



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: **mgr inż. Małgorzata Bodnar**
Dyscyplina naukowa: **Nauki chemiczne/chemia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

**Sprawdzenie możliwości wytworzenia
kandydata na materiał odniesienia
na potrzeby specjacji selenu
w oparciu o wzbogacone w selen kielki roślin**

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

**Evaluation of candidate reference material
obtained from selenium-enriched sprouts
for the purpose of selenium speciation analysis**

Promotor

podpis

prof. dr hab. inż. Piotr Konieczka

Gdańsk, rok 2016

*Składam najserdeczniejsze podziękowania
Mojemu promotorowi
Panu **prof. dr hab. inż. Piotrowi Konieczce**
za poświęcony czas, przekazaną wiedzę
i nieocenioną pomoc w realizacji niniejszej pracy.
Cierpliwość i zaangażowanie Pana Profesora
oraz mobilizowanie mnie do pracy
stworzyły znakomite warunki, w których mogłam
rozwijać się naukowo.*

*Dziękuję również
Panu **prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi**
za cenne wskazówki, życzliwość
oraz umożliwienie realizacji niniejszej pracy*

*Dziękuję **Pracownikom, Koleżankom i Kolegom**
z **Katedry Chemii Analitycznej**
za stworzenie milej atmosfery pracy*

*Pragnę podziękować wszystkim
Moim Przyjaciółom,
którym nie znudziło się pytać „Jak tam doktorat?”*

*Szczególnie dziękuję
Moim Rodzicom
oraz **chłopakowi Bartkowi**
za miłość, wsparcie oraz wiarę w moje możliwości,
które dodają siły do działania*

Spis treści

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	4
1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1.1 Wstęp	10
1.1.1 Historia selenu	10
1.1.2 Selen i jego związki	12
1.1.3 Selenobiałka.....	14
1.2 Rola selenu w organizmie człowieka	19
1.2.1 Przebieg procesu metabolizmu związków selenu w organizmie człowieka	19
1.2.2 Substancje antagonistyczne i synergistyczne w stosunku do selenu	21
1.2.3 Spożycie selenu w różnych krajach a jego zalecana dzienna dawka.....	22
1.2.4 Konsekwencje niedoboru selenu w organizmie człowieka	24
1.2.5 Selen a zdrowie człowieka.....	26
1.2.5.1 Choroby nowotworowe.....	27
1.2.5.2 Choroby układu sercowo - naczyniowego	31
1.2.5.3 Działanie immunostymulujące.....	31
1.2.5.4 Niedoczynność tarczycy	32
1.2.5.5 AIDS.....	32
1.2.5.6 Cięża.....	32
1.2.5.7 Płodność mężczyzn.....	33
1.2.6 Toksyczne właściwości selenu – nadmiar selenu w organizmie	33
1.3 Rola selenu w roślinach	34
1.3.1 Formy występowania selenu w roślinach	34
1.3.2 Przebieg procesu metabolizmu selenu w roślinach	36
1.3.3 Zdolność roślin do kumulacji selenu	37
1.4 Selen w żywności	40
1.4.1 Produkty zawierające największą ilość selenu	40
1.4.2 Biodostępność związków selenu obecnych w produktach żywnościowych	41
1.5 Suplementacja jako sposób wzbogacania diety w selen	44
1.6 Metody analityczne służące do oznaczania selenu	45
1.7 Materiały odniesienia	54
1.7.1 Definicje materiałów odniesienia	55
1.7.2 Materiały odniesienia w QA/QC	58
1.7.3 Wytwarzanie materiałów odniesienia.....	59
1.7.4 Wybór odpowiedniego materiału odniesienia	62
1.7.5 Parametry charakteryzujące materiał odniesienia	63
1.7.5.1 Jednorodność.....	63
1.7.5.2 Trwałość	64

1.7.5.3	<i>Wartość odniesienia</i>	65
1.7.6	Raport certyfikacyjny	67
1.7.7	Zasady stosowania materiałów odniesienia	68
1.7.8	Materiały odniesienia na potrzeby oznaczania selenu oraz jego organicznych związków	68
2	CEL PRACY	71
3	CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA	74
3.1	Materiały i aparatura	74
3.1.1	Materiały	74
3.1.2	Aparatura	74
3.2	Przygotowanie próbek	75
3.2.1	Kielkowanie	75
3.2.2	Liofilizacja	76
3.3	Procedura oznaczania zawartości całkowitego selenu oraz jego związków organicznych w próbkach kielków roślin	77
3.3.1	Oznaczenie całkowitej zawartości selenu w próbkach kielków roślin	77
3.3.2	Specjacja selenu w próbkach kielków roślin	78
3.3.3	Wstępne badanie trwałości selenu w próbkach kielków roślin	79
3.3.4	Wstępne badanie jednorodności	80
4	WYNIKI	81
4.1	Wyznaczenie parametrów walidacyjnych dla procedury oznaczania całkowitej zawartości selenu z wykorzystaniem techniki GF - AAS	81
4.2	Oznaczenie całkowitej zawartości selenu w próbkach kielków roślin	83
4.3	Wstępne badanie trwałości selenu w kielkach roślin	86
4.3.1	Wstępne badanie trwałości zawartości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4	86
4.3.2	Wstępne badanie trwałości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 lub 10 mg/l Na_2SeO_3 – rok badawczy 2013/2014	90
4.3.3	Wstępne badanie trwałości zawartości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 – rok badawczy 2014/2015	101
4.3.4	Podsumowanie badań trwałości próbek kielków roślin	123
4.4	Wstępne badanie jednorodności próbek kielków roślin	123
4.4.1	Wstępne badanie jednorodności próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4	124
4.4.2	Wstępne badanie jednorodności wewnątrzpakowaniowej próbek kielków gorczyca białej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3	125
4.5	Analiza specjacyjna selenu w próbkach kielków roślin	126
4.5.1	Analiza specjacyjna selenu w próbkach kielków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4	126

4.5.2	Analiza specjacyjna selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na ₂ SeO ₃	127
4.5.3	Badanie trwałości zawartości związków organicznych selenu (SeMetSeCys, SeMet) oraz Se (IV) w próbkach kiełków brokułów, gorczycy białej i kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na ₂ SeO ₃	130
4.5.4	Zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kiełków roślin a stężeniem roztworu użytego podczas kiełkowania.....	137
5	WNIOSKI I PODSUMOWANIE.....	140
	LITERATURA	147
	STRESZCZENIE	163
	ABSTRACT	164
	SPIS DOROBKU NAUKOWEGO	165
	ZAŁĄCZNIKI	169

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

SKRÓT/ AKRONIM	Pełna nazwa w języku angielskim	Pełna nazwa w języku polskim
ZWIĄZKI SELENU		
DMSe	Dimethyl selenide	Selenek dimetylu
DMDSe	Dimethyl diselenide	Diselenek dimetylu
DMSP	Dimethylpropionate	Propionian dimetylu
GSH	Reduced glutathione	Zredukowany glutation
GSH-Px	Glutathione peroxidase	Peroksydaza glutationowa
GS-Se²⁻	Conjugated selenide	Selenek sprzężony z glutationem
GS-SeH	Glutathionylselenol	Glutationyloselenol
GS-SeO₃⁻	Conjugated selenite	Selenian (IV) sprzężony z glutationem
GS-Se-SG	Selenodiglutathione	Selenodiglutation
HCys	Homocysteine	Homocysteina
Met	Methionine	Metionina
Met-tRNA	Methionine and tRNA complex	Kompleks metioniny z tRNA
OAS	O-acetylserine	acetylohomoseryna
SeBet	Selenobetaine	Selenobetaina
SeCys	Selenocysteine	Selenocysteina
Se-cys tRNA_{UGA}/ SeCys-tRNA	Selenocysteine and tRNA _{UGA} complex	Kompleks selenocysteiny z tRNA _{UGA}
SeMetSeCys/ CH₃SeCys/ SeMeSeCys/ SeMetCys	Selenomethylselenocysteine	Selenometyloselenocysteina
Se-Me-SeMet	Selenomethylselenomethionine	Selenometyloselenometionina
SeMet	Selenomethionine	Selenometionina
SeMetO	Selenomethionine oxide	Tlenek selenometioniny
SeMetSeO/ Se-MetSeCys-Se- tlenek	Selenomethionine selenoxide	Selenotlenek selenometioniny

SeMet-tRNA	Selenomethionine and tRNA complex	Kompleks selenometioniny z tRNA
Se-sugar-A	Selenosugar A	Selenocukier A
Se-sugar-B	Selenosugar B	Selenocukier B
γ-glutamyl-SeMetSeCys/		
γ-glutamyl-CH₃SeCys/	γ -glutamyl-selenomethylselenocysteine	γ -glutamylo-selenometyloselenocysteina
glutamylo-SeMetCys		
POZOSTAŁE ZWIĄZKI CHEMICZNE		
T₃	Triiodothyronine	Trijodotyronina
T₄	Thyroxine	Tyroksyna
tRNA^{Met}	Methionine Transfer Ribonucleic Acid	Transportujący metioninę kwas rybonukleinowy
tRNA^{UGA}	UGA codon Transfer Ribonucleic Acid	Transportujący kodon UGA kwas rybonukleinowy
UGA	Codon stop	Kodon stop
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozynotrójfosforan
APS	Adenosine Phosphosulfate	Adenozynofosfosiarczan
PROCEDURY ANALITYCZNE		
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna
AED	Atomic Emission Detector	Detektor emisji atomowej
AES	Atomic Emission Spectrometry	Atomowa spektrometria emisyjna
AFS	Atomic Fluorescence Spectroscopy	Atomowa spektroskopia fluorescencyjna
CSV	Cathodic Stripping Voltammetry	Katodowa woltamperometria strippingowa
DLLME	Dispersive Liquid Liquid Microextraction	Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz
DPCSV	Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry	Impulsowo-różnicowa katodowa woltamperometria strippingowa
ECD	Electron Capture Detector	Detektor wychwytu elektronów

ESI	Electrospray Ionisation	Jonizacja przez rozpylenie w polu elektrycznym
ET - AAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure	Spektroskopia absorpcji promieniowania rentgenowskiego w obszarze subtelnej struktury ponadkrawędziowej
FI	Flow Injection System	System wstrzykowo - przepływowy
FID	Flame Ionization Detector	Detektor płomieniowo - jonizacyjny
FPD	Flame Photometric Detector	Detektor płomieniowo - fotometryczny
GC	Gas Chromatography	Chromatografia gazowa
GF - AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry	Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w kuwecie grafitowej
HG	Hydride Generation	Generacja wodorków
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
ICP - MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej
INAA	Instrumental Neutron Activation Analysis	Instrumentalna neutronowa analiza aktywacyjna
IPC IP	Ion Par Chromatography	Chromatografia par jonowych
MIP	Microwave Induced Plasma	Plazma indukowana za pomocą promieniowania mikrofalowego
MS	Mass Spectrometer	Spektrometr mas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandemowa spektrometria mas
OES	Optical Emission Spectroscopy	Optyczna spektroskopia emisyjna
Q-TOF	Quadrupol Time of Flight	Kwadrupolowy analizator czasu przelotu
RPC RP	Reversed-Phase Chromatography	Chromatografia w układzie faz odwróconych
SAX	Strong Anion Exchanger	Silny wymiennicz jonowy

SPME	Solid-Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stałej
UV	Ultraviolet	Nadfioletowy
UV – VIS	Ultraviolet – visible spectroscopy	Spektroskopia w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure	Spektroskopia w obszarze bliskim progu absorpcji promieniowania rentgenowskiego
KONTROLA I ZAPEWNIENIE JAKOŚCI		
BAM	Federal Institute for Materials Research and Testing	Federalny Instytut Badań i Kontroli Materiałów
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry	Współpraca na rzecz Międzynarodowej Spójności pomiarowej w Chemii Analitycznej
CRM	Certified reference material	Certyfikowany materiał odniesienia
ERM	European Reference Material	Europejski materiał odniesienia
GLP	Good Laboratory Practice	Dobra Praktyka Laboratoryjna
GUM	Guide to the expression of Uncertainty in Measurement	Poradnik wyrażania Niepewności Pomiarów
ICHtJ	-	Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ILAC	International Laboratory Accreditation Conference	Międzynarodowa Organizacja Współpracy w zakresie Akredytacji Laboratoriów
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements	Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów
ISO	International Organization for Standardization	Międzynarodowa Organizacja Standaryzacyjna
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
LGC	Laboratory of the Government Chemist	Rządowe Laboratorium Chemika
LRM	Laboratory Reference Material	Laboratoryjny materiał odniesienia
NIST	National Institute of Standards and Technology	Narodowy Instytut Wzorców i Technologii

NRC	National Research Council of Canada	Krajowa Rada Badawcza Kanady
PRM	Primary Reference Material	Pierwotny materiał odniesienia
QA/QC	Quality Assurance/Quality Control	Zapewnienie i Kontrola Jakości
QCM	Quality Control Material	Materiał do kontroli jakości
RM	Reference material	Materiał odniesienia
SecRM	Secondary Reference Material	Wtórny materiał odniesienia
POZOSTAŁE		
AI	Adequate Intake	Odpowiednie spożycie
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	Zespół nabytego niedoboru odporności
ANOVA	Analysis of variance	Analiza wariancji
CV	Coefficient of variation	Współczynnik zmienności
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
DRI	Dietary Reference Intake	Zalecana dawka żywieniowa
EAR	Estimated Average Requirement	Średnie dobowe zapotrzebowanie
ETS	Environmental Tobacco Smoke	Środowiskowy dym tytoniowy
f df	Degrees of freedom	Liczba stopni swobody
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1	Ludzki wirus niedoboru odporności typu 1
LDL	Low Density Lipoproteins	Lipoproteina niskiej gęstości
LOD	Limit Of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit Of Quantitation	Granica oznaczalności
MDL	Method Detection Limit	Granica wykrywalności metody
MQL	Method Quantitation Limit	Granica oznaczalności metody
NPC	Nutritional Prevention Cancer	Zapobieganie nowotworom poprzez odżywianie
PE	Polyethylene	Polietylen
ppb	Parts per billion	Części na miliard
ppm	Parts per million	Części na milion

RDA	Recommended Dietary Allowance	Zalecane dzienne spożycie
RNA	Ribonucleic acid	Kwas rybonukleinowy
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktywne formy tlenu
s	Standard deviation	Odchylenie standardowe
s.m.	-	Sucha masa
SELECT	Selenium and Vitamin C Cancer Prevention Trial	Eksperyment polegający na sprawdzeniu możliwości selenu i witaminy C w zapobieganiu nowotworom
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome	Zespół Nagłej Śmierci Niemowląt
SS	Sum of Squares	Suma kwadratów
UL	Tolerable Upper Intake Level	Najwyższy bezpieczny poziom spożycia

1 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1 Wstęp

1.1.1 Historia selenu

Selen jest pierwiastkiem chemicznym z grupy niemetali w układzie okresowym. Jego historia odkrycia oraz poznawania właściwości jest bardzo ciekawa. Na początku selen uważany był za pierwiastek trujący, a dopiero 140 lat od jego odkrycia wykazano pozytywne oddziaływanie tego pierwiastka na organizmy żywe. W tabeli 1 przedstawiono informacje o kamieniach milowych w rozwoju wiedzy na temat selenu i jego związków.

Tabela 1. Kamienie milowe w rozwoju wiedzy na temat selenu i jego związków

Data	Autor/ autorzy	Wydarzenie	Litera- tura
XIII w.	Arnold de Villanova	W książce Rosarium Philosophorum wspomniał o „czerwonej siarce”, którą odkrył na ścianach pomieszczeń, w których odparowywano siarkę	[1]
XIII w.	Marco Polo	W trakcie podróży dookoła świata opisał trującą roślinę, występującą w Chinach, która powodowała u zwierząt zjadających ją „odpadanie kopyt” (prawdopodobnie była to roślina należąca do tzw. „hiperakumulatorów” selenu)	[1]
1817 r.	Jöns Jacob Berzelius	Badając „czerwonawy osad” powstały w fabryce produkującej kwas siarkowy odkrył substancję o właściwościach zbliżonych do telluru; Nowo odkryty pierwiastek nazwał „selen” (gr. „selene” – Księżyc) ze względu na występowanie obok telluru (łac. „tellus” – Ziemia)	[1]
1935 r.	Beath i in.	Opisali chorobę zwierząt gospodarskich – błędnie nazywaną „chorobą alkaliczną” – spowodowaną spożywaniem roślin z rodziny <i>Astragalus</i> , które mają zdolność do kumulacji bardzo dużych ilości selenu z gleby	[2]
1937 r.	A. L. Moxon	Opublikował raport, w którym zidentyfikował selen jako czynnik toksyczny w niektórych roślinach szkodliwych dla zwierząt gospodarskich na terenach zachodnich Dakoty (USA)	[3]
1943 r.	Nelson i in.	Pierwsza wzmianka sugerująca, że selen jest rakotwórczy	[4]
1954 r.	J. Pinsent	Opisał wyniki badań, w których opisał istotność selenu dla bakterii	[5]
1957 r.	K. Schwarz i C. M. Foltz	Opisali wyniki badań, w których zidentyfikowali pierwszą chorobę, w której selen działa zapobiegawczo; pierwszy raz selen został opisany jako istotny dla zdrowia mikroskładnik	[6]

Tabela 1 c.d.

1957 r.	Patterson i in.	Odkryli związek pomiędzy niedoborem selenu a „skazą wysiękową” u drobiu	[7]
1957 r.	Eggert i in.	Odkryli związek pomiędzy niedoborem selenu a „ <i>hepatosis dietetica</i> ” (uszkodzenie wątroby) u świń	[8]
1958 r.	Muth i in.	Odkryli związek pomiędzy niedoborem selenu a chorobą „białych mięśni” u cieląt i jagniąt	[9]
1969 r.	Thompson i Scott	Odkryli związek pomiędzy niedoborem selenu a zwyrodnieniem trzustki u drobiu	[10]
1969 r.	Rotruck i in.	Opisali wyniki badań, w których potwierdzili, że selen jest częścią enzymu peroksydazy glutationowej	[11]
1969 r.	Shamburger i Frost	Opisali wyniki badań demograficznych, w których zasugerowali, że selen może działać przeciwrakotwórczo	[12]
1969 r.	Kuchel i Buckley	Opracowali pierwsze selenowe suplementy diety dla zwierząt gospodarskich	[13]
1986 r.	Koivistonen i Huttunen	Rząd Finlandii podejmuje decyzję o dodawaniu do nawozów selenu	[14]
1988 r.	Yang i in.	Opisali choroby Keshan i Kasin-Beck, występujące u mieszkańców Chin, spowodowane przez niedobór selenu	[15]
1989 r.	Duthie i in.	Opisali wyniki badań, w których zasugerowali, że suplementacja za pomocą selenu może chronić przed chorobami układu sercowo - naczyniowego	[16]
1994 r.	Schrauzer	Opisał pozytywny wpływ suplementacji za pomocą selenu na AIDS	[17]
1996 r.	Clark i in.	Podczas eksperymentu NPC wykazano, że suplementacja selenem powoduje redukcję w częstości występowania raka prostaty, płuc i jelita grubego	[18]
1997 r.	Combs	Zasugerował, że suplementacja selenem może być czynnikiem chroniącym przed niektórymi rodzajami nowotworów	[19]
2000 r.	Levander	Wykazał, że selen może być czynnikiem chroniącym przed zakażeniami wirusowymi	[20]
2001 – 2014 r.	SELECT	Wyniki badań opublikowane w latach 2008-2014 wykazały, że suplementacja za pomocą SeMet i/lub witaminy E nie powoduje istotnych różnic w częstości występowania raka prostaty. Dodatkowo stwierdzono, że suplementacja może zwiększać ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2, łysienia i zapalenia skóry.	[21 - 24]
2006 r.	Mester i in.	Do obiegu trafia pierwszy certyfikowany materiał odniesienia do specjacji SeMet – SELM-1 – w postaci wzbogaconych w selen drożdży; produkowany przez NRC	[25]
2011 r.		Początek produkcji materiału odniesienia do specjacji SeMet - ERM-BC210a – w postaci mąki pszennej; produkowany przez LGC	

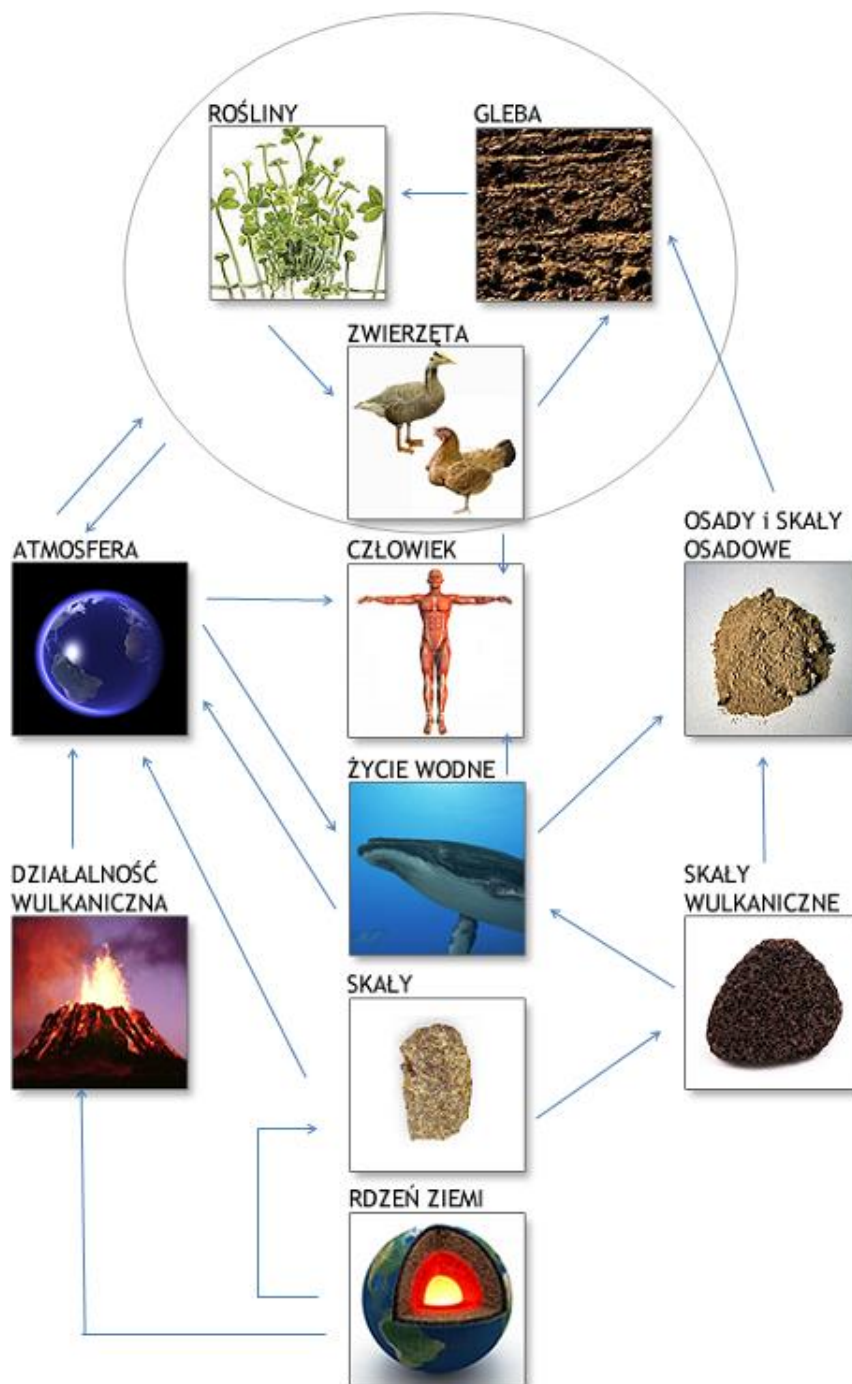
1.1.2 Selen i jego związki

Ze względu na zawartość tego pierwiastka w skorupie ziemskiej – (0,05 ppm) – selen traktowany jest, jako mikrośladnik lub śladnik. Mimo to występuje w wielu składnikach przyrody takich jak: skały, minerały, gleby, materiały pochodzenia wulkanicznego, złoża siarki i siarczków, węgiel i popiół węglowy oraz w pyle [26, 27]. Selen występuje we wszystkich elementach nieożywionego środowiska (hydrosferze, litosferze, atmosferze), a także w biosferze. Może występować zarówno w postaci związków organicznych jak i połączeń nieorganicznych [28], przy czym formy nieorganiczne są bardziej toksyczne niż formy organiczne [29]. Do związków nieorganicznych należą: selen elementarny, selenki metali oraz seleniany (IV) i (VI). Natomiast do połączeń organicznych zaliczyć należy związki, w których selen jest bezpośrednio połączony z węglem (związki metylowe, aminokwasy selenowe) oraz związki, w których selen połączony jest z węglem za pomocą wiązań kowalencyjnych (selenometionina, selenocysteina) [30]. W próbkach środowiskowych selen może występować, jako selenian (IV), selenian (VI), $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$, a w próbkach biologicznych najczęściej w formie selenocysteiny, selenometioniny i selenometyloselenocysteiny [29]. Informacje o niektórych nieorganicznych i organicznych związkach selenu zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Organiczne i nieorganiczne związki selenu [31 - 33]

Wzór chemiczny	Nazwa
H_2Se	Selenowódór / Selenek diwodoru
SeO_2	Dwutlenek selenu
H_2SeO_3	Kwas selenowy (IV)
H_2SeO_4	Kwas selenowy (VI)
GS-Se-H	Glutationyloselenol
GS-Se-SG	Selenodiglutation
$\text{CH}_3\text{-Se-H}$	Metyloselenol
$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	Dimetyloselenek / selenek dimetylu
$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$	Jon trimetyloseleniowy
$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenometionina
$\text{H-Se-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenocysteina
$\text{HCOO-(NH}_2\text{)CHCH}_2\text{-Se-Se-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenocystyna
$\text{H-Se-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenohomocysteina
$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenometyloselenocysteina
$\text{HCOO-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$	Selenocystatonina

Związki selenu podlegają biologicznej metylacji – procesowi, w którym udział biorą rośliny wyższe, grzyby oraz mikroorganizmy. Do jej produktów należą alkilowe pochodne selenu np. $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ - selenek dimetylu, czy $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ - diselenek dimetylu. Lotne produkty metylacji odgrywają istotną rolę w geochemicznym obiegu tego pierwiastka [34], jak to przedstawiono schematycznie na rysunku 1.



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie obiegu selenu w przyrodzie [35]

Organiczne i nieorganiczne związki selenu znalazły także zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. W tabeli 3 zestawiono informacje o zastosowaniach przemysłowych związków selenu.

Tabela 3. Zastosowania przemysłowe związków selenu [26, 35 - 37]

Związek/ki selenu	Sfera działalności człowieka	Opis zastosowania
-	Elektronika	Produkcja półprzewodników, fotoogniw, prostowników
Na ₂ SeO ₃ (NH ₄) ₂ SeO ₃	Przemysł szklarski	Barwienie szkła
Se SeO ₂	Przemysł chemiczny	Katalizator
SeOCl ₂	Przemysł gumowy	Przyspieszanie procesu wulkanizacji
Na ₂ SeO ₄ Na ₂ SeO ₃ SeMet	Przemysł farmaceutyczny	Składnik suplementów diety lub leków przeciwdziałających chorobom spowodowanym niedoborem selenu
Na ₂ SeO ₄ Na ₂ SeO ₃	Rolnictwo	Insektycyd lub składnik nawozów sztucznych
CdSe		W fotokomórkach, kserokopiarkach, sygnalizatorach świetlnych
CuSeO ₄		Koloryzator stopów miedzi

Działalność wymienionych gałęzi przemysłu, a także procesy spalania węgla i produktów przeróbki ropy naftowej, wytapianie siarczkowych rud miedzi i ołowiu [37, 38] stanowią antropogeniczne źródła zanieczyszczenia środowiska przez selen.

1.1.3 Selenobiałka

Selen dostarczany do organizmu poprzez odpowiednią dietę pełni funkcje prozdrowotne, głównie przez jego włączenie do cysteiny i syntezę 21 aminokwasu – selenocysteiny, obecnej w wielu białkach enzymatycznych. Białka, które zawierają przynajmniej jedną resztę selenocysteinową określa się jako selenobiałka [39]. Selenobiałka są obecne we wszystkich trzech domenach życia: bakteriach, archeonach oraz jądrowcach (eukaryota). Do organizmów, które nie zawierają selenobiałek należą drożdże oraz rośliny wyższe. Do tej pory odkryto 30 selenobiałek [40]. Ludzki proteom zawiera 25 selenobiałek [41]: pięć peroksydaz glutationowych, trzy dejodazy jodotyroniny, trzy reduktazy tioredoksyny oraz selenobiałka P, W, 15kD, M, I, N, O, H, T, K, S, R, SPS2 [42].

Selenobiałka spełniają ważne funkcje w organizmach żywych, przede wszystkim:

- a) stanowią niezbędne enzymy przeciwutleniające,
- b) regulują syntezę hormonu tarczycy,
- c) stanowią białka strukturalne biorące udział w syntezie plemników,
- d) mogą pełnić funkcję ochronną przed niektórymi rodzajami wirusów (w tym HIV),
- e) poprawiają funkcjonowanie układu sercowo - naczyniowego,
- f) zapobiegają neurodegeneracji,
- g) biorą udział w metabolizmie mięśni,
- h) prawdopodobnie mogą brać udział w ochronie przeciwnowotworowej [39].

W tabeli 4 przedstawiono informacje na temat selenobiałek, ich funkcji oraz umiejscowienia w organizmie żywym.

Tabela 4. Selenobiałka, ich funkcje i umiejscowienie w organizmach żywych [35, 39, 43 - 50]

Selenobiałko	Skrót	Funkcja w organizmie żywym	Miejsce występowania w organizmie
Peroksydaza glutationowa cytolozowa lub klasyczna	GPx1, cGSH-Px	Redukuje nadtlenek wodoru i nadtlarki organiczne odpowiednio do wody i alkoholu, dzięki czemu chroni przed uszkodzeniem błon komórkowych. Nie wykazuje aktywności w stosunku do wodoronadtlenków fosfolipidów.	Erytrocyty, wątroba, nerki, płuca
Peroksydaza glutationowa żołądkowo-jelitowa	GPx2, GI-GSH-Px	Wykazuje aktywność w stosunku do wolnych wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych i nadtlenu wodoru, pełniąc funkcję w metabolizmie spożywanych nadtlenuków tłuszczów. Może mieć również znaczenie w ochronie organizmu przed rakiem jelita grubego.	Tkanki przewodu pokarmowego, wątroba
Peroksydaza glutationowa osoczowa lub pozakomórkowa	GPx3, eGSH-Px	Chroni błony komórkowe, redukując nadtlenek wodoru i nadtlarki organiczne w obecności glutationu. W przeciwieństwie do GPx1 wykazuje aktywność wobec wodoronadtlenków fosfolipidów. Dodatkowo kontroluje poziom nadtlenu wodoru w tarczycy, co jest konieczne do syntezy hormonów tarczycy.	Płyn zewnątrzkomórkowy, osocze, wątroba, nerki, serce, płuca, tarczyca, przewód pokarmowy, łożysko
Peroksydaza glutationowa fosfolipidowa	GPx4, PH-GSH-Px	Rozkłada wodoronadtlenki fosfolipidowe, wodoronadtlenki tyminy, cholesterol i jego estry. Stanowi czynnik w systemie obronnym przeciwko oksydacyjnemu niszczeniu biomembran, pod warunkiem, że membrany zawierają odpowiednią ilość witaminy E. Dodatkowo bierze udział w procesie spermatogenezy. Zamienia wodoronadtlenki cholesterolu i estrów cholesterolu w mniej toksyczne pochodne. Chroni DNA przed uszkodzeniami spowodowanymi utlenieniem.	Mitochondria, komórki cystolu, jądra komórkowe
Peroksydaza glutationowa jąder plemników	GPx5, SnGSH-Px	Funkcje dotąd nie zostały poznane.	
Peroksydaza glutationowa 6	GPx6	Selenobiałko występujące tylko u ludzi. Funkcje dotąd nie zostały poznane.	
Peroksydaza glutationowa 7	GPx7	Pełni funkcję przeciwutleniającą i prawdopodobnie bierze udział w procesie zwijania (fałdowania)** białek.	Retikulum endoplazmatyczne*

Tabela 4 c.d.

Peroksydaza glutationowa 8	GPx8	Prawdopodobnie bierze udział w procesie zwijania (fałdowania) białek.	Retikulum endoplazmatyczne
Dejodaza jodotyroniny typu 1	D1, 5'DI	Dostarcza aktywnej formy hormonu tarczycy 3,3'-5'trijodotyroniny (T ₃) w osoczu, inaktywuje T ₃ i T ₄ oraz eliminuje z krążenia odwrotną T ₃	Wątroba, nerki, tarczyca, brunatna tkanka tłuszczowa
Dejodaza jodotyroniny typu 2	D2, 5'DII	Katalizuje odjodowanie T ₄ do T ₃ oraz odwrotnej T ₃ do T ₂ oraz bierze udział w wewnątrzkomórkowym wytwarzaniu T ₃ . Pełni istotną rolę w procesie aktywacji hormonów tarczycy.	Centralny układ nerwowy, mięśnie szkieletowe, brunatna tkanka tłuszczowa
Dejodaza jodotyroniny typu 3	D3, 5'DIII	Katalizuje odjodowanie pierścienia tyrozyłowego	Centralny układ nerwowy, płód, łożysko, macica
Reduktaza tioredoksyny 1	TrxR1	Uważane są one jako jeden z głównych regulatorów reakcji redox w komórkach ssaków. TrxR1 pełni główną rolę w embriogenezie, a TrxR2 zapewnia ochronę przed nadtlenkiem wodoru produkowanym przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. Dodatkowo reduktazy katalizują reakcję tioredoksyny oraz są odpowiedzialne za redukcję rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów i utrzymanie właściwego potencjału redox wewnątrz komórki.	Cytozol
Reduktaza tioredoksyny 2	TrxR2		Mitochondria
Reduktaza tioredoksyny 3	TrxR3		Jądra
Selenobiałko P	SeP	Jego podstawową funkcją jest udział w magazynowaniu i transporcie selenu z osocza do komórek (wiąże do 60 % selenu zawartego w osoczu) oraz utrzymanie homeostazy procesów biologicznych. Dodatkowo, jako przeciwutleniacz chroni przed wirusem <i>Hepatitis B</i> , który wywołuje peroksydację lipidów. Eliminuje nadtlarki azotowe, powstałe w wyniku reakcji jonów nadtlenkowych z kwasem azotowym.	Mózg, wątroba, jądra
Syntetaza selenofosforanowa 2	SPS2	Katalizuje reakcję selenu z ATP. W reakcji tej powstaje selenofosforan, który stanowi donor selenu w biosyntezie selenocysteiny i selenobiałek.	Nerki, wątroba, jądra

Tabela 4 c.d.

Selenobiałko R	SelR, MrsB1	Zapewnia ochronę przeciwko wolnym rodnikom powodującym stres oksydacyjny. Bierze udział w metabolizmie metioniny oraz procesach naprawy białek.	Wątroba, nerki
Selenobiałko W	SelW	Bierze udział w metabolizmie mięśni. Przeciwtleniacz w komórkach rakowych powstających w płucach.	Prostata, mózg, jelito grube, serce, mięśnie szkieletowe
Selenobiałko N	SelN	Bierze udział w metabolizmie mięśni.	Większość tkanek
Selenobiałko K	SelK	Prawdopodobne działanie przeciwutleniające.	Śledziona, komórki układu odpornościowego
Selenobiałko H	SelH	Bierze udział w regulacji genu odpowiedzialnego za syntezę glutationu. Pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego.	Śledziona, mózg, jądra komórkowe
Selenobiałko M	SelM	Bierze udział w procesie zwijania (fałdowania) białek. Pełni funkcję przeciwutleniającą.	Retikulum endoplazmatyczne
Selenobiałko 15kD	Sel15	Bierze udział w procesie zwijania (fałdowania) białek.	Retikulum endoplazmatyczne
Selenobiałko S	SelS	Eliminuje nieaktywne białka z retikulum. Bierze udział w procesie regulacji stanów zapalnych.	Membrany osocza, retikulum endoplazmatyczne
Selenobiałko osłonki mitochondrialnej***	MCSep	Pełni funkcję magazynującą dla GPx4.	Osłonka mitochondrialna plemnika
Selenobiałko T Selenobiałko O Selenobiałko I	SelT SelO SelI	Funkcje dotąd nie zostały poznane.	Retikulum endoplazmatyczne
Selenobiałko V	SelV	Funkcje dotąd nie zostały poznane.	

*Siateczka śródplazmatyczna lub wewnątrzplazmatyczna – wewnątrzkomórkowy i międzykomórkowy system kanałów odizolowanych od cytoplazmy podstawowej membranami biologicznymi.

** proces fizyczny polegający na formowaniu przez polipeptyd wysoko zorganizowanej struktury o charakterystycznej i stabilnej konformacji

*** Każde mitochondrium jest otoczone torebką białkową, która zawiera białka siarczkowe i selenowe oraz enzymatyczne o charakterze przeciwutleniającym

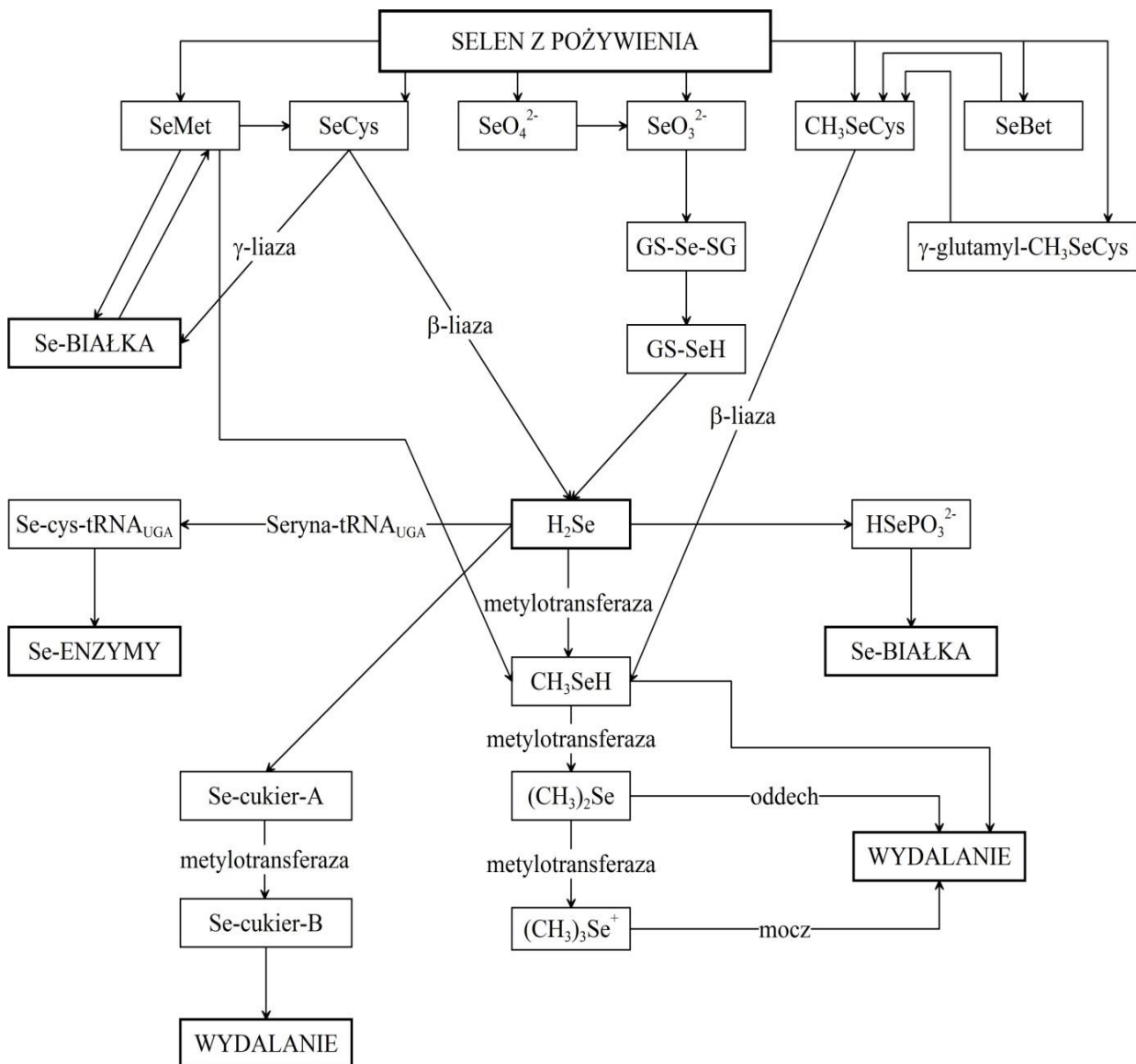
1.2 Rola selenu w organizmie człowieka

Od pewnego czasu przyjmuje się za pewnik, że spożywanie produktów zawierających stosunkowo niskie stężenia selenu jest korzystne, natomiast wysokie stężenia tego pierwiastka wywołują efekt toksyczny. Zakres pomiędzy niedoborem, niezbędną ilością oraz nadmiarem selenu jest bardzo wąski [51]. Zarówno niedobór jak i nadmiar selenu w organizmie są niebezpieczne. Zawartość selenu w organizmach żywych warunkowana jest jego biodostępnością, która zależy od formy jego występowania, przy czym forma organiczna jest bardziej biodostępna dla człowieka niż forma nieorganiczna [30, 52].

1.2.1 Przebieg procesu metabolizmu związków selenu w organizmie człowieka

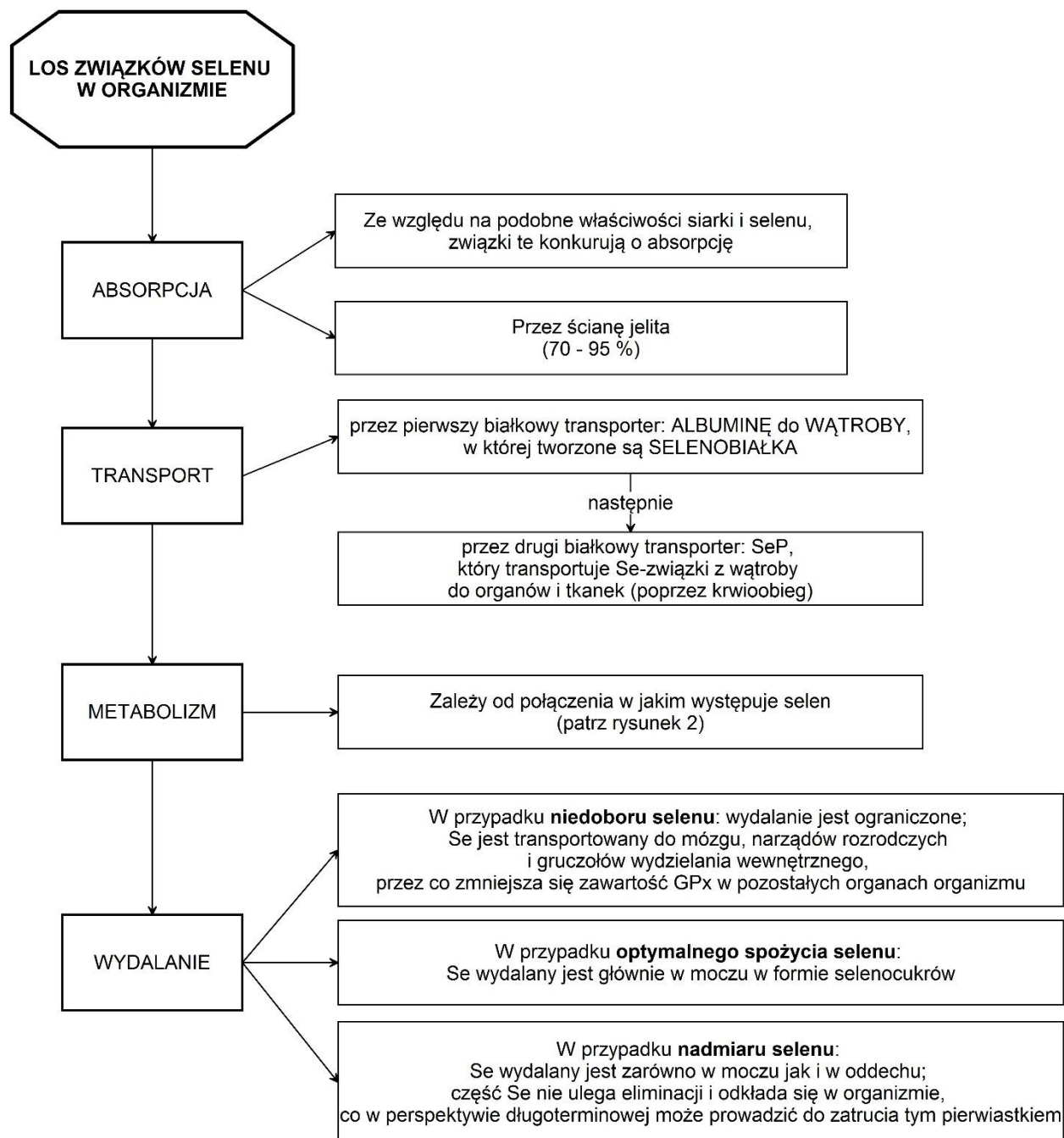
Wiedza na temat metabolizmu związków selenu w organizmie człowieka, którego schemat przedstawiono na rysunku 2, pochodzi głównie z wyników badań przeprowadzonych na myszach i szczurach [53]. Selen trafiający do organizmu człowieka razem z dietą może występować w formie organicznej lub nieorganicznej. Selenometionina może być bezpośrednio wbudowana do białek, ulegać przekształceniu do SeCys lub ulegać eliminacji do CH_3SeH (poprzez α, γ -eliminację katalizowaną przez γ -liazę). SeCys może być włączona do białek lub ulegać przekształceniu do H_2Se (przez β -liażę SeCys). Selen może być także dostarczony do organizmu z produktów roślinnych w formie SeMetSeCys, która metabolizowana jest bezpośrednio do CH_3SeH (przez β -liażę). Nieorganiczne formy selenu podlegają w organizmie przemianom do H_2Se – połączenia selenu, które pełni główną rolę w metabolizmie tego pierwiastka. Związek ten może być przekształcony do:

- Se-cys-tRNA_{UGA}, który bierze udział w syntezie selenobiałek,
- HSePO_3^{2-} , który następnie bierze udział w syntezie selenobiałek,
- selenocukru A i następnie poprzez proces metylacji do selenocukru B, który jest wydalany z organizmu z moczem,
- toksycznego SeO_2 ,
- $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, lotnego związku wydalanego z organizmu z oddechem,
- $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$, który wydalany jest z moczem.



Rysunek 2. Schemat przebiegu procesu metabolizmu związków selenu u ludzi i zwierząt [33, 54 - 60]

Selen, niezależnie od połączenia w którym występuje, może w procesie metabolizmu zostać włączony do selenobiałek lub wydalony z organizmu, głównie z moczem. Los związków selenu w organizmie przedstawiono schematycznie na rysunku 3.





Rysunek 3. Los związków seleniu w organizmie [61]

1.2.2 Substancje antagonistyczne i synergistyczne w stosunku do seleniu

Obecność innych składników, które mogą wywoływać efekt synergistyczny lub antagonistyczny jest również bardzo istotna. W tabeli 5 zestawiono informacje o metalach i substancjach, które wywołują efekt synergistyczny lub efekt antagonistyczny w przypadku współwystępowania w organizmie żywym razem z selenem.

Tabela 5. Substancje antagonistyczne i synergistyczne w stosunku do selenu [34, 36]

Pierwiastek	Efekt antagonistyczny	Substancja	Efekt synergistyczny
S		Wit. E	
F Zn		Wit. B ₆	
As Cu		Wit. C	
Tl Pb		I	
Hg Sn		Metioneina (białko małowcząsteczkowe)	
Fe Cd		Co, Cu	
Mn Mg			
Wit. C, A, K			

Przykładem występowania efektu antagonistycznego jest oddziaływanie między selenem i arsenem. Niedobór selenu w organizmie może powodować zwiększoną kumulację arsenu w wątrobie, schorzenia skóry, płuc i serca oraz choroby tarczycy. Niedobór selenu u zwierząt może powodować zmniejszenie wydalania organicznych i nieorganicznych form arsenu. Wyniki badań wykazały, że u kobiet narażonych na działanie arsenu w skutek spożywania skażonej wody, kobiet chorych na raka i cierpiących na zmiany skórne poziom selenu we krwi i we włosach jest dużo niższy niż u kobiet nienarażonych, natomiast wzrasta poziom arsenu [62].

Efekt synergistyczny widoczny jest w obecności witaminy E. Selen w połączeniu z tą witaminą wykazuje działanie immunostymulujące (pobudza czynności układu immunologicznego) [31]. Wspólne działanie tych dwóch związków może zapobiegać uszkodzeniu nienasyconych kwasów tłuszczowych przez peroksydację lipidów, którą wywołują wolne rodniki. Związki selenu mogą stać się swoistą „pułapką” dla wolnych rodników i w rezultacie przekształcać je w stabilne związki [63].

1.2.3 Spożycie selenu w różnych krajach a jego zalecana dzienna dawka

W roku 1980 eksperci z The National Research Council (USA) po raz pierwszy podali zakres zalecanego dziennego spożycia selenu na poziomie 50 - 200 [µg/dzień]. Zakres ten ustalony został głównie na podstawie wyników otrzymanych w trakcie badań przeprowadzanych na zwierzętach. W tabeli 6 zestawiono informacje o zalecanym średnim dobowym zapotrzebowaniu na selen (EAR), zalecanej dziennej dawce selenu (RDA) oraz dopuszczalnej dziennej dawce selenu (UL).

Tabela 6. Średnie dobowe zapotrzebowanie (EAR), zalecana dzienna dawka (RDA) oraz dopuszczalna dzienna dawka (UL) selenu [64]

Grupa (płeć/wiek, lata)	EAR [µg/dzień]	RDA [µg/dzień]	UL [µg/dzień]
<i>Niemowlęta</i>			
0-0,5	15 (AI)		45
0,5-1	20 (AI)		60
<i>Dzieci</i>			
1-3	17	20	90
4-9	23	30	280
<i>Chłopcy</i>			
10-12	35	40	280
13-18	45	55	400
<i>Mężczyźni</i>			
19-75	45	55	400
> 75	45	55	400
<i>Dziewczęta</i>			
10-12	35	40	280
13-18	45	55	400
<i>Kobiety</i>			
19-75	45	55	400
> 75	45	55	400
<i>Ciąża</i>			
< 19	50	60	400
> 19	50	60	400
<i>Laktacja</i>			
< 19	60	70	400
> 19	60	70	400

Dawka selenu dostarczana codziennie do organizmu zależy od wielu czynników, przede wszystkim od regionu geograficznego, czyli od diety w danym kraju. W tabeli 7 zestawiono informacje na temat dziennego spożycia selenu w różnych krajach, w tym w Polsce.

Tabela 7. Informacje literaturowe o dziennym spożyciu selenu [$\mu\text{g}/\text{dzień}$] w różnych krajach

Kraj	Spożycie Se [$\mu\text{g}/\text{dzień}$]	Literatura
Arabia Saudyjska	75 - 122	[65]
Chiny (region Keshan)	3 - 11	[51]
Chiny (region Suzhou)	44	[66]
Chorwacja	27	[67]
Egipt	49	[68]
Grecja	39	[69]
Hiszpania	73	[70]
Japonia	133	[51]
Kanada	98 - 224	[71]
Korea	57	[72]
Libia	13 - 44	[73]
Litwa	100	[74]
Norwegia	80	[75]
Polska	30 - 40	[76]
Słowacja	38	[77]
Stany Zjednoczone	60 - 160	[78]
Szwajcaria	70	[51]
Szwecja	38	[51]
Turcja	30	[51]
Wielka Brytania	34	[79]

1.2.4 Konsekwencje niedoboru selenu w organizmie człowieka

Zapotrzebowanie na selen, w wyniku stresogennych warunków życia (alkohol, papierosy, zanieczyszczenie środowiska) ciągle wzrasta. W związku z tym system obronny organizmów żywych potrzebuje dodatkowych dawek selenu by móc się bronić. W przyrodzie proces przyswajania selenu przez „ogniwa” łańcucha pokarmowego jest ograniczony przez zubożenie środowiska naturalnego w ten pierwiastek wskutek stosowania nowoczesnych technologii w przemyśle spożywczym i rolnictwie. Erozja gleb, skażenie przez metale ciężkie oraz „kwaśne deszcze” (zakwaszenie związkami siarki i azotu) przyczyniają się do zmniejszenia biodostępności selenu dla roślin [40]. Dodatkowo na obniżenie biodostępności wpływają procesy przetwarzania żywności, np. pieczenie, gotowanie, smażenie.

Deficyt selenu wpływa ujemnie na organizmy żywe, w szczególności zwierzęta i ludzi, powodując zwyrodnienie wielu narządów i tkanek oraz prowadzi do wielu chorób. Do dwóch najbardziej znanych chorób spowodowanych niedoborem selenu w diecie należą:

- choroba Keshan - endemiczna choroba mięśnia sercowego występująca głównie u dzieci i młodych kobiet; stwierdzono ją po raz pierwszy w północno-wschodniej części Chin,
- choroba Kasin-Beck - endemiczna choroba układu kostno-stawowego objawiająca się zaburzeniem w kostnieniu oraz deformacją stawów; przypadki tej choroby pierwszy raz wystąpiły u mieszkańców północno-wschodnich regionów Chin [80 - 88].

Obydwie choroby wywołane są niedoborem selenu w organizmie, co związane jest z faktem, że gleby w tym regionie geograficznym są bardzo ubogie w selen.

Niedobór selenu może wywoływać różnorodne zaburzenia w funkcjonowaniu organizmu. Jako przykłady można podać [27, 36, 40, 43, 89 - 93]:

- chorobę Friedreicha - postępujące zwyrodnienie niektórych części układu nerwowego oraz mięśnia sercowego,
- obniżenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za czynności błon komórkowych,
- osłabienie odporności i powstawanie nowotworów,
- martwicę wątroby i trzustki,
- zmniejszenie płodności,
- osłabienie funkcjonowania układu immunologicznego,
- podwyższone ryzyko wystąpienia nadciśnienia,
- zaburzenie prawidłowego funkcjonowania tarczycy,
- zwyrodnienie serca i wątroby,
- zaburzenie mineralizacji kości,
- nieprawidłowe wykształcenie zębów,
- zwiększenie podatności na infekcje wirusowe,
- występowanie stanów zapalnych,
- choroby układu sercowo - naczyniowego,
- depresję, lęki, wrogość,
- zaćmę,
- zaburzenia erytrocytów,
- Zespół Nagłej Śmierci Niemowląt (SIDS),

- mukowiscydozę,
- chorobę Crohn'a - zapalną chorobę jelita cienkiego i grubego.

1.2.5 Selen a zdrowie człowieka

Wolne rodniki (ROS – reaktywne formy tlenu) są naturalnymi produktami metabolizmu komórkowego, które odgrywają ważną rolę w prawidłowym działaniu złożonych mechanizmów, kontrolujących podziały komórkowe i uczestniczą w przebiegu wielu ważnych procesów komórkowych. ROS mogą być także czynnikami uszkadzającymi składniki komórkowe [94]. Stan zakłóconej równowagi między wolnymi rodnikami a przeciwutleniaczami w organizmie określa się mianem stresu oksydacyjnego. Wolne rodniki posiadają niesparowany elektron, dlatego cały czas dążą do odebrania jednego elektronu innej komórce, co w rezultacie doprowadza do dezintegracji, uszkodzenia i zaburzenia funkcjonowania komórek. Reaktywne formy tlenu mogą powodować uszkodzenia białek, tłuszczów, a także DNA komórek, doprowadzając do mutacji. To z kolei może być przyczyną [95]:

- rozwoju wielu rodzajów nowotworów (poprzez uszkodzenie DNA),
- chorób neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimer),
- chorób płuc, nerek, układu moczowego, układu sercowo - naczyniowego i innych.

Selen poprzez selenobiałka ma wpływ na wiele funkcji fizjologicznych komórki, głównie w formie SeCys – 21-ego aminokwasu [96]. Niektóre z selenobiałek mają działanie przeciwutleniające i chronią organizm przed stresem oksydacyjnym. Mogą także uczestniczyć w procesie regeneracji oraz aktywacji innych przeciwutleniaczy, np. koenzymu Q10, witaminy C lub witaminy E [97]. Wymienione funkcje selenu dotyczą sytuacji, gdy pierwiastek ten dostarczany jest do organizmu na optymalnym poziomie odżywczym. Wysoki poziom selenu w organizmie powoduje, że pierwiastek ten działa utleniająco, przez co hamuje wzrost i działa toksycznie na komórki.

Podsumowując, spożywanie selenu w odpowiedniej ilości odgrywa istotną rolę w profilaktyce i leczeniu wielu schorzeń oraz w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu. Poniżej przedstawiono niektóre aspekty działania związków selenu.

1.2.5.1 Choroby nowotworowe

Choroby nowotworowe stają się coraz poważniejszym problemem w skali globalnej. W roku 2012 na świecie zanotowano 14 milionów przypadków nowych zachorowań na nowotwory oraz 8,2 miliona zgonów z powodu nowotworów. U mężczyzn zdiagnozowano głównie raka płuc, prostaty, jelita grubego, żołądka oraz wątroby. Natomiast u kobiet raka piersi, jelita grubego, płuc, żołądka oraz szyjki macicy. Co gorsza, naukowcy szacują, że w ciągu następnych dwóch dekad liczba zachorowań na nowotwory może wzrosnąć nawet o 70 % [98]. Według szacunków Amerykańskiego Instytutu Badań nad Rakiem poprzez zdrowy sposób żywienia, utrzymywanie prawidłowej masy ciała, nie palenie oraz regularną aktywność fizyczną można by zapobiec około 1/3 wszystkich zachorowań na raka [99]. Dlatego ważne jest poszukiwanie środków występujących naturalnie w często spożywanej żywności, które mogą spowolnić rozwój nowotworów.

Powstawanie nowotworów jest procesem wieloetapowym, w którym wyróżnia się fazę inicjacji, promocji i progresji. Wyniki licznych badań w układach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* wskazują, że ROS są zaangażowane nie tylko na etapie inicjacji i promocji procesu kancerogenezy, ale również jego progresji [27, 66, 100].

Wysokie stężenie ROS w komórkach nowotworowych może odpowiadać za szybkie tempo podziałów komórkowych, kolejne mutacje w DNA i niestabilność genomu, a także prowadzić do oporności na pewne grupy leków stosowanych w terapii antynowotworowej. Jednak zjawisko stresu w komórkach nowotworowych może być wykorzystane w poszukiwaniu nowych strategii leczenia [57 – 70, 94].

Efektywność związków selenu jako czynników przeciwrakotwórczych zależy głównie od formy chemicznej selenu, dawki, formy redox i użytego modelu doświadczalnego [101].

W przypadku form nieorganicznych, wyniki badań wykazały działanie cytotoksyczne SeO_3^{2-} wobec komórek nowotworowych w przypadku nowotworów płuc [102, 103], prostaty [104], szyjki macicy [105], jajnika [106] i jelita grubego [107, 108], a także w przypadku komórek białaczkowych [109], wewnątrzwątrobowych [110], czerniakowych [111] i nowotworowych międzybłonna [112].

Z kolei wyniki badań *in vitro* niektórych form organicznych selenu, wykazały:

- lepsze działanie hamujące selenodiglutationu na wzrost komórek rakowych od SeO_3^{2-} ,

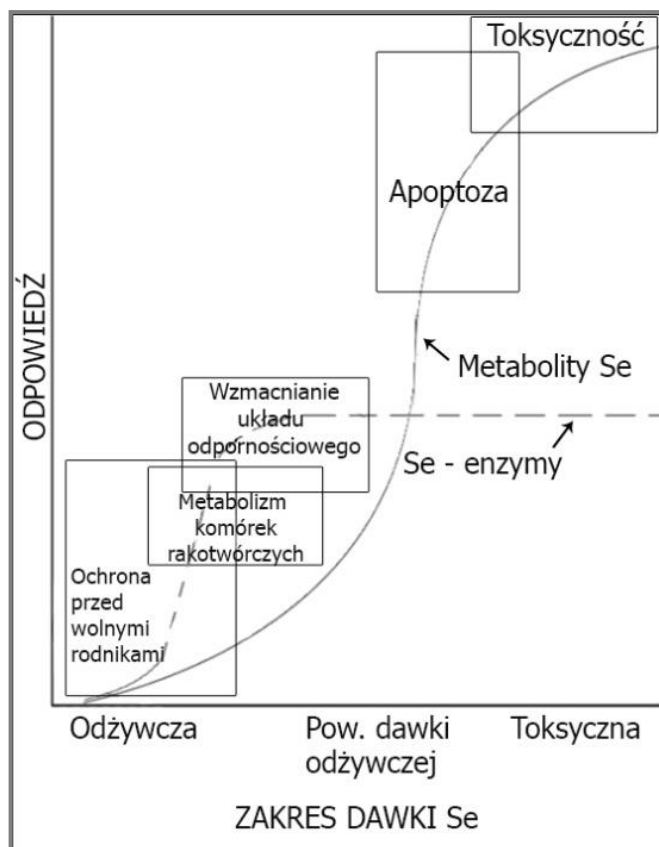
- działanie hamujące SeMet na wzrost nowotworów jelita grubego [114, 115], płuc [116, 117] piersi oraz prostaty [118, 119], jednak tylko w przypadku wysokich zawartości SeMet w organizmie (średnie do wysokich zakresów mikromolowych),
- działanie hamujące SeMetSeCys na gwałtowny wzrost (proliferację) komórek nowotworowych płaskonabłonkowego raka jamy ustnej, jelita grubego, piersi [116, 120, 121]; SeMetSeCys ma również zdolność do modulacji procesów komórkowych odpowiedzialnych za procesy przerzutowe,
- działanie hamujące kwasu metyloselenowego na wzrost komórek nowotworowych w przypadku raka płuc [122], prostaty [123 - 126] i piersi [101],
- działanie hamujące selenocystyny na wzrost komórek nowotworowych w przypadku raka szyjki macicy [127], płuc [115], piersi [128] oraz czerniaka skóry [129].

Działanie pozostałych organicznych form selenu zostało szczegółowo opisane w pracy przeglądowej [96].

W przypadku badań przeciwnowotworowych warto również wspomnieć o selenobiałkach. Selen wchodzi w skład enzymu - peroksydazy glutationowej – czynnika, który należy do grupy tzw. „zmiataczy wolnych rodników” [33, 63, 130]. Selen w tym połączeniu pełni funkcję ochronną dla krwinek czerwonych, a zwłaszcza hemoglobiny, stanowiąc jedną z substancji potrzebnych do kontroli procesu tworzenia wolnych rodników w organizmie. Opisane właściwości selenobiałka GPx, a także jego ochronną rolę w stosunku do DNA i RNA [32] wykorzystuje się w terapii przeciwnowotworowej.

Dodatkowo, w celu zrozumienia roli selenobiałek w hamowaniu rozwoju nowotworów przeprowadzono badania *in vitro* oraz *in vivo* trzech z nich: TrxR1, Sel15 i GPx2. Wyniki badań wykazały, że selenobiałka te mają działanie zarówno ochronne jak i wspomagające rozwój nowotworów [68, 69, 73 – 75, 82, 83, 85].

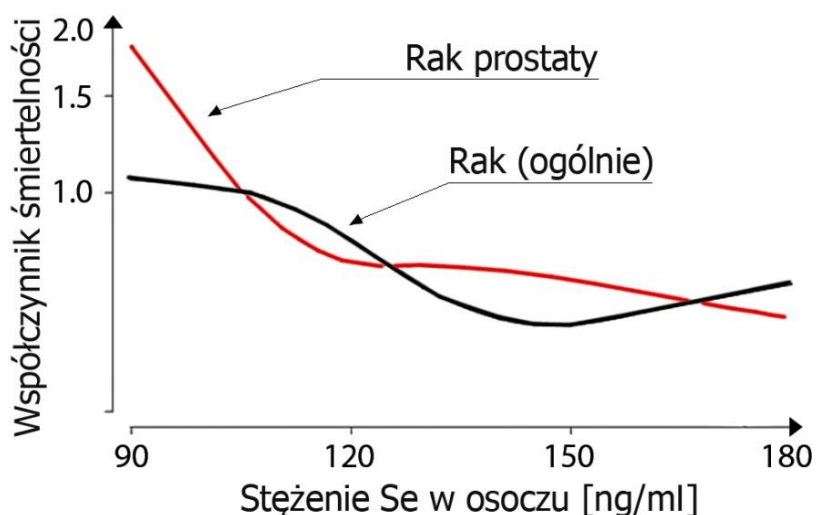
Na rysunku 4 przedstawiono schemat, który obrazuje kilka typów aktywności przeciwnowotworowej selenu w zależności od jego dawki.



Rysunek 4. Typy aktywności przeciwnowotworowej selenu [131]

Większość badań, których wyniki wskazują na prozdrowotne działanie związków selenu, przeprowadzono głównie w warunkach *in vitro*, natomiast badania *in vivo* przeprowadzane były głównie na myszach i szczurach. Pozytywne wyniki badań oraz fakt, iż niedobór selenu został powiązany ze zwiększoną częstością występowania nowotworów u ludzi, skłoniły badaczy do przeprowadzenia badań klinicznych. Badania te miały na celu wykazanie chemoprotekcyjnego działania selenu, poprzez suplementację pacjentów za pomocą tego pierwiastka.

W ramach badań NPC, rozpoczętych w roku 1996, przeprowadzono suplementację diety pacjentów z historią raka skóry za pomocą dawki selenu wynoszącej 200 μg /dzień (w postaci wzbogaconych w Se drożdży) przez okres 12 tygodni. Wyniki badań wykazały, że suplementacja selenem nie powoduje znaczących różnic w występowaniu nowotworów skóry, lecz powoduje redukcję w częstości występowania raka prostaty (65 %), płuc i jelita grubego, co zostało przedstawione na rysunku 5. Istotne zmniejszenie częstości występowania wszystkich rodzajów nowotworów poprzez suplementację selenem wykazano tylko w podgrupie pacjentów z wyjściowym stężeniem selenu w surowicy $<105 \mu\text{g/l}$, podczas gdy u pacjentów z wysokim wyjściowym stężeniem selenu w surowicy ($>120 \mu\text{g/l}$) suplementacja była szkodliwa – zwiększała częstość występowania nowotworów [132].



Rysunek 5. Zależność wartości liczbowej współczynnika śmiertelności od zawartości seleniu w osoczu krwi [132]

W oparciu o wyniki badań uzyskanych w trakcie NPC, w 2001 roku rozpoczęto kolejne badania kliniczne – SELECT - mające na celu potwierdzić, że suplementacja za pomocą seleniu (w formie L-SeMet) i/lub witaminy E zmniejsza ryzyko zachorowania na raka prostaty. Wyniki badań opublikowane w latach 2008 - 2010 wykazały, że suplementacja SeMet i/lub witaminą E nie powoduje istotnych różnic w częstości występowania raka prostaty [21, 22]. Kolejne wyniki badań opublikowane w roku 2011 wykazały, że ryzyko raka prostaty było podwyższone o 17 % w grupie suplementowanej za pomocą witaminy E [23]. Natomiast wyniki badań opublikowane w roku 2014 wykazały, że suplementacja SeMet zwiększa ryzyko wystąpienia raka prostaty u mężczyzn, którzy mieli wyższą wyjściową zawartość seleniu we krwi. Dodatkowo stwierdzono, że suplementacja może zwiększać ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2, łysienia i zapalenia skóry. W podsumowaniu badań stwierdzono, że „nie ma przekonujących dowodów sugerujących, że suplementacja selenem może zapobiec nowotworowi prostaty” [133].

Podsumowując, mimo wielu szeroko zakrojonych wysiłków w celu korzystnego i niekorzystnego działania seleniu w badaniach klinicznych, pojawia się wiele przeszkód spowodowanych głównie przez niekompletną wiedzę na temat metabolicznego działania seleniu i selenobiałek w celu zapobiegania, i w niektórych przypadkach, wpływania na rozwój nowotworów. Lepsze zrozumienie tych podstawowych mechanizmów ułatwi przeprowadzanie bezpiecznych i skutecznych badań klinicznych, interpretację wyników badań, co może prowadzić do nowych strategii interwencji terapeutycznej [46].

1.2.5.2 Choroby układu sercowo - naczyniowego

Niedobór selenu we krwi został powiązany ze zwiększającą się śmiertelnością spowodowaną chorobami układu sercowo - naczyniowego [40, 134 - 136]. Niskie stężenie selenu we krwi stwierdzono również u osób z nieendemiczną kardiomiopatią [137]. Mimo wykonania wielu badań kliniczno - kontrolnych, a także badań doświadczalnych, związek między niskim stężeniem Se, a występowaniem chorób układu sercowo - naczyniowego nie jest dotychczas jednoznacznie ustalony [96, 134]. Niektóre wyniki badań wykazały, że suplementacja za pomocą selenu może zmniejszać ryzyko chorób układu sercowo - naczyniowego poprzez ochronę przed: zapaleniami, peroksydacją lipidów i agregacją płytek krwi [138, 139]. Ochronna funkcja selenu może polegać także na aktywności peroksydazy glutationowej fosfolipidowej (GPx4), która bierze udział w procesie rozkładu tzw. „złego cholesterolu” (LDL) [140, 141] i chroni przed osadzaniem się płytek krwi na ścianach naczyń krwionośnych.

Wyniki badań klinicznych, polegających na suplementacji diety pacjentów za pomocą selenu w ilości od 100 – 300 [μg/dzień], wykazały, że selen nie zmniejsza ryzyka występowania chorób układu sercowo - naczyniowego [142 - 144]. Jednak w niektórych przypadkach badań klinicznych wykazano wpływ selenu na poprawę ogólnego stanu zdrowia pacjentów z chorobami układu sercowo - naczyniowego lub nawet zmniejszenie ryzyka występowania tych chorób przez spożywanie orzechów brazylijskich (zawierających duże ilości Se) [145].

1.2.5.3 Działanie immunostymulujące

Niedobór selenu może powodować zaburzenia w tworzeniu się limfocytów, co powoduje zmniejszenie liczby komórek T (limfocytów T) i prowadzi do obniżenia odporności organizmu [146]. Wyniki badań wykazują, że suplementacja diety za pomocą selenu w ilości 50 lub 100 μg/dzień powoduje wzrost liczby komórek T i pomocniczych limfocytów T [147]. Suplementacja diety za pomocą selenu w ilości 200 μg/dzień Na₂SeO₃ spowodowała zwiększenie odpowiedzi immunologicznej [148].

U pacjentów cierpiących na choroby nerek zawartość selenu w osoczu krwi jest niższa niż u osób zdrowych [149]. Wykazano również obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej u osób cierpiących na te choroby [150]. Stwierdzono, że suplementacja grupy dializowanych osób przez trzy miesiące za pomocą początkowo 500 μg/dzień Na₂SeO₃, a następnie 200 μg/dzień Na₂SeO₃, spowodowała wzrost zawartości selenu w osoczu oraz wzrost aktywności peroksydazy glutationowej u osób badanych. Dodatkowo wzrost aktywności peroksydazy glutationowej wpływa na obniżenie intensywności procesu tworzenia produktów powodujących stres oksydacyjny. Wynika z tego, że suplementacja diety za pomocą selenu jest

efektywnym środkiem poprawiającym jego zawartość w organizmie oraz podnoszącym odporność organizmu [151].

Dodatkowo, na podstawie wyników badań stwierdzono, że enzymy przeciwutleniające spowalniają proces starzenia się komórek poprzez zapobieganie tworzenia się wolnych rodników [152]. Zostało udowodnione, że selenobiałka, a głównie peroksydaza glutationowa, mają właściwości przeciwutleniające, więc zaliczają się do grupy substancji chroniących organizm przed przedwczesnym starzeniem.

1.2.5.4 Niedoczynność tarczycy

Selen jest pierwiastkiem, który odgrywa istotną rolę w procesie syntezy aktywnej formy hormonu tarczycy. Dejodaza jodotyroniny – enzym zawierający selenocysteinę – pełni decydującą rolę w procesie przekształcania tyroksyny (T_4) do aktywnej formy trójiodotyroniny (T_3) oraz nieaktywnej odwrotnej formy T_3 do T_2 [54, 147, 153]. Stwierdzono również, że niedobór selenu może być głównym wyznacznikiem niedoboru jodu, a co za tym idzie prowadzić do dezaktywacji hormonu tarczycy powodując niedoczynność tarczycy [154].

1.2.5.5 AIDS

Wyniki badań osób zarażonych wirusem HIV-1 wykazały niedobór lub nadmiar selenu w ich organizmach. Niedobór selenu wiązał się z obniżeniem aktywności cytotoksycznej, natomiast nadmiar selenu z bardzo niskim stężeniem immunoglobulin (IgG i IgM) [155, 156]. Wyniki badań próbek osocza krwi osób zarażonych wirusem HIV-1 wskazały niedobór selenu, jako niezależny czynnik prognostyczny przeżycia tych osób [157]. Dodatkowo niski poziom selenu w organizmie u osób chorych na AIDS powodował kardiomiopatię, a suplementacja związkami selenu wpływała korzystnie na te osoby, co świadczy o ochronnej roli tego pierwiastka dla organizmów zarażonych wirusami [158].

1.2.5.6 Cięża

Stwierdzono, że poziom selenu we krwi kobiet w ciąży obniża się [150, 159, 160], ponieważ selen transportowany jest przez łożysko i w postaci selenianów (IV) może przedostawać się do płodu [32]. Zostało potwierdzone, że wolne rodniki wywołujące stres oksydacyjny mogą przyczyniać się do rozwoju stanu przedrzucawkowego podczas ciąży [161]. Stan przedrzucawkowy objawia się podwyższonym ciśnieniem, obrzękami skóry rąk i twarzy oraz zwiększonym stężeniem białka w moczu. Nieleczony może być bardzo niebezpieczny i prowadzić do śmierci. Selen, a szczególnie selenobiałko – GPx – pełni ważną rolę w zwalczaniu „wolnych rodników”, a co za tym idzie w ochronie organizmu kobiety przed

rozwojem stanu przedrzucawkowego. Niedobór selenu przyczynia się ponadto do występowania bezpłodności, poronień oraz zatrzymania łożyska [162]. Stwierdzono również, że selen pełni rolę w systemie obronnym matki, chroniąc ją przed szkodliwym wpływem zanieczyszczeń oraz składnikami dymu tytoniowego, w tym również środowiskowego dymu tytoniowego (ETS) [163]. Pierwiastek ten przenika z krwi do mleka matki, dlatego obserwuje się zwiększone zapotrzebowanie na selen u kobiet w ciąży i matek karmiących. Według Ekspertów z Państwowego Instytutu Zdrowia (USA) dzienna dawka powinna wynosić 70 µg Se [164].

1.2.5.7 Płodność mężczyzn

Na obniżenie płodności u mężczyzn mają wpływ czynniki takie jak zanieczyszczenie środowiska (metale ciężkie, pestycydy), promieniowanie UV, stres oraz dym tytoniowy [165, 166]. Czynniki te przyczyniają się do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania systemu przeciwutleniającego organizmu, powodują zwiększenie liczby wolnych rodników, co prowadzi do obniżenia liczby plemników w nasieniu. Wyniki badań wykazały skuteczność suplementacji za pomocą selenu oraz innych substancji, takich jak: karnityna, arginina, witamina B₁₂, przeciwutleniacze (witamina C, witamina E, glutation, koenzym Q10) w leczeniu obniżonej płodności u mężczyzn [167, 168].

Do związków, które wpływają na ruchliwość plemników należą GPx4 oraz SePP1 [169 - 171]. SePP1 syntezowana jest w wątrobie, a następnie transportowana do jąder, gdzie ulega absorpcji i wpływa na poprawę potencjału przeciwutleniającego w męskich narządach rozrodczych. Wyniki badań polegających na suplementacji mężczyzn za pomocą selenu w ilości 100 – 200 [µg/dzień] (w formie SeMet) wykazały zwiększenie ruchliwości plemników po 3 miesiącach, co w rezultacie wpłynęło na zwiększenie płodności [172].

1.2.6 Toksyczne właściwości selenu – nadmiar selenu w organizmie

Toksyczność selenu zależy głównie od formy w jakiej występuje oraz od czasu narażenia [37]. Efekt toksyczny u ludzi spowodowany nadmiarem selenu występuje bardzo rzadko, ponieważ sama obecność selenu w danym elemencie środowiska nie skutkuje narażeniem ludzi. Ewentualne objawy nadmiernej kumulacji tego pierwiastka stwierdzono u osób zatrudnionych w różnych gałęziach przemysłu (np. elektronicznym, ceramicznym, hutniczym i szklarskim). W tych miejscach przewlekłe zatrucia zostały zaobserwowane u pracowników, którzy byli narażeni na wchłanianie pyłu metalicznego selenu, dwutlenku selenu i par różnych związków selenu [173]. Objawem zatrucia przewlekłego selenem jest: uszkodzenie wątroby, któremu

towarzyszą najczęściej zaburzenia żołądkowo-jelitowe, brak łaknienia, upośledzenie stanu odżywiania. Ze strony układu nerwowego obserwuje się zaburzenia nerwowe objawiające się stanami przygnębienia, niemożności skupienia uwagi i wzmożonej pobudliwości nerwowej.

Szkodliwe działanie nadmiaru selenu może pojawiać się także w regionach bogatych w gleby alkaliczne i torfowe, w których zawartość tego pierwiastka wynosi 28 - 360 [ppm] [34]. W tych regionach ludzie mogą być narażeni na selen w przypadku spożywania przez nich dużych ilości lokalnych ziaren, warzyw czy produktów zwierzęcych, które zaakumulowały duże ilości tego pierwiastka. Toksyczność selenu dla roślin zależy od ich zdolności do metabolizowania poszczególnych związków selenu oraz procesu ich odparowania (przekształcania związków selenu w lotny dimetyloselen). Natomiast toksyczność dla zwierząt zależy od efektywności procesu metylacji i wydalania poszczególnych związków selenu (selen jest wydalany głównie w moczu oraz w mniejszym stopniu w kale i oddechu) [174].

Nadmiar selenu w organizmie może wywoływać niekorzystne objawy takie jak [173]:

- selenozę (ból głowy, wypadanie włosów, łamliwość paznokci, wysypkę skórą, „czosnkowy” oddech spowodowany przez dimetyloselen),
- choroby serca,
- osłabienie układu odpornościowego,
- zmiany nowotworowe,
- zawroty głowy, zmęczenie, podrażnienie błon śluzowych,
- zapalenie płuc lub oskrzeli,
- wysypkę, zaczerwienienie, pieczenie, swędzenie (poprzez narażenie skóry),
- pieczenie, podrażnienie i łzawienie (poprzez narażenie oczu na kontakt z dwutlenkiem selenu),
- wymioty, nudności, biegunkę.

1.3 Rola selenu w roślinach

1.3.1 Formy występowania selenu w roślinach

Selen prawdopodobnie nie jest składnikiem istotnym dla roślin [38, 175 - 177], jednak niektóre rośliny wykazują zdolność do akumulacji i przekształcania selenu w bioaktywne związki. Stwierdzono dodatni wpływ selenianów (VI) na zmiany aktywności i przepuszczalności błony komórkowej roślin, co może stanowić pierwszy objaw oddziaływania związków selenu na rośliny [178]. Kumulacja dużych ilości selenu przez rośliny ma duże znaczenie dla środowiska

oraz dla prawidłowego odżywiania się ludzi, a więc i dla ich zdrowia [177, 179]. Tkanki roślin pobierających duże ilości tego pierwiastka (hiperakumulatorów selenu) mogą stanowić źródło materiału genetycznego. Wyniki badań takiego materiału mogą dostarczyć informacji na temat metabolizmu selenu, tolerancji roślin na toksyczne stężenia tego pierwiastka, a także sposobu eliminacji selenu ze środowiska skażonego tym pierwiastkiem [179].

W roślinach selen najczęściej występuje w formie selenometioniny, selenocysteiny, selenianów (IV) i (VI), selenohomocysteiny, selenometyloselenocysteiny, selenotlenku selenometioniny i dimetyloselenku [180].

Zawartość selenu w roślinach zależy głównie od zawartości tego pierwiastka w glebie [27, 100] oraz czynników wpływających na biodostępność selenu z gleby takich jak [34, 43, 180 - 182]:

- rodzaj gleby i jej pH (formy selenu w zależności od warunków redox zostały przedstawione w tabeli 8)
- zawartość materii organicznej,
- struktura gleby,
- aktywność mikrobiologiczna,
- potencjał utleniająco - redukujący (redox),
- zawartość tlenków typu Me_2O_3 ,
- warunki klimatyczne, w tym temperatura (im wyższa temperatura tym silniejsza bioakumulacja) i ilość opadów (częste deszcze powoduje zmniejszenie przyswajalności związków selenu),
- kwasy glebowe,
- tworzenie związków kompleksowych z Al, Fe,
- zawartość $CaCO_3$,
- interakcje między selenem i jonami siarczanowym(VI) i fosforanowym(V),
- proces zasolenia,
- obecność P, S, Mn, Cu, Zn, Cd i W, ze względu na fakt, że selen odgrywa rolę czynnika antagonistycznego w stosunku do tych pierwiastków.

Tabela 8. Formy selenu w zależności od warunków redox [34]

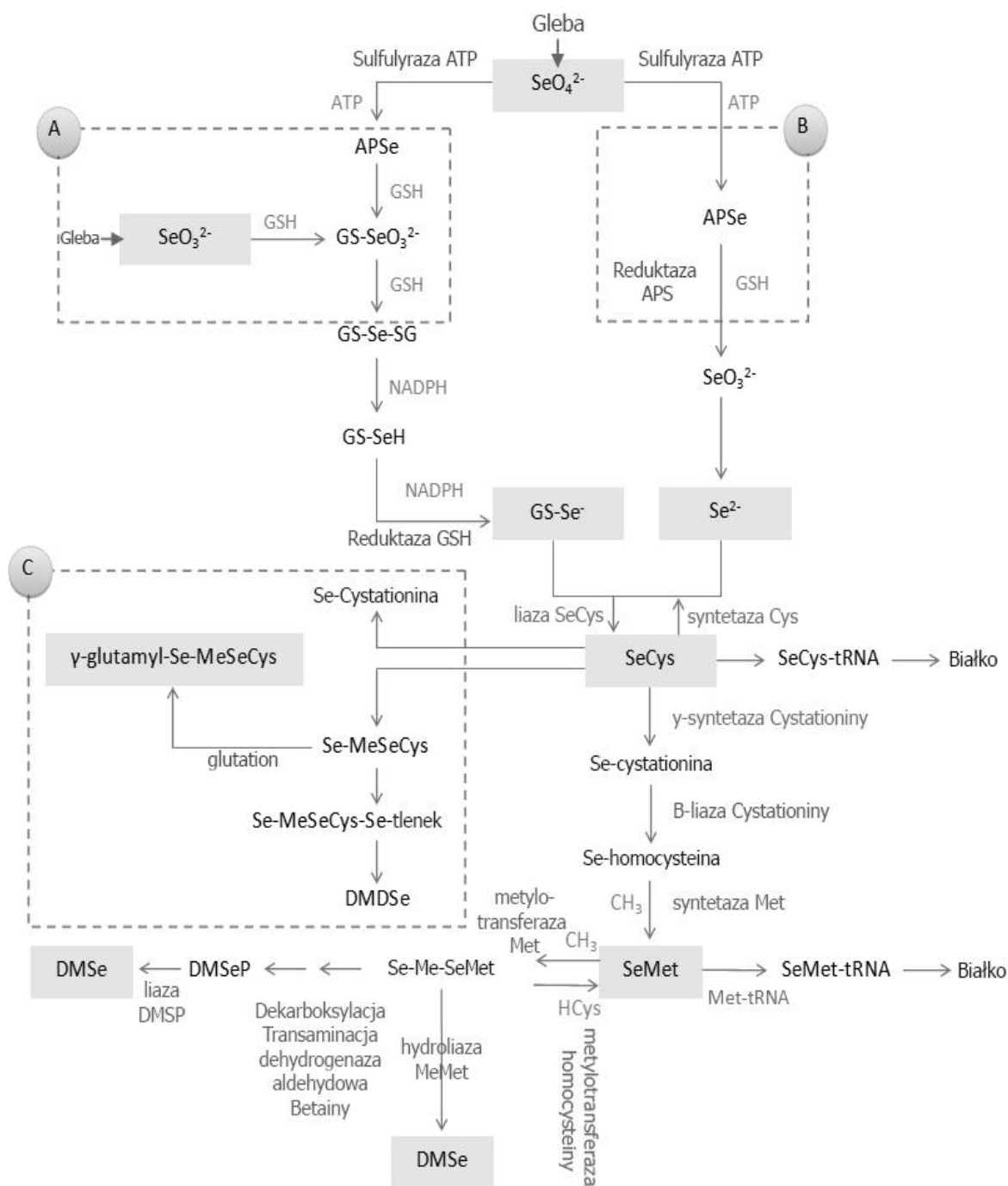
Warunki redox	pH	Główne formy selenu	
Silnie utleniające	7 < 2	SeO_4^{2-} HSeO_4^- , H_2SeO_3^-	Seleniany (VI)
Przejściowe	> 7 < 7,3	SeO_3^{2-} HSeO_3^-	Seleniany (IV)
Silnie redukcyjne	> 3,8 < 3,8	HSe^- H_2Se^0	Selenki

1.3.2 Przebieg procesu metabolizmu selenu w roślinach

Rośliny pobierają selen z gleby głównie w postaci selenianu (IV) lub selenianu (VI), przy czym większość z nich wykazuje większą zdolność do kumulacji selenianu (VI). Wyjątek stanowią makrofity, czyli wodne rośliny kwiatowe i duże glony, które pobierają większe ilości selenu w postaci selenianu (IV) [183]. Selenian (VI) konkuruje zazwyczaj z siarczanem (VI) [180]. Wynika to z faktu, że selen i siarka posiadają podobne właściwości chemiczne oraz pobierane i kumulowane są według wspólnego schematu [184]. Selenian (VI) konkuruje także z fosforanem, szczawianem i molibdenianem [185]. Selen kumulowany jest głównie w pędach i liściach rośliny [176], a jego ilość zależy od zawartości białek [51]. Wyjątek stanowią rośliny mające zdolność do pobierania organicznych związków selenu z gleby i kumulowania ich w korzeniach, wymienione w literaturze [186]. Pobrany przez roślinę związek selenu (organiczny lub nieorganiczny) jest transportowany do chloroplastów, gdzie ulega metabolizmowi według schematu, który został przedstawiony na rysunku 6.

Jak wcześniej wspomniano, rośliny pobierają selen z gleby najczęściej w formie selenianów (IV) lub selenianów (VI). Selenian (VI) może ulegać redukcji do selenku w dwóch procesach: (A) poprzez nieenzymatyczne reakcje oraz reduktazę glutationową, (B) poprzez reduktazę APS oraz reduktazę siarczynową. Selenek oraz selenian sprzężony z GSH jest przekształcany do SeCys. SeMet może być przekształcana do lotnego DMSe lub włączana do białek rośliny. SeCys natomiast może ulegać różnym reakcjom:

- 1) może być metabolizowana do SeMet,
- 2) może być włączona do białek rośliny,
- 3) może być metabolizowana do Se-cystationiny, γ -glutamyl-SeMetSeCys lub DMDS (lotnego związku Se); przekształcenie to dotyczy tylko roślin będących hiperakumulatorami selenu (C).



Rysunek 6. Schematyczne przedstawienie procesu przemian metabolicznych selenu w roślinach [51, 175, 187, 188]

1.3.3 Zdolność roślin do kumulacji selenu

Występowanie zjawisk uwalniania selenu przez rośliny do atmosfery może zostać wykorzystane, jako alternatywny sposób usuwania nadmiaru tego pierwiastka z zanieczyszczonych gleb i wód za pomocą techniki zwanej fitoodparowaniem. Technika ta wykorzystuje rośliny mające zdolność do pobierania i kumulowania metali ciężkich oraz dodatkowo do usuwania ich w postaci lotnych związków do atmosfery.

Rośliny – hiperakumulatory selenu - mogą być wykorzystane jako skuteczne „narzędzie” służące do oczyszczania gleby z tego pierwiastka [51]. Powstawanie lotnego i nietoksycznego selenku dimetylu w wyniku procesu przemian metabolicznych ma dużo zalet w porównaniu z akumulacją. Najważniejszą z nich jest fakt, że rośliny te nie zawierają dużych stężeń selenu w swoich tkankach, a więc nie są toksyczne dla zjadających je zwierząt [180, 186]. Wadą może być jedynie wydzielanie przez rośliny przykrego zapachu [35].

Zawartość selenu w roślinach zmienia się w szerokim przedziale od poziomu $<1 \mu\text{g/g s.m.}$ do $20000 \mu\text{g/g s.m.}$ [187]. Z tego względu rośliny można zaliczyć do trzech grup, co przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Podział na grupy roślin w zależności od zdolności do kumulacji selenu [37, 175, 189, 190]

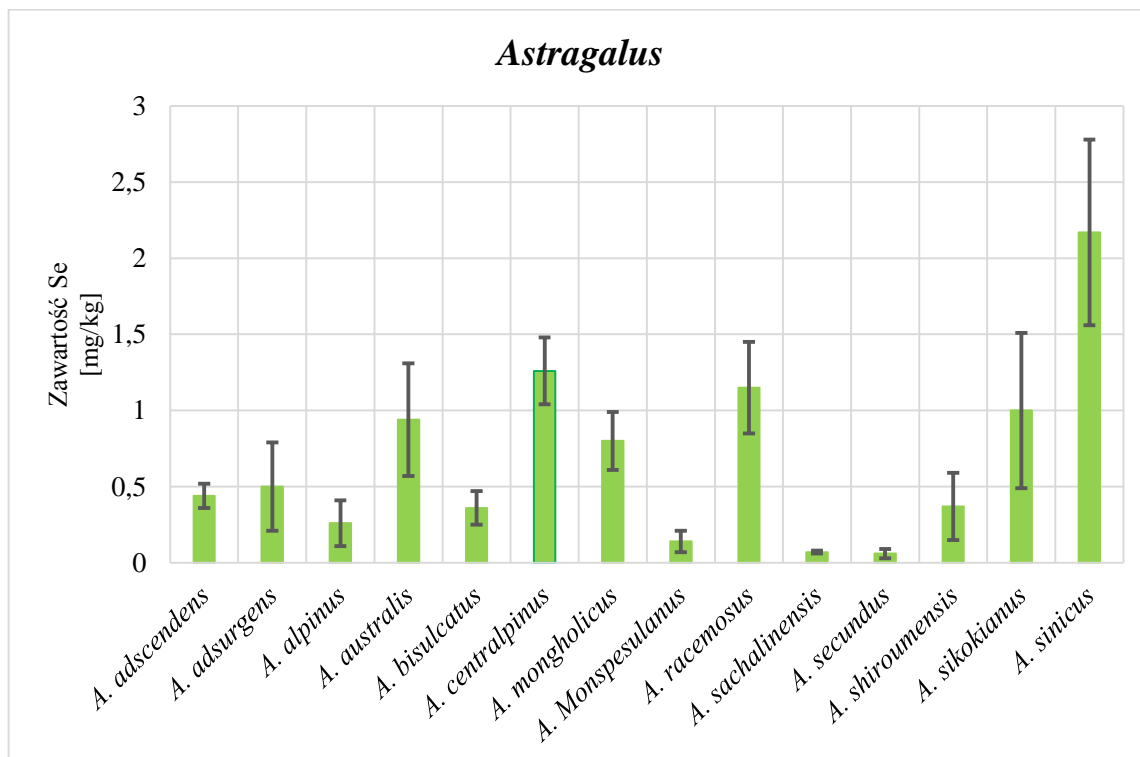
Określenie	Zakres kumulacji [$\mu\text{g/g s.m.}$]	Przykłady roślin
Rośliny mające zdolność do kumulacji dużych ilości selenu, tzw. „hiperakumulatory selenu”	1000-20000	<i>Astragalus, Conopsis, Stanleya, Neptunia, Xylorhiza, Machaeranthera</i> , a także czosnek, gorczyca sarepska, rzepak, brokuły oraz niektóre grzyby (zależne od ilości selenu w glebie)
Rośliny mające zdolność do kumulacji niewielkiej ilości selenu, tzw. „drugorzędowe wskaźniki”	50-100	<i>Aster, Grinolelia, Melilotus, Atriplex, Castilleja, Gutierrezia, Camelina microcarpa, Astragalus americanus, Descurainia pinnata, Medicago sativa, Helianthus pumilus</i>
Rośliny praktycznie nieposiadające zdolności do kumulacji selenu	<1	trawy, zboża, chwasty, rośliny uprawne

Idealna roślina, która może być wykorzystana w procesie fitoremediacji gleb zanieczyszczonych przez związki selenu, powinna charakteryzować się następującymi cechami:

- zdolnością do fitoodparowania selenu,
- odpornością na trudne warunki (wysokie stężenie selenu w glebie),
- szybkim wzrostem,
- wysokim przyrostem biomasy.

Do organizmów roślinnych, które wykazują takie właściwości można zaliczyć gorczycę sarepską (*Brassica juncea*) oraz brokuły (*Brassica oleracea*). Brokuły można uważać za modelowy organizm roślinny do badania mechanizmu procesu kumulacji selenu przez rośliny, jednak biodostępność związków selenu dla zwierząt jest niewielka. Natomiast kontynuowanie badań w celu lepszego poznania mechanizmu kumulacji selenu przez *B. juncea* może przyczynić się do zwiększenia efektywności procesu fitoremediacji gleb zanieczyszczonych przez ten pierwiastek, a także wykorzystania tej rośliny, jako źródła selenu dla człowieka [177].

Najlepiej poznaną rośliną, która wykazuje zdolność do kumulowania dużych ilości selenu jest roślina z rodzaju traganków - *Astragalus bisulcatus*. Roślina ta występuje w południowo-zachodniej części USA, na glebach bogatych w selen. Charakterystyczną cechą tej rośliny jest jej silny czosnkowy zapach, pochodzący od wydzielającego się lotnego selenku dimetylu. *A. bisulcatus* kumuluje selen nieorganiczny w starych liściach, natomiast organiczne związki selenu (w postaci SeMetSeCys) w liściach młodych. Roślina ta kumuluje większe ilości selenu w częściach nadziemnych niż korzeniach [189]. Spożywanie roślin przez zwierzęta może wywoływać efekt toksyczny np. „chorobę alkaliczną” lub „ślepą kołowaciznę” [38]. Na rysunku 7 przedstawiono informacje o stężeniu selenu w różnych odmianach tej rośliny.



Rysunek 7. Zawartość selenu w roślinach z rodziny *Astragalus* [191]

1.4 Selen w żywności

Głównym źródłem selenu jest odpowiednia dieta, czyli właściwy dobór produktów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, przy czym selen w przewodzie pokarmowym przyswaja się lepiej z produktów roślinnych niż zwierzęcych (np. 86 % z kukurydzy i 9 % z ryb) [35]. Rośliny pobierają selen nieorganiczny (seleniany (IV) i (VI)) z gleby i przekształcają go w bardziej dostępną formę organiczną (selenometioninę lub selenocysteinę) [33, 37]. W postaci organicznej selen jest spożywany przez ludzi i ulega przemianom, w trakcie których przyłączany jest do białek i aminokwasów. Selen dostarczany w trakcie spożywania różnych produktów żywnościowych przyczynia się do poprawy zdrowia poprzez ochronę układu immunologicznego, sercowo - naczyniowego, warunkowanie prawidłowego funkcjonowania tarczycy, wpływ na płodność zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn oraz przede wszystkim poprzez prawdopodobne działanie przeciwnowotworowe.

1.4.1 Produkty zawierające największą ilość selenu

Orzechy brazylijskie (*Bertholletia excelsa*) należą do grupy produktów najczęściej spożywanych przez mieszkańców Ameryki Południowej (Brazylia, Peru, Kolumbii, Wenezueli i Ekwadoru). Są one źródłem wielu składników odżywczych takich jak białka, fitosterole, tokoferol, magnez, fosfor, wit. B₆, wapń, żelazo, potas, cynk i miedź [192]. Jednak ich charakterystyczną cechą jest bardzo wysoka zawartość selenu - głównie w formie selenometioniny [193], dzięki czemu produkt ten uważany jest za główne źródło tego pierwiastka. Dieta wzbogacona w ten produkt pozwala osiągać korzyści zdrowotne, w szczególności obniżać ryzyko wystąpienia przewlekłych chorób. Wyniki badań wykazały, że spożywanie jednego orzecha dziennie przez pacjentów, którzy są poddawani hemodializie, powoduje wzrost zawartości selenu oraz aktywności peroksydazy glutationowej w organizmie człowieka, a co za tym idzie wzmacnia jego odporność [194]. Orzechy brazylijskie zajmują pierwsze miejsce w rankingu 20 produktów zawierających największą ilość selenu. Ranking ten został przedstawiony w tabeli 10.

Tabela 10. Lista 20 produktów zawierających największą ilość selenu [195, 196]

L.p.	Produkt	µg/100g	% RDA
1	orzechy brazylijskie	1917	3485 %
2	wołowina	58 - 91,4	106 – 166 %
3	tuńczyk	80,4 - 162	146 - 295 %
4	pszenica	70,7	129 %

Tabela 10 c.d.

5	ostrygi	63,7	116 %
6	nasiona słonecznika	53	96 %
7	wieprzowina	49,6	90 %
8	krab	44,4	81 %
9	łosoś	41,4	75 %
10	krewetki	39,6	72 %
11	żyto	35,3	64 %
12	owies	34	62 %
13	kurczak	27,6 - 39	50- 71 %
14	jaja	25 - 32	45 – 58 %
15	makaron	26,4	48 %
16	indyk	22,8 - 55	41 - 99 %
17	ser	15	27 %
18	grzyby	11,9	22 %
19	brązowy ryż	9,8	18 %
20	soja	7,3	13 %

1.4.2 Biodostępność związków selenu obecnych w produktach żywnościowych

Zawartość selenu w danym produkcie spożywczym nie znaczy wcale, że w ten sposób organizm otrzyma odpowiednią ilość tego pierwiastka. Właściwe przyswajanie selenu z produktów żywnościowych zależy od:

- biodostępności, czyli takiego połączenia selenu, które może być łatwo transportowane przez membrany biologiczne organizmu,
- bioprzyjętności, czyli przekształceniu danej formy selenu wewnątrz jelit lub płuc do formy rozpuszczalnej, zdolnej do absorpcji z membraną biologiczną [197],
- bioaktywności, czyli przyswajania danych form selenu wpływających na zwiększenie aktywności niektórych selenobiałek, np. peroksydazy glutationowej lub deoksydazy jodotyroniny.

Do utworzenia produktów metabolizmu, a co za tym idzie wykorzystania ich jako substratów w różnych procesach biologicznych zachodzących w organizmie żywym przyczynia się bioaktywność danego związku lub połączenie jego biodostępności z bioprzyjętnością [198]. Natomiast sama biodostępność może przyczynić się do sytuacji, w której związki selenu zostają zaadsorbowane na bardzo małych cząsteczkach koloidalnych, które przenikają przez membrany, co prowadzi do usunięcia selenu z organizmu. Gdy dany związek nie jest

bioprzyswajalny dla organizmu, „przechodzi przez niego” nie wywołując żadnego efektu i ostatecznie jest wydalony z moczem lub kałem [61].

Biodostępność i bioprzyswajalność zależą od warunków fizykochemicznych takich jak:

- specjacja – główny czynnik warunkujący „los” związków selenu w środowisku; biodostępność związków selenu rośnie w szeregu: $Se(0) < Se(VI) < Se(IV) < Se(-II)$ [198],
- rozpuszczalność,
- siła jonowa,
- pH,
- potencjał redukująco - utleniający (redox),
- obecność innych metali i substancji (np. leków), które mogą wywoływać efekt synergistyczny lub antagonistyczny.

Biodostępność selenu na każdym szczeblu łańcucha pokarmowego jest bardzo istotna. Odpowiednie formy selenu występujące w glebie warunkują ich biodostępność dla roślin. Formy te zależą od wielu czynników, na przykład od rodzaju oraz pH gleby, zawartości innych substancji w glebie lub warunków atmosferycznych. Rośliny łatwiej wchłaniają związki selenu występujące w połączeniach nieorganicznych – seleniany (IV) i seleniany (VI), które następnie metabolizowane są w ich tkankach i przekształcane w formy organiczne. Organiczne formy selenu są bardziej biodostępne dla zwierząt i ludzi. Biodostępność można oceniać na podstawie wyników badań prowadzonych *in vitro* lub *in vivo*. Badania *in vitro* mają wiele zalet, ponieważ są szybsze, tańsze oraz prostsze niż badania *in vivo* [199]. W badaniach prowadzonych na ludziach wykorzystuje się stabilne izotopy selenu w celu odróżnienia selenu pochodzącego z produktu spożywczego od selenu innego pochodzenia. W ocenie biodostępności selenu istotny jest również rodzaj i temperatura procesu przygotowania danego produktu do spożycia. Wysoka temperatura może powodować tworzenie się lotnych związków selenu, ich rozpad i/lub przekształcenie, a co za tym idzie zmniejszenie zawartości tego pierwiastka w żywności [199]. Przykładami produktów, w których biodostępność selenu uległa zmniejszeniu w wyniku procesu ich przygotowania są:

- ziarna kawy – wyniki badań odpowiednich próbek wskazują, że w trakcie procesu palenia ziaren kawy zachodzi proces, w którym powstają lotne związki selenu [200],
- biszkopty z mąki wzbogaconej selenem; wyniki badań wykazały, że główną formą selenu jest SeMet, natomiast po upieczeniu SeMetSeO [201],

- rośliny z rodziny *Brassicaceae*, np. brokuły, zawierają SeMetSeCys, a po ugotowaniu 85 - 89 % związków selenu przechodzi do wody, w której gotowane były warzywa [53]
- szparagi, grzyby, warzywa, produkty mleczne, których wyniki badań wykazały 40 - 50 % strat związków selenu podczas gotowania, szczególnie po dodaniu soli i octu [202].

Podsumowując, zawartość selenu w organizmie zależy od biodostępności, bioprzyswajalności i/lub bioaktywności związków selenu zawartych w danym produkcie spożywczym. Wyniki wielu badań wskazują na to, że związki organiczne selenu np. SeMet w porównaniu do nieorganicznych połączeń tego pierwiastka - selenianu (IV) i selenianu (VI) - posiadają następujące zalety:

- lepsza absorpcja,
- większa retencja,
- wyższa akumulacja selenu we krwi oraz tkankach [203].

Dodatkowo warto dodać, iż organiczne formy selenu lepiej chronią organizm przed niedoborami tego pierwiastka niż formy nieorganiczne, które z kolei stwarzają większe ryzyko wystąpienia objawów toksycznych – nadmiernej kumulacji selenu w organizmie.

Biorąc pod uwagę trzy rodzaje wpływu selenu na organizm, istotne są następujące połączenia selenu:

- SeMet pochodząca z drożdży wzbogaconych przez selen powoduje kumulację selenu w tkankach: [204],
- nieorganiczne połączenia selenu pochodzące z produktów zwierzęcych lub roślinnych powodują podwyższenie aktywności peroksydazy glutationowej [205],
- SeMetSeCys i/lub γ -glutamyl-SeMetSeCys pochodzące z roślin *Brassica* lub *Allium* mają prawdopodobne działanie przeciwrakotwórcze [206].

Odkrycie nowych związków selenu oraz ich funkcji pozwoli na badanie ich biodostępności czy bioaktywności, co umożliwi porównanie ich działania z dotychczas poznanymi formami selenu [61]. Dlatego ważne jest prowadzenie badań specjacyjnych, mających na celu oznaczenie poszczególnych związków selenu w próbkach pobranych bezpośrednio z przewodu pokarmowego, co pozwoli przewidzieć, jakie formy selenu (organiczne i nieorganiczne) są najistotniejsze dla zdrowia i rozwoju człowieka [207]. Przyczyni się

to również do wzbogacenia wiedzy na temat różnych produktów żywnościowych, które będą mogły być polecane przez dietetyków lub lekarzy jako naturalne źródło pozwalające na zwiększenie zawartości selenu w organizmie – naturalne suplementy diety.

1.5 Suplementacja jako sposób wzbogacania diety w selen

Zalecana dzienna dawka selenu może być łatwo dostarczana konsumentom zamieszkujących takie kraje jak: USA, Meksyk, Kolumbia, Hawaje, Indie, czy Islandia. W wielu regionach świata jak na przykład: północna Europa (Finlandia, Polska, Wielka Brytania), Australia, Nowa Zelandia, Chiny [208] przeważają gleby ubogie w selen, co prowadzi do niedoborów tego pierwiastka u ludzi.

Właściwy poziom zawartości selenu w organizmie człowieka ma istotny wpływ na jego zdrowie i rozwój. Istotność selenu dla zdrowia i rozwoju człowieka po raz pierwszy stwierdzono podczas badania przyczyn chorób Keshan i Kasin-Beck, występujących w północno-wschodnim regionie Chin. Wyniki badań wskazują, że te endemiczne choroby powiązane są z niską zawartością selenu w organizmach osób chorych. Udowodniono również istotną rolę tego pierwiastka, a szczególnie selenozależnych białek, w występowaniu i rozwoju wielu chorób i schorzeń [101 – 113, 135, 152, 159].

Od momentu, gdy stwierdzono, że selen i jego związki mają istotny wpływ na przebieg wielu procesów metabolicznych, a w wielu krajach na świecie wykazano niedobór tego pierwiastka, dużą wagę przyłożono do badań nad metodą skutecznej suplementacji środowiska za pomocą selenu [209]. Metoda taka powinna efektywnie i szybko wpływać na wzrost zawartości selenu w glebie, w organizmach zwierząt i ludzi. Warto podkreślić, że proces suplementacji środowiska selenem wymaga zachowania szczególnej ostrożności i powinien być monitorowany przez odpowiednie instytucje i organizacje dysponujące odpowiednimi narzędziami, czyli procedurami analitycznymi i urządzeniami kontrolno - pomiarowymi.

Obecnie można wyróżnić dwie grupy metod suplementacji za pomocą selenu:

- „klasyczne” sposoby suplementacji produktów żywnościowych to metody wykorzystujące wzbogacanie nawozów w nieorganiczne związki selenu, suplementy diety w formie tabletek zawierające w swoim składzie zarówno nieorganiczne, jak i organiczne połączenia selenu oraz drożdże wzbogacone w selen; produkty te dostarczają do organizmu selen głównie w formie nieorganicznej lub w postaci SeMet (drożdże),

- „alternatywne” sposoby na suplementację produktów żywnościowych, polegające na uprawianiu roślin na glebie nawożonej uprzednio nawozami zawierającymi selen, namnażaniu kultur bakteryjno-drożdżowych w medium hodowlanym zawierającym selen nieorganiczny, kiełkowaniu roślin na pożywce zawierającej nieorganiczne sole selenu oraz produkcji pieczywa wzbogaconego w selen; produkty te dostarczają do organizmu selen w postaci organicznej, głównie SeMet i SeMetSeCys.

Metody suplementacji za pomocą selenu zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej mojego współautorstwa [210].

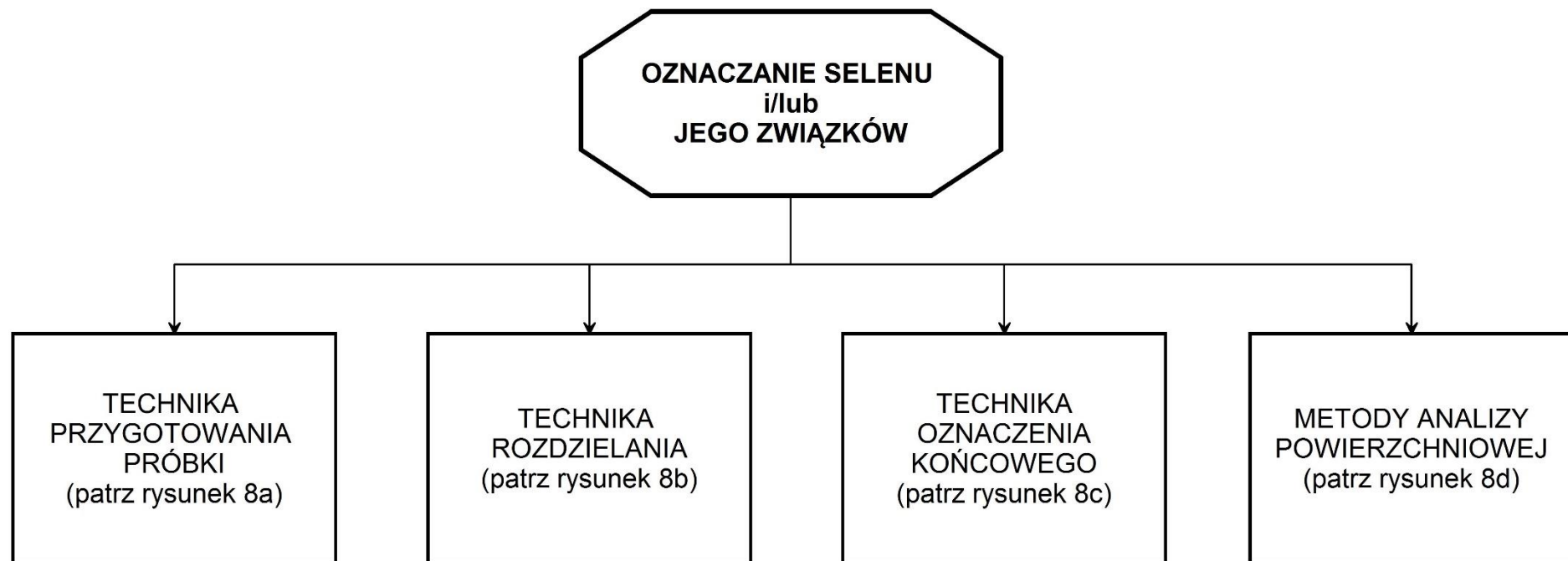
1.6 Metody analityczne służące do oznaczania selenu

Oznaczenie zawartości pierwiastków występujących w środowisku na poziomie śladowym wymaga doboru odpowiednich metod pomiarowych. Najistotniejszym aspektem prowadzenia badań jest wybór techniki analitycznej, która umożliwi oznaczenie zawartości danego pierwiastka lub jego związków. Przede wszystkim należy uwzględnić [211]:

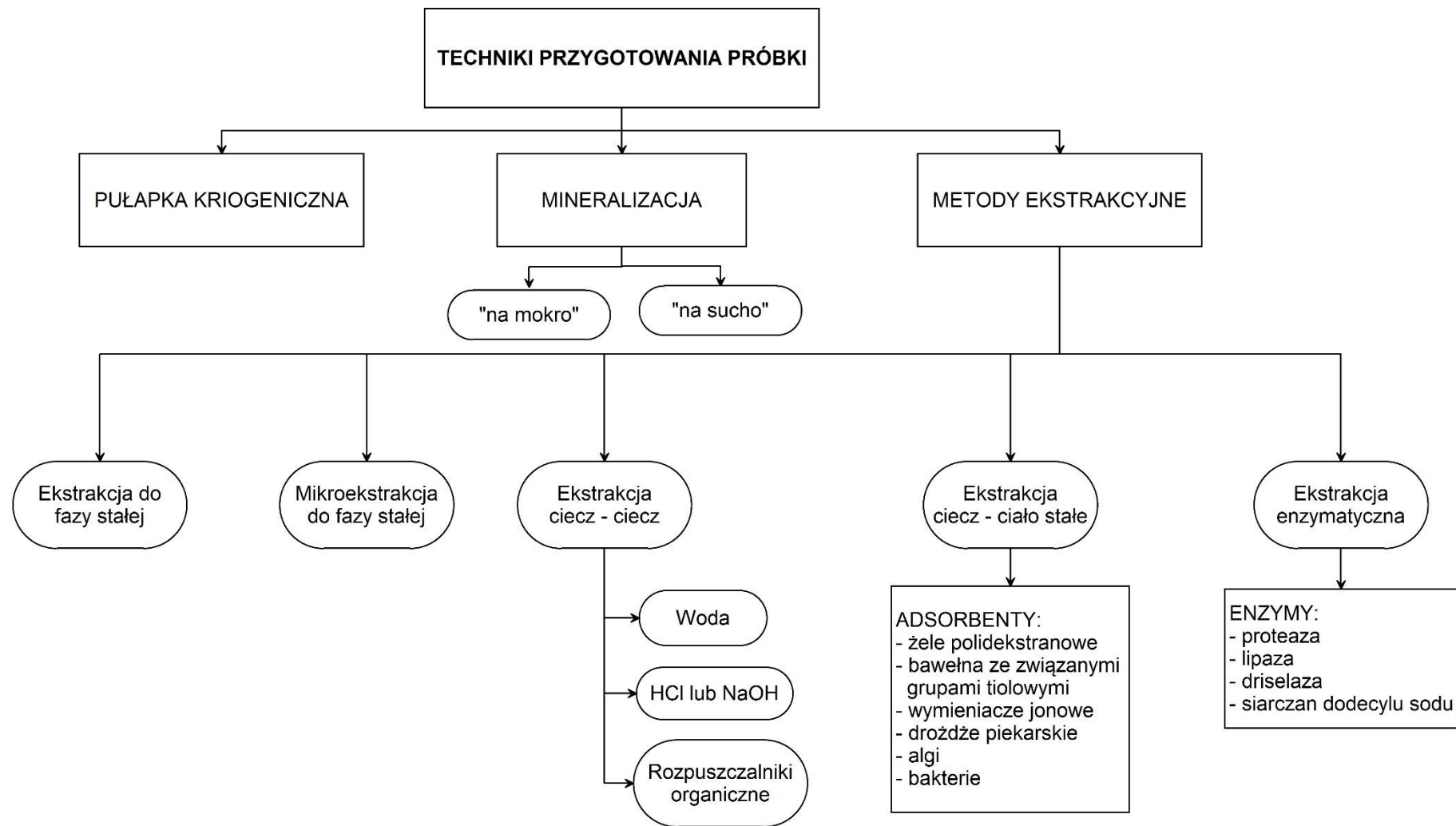
- selektywność danej metody, która stanowi możliwość oznaczenia danej substancji chemicznej w obecności innych składników badanej próbki,
- wartość granicy wykrywalności metody, za pomocą której określa się najmniejszą ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej metody czy techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem,
- wartość granicy oznaczalności metody,
- precyzję, poprawność oraz dokładność danej metody analitycznej,
- właściwości fizyczne i chemiczne składników próbki,
- czas wykonania analizy,
- koszt aparatury pomiarowej,
- koszt pojedynczej analizy,
- dobór odpowiedniej techniki przygotowania próbki; w przypadku oznaczania całkowitej zawartości selenu lub jego określonych związków w danej próbce, ważne jest, aby stosowana technika umożliwiała przeprowadzenie próbki do postaci, w której takie oznaczenie jest możliwe.

Na rysunku 8 przedstawiono w sposób schematyczny informacje na temat procedur analitycznych, które mogą być wykorzystane do oznaczania selenu i jego związków. Metody te składają się najczęściej z techniki rozdzielania oraz techniki oznaczenia końcowego (detekcji).

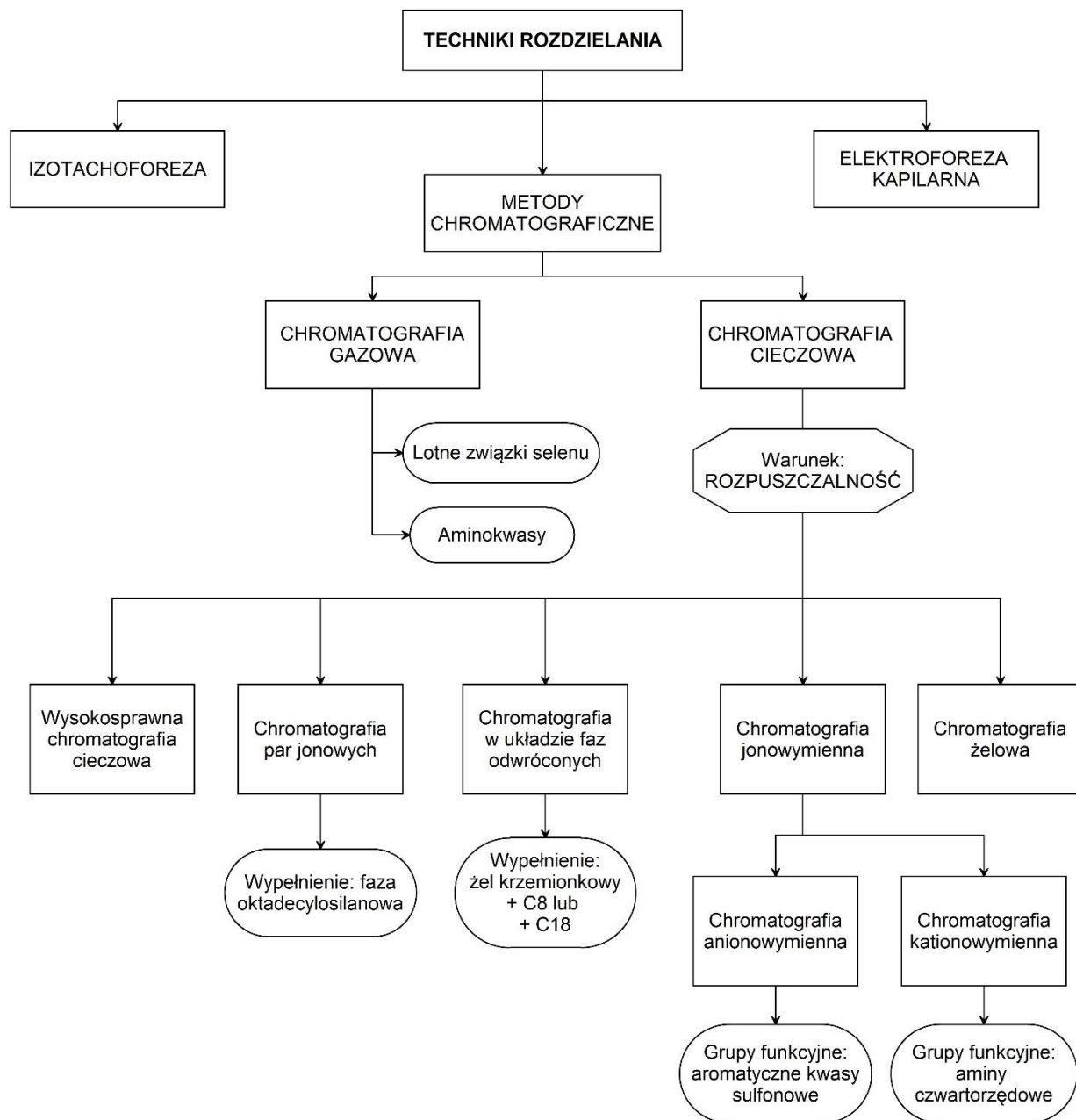
Natomiast w tabeli 11 przedstawiono przykłady literaturowe zastosowania technik analitycznych do oznaczenia całkowitej zawartości selenu, bądź do oznaczenia poszczególnych jego związków (specjacja selenu) w próbkach środowiskowych różnego pochodzenia.



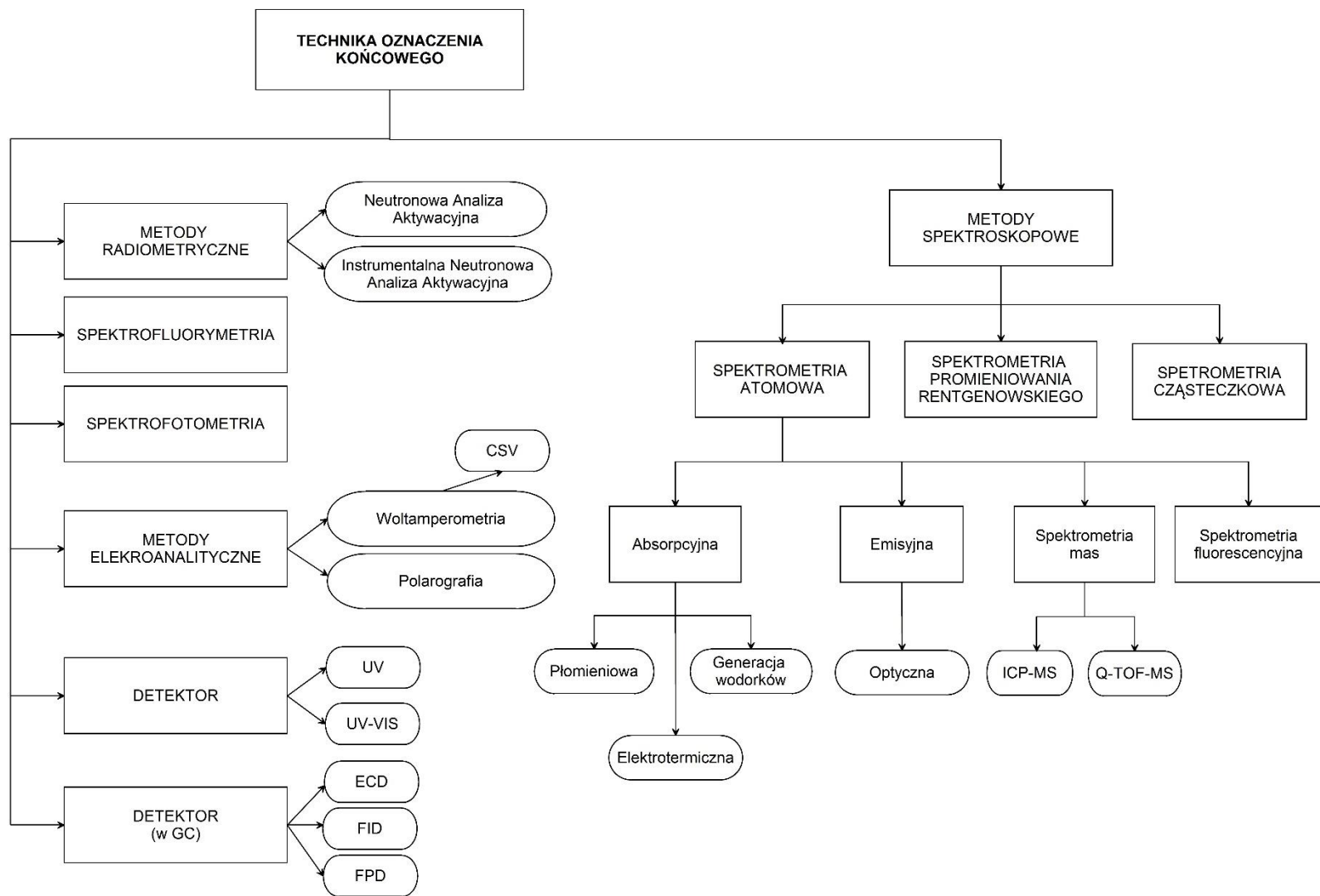
Rysunek 8. Procedury analityczne, które mogą być wykorzystane do oznaczania selenu i jego związków



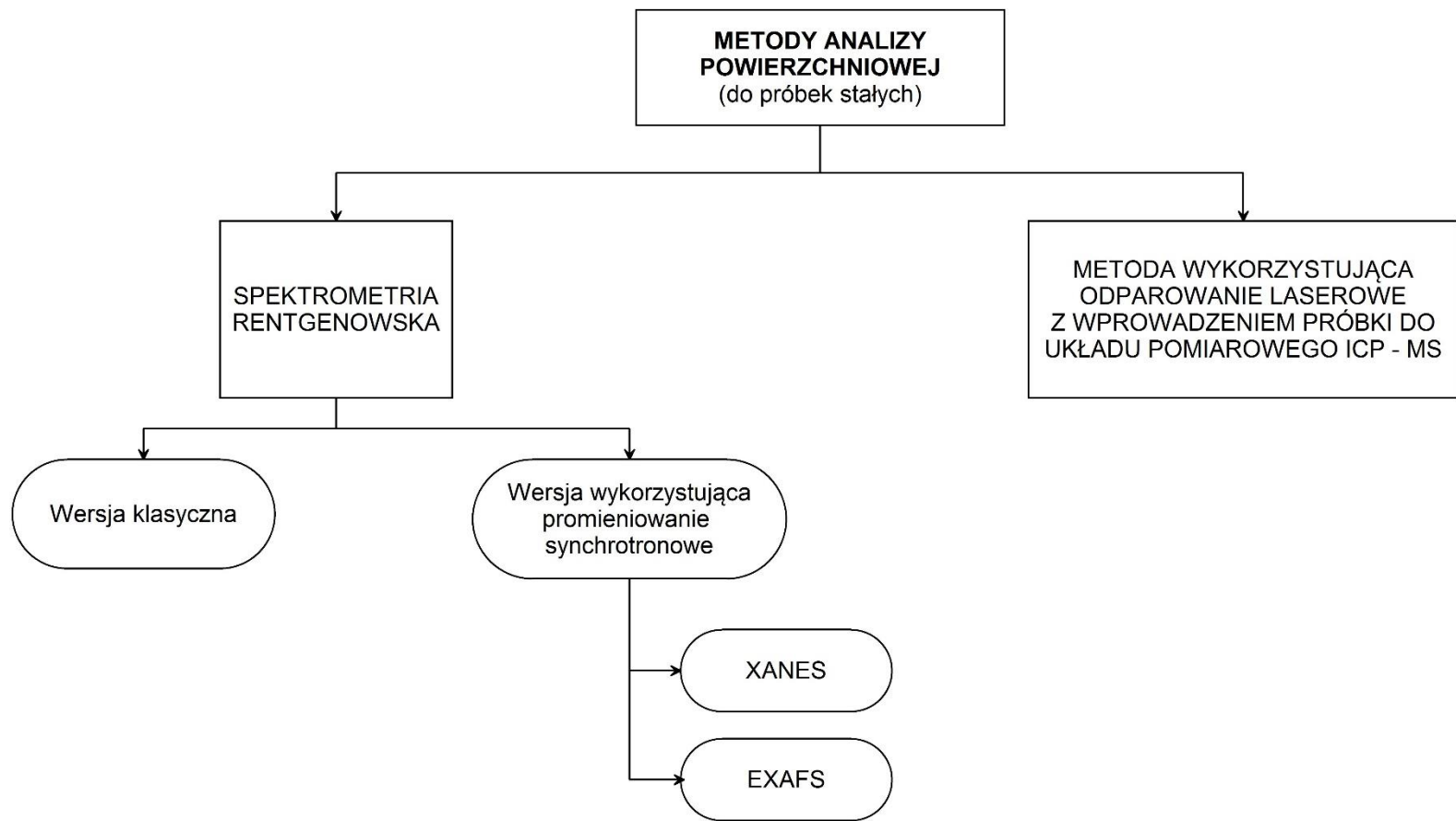
Rysunek 8a. Techniki przygotowania próbek wykorzystywane w celu oznaczenia selenu i/lub jego związków



Rysunek 8b. Techniki rozdzielania wykorzystywane w celu oznaczenia selenu i/lub jego związków



Rysunek 8c. Techniki oznaczeń końcowych wykorzystywane w celu oznaczenia selenu i/lub jego związków



Rysunek 8d. Metody analizy powierzchniowej wykorzystywane w celu oznaczenia selenu i/lub jego związków

Tabela 11. Informacje literaturowe na temat możliwego wykorzystania różnych procedur analitycznych do oznaczania selenu i/lub jego związków

Rodzaj oznaczenia	Material badawczy	Przygotowanie próbki i/lub rozdzielanie próbki	Technika pomiarowa (detektor)	Literatura
całkowita zawartość Se	sorbenty do oczyszczania gazów	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	ICP-MS i/lub HG-ICP-MS	[212]
	kręwe	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	GC-MS	[213]
	czosnek	roztwarzanie za pomocą HClO ₄ i HNO ₃	CSV	[214]
	czosnek, cebula	wzbogacanie analitu za pomocą 3,3-diaminobenzodyny na węglu aktywnym	ET-AAS	[215]
	ryby, skorupiaki	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	FI-HG-AAS	[216]
	rośliny	technika wytwarzania par z zawiesin	ICP-MS	[217]
	warzywa, owoce	mikroekstrakcja z wykorzystaniem włókna z osadzoną fazą ciekłą wspomagana ultradźwiękami	GF - AAS	[26]
	piwo	wzbogacanie analitu za pomocą drożdży piekarskich, wytwarzania wodorków i SPME	ICP/MIP-OES	[218]
	liście herbaty	roztwarzanie za pomocą kwasu	HG-AFS	[219]
	<i>B.juncea</i> , drożdże	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	ICP-MS lub ET-AAS	[220]
	osady	roztwarzanie za pomocą wody królewskiej	GF - AAS lub ICP-MS	[221]
	woda	DLLME	GF - AAS	[222]
	mąka oraz chleb wzbogacone za pomocą Se	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	ICP-MS	[223]
	rośliny	roztwarzanie za pomocą kwasu	ICP-AES	[224]
drożdże	rozdzielenie na filtrach Synpor; liofilizacja	INAA	[225]	
Se – stan utlenienia	skały	suszenie, rozdrobnienie, homogenizacja	XAFS	[226]
	drożdże wzbogacone za pomocą Se	kilka miligramów próbki umieszczono na aluminiowym próbniku za pomocą taśmy zabezpieczającej tzw. “Kapton tape”	XANES	[227]

Tabela 11 c.d.

Specjacja – nieorganiczny Se	sok z cytrusów	homogenizacja; redukcja Se (VI) do Se (IV) za pomocą promieniowania mikrofalowego	FI-HG-AAS	[228, 229]
	osady	ekstrakcja za pomocą kwasu fosforowego	HPLC-ICP-MS	[230]
	ziemniaki	homogenizacja, hydroliza enzymatyczna, mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	DPCSV	[52]
Specjacja selenu	tkanki tłuszczka i mały	roztwarzanie enzymatyczne za pomocą nie-specyficznej proteazy	HPLC-ICP-MS	[231]
	białko	ekstrakcja za pomocą kwasu lub zasady; ekstrakcja enzymatyczna	RP-HPLC-ICP-MS	[232]
	wątroba, osocze, mocz człowieka	ekstrakcja cytozoliczna	RP-HPLC-ICP-MS	[233]
	<i>B.juncea</i> , drożdże	hydroliza enzymatyczna, ekstrakcja za pomocą HCl	HPLC-ICP-MS	[220]
	osady	ekstrakcja za pomocą metanolu lub HCl	SAX-ICP-MS lub RPC-ICP-MS	[221]
	gleba	mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	HPLC-ICP-MS	[234]
	suplement diety zawierający Se	ekstrakcja enzymatyczna	IP-RP-HPLC-ICP-MS	[235]
	suplement diety zawierający Se	elektroforeza kapilarna	Detektor UV	[236]
	wzorce Se	elektroforeza kapilarna	ICP-MS	[237]
	ryż	ekstrakcja enzymatyczna; elektroforeza kapilarna	ICP-MS	[238]
	suplementy diety zawierające i niezawierające drożdży	ekstrakcja enzymatyczna (do oznaczania za pomocą HPLC); ekstrakcja fazy nadpowierzchniowej i derywatywacja (w przypadku analizy za pomocą GC)	HPLC-ICP-MS i GC-AED	[239]
	mąka oraz chleb wzbogacone za pomocą Se	roztwarzanie proteolityczne	HPLC-ICP-MS	[223]
	drożdże wzbogacone za pomocą Se	ekstrakcja za pomocą wody i chromatografia wykluczania	ICP-MS lub ESI Q-TOF MS/MS	[240]

Z przedstawionego zestawienia literaturowego wynika, iż oznaczenie całkowitej zawartości selenu w danej próbce poprzedza zwykle mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym, a oznaczenia dokonuje się za pomocą techniki AAS z wykorzystaniem różnych rodzajów atomizacji lub za pomocą techniki ICP - MS. Natomiast w badaniach specjacji selenu do wyodrębnienia poszczególnych związków z próbki wykorzystuje się różne techniki ekstrakcji, najczęściej ekstrakcję za pomocą wody lub ekstrakcję enzymatyczną. Oznaczenia zawartości poszczególnych związków w większości przypadków dokonuje się za pomocą połączenia wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z ICP - MS.

Podsumowując, ze względu na różnorodność form selenu oraz ich właściwości, a także ze względu na bardzo niewielkie różnice między zawartością Se, która świadczy o jej niedoborze lub nadmiarze w organizmie, istotne jest:

- określenie efektywnej i szybkiej metody pozwalającej na oznaczenie danych form selenu w próbkach środowiskowych (w tym w suplementach diety) z dużą dokładnością i precyzją,
- opracowanie metody pozwalającej na określenie biodostępności i/lub bioprzystępności danego związku selenu z badanego produktu.

Metody te powinny być także właściwie zwalidowane, co oznacza, iż ważne jest prowadzenie badań nad opracowaniem nowych materiałów odniesienia na potrzeby oznaczania całkowitej zawartości selenu oraz specjacji selenu, w celu poszerzenia wiedzy na temat zawartości niektórych istotnych oraz prawdopodobnie korzystnych dla człowieka związków selenu.

1.7 Materiały odniesienia

Poznanie materii odbywa się poprzez badanie jej właściwości i zarówno analityk jak i odbiorca informacji analitycznych muszą być świadomi ograniczeń stosowanego w praktyce warsztatu analitycznego. Praca w laboratorium chemicznym polega na pobraniu porcji materiału z dostarczonej próbki, a następnie przeprowadzeniu szeregu procesów fizycznych i chemicznych związanych z wydzieleniem analizowanego składnika z matrycy, ewentualnym wzbogaceniu go, kończąc na wykonaniu właściwego pomiaru. Wszystkie etapy postępowania analitycznego, mają wpływ na jakość otrzymanego wyniku, a co za tym idzie na decyzje (środowiskowe, ekonomiczne, społeczne czy polityczne) podejmowane na jego podstawie. Z tego względu istnieje konieczność szczegółowego opisanie wszystkich aspektów metrologicznych

(tj. spójności pomiarowej, niepewności wyników oraz walidacji stosowanych procedur analitycznych), a także zapewnienia odpowiedniego systemu zarządzania laboratorium.

Jednym z narzędzi pozwalających na uzyskanie wszechstronnych i miarodajnych informacji o stanie poszczególnych obiektów materialnych są materiały odniesienia. Wytworzenie materiału odniesienia jest procesem praco- i czasochłonnym, na który składa się wiele etapów, których realizacja pozwala na otrzymanie produktów o takich samych parametrach (reprezentatywność, jednorodność i trwałość). W sytuacji, gdy dany materiał odniesienia jest jednorodny i trwały, warunki jego stosowania są dokładnie określone i opisane, a uzyskane wyniki analizy odpowiednich próbek w celu określenia jego składu są powtarzalne i spójne, można przystąpić do etapu certyfikacji materiału odniesienia. Zwieńczeniem procesu certyfikacji jest raport certyfikacyjny, który powinien być źródłem zasadniczej informacji na temat materiału odniesienia od producenta do użytkownika.

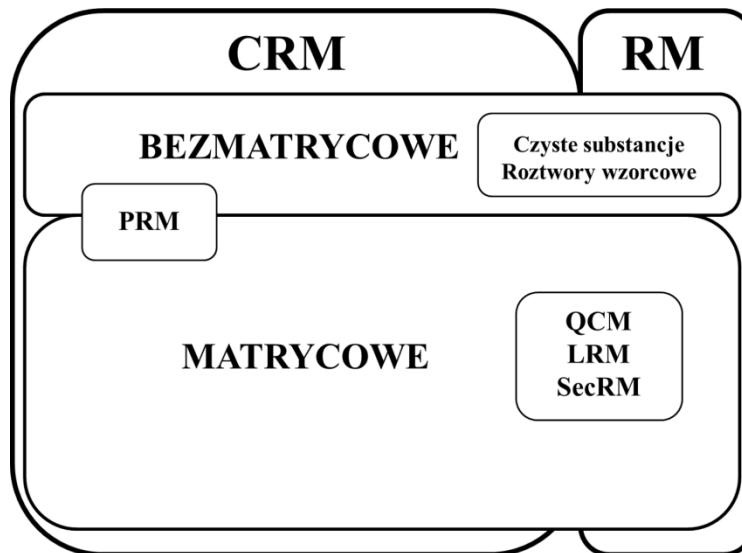
Mimo znacznej ilości dostępnych materiałów odniesienia wciąż istnieje ogromne zapotrzebowanie na certyfikowane materiały odniesienia o złożonym składzie matrycy, w których składniki mierzone występują na zróżnicowanych poziomach zawartości. Jednym z takich analizów jest selen, a w szczególności jego połączenia organiczne. Obecnie na rynku można znaleźć jedynie trzy certyfikowane materiały odniesienia na potrzeby oznaczania selenometioniny.

1.7.1 Definicje materiałów odniesienia

Materiał odniesienia (RM), to materiał dostatecznie jednorodny i trwały, jeżeli chodzi o określone właściwości, który przyjęto jako odpowiedni do zamierzonego jego wykorzystania w pomiarach lub przy badaniu cech nominalnych [241].

Certyfikowany materiał odniesienia (CRM), to materiał odniesienia, któremu towarzyszy dokumentacja wystawiona przez miarodajną instytucję i posiadająca jedną lub więcej wartości określonej właściwości wraz ze związanymi z nimi niepewnościami i spójnością, przy użyciu zwalidowanych procedur [241].

Ogólna klasyfikacja materiałów odniesienia została przedstawiona na rysunku 9.



Rysunek 9. Ogólna klasyfikacja materiałów odniesienia [242]

Materiały odniesienia można również sklasyfikować bardziej szczegółowo, według takich cech jak [211]:

a) właściwości:

- skład chemiczny,
- właściwości biologiczne i kliniczne,
- właściwości fizyczne,
- właściwości techniczne,
- różnorodne;

b) skład chemiczny:

- czyste substancje (materiały wysokiej czystości, materiały o określonej czystości, materiały pierwszego rzędu),
- roztwory,
- metodycznie dedykowane materiały,
- materiały o znanym składzie matrycy,
- materiały matrycowe (materiały odniesienia zawierające składniki główne, uboczne, śladowe lub ultraśladowe);

c) spójność pomiarowa z układem SI:

- materiały klas 0-V:
 - 0 - czyste indywidua chemiczne certyfikowane w stosunku do jednostek układu SI przy najniższej osiągalnej niepewności wyników pomiarów,

- I – materiały odniesienia certyfikowane w stosunku do jednostek układu SI lub materiałów klasy 0,
 - II - materiały odniesienia certyfikowane w stosunku do jednostek układu SI lub materiałów klasy 0 lub I,
 - III - materiały odniesienia certyfikowane w stosunku do materiałów klasy 0, I lub II,
 - IV - materiały odniesienia certyfikowane w stosunku do jednostek innych układów niż SI,
 - V – materiały, które charakteryzuje brak spójności pomiarowej z jakimkolwiek układem miar,
- d) niepewność określenia stężenia (ilości) analitu w materiale:
- certyfikowane materiały odniesienia,
 - niecertyfikowane materiały odniesienia;
- e) zastosowanie w badaniach chemicznych:
- kalibracja przyrządów analitycznych,
 - szacowanie spójności pomiarowej,
 - określanie niepewności pomiarowej,
 - kontrola jakości wyników pomiarowych,
 - walidacja procedur analitycznych.

Wyżej wymienione właściwości są wykorzystywane w trakcie uaktualniania baz danych dotyczących materiałów odniesienia. Bazy danych oprócz szerokiego wachlarza funkcji przeszukiwania mają za zadanie rozpowszechnianie informacji, zapewnienie doradztwa oraz specjalistycznej wiedzy i pomocy w zakresie produkcji i użytkowania materiałów odniesienia oraz tematów pokrewnych. Do najbardziej obszernych baz danych RM należą:

- COMAR - www.bam.de

- VIRM - www.virm.net

- REFMAT - www.refmat.org.pl

- oraz strony domowe głównych producentów materiałów odniesienia.

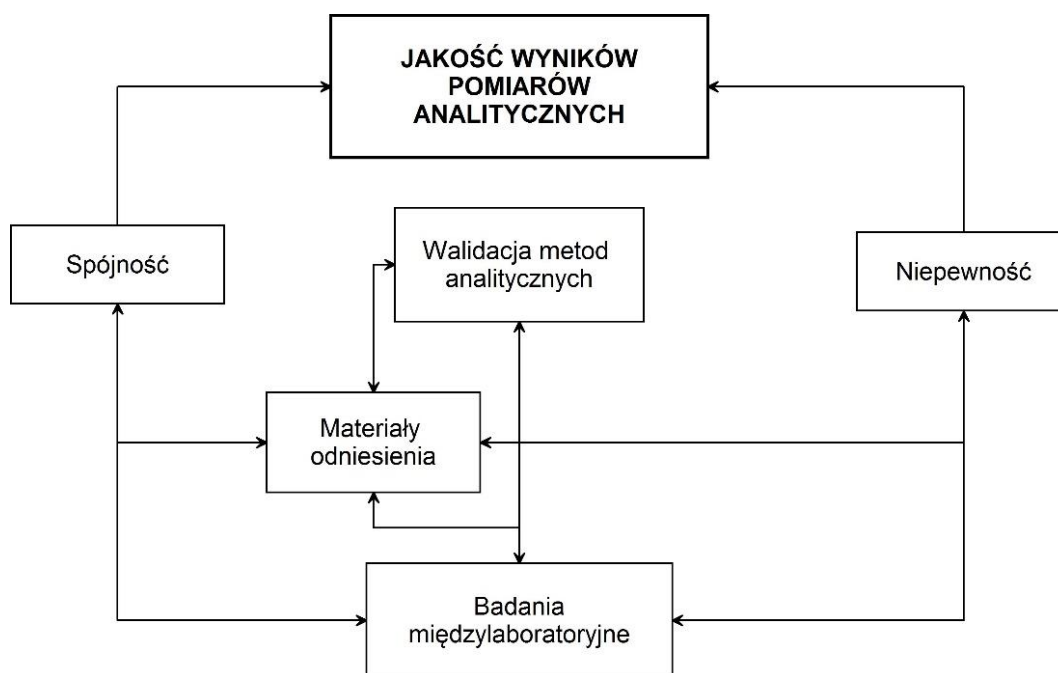
1.7.2 Materiały odniesienia w QA/QC

Rozwój metod analitycznych, a co za tym idzie pojawianie się na rynku coraz bardziej zaawansowanych przyrządów pomiarowych (pozwalających na oznaczanie na poziomie bardzo niskich wartości LOD), wiąże się z dążnością do oznaczania coraz niższych stężeń analitów w próbkach o złożonej matrycy. Procedura analityczna wymaga kontroli każdego etapu procesu, począwszy od pobrania próbki aż do oznaczenia w niej analitów. Zadanie to stanowi wyzwanie dla poszczególnych laboratoriów analitycznych, które chcąc zaprezentować wiarygodne, miarodajne dane, muszą wdrożyć odpowiednie procedury kontroli i zapewnienia jakości uzyskiwanych wyników.

Do elementów składowych systemu kontroli i zapewnienia jakości wyników pomiarów analitycznych należą [211]:

- zapewnienie spójności pomiarowej,
- oszacowanie wartości niepewności wyników pomiarów analitycznych,
- walidacja procedur analitycznych,
- stosowanie materiałów odniesienia,
- uczestniczenie porównaniach międzylaboratoryjnych.

Elementy te wiążą się ze sobą wzajemnie, co pokazano schematycznie na rysunku 10.



Rysunek 10. Elementy składowe systemu kontroli i zapewnienia jakości wyników pomiarów analitycznych [211]

Obecnie na świecie funkcjonują trzy systemy zapewnienia jakości. Należą do nich:

- dobra praktyka laboratoryjna (GLP),
- certyfikacja wg ISO 9000,
- akredytacja wg EN 45001 lub Przewodnika ISO 17025.

Bez względu na wybór przez dane laboratorium systemu kontroli i zapewnienia jakości, materiały odniesienia pełnią kluczową rolę w każdym z nich. Według międzynarodowych organizacji takich jak: ISO, IUPAC, CITAC, ILAC, stosowanie CRM jest powszechnie wymagane w celu uzyskania miarodajnych i jednolitych wyników pomiarów w różnych dziedzinach życia.

Podstawowe obszary zastosowań CRM to:

- wyznaczanie parametrów walidacyjnych (poprawność, dokładność);
- szacowanie niepewności pomiarowej;
- kontrola i zapewnienie spójności pomiarowej;
- wspomaganie procesu akredytacji laboratorium;
- sprawdzanie umiejętności analityka;
- kalibracja przyrządów pomiarowych;
- wykorzystanie jako materiał w porównaniach międzylaboratoryjnych;
- kontrola jakości pracy laboratorium.

1.7.3 Wytwarzanie materiałów odniesienia

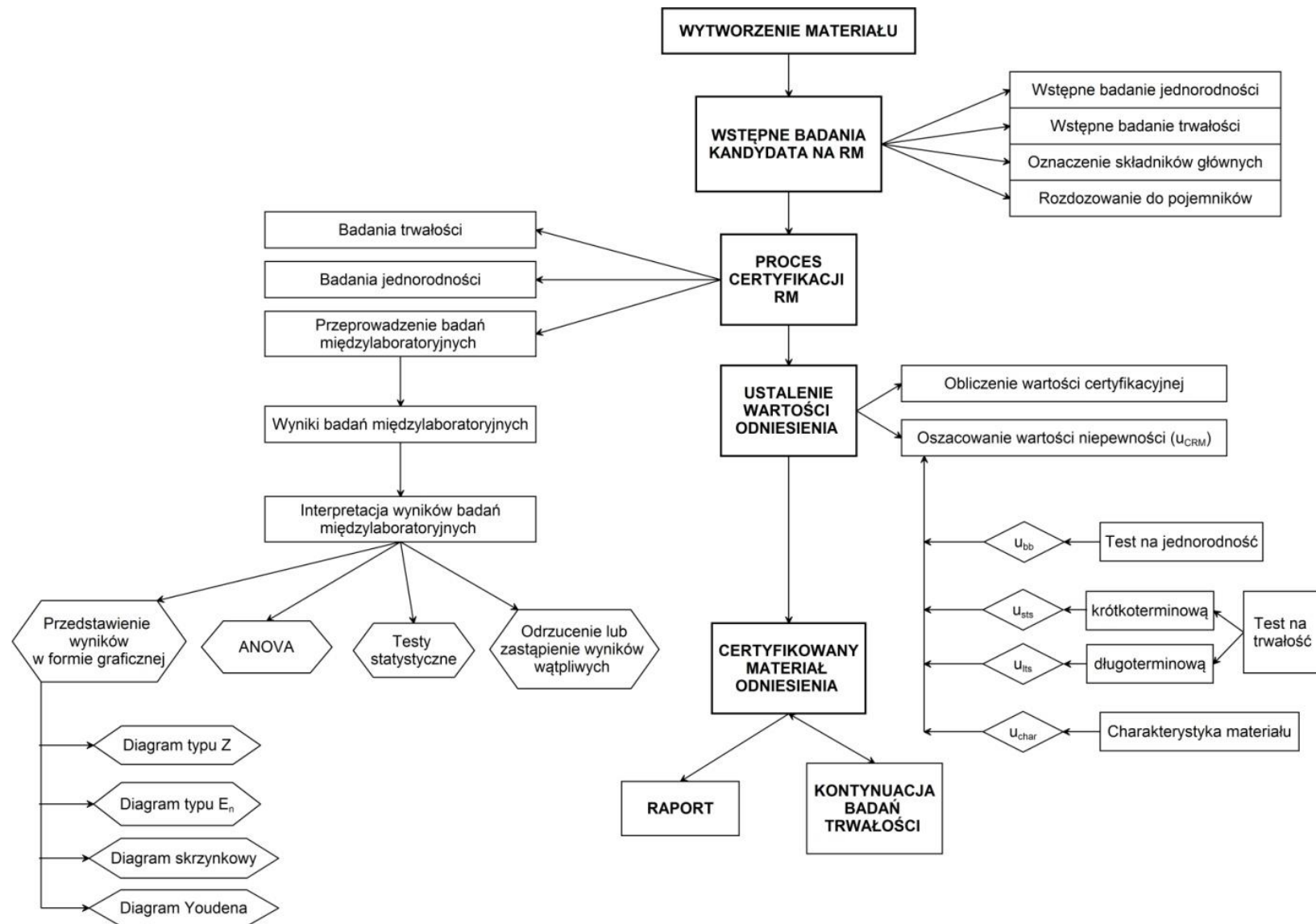
Materiały odniesienia znajdują zastosowanie podczas kalibracji przyrządów analitycznych, optymalizacji procedur pomiarowych, zapewnienia spójności pomiarowej czy szacowania niepewności pomiarów. Wymienione wyżej zastosowania są zgodne z wymogami zawartymi w normie ISO/IEC 17025:2005 [243]. Z tego względu producenci materiałów odniesienia powinni posiadać określone kompetencje takie jak: odpowiednio przygotowane, nowoczesne linie produkcyjne i aparaturę oraz wykwalifikowaną kadrę, postępującą zgodnie z odpowiednimi wymaganiami wobec produkcji oraz jakości metrologicznej wartości certyfikowanej.

Do największych producentów materiałów odniesienia należą: IRMM, BAM, LGC, NIST, IChTJ.

Ze względu na fakt, iż wytworzenie materiału odniesienia jest procesem złożonym, przed przystąpieniem do produkcji materiału odniesienia niezmiernie ważny jest proces planowania wytworzenia danego kandydata na RM, w którym producent powinien określić:

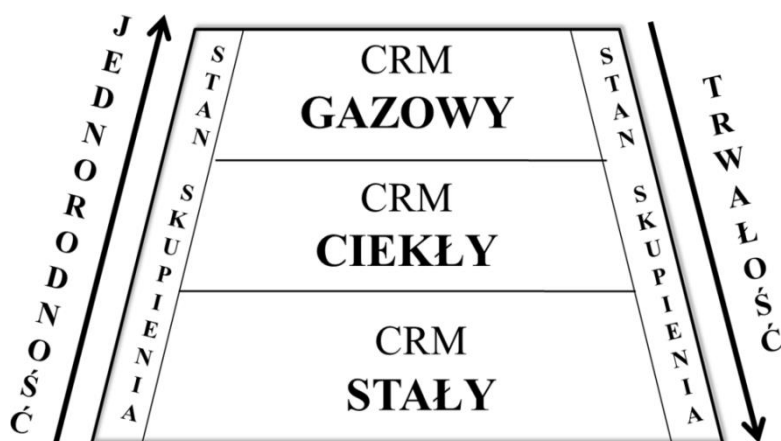
- zapotrzebowanie na dany rodzaj materiału odniesienia,
- postać materiału odniesienia – stan skupienia, rodzaj matrycy – wynikająca z charakterystyki procedur analitycznych, jakie będą stosowane w trakcie jego wykorzystania, oraz związane ze stopniem jego jednorodności,
- postać, rodzaj i zakres zawartości analitu(ów) w przygotowywanym materiale,
- liczbę wytworzonych jednostek materiału odniesienia – uzależnioną od trwałości materiału i obszaru jego wykorzystania.

Proces produkcji materiałów odniesienia składa się z pracochłonnych i czasochłonnych etapów, które przedstawiono w sposób schematyczny na rysunku 11.



Rysunek 11. Schemat produkcji certyfikowanego materiału odniesienia [211]

Ponadto decyzja o wytworzeniu danego materiału odniesienia jest zawsze swego rodzaju kompromisem między jednorodnością (niejednorodność rośnie wraz ze zmianą stanu fizycznego od gazowego poprzez ciekły do stałego) i trwałością (z reguły najbardziej nietrwałe są materiały w stanie gazowym a najbardziej trwałe w stanie stałym), co zostało schematycznie przedstawione na rysunku 12. Konsekwencją tego jest liczba oferowanych na rynku materiałów odniesienia – zdecydowanie najwięcej jest materiałów z grupy CRM, których matryca jest ciałem stałym, a najmniej z matrycą w postaci gazowej.



Rysunek 12. Zależność między liczbą dostępnych CRM na rynku a ich trwałością i jednorodnością uwarunkowaną stanem skupienia

1.7.4 Wybór odpowiedniego materiału odniesienia

Przed wyborem danego materiału odniesienia należy określić przede wszystkim jego zastosowanie. Na przykład, jeżeli zadaniem będzie kalibracja przyrządu pomiarowego, nie ma potrzeby zakupu drogiego materiału odniesienia. Zamiast tego, w większości przypadków wykorzystuje się czyste substancje wzorcowe, dzięki którym można do określonej ilości substancji oznaczanej przypisać odpowiedź układu pomiarowego. Natomiast, jeżeli zadanie ma dotyczyć oceny przydatności procedury pomiarowej do określonego celu, wybór odpowiedniego materiału odniesienia jest bardzo istotny.

Należy określić kilka ważnych kryteriów, między innymi:

- stopień zgodności składu matrycy w stosunku do próbek rzeczywistych,
- poziom zawartości analitu(ów),
- niepewność wartości odniesienia,

- spójność pomiarową wartości odniesienia,
- wymaganą wartość niepewności pomiaru,
- wpływ wartości niepewności certyfikowanego materiału odniesienia na złożoną niepewność pomiaru,
- kompetencje i renomę producenta CRM,
- cenę.

W rzeczywistości dobranie idealnego materiału odniesienia nie jest możliwe, z uwagi na:

- różne rodzaje matryc materiałów odniesienia,
- postać fizyczną materiału odniesienia (najczęściej jako mocno rozdrobniony, wcześniej zliofilizowany, proszek o dużej jednorodności),
- stężenie substancji w materiale odniesienia, które różni się znacznie (najczęściej jest znacznie większe) od stężenia substancji w próbkach badanych,
- formę chemiczną oznaczanej substancji w materiale odniesienia, która różni się od formy chemicznej tej substancji w próbce badanej.

Podczas wybierania danego materiału odniesienia ważne jest również zwrócenie uwagi na aspekt ekonomiczny. W zależności od wielkości niepewności dany CRM zajmuje określona pozycję w hierarchii metrologicznej; im wyżej w hierarchii, tym materiał jest droższy. W praktyce najlepszym wyborem jest zakup takiego materiału odniesienia, którego „niepewność standardowa nie spowoduje zwiększenia standardowej niepewności złożonej, poza ustalone wymagania” [244].

1.7.5 Parametry charakteryzujące materiał odniesienia

Do najważniejszych cech materiału odniesienia należą jednorodność, trwałość oraz w przypadku CRM niepewność przypisana wartości odniesienia.

1.7.5.1 Jednorodność

Jednorodność jest definiowana jako stopień zgodności struktury lub składu w stosunku do danej właściwości [245]. Badanie tej właściwości polega na porównywaniu uzyskanych wyników dla pobranych losowo próbek materiału odniesienia i powinno być przeprowadzone za pomocą

procedury, która pozwala na wykorzystanie próbek o małej masie oraz na uzyskiwanie bardzo powtarzalnych wyników pomiarów [246].

Wyróżnia się dwa rodzaje jednorodności [247]:

- jednorodność wewnątrzopakowaniową (ang. *within-bottle homogeneity*), dzięki której ustalona zostaje minimalna ilość próbki, którą należy pobrać do analizy, aby zachować ustaloną wcześniej niepewność pomiaru; zdefiniowanie minimalnej ilości próbki materiału odniesienia pobieranego do analizy pozwala na wyeliminowanie błędu związanego z niejednorodnością materiału w jednym opakowaniu;
- jednorodność międzyopakowaniową (ang. *between-bottle homogeneity*), która określa zmienność materiału pomiędzy poszczególnymi opakowaniami (ściślej jednostkami badanymi); na wartość niejednorodności materiału odniesienia między opakowaniami użytkownik nie ma wpływu.

1.7.5.2 Trwałość

Materiały odniesienia są zwykle przygotowywane w ilości, która jest wystarczająca na kilka lat i z tego powodu muszą być one produkowane w sposób zapewniający trwałość podczas planowanego czasu eksploatacji [248]. Dodatkowo podczas wytwarzania materiału odniesienia należy ustalić najbardziej odpowiednie i ekonomiczne warunki jego przechowywania i transportu.

Badanie trwałości materiału odniesienia jest etapem niezbędnym w procesie jego produkcji i ma na celu:

- sprawdzenie, czy skład materiału odniesienia pozostanie niezmienny w czasie,
- zbadanie wpływu warunków przechowywania na trwałość samego analitu, jego matrycy i połączenia tych dwóch aspektów,
- zagwarantowanie trwałości materiału podczas transportu, ponieważ czynniki zewnętrzne mogą wpływać na zmianę składu materiału odniesienia.

Wyróżnia się dwa rodzaje trwałości:

- trwałość krótkoterminową (np. trwałość materiału w „warunkach transportu”),
- trwałość długoterminową (np. okres trwałości).

Badania trwałości materiału odniesienia wymagają wykorzystania szybkich i powtarzalnych procedur pomiarowych. Mogą one być wykonywane z zastosowaniem dwóch sposobów klasycznego oraz izochronicznego [248]. W przypadku sposobu klasycznego badanie trwałości polega na porównaniu wyników uzyskanych dla próbek przechowywanych w zalecanych warunkach i dla próbek odniesienia (najczęściej przechowywanych w niskich temperaturach). Natomiast izochroniczny sposób badania trwałości polega na wnioskowaniu o trwałości materiału odniesienia na podstawie wyników analiz próbek przechowywanych w różnych temperaturach (na ogół wyższych niż zalecana temperatura przechowywania) w krótkim okresie czasu (np. kilka tygodni).

Do procesów, które mogą mieć istotny wpływ na spadek trwałości materiału odniesienia należą [211]:

- rozkład analitu kontrolowany przez proces dyfuzji,
- rozkład składników matrycy kontrolowany przez proces dyfuzji,
- zużycie przeciwutleniacza kontrolowane przez proces dyfuzji,
- autokataliza,
- reakcja elementarna,
- „tworzenie” analitu przez mikroorganizmy.

1.7.5.3 Wartość odniesienia

Proces certyfikacji przeprowadzany jest w celu wyznaczenia wartości parametru charakteryzującego materiał odniesienia przez odpowiednio wybrane laboratoria. Kampania certyfikacyjna jest zazwyczaj poprzedzona badaniami wstępnymi, w których uczestniczy najczęściej liczna grupa laboratoriów, z których wybierane są następnie laboratoria będące uczestnikami właściwego procesu certyfikacji materiału [249].

W sytuacji, gdy dany materiał odniesienia jest jednorodny i trwały, warunki jego stosowania są dokładnie opisane, a analiza składu stosowanego materiału daje powtarzalne i spójne wyniki, można przystąpić do etapu certyfikacji materiału odniesienia.

W zależności od:

- rodzaju materiału odniesienia,
- wymagań podyktowanych jego końcowym zastosowaniem,
- kwalifikacji laboratoriów uczestniczących w pomiarze,
- jakości metody/metod badań,

istnieje możliwość wyboru poprawnej technicznie metody przeprowadzenia certyfikacji materiału odniesienia.

Metody, według których certyfikuje się materiały odniesienia można sklasyfikować następująco [250, 251]:

- pomiar z wykorzystaniem jednej metody definitywnej (pierwotnej),
- pomiar z wykorzystaniem kilku niezależnych procedur wzorcowych w jednym laboratorium,
- wykorzystanie badań międzylaboratoryjnych – kilka procedur w kilku laboratoriach.

Najistotniejszym założeniem wszystkich procedur certyfikacyjnych jest właściwe scharakteryzowanie błędów systematycznych, spowodowanych zastosowaniem określonych metod pomiarowych, ponieważ wartości tych błędów są jedną z cech uwzględnianych przy szacowaniu niepewności certyfikowanej wartości odniesienia.

Niepewność danej wartości odniesienia zależy od wyniku oszacowania jednorodności danego materiału odniesienia. Rozpatruje się dwa przypadki [250]:

- 1) niejednorodność materiału jest pomijalnie niewielka w porównaniu z błędem pomiaru – w tym wypadku wszystkie próbki jednostkowe materiału odniesienia mogą być traktowane, jako identyczne pod względem certyfikowanej wartości właściwości; źródłem niepewności w tym przypadku jest błąd przypadkowy pomiaru, natomiast niepewność wyrażana jest za pomocą przedziału ufności pokrywającego wartość średnią;
- 2) niejednorodność materiału jest głównym źródłem niepewności w porównaniu z błędem pomiaru – w tym przypadku próbki jednostkowe materiału odniesienia tworzą populację; szacując niepewność opisuje się rozpiętość między poszczególnymi próbkami jednostkowymi w populacji; istotne jest, aby wartość każdej próbki jednostkowej mieściła się w granicach określonego przedziału tolerancji. W przypadku, gdy producent CRM określił naturalne różnice między próbkami jednostkowymi danego materiału jako małe, to CRM nadaje się do przewidywanego zastosowania, jeżeli nie to proces certyfikacyjny danego materiału odniesienia nie może być dalej prowadzony.

Na wartość niepewności wartości certyfikowanej materiału odniesienia (U_{CRM}), którą oblicza się według równania 1, mają wpływ niepewności związane z [211]:

- charakterystyką materiału,
- jednorodnością,
- trwałością (krótko- i długoterminową).

$$U_{CRM} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (1)$$

gdzie: U_{CRM} – rozszerzona niepewność wartości odniesienia materiału odniesienia;
 k – współczynnik rozszerzenia; u_{char} – standardowa niepewność związana z charakterystyką materiału; u_{bb} – standardowa niepewność związana z jednorodnością międzyopakowaniową;
 u_{sts} – standardowa niepewność związana z trwałością długoterminową materiału;
 u_{lts} – standardowa niepewność związana z trwałością krótkoterminową materiału.

1.7.6 Raport certyfikacyjny

Certyfikat powinien przekazywać zasadniczą informację (certyfikowaną wartość właściwości oraz niepewność tej wartości) na temat materiału odniesienia od producenta do użytkownika. Według przewodnika ISO nr 31 [252] w raporcie certyfikacyjnym powinny być zawarte następujące informacje:

- nazwa i adres organizacji certyfikującej,
- tytuł dokumentu,
- status certyfikatu,
- nazwa materiału,
- numer próbki i/lub numer partii,
- data certyfikacji,
- dane o dostępności materiałów odniesienia w innych postaciach/wymiarach,
- źródło dostawy materiału odniesienia,
- dostawca materiału odniesienia,
- dane o przygotowującym materiał odniesienia,
- opis materiału odniesienia,
- określenie przewidywanego sposobu stosowania,
- trwałość oraz instrukcje dotyczące transportu i przechowywania,
- specjalne instrukcje dotyczące prawidłowego stosowania,
- metodę przygotowania,
- stwierdzenie jednorodności,
- certyfikowane wartości właściwości i ich niepewność,
- wartości drugorzędnych właściwości podane dla informacji, lecz niecertyfikowane,

- specjalne wartości uzyskane przez poszczególne laboratoria lub przy zastosowaniu poszczególnych metod,
- interpretacja statystycznego oszacowania niepewności,
- techniki pomiarowe użyte do certyfikacji,
- nazwiska analityków, badaczy oraz nazwy laboratoriów uczestniczących,
- status prawny,
- literatura (z raportem towarzyszącym włącznie, o ile taki istnieje),
- podpisy lub nazwiska osób odpowiedzialnych z urzędu za certyfikację.

1.7.7 Zasady stosowania materiałów odniesienia

Korzystanie z materiałów odniesienia wymaga przestrzegania reguł dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP) i/lub wytycznych zawartych w normie ISO/IEC 17025:2005 [243], które obowiązują w laboratoriach zajmujących się oznaczaniem składników, występujących w ilościach śladowych czy też nawet ultra śladowych w badanych próbkach. Należy zatem przestrzegać zaleceń producenta, zawartych w raporcie certyfikacyjnym materiału odniesienia, dotyczących m. in. [253]:

- celu stosowania materiału odniesienia,
- warunków stosowania materiału odniesienia,
- zasad postępowania z próbką CRM przed rozpoczęciem analizy oraz w jej trakcie,
- minimalnej masy materiału odniesienia pobranego do analizy,
- toku postępowania, w przypadku materiałów w stanie skupienia stałym, w celu określenia zawartości wody dla próbek materiału odniesienia,
- informacji nt. trwałości i jednorodności materiału odniesienia,
- warunków przechowywania (temperatura, charakterystyka naczynia)
- pobranej i niewykorzystanej do badań próbki materiału odniesienia (nie można jej kierować z powrotem do pojemnika).

1.7.8 Materiały odniesienia na potrzeby oznaczania selenu oraz jego organicznych związków

Obecnie dużą wagę przykładana się do dokładnego poznania składu pierwiastkowego produktów roślinnych i zwierzęcych, ponieważ wiąże się to z zapewnieniem zdrowej żywności oraz ma wpływ na proces produkcji artykułów spożywczych przyczyniających się do poprawy zdrowia [254]. Dąży się nie tylko do oznaczania całkowitej zawartości danego pierwiastka, ale również

do poznania poszczególnych jego form, które z kolei przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat metabolizmu pierwiastków w roślinach lub organizmach zwierzęcych oraz ich biodostępności. W przypadku selenu, forma w jakiej występuje w danym produkcie jest istotna ze względu na wąską granicę pomiędzy dawką szkodliwą a niezbędną dla tego pierwiastka. Dlatego podczas oznaczania selenu istotne jest uzyskanie miarodajnych wyników. Jednym z elementów systemu kontroli i zapewnienia jakości wyników pomiarów są materiały odniesienia. W tabeli 12 przedstawiono przykłady materiałów odniesienia z certyfikowaną zawartością selenu całkowitego.

Tabela 12. Certyfikowane materiały odniesienia do oznaczania całkowitej zawartości selenu [254, 255]

Nazwa CRM	Matryca	Wartość certyfikowana* [mg/kg]	Producent
SRM 1567b ERM-BC210a	Mąka pszenna	1,14 ± 0,10 17,23 ± 0,91	NIST LGC
SRM 1568b	Mąka ryżowa	0,365 ± 0,029	NIST
SRM 1570a	Liście szpinaku	0,117 ± 0,009	NIST
SRM 1573a	Liście pomidora	0,054 ± 0,003	NIST
SRM 1566b	Tkanka ostrygi	2,06 ± 0,15	NIST
SRM 1547	Liście brzoskwini	0,120 ± 0,009	NIST
SRM 1515	Liście jabłka	0,050 ± 0,009	NIST
ERM-BD150 ERM-BD151	Odłuszczone mleko w proszku	0,188 ± 0,014 0,190 ± 0,040	IRMM
ERM-BB184	Mięśnie wołowe	0,45 ± 0,04	IRMM
BCR-185R	Wątroba wołowa	1,68 ± 0,14	IRMM
ERM-BB186	Nerki wieprzowe	10,30 ± 0,90	IRMM
BCR-422	Mięśnie dorsza	1,63 ± 0,07	IRMM
ERM-CE278K	Tkanka małża	1,62 ± 0,12	IRMM
BCR-402	Koniczyna biała	6,70 ± 0,25	IRMM
ERM-BB422	Mięśnie ryb	1,33 ± 0,13	IRMM
ERM-CD200	Wodorosty	0,088 ± 0,010	IRMM
ERM-BC281	Żyto	0,023 ± 0,004	IRMM
DORM-4	Białko ryb	3,56 ± 0,34	NRC
TORT-3	Homar	10,9 ± 1,0	NRC
SELM-1	Wzbogacone w Se drożdże	2059 ± 64	NRC
DOLT-5	Wątroba kolenia	8,3 ± 1,8	NRC

*wartość certyfikowana podana w wersji oryginalnej z certyfikatu

Ponieważ większość materiałów odniesienia ma atestowaną jedynie całkowitą zawartość selenu, istotne wydaje się wytypowanie materiałów, które spełniałyby warunki stawiane kandydatom na materiał odniesienia pod względem trwałości, jednorodności, odporności biologicznej i chemicznej. Do tej pory jedynie trzy materiały stanowią CRM na potrzeby specjacji selenu oraz selenometioniny. Należą do nich materiały dostępne pod handlową nazwą SELM-1 [25], ERM-BC210a [256] i LGC-7330 [257], których charakterystykę przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Certyfikowane materiały odniesienia na potrzeby specjacji selenu [25, 256, 257]

Nazwa CRM	Matryca	Wartość certyfikowana*	Producent
ERM – BC210a	Mąka pszenna	Se: $17,23 \pm 0,91$ SeMet : $27,4 \pm 2,6$ [mg/kg s.m.]	LGC
SELM-1	Wzbogacone w Se drożdże	Se: 2059 ± 64 SeMet: 3448 ± 146 Met: 5758 ± 277 [mg/kg]	NRC
LGC-7330	Wzbogacony ^{76}Se	$99,8 \% +0,2/-3,1$	LGC

*wartość certyfikowana podana w wersji oryginalnej z certyfikatu

2 CEL PRACY

Dzięki panującej modzie na zdrowy styl życia coraz więcej ludzi jest świadomych jak ogromną rolę w naszym życiu odgrywa dieta. Stwierdzenie: „Jesteś tym, co jesz” w dobie dzisiejszych doniesień naukowych nabiera nowego znaczenia. Wiadomym jest, że żywność bezpośrednio oddziałuje na organizm człowieka. Może mu szkodzić lub służyć. Z tego względu coraz większą popularność zyskuje żywność funkcjonalna, wzbogacona oraz naturalne suplementy diety. Produkty takie wykazują korzystny wpływ na zdrowie człowieka, np. obniżają poziom cholesterolu we krwi, czy dostarczają witamin lub składników mineralnych.

Selen jest niezbędnym składnikiem mineralnym dla zwierząt i ludzi, którego spożywanie oferuje korzyści zdrowotne, włączając w to ochronę przeciwnowotworową. Zostało potwierdzone, że selen chroni organizm przed różnymi rodzajami nowotworów, takimi jak rak jelita grubego [258 - 260], rak piersi [261], rak skóry [18], rak prostaty [262] i rak płuc [263, 264]. Ochrona przeciwnowotworowa selenu została powiązana z przeciwutleniającymi właściwościami niektórych selenobiałek [265]. Udowodniono, że związki selenu mają zdolność do zmniejszenia zachorowań na raka oraz zmniejszenia śmiertelności z powodu nowotworów. Zauważono również zwiększenie występowania tych dwóch efektów u osób, u których wykazano niedobór selenu [43]. Aktualne badania na temat związku pomiędzy spożyciem selenu a profilaktyką raka koncentrowały się głównie na postaci chemicznej selenu: wzbogaconej w selen żywności oraz efektów *in vitro* monoetylowanych związków selenu. Wiele z tych badań polegało na wprowadzeniu selenianu (IV) sodu lub selenometioniny do diety. Wyniki badań wykazały, że selenian (IV) wykazuje większy efekt chemoochronny niż SeMet [266]. Inne badania polegały na wykazaniu słuszności, że suplementacja za pomocą wzbogaconych w selen warzyw takich jak czosnek, czy brokuły, wykazuje większy efekt chemoochronny w porównaniu do Se (IV) i SeMet [258, 260, 267]. Warzywa te kumulują nieorganiczne formy selenu i zamieniają je na formy organiczne, głównie SeMetSeCys – związek selenu, który przypuszczalnie jest odpowiedzialny za ochronę przeciwnowotworową [268, 269]. Ponadto na podstawie wyników badań stwierdzono stosunkowo małą toksyczność SeMetSeCys w porównaniu do innych organicznych związków selenu oraz jednocześnie wysoką przyswajalność SeMetSeCys [270]. Wykazano również, że SeMetSeCys jest nietoksycznym, wysoce bioaktywnym związkiem, który może stanowić źródło selenu dla organizmów żywych (szczególnie człowieka) [271]. SeMSeCys jest jednym z głównych prekursorów lotnego metyloselenolu (CH_3SeH) - aktywnej formy selenu, która jest odpowiedzialna za obniżenie zachorowań na niektóre rodzaje nowotworów (rak piersi,

prostaty, skóry) [33, 272]. SeMetSeCys w organizmie człowieka jest bezpośrednio metabolizowana do metyloselenolu (przez β -liazę), co wyróżnia ją spośród innych związków (w tym selenometioniny), które do syntezy lotnej formy selenu potrzebują kilku etapów. SeMetSeCys występuje głównie we wzbogaconych w selen roślinach z rodziny *Allium* i *Brassica* np. brokułach, cebuli, czosnku i gorczycy sarepskiej [55, 207, 220, 267, 273 - 278]. Jednak proces wytwarzania wzbogaconych w selen warzyw wymaga wstępnego etapu przygotowania gleby pod ich uprawę, czyli wzbogacenia nawozów za pomocą nieorganicznych soli selenu. Dodatkowo nawożenie gleby może stanowić ryzyko jej zanieczyszczenia, a co się z tym wiąże przedostania się szkodliwych związków do łańcucha pokarmowego [279].

Wyniki badań próbek brokułów, opisanych w literaturze [280], uprawianych na pożywce z dodatkiem selenianu (IV) przez 40 dni wykazały wzrost zawartości selenu w korzeniach i łodydze (łącznie z liśćmi). Dystrybucja związków selenu w brokułach uzasadnia ich wysoką zdolność do kumulacji selenu. Po 10 dniach ekspozycji na Se (IV), formy nieorganiczne były szybko zamieniane w korzeniach na organiczne – głównie SeMet. Wysoka zawartość SeMet w korzeniach oraz mały współczynnik przenoszenia tego związku do innych części rośliny stanowi prawdopodobnie mechanizm tolerancyjny rośliny wobec selenu. SeMetSeCys była głównym związkiem selenu oznaczonym w łodygach i owocach, co stanowiło podstawę do stwierdzenia, że wzbogacone w selen brokuły mogą stanowić źródło SeMetSeCys dla człowieka, jednak tylko w postaci surowej. W gotowanych brokułach wykazano, że istotne związki selenu są zamieniane na inne organiczne związki i selenian (VI), a SeMetSeCys oznaczona została głównie w wodzie po gotowaniu brokułów. Dlatego, aby dostarczyć SeMetSeCys do organizmu powinno się spożywać brokuły w stanie surowym w sałatkach lub ewentualnie jako zupę [280].

Biorąc pod uwagę wszystkie wnioski z badań przeprowadzonych w ośrodkach badawczych na całym świecie, dobrym rozwiązaniem dla dostarczania SeMetSeCys do organizmu człowieka wydaje się kiełkowanie roślin w kontrolowanym środowisku na pożywce bogatej w selen [281]. Kiełki oprócz tego, że zawierają znaczne ilości witamin oraz składników mineralnych, nie wymagają wstępnego procesu przygotowania (gotowania, pieczenia), a co za tym idzie prawdopodobieństwo ulotnienia się niektórych istotnych dla zdrowia (szczególnie zmetylowanych) związków selenu jest małe.

W przypadku selenu, który obecnie staje się coraz bardziej popularnym dodatkiem do diety, bardzo ważne jest dokładne oznaczenie ilościowe i jakościowe tego pierwiastka w danym produkcie, ze względu na wąską granicę pomiędzy dawką niezbędną a toksyczną.

Wynika z tego potrzeba posiadania odpowiedniego materiału odniesienia na potrzeby oznaczenia całkowitej zawartości selenu jak i jego poszczególnych związków, który zapewni spójność, dokładność i poprawność uzyskanych wyników pomiarów.

Głównym celem badań było sprawdzenie możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu w oparciu o wzbogacone w selen kiełki roślin.

W związku z tym, w ramach wykonywanej pracy doktorskiej podjęto się realizacji następujących zadań:

- a) hodowli kiełków roślin na pożywce zawierającej roztwory nieorganicznych soli selenu – selenianu (IV) sodu lub selenianu (VI) sodu i na tej podstawie wyboru rodzaju kiełków najbardziej odpornego na wymagające warunki procesu (hamowanie wzrostu, gnicie, pleśń),
- b) oznaczeniu całkowitej zawartości selenu w próbkach kiełków roślin,
- c) badaniu trwałości zawartości całkowitego selenu w próbkach kiełków i na tej podstawie określeniu optymalnych warunków kiełkowania oraz wstępnemu wyselekcjonowaniu odpowiednich rodzajów kiełków do dalszych etapów badań,
- d) badaniu jednorodności próbek kiełków roślin,
- e) oznaczeniu jakościowym i ilościowym poszczególnych związków selenu w próbkach kiełków i na tej podstawie:
 - określeniu, która z form nieorganicznego selenu powoduje tworzenie się organicznych połączeń selenu w kiełkach,
 - wyselekcjonowaniu odpowiednich rodzajów kiełków do dalszych etapów badań,
- f) badaniu trwałości zawartości poszczególnych związków selenu w próbkach kiełków,
- g) sprawdzeniu zależności między stężeniem roztworu selenianu użytym podczas kiełkowania a zawartością poszczególnych związków selenu w kiełkach roślin,
- h) zaproponowaniu odpowiedniego rodzaju kiełków roślin jako kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu.

3 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1 Materiały i aparatura

3.1.1 Materiały

- Nasiona na kielki roślin (PNOS lub BIOS, Polska),
- Selenian (IV) sodu i selenian (VI) sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- Kwas azotowy HNO₃ (Suprapur, 65 %, Merck, Niemcy),
- Roztwór wzorcowy selenu 1000 mg/l (SPEX CertiPrep, USA),
- Modyfikator matrycy do GF - AAS: Pd(NO₃)₂ + Mg(NO₃)₂ w 1 % HNO₃ (SCP, Kanada),
- Roztwory wzorcowe selenometioniny, selenometyloselenocysteiny i γ -glutamyl-selenometyloselenocysteiny (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- Nadtlenek wodoru H₂O₂ (30 %, POCh, Polska),
- Roztwory wzorcowe selenianu (IV) sodu i selenianu (VI) sodu (Merck, Niemcy),
- Enzymy: proteaza typu XIV uzyskana z *Streptomyces griseus* oraz lipaza typu VII uzyskana z *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- Trizma (Sigma-Aldrich, Niemcy),
- Bufor octanowy o pH = 4,7 (Sigma-Aldrich, Niemcy).

3.1.2 Aparatura

- System do otrzymywania ultraczystej wody dejonizowanej Milli-Q (Millipore, USA),
- Kielkownica (Plantico, Polska),
- Liofilizator Labconoco FreeZone 6 system (USA),
- Blender ręczny (Zepter, Polska),
- Mineralizator Multiwave GO (Anton Paar, Austria),
- Atomowy Spektrometr Absorpcyjny SavantAA Zeeman (GBC, Australia),
- System ekstrakcji mechanicznej (Radleys Tech, Wielka Brytania),
- Wirówka Hettich Zentrifugen EBA 20 (Niemcy),
- Wysokosprawny Chromatograf Cieczowy (HPLC) Agilent 1200 (Agilent, USA),
- Spektrometr mas w połączeniu z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP MS) (PerkinElmer SCIEX, USA).

3.2 Przygotowanie próbek

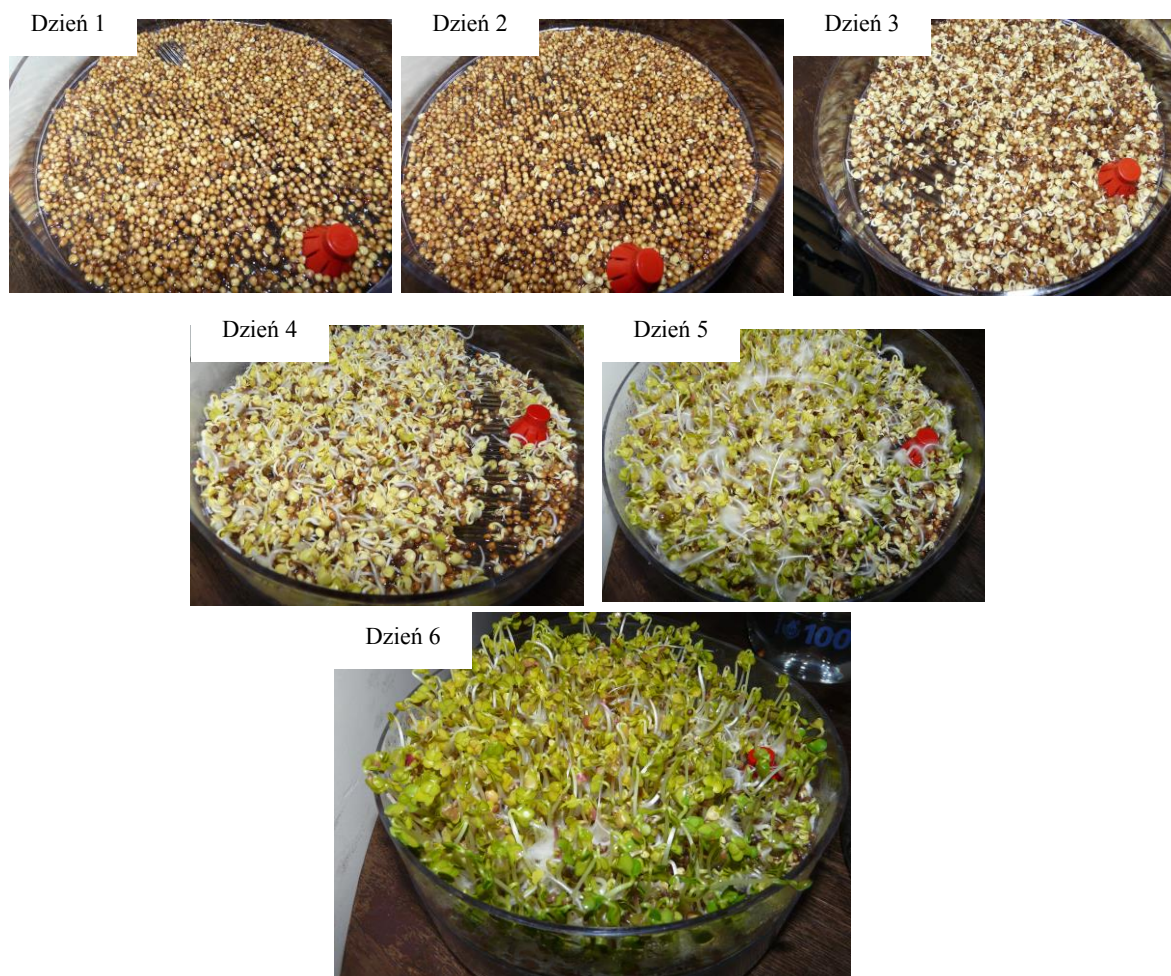
3.2.1 Kielkowanie

Do badań użyto sześciu różnych rodzajów nasion roślin, których charakterystykę zestawiono w tabeli 14. Pierwszym etapem było namoczenie nasion w ok. 250 ml roztworu (wody lub roztworu selenianu (VI lub IV) sodu). Czas namaczania zależał od rozmiaru nasion – mniejsze nasiona (brokułów, kapusty czerwonej i lucerny) namoczono przez 4 godziny, większe (gorczycy białej, rzodkwi i rzodkiewki) przez 8 godzin. Następnie nasiona wysiano w kielkownicach, których budowa zapewnia stabilne, wilgotne warunki także przy wahaniami temperatury. Trzy duże szalki kielkownicy pozwalają na jednoczesne kielkowanie trzech rodzajów kielków, a syfony odpływowe równomierne nawodnienie, wilgotność i odpływ wody. Proces kielkowania roślin prowadzony był w temperaturze pokojowej (19-23 °C) w warunkach dnia i nocy. Kielki podlewane były dwa razy dziennie za pomocą 250 ml odpowiedniego roztworu. Całkowity czas kielkowania zależny był od rodzaju rośliny.

W tabeli 14 przedstawiono czas kielkowania dla poszczególnych roślin, natomiast na rysunku 13 przedstawiono proces kielkowania nasion na przykładzie nasion rzodkiewki.

Tabela 14. Lista nasion na kielki użytych do badań

Gatunek/rodzaj		Rodzina	Całkowity czas kielkowania (dni)
Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna		
Brokuły	<i>Brassica oleracea L. var. italica</i> Plenck	Brassicaceae	9
Kapusta czerwona	<i>B. oleracea var. capitata f. rubra</i>		9
Gorczyca biała	<i>Sinapis alba</i>		7
Rzodkiew	<i>Raphanus sativus var. Longipinnatus</i>		7
Rzodkiewka	<i>Raphanus sativus var. sativus</i>		7
Lucerna	<i>Medicago L.</i>	Fabaceae	7



Rysunek 13. Proces kiełkowania nasion rzodkiewki

Zebrane kiełki dokładnie przemyto wodą, a następnie kilkakrotnie wodą dejonizowaną w celu wykluczenia zanieczyszczenia oraz wymycia pozostałości roztworów z ich powierzchni. Następnie kiełki osuszono, przeniesiono do szczelnie zamykanych woreczków PE i zamrożono (temp. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.2.2 Liofilizacja

Kolejnym etapem było przeprowadzenie liofilizacji zebranego materiału badawczego. Liofilizacja prowadzona była przez okres 3 – 4 dni w temperaturze $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pod ciśnieniem $0,12\text{ mbar}$. Następnie liofilizaty rozdrobniono za pomocą blendera ręcznego i przeniesiono do szczelnie zamykanych woreczków PE. Tak przygotowane próbki przechowywano w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Procedura oznaczania zawartości całkowitego selenu oraz jego związków organicznych w próbkach kiełków roślin

3.3.1 Oznaczenie całkowitej zawartości selenu w próbkach kiełków roślin

Całkowita zawartość selenu została oznaczona w kiełkach (składających się z nasion, łodyg i korzeni). Pierwszym etapem była mineralizacja próbki w mineralizatorze wspomaganym promieniowaniem mikrofalowym wyposażonym w naczynia teflonowe. W tym celu odważono około $0,500 \pm 0,001$ g próbki, do której następnie dodano 7 ml 65 % kwasu azotowego HNO_3 . Mineralizacja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym przebiegała w temperaturze 180°C i pod ciśnieniem do maksimum 20 bar. Mineralizaty przeniesiono do kolb stożkowych 25 ml i rozcieńczono wodą dejonizowaną do odpowiedniej objętości (25 ml). Tak przygotowane roztwory przeniesiono do szczelnie zamykanych probówek. Do oznaczenia całkowitej zawartości selenu w próbkach użyto spektrometru SavantAA Zeeman, który wykorzystuje technikę atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w kuwecie grafitowej (GF - AAS). Pierwszym etapem analizy było sporządzenie krzywej kalibracyjnej. Krzywa generowana była automatycznie na podstawie pomiaru absorbancji roztworu wzorcowego i jego kolejnych rozcieńczeń. Następnie w automatycznym podajniku próbek umieszczono w naczynkach o pojemności 2 ml kolejne mineralizaty próbek kiełków roślin. Aby zapewnić lepsze rezultaty podczas oznaczania całkowitej zawartości selenu stosowano dodatek modyfikatora. Otrzymane wyniki w $[\mu\text{g/l}]$ przeliczono na suchą masę badanych próbek $[\text{mg/kg s.m.}]$, a następnie obliczono wartości odchyłeń standardowych oraz oszacowano niepewność pomiarów. W tabeli 15 zestawiono informacje na temat parametrów pracy spektrometru AAS, natomiast w tabeli 16 na temat wykorzystywanego programu temperaturowego pieca grafitowego.

Tabela 15. Parametry pracy spektrometru AAS

Matryca	1 % HNO_3
Długość fali (nm)	196,0
Szerokość szczeliny (nm)	1,0
Objętość próbki (μl)	20
Modyfikator	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ w 1 % HNO_3
Natężenie pola magnetycznego (Tesla)	1,00
Charakterystyczna masa (pg)	7,7
Zakres pomiarowy	8,7 - 60 $[\mu\text{g/l}]$
Objętość modyfikatora (μl)	3

Tabela 16. Program temperaturowy pieca grafitowego

Etap	Temperatura [°C]
1	50
2 - Nastrzyk	
3 – Odparowanie rozpuszczalnika	90
4	120
5 - Spopielanie	800
6	800
7 - Odczyt	2650
8	2650

3.3.2 Specjacja selenu w próbkach kiełków roślin

Analiza specjacyjna selenu została przeprowadzona w ośrodku zewnętrznym. Pierwszym etapem oznaczenia poszczególnych związków selenu w próbkach kiełków roślin była ekstrakcja enzymatyczna. Polegała ona na zmieszaniu $0,100 \pm 0,001$ g zliofilizowanej próbki z 20 mg proteazy, 20 mg lipazy oraz 5 ml 30 mM Tris-HCl (pH 7,5). Ekstrakcja była prowadzona w termostacie przez 16 godzin w temperaturze 37 °C w mieszalniku termostatowanym. Po ekstrakcji próbki wirowano przez 10 minut z prędkością 13 000 rpm. Następnie ekstrakty przesączono przez sącze 0,45 µm. Szczegółowy opis procedury oznaczania poszczególnych związków selenu przedstawiono w literaturze [282].

Warunki rozdzielania za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Warunki rozdzielania za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Faza ruchoma	Bufor octanowy (pH = 4,7) o stężeniu 5 mM lub 100 mM
Kolumna	Kolumna anionowymienna typu PrP-X100 o parametrach: 250 mm × 4,6 mm × 10 µm (Hamilton, USA)
Warunki rozdzielania	Elucja gradientowa
Objętość próbki	100 µl
Czas rozdzielania	20 min

W celu kalibracji układu HPLC – ICP - MS sporządzono roztwór wzorcowy oznaczanych związków selenu o stężeniu wyjściowym 500 µg/l, którego rozcieńczeń używano kalibracji. Na podstawie czasów retencji uzyskanych dla poszczególnych związków: SeMetSeCys (2,9

min), SeMet (4,6 min), Se (IV) (9,3 min), γ -glutamyl-SeMetSeCys (12,5 min) oraz Se (VI) (14,8 min) można było przeprowadzić analizę jakościową, a na podstawie krzywych wzorcowych analizę ilościową ekstraktów kiełków roślin.

3.3.3 Wstępne badanie trwałości selenu w próbkach kiełków roślin

Sprawdzanie trwałości materiału odniesienia jest etapem niezbędnym w procesie jego certyfikacji.

Badanie trwałości selenu w próbkach kiełków polegało na powtórzeniu całej procedury oznaczania całkowitej zawartości selenu po przechowywaniu materiału badawczego przez okres czasu od 1 do 12 miesięcy w szczelnie zamykanych woreczkach PE w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Wartości niepewności pomiarów zostały oszacowane przy uwzględnieniu niepewności wynikającej z poprawności oraz niepewności pomiarów.

Na podstawie wyników badań po danym okresie czasu, jeżeli:

- 1) różnica pomiędzy zawartością selenu po danym okresie czasu w stosunku do zawartości początkowej była nie większa niż $\pm 10\%$, tj. spełniała warunek przedstawiony za pomocą równania 2:

$$90\% \leq \frac{x(t_i)}{x(t_0)} \leq 110\% \quad (2)$$

gdzie $x(t_i)$ – zawartość całkowitego selenu w próbce po okresie przechowywania i ,
 $x(t_0)$ – początkowa zawartość całkowitego selenu w próbce;

- 2) wyniki w dwóch punktach czasowych nie różniły się w ramach ich odpowiedniej niepewności pomiaru,

dany materiał badawczy został zakwalifikowany jako kandydat na materiał odniesienia.

Trwałość kiełków wzbogaconych w selen zbadano także wykorzystując analizę regresji. W tym celu do porównania istotności różnic współczynników równania regresji liniowej dla zależności $y=f(t)$ z wartościami zadanymi zastosowany został test t –Studenta [211]. Korzystano z następujących zależności przedstawionych za pomocą równań 3 i 4:

$$t_a = \frac{a - a_o}{s_a} \quad (3)$$

$$t_b = \frac{b - b_o}{s_b} \quad (4)$$

gdzie: a - wyraz wolny w równaniu regresji prostoliniowej, b - współczynnik kierunkowy w równaniu regresji prostoliniowej; a_o – wartość zadana wyrazu wolnego (w tym przypadku $a_o = y_{sr}$), b_o - wartość zadana współczynnika kierunkowego (w tym przypadku $b_o = 0$), s_a – wartość odchylenia standardowego wyrazu wolnego, s_b – wartość odchylenia standardowego współczynnika kierunkowego.

Obliczone wartości a i b porównano z wartościami krytycznymi dla testu t-Studenta (t_{kr}) dla przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i liczby stopni swobody $f = n - 2$, a wartości współczynników regresji r z wartościami krytycznymi dla tego współczynnika (r_{kr}).

3.3.4 Wstępne badanie jednorodności

Badanie jednorodności wewnątrzopakowaniowej kielków roślin polegało na pobraniu sześciu próbek z tego samego opakowania, mineralizacji próbek oraz oznaczeniu w nich całkowitej zawartości selenu za pomocą techniki GF - AAS. Pomiar dla każdej z próbek wykonano w sześciu powtórzeniach. Następnie uzyskane wyniki badań poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) – narzędzia dostępnego w programie Microsoft Excel. Dodatkowo za pomocą równań 5 i 6 obliczono wartość odpowiednio współczynnika zmienności CV i względnej niepewności wynikającej z niejednorodności wewnątrzopakowaniowej.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \quad (5)$$

$$U(k=2) = k \cdot \frac{CV_1}{n} \quad (6)$$

gdzie: \bar{x} - wartość średnia obliczona ze wszystkich średnich wartości dla poszczególnych wierszy, CV_1 – współczynnik zmienności pomiędzy grupami, n – liczba powtórzeń, k – współczynnik rozszerzenia

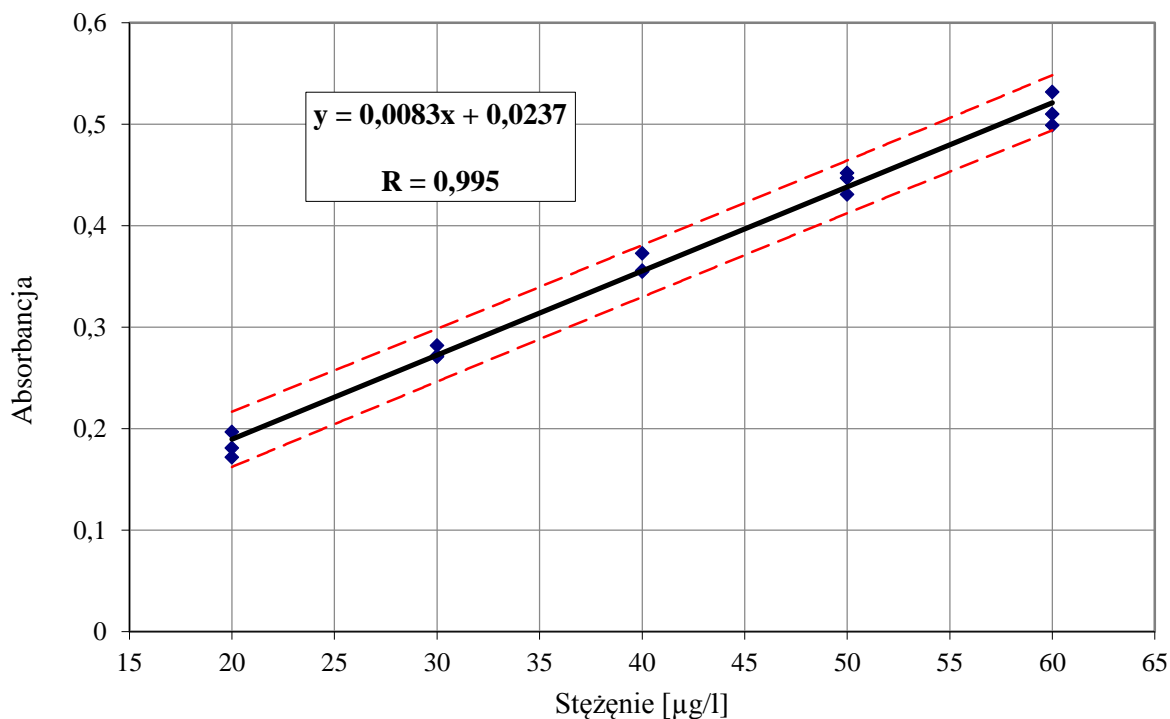
Badanie jednorodności międzyopakowaniowej nie zostało przeprowadzone ze względu, iż uzyskano tylko jedną partię materiału o masie niewystarczającej na rozdozowanie do kilku pojemników.

Ze względu na fakt, iż celem badań było wyselekcjonowanie kandydata na materiał odniesienia, badanie jednorodności zostało przeprowadzone po zakończeniu badań trwałości materiału badawczego.

4 WYNIKI

4.1 Wyznaczenie parametrów walidacyjnych dla procedury oznaczania całkowitej zawartości selenu z wykorzystaniem techniki GF - AAS

Parametry walidacyjne dla procedury oznaczania całkowitej zawartości selenu w próbkach kielków roślin oraz parametry wykresów kalibracyjnych zostały wyznaczone korzystając z zależności opisanych za pomocą równań podanych w literaturze [211]. Kalibracja została przeprowadzona używając roztworów wzorcowych zawierających 20, 30, 40, 50 i 60 $\mu\text{g/l}$ Se. Precyzja pomiaru, wyrażona za pomocą CV dla wszystkich próbek nie przekroczyła 10 %. Na rysunku 14 przedstawiono przykładową krzywą kalibracyjną wyznaczoną dla selenu, a w tabeli 18 przedstawiono wyznaczone parametry walidacyjne.



Rysunek 14. Krzywa kalibracyjna dla selenu; linie przerywane wyznaczają przedział ufności

Tabela 18. Parametry walidacyjne wyznaczone dla procedury oznaczania selenu za pomocą techniki GF - AAS

PARAMETR WALIDACYJNY		WARTOŚĆ
Równanie krzywej kalibracyjnej		$y = 0,0083x - 0,0237$
Liniowość		$r = 0,995$
Granica wykrywalności (LOD)		3,9 $\mu\text{g/l}$
Granica oznaczalności (LOQ)		12 $\mu\text{g/l}$
Zakres pomiarowy**		12 – 60 [$\mu\text{g/l}$]
Granica wykrywalności metody (MDL)		0,20 mg/kg*
Granica oznaczalności metody (MQL)		0,59 mg/kg
Zakres pomiarowy metody**		0,59 – 3,0 [mg/kg]
Współczynnik zmienności (CV)	Roztwory wzorcowe	20 $\mu\text{g/l}$ – 4,8 % 30 $\mu\text{g/l}$ – 2,6 % 40 $\mu\text{g/l}$ – 1,2 % 50 $\mu\text{g/l}$ – 1,7 % 60 $\mu\text{g/l}$ – 2,7 % Wartość spropagowana: 2,9 %
Współczynnik zmienności (CV)	Próbki rzeczywiste	221 mg/kg – 5,5 % 218 mg/kg – 4,2 % 213 mg/kg – 5,7 % 212 mg/kg – 7,5 % 215 mg/kg – 9,9 % 225 mg/kg – 7,5 % Wartość spropagowana: 7,0 %
Poprawność (odzysk): $R \pm U(k=2)$	CRM (ERM – BC210a): 17,23 \pm 0,91 [mg/kg s.m.] Wartość oznaczona: 16,81 \pm 0,11 [mg/kg s.m.]	97,6 \pm 5,5 %

*Wartości w $\mu\text{g/l}$ przeliczone na mg/kg przy założeniach: masa próbki = 0,5 g, objętość końcowa mineralizatu = 25 ml, zawartość suchej masy = 10 %

**Górna granica zakresu pomiarowego podana jest przy założeniu, że badana próbka jest nierozcieńczona. Próbka może być rozcieńczana tak, aby pomiar odbywał się w zakresie odpowiedniej krzywej wzorcowej.

Zasada pomiaru AAS polega na pomiarze absorpcji charakterystycznego promieniowania (196,0 nm w przypadku selenu). Dodatkowo zastosowano metodę Zeemana korekcji tła. Otrzymane wartości współczynników zmienności dla próbek roztworów wzorcowych i próbek rzeczywistych nie różnią się między sobą w sposób statystycznie istotny co dowodzi braku wpływu składu matrycy na precyzję pomiaru, czyli potwierdza jego selektywność.

W oparciu o obliczoną wartość odzysku, można było przyjąć, że metoda oznaczania całkowitej zawartości selenu za pomocą techniki GF - AAS jest poprawna.

Metoda ta jest również precyzyjna, ponieważ wartości wszystkich współczynników zmienności nie przekraczały 10 %. Ponieważ warunki poprawności oraz precyzji zostały spełnione można stwierdzić, że metoda oznaczania całkowitej zawartości selenu za pomocą techniki GF - AAS jest dokładna.

4.2 Oznaczenie całkowitej zawartości selenu w próbkach kiełków roślin

Całkowita zawartość selenu została oznaczona we wszystkich próbkach kiełków roślin. W tabeli 19 przedstawiono wyniki oznaczenia całkowitej zawartości selenu w próbkach kiełków hodowanych na pożywce kontrolnej oraz zawierającej nieorganiczne sole selenu o stężeniach: 100 mg/l Na_2SeO_4 , 1 mg/l oraz 10 mg/l Na_2SeO_3 (rok badawczy 2013/2014), 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l (rok badawczy 2014/2015).

Tabela 19. Całkowita zawartość selenu w próbkach kiełków roślin [mg/kg s.m.];

kolorem niebieskim oraz czerwonym zaznaczono próbki, w których oznaczono odpowiednio największą i najmniejszą zawartość selenu

PRÓBKA	Kontrola	100 mg/l Na ₂ SeO ₄	2013/2014		2014/2015			
			1 mg/l Na ₂ SeO ₃	10 mg/l Na ₂ SeO ₃	1 mg/l Na ₂ SeO ₃	5 mg/l Na ₂ SeO ₃	10 mg/l Na ₂ SeO ₃	15 mg/l Na ₂ SeO ₃
			c ± U (k=2) [mg/kg s.m.]					
Brokuły	3,98 ± 0,30	1309 ± 88	22,3 ± 1,4	133 ± 14	10,90 ± 0,74	54,0 ± 3,1	80,6 ± 5,1	119,7 ± 7,8
Kapusta czerwona	3,50 ± 0,26	(2,73 ± 0,20) · 10 ³	13,4 ± 1,4	82,2 ± 5,7	6,28 ± 0,36	40,3 ± 2,7	72,0 ± 7,4	95,2 ± 8,4
Gorzycza biała	3,37 ± 0,25	(2,71 ± 0,30) · 10 ³	11,56 ± 0,66	78,0 ± 4,9	9,36 ± 0,55	67,2 ± 4,0	98,1 ± 7,6	151 ± 11
Lucerna	3,76 ± 0,28	697 ± 67	12,76 ± 0,99	109 ± 14	9,1 ± 1,0	29,7 ± 1,7	59,9 ± 3,9	46,3 ± 2,9
Rzodkiewka	1,97 ± 0,15	635 ± 66	10,13 ± 0,65	103,8 ± 7,3	2,44 ± 0,14	18,1 ± 1,0	47,8 ± 2,8	83,2 ± 5,2
Rzodkiew	1,83 ± 0,14	546 ± 56	12,83 ± 0,83	97,3 ± 6,6	2,50 ± 0,21	18,5 ± 1,0	44,6 ± 3,2	67,4 ± 5,2

Wyniki badań uzyskane dla próbek kontrolnych wykazały największą zawartość selenu w kiełkach brokułów – 3,98 mg/kg s.m., a najmniejszą w kiełkach rzodkwi i rzodkiewki, odpowiednio 1,83 mg/kg s.m. oraz 1,97 mg/kg s.m. W pozostałych kiełkach zawartość selenu była na podobnym poziomie 3,37 – 3,76 [mg/kg s.m.].

Podlewanie kiełków roztworem zawierającym 100 mg/l Na_2SeO_4 oraz roztworami zawierającymi 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l lub 15 mg/l Na_2SeO_3 spowodowało znaczący wzrost zawartości selenu całkowitego we wszystkich próbkach. Warto dodać, że podlewanie danym roztworem nie spowodowało szkodliwego efektu takiego jak gnicie, pleśnienie, czy zahamowanie wzrostu podczas kiełkowania roślin.

W oparciu o wyniki badań stwierdzono, że największą zdolność do kumulacji selenu (VI) mają kiełki gorczycy białej oraz kapusty czerwonej hodowanej na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_3 , odpowiednio 2731 mg/kg s.m. oraz 2705 mg/kg s.m., natomiast najmniejszą zawartość selenu całkowitego oznaczono w kiełkach rzodkwi 546 mg/kg s.m.

Na podstawie wyników badań kiełków hodowanych w pierwszym roku badawczym (2013/2014) stwierdzono, że największą zdolność do kumulacji selenu, dla obydwu rodzajów pożywek zawierających Se (IV) posiadają kiełki brokułów (22,3 mg/kg s.m. i 133 mg/kg s.m., odpowiednio dla próbek kiełków uprawianych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 i 10 mg/l Na_2SeO_3). Dla kiełków uprawianych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 i 10 mg/l Na_2SeO_3 najmniejszą zdolność do kumulacji selenu wykazują odpowiednio kiełki rzodkiewki (10,13 mg/kg s.m.) oraz kiełki kapusty czerwonej (82,2 mg/kg s.m.).

Natomiast wyniki badań kiełków hodowanych w drugim roku badawczym (2014/2015) wykazały, że dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 największą zdolność do kumulacji selenu mają kiełki brokułów (10,90 mg/kg s.m.). Dla pozostałych trzech pożywek, największą zawartość selenu całkowitego stwierdzono w przypadku kiełków gorczycy białej (67,2 mg/kg s.m.; 98,1 mg/kg s.m.; 151 mg/kg s.m.). Najmniejszą zdolność do kumulacji selenu stwierdzono dla kiełków rzodkiewki (2,44 i 18,1 mg/kg s.m.) i rzodkwi (44,6 i 67,4 mg/kg s.m.), odpowiednio dla pożywek 1 mg/l i 5 mg/l Na_2SeO_3 oraz 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 .

Podsumowując, można stwierdzić, że selenian (VI) sodu jest bardziej efektywny niż selenian (IV) sodu w odniesieniu do ilości selenu całkowitego zaakumulowanego przez kiełki roślin. Warto dodać, iż przeprowadzono próbę kiełkowania roślin przy użyciu roztworu zawierającego 100 mg/l Na_2SeO_3 . Użycie takiego stężenia roztworu spowodowało gnicie i pleśnienie nasion

na kielki. Efektywność selenianu (VI) w porównaniu do selenianu (IV) została również potwierdzona przez innych badaczy [281]

4.3 Wstępne badanie trwałości selenu w kielkach roślin

Kolejnym etapem sprawdzenia możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia było sprawdzenie trwałości próbek po okresie przechowywania trwającym od 1 do 12 miesięcy. Próbki przechowywane były w szczelnie zamykanych woreczkach PE w temperaturze -20 °C.

4.3.1 Wstępne badanie trwałości zawartości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na₂SeO₄

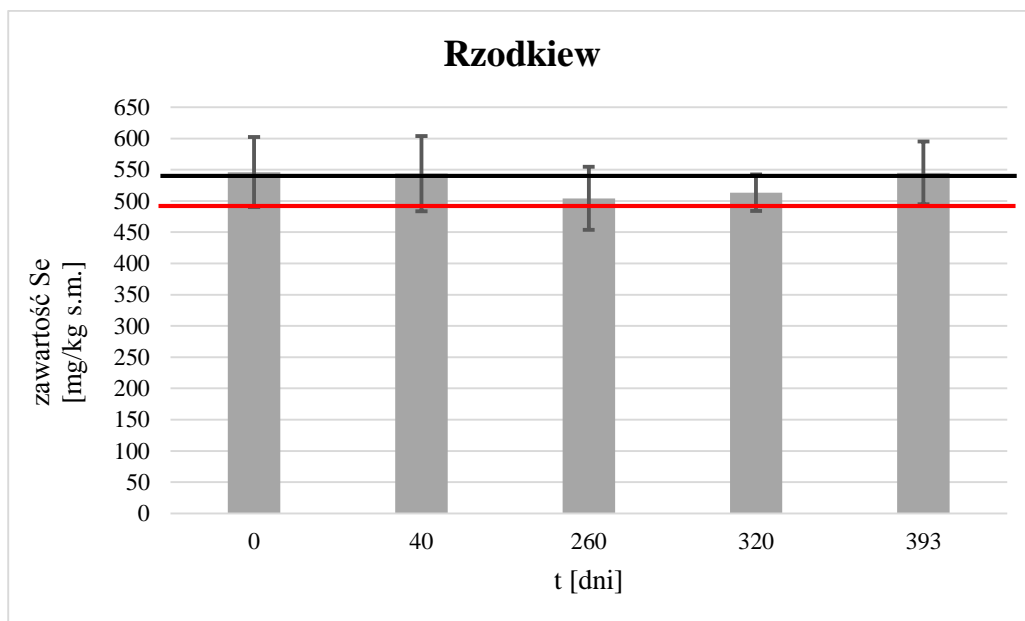
Całkowitą zawartość selenu w próbkach kielków oznaczono po następujących okresach przechowywania materiału: $t_1 = 40$ dni, $t_2 = 260$ dni, $t_3 = 320$ dni, $t_4 = 393$ dni. Wyniki badań trwałości selenu w próbkach kielków roślin uprawianych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na₂SeO₄ przedstawiono w tabeli 20 i na rysunkach 15 i 16, odpowiednio dla kielków rzodkwi i lucerny.

Tabela 20. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na₂SeO₄

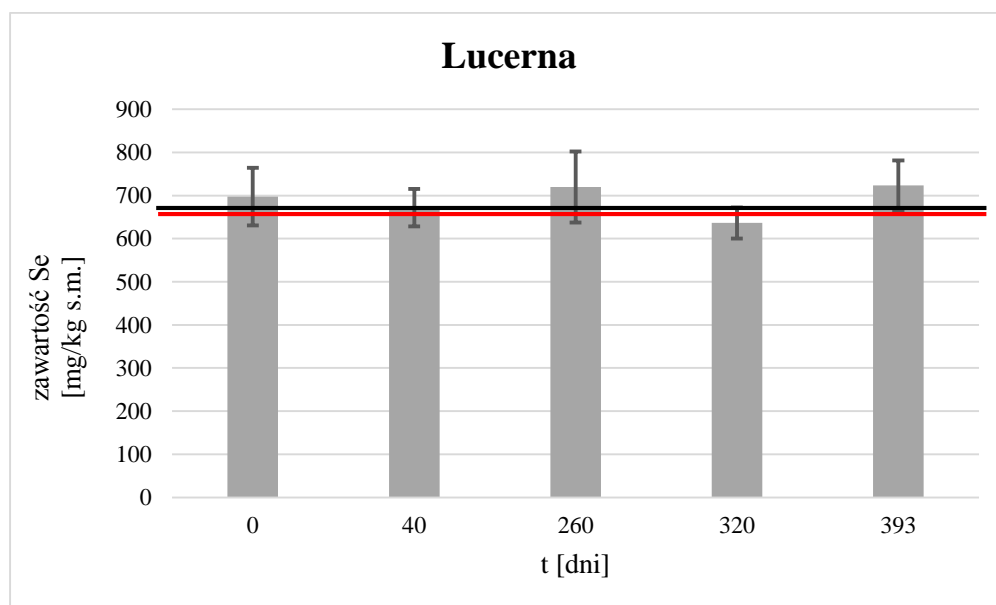
PRÓBKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_4)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	60 ± 10				negatywna
Gorczyca biała	30 ± 17				negatywna
Kapusta czerwona	83 ± 10				negatywna
Rzodkiewka	108 ± 14	80 ± 15			negatywna
Rzodkiew	100 ± 15	92 ± 14	94 ± 12	100 ± 12	<u>pozytywna</u>
Lucerna	96 ± 12	103 ± 15	91 ± 11	104 ± 25	<u>pozytywna</u>

$t_1 = 40$ dni, $t_2 = 260$ dni, $t_3 = 290$ dni, $t_4 = 363$ dni

Mimo znaczącej zdolności do kumulacji selenu przez kiełki gorzycy białej oraz kapusty czerwonej, stwierdzono brak trwałości selenu w tych próbkach po przechowywaniu ich przez okres 1 miesiąca. Zawartość selenu w próbkach kiełków gorzycy białej spadła aż o 70 % w porównaniu do wartości początkowej. Natomiast w próbkach kiełków, które zaakumulowały mniejsze ilości selenu, takie jak rzodkiew czy lucerna, wyniki badań wykazały, że z punktu widzenia zawartości całkowitego selenu kiełki są trwałe przez ponad rok czasu.



Rysunek 15. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4



Rysunek 16. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4

Trwałość próbek potwierdzono również za pomocą analizy statystycznej uzyskanych wyników, której wyniki zestawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kielków rzodkwi i lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na₂SeO₄

KIEŁKI	Rzodkiew	Lucerna
liczba punktów pomiarowych n	5	
wartość średnia $y_{\bar{s}r} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	530 ± 18	690 ± 32
współczynnik korelacji r	0,436	0,125
Współczynnik kierunkowy:		
wartość b	-0,051	0,03
odchylenie standardowe s_b	0,060	0,12
parametr t-Studenta t_{obl}	0,840	0,218
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	3,182	
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:		
wartość a	541	684
odchylenie standardowe s_a	15	30
parametr t-Studenta t_{obl}	0,666	0,173
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	3,182	
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości $y_{\bar{s}r}$ w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=3, \alpha=0,05) = 0,9969$

Wykazano, że dla próbek kielków rzodkwi oraz lucerny wartość współczynnika kierunkowego b (zależności liniowej zawartości selenu w funkcji czasu) nie różni się w sposób statystycznie istotny od wartości 0, wartość wyrazu wolnego a nie różni się w sposób statystycznie istotny od średniej zawartości selenu w poszczególnych próbkach $y_{\bar{s}r}$, a wartość współczynnika korelacji r jest mniejsza od wartości r_{kr} , co pozwala na stwierdzenie, że nie ma zależności pomiędzy zawartością całkowitego selenu w próbkach kielków roślin w stosunku do okresu ich przechowywania.

4.3.2 Wstępne badanie trwałości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃ lub 10 mg/l Na₂SeO₃ – rok badawczy 2013/2014

Do badań polegających na sprawdzeniu trwałości selenu w materiale badawczym zakwalifikowano wszystkie sześć rodzajów kielków roślin uprawianych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃ lub 10 mg/l Na₂SeO₃, ponieważ zakumulowały one znaczne ilości selenu oraz były odporne na wymagające warunki prowadzenia procesu kiełkowania. Całkowitą zawartość selenu w próbkach kielków oznaczono po następujących okresach przechowywania materiału: t₁ = 28 dni, t₂ = 189 dni, t₃ = 314 dni. Wyniki badań trwałości kielków roślin uprawianych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃ lub 10 mg/l Na₂SeO₃ przedstawiono odpowiednio w tabelach 22 i 23, na rysunkach 17 – 22 i 23 – 28 oraz w załącznikach 1 i 2.

Tabela 22. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃

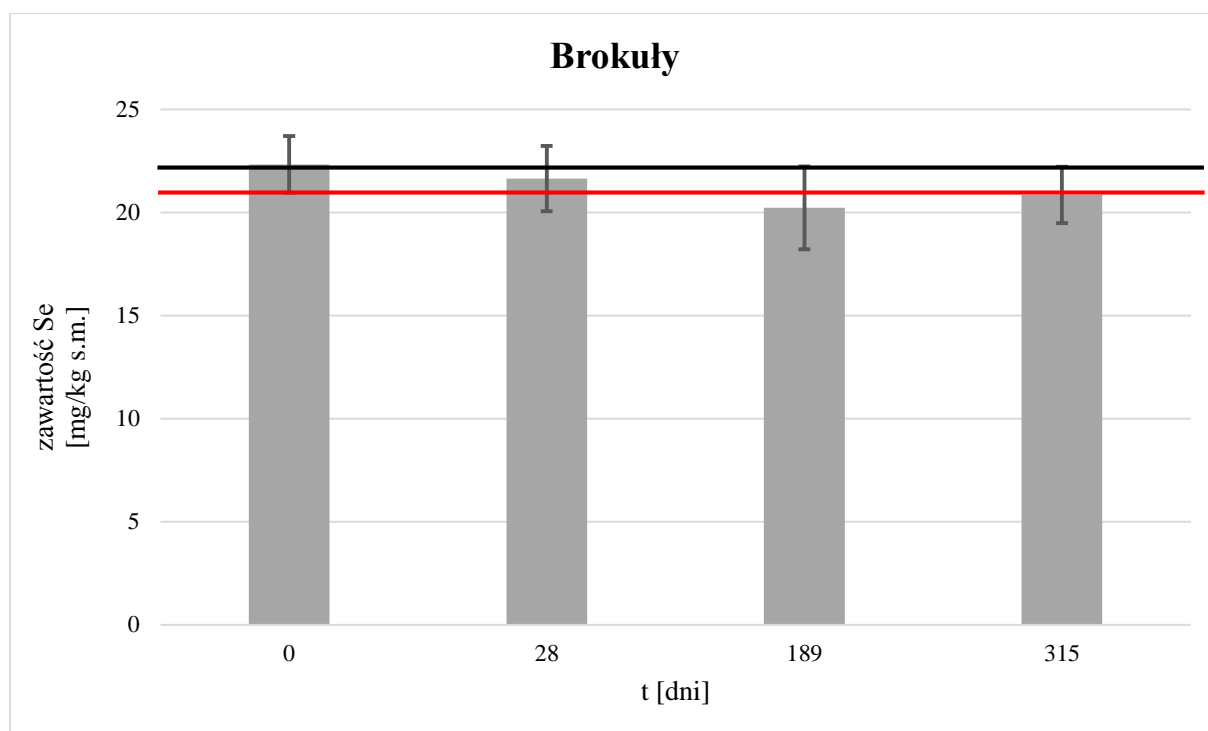
PRÓBKKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	97 ± 10	91 ± 11	93,4 ± 9,0	<u>pozytywna</u>
Gorczyca biała	109 ± 10	104 ± 11	99,2 ± 8,4	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	112 ± 12	109 ± 12	100 ± 13	<u>pozytywna</u>
Lucerna	110 ± 12	117,8 ± 9,5	89 ± 11	<u>pozytywna</u>
Rzodkiewka	117 ± 10	108,8 ± 9,1	96,8 ± 8,6	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	92,1 ± 9,0	93,1 ± 8,9	93,2 ± 9,3	<u>pozytywna</u>

$t_1 = 28$ dni, $t_2 = 189$ dni, $t_3 = 314$ dni

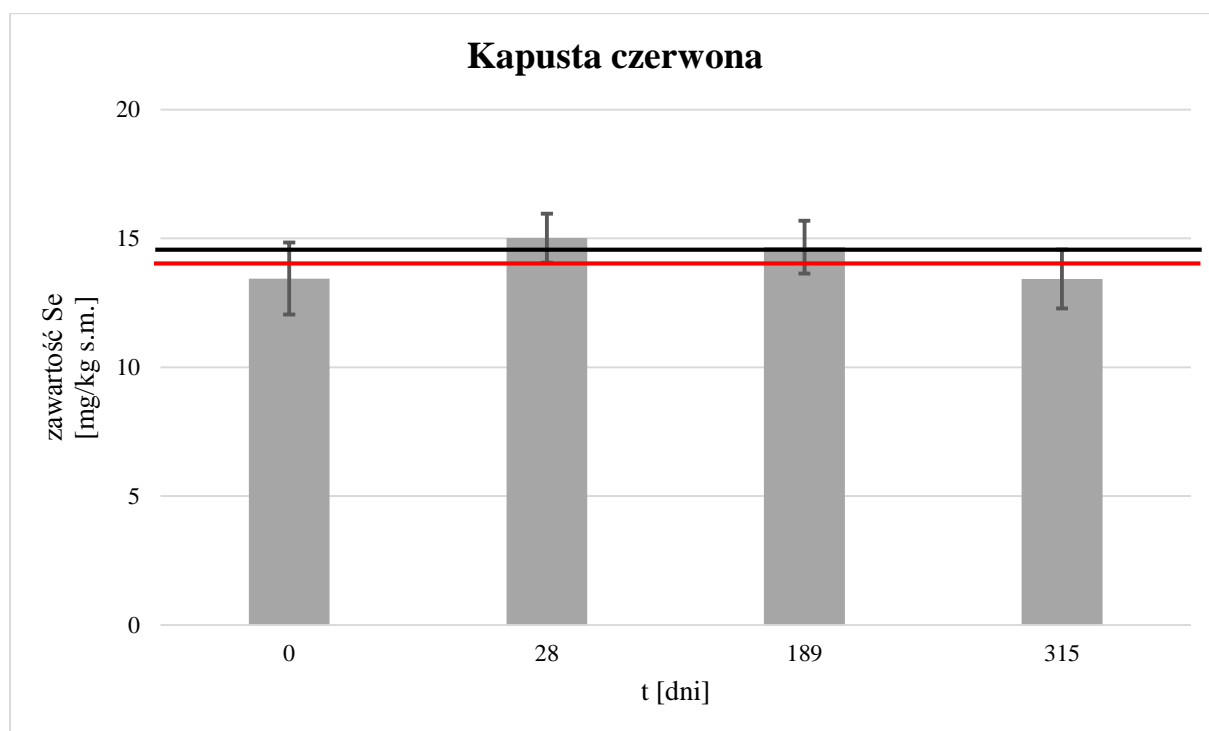
Tabela 23. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

PRÓBKKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	101 ± 17	93 ± 13	<i>brak próbki</i>	<u>pozytywna</u>
Gorczyca biała	101 ± 12	102,0 ± 8,9	100,8 ± 8,6	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	99 ± 17	89 ± 15	101 ± 10	<u>pozytywna</u>
Lucerna	104 ± 15	88 ± 14	93 ± 15	<u>pozytywna</u>
Rzodkiewka	109 ± 10	89 ± 10	95,6 ± 9,4	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	110 ± 12	99 ± 10	111,8 ± 9,3	<u>pozytywna</u>

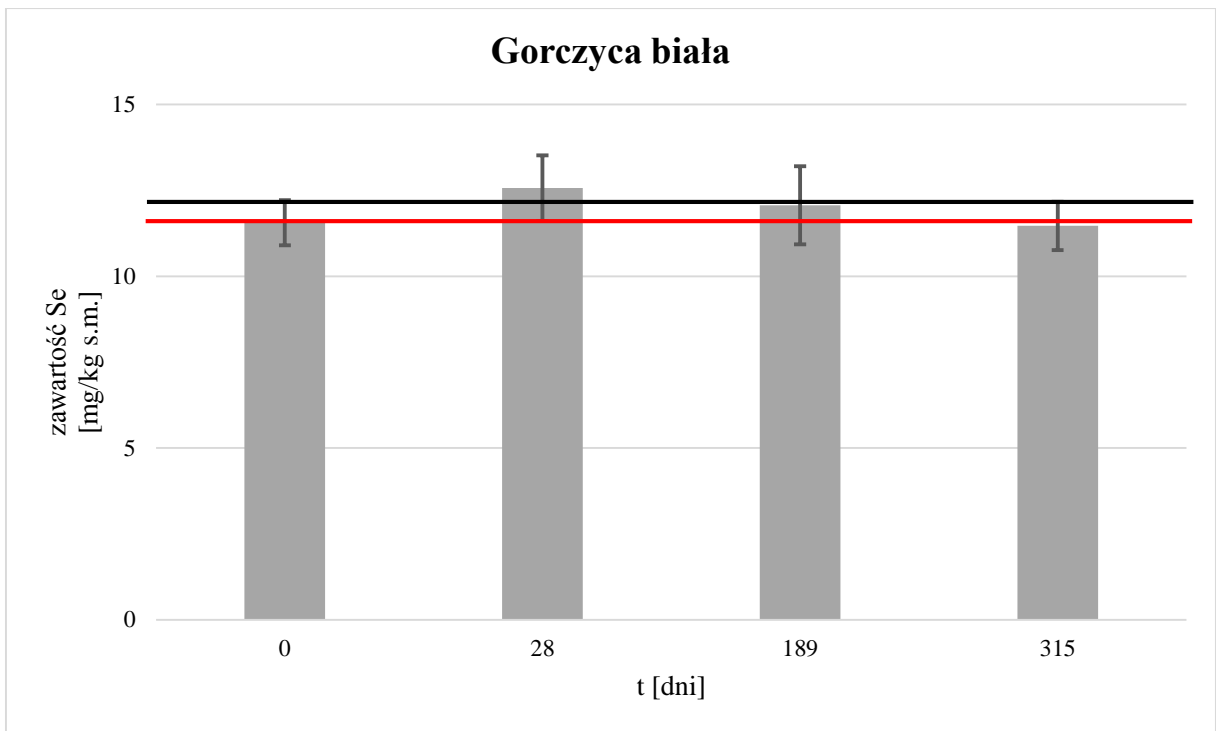
$t_1 = 28$ dni, $t_2 = 189$ dni, $t_3 = 314$ dni



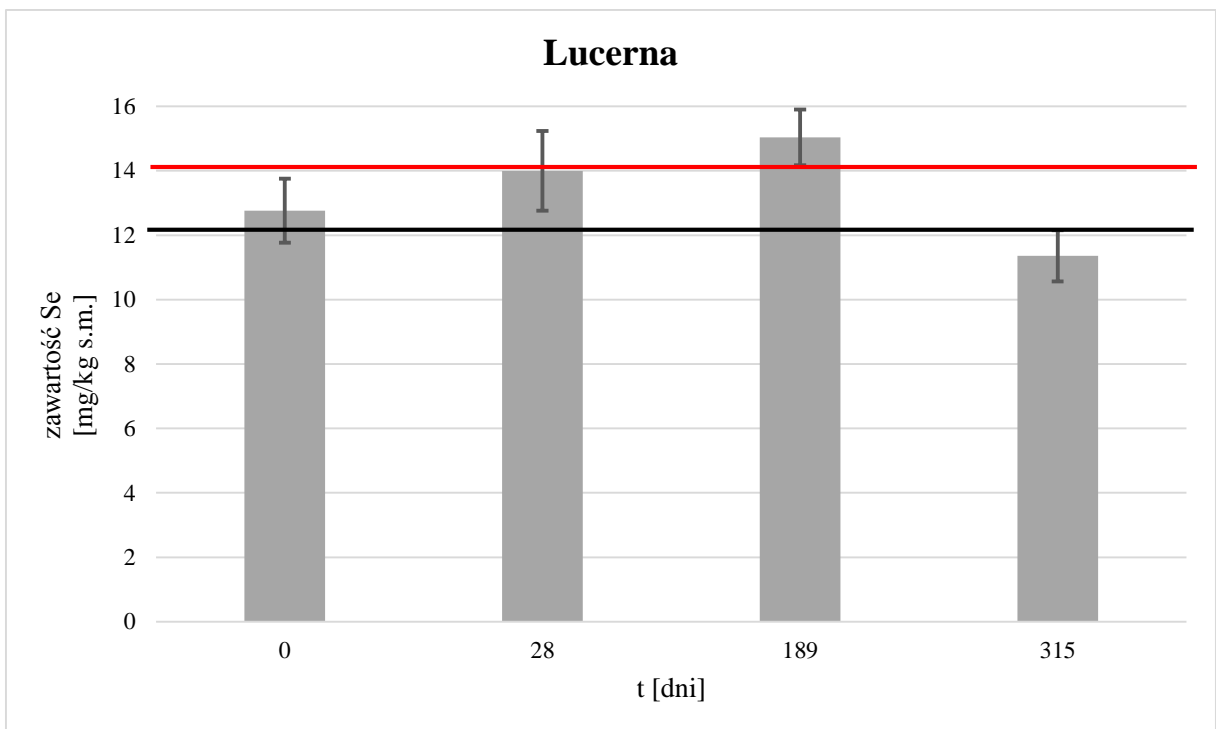
Rysunek 17. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



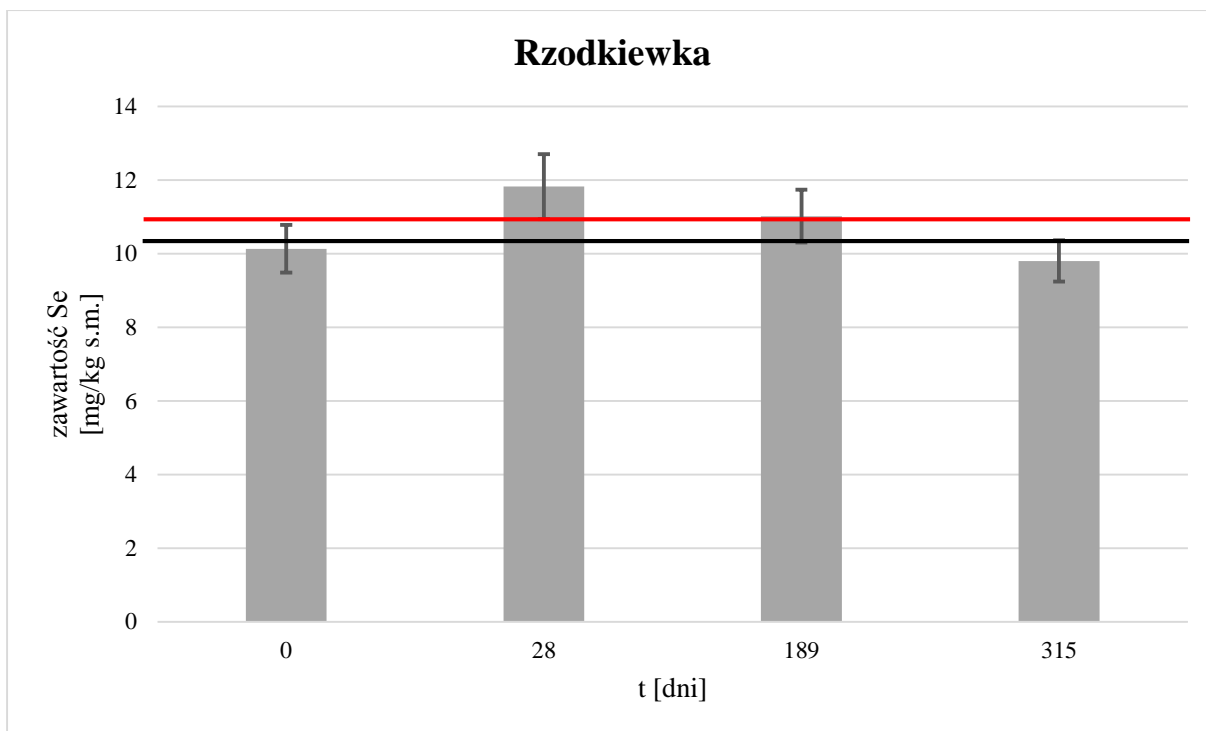
Rysunek 18. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



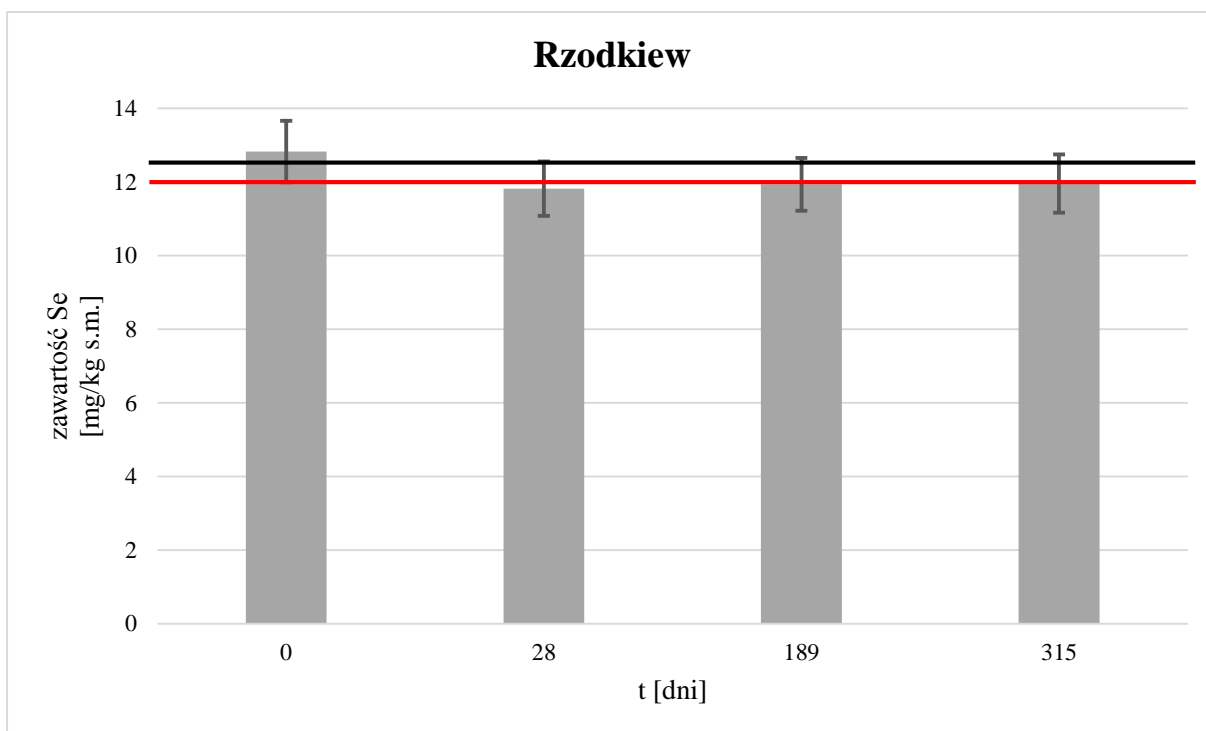
Rysunek 19. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



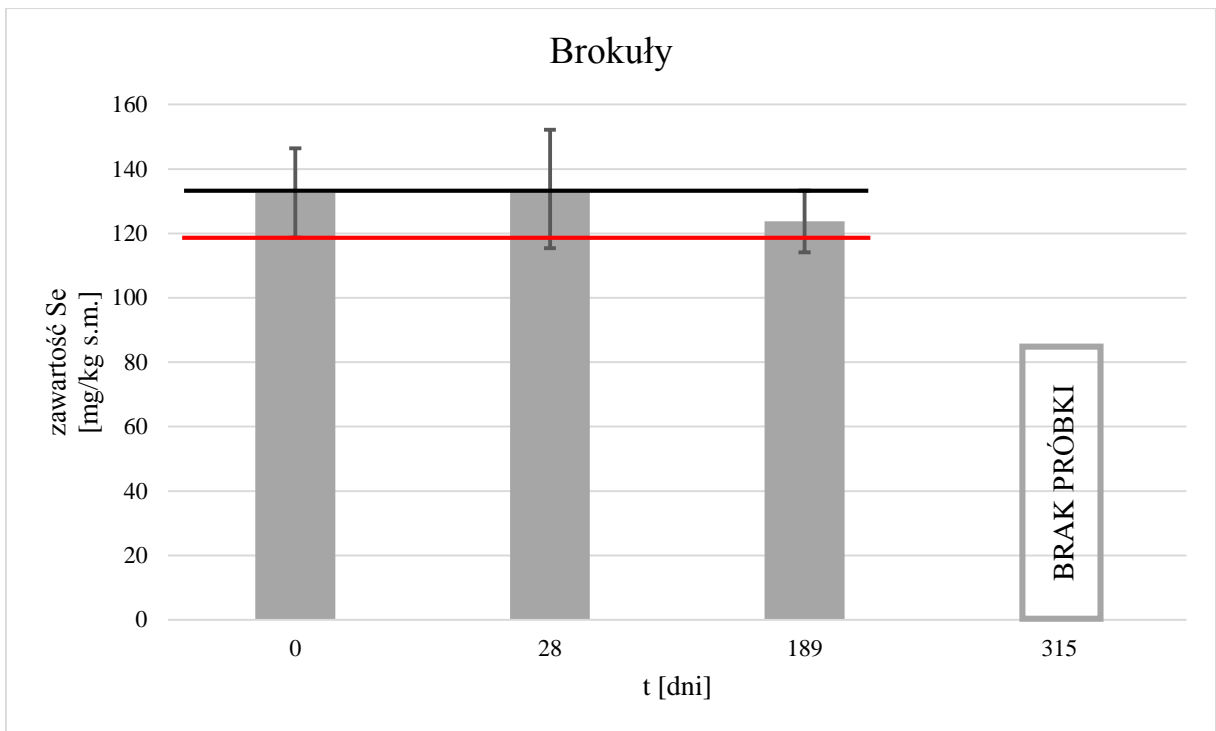
Rysunek 20. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



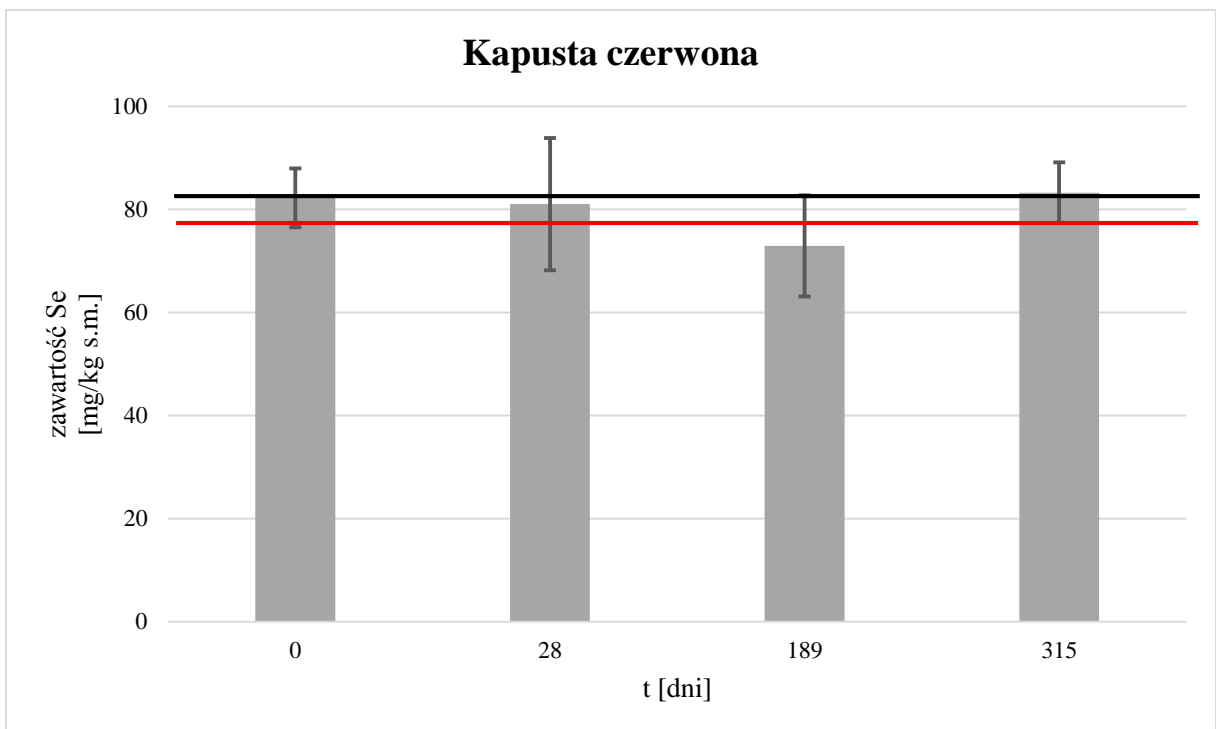
Rysunek 21. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃



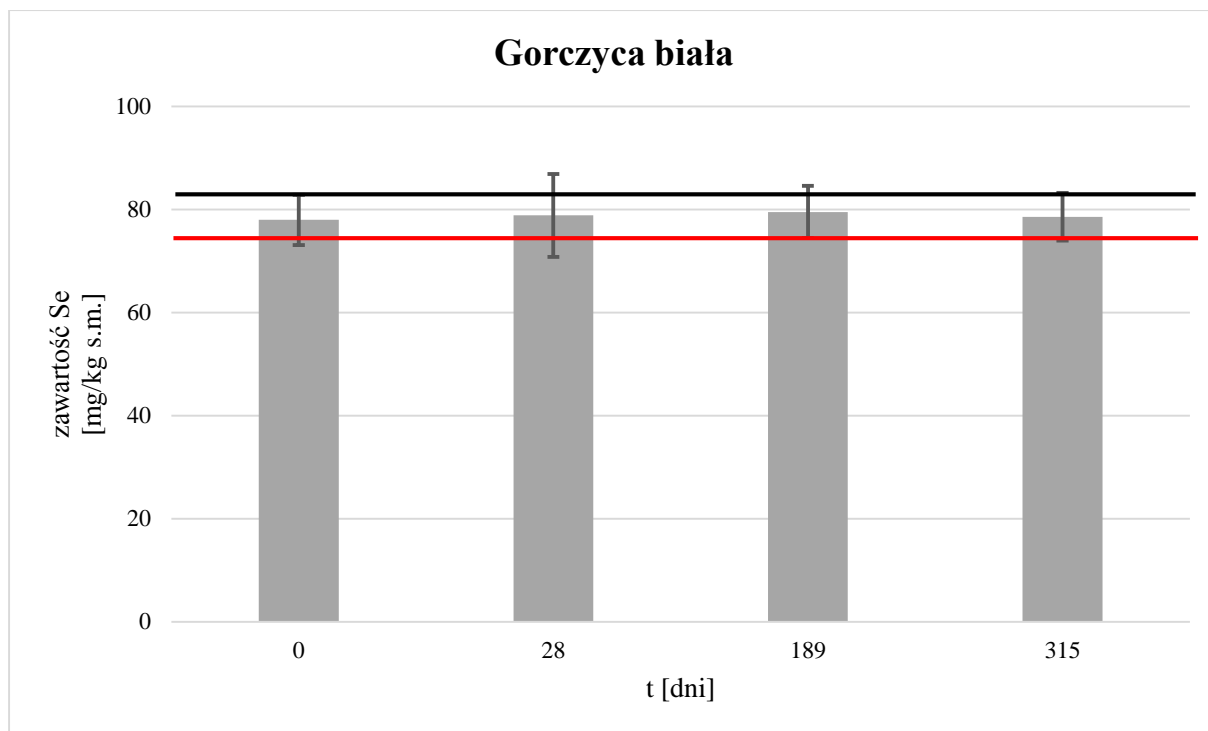
Rysunek 22. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃



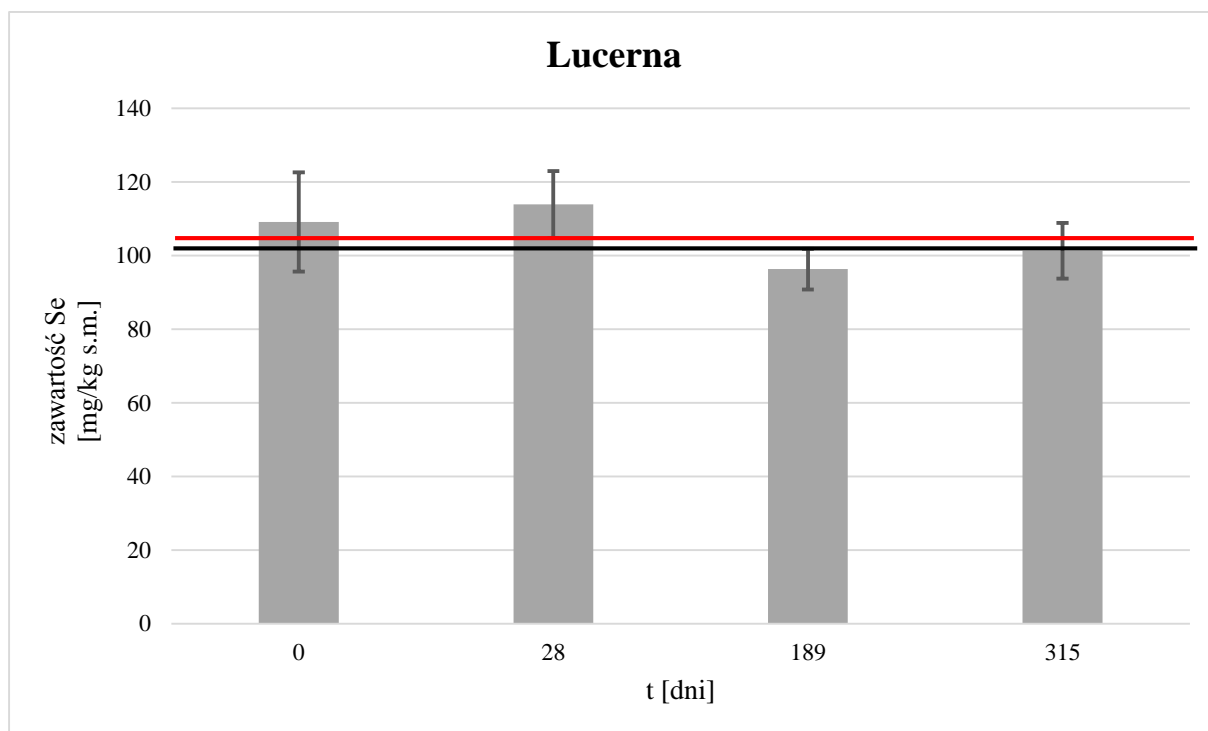
Rysunek 23. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



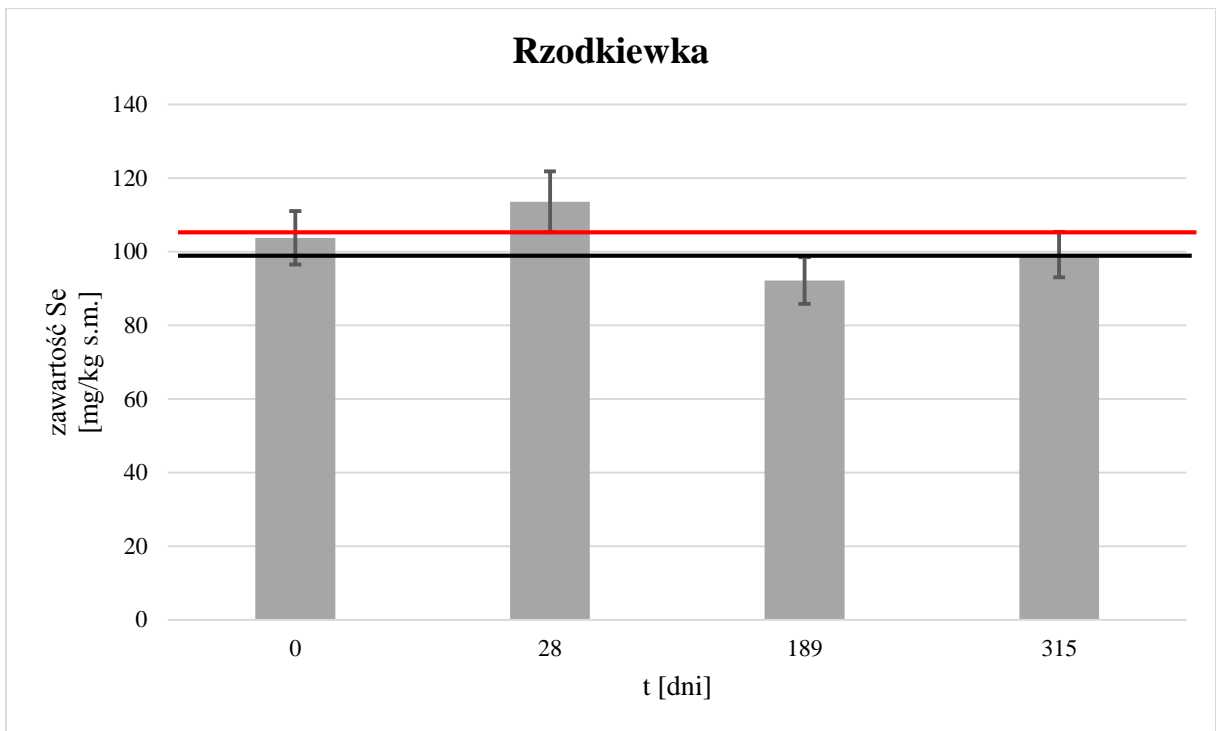
Rysunek 24. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



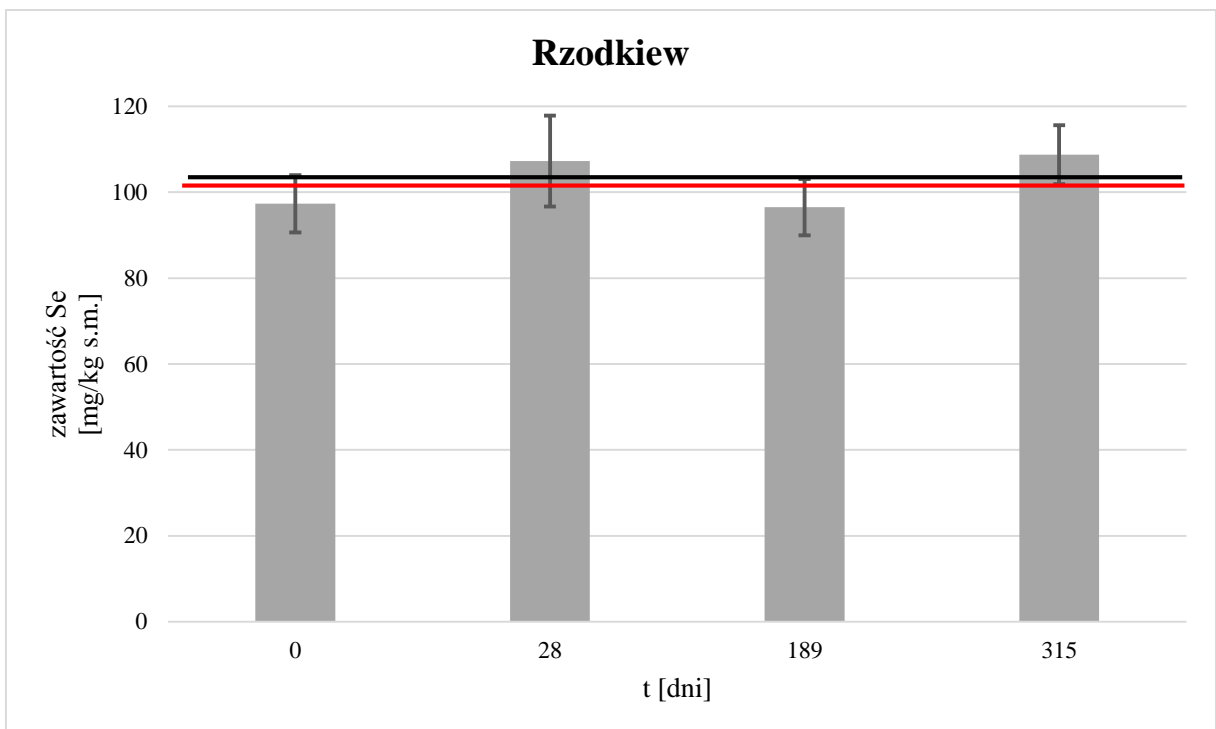
Rysunek 25. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 26. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 27. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 28. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewi hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3

Wyniki badań trwałości przeprowadzone z wykorzystaniem techniki GF - AAS wykazały brak trwałości próbek kiełków lucerny i rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 oraz próbek lucerny, rzodkwi i rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 .

Trwałość próbek sprawdzono również za pomocą analizy statystycznej uzyskanych wyników, której wyniki zestawiono w tabelach 24 i 25, odpowiednio dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 i 10 mg/l Na_2SeO_3 .

Tabela 24. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃

KIEŁKI	Kapusta czerwona	Gorzycza biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	4					
wartość średnia $y_{\bar{s}r} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	14,14 ± 0,82	11,92 ± 0,51	21,27 ± 0,92	13,3 ± 1,6	12,13 ± 0,47	10,70 ± 0,91
współczynnik korelacji r	0,274	0,175	0,778	0,368	0,497	0,467
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	-0,0015	-0,0014	-0,0049	-0,0040	-0,0016	-0,0029
odchylenie standardowe s_b	0,0038	0,0022	0,0028	0,0071	0,0019	0,0039
parametr t-Studenta t_{obl}	0,403	0,651	1,752	0,559	0,811	0,746
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	4,303					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	14,34	12,11	21,92	13,8	12,34	11,08
odchylenie standardowe s_a	0,70	0,41	0,51	1,3	0,36	0,71
parametr t-Studenta t_{obl}	0,291	0,470	1,265	0,404	0,585	0,539
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	4,303					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości $y_{\bar{s}r}$ w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=3, \alpha=0,05) = 0,9969$

Tabela 25. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

KIEŁKI	Kapusta czerwona	Gorzycza biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	4		3	4		
wartość średnia $y_{sr} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	79,9 ± 4,7	78,76 ± 0,64	130,0 ± 6,4	105,2 ± 7,8	102,5 ± 6,4	102,2 ± 9,0
współczynnik korelacji r	0,0997	0,381	0,970	0,762	0,350	0,635
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	-0,003	0,002	-0,052	-0,041	0,015	-0,039
odchylenie standardowe s_b	0,023	0,003	0,013	0,024	0,029	0,033
parametr t-Studenta t_{obl}	0,142	0,582	3,971	1,664	0,529	1,161
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	4,303		12,706	4,303		
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	80,3	78,5	133,8	110,6	100,4	107,3
odchylenie standardowe s_a	4,1	0,5	1,5	4,5	5,3	6,1
parametr t-Studenta t_{obl}	0,102	0,421	2,604	1,201	0,382	0,838
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	4,303		12,706	4,303		
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości y_{sr} w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=3, \alpha=0,05) = 0,9969$; $r_{kr}(f=2, \alpha=0,05) > 0,9969$

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników sprawdzenia trwałości można stwierdzić, że dla wszystkich próbek kielków roślin uprawianych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 lub 10 mg/l Na_2SeO_3 wartość współczynnika kierunkowego b (zależności liniowej zawartości selenu w funkcji czasu) nie różni się w sposób statystycznie istotny od wartości 0, wartość wyrazu wolnego a nie różni się w sposób statystycznie istotny od średniej zawartości selenu w poszczególnych próbkach y_{sr} , a wartość współczynnika korelacji r jest mniejsza od r_{kr} , co pozwala na stwierdzenie, że nie ma zależności pomiędzy zawartością całkowitego selenu w próbkach kielków roślin w stosunku do okresu ich przechowywania.

4.3.3 Wstępne badanie trwałości zawartości selenu w kielkach roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 – rok badawczy 2014/2015

W drugim roku badawczym powtórzono całą procedurę sprawdzenia możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu w oparciu o wzbogacone w selen kielki roślin.

Do badań wykorzystano te same rodzaje nasion na kielki jak poprzednio. Kielkowanie roślin przeprowadzono w tych samych warunkach. Zmianie uległy jedynie stężenia roztworów selenianu (IV) sodu używanych do podlewania nasion. Stężenia te wynosiły odpowiednio 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l oraz 15 mg/l Na_2SeO_3 . Zwiększenie ilości roztworów używanych do podlewania miało na celu dobranie optymalnego stężenia Na_2SeO_3 w końcowym etapie sprawdzenia możliwości wytworzenia certyfikowanego materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu oraz sprawdzenie maksymalnej odporności nasion na warunki kielkowania przy użyciu nieorganicznych soli selenu (IV). Dodatkowo badania przeprowadzono hodując kielki na pożywce zawierającej 20 mg/l Na_2SeO_3 . Jednak w przypadku wszystkich rodzajów nasion na kielki zaobserwowano gnicie i pleśnienie, co było powodem przerwania badań.

Całkowitą zawartość selenu w próbkach kielków oznaczono po następujących okresach przechowywania materiału: $t_1 = 62$ dni, $t_2 = 104$ dni, $t_3 = 174$ dni, $t_4 = 223$ dni, $t_5 = 271$ dni. Wyniki badań trwałości próbek kielków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 przedstawiono odpowiednio w tabelach 26 -29, na rysunkach 29 – 34, 35 – 40, 41 – 46 i 47 – 52 oraz załącznikach 3 – 6.

Tabela 26. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃

PRÓBKĄ	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_4)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_5)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	105,7 ± 8,8	94 ± 13	99 ± 10	99 ± 10	103,8 ± 8,9	<u>pozytywna</u>
Gorczyca biała	109,2 ± 9,1	109 ± 15	119 ± 10	98 ± 10	121,7 ± 8,2	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	98,2 ± 8,8	95,5 ± 8,6	90,9 ± 8,9	93,8 ± 8,6	101 ± 10	<u>pozytywna</u>
Lucerna	102 ± 14	94 ± 15	99 ± 13	92 ± 14	88 ± 13	<u>pozytywna</u>
Rzodkiewka	98,9 ± 9,2	99 ± 11	98,4 ± 8,1	100,6 ± 9,0	97,9 ± 8,0	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	86 ± 10	95 ± 10	91 ± 11	87 ± 11	101 ± 12	<u>pozytywna</u>

$t_1 = 62$ dni, $t_2 = 104$ dni, $t_3 = 174$ dni, $t_4 = 223$ dni, $t_5 = 271$ dni

Tabela 27. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na₂SeO₃

PRÓBKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_4)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_5)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	93,7 ± 8,6	94,4 ± 8,1	97 ± 12	99 ± 11	94,9 ± 9,4	<u>pozytywna</u>
Gorzycza biała	101 ± 12	93,4 ± 8,3	100,0 ± 8,2	88 ± 13	92,9 ± 8,2	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	99 ± 10	96,4 ± 8,7	105 ± 12	95,5 ± 8,9	89,7 ± 9,1	<u>pozytywna</u>
Lucerna	91 ± 12	95 ± 10	93,1 ± 8,4	91 ± 12	90,5 ± 8,4	<u>pozytywna</u>
Rzodkiewka	111,3 ± 9,0	110,9 ± 8,0	111,9 ± 8,5	109,1 ± 8,6	99,1 ± 8,0	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	100,1 ± 8,1	100,4 ± 8,2	100,0 ± 8,5	95,0 ± 9,4	100,3 ± 8,7	<u>pozytywna</u>

$t_1 = 62$ dni, $t_2 = 104$ dni, $t_3 = 174$ dni, $t_4 = 223$ dni, $t_5 = 271$ dni

Tabela 28. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

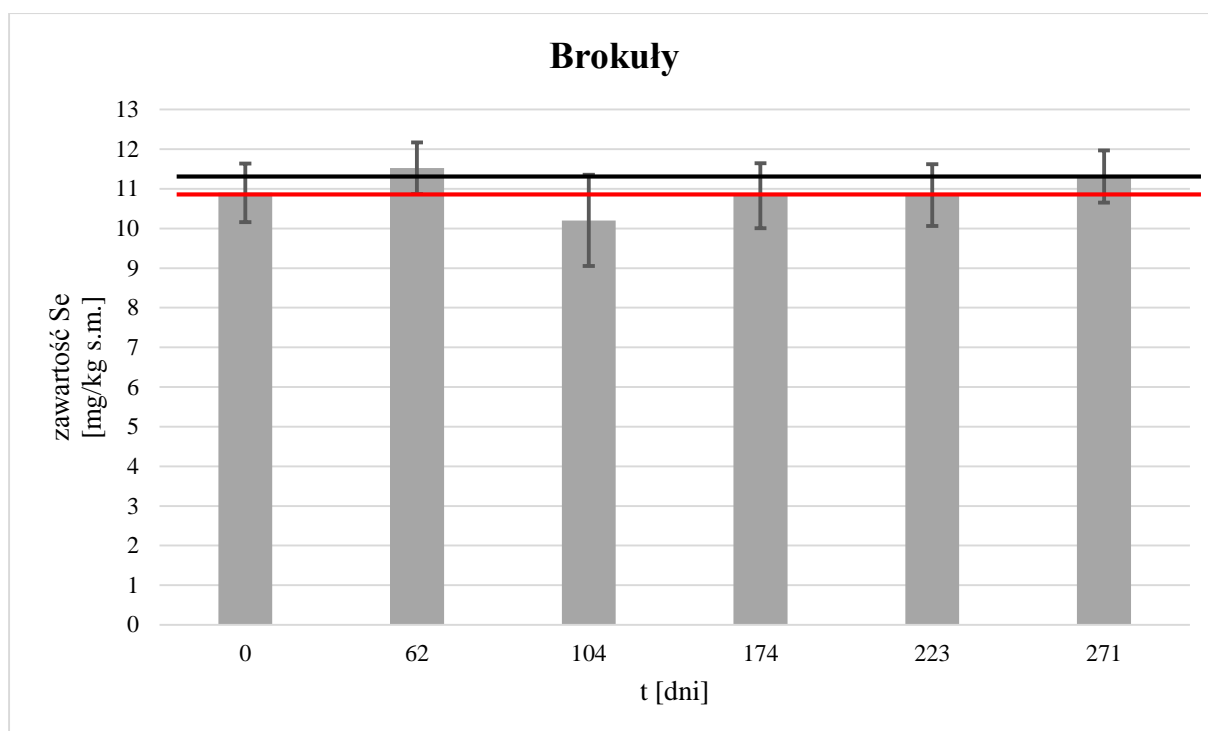
PRÓBKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_4)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_5)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	102 ± 13	104,8 ± 9,2	97,2 ± 8,7	94 ± 11	106,5 ± 9,2	<u>pozytywna</u>
Gorzycza biała	99 ± 10	89 ± 10	91 ± 14	84 ± 12	94 ± 10	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	103 ± 15	103 ± 13	89 ± 14	98 ± 12	99 ± 12	<u>pozytywna</u>
Lucerna	102,9 ± 9,2	95,6 ± 8,9	88,6 ± 8,8	110,3 ± 9,4	112 ± 10	<u>pozytywna</u>
Rzodkiewka	92,4 ± 8,9	90 ± 10	89,1 ± 8,4	88,2 ± 8,2	103 ± 11	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	97 ± 10	90,4 ± 9,4	100,5 ± 9,3	87,5 ± 9,4	91 ± 10	<u>pozytywna</u>

$t_1 = 62$ dni, $t_2 = 104$ dni, $t_3 = 174$ dni, $t_4 = 223$ dni, $t_5 = 271$ dni

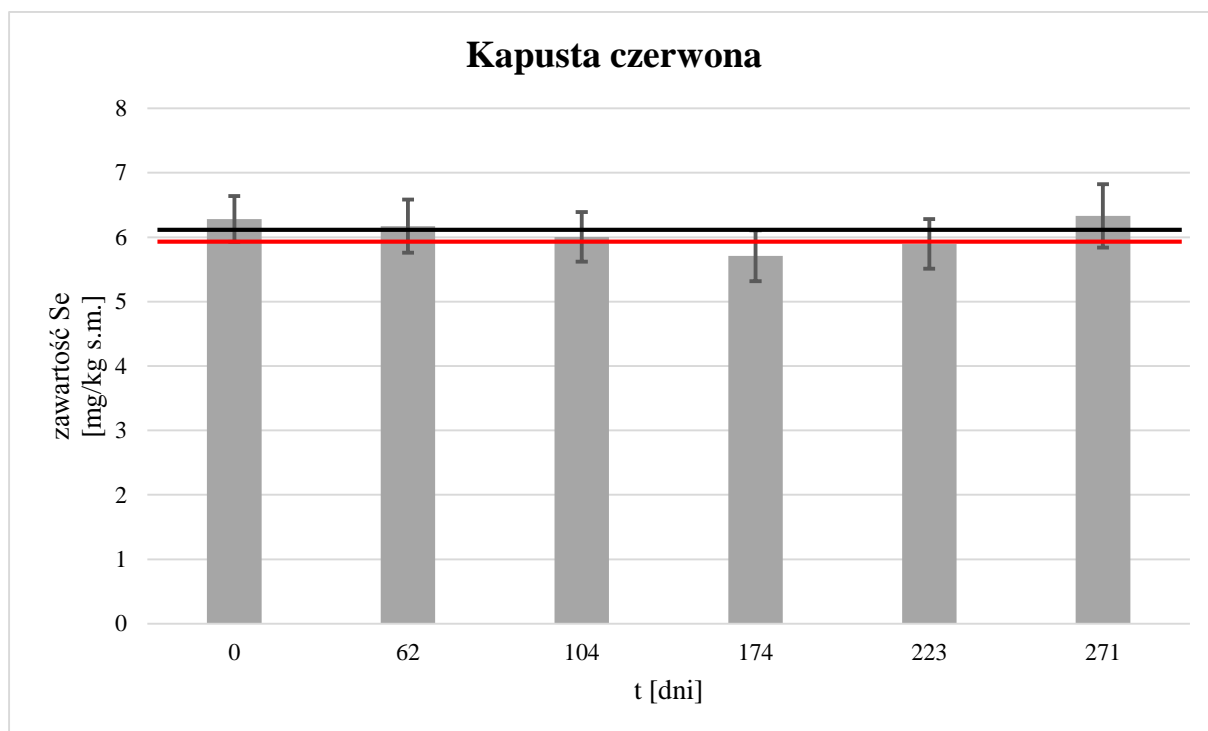
Tabela 29. Wyniki badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na₂SeO₃

PRÓBKA	$\frac{x(t_1)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_2)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_3)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_4)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	$\frac{x(t_5)}{x(t_0)} \pm U(k=2)$ [%]	Kwalifikacja
Brokuły	99,5 ± 8,7	103 ± 10	104,0 ± 8,9	100 ± 17	97 ± 11	<u>pozytywna</u>
Gorczyca biała	104,2 ± 9,2	97 ± 11	98 ± 11	102,6 ± 9,2	93,6 ± 9,7	<u>pozytywna</u>
Kapusta czerwona	106 ± 11	107 ± 14	114 ± 13	117 ± 16	116 ± 12	negatywna
Lucerna	128 ± 11	107 ± 11	107,3 ± 8,6	107,0 ± 9,0	128,0 ± 8,6	negatywna
Rzodkiewka	109,5 ± 8,7	88,5 ± 8,5	92,5 ± 9,0	98,3 ± 8,5	95,1 ± 8,6	<u>pozytywna</u>
Rzodkiew	99 ± 11	91 ± 10	90 ± 14	84 ± 10	93 ± 13	<u>pozytywna</u>

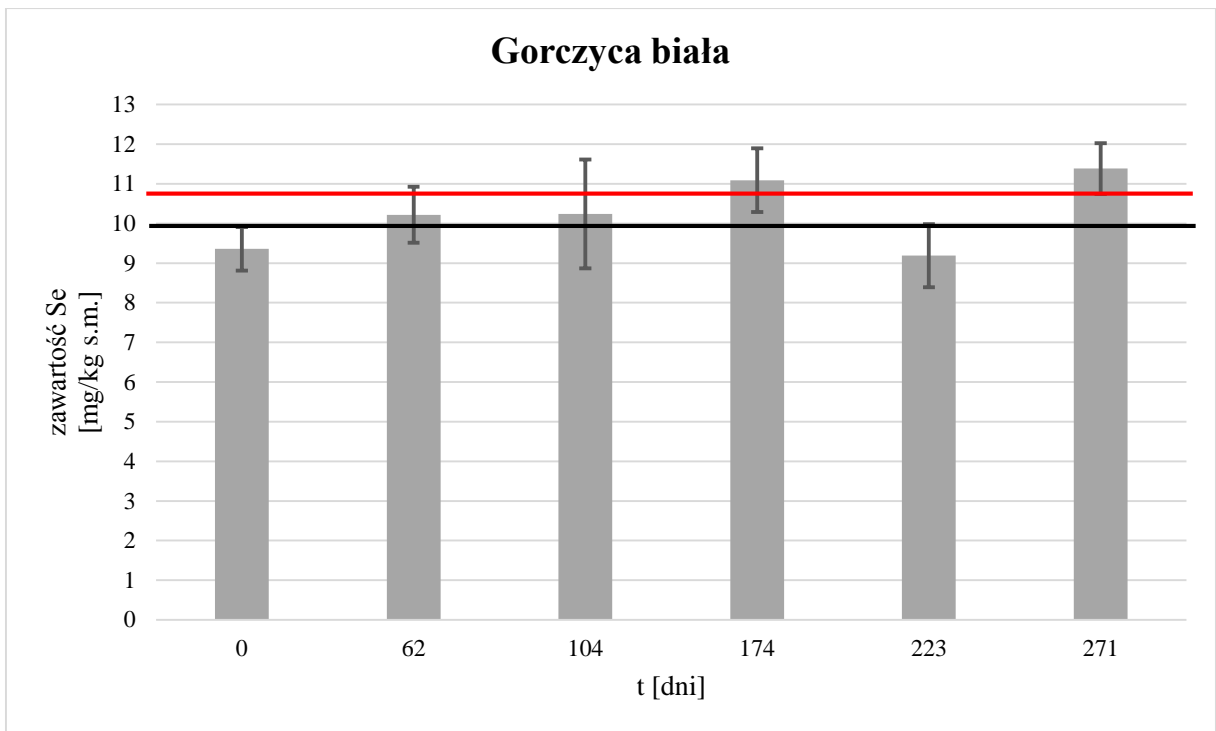
$t_1 = 62$ dni, $t_2 = 104$ dni, $t_3 = 174$ dni, $t_4 = 223$ dni, $t_5 = 271$ dni



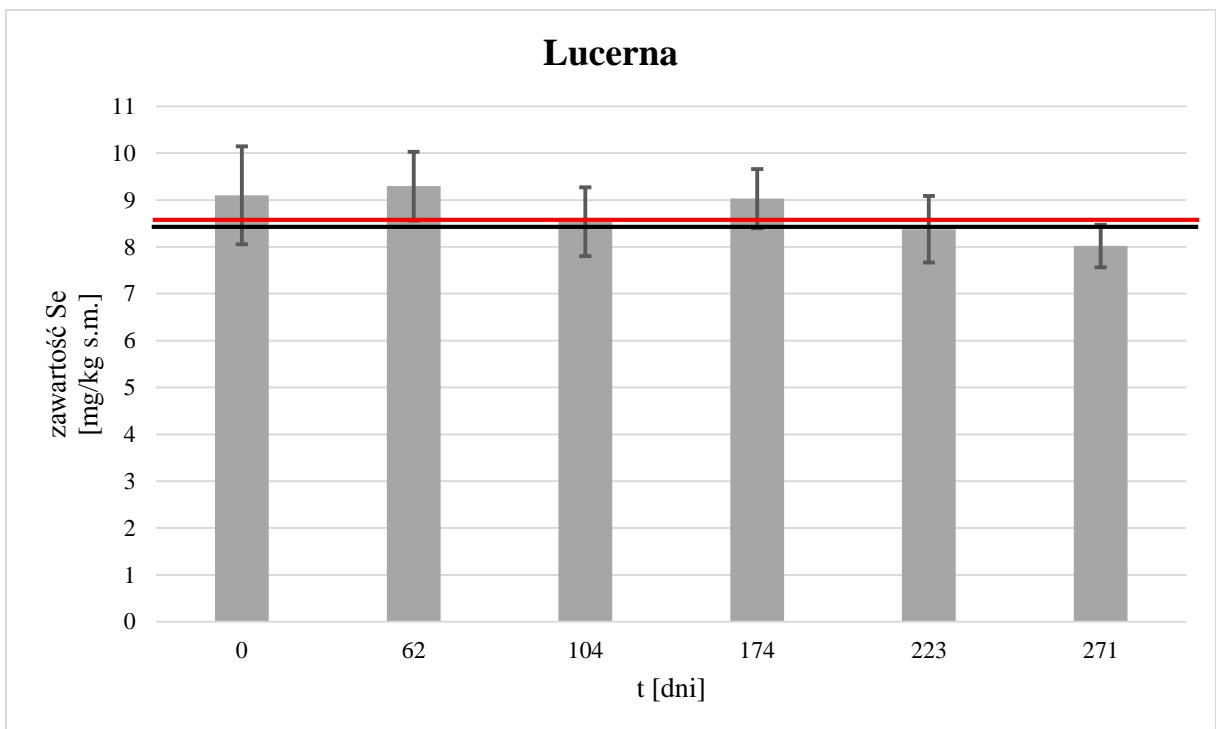
Rysunek 29. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



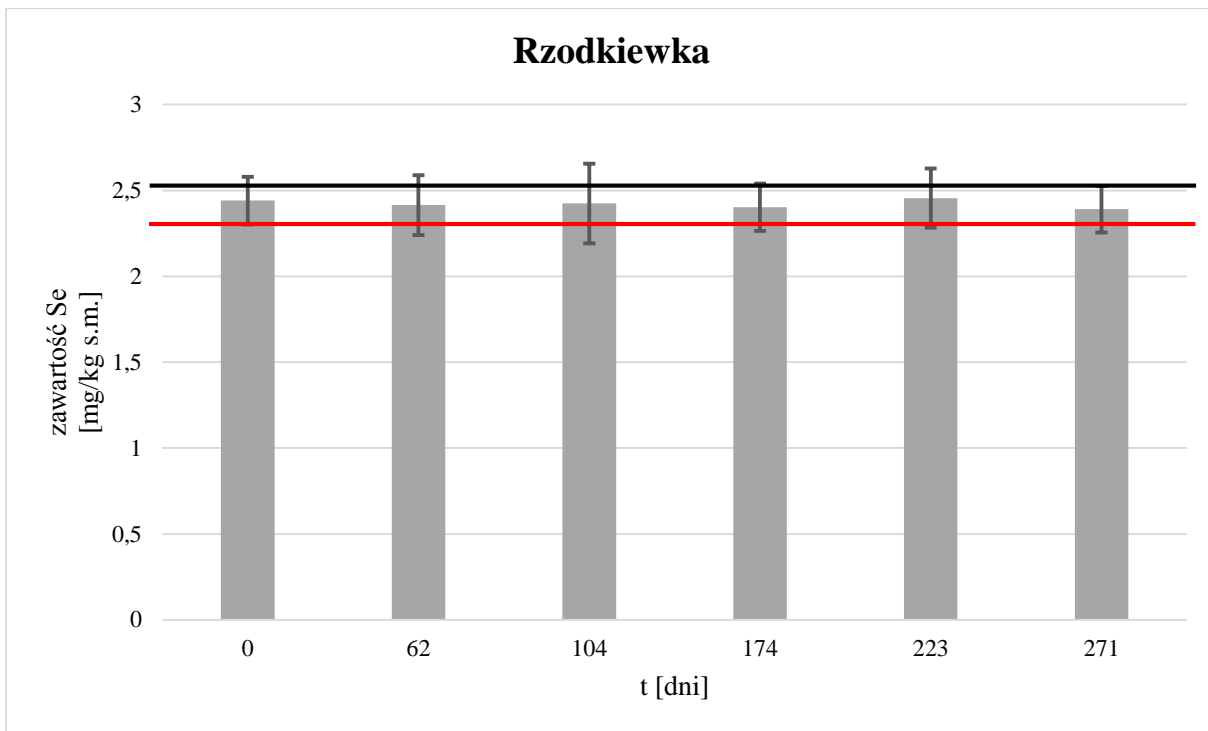
Rysunek 30. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



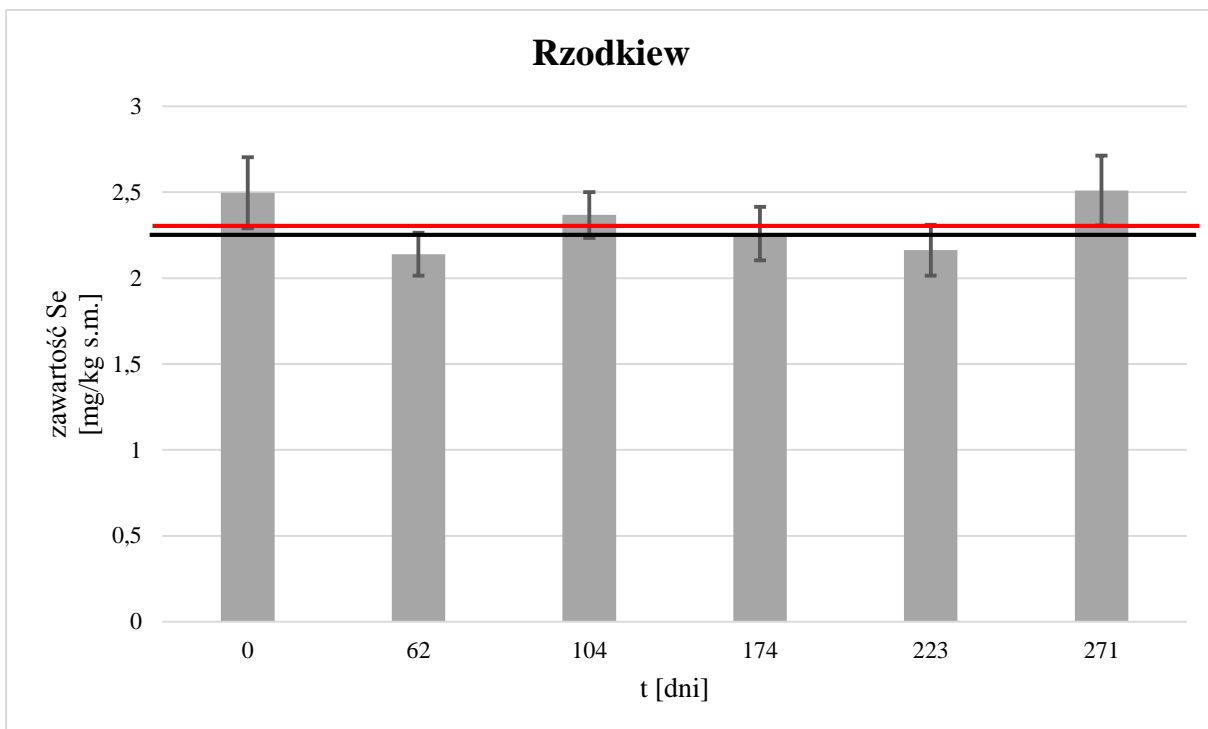
Rysunek 31. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



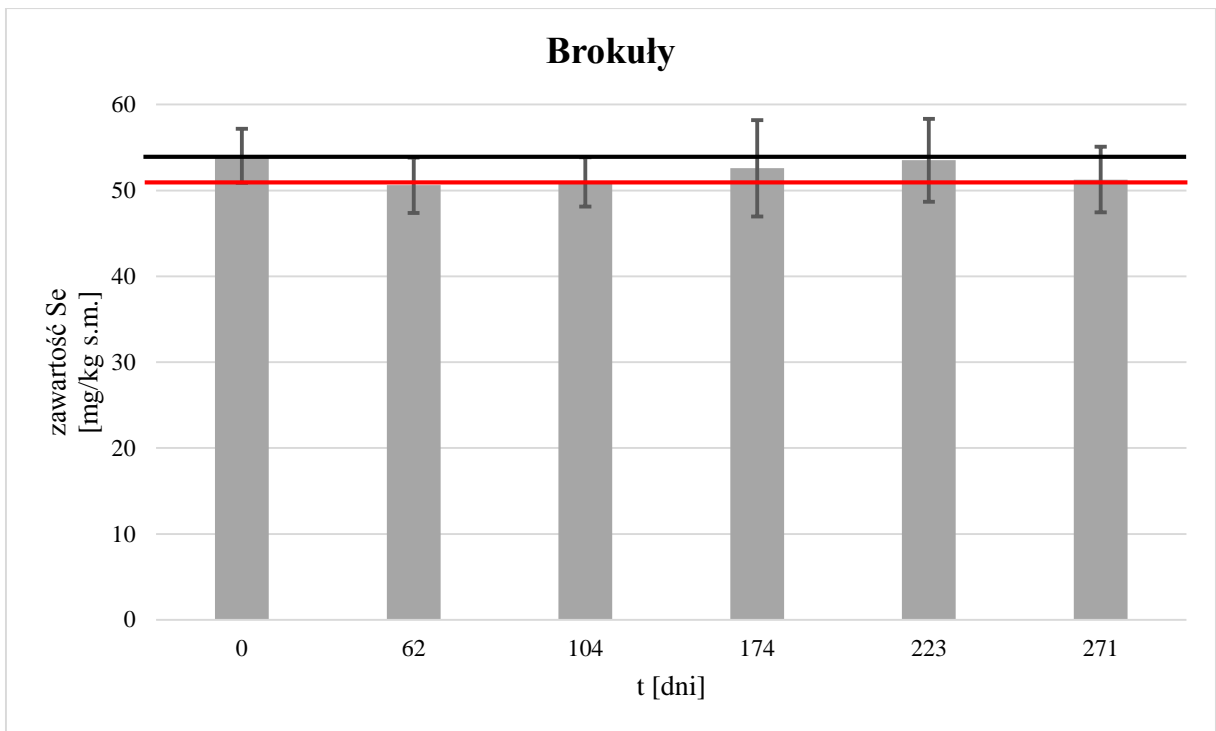
Rysunek 32. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



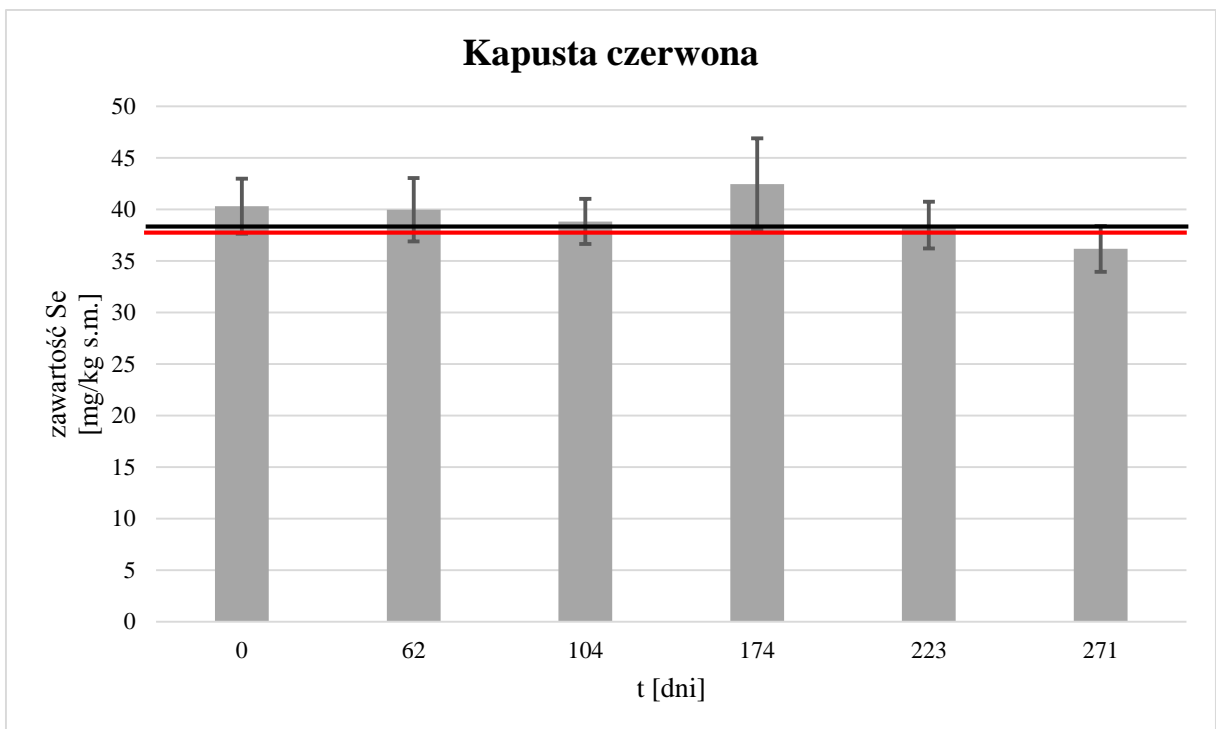
Rysunek 33. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



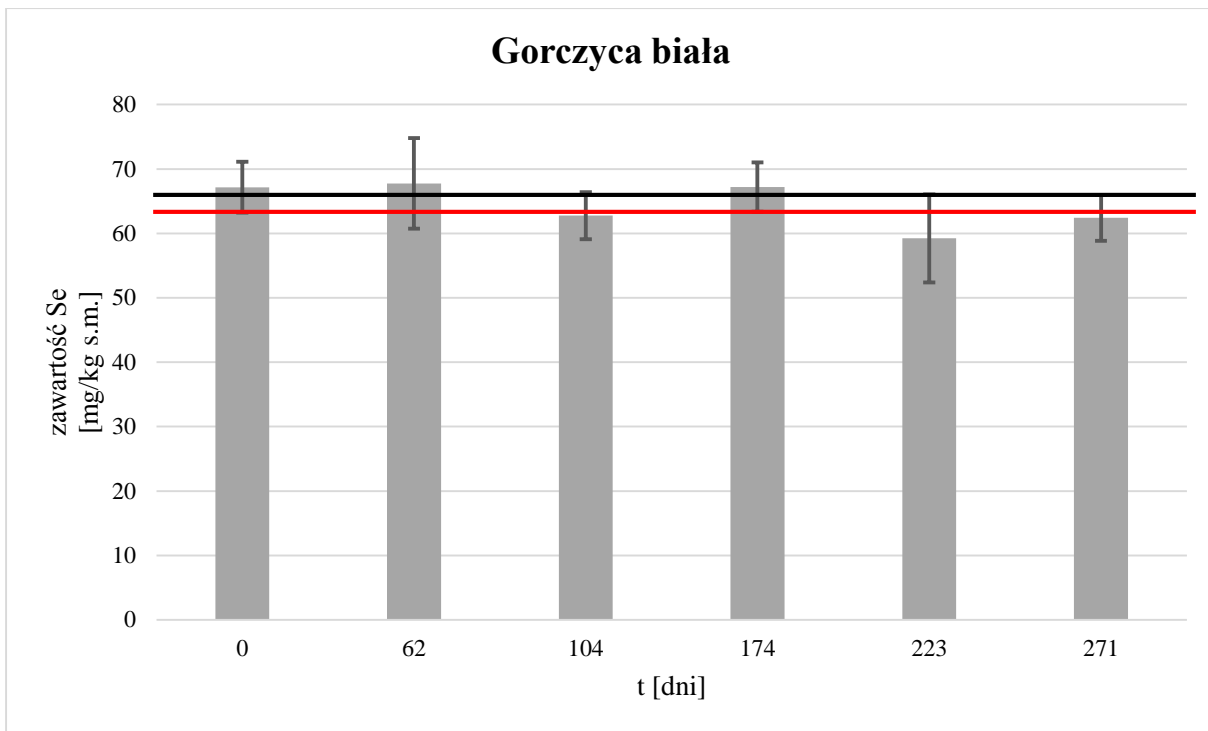
Rysunek 34. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3



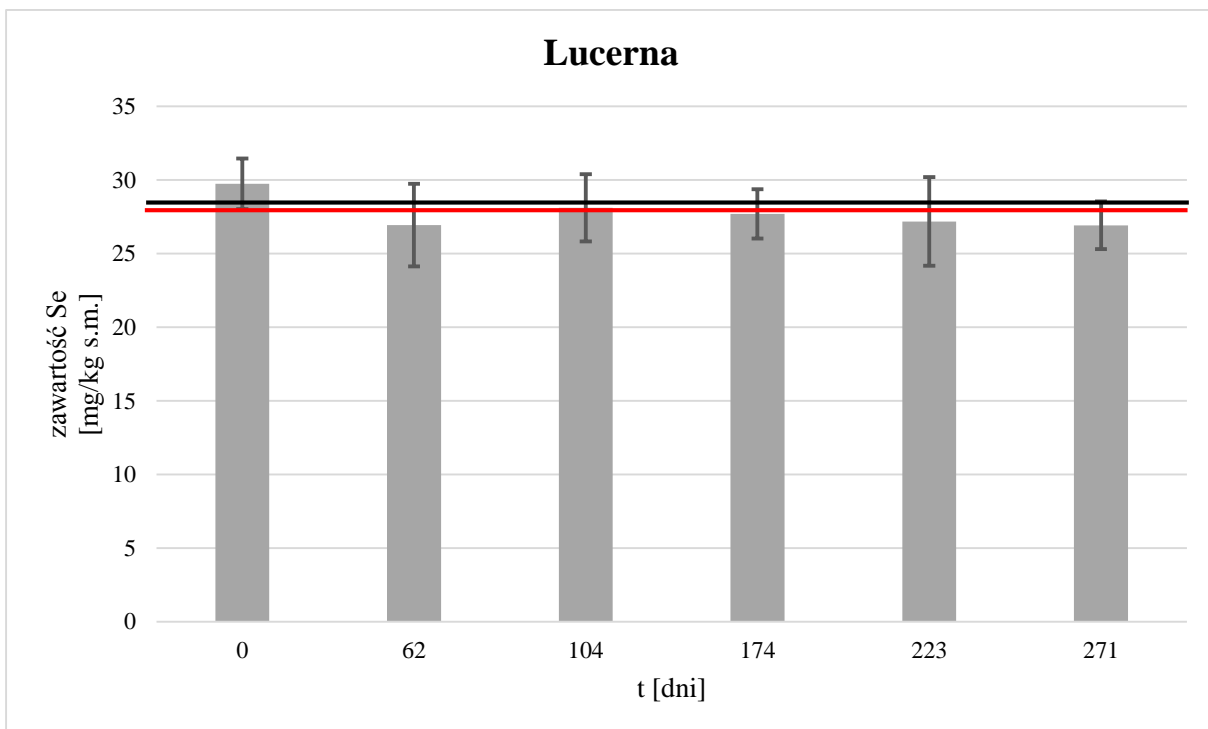
Rysunek 35. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



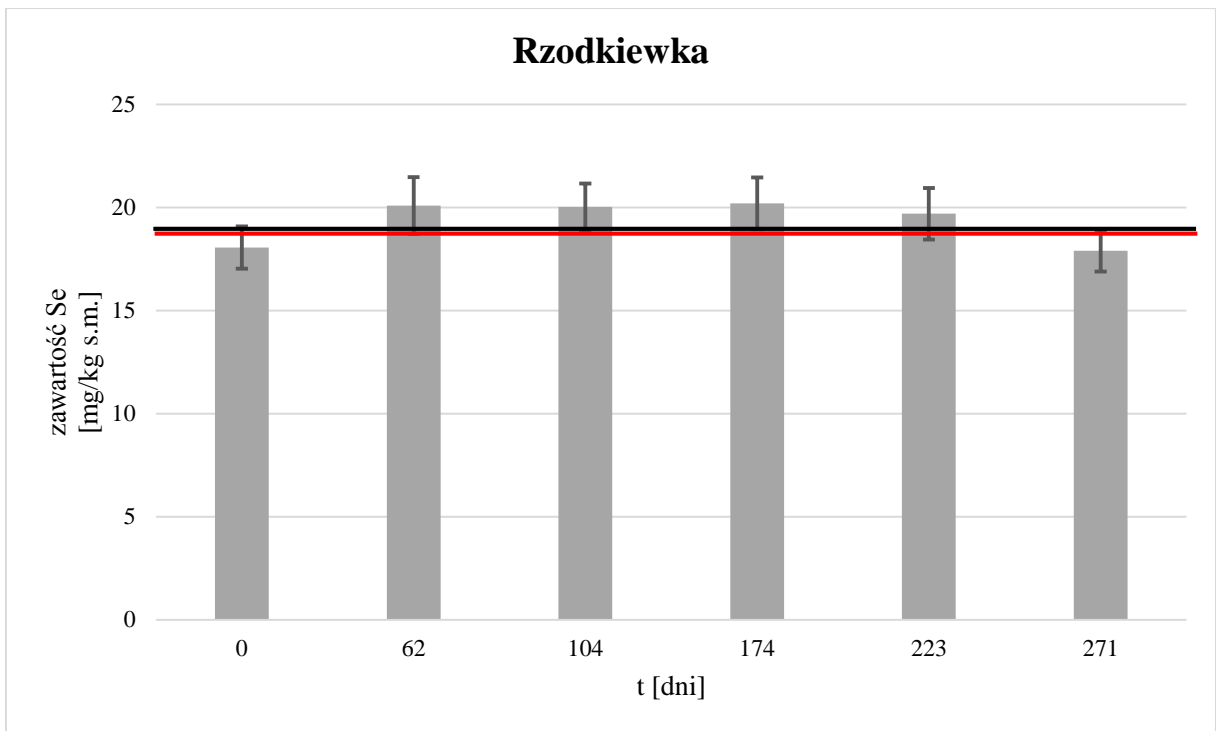
Rysunek 36. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 37. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



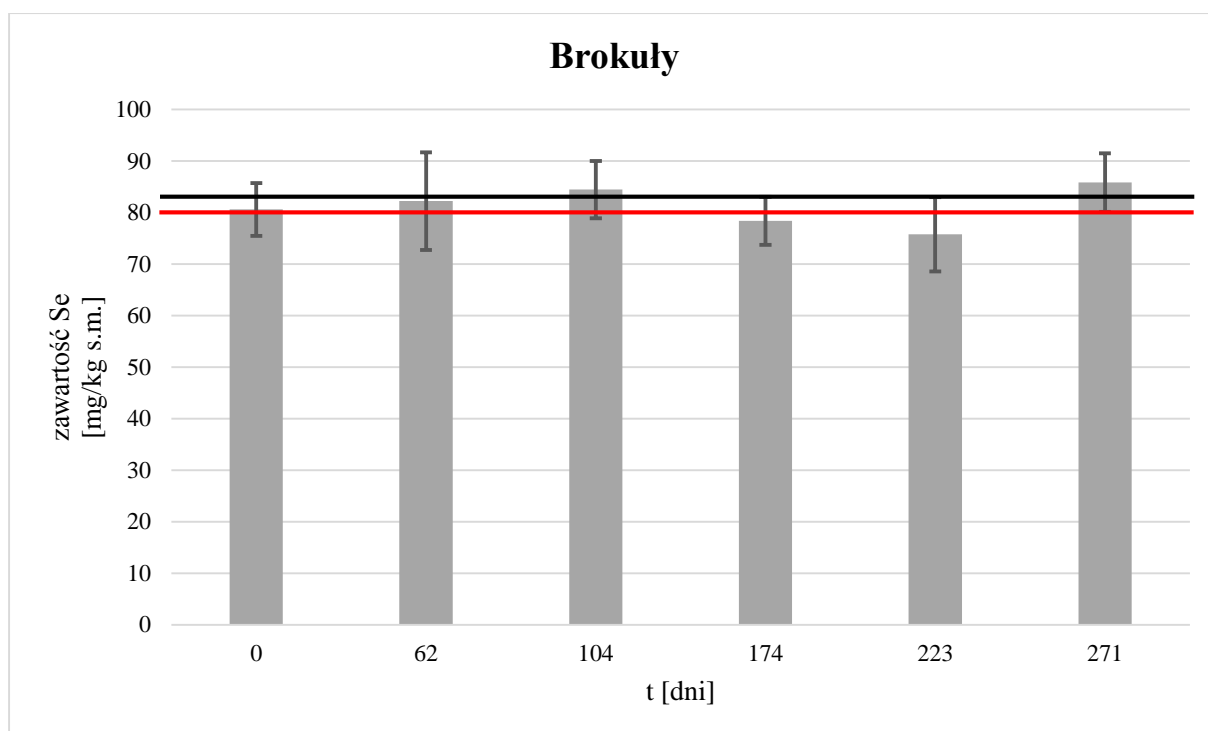
Rysunek 38. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



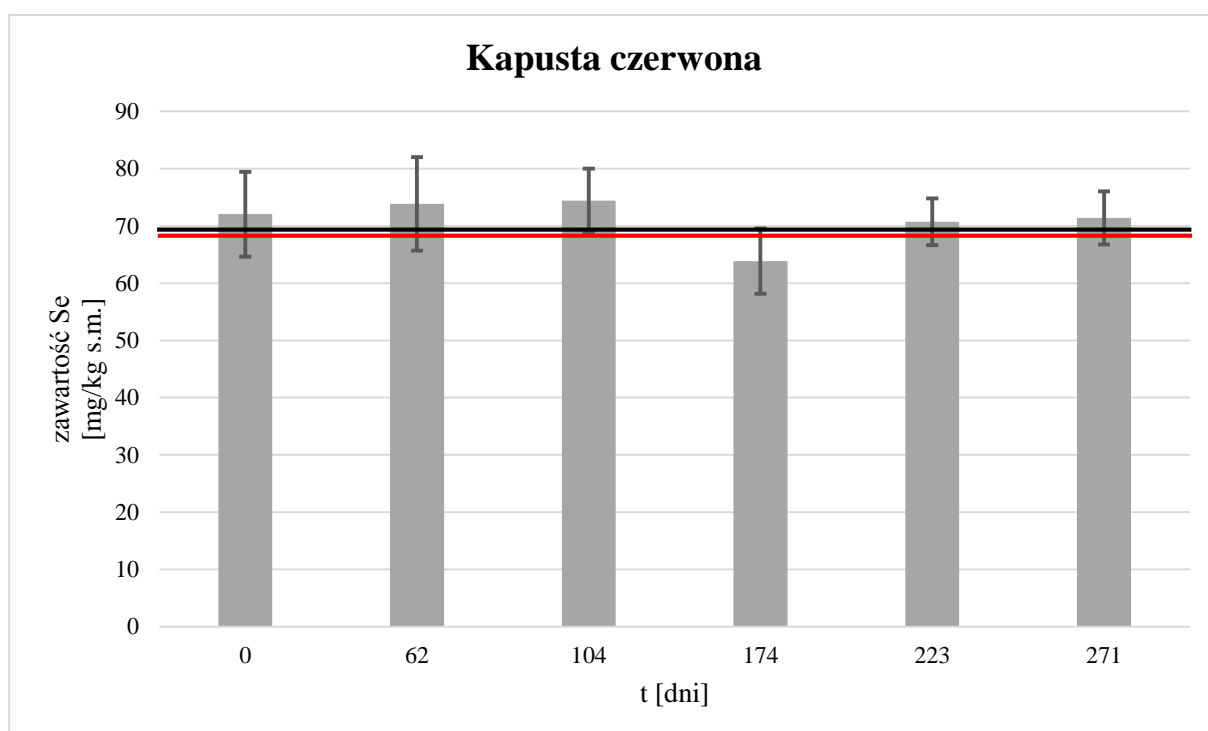
Rysunek 39. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



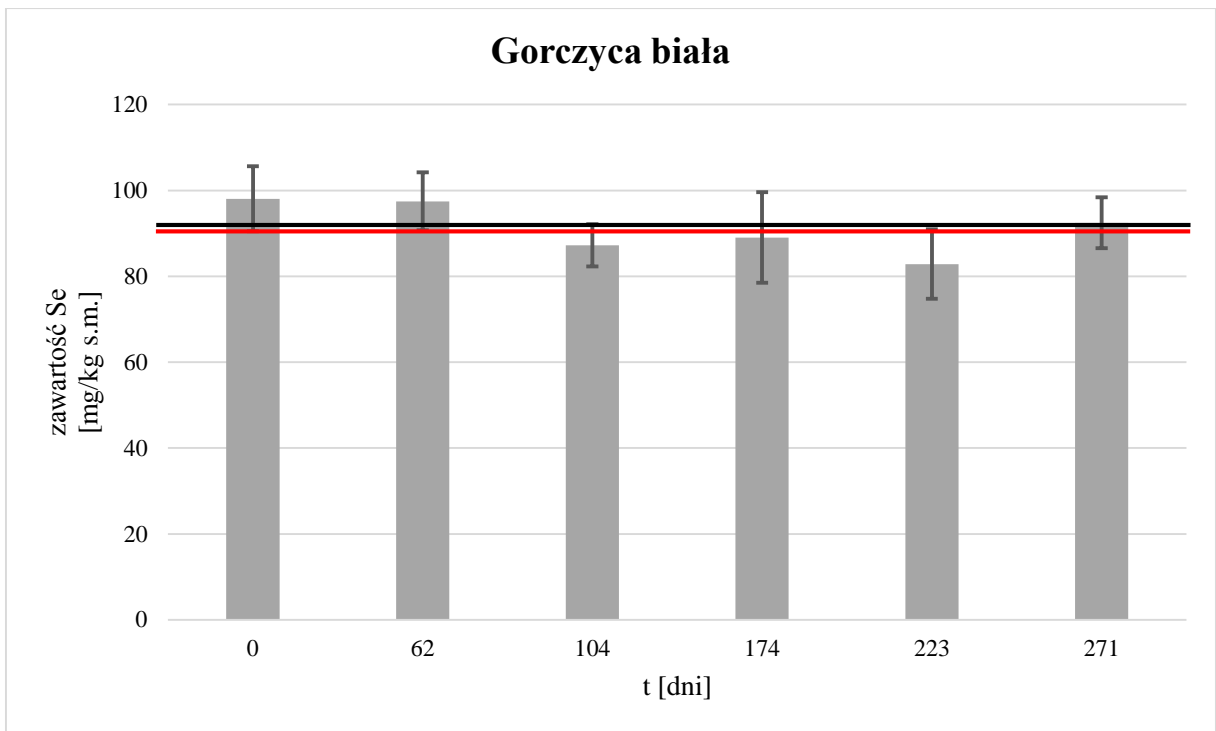
Rysunek 40. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3



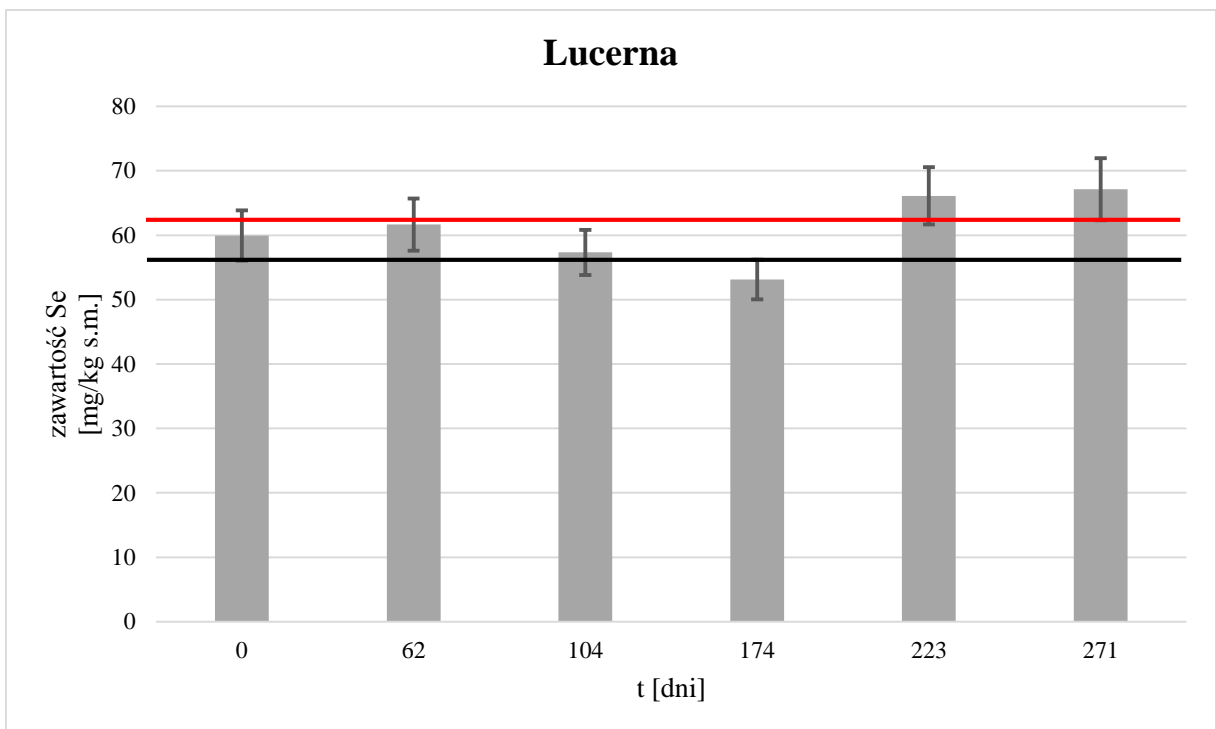
Rysunek 41. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



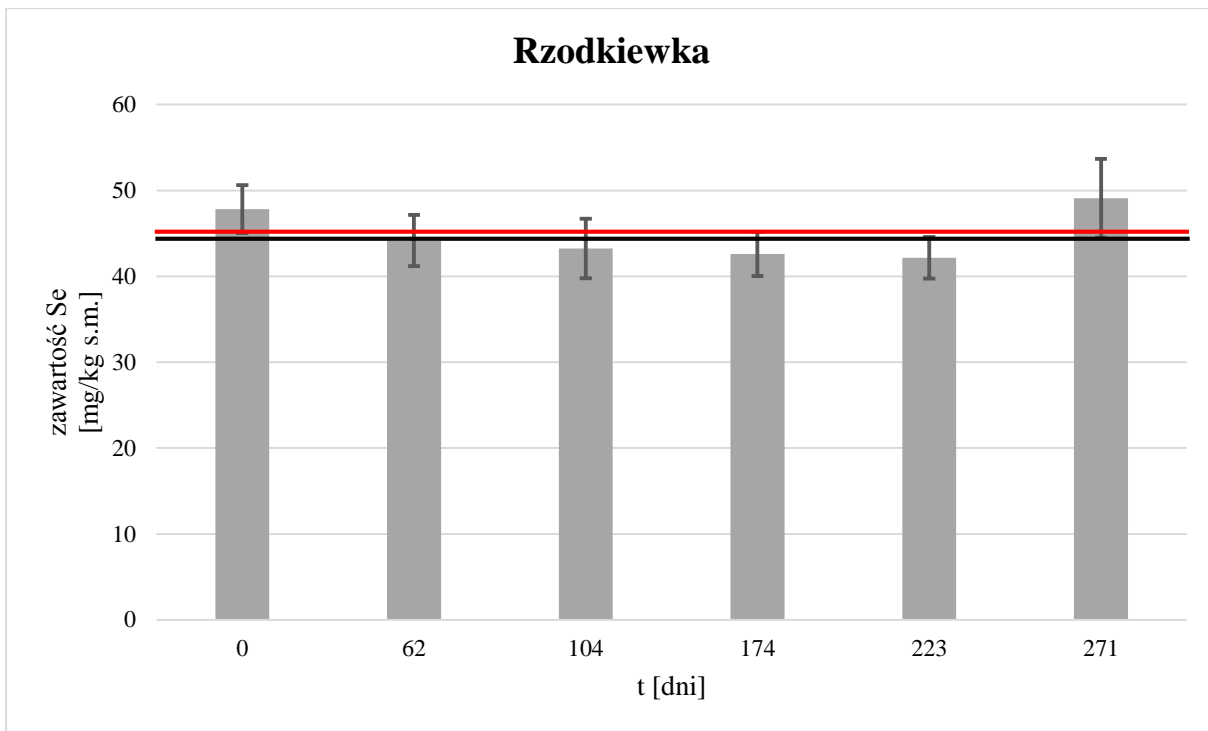
Rysunek 42. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



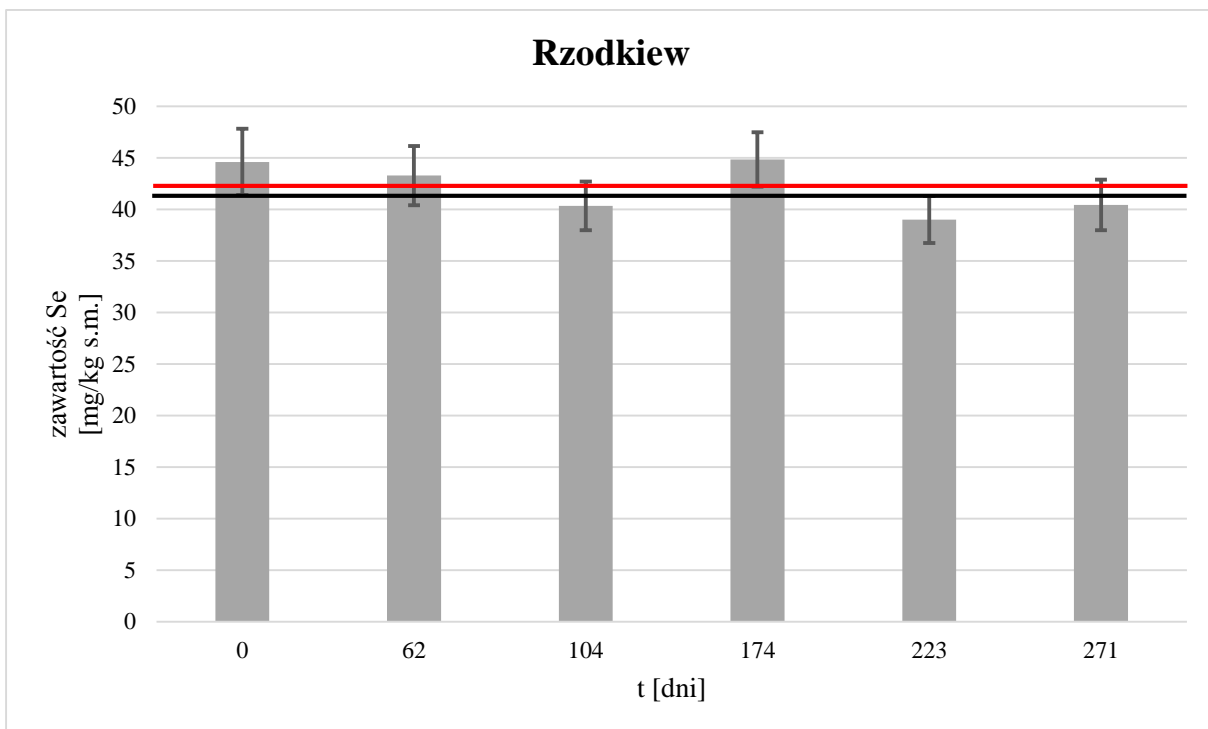
Rysunek 43. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



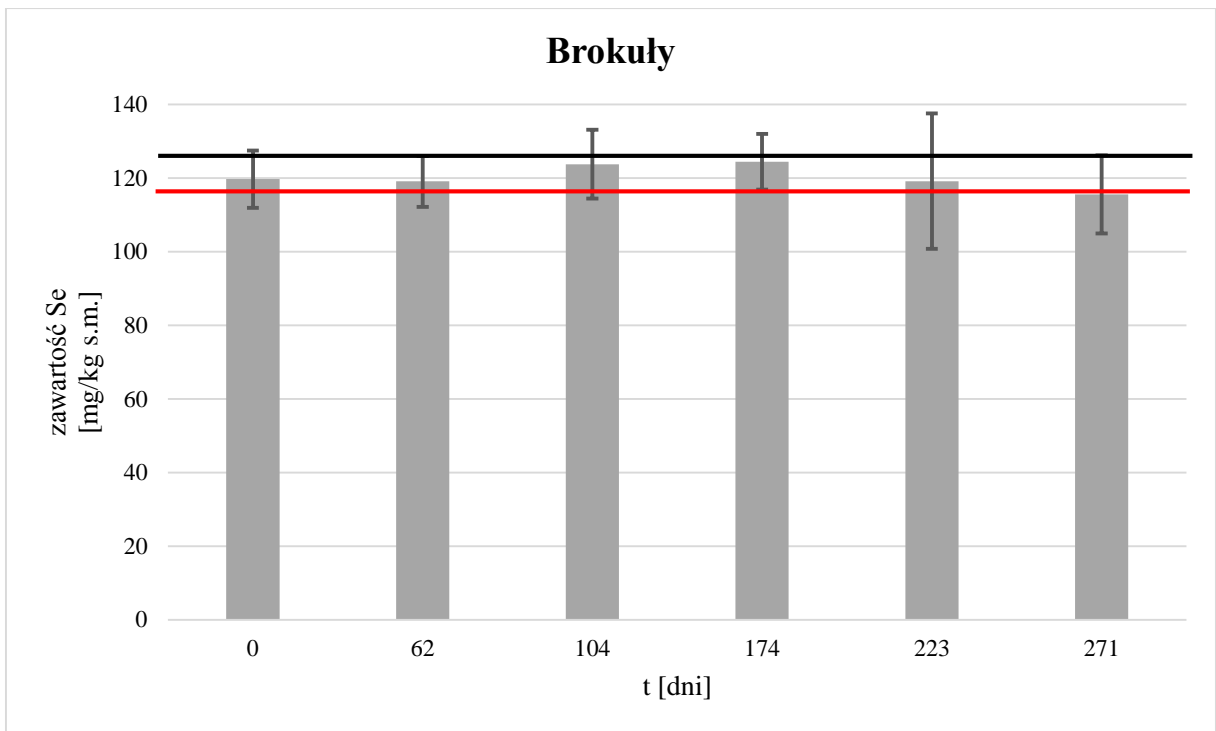
Rysunek 44. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



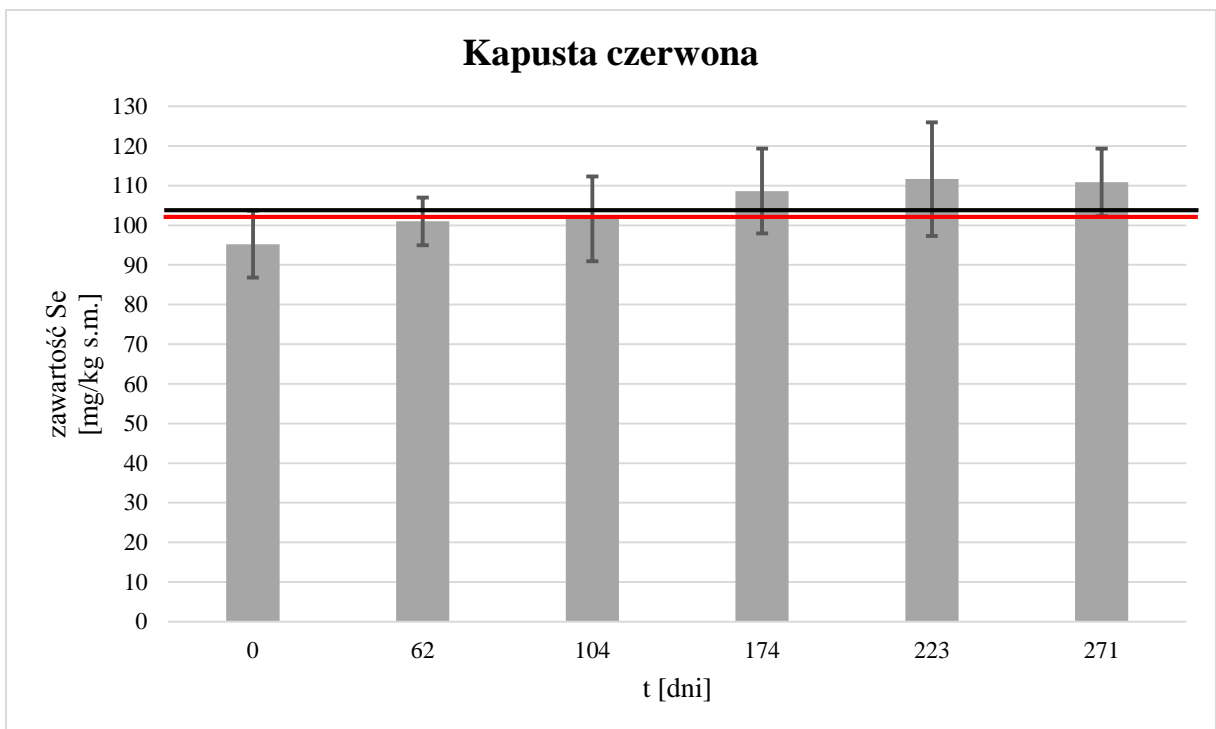
Rysunek 45. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



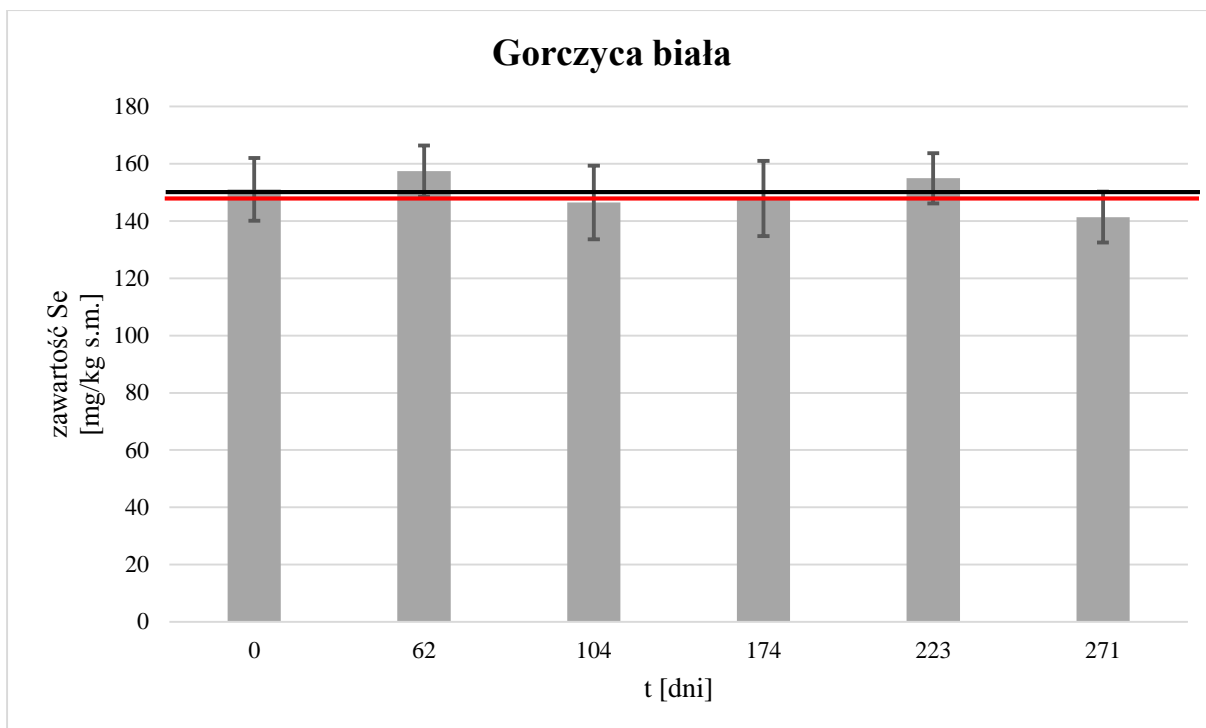
Rysunek 46. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



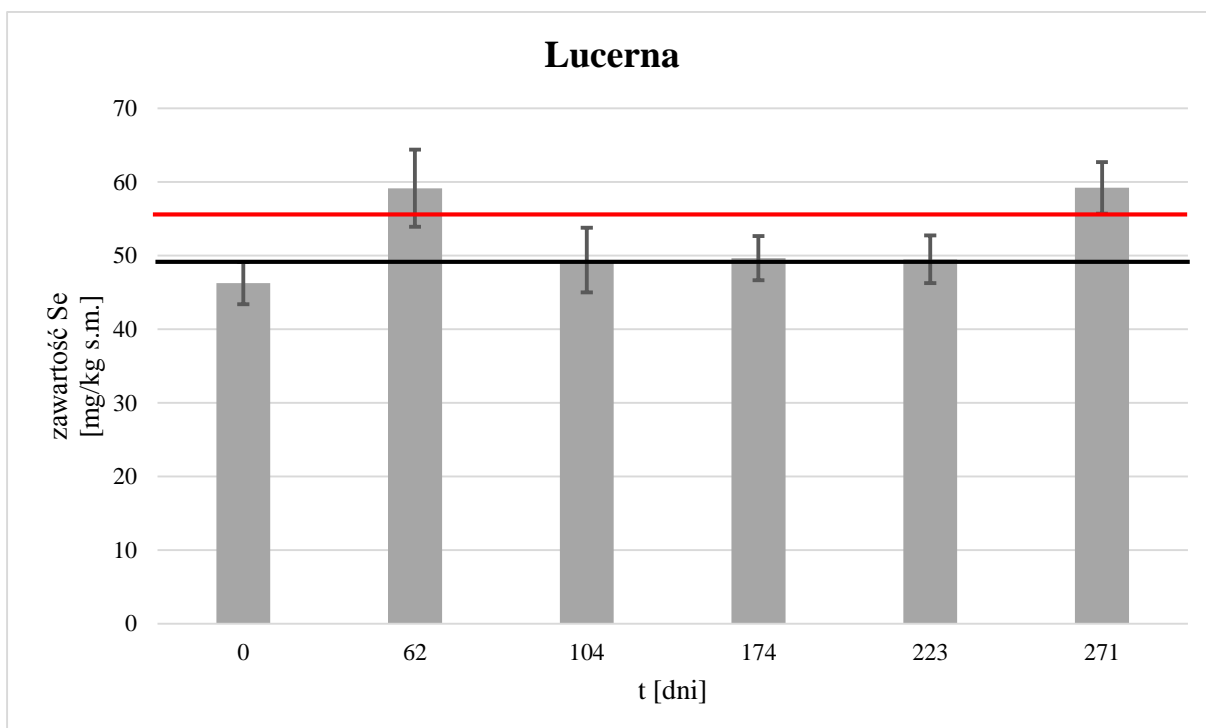
Rysunek 47. Wyniki badań trwałości próbek kielków brokułów hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3



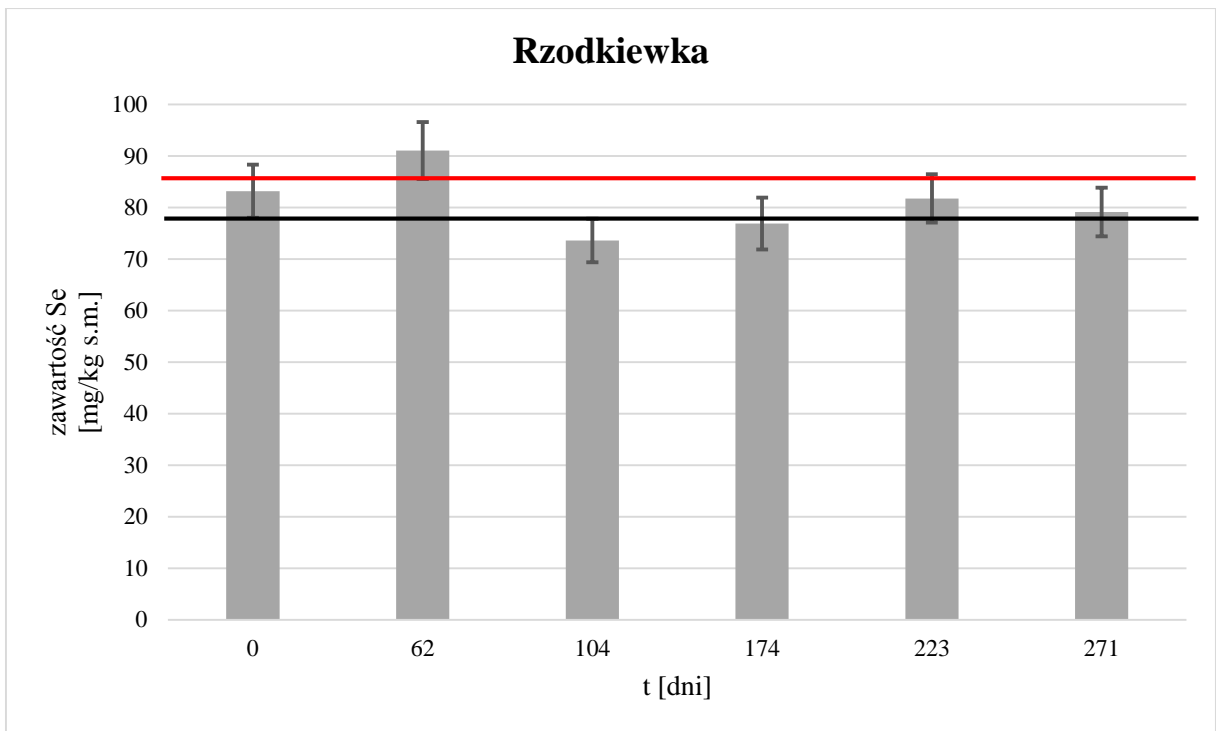
Rysunek 48. Wyniki badań trwałości próbek kielków kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3



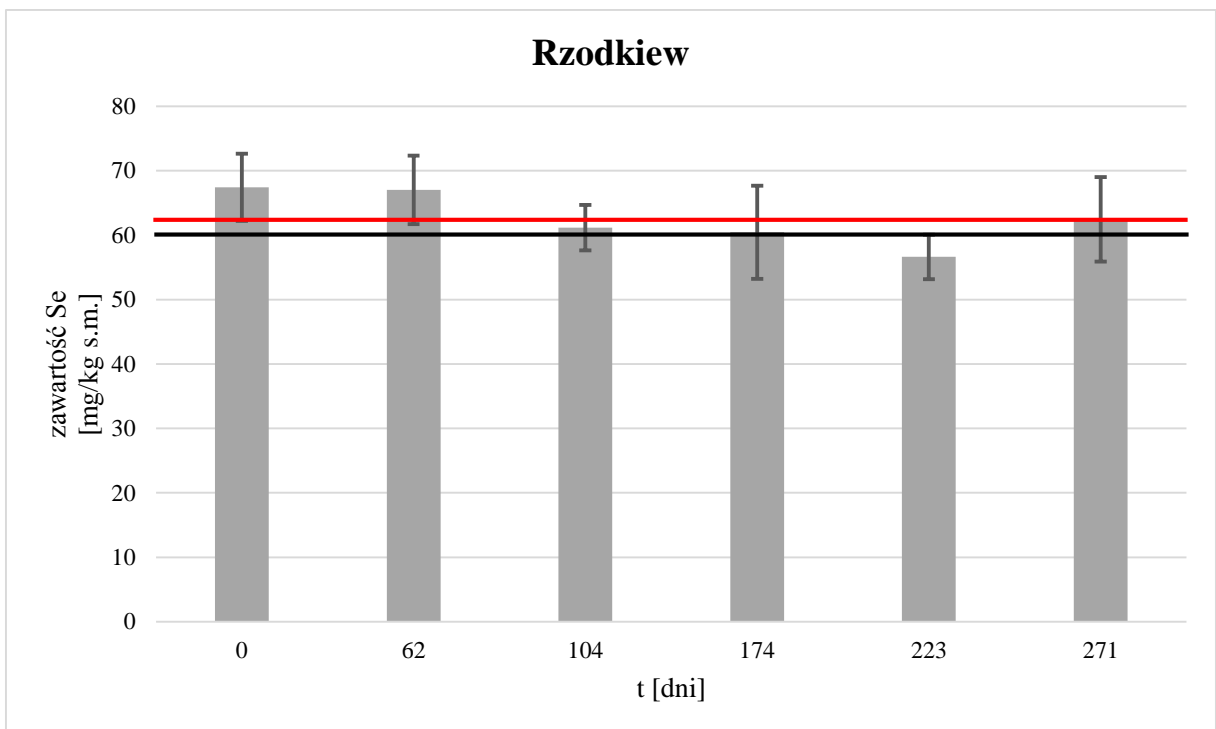
Rysunek 49. Wyniki badań trwałości próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 50. Wyniki badań trwałości próbek kielków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 51. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 52. Wyniki badań trwałości próbek kielków rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3

Wyniki badań trwałości przeprowadzone z wykorzystaniem techniki GF - AAS wykazały brak trwałości próbek kiełków gorczycy białej, lucerny i rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 , próbek kiełków lucerny i rzodkwi hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 oraz próbek kiełków lucerny, rzodkwi i rzodkiewki hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3 . W przypadku wszystkich rodzajów pożywek trwałe były próbki kiełków brokułów oraz kapusty czerwonej.

Trwałość próbek sprawdzono również za pomocą analizy statystycznej uzyskanych wyników, której wyniki przedstawiono w tabelach 30 - 33, odpowiednio dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 .

Tabela 30. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej

1 mg/l Na₂SeO₃

KIEŁKI	Kapusta czerwona	Gorzycza biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	6					
wartość średnia $y_{sr} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	6,07 ± 0,20	10,25 ± 0,72	10,93 ± 0,37	8,73 ± 0,40	2,32 ± 0,13	2,421 ± 0,020
współczynnik korelacji r	0,225	0,479	0,102	0,800	0,031	0,342
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	-0,0005	0,0042	0,0005	-0,0039	-0,00005	-0,00008
odchylenie standardowe s_b	0,0011	0,0038	0,0022	0,0014	0,00079	0,00011
parametr t-Studenta t_{obl}	0,463	1,092	0,205	2,665	0,062	0,728
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	6,14	9,67	10,87	9,26	2,33	2,433
odchylenie standardowe s_a	0,19	0,64	0,37	0,24	0,13	0,019
parametr t-Studenta t_{obl}	0,384	0,907	0,170	2,213	0,052	0,605
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości y_{sr} w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=4, \alpha=0,05) = 0,8114$

Tabela 31. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na₂SeO₃

KIEŁKI	Kapusta czerwona	Gorzycza biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	6					
wartość średnia $y_{\bar{s}r} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	39,4 ± 1,7	64,4 ± 2,8	52,2 ± 1,2	27,77 ± 0,88	18,42 ± 0,32	19,34 ± 0,87
współczynnik korelacji r	0,509	0,670	0,121	0,702	0,375	0,062
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	-0,0105	-0,023	-0,0017	-0,0074	-0,0015	-0,0006
odchylenie standardowe s_b	0,0088	0,013	0,0069	0,0037	0,0018	0,0052
parametr t-Studenta t_{obl}	1,182	1,804	0,243	1,973	0,809	0,124
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	40,8	67,57	52,4	28,79	18,62	19,42
odchylenie standardowe s_a	1,5	2,11	1,2	0,63	0,30	0,87
parametr t-Studenta t_{obl}	0,981	1,498	0,202	1,639	0,672	0,103
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości $y_{\bar{s}r}$ w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=4, \alpha=0,05) = 0,8114$

Tabela 32. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej

10 mg/l Na₂SeO₃

KIELKI	Kapusta czerwona	Gorczyca biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	6					
wartość średnia $y_{sr} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	71,0 ± 3,1	91,2 ± 4,9	81,2 ± 3,1	60,9 ± 4,3	42,1 ± 2,0	44,8 ± 2,4
współczynnik korelacji r	0,364	0,626	0,0287	0,440	0,602	0,0335
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	-0,014	-0,037	-0,001	0,023	-0,015	-0,001
odchylenie standardowe s_b	0,017	0,023	0,018	0,023	0,010	0,014
parametr t-Studenta t_{obl}	0,781	1,606	0,057	0,979	1,508	0,067
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	72,9	96,3	81,4	57,7	44,1	45,0
odchylenie standardowe s_a	2,9	3,8	3,1	3,9	1,6	2,4
parametr t-Studenta t_{obl}	0,649	1,334	0,048	0,813	1,252	0,056
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości y_{sr} w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=4, \alpha=0,05) = 0,8114$

Tabela 33. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na₂SeO₃

KIEŁKI	Kapusta czerwona	Gorczyca biała	Brokuły	Lucerna	Rzodkiew	Rzodkiewka
liczba punktów pomiarowych n	6					
wartość średnia $y_{\bar{s}r} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	104,8 ± 5,3	149,9 ± 4,8	120,3 ± 2,7	52,2 ± 4,5	62,5 ± 3,4	81,0 ± 4,9
współczynnik korelacji r	0,969	0,465	0,310	0,352	0,739	0,371
Współczynnik kierunkowy:						
wartość b	0,062	-0,027	-0,010	0,019	-0,030	-0,022
odchylenie standardowe s_b	0,008	0,025	0,015	0,025	0,014	0,027
parametr t-Studenta t_{obl}	7,892	1,051	0,652	0,751	2,192	0,800
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:						
wartość a	96,2	154	121,7	49,5	66,7	84,0
odchylenie standardowe s_a	1,3	4	2,6	4,3	2,3	4,6
parametr t-Studenta t_{obl}	6,554	0,873	0,542	0,624	1,821	0,665
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776					
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości $y_{\bar{s}r}$ w sposób statystycznie istotny	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

* $f=n-2$; $r_{kr}(f=4, \alpha=0,05) = 0,8114$

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników sprawdzenia trwałości można stwierdzić, że dla większości próbek kiełków roślin uprawianych na pożywkach zawierających 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 wartość współczynnika kierunkowego b (zależności liniowej zawartości selenu w funkcji czasu) nie różni się w sposób statystycznie istotny od wartości 0, wartość wyrazu wolnego a nie różni się w sposób statystycznie istotny od średniej zawartości selenu w poszczególnych próbkach y_{sr} , a wartość współczynnika korelacji r jest mniejsza od r_{kr} , co pozwala na stwierdzenie, że nie ma zależności pomiędzy zawartością całkowitego selenu w próbkach kiełków roślin w stosunku do okresu ich przechowywania. Jedynie dla próbki kiełków kapusty czerwonej hodowanej na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3 wykazano zależność pomiędzy zawartością całkowitego selenu a czasem przechowywania.

4.3.4 Podsumowanie badań trwałości próbek kiełków roślin

Podsumowując wyniki otrzymane podczas badania trwałości zawartości selenu w próbkach kiełków, do kolejnych etapów sprawdzenia możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu zakwalifikowano kiełki rzodkwi i lucerny hodowane na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4 oraz kiełki brokułów, gorczycy białej i kapusty czerwonej hodowane na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 . Wybór danego stężenia selenianu (IV) sodu w pożywce podyktowany był założeniem, aby w przypadku produkcji certyfikowanego materiału odniesienia wartości odniesienia poszczególnych analitów były wystarczająco wysokie, co będzie miało wpływ na wyznaczone wartości certyfikowane i ich niepewności, a co za tym idzie rozszerzy zakres obszaru zastosowania danego CRM.

4.4 Wstępne badanie jednorodności próbek kiełków roślin

Do badań jednorodności wybrano po jednym rodzaju kiełków hodowanych na pożywce zawierającej Na_2SeO_4 (lucerna) lub Na_2SeO_3 (gorczyca biała), w celu wstępnego sprawdzenia czy dany materiał spełnia wymagania stawiane kandydatom na materiał odniesienia. Wybór danych rodzajów kiełków podyktowany był przede wszystkim ilością materiału badawczego, który pozostał po badaniach trwałości.

4.4.2 Wstępne badanie jednorodności wewnątrzpakowaniowej próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

Przeprowadzono wstępne badanie jednorodności próbek kielków gorzycy białej wzbogaconej w Se (IV). W tym celu pobrano 6 podpróbek i poddano je analizie za pomocą GF - AAS. Oznaczenie całkowitej ilości selenu przeprowadzono w 6 powtórzeniach dla każdej próbki. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 35.

Tabela 35. Wyniki badania jednorodności próbek kielków gorzycy białej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

<i>Grupy</i>	<i>Licznik</i>	<i>Suma</i>	<i>Średnia</i>	<i>Wariancja</i>
Wiersz 1	6	1329	221	144
Wiersz 2	6	1311	218	81
Wiersz 3	6	1279	213	143
Wiersz 4	6	1272	212	246
Wiersz 5	6	1287	215	481
Wiersz 6	6	1353	225	280
\bar{x}			218	

ANALIZA WARIANCJI

<i>Źródło wariacji</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Wartość-p</i>	<i>Test F</i>	<i>s</i>	<i>CV</i>
Pomiędzy grupami	830	5	166	0,72	0,61	2,5	13	5,9 %
W obrębie grup	6871	30	229				15	7,0 %
Razem	7701	35						

U (k=2)	jednorodność	4,8 %
u	wewnątrzpakowaniowa (względna)	2,4 %

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że przygotowane próbki kielków gorzycy białej są jednorodne wewnątrz opakowania dla odważek powyżej 0,5 g, a niepewność względna związana z niejednorodnością partii materiału wynosi 2,4 %.

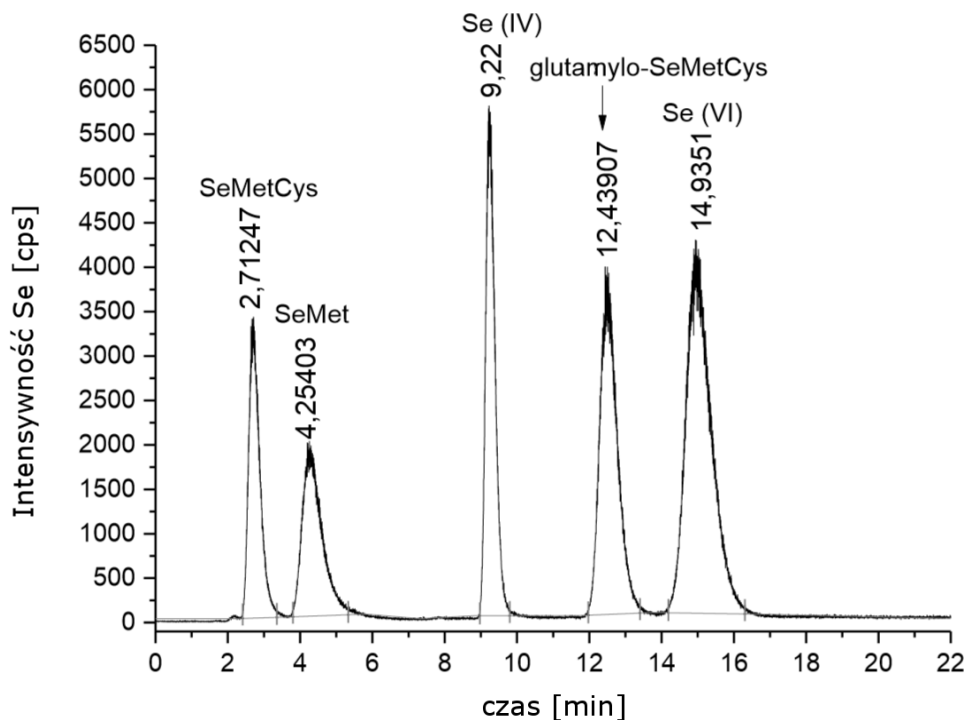
4.5 Analiza specyjacyjna selenu w próbkach kiełków roślin

Kiełki, które wykazały zdolność do akumulacji dużych ilości selenu, były odporne na wymagające warunki prowadzenia procesu kiełkowania oraz dla których wykazano trwałość przez długi okres czasu, zostały zakwalifikowane do kolejnego etapu badań – analizy specyjacyjnej.

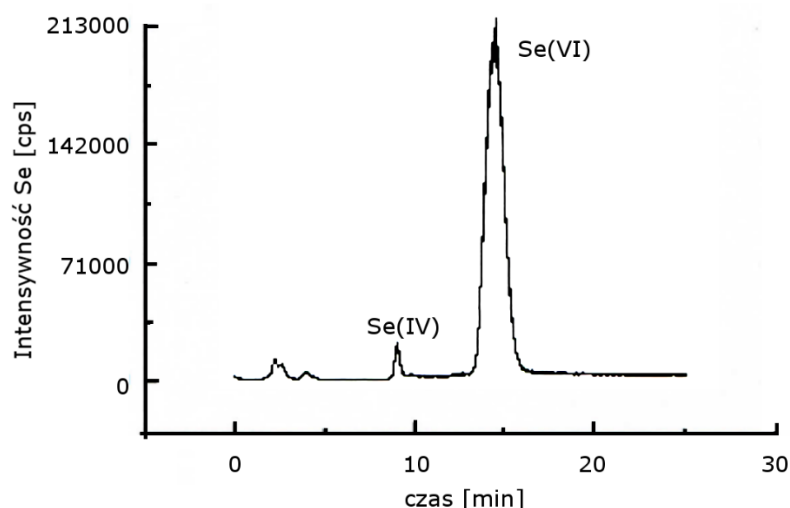
4.5.1 Analiza specyjacyjna selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4

Ze względu na pozytywne wyniki badań trwałości i jednorodności, próbki kiełków rzodkwi i lucerny uprawianych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4 zakwalifikowano do badań, polegających na oznaczeniu poszczególnych związków selenu (szczególnie SeMet i SeMetSeCys). Ze względu na fakt, iż badania specjacji selenu były przeprowadzane w ośrodku zewnętrznym, otrzymano jedynie wyniki specjacji dla próbki kiełków lucerny.

Na rysunku 53 przedstawiono chromatogram dla mieszaniny wzorcowej związków selenu o stężeniu 500 $\mu\text{g/l}$. Natomiast na rysunku 54 przedstawiono chromatogram dla ekstraktu próbki kiełków lucerny.



Rysunek 53. Chromatogram dla mieszaniny wzorcowej związków selenu o stężeniu 500 $\mu\text{g/l}$

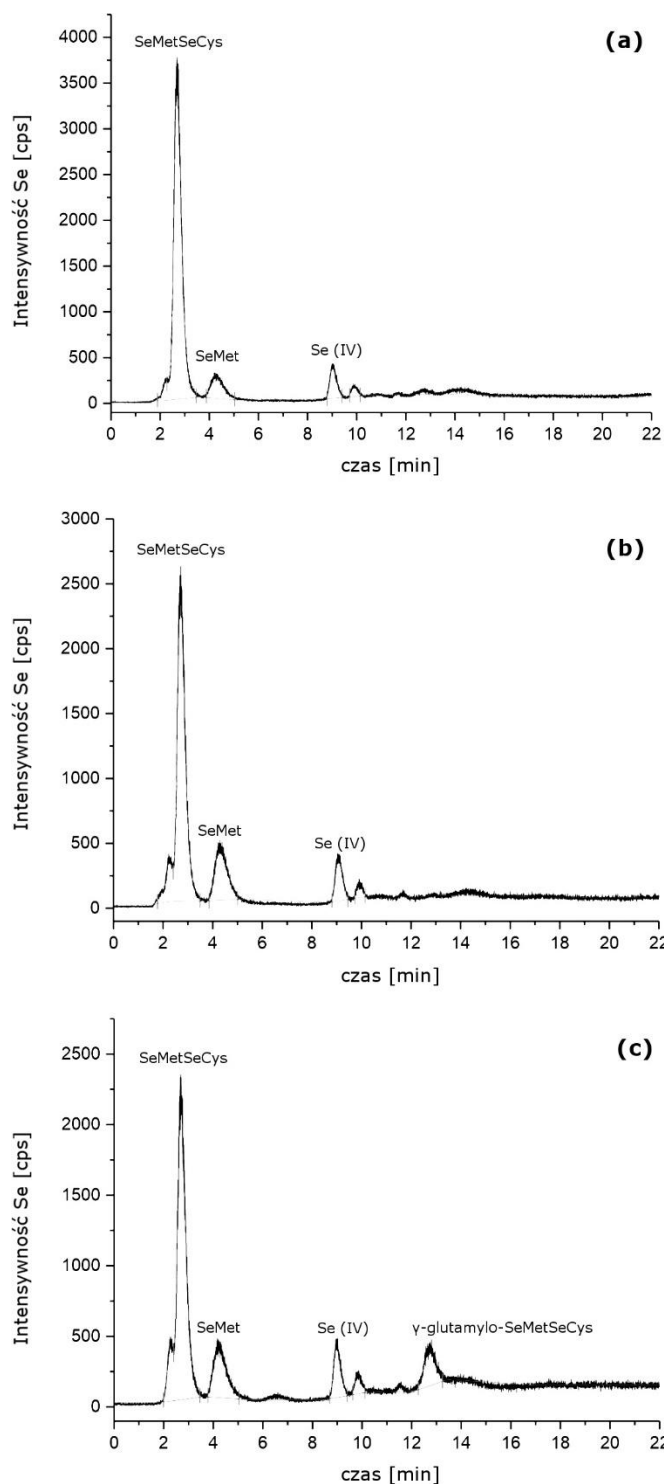


Rysunek 54. Chromatogram otrzymany dla ekstraktu próbki kiełków lucerny hodowanych na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4

Wyniki analizy specjacyjnej dla próbki lucerny wykazały brak organicznych połączeń selenu. Wykryto jedynie nieorganiczne połączenia selenu – Se (IV) oraz Se (VI) (podobne wyniki badań zostały opisane w literaturze [279]), co dyskwalifikuje dany rodzaj kiełków, jako kandydata na materiał odniesienia na potrzeby analizy specjacyjnej wybranych związków selenu.

4.5.2 Analiza specjacyjna selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3

W przypadku kiełków roślin uprawianych na pożywce zawierającej Na_2SeO_3 , do etapu oznaczenia poszczególnych związków selenu wybrano próbki kiełków brokułów, gorczycy białej oraz kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 . Próbkę te wybrano, ponieważ zaakumulowały największe ilości selenu, były odporne na wymagające warunki prowadzenia procesu kiełkowania oraz były trwałe przez długi okres czasu. Ponadto wyniki badań opisane w literaturze [279, 281, 283] wskazują, że w próbkach z rodziny kapustowatych głównym połączeniem selenu jest SeMetSeCys. Wyniki analizy jakościowej przedstawiono na rysunku 55.



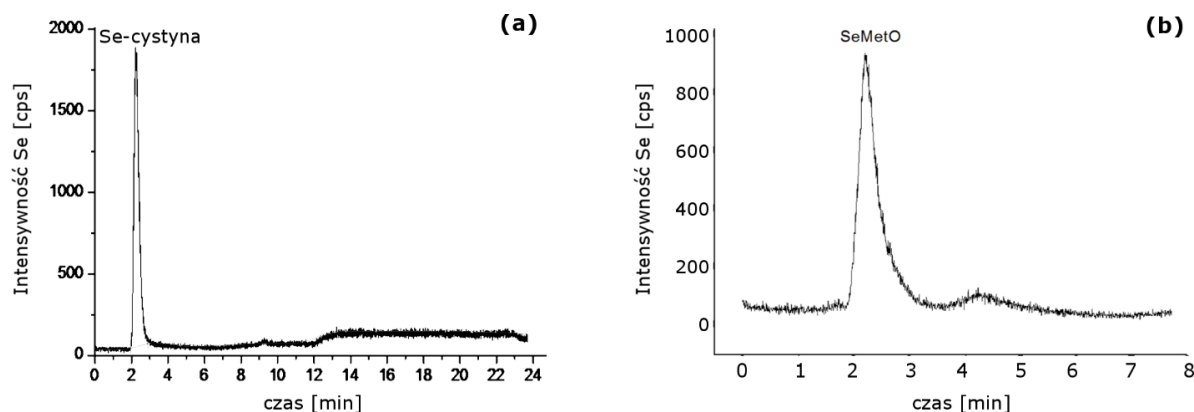
Rysunek 55. Chromatogramy otrzymane dla próbek kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 :

a) brokuły, b) gorczyca biała, c) kapusta czerwona

W wyniku przeprowadzonej identyfikacji związków w ekstraktach kiełków zidentyfikowano głównie SeMetSeCys, $t_R = 2,7$ min. W analizowanych ekstraktach zidentyfikowano również SeMet, $t_R = 4,3$ min oraz Se(IV), $t_R = 9,0$ min. Dodatkowo w ekstrakcie próbki kiełków kapusty czerwonej stwierdzono obecność glutamyl-SeMetSeCys wymywanej w czasie $t_R = 12,5$ min.

Występowanie powyższych związków w próbkach kiełków roślin potwierdzone zostało również przez inne zespoły badawcze, a wyniki przeprowadzonych przez nie badań zostały przedstawione w literaturze [281, 283]

W trakcie identyfikacji związków selenu z wykorzystaniem techniki HPLC – ICP - MS, przy czasie retencji $t_R = 2,2$ min wymywają się dwa związki Se-cystyna oraz Se-metionina utleniona (SeMetO). Chromatogramy dla tych dwóch związków przedstawiono na rysunku 56.



Rysunek 56. Chromatogramy otrzymane dla (a) Se-cystyny, (b) Se-metioniny utlenionej

Do potwierdzenia obecności tych związków wykorzystano układ pomiarowy HPLC MS/MS. Przeprowadzona analiza nie wykazała obecności Se-cystyny. Niewielki sygnał uzyskany w próbkach ekstraktów przy czasie retencji $t_R = 2,2$ min (rys. 27) może pochodzić od SeMetO. Nie mniej jednak są to sygnały zbyt niskie, aby możliwa była ich identyfikacja ilościowa.

Przeprowadzono również analizę ilościową związków selenu w ekstraktach kiełków. W tabeli 36 przedstawiono wartości granic wykrywalności i oznaczalności metody dla poszczególnych związków selenu, uzyskane za pomocą techniki sprzężonej HPLC – ICP – MS.

Tabela 36. Granice wykrywalności i oznaczalności metody dla poszczególnych związków selenu uzyskane za pomocą techniki sprzężonej HPLC – ICP – MS

Granica wykrywalności metody (MDL) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	SeMet	75
	SeMetSeCys	72
	Se (IV)	55
Granica oznaczalności metody (MQL) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	SeMet	150
	SeMetSeCys	144
	Se (IV)	111

Całkowita zawartość SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w ekstraktach kiełków została przedstawiona w tabeli 37.

Tabela 37. Całkowita zawartość SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w ekstraktach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

PRÓBKKA	SeMet c ± U(k=2) [mg/kg s.m.]	SeMetSeCys c ± U(k=2) [mg/kg s.m.]	Se (IV) c ± U(k=2) [mg/kg s.m.]
Brokuły	7,1 ± 1,3	68 ± 12	3,43 ± 0,62
Gorzycza biała	10,7 ± 1,9	44,3 ± 8,0	2,54 ± 0,46
Kapusta czerwona	7,4 ± 1,3	43,1 ± 7,8	2,38 ± 0,43

Wyniki badań specjacyjnych w ekstraktach kiełków roślin wykazały, że kiełki brokułów, gorzycy białej oraz kapusty czerwonej posiadają zdolność do biotransformacji związków nieorganicznych selenu w jego organiczne połączenia, szczególnie SeMetSeCys i SeMet. Z tego względu te trzy rodzaje kiełków zostały zakwalifikowane do dalszych etapów badań polegających na badaniu trwałości zawartości związków organicznych selenu w próbkach.

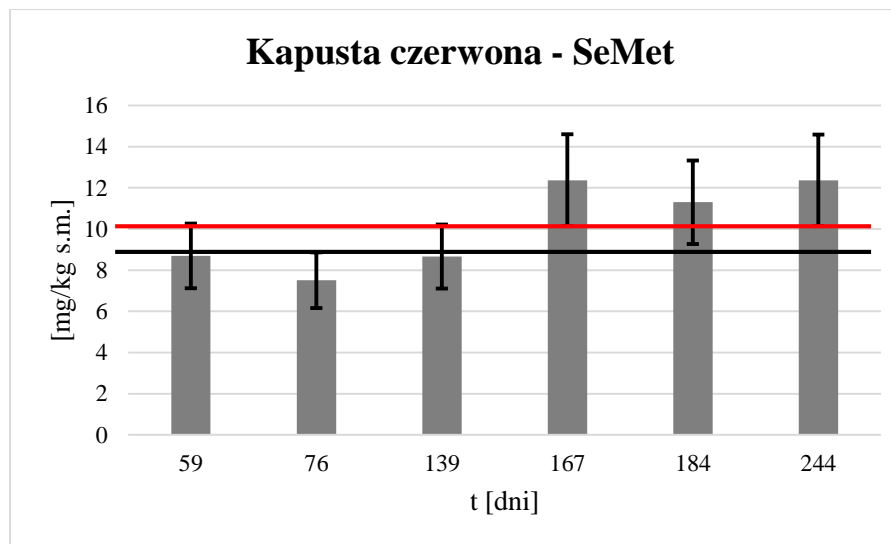
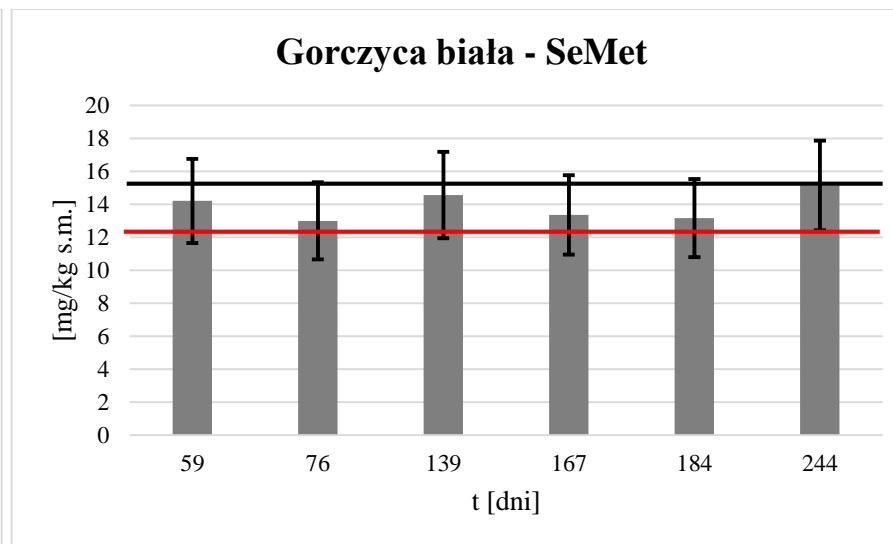
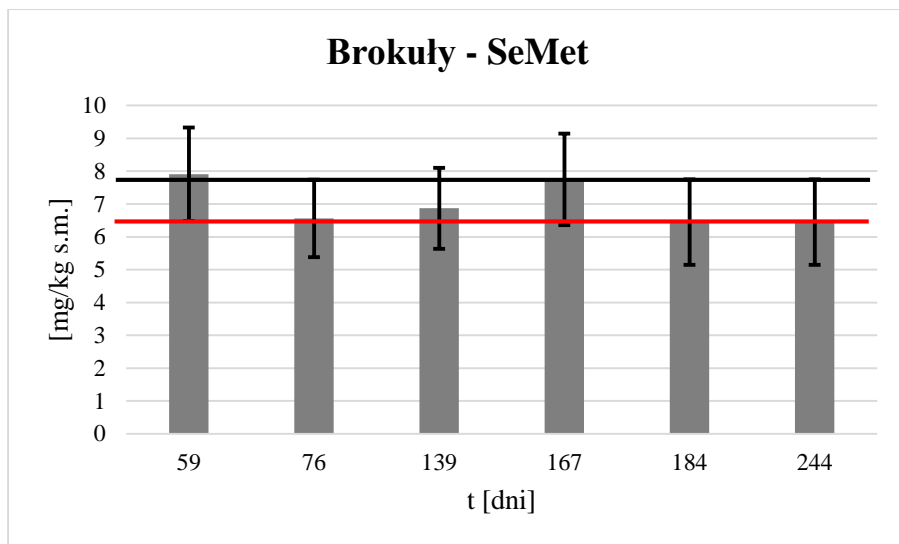
4.5.3 Badanie trwałości zawartości związków organicznych selenu (SeMetSeCys, SeMet) oraz Se (IV) w próbkach kiełków brokułów, gorzycy białej i kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

Badanie trwałości zawartości SeMetSeCys, SeMet oraz Se (IV) w próbkach kiełków zostało przeprowadzone po następujących czasach przechowywania: t₁ = 59 dni, t₂ = 76 dni, t₃ = 139 dni, t₄ = 167 dni, t₅ = 184 dni, t₆ = 244 dni, przy użyciu techniki HPLC – ICP – MS. Próbki przechowywano w szczelnie zamykanych woreczkach PE w temperaturze -20 °C Wyniki badań trwałości przedstawiono w tabeli 38 i na rysunkach 56, 57 oraz 58, odpowiednio dla SeMet, SeMetSeCys i Se (IV).

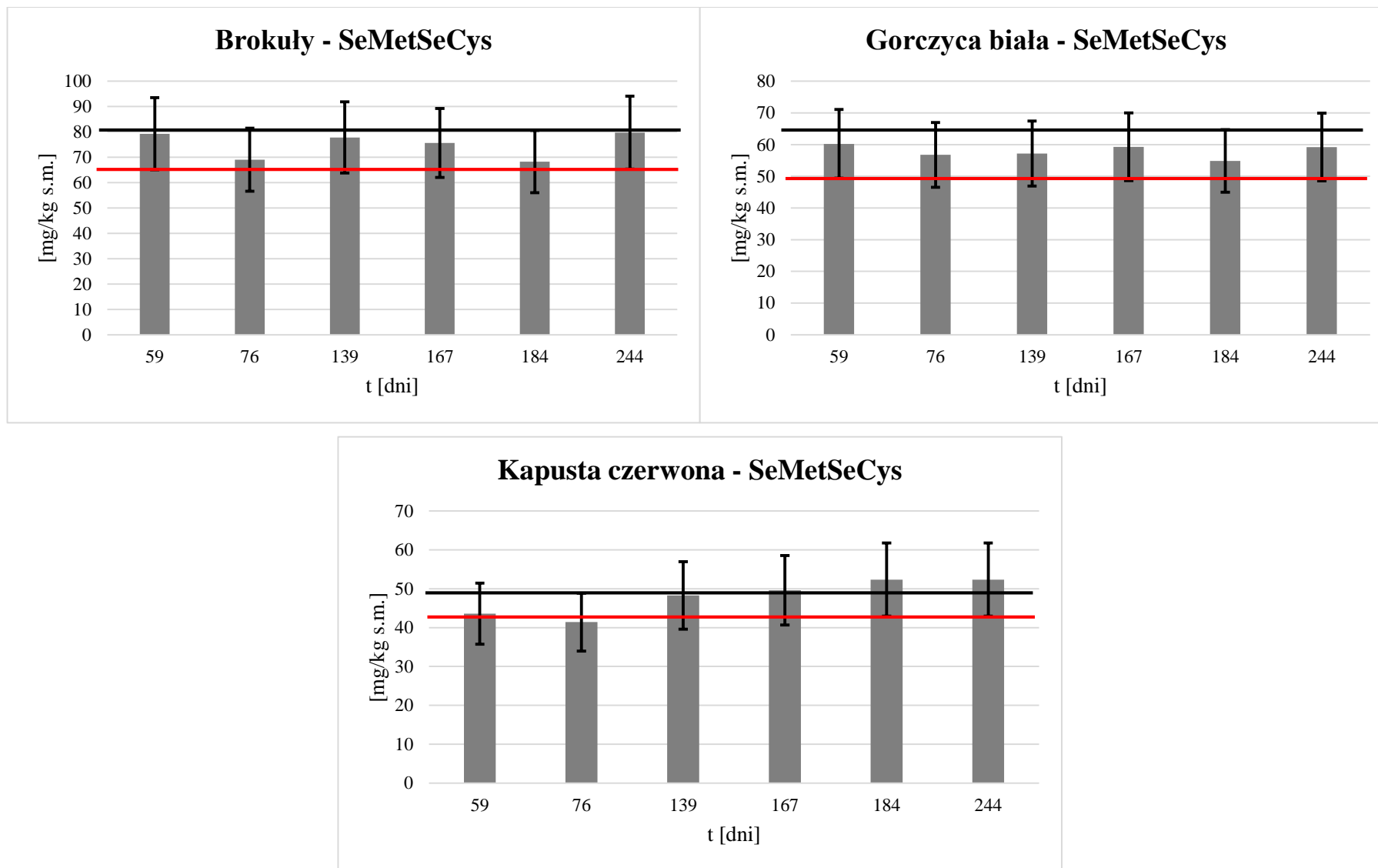
Tabela 38. Wyniki badań trwałości zawartości SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

	Próbka	$x(t_1) \pm U(k=2)$	$x(t_2) \pm U(k=2)$	$x(t_3) \pm U(k=2)$	$x(t_4) \pm U(k=2)$	$x(t_5) \pm U(k=2)$	$x(t_6) \pm U(k=2)$
		[mg/kg s.m.]					
SeMet	Brokuły	7,9 ± 1,4	6,6 ± 1,2	6,9 ± 1,2	7,8 ± 1,4	6,5 ± 1,2	7,3 ± 1,3
	Gorzycza biała	14,2 ± 2,6	13,0 ± 2,3	14,6 ± 2,6	13,4 ± 2,4	13,2 ± 2,4	15,2 ± 2,7
	Kapusta czerwona	8,7 ± 1,6	7,5 ± 1,4	8,7 ± 1,6	12,4 ± 2,2	11,3 ± 2,0	12,4 ± 2,2
SeMetSeCys	Brokuły	79 ± 14	69 ± 12	78 ± 14	76 ± 14	68 ± 12	80 ± 14
	Gorzycza biała	60 ± 11	57 ± 10	57 ± 10	59 ± 11	54,9 ± 9,9	59 ± 11
	Kapusta czerwona	43,6 ± 7,8	41,4 ± 7,5	48,3 ± 8,7	49,6 ± 8,9	52,4 ± 9,4	52,4 ± 9,4
Se (IV)	Brokuły	3,65 ± 0,66	3,28 ± 0,59	3,68 ± 0,66	4,45 ± 0,80	3,38 ± 0,61	3,81 ± 0,69
	Gorzycza biała	4,18 ± 0,75	3,07 ± 0,55	3,26 ± 0,59	3,55 ± 0,64	3,31 ± 0,60	3,54 ± 0,64
	Kapusta czerwona	3,09 ± 0,56	2,55 ± 0,46	3,10 ± 0,56	3,55 ± 0,64	3,21 ± 0,58	2,81 ± 0,51

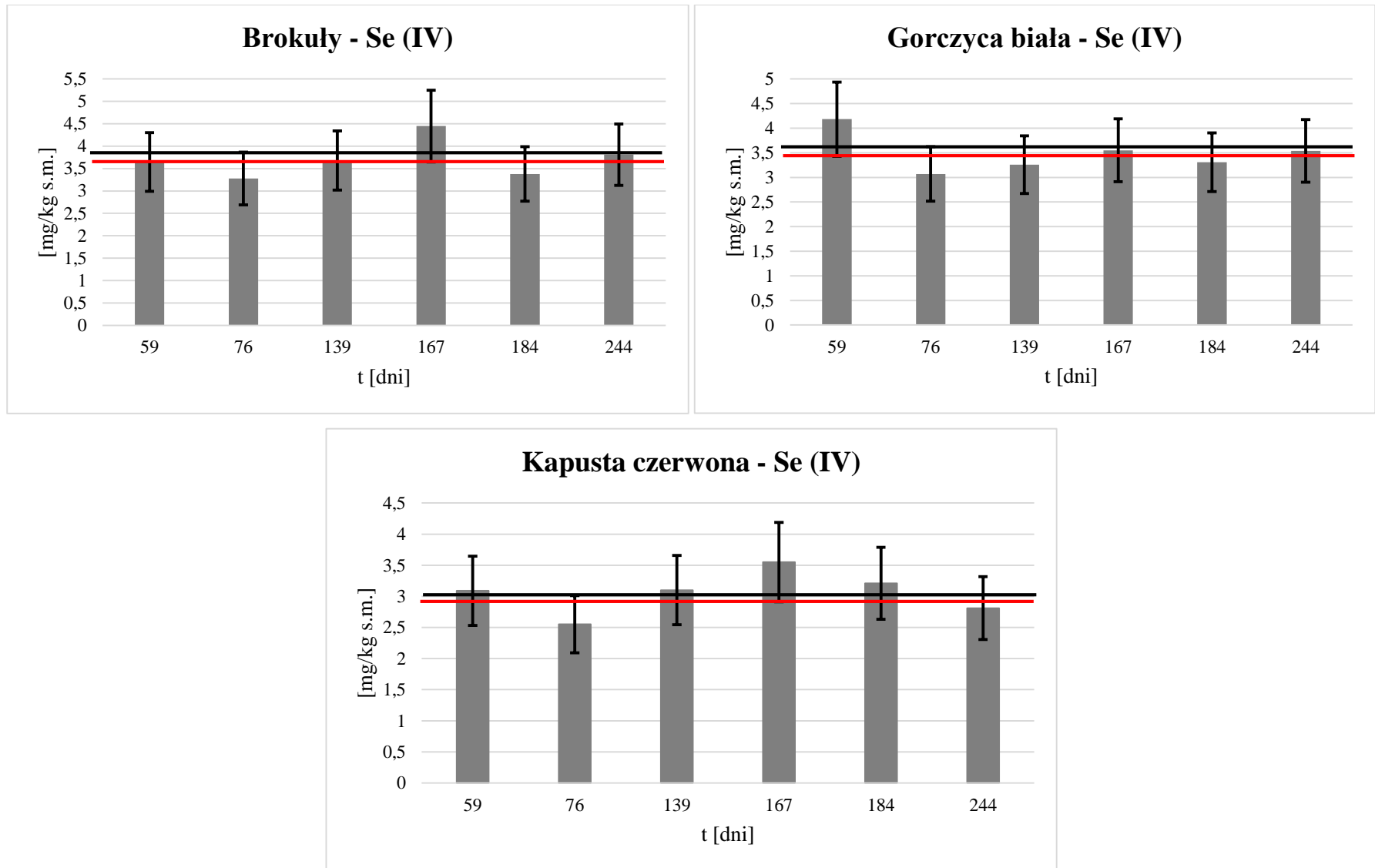
$t_1 = 59$ dni, $t_2 = 76$ dni, $t_3 = 139$ dni, $t_4 = 167$ dni, $t_5 = 184$ dni, $t_6 = 244$ dni



Rysunek 56. Wyniki badań trwałości SeMet w próbkach kielków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 57. Wyniki badań trwałości SeMetSeCys w próbkach kielków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3



Rysunek 58. Wyniki badań trwałości Se (IV) w próbkach kielków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3

Na podstawie wyników badań trwałości można stwierdzić, że zawartość SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w próbkach kiełków nie ulega zmianie po okresie przechowywania wynoszącym 244 dni. Jedynie w przypadku zawartości SeMet w próbce kiełków kapusty czerwonej wykazano brak trwałości, co jest podstawą do dyskwalifikacji danego rodzaju kiełków jako kandydata na materiał odniesienia.

Trwałość poszczególnych związków selenu w próbkach kiełków brokułów, gorczycy białej i kapusty czerwonej hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 sprawdzono również za pomocą analizy statystycznej uzyskanych wyników badań. Wyniki analizy statystycznej zostały przedstawione w tabeli 39.

Tabela 39. Analiza statystyczna wyników badań trwałości zawartości SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w próbkach kielków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃

KIELKI	SeMet			SeMetSeCys			Se (IV)		
	Brokuły	Gorzycza biała	Kapusta czerwona	Brokuły	Gorzycza biała	Kapusta czerwona	Brokuły	Gorzycza biała	Kapusta czerwona
liczba punktów pomiarowych n	6								
wartość średnia $y_{sr} \pm U(k=2)$ [mg/kg s.m.]	7,00 ± 0,54	13,91 ± 0,71	10,2 ± 1,7	75,0 ± 4,2	57,9 ± 1,6	47,9 ± 3,7	3,71 ± 0,34	3,49 ± 0,32	3,05 ± 0,28
współczynnik korelacji r	0,464	0,382	0,857	0,141	0,108	0,932	0,340	0,224	0,205
Współczynnik kierunkowy:									
wartość b	-0,004	0,005	0,026	0,010	-0,003	0,061	0,0020	-0,0013	0,0010
odchylenie standardowe s_b	0,004	0,006	0,008	0,036	0,014	0,012	0,0028	0,0027	0,0024
parametr t-Studenta t_{obl}	1,047	0,826	3,321	0,285	0,217	5,159	0,723	0,460	0,418
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776								
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli b nie różni się od wartości 0 w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA
Wyraz wolny:									
wartość a	7,6	13	6,4	73,5	58,4	39,1	3,41	3,67	2,91
odchylenie standardowe s_a	0,7	1	1,2	5,8	2,3	1,9	0,44	0,43	0,38
parametr t-Studenta t_{obl}	0,959	0,757	3,043	0,261	0,199	4,728	0,662	0,422	0,383
wartość krytyczna parametru t-Studenta t_{kr}	2,776								
$t_{obl} < t_{kr}$, czyli a nie różni się od wartości y_{sr} w sposób statystycznie istotny	PRAWDA	PRAWDA	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	FALSZ	PRAWDA	PRAWDA	PRAWDA

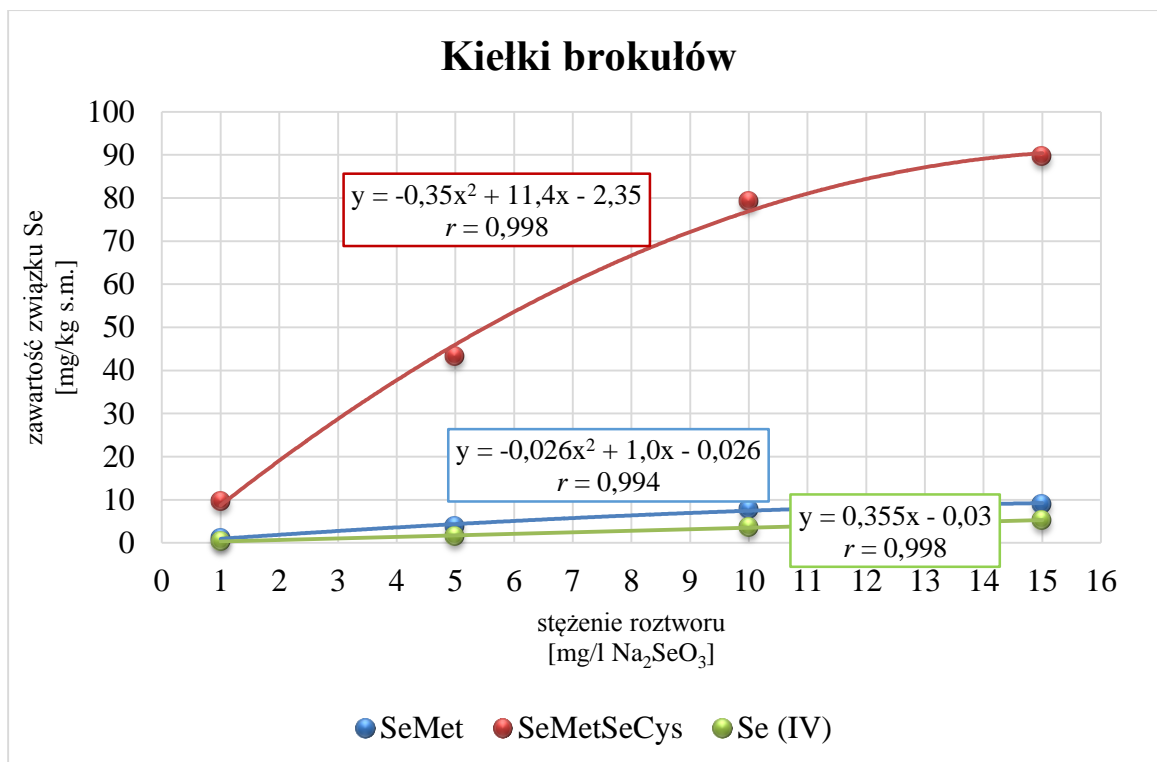
* $f=n-2$; $r_{kr}(f=4; \alpha=0,05) = 0,8114$

Na podstawie analizy statystycznej wyników badań trwałości można stwierdzić, że dla próbek kiełków brokułów oraz gorczycy białej wartość współczynnika kierunkowego b (zależności liniowej zawartości SeMet, SeMetSeCys lub Se (IV) w funkcji czasu) nie różni się w sposób statystycznie istotny od wartości 0, wartość wyrazu wolnego a nie różni się w sposób statystycznie istotny od średniej zawartości Se w poszczególnych próbkach y_{sr} , a wartość współczynnika korelacji r jest mniejsza od r_{kr} , co pozwala na stwierdzenie, że nie ma zależności pomiędzy zawartością odpowiednich związków selenu w próbkach kiełków roślin w stosunku do okresu ich przechowywania. A zatem, zawartość SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w próbkach kiełków brokułów oraz gorczycy białej nie ulega zmianie po długim czasie przechowywania.

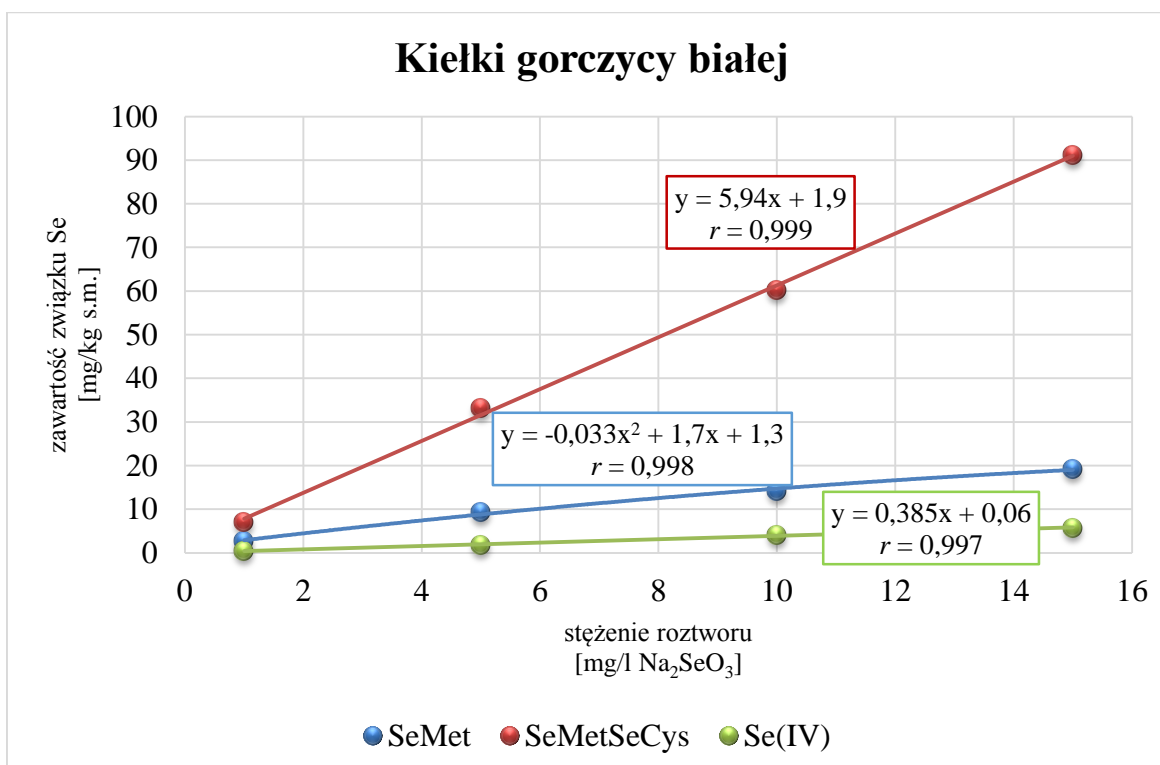
Analiza statystyczna uzyskanych wyników sprawdzenia trwałości SeMet oraz SeMetSeCys, wykazała statystyczną zależność dla współczynnika kierunkowego b , wyrazu wolnego a i współczynnika korelacji r dla próbki kiełków kapusty czerwonej hodowanej na pożywcze zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 . Podsumowując, można zauważyć zależność pomiędzy zawartością SeMet oraz SeMetSeCys w próbkach tych kiełków w stosunku do okresu ich przechowywania. Mimo, iż wyniki analizy statystycznej potwierdziły trwałość Se (IV) w próbkach kiełków kapusty czerwonej, materiał ten został ostatecznie odrzucony jako kandydat na certyfikowany materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu.

4.5.4 Zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kiełków roślin a stężeniem roztworu użytego podczas kiełkowania

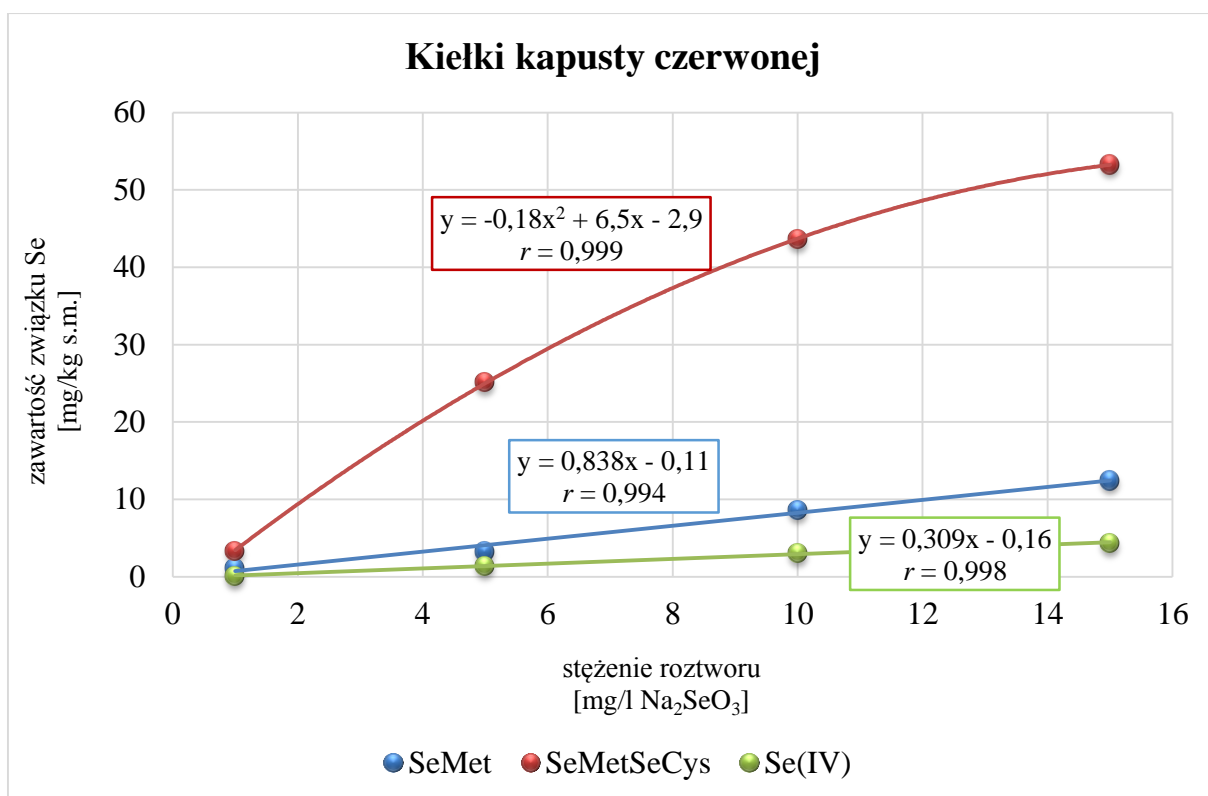
Przeprowadzono również badania mające na celu uzyskanie odpowiedzi na temat zależności pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kiełków roślin a stężeniem roztworu użytego podczas kiełkowania. W tym celu kiełki brokułów, gorczycy białej oraz kapusty czerwonej hodowano na czterech pożywkach zawierających 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l i 15 mg/l Na_2SeO_3 . Po zakończeniu kiełkowania, kiełki roślin zebrano, poddano liofilizacji, ekstrakcji enzymatycznej, a następnie przeprowadzono analizę specjacyjną selenu. Wyniki badań dla kiełków brokułów, gorczycy białej oraz kapusty czerwonej przedstawiono odpowiednio na rysunkach 59 - 61.



Rysunek 59. Zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kielków brokułów a stężeniem roztworu użytego podczas kielkowania



Rysunek 60. Zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kielków gorczycy białej a stężeniem roztworu użytego podczas kielkowania



Rysunek 61. Zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se (IV) w próbkach kielków kapusty czerwonej a stężeniem roztworu użytego podczas kiełkowania

Wyniki badań wykazały, że istnieje wielomianowa zależność zawartości SeMetSeCys w kielkach brokułów i kapusty czerwonej oraz zawartości SeMet w kielkach brokułów i gorczycy białej w stosunku do stężenia roztworu użytego podczas kiełkowania. Na tej podstawie można stwierdzić, że zwiększenie stężenia roztworu Na₂SeO₃, używanego podczas kiełkowania roślin, nie spowoduje znacznego wzrostu zawartości danego związku w wymienionych kielkach roślin. Prostoliniową zależność zawartości danego połączenia selenu w stosunku do stężenia roztworu użytego podczas kiełkowania wykazano dla zawartości SeMetSeCys w kielkach gorczycy białej oraz Se (IV) we wszystkich trzech rodzajach kielków. Prostoliniowa lub wielomianowa zależność została wybrana w oparciu o wartość współczynnika korelacji $r > 0,99$.

Badania przeprowadzono również uprawiając kielki na pożywce zawierającej 20 mg/l Na₂SeO₃. Jednak w przypadku wszystkich trzech rodzajów kielków zaobserwowano gnicie i pleśnienie, co było powodem przerwania badań. Można na tej podstawie wnioskować, że optymalnym stężeniem pożywki do produkcji materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu jest 10 - 15 mg/l Na₂SeO₃.

5 WNIOSKI I PODSUMOWANIE

W ramach rozprawy doktorskiej opisano wyniki określenia możliwości wytworzenia materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu w oparciu o wzbogacone w selen kiełki roślin.

Do badań wybrano wstępnie sześć rodzajów kiełków roślin: brokułów, gorczycy białej, kapusty czerwonej, lucerny, rzodkiewki oraz rzodkwi. Wybór ten podyktowany był przeglądem literatury, w której opisano zdolność tych roślin do kumulacji selenu oraz biotransformacji związków nieorganicznych w połączenia organiczne selenu.

Kiełki hodowano na pożywkach zawierających nieorganiczne sole selenu – selenian (VI) sodu lub selenian (IV) sodu.

Wykorzystując otrzymany materiał badawczy, w trakcie 4-letniej pracy zrealizowano następujące zadania badawcze:

- określono odporność nasion na warunki procesu kiełkowania z użyciem roztworów selenianu (IV lub VI) sodu (hamowanie wzrostu, gnicie, pleśń),
- oznaczono całkowitą zawartość selenu w próbkach kiełków roślin za pomocą techniki GF - AAS,
- dokonano oceny trwałości materiału badawczego – ocenę trwałości próbek kiełków roślin przeprowadzono na podstawie pomiarów całkowitej zawartości selenu za pomocą techniki GF – AAS, po przechowywaniu materiału przez okres od 1 – 12 miesięcy w temperaturze -20 °C,
- przeprowadzono wstępną selekcję kandydatów na materiał odniesienia – do dalszych etapów badań zakwalifikowano próbki kiełków roślin, w których zawartość selenu nie uległa zmianie w czasie,
- dokonano oceny wstępnej jednorodności wybranych kiełków roślin,
- przeprowadzono analizę specjacyjną (jakościową) wybranych kandydatów na materiał odniesienia – dokonano analizy jakościowej i na tej podstawie określono, która z form nieorganicznego selenu powoduje tworzenie się organicznych połączeń selenu w kiełkach,
- przeprowadzono po raz kolejny selekcję kandydatów na materiał odniesienia,
- dokonano oceny ilościowej wybranych związków selenu (SeMet, SeMetSeCys i Se (IV)) w próbkach kiełków hodowanych na pożywce zawierającej Na_2SeO_4 lub Na_2SeO_3 ,

- dokonano oceny trwałości zawartości SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w próbkach kiełków roślin,
- wyznaczono zależność między stężeniem roztworu selenianu użytym podczas kiełkowania a zawartością poszczególnych związków selenu w kiełkach roślin,
- wybrano optymalny rodzaj kiełków jako kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu.

Uzyskane wyniki badań, mogą stanowić podstawę do wyciągnięcia następujących wniosków:

- 1) kiełki brokułów, gorczycy białej, kapusty czerwonej, lucerny, rzodkiewki oraz rzodkwi wykazały odporność na warunki procesu kiełkowania, tj. podlewanie roztworem zawierającym 100 mg/l Na_2SeO_4 oraz roztworami zawierającymi 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l lub 15 mg/l Na_2SeO_3 ,
- 2) podlewanie kiełków roztworem zawierającym 100 mg/l Na_2SeO_4 oraz roztworami zawierającymi 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l lub 15 mg/l Na_2SeO_3 spowodowało znaczący wzrost zawartości selenu całkowitego we wszystkich próbkach; na podstawie wyników badań stwierdzono, że selenian (VI) sodu jest bardziej efektywny niż selenian (IV) sodu w odniesieniu do ilości selenu całkowitego zaakumulowanego przez kiełki roślin,
- 3) w oparciu o wyniki badań trwałości kiełków wzbogaconych w Se (VI) stwierdzono, że zawartość selenu w próbkach kiełków lucerny i rzodkwi nie ulega zmianie w czasie przechowywania trwającym 12 miesięcy; trwałość została również potwierdzona za pomocą analizy statystycznej; na tej podstawie kiełki lucerny i rzodkwi zakwalifikowano do kolejnych etapów badań,
- 4) w oparciu o wyniki badań trwałości uzyskane dla kiełków wzbogaconych w Se (IV) w roku badawczym 2013/2014 można stwierdzić, że:
 - dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, gorczycy białej, kapusty czerwonej i rzodkwi,
 - dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, gorczycy białej i kapusty czerwonej,
- 5) w oparciu o wyniki badań trwałości uzyskane dla kiełków wzbogaconych w Se (IV) w roku badawczym 2014/2015 można stwierdzić, że:

- dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, kapusty czerwonej i rzodkiewki,
- dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, gorczyca biała, kapusty czerwonej, lucerny, rzodkiewki i rzodkwi,
- dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, gorczyca biała, kapusty czerwonej i rzodkiewki,
- dla próbek kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3 trwałość zachowują kiełki brokułów, gorczyca biała i kapusty czerwonej.

Dodatkowo, wyniki analizy statystycznej wykazały, że nie ma zależności pomiędzy zawartością całkowitego Se w próbkach kiełków hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l, 5 mg/l i 10 mg/l Na_2SeO_3 w stosunku do okresu ich przechowywania. W przypadku próbek hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3 wykazano statystyczną zależność pomiędzy zawartością całkowitego Se w próbkach kiełków kapusty czerwonej w stosunku do okresu ich przechowywania i z tego względu kiełki te zdyskwalifikowano jako kandydata na materiał odniesienia. Dla pozostałych próbek hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na_2SeO_3 nie wykazano statystycznej zależności pomiędzy zawartością całkowitego selenu w próbkach kiełków w stosunku do okresu ich przechowywania.

- 6) do kolejnych etapów sprawdzenia możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu zakwalifikowano kiełki rzodkwi i lucerny hodowane na pożywce zawierającej 100 mg/l Na_2SeO_4 oraz kiełki brokułów, gorczyca biała i kapusty czerwonej hodowane na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 ,
- 7) na podstawie wyników badań jednorodności stwierdzono, że:
 - przygotowane próbki kiełków lucerny są jednorodne wewnątrz opakowania dla odważek powyżej 0,5 g, a niepewność względna związana z niejednorodnością partii materiału wynosi 3,9 %,
 - przygotowane próbki kiełków gorczyca biała są jednorodne wewnątrz opakowania dla odważek powyżej 0,5 g, a niepewność względna związana z niejednorodnością partii materiału wynosi 2,4 %,

- 8) wyniki analizy specjacyjnej dla próbek kiełków lucerny wykazały brak organicznych połączeń selenu; wykryto jedynie nieorganiczne połączenia selenu – Se (IV) oraz Se (VI), co było podstawą dyskwalifikacji danego rodzaju kiełków jako kandydata na materiał odniesienia na potrzeby analizy specjacyjnej wybranych związków selenu,
- 9) wyniki badań specjacyjnych w ekstraktach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 wykazały, że kiełki brokułów, gorczycy białej oraz kapusty czerwonej posiadają zdolność do biotransformacji związków nieorganicznych selenu w jego organiczne połączenia, szczególnie SeMetSeCys i SeMet; w ekstraktach oznaczono również Se (IV); z tego względu te trzy rodzaje kiełków zostały zakwalifikowane do dalszych etapów badań polegających na badaniu trwałości zawartości związków organicznych selenu w próbkach,
- 10) w oparciu o wyniki badań trwałości można stwierdzić, że zawartość SeMet, SeMetSeCys oraz Se (IV) w próbkach kiełków brokułów i gorczycy białej nie ulega zmianie po okresie przechowywania wynoszącym do 244 dni; trwałość potwierdzona została również za pomocą analizy statystycznej; w przypadku próbek kapusty czerwonej wykazano brak trwałości zawartości SeMet; co więcej, na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników badań trwałości wykazano statystyczną zależność pomiędzy zawartością SeMet oraz SeMetSeCys w próbkach kiełków kapusty czerwonej w stosunku do okresu ich przechowywania; w związku z tym kiełki kapusty czerwonej zdyskwalifikowano jako kandydata na materiał odniesienia,
- 11) na podstawie wyników opisujących zależność pomiędzy zawartością SeMet, SeMetSeCys i Se(IV) w próbkach kiełków a stężeniem roztworu użytego podczas kiełkowania, przyjęto, że optymalnym stężeniem w pożywce do produkcji materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu jest 10 - 15 mg/l Na_2SeO_3 .

W celu wyboru jednego rodzaju kiełków na kandydata na materiał odniesienia wszystkie wyniki badań zestawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Podsumowanie wyniki badań wykonanych w celu sprawdzenia możliwości wytworzenia materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu

		ODPORNOŚĆ	TRWAŁOŚĆ			SPECJACJA	TRWAŁOŚĆ		
			GF - AAS	REGRESJA	KRYTERIUM ± 10 %		SeMet	SeMetSeCys	Se (IV)
LUCERNA 100 mg/l Na ₂ SeO ₄		+	+	+	+	-			
BROKULY	1 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
	5 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
	10 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
	15 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
GORCZYCA BIAŁA	1 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	-	+	+	+			
	5 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
	10 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
	15 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
KAPUSTA CZERWONA	1 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
	5 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+			
	10 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	+	+	+	-	+	+
	15 mg/l Na ₂ SeO ₃	+	+	-	-	+			

Na podstawie przeprowadzonych badań nad sprawdzeniem możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia można stwierdzić, że kiełki brokułów i gorzycy białej hodowane na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 spełniają wymagania stawiane materiałom odniesienia odnośnie trwałości i jednorodności wewnątrzopakowaniowej. Z tego względu z powodzeniem mogą być poddane procesowi wytworzenia i certyfikacji materiału odniesienia na potrzeby specjacji selenu.

Produkcja takiego materiału odniesienia polegałaby na spełnieniu poniższych warunków:

1. określeniu reprezentatywności,
2. określeniu warunków procesu przygotowania kiełków – rodzaju nasion (producent), warunków kiełkowania (kiełkownica, czas, temperatura, objętość roztworu użyta do podlewania, częstotliwość podlewania) oraz stężenia roztworu selenianu (IV) sodu używanego do podlewania,
3. warunków zebrania próbek (przemycie wodą dejonizowaną w celu usunięcia zanieczyszczeń),
4. warunków przechowywania przed liofilizacją (temperatura, pojemniki),
5. określeniu warunków liofilizacji (temperatura, ciśnienie, czas),
6. określeniu warunków homogenizacji próbek,
7. określeniu warunków przechowywania próbek (temperatura, pojemniki),
8. wstępnemu badaniu jednorodności,
9. wstępnemu badaniu trwałości zawartości całkowitego selenu, SeMet i SeMetSeCys po okresie przechowywania trwającym 1 – 2 miesiące,
10. określeniu minimalnej ilości materiału, który może zostać pobrany do badań,
11. wyboru pojemników i odpowiedniej ilości masy, która ma zostać do nich rozdozowana,
12. rozdozowaniu materiału i etykietowaniu pojemników,
13. sterylizacji,
14. badaniu jednorodności międzyopakowaniowej,
15. badaniu jednorodności wewnątrzopakowaniowej,
16. badaniu trwałości materiału odniesienia,

17. określeniu niepewności, uwzględniającej:

- niepewność związaną z nietrwałością materiału,
- niepewność związaną z niejednorodnością materiału oraz
- niepewność związaną z nieprecyzyjnością wyznaczenia wartości odniesienia,

18. określeniu warunków przechowywania i transportu,

19. zorganizowaniu kampanii certyfikacyjnej,

20. ostatecznemu określeniu wartości odniesienia wraz z niepewnością,

21. certyfikacji materiału odniesienia.

LITERATURA

- [1] C. Reilly. Selenium in Food and Health. Chapman and Hall, London, 1996
- [2] O. A. Beath, H. F. Eppson, C. S. Gilbert. Selenium and other toxic minerals in soils and vegetation. Bull. 206, Wyo. Agric. Exp. Sta., Laramie, 1935
- [3] A. L. Moxon. Alkali Disease, or selenium poisoning. Bull. 331, South Dakota Agric. Exp. Sta., Brookings, 1937
- [4] A. A. Nelson, O. G. Fitzhugh, H. O. Calvery, *Cancer Res.* **3** (1943) 230
- [5] J. Pinsent, *Biochem. J.* **57** (1954) 10
- [6] K. Schwarz, C. M. Foltz, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957) 3292
- [7] E. L. Patterson, R. Milstrey, E. L. R. Stockstad, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **95** (1957) 617
- [8] R. O. Eggert, E.L. Patterson, W. J. Akers, E. L. R. Stockstad, *J. Anim. Sci.* **16** (1957) 1037
- [9] O. H. Muth, J. E. Oldfield, L. F. Remmert, J. R. Schubert, *Science* **128** (1958) 1090
- [10] J. M. Thompson, M. L. Scott, *J. Nutr.* **97** (1969) 335
- [11] J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Science* **179** (1969) 588
- [12] R. J. Shamberger, D. V. Frost, *Can. Med. Assoc. J.* **100** (1969) 682
- [13] R. E. Kuchel, R. A. Buckley, *Aust. J. Agric. Res.* **201** (1969) 1099
- [14] P. Koivistoinen, J. K. Huttunen, *Ann. Clin. Res.* **18** (1986) 13
- [15] G. Q. Yang, K. Ge, J. Chen, X. Chen, *World Rev. Nutr. Diet.* **55** (1988) 98
- [16] G. G. Duthie, K. W. J. Wahle, W. P. J. James, *Nutr. Res. Rev.* **2** (1989) 51
- [17] G. N. Schrauzer, *Chem. Biol. Interact.* **91** (1994) 199
- [18] L. C. Clark, G. F Combs, Jr., B. W. Turnbull, E. Slate, D. Alberto, D. Abele, R. Allison, J. Bradshaw, D. Chalker, J. Chow, D. Curtis, L. Davis, R. Deal, M. Dellasaga, R. Glover, G. Graham, E. Gross, J. Hendrix, J. Herlong, F. Knight, A. Krongrad, J. Desher, J. Moore, H. K. Park, J. Rice, A. Rudgers, B. Sanders, C. Smith, J. R. Taylor, J. Woodward, *JAMA* **276** (1996) 1957

- [19] G.F. Combs. Selenium in cancer prevention. W: Antioxidants and Disease Prevention (red. H. A. Garewal). Wyd. CRC, Nowy Jork, 1997, str. 97 – 113
- [20] O. A. Levander, *J. Nutr.* **130** (2000) 4859
- [21] S. M. Lippman, E. A. Klein, P. J. Goodman, S. M. Lucia, I. M. Thompson, L. G. Ford, H. L. Parnes, L. M. Minasian, M. J. Gaziano, J. A. Hartline, K. J. Parsons, J. D. Bearden, D. E. Crawford, G. E. Goodman, J. Claudio, E. Winqvist, E. D. Cook, D. D. Karp, P. Walther, M. M. Lieber, A. R. Kristal, A. K. Darke, K. B. Arnold, P. A. Ganz, R. M. Santella, D. Albanes, P. R. Taylor, J. L. Probstfield, T. J. Jagpal, J. J. Crowley, F. L. Meyskens, L. H. Baker, C. A. Coltman, *JAMA* **301**(1) (2009) 39
- [22] B. K. Dunn, E. S. Richmond, L. M. Minasian, A. M. Ryan, L. G. Ford, *Nutr. Cancer* **62**(7) (2010) 896
- [23] E. A. Klein, I. M. Thompson, C. M. Tangen, J. J. Crowley, S. M. Lucia, P. J. Goodman, L. M. Minasian, L. G. Ford, H. L. Parnes, M. J. Gaziano, D. D. Karp, M. M. Lieber, P. J. Walther, L. Klotz, K. J. Parsons, J. L. Chin, A. K. Darke, S. M. Lippman, G. E. Goodman, F. L. Meyskens, L. H. Baker, *JAMA* **306**(14) (2011) 1549
- [24] A. R. Kristal, A. K. Darke, J. S. Morris, C. M. Tangen, P. J. Goodman, I. M. Thompson, F. L. Meyskens, G. E. Goodman, L. M. Minasian, H. L. Parnes, S. M. Lippman, E. A. Klein, *J. Natl. Cancer Inst.* **106**(3) (2014) djt456
- [25] Z. Mester, S. Willie, L. Yang, R. Sturgeon, J. A. Caruso, M. L. Fernandez, P. Fodor, R. J. Goldschmidt, H. Goenaga-Infante, R. Łobiński, P. Maxwell, S. McSheehy, A. Połatajko, B. B. M. Sadi, A. Sanz-Medel, C. Scriver, J. Szpunar, W. Wolf, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 168
- [26] K. Shrivastava, D.K. Patel, *Food Chem.* **124** (2011) 1673
- [27] A. M. Fan, K. W. Kizer, *West. J. Med.* **153** (1990) 160
- [28] A. Vonderheide, K. Wróbel, S. S. Kannamkumarath, C. B'Hymer, M. Montez-Bayón, C. Ponce do León, J. A. Caruso, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 5722
- [29] N. M. Najafi, S. Seidi, R. Alizadeh, H. Tavakoli, *Spectrochim. Acta B* **65** (2010) 334
- [30] V. Gergely, M. Montes-Bayón, P. Fodor, A. Sanz-Medel, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 4524
- [31] K. El-Bayoumy, *Mutat. Res.* **475** (2001) 123
- [32] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz, *Polski Merkuriusz Lekarski* **27**(159) (2009) 249

- [33] R. Abdulah, K. Miyazaki, M. Nakazawa, H. Koyama, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19** (2005) 141
- [34] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa, 1999
- [35] K. Pyrzyńska. Występowanie selenu w środowisku. W: Selen: pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza (praca zbiorowa pod redakcją M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrzyńska, I. Wysocka, B. A. Zachara). Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa, 2007, str. 25
- [36] D. L. Watts, *J. Orthomol. Med.* **9** (1994) 111
- [37] M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique, *Sci. Total Environ.* **400** (2008) 115
- [38] P. V. Minorsky, *Plant Physiol.* **133** (2003) 14
- [39] B. S. Weeks, M. S. Hanna, D. Cooperstein, *Med. Sci. Monit.* **18**(8) (2012) 127
- [40] K. M. Brown, J. R. Arhur, *Public Health Nutr.* **4** (2001) 593
- [41] J. Lu, A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 723
- [42] G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigó, V. N. Gladyshev, *Science* **300**(5624) (2003) 1439
- [43] M. P. Rayman, *Lancet* **365** (2000) 233
- [44] R. Saxena, G. Jaiswal, *Kuwait Med. J.* **39** (2007) 10
- [45] E. S. J. Arner, *Biochim. Biophys. Acta* **1790** (2009) 495
- [46] D. L. Hatfield, M. Yoo, B. A. Carlson, V. N. Gladyshev, *Biochim. Biophys. Acta* **1790** (2009) 1541
- [47] P. D. Whanger, *Biochim. Biophys. Acta* **1790**(11) (2009) 1448
- [48] L. V. Papp, J. Lu, A. Holmgren, K. K. Khanna, *Antioxid. Redox Signal.* **9**(7) (2007) 775
- [49] Y. Mehdi, J-L. Hornick, L. Istasse, I. Dufrasne, *Molecules* **18** (2013) 3292
- [50] I. Lopez Heras, M. Palomo, Y. Madrid, *Anal. Bioanal. Chem.* **400** (2011) 1717
- [51] E. Dumont, F. Vanheacke, R. Cornelis, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 1304
- [52] T. Ferri, G. Favero, M. Frasconi, *Microchem. J.* **85** (2007) 222
- [53] M. P. Rayman, H. Goenaga Infante, M. Sargent, *Br. J. Nutr.* **100** (2008) 238

- [54] D. H. Holben, A. M. Smith, *J. Am. Diet. Assoc.* **99** (1999) 836
- [55] J. W. Finley, *Nutr. Rev.* **64** (2005) 146
- [56] H. Tapiero, D. M. Townsend, K. D. Tew, *Biomed. Pharmacother.* **57** (2003) 134
- [57] C. Ip, *J. Nutr.* **128** (1998) 1845
- [58] M. P. Rayman, *Br. J. Nutr.* **92** (2004) 557
- [59] Y. Kobayahi, Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, K. T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 15932
- [60] L. Bendahl, B. Gammelgaard, *J. Anal. At. Spectrom.* **19** (2004) 950
- [61] C. Thiry, A. Ruttens, L. De Temmerman, Y-J. Schneider, L. Pussemier, *Food Chem.* **130** (2012) 767
- [62] N. F. Kolachi, T. G. Kazi, S. K. Wadhwa, H. I. Afridi, J. A. Baig, S. Khan, F. Shah, *Sci. Total Environ.* **409** (2011) 3092
- [63] K. Sieja, M. Talerczyk, *Gynecol. Oncol.* **93** (2004) 320
- [64] A. Wojtasik, M. Jarosz, K. Stoś. Składniki mineralne. W: Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja (praca zbiorowa pod redakcją M. Jarosz, R. Gajowiak, K. Molska), Wydawca: Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa, 2012, str. 140, ISBN 978-83-86060-83-2
- [65] K. M. Al-Ahmary, *Arab. J. Chem.* **2** (2009) 95
- [66] J. Gao, Y. Liu, Y. Huang, Z. Lin, G. S. Bañuelos, M. Hon-Wah Lam, X. Yin, *Food Chem.* **126** (2011) 1088
- [67] T. Klapac, M. L. Mandic, J. Grgic, L. G. Primorac, A. Perl, V. Krstanovic, *Food Chem.* **85** (2004) 445
- [68] L. Hussein, J. Bruggemana, *Food Chem.* **65** (1999) 527
- [69] E. C. Pappa, A. C. Pappas, P. F. Surai, *Sci. Total Environ.* **372** (2006) 100
- [70] J. P. Diaz-Alarcon, M. Navarro-Alarcon, H. de la Serrana Lopez, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 2423
- [71] G. Gissel-Nielsen, Effects of selenium supplementation of field crops. W: Environmental chemistry of selenium (Praca zbiorowa pod redakcją W. T. Frankenberger i R. A. Engberg). Wydawnictwo Dekker, Nowy Jork, 1998, str. 99-112

- [72] Y. Choi, J. Kim, H-S. Lee, C. Kim, I. Kyeong Hwang, H. Kyung Park, C-H. Ohe, *J. Food Compos. Anal.* **22** (2009) 117
- [73] U. M. El-Ghawi, A. A. Al.-Sadeq, M. M. Bejey, M. B. Alamin, *Biol. Trace Elem. Res.* **16** (2005) 61
- [74] N. A. Golubkina, M. V. Shagova, V. B. Spirichev, *Vopr. Pitan.* **1** (1992) 35
- [75] H. M. Meltzer, G. Norheim, E. B. Loken, H. Holm, *Br. J. Nutr.* **67** (1992) 287
- [76] W. Wasowicz, J. Gromadzińska, K. Rydzyński, J. Tomczak, *Toxicol. Lett.* **137** (2003) 95
- [77] J. Kadrabova, C. Madaric, E. Ginter, *Food Chem.* **58** (1997) 29
- [78] M. P. Longnecker, P. R. Taylor, O. A. Levander, S. M. Howe, C. Veillon, P. A. McAdam, *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (1991) 1288
- [79] M. N. I. Barclay, A. MacPherson, J. Dixon, *J. Food Compos. Anal.* **8** (1995) 307
- [80] C. C. Johnson, X. Ge, K. A. Green, X. Liu, *Appl. Geochem.* **15** (2000) 385
- [81] J. Tan, W. Zhu, W. Wang, R. Li, S. Hou, D. Wang, L. Yang, *Sci. Total Environ.* **284** (2002) 227
- [82] K. Zou, G. Liu, T. Wu, L. Du, *Osteoarthr. Cartilage* **17** (2009) 144
- [83] Y. Jirong, P. Huiyun, Y. Zhongzhe, D. Birong, L. Weimin, Y. Ming, S. Yi, *Osteoarthr. Cartilage* **20**(7) (2012) 605
- [84] F. Yang, *Sci. China Ser. C: Life Sci.* **49** (2006) 513
- [85] F. S. Siddiqi, W. Shaheen, A. Aziz, *Int. J. Cardiol.* **158**(2) (2012) e29
- [86] M. Hinsenkamp, *Int. Orthop.* **25** (2001) 133
- [87] P. Sudre, F. Mathieu, *Int. Orthop.* **25** (2001) 175
- [88] P. Zagrodzki, P. Laszczyk, *Postępy Hig. Med. Dośw.* **60** (2006) 624
- [89] B. Floriańczyk, *Nowiny Lekarskie* **68** (1999) 244
- [90] M. J. Fryer, *Med. Hypotheses* **58** (2002) 127
- [91] S. H. Bugel, B. Sandstorm, E. H. Larsen, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **14** (2001) 198
- [92] J. E. Oldfield, *J. Nutr.* **117** (1987) 2002,
- [93] T. Rannem, K. Ladefo, E. Hylander, *Am. J. Clin. Nutr.* **56** (1992) 933

- [94] D. Ścibior-Bentkowska, H. Czczot, *Postępy Hig. Med. Dośw.* **63** (2009) 58
- [95] http://www.poradnikzdrowie.pl/sprawdz-sie/sygnaly-ciala/stres-oksydacyjny-przyczyny-i-skutki-stresu-oksydacyjnego_37946.html (stan na 31.01.2016 r.)
- [96] A. P. Fernandes, V. Gandin, *Biochim. Biophys. Acta* **1850**(8) (2015) 1642
- [97] D. Bohrer, E. Becker, P.C. Nascimento, M. Dessuy, L.M. de Carvalho, *Food Chem.* **104** (2007) 868
- [98] <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence> (stan na 31.01.2016 r.)
- [99] <http://www.aicr.org/learn-more-about-cancer/infographics-cancer-preventability.html> (stan na 31.01.2016 r.)
- [100] H. Pfeifer, M. Conrad, D. Roethlein, A. Kyriakopoulos, M. Brielmeier, G. W. Bornkamm, D. Behne, *FASEB J.* **15** (2001) 1236
- [101] R. J. Jariwalla, B. Gangapurkar, D. Nakamura, *Br. J. Nutr.* **101** (2009) 182
- [102] L. Björkhem-Bergman, K. Jönsson, L.C. Eriksson, J.M. Olsson, S. Lehmann, C. Paul, M. Björnstedt, *Biochem. Pharmacol.* **63** (2002) 1875
- [103] M. Selenius, A. P. Fernandes, O. Brodin, M. Björnstedt, A. K. Rundlöf, *Biochem. Pharmacol.* **75** (2008) 2092
- [104] N. Xiang, R. Zhao, W. Zhong, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63** (2009) 351
- [105] L. Fu, Q. Liu, L. Shen, Y. Wang, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **25** (2011) 130
- [106] M. P. Rigobello, V. Gandin, A. Folda, A. K. Rundlöf, A. P. Fernandes, A. Bindoli, C. Marzano, M. Björnstedt, *Free Radic. Biol. Med.* **47** (2009) 710
- [107] Z. Li, J. Meng, T. J. Xu, X. Y. Qin, X. D. Zhou, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17** (2013) 2166
- [108] V. Kralova, S. Benesova, M. Cervinka, E. Rudolf, *Toxicol. In Vitro* **26** (2012) 258
- [109] E. Olm, K. Jönsson-Videsäter, I. Ribera-Cortada, A. P. Fernandes, L. C. Eriksson, S. Lehmann, A. K. Rundlöf, C. Paul, M. Björnstedt, *Cancer Lett.* **282** (2009) 116
- [110] A. Philchenkov, M. Zavelevich, N. Khranovskaya, P. Surai, *Exp. Oncol.* **29** (2007) 257
- [111] H. A. Celik, H. H. Aydin, R. Deveci, E. Terzioglu, S. Karacali, G. Saydam, U. Akarca, Y. Batur, *Biol. Trace Elem. Res.* **99** (2004) 27
- [112] L. Bandura, J. Drukala, A. Wolnicka-Glubisz, M. Björnstedt, W. Korohoda, *Biochem. Cell Biol.* **83** (2005) 196

- [113] G. Nilsson, X. Sun, C. Nyström, A. K. Rundlöf, A. P. Fernandes, M. Björnstedt, K. Dobra, *Free Radic. Biol. Med.* **41** (2006) 874
- [114] A. Baines, M. Taylor-Parker, A. C. Goulet, C. Renaud, E. W. Gerner, M. A. Nelson, *Cancer Biol. Ther.* **1** (2002) 370
- [115] Y. Yang, F. Huang, Y. Ren, L. Xing, Y. Wu, Z. Li, H. Pan, C. Xu, *Oncol. Res.* **18** (2009) 1
- [116] M. Suzuki, M. Endo, F. Shinohara, S. Echigo, H. Rikiishi, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66** (2010) 475
- [117] R. L. Poerschke, P. J. Moos, *Biochem. Pharmacol.* **81** (2011) 211
- [118] J. T. Pinto, R. Sinha, K. Papp, N. D. Facompre, D. Desai, K. El-Bayoumy, *Int. J. Cancer* **120** (2007) 1410
- [119] C. Redman, J. A. Scott, A. T. Baines, J. L. Basye, L. C. Clark, C. Calley, D. Roe, C. M. Payne, M. A. Nelson, *Cancer Lett.* **125** (1998) 103
- [120] L. Schroterova, V. Kralova, A. Voracova, P. Haskova, E. Rudolf, M. Cervinka, *Toxicol. In Vitro* **23** (2009) 1406
- [121] R. Sinha, D. Medina, *Carcinogenesis* **18** (1997) 1541
- [122] R. L. Poerschke, M. R. Franklin, P. J. Moos, *Toxicol. In Vitro* **22** (2008) 1761
- [123] S. O. Lee, J. Yeon Chun, N. Nadiminty, D. L. Trump, C. Ip, Y. Dong, A. C. Gao, *Prostate* **66** (2006) 1070
- [124] G. X. Li, H. Hu, C. Jiang, T. Schuster, J. Lu, *Int. J. Cancer* **120** (2007) 2034
- [125] C. Jiang, Z. Wang, H. Ganther, J. Lu, *Cancer Res.* **61** (2001) 3062
- [126] C. Jiang, Z. Wang, H. Ganther, J. Lu, *Mol. Cancer Ther.* **1** (2002) 1059
- [127] M. Wallenberg, S. Misra, A. M. Wasik, C. Marzano, M. Bjornstedt, V. Gandin, A. P. Fernandes, *J. Cell Mol. Med.* **18**(4) (2014) 671
- [128] C. Fan, J. Chen, Y. Wang, Y. S. Wong, Y. Zhang, W. Zheng, W. Cao, T. Chen, *Free Radic. Biol. Med.* **65** (2013) 305
- [129] T. Chen, Y. S. Wong, *CMLS* **65** (2008) 2763
- [130] R. Manjusha, K. Dash, D. Karunasagar, *Food Chem.* **105** (2007) 260
- [131] Y. Bao, P. Jemth, B. Mannervik, G. Williamson, *FEBS Lett.* **410** (1997) 210
- [132] J. Bleys, A. Navas-Acien, E. Guallar, *Arch. Intern. Med.* **168** (2008) 404

- [133] M. Vinceti, G. Dennert, C. M. Crespi, M. Zwahlen, M. Brinkman, M. P. Zeegers, M. Horneber, R. D'Amico, C. Del Giovane, *Cochrane Database Syst. Rev.* **3** (2014) CD005195
- [134] B. Santhosh Kumar, K. I. Priyadarsini, *Biomed. Prev. Nutr.* **4** (2014) 333
- [135] M. Shargorodsky, O. Debby, Z. Matas, R. Zimlichman, *Nutr. Metab.* **7** (2010) 55
- [136] J. Virtamo, E. Valkeila, G. Alfthan, S. Punsar, J. K. Huttunen, M. J. Karvonen, *Am. J. Epidemiol.* **122** (1985) 276
- [137] O. Oster, W. Prellwitz, W. Kasper, T. Meinertz, *Clin. Chim. Acta* **128** (1983) 125
- [138] M. M. Ricetti, G. C. Guidi, C. Tecchio, G. Bellisola, A. Rigo, G. Perona, *Int. J. Clin. Lab. Res.* **29**(2) (1999) 80
- [139] J. Nève, *J. Cardiovasc. Risk.* **3**(1) (1996) 42
- [140] J. P. Thomas, P. G. Geiger, A.W. Girotti, *J. Lipid Res.* **34** (1993) 473
- [141] H. Imai, Y. Nakagawa, *Free Radic. Biol. Med.* **15**(342) (2003) 145
- [142] S. Stranges, J. R. Marshall, M. Trevisan, R. Natarajan, R. P. Donahue, G. F. Combs, E. Farinaro, L. C. Clark, M. E. Reid, *Am. J. Epidemiol.* **163**(8) (2006) 694
- [143] W. C. Hawkes, L. J. Laslett, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**(2) (2009) H256
- [144] S. Stranges, J. R. Marshall, R. Natarajan, R. P. Donahue, M. Trevisan, G. F. Combs, F. P. Cappuccio, A. Ceriello, M. E. Reid, *Ann. Intern. Med.* **147**(4) (2007) 217
- [145] C. Cominetti, M. C. de Bortoli, A. B. Garrido Jr., S. M. F. Cozzolino, *Nutr. Res.* **32**(6) (2012) 403
- [146] G. Bermano, F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur, J. E. Hesketh, *Biochem. J.* **311** (1995) 425
- [147] C. S. Broome, F. McArdle, J. A. M. Kyle, F. Andrews, N. M. Lowe, C. A. Hart, J. R. Arthur, M. J. Jackson, *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (2004) 154
- [148] L. Kiremidjian-Schumacher, M. Roy, H. Wishe, M. W. Cohen, G. Stotzy, *Biol. Trace Element Res.* **41** (1994) 103
- [149] J. M. Marchante-Gayón, J. E. Sanchez-Uria, A. Sanz-Medel, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **10** (1996) 229
- [150] B. A. Zachara, A. Salak, D. Koterska, J. Manitius, W. Wasowicz, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **17** (2004) 291

- [151] M. D. Saint-Georges, D. J. Bonnefont, B. A. Bourely, M. C. Jaudon, P. Cereze, P. Chaumeil, C. Gard, C. L. D'Auzac, *Kidney Int. Suppl.* **27** (1989) 274
- [152] W. C. Orr, R. S. Sohal, *Science* **263** (1994) 1128
- [153] A. Kyriakopoulos, D. Behne, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **145** (2002) 1
- [154] J. R. Arthur, F. Nicol, G. J. Beckett, *Biol. Trace Element Res.* **33** (1991) 321
- [155] E. Mantero-Atienza, M. Gavancho-Stomayor, G. Shor-Posner, M. A. Fletcher, H. E. Sauberlich, R. S. Beach, M. K. Baum, *Nutr. Res.* **11** (1991) 1237
- [156] C. B. Stephensen, G. S. Marquis, S. D. Douglas, L. A. Kruzich, C. M. Wilson, *Am. J. Clin. Nutr.* **85** (2007) 173
- [157] M. K. Baum, G. Shor-Posner, S. Lai, G. Zhang, H. Lai, M. A. Fletcher, H. Sauberlich, J. B. Page, *J. Acquir. Immune Def. Syndrom Hum. Retroviro.* **15** (1997) 370
- [158] J. Constans, S. Sire, C. Sergeant, M. Simonoff, J. M. Ragnaud, *Rev. Med. Intern.* **18** (1997) 642
- [159] J. A. Butler, P. D. Whanger, M. J. Tripp, *Am. J. Clin. Nutr.* **36** (1982) 15
- [160] D. C. Wilson, R. Tubman, N. Bell, H. L. Halliday, D. McMaster, *Early Hum. Develop.* **26** (1991) 223
- [161] S. Z. Ghaemi, S. Forouhari, M. H. Dabbaghmanesh, M. Sayadi, M. Bakhshayeshkaram, F. Vaziri F, Z. Tavana, *Biol. Trace Elem. Res.* **152**(2) (2013) 174
- [162] J. W. Barrington, P. Lindsay, D. James, S. Smith, A. Roberts, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **103** (1996) 130
- [163] M. Kantola, R. Purkunen, P. Kroger, A. Tooming, J. Juravskaja, M. Pasanen, K. Seppanen, S. Saarikoski, T. Vartiainen, *Environ. Res.* **96** (2004) 51
- [164] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/> (stan na 31.01.2016 r.)
- [165] E. K. Sheiner, E. Sheiner, R. D. Hammel, G. Potashnik, R. Carel, *Ind. Health* **41** (2003) 55
- [166] D. Bernhard, C. Moser, A. Backovic, G. Wick, *Exp. Gerontol.* **42** (2007) 160
- [167] A. A. Nikolaev, D. L. Lutskii, L. V. Lozhkina, V. A. Bochanovskii, L. A. Goncharova, *Urologia* **4** (1999) 29
- [168] S. Sinclair, *Altern. Med. Rev.* **5** (2000) 28
- [169] M. Meseguer, J. A. Martínez-Conejero, L. Muriel, A. Pellicer, J. Remohí, N. Garrido, *Drug Metab. Lett.* **1**(2) (2007) 121

- [170] M. Meseguer, N. Garrido, C. Simón, A. Pellicer, J. Remohí, *J. Androl.* **25**(5) (2004) 773
- [171] S. Shalini, M. P. Bansal, *Biofactors* **23**(3) (2005) 151
- [172] R. Scott, A. MacPherson, R. W. Yates, B. Hussain, J. Dixon, *Br. J. Urol.* **2**(1) (1998) 76
- [173] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.pdf> (stan na 31.01.2016 r.)
- [174] M. Mezes, K. Balogh, *Acta Biol. Szeged.* **53** (2009) 15
- [175] N. Terry, A. M. Zayed, M.P. de Souza, A. S. Tarun, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51** (2000) 401
- [176] M. Germ, V. Stibilj, *Acta Agric. Slov.* **89** (2007) 65
- [177] C. Kahakachchi, H. T. Boakye, P.C. Uden, J. F. Tyson, *J. Chromatogr. A* **1054** (2004) 303
- [178] T. B. Kinraide, *Plant Physiol.* **117** (2003) 64
- [179] D. R. Ellis, D. E. Salt, *Curr. Opin. Plant Biol.* **6** (2003) 273
- [180] P. Smrkolj, V. Stibilj, *Anal. Chim. Acta* **512** (2004) 11
- [181] V. Kos, M. Veber, V. Hudnik, *Fresenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 225
- [182] <http://californiaagriculture.ucanr.org/fileaccess.cfm?article=62185&p=BROOQC&filetip=pdf> (stan na 31.01.2016 r.)
- [183] S. J. Hamilton, *Sci. Total Environ.* **326** (2004) 1
- [184] S. Eapen, S.F. D'Souza, *Biotechnol. Adv.* **23** (2005) 65
- [185] H. F. Mayland, L. P. Gough, K. C. Stewart, Selenium mobility in soils and its absorption, translocation and metabolism in plants, Proceedings, Symposium on Selenium, Western U.S.; z: <http://eprints.nwisrl.ars.usda.gov/909/1/744.pdf> (stan na 31.01.2016 r.)
- [186] A. Zayed, M. Lytle, N. Terry, *Planta* **206** (1998) 284
- [187] A. Lauchli, *Botanica Acta* **106** (1993) 455
- [188] A. Lescure, D. Gautheret, P. Carbon, A. Krol, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 38147
- [189] I. J. Pickering, C. Wright, B. Bubner, D. Ellis, M. W. Persans, E. Y. Yu, G. N. George, R. C. Prince, D.E. Salt, *Plant Physiol.* **131** (2003) 1460
- [190] M. L. Galeas, E. M. Klamper, L. E. Bennet, J. L. Freeman, B. C. Kondratieff, C. F. Quinn, E. A. H. Pilon-Smits, *New Phytol.* **177** (2008) 715

- [191] T. Mizutani, K. Tanabe, K. Watanabe, M. Goto, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* **42** (1996) 360
- [192] J. Yang, *Food Sci. Technol.* **42** (2009) 1573
- [193] S. S. Kannamkumarath, K. Wróbel, K. Wróbel, A. Vonderheide, J. A. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 454
- [194] M. B. Stockler-Pinto, D. Mafra, N. E. Farage, G. T. Boaventura, S. M. F. Cozzolino, *Nutrition* **26** (2010) 1065
- [195] <http://www.healthbeckon.com/selenium-rich-foods/> (stan na 31.01.2016 r.)
- [196] <http://forum.facmedicine.com/threads/top-10-foods-high-in-selenium.22653/> (stan na 31.01.2016 r.)
- [197] R. J. Reeder, M. A. A. Schoonen, A. Lanzirotti, *Rev. Mineral. Geochem.* **64** (2006) 59
- [198] A. Fernandez-Martinez, L. Charlet, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **8** (2009) 81
- [199] Z. Pedrero, Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta* **634** (2009) 135
- [200] J. Meija, J. M. Bryson, A. P. Vonderheide, M. Montes-Bayón, J. A. Caruso, *J. Agric. Food Chem.* **51**(17) (2003) 5116
- [201] J. K. Kirby, G. H. Lyons, M. P. Karkkainen, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 1772
- [202] F. Fordyce, Selenium deficiency and toxicity in the environment. W: Essentials of medical geology – Impacts of the natural environment on public health (Praca zbiorowa pod redakcją E. O Selinus, B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, P. Smedley). Wydawnictwo Elsevier - Academic Press, London, 2005, str. 373-415
- [203] T. E. Fox, E. G. Van den Heuvel, C. A. Atherton, J. R. Dainty, D. J. Lewis, N. J. Langford, *Nutrition* **58** (2004) 343
- [204] S. A. Rider, S. J. Davies, A. N. Jha, A. A. Fisher, J. Knight, J. W. Sweetman, *Aquaculture* **295** (2009) 282
- [205] J. Neve, *J. Trace Elements Med. Biol.* **9** (1995) 65
- [206] Y. Ogra, K. Ishiwata, Y. Ishiwata, K. T. Suzuki, *J. Chromatog. A* **1093** (2005) 118
- [207] K. Pyrżyńska, *Food Chem.* **114** (2009) 1183
- [208] C. Bitterli, G. S. Banuelos, R. Schulin, *J. Geochem. Explor.* **107** (2010) 206
- [209] J. R. Arthur, *Proc. Nutr. Soc.* **62** (2003) 393

- [210] M. Bodnar, M. Szczygłowska, P. Konieczka, J. Namieśnik, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56** (2016) 36
- [211] Ocena kontroli i jakości wyników pomiarów analitycznych (praca zbiorowa pod redakcją: P. Konieczka, J. Namieśnik). Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007
- [212] M. Diaz-Somoano, M. A. Lopez-Anton, M. R. Martinez-Tarazona, *Fuel* **83** (2004) 231
- [213] V. Ducros, F. Laporte, N. Belin, A. David, A. Favier, *J. Inorg. Biochem.* **81** (2000) 105
- [214] R. Inam, G. Somer, *Food Chem.* **66** (1990) 381
- [215] B. Izgi, S. Gucer, R. Jaćimović, *Food Chem.* **99** (2006) 630
- [216] I. Lavilla, J. M. Gonzalez-Costas, C. Bendicho, *Anal. Chim. Acta* **591** (2007) 225
- [217] Y-C. Li, S-J. Jiang, S-F. Chen, *Anal. Chim. Acta* **372** (1998) 365
- [218] A. Tyburska, K. Jankowski, A. Rodzik, *Spectrochim. Acta B* **66** (2011) 517
- [219] N. Zhang, N. Fu, Z. Fang, Y. Feng, L. Ke, *Food Chem.* **124** (2011) 1185
- [220] C. Khakachchi, H. Totoe Boakye, P. C. Uden, J. F. Tyson, *J. Chromatog. A* **1054** (2004) 303
- [221] M. Ochsenkuhn-Petropoulou, B. Michalke, D. Kavouras, P. Schramel, *Anal. Chim. Acta* **478** (2003) 219
- [222] A. Bidari, E. Z. Jahromi, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, *Microchem. J.* **87** (2007) 6
- [223] D. J. Hart, S. J. Fairweather-Tait, M. R. Broadley, S. J. Dickinson, I. Foot, P. Knott, S. P. McGrath, H. Mowat, K. Norman, P. R. Scott, J. L. Stround, M. Tucker, P. J. White, F. J. Zhao, R. Hurst, *Food Chem.* **126** (2011) 1771
- [224] C. N. Prins, L. J. Hantzis, C. F. Quinn, E. A. H. Pilon-Smits, *J. Exp. Bot.* **62**(15) (2011) 5633
- [225] C. B'Hymer, J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A* **1114**(1) (2006) 1
- [226] A. L. Ryser, D. G. Strawn, M. A. Marcus, J. L. Johnson-Maynard, M. E. Gunter, G. Moller, *Geochem. Trans.* **6**(1) (2005) 1
- [227] C. R. Christensen, J. N. Cutler, D. A. Christensen, *Can. J. Anim. Sci.* **84** (2004) 171
- [228] J. L. Burguera, P. Carrero, M. Burguera, C. Rondon, M. R. Brunetto, M. Gallignani, *Spectrochim. Acta B* **51** (1996) 1837

- [229] M. Gallignani, M. Valero, M. R. Brunetto, J. L. Burguera, M. Burguera, Y. Petit de Pena, *Talanta* **52** (2000) 1015
- [230] L. Orero Iserte, A. F. Roig-Navarro, F. Hernandez, *Anal. Chim. Acta* **527** (2004) 97
- [231] M. Angels Quijano, P. Moreno, A. M. Gutierrez, M. Concepcion Perez-Conde, C. Camara, *J. Mass Spectr.* **53** (2000) 878
- [232] V. Gergely, K. M. Kubachka, S. Mounicou, P. Fedor, J.A. Caruso, *J. Chromatog. A* **1101** (2006) 94
- [233] Y. Hongwei, C. Chunying, G. Yuxi, L. Bai, C. Zhifang, *Chin. J. Anal. Chem.* **34**(6) (2006) 749
- [234] J. Tolu, I. Le Hecho, M. Bueno, Y. Thiry, M. Potin-Gautier, *Anal. Chim. Acta* **684** (2011) 126
- [235] J. Zheng, M. Ohata, N. Furuta, W. Kosmus, *J. Chromatogr. A* **874** (2000) 55
- [236] B. Sun, M. Macka, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A* **1039**(1-2) (2004) 201
- [237] L. Bendahl, B. Gammelgaard, O. Jøns, O. Farver, S. Honorè Hansen, *J. Anal. At. Spectrom.* **16** (2001) 38
- [238] Y. Zhao, J. P. Zheng, M. W. Yang, G. D. Yang, Y. N. Wu, F. F. Fu, *Talanta* **84**(3) (2011) 983
- [239] P.O. Amoako, P. C. Uden, J. F. Tyson, *Anal. Chim. Acta* **652** (2009) 315
- [240] J. Far, H. Preud'homme, R. Łobiński, *Anal. Chim. Acta* **657** (2010) 175
- [241] *International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms* JCGM 200:2012 (JCGM 200:2008 with minor corrections) International Vocabulary of Metrology - Basic and general concepts and associated terms, (VIM), Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 200, 2008. <http://www.bipm.org> (stan na 31.01.2016 r.)
- [242] M. Bodnar, K. Dubalska, M. Rutkowska, P. Konieczka, J. Namieśnik, *Analityka: nauka i praktyka* **3** (2013) 33
- [243] ISO/IEC 17025:2005 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”
- [244] E. Bulska. Materiały odniesienia w pomiarach chemicznych W: Metrologia Chemiczna. Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa, 2012

- [245] J. Pauwels, A. Lamberty, H. Schimmel, *Accred. Qual. Assur.* **3** (1998) 51
- [246] T. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. van der Veen, H. Schimmel, A. Lamberty, *Accred. Qual. Assur.* **6** (2001) 20
- [247] A. M. H. van der Veen, T. Linsinger, J. Pauwels, *Accred. Qual. Assur.* **6** (2001) 26
- [248] A. M. H. van der Veen, T. Linsinger, A. Lamberty, J. Pauwels, *Accred. Qual. Assur.* **6** (2001) 257
- [249] A. M. H. van der Veen, T. P. J. Linsinger, H. Schimmel, A. Lamberty, J. Pauwels, *Accred. Qual. Assur.* **6** (2001) 290
- [250] Przewodnik ISO nr 35 (1989) – Certyfikacja materiałów odniesienia. Zasady ogólne i analiza statystyczna. PKN, Warszawa, 1997
- [251] Z. Szopa, R. Dybczyński, *Analityka* **2** (2000) 4
- [252] Przewodnik ISO nr 31 – Treść certyfikatów materiałów odniesienia. PKN, Warszawa, 1997
- [253] Przewodnik ISO nr 33 – Stosowanie certyfikowanych materiałów odniesienia. PKN, Warszawa, 1997
- [254] W. Ambroziak, A. Diowks, M. Bryszewska, Metody suplementacji diety w selen. W: Selen: pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza (praca zbiorowa pod redakcją M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrzyńska, I. Wysocka, B. A. Zachara). Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa, 2007, str. 206
- [255] <http://www.comar.bam.de/en/> (stan na 31.01.2016 r.)
- [256] http://www.erm-crm.org/ERM_products/search/certificates/BC210.pdf
(stan na 31.01.2016 r.)
- [257] http://www.lgcstandards.com/medias/sys_master/pdfs/pdfs/h8b/h80/8833861058590/LGC7330-ST-WB-CERT-1775171-1-1-1.pdf
(stan na 31.01.2016 r.)
- [258] J. W. Finley, C. Davis, *BioFactors* **14** (2001) 191

- [259] G. Kune, L. Watson, *Nutr. Cancer* **56** (2006) 11
- [260] J. W. Finley, C. Davis, Y. Feng, *J. Nutr.* **130** (2000) 2384
- [261] E. Unni, D. Koul, W. K. Young, R. Sinha, *Breast Cancer Res.* **7** (2005) 699
- [262] L. C. Clark, B. Dalkin, A. Krongrad, G. F. Combs, W. Turnbull, *Br. J. Urol.* **81** (2004) 730
- [263] H. Zhuo, A. H. Smith, C. Steinmaus, *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* **13** (2004) 771
- [264] L. Li, Y. Xie, W. M. El-Sayed, J. G. Szakacz, M. R. Franklin, J. C. Roberts, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **19** (2006) 396
- [265] R. Sinha, J. Yee, M. Boylan, J. E. Spalholz, *Biol. Trace Elem. Res.* **30** (1991) 145
- [266] B. Wachowicz, K. Zbikowska, P. Nowak, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **6** (2001) 375
- [267] C. Ip, M. Birringer, E. Block, M. Kotrebai, J. Tyson, P. Uden, D.J. Lisk, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 2062
- [268] S. Vadhanavikit, C. Ip, H. Ganther, *Xenobiotica* **23** (1993) 731
- [269] A. V. Mahn, H. M. Toledo, M. Ruz, *J. Nutr. Biochem.* **20** (2009) 791
- [270] S. Cuello, S. Ramos, R. Mateos, M. A. Martin, Y. Madrid, C. Camara, *Anal. Bioanal. Chem.* **389** (2007) 2167
- [271] C. S. Hoefig, K. Renko, J. Korle, M. Birringer, L. Schomburg, *J. Nutr. Biochem.* **22** (2011) 945
- [272] P. D. Whanger, *Br. J. Nutr.* **91** (2004) 11
- [273] J. W. Finley, A. Sigrid-Keck, R. J. Robbins, K. J. Hintze, *J. Nutr.* **135** (2005) 1236
- [274] T. C. Seo, J.E. Spallholz, H. K. Yun, S. W. Kim, *J. Med. Food* **11**(4) (2008) 687
- [275] K. Wróbel, K. Wróbel, S. S. Kannamkumarath, J. A. Caruso, I. A. Wysocka, E. Bulska, J. Świątek, M. Wierzbicka, *Food Chem.* **86** (2004) 617

- [276] M. Montes-Bayon, T. D. Grant, J. Meija, J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 1015
- [277] I. Arnault, J. Auger, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 23
- [278] M. T. Roberge, A. J. Borgerding, J. W. Finley, *J. Agric. Food Chem.* **51**(15) (2003) 4191
- [279] S. Sugihara, M. Kondo, Y. Chichara, M. Yuji, H. Hattori, M. Yoshida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**(1) (2004) 193
- [280] Z. Pedrero, D. Elvira, C. Camara, Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta.* **596** (2007) 251
- [281] F. W. Avila, V. Faquin, Y. Yang, S. J. Ramos, L. R. G. Guilherme, T. W. Thannhauser, L. Li, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 6216
- [282] M. Michalska-Kacymirow, E. Kurek, A. Smolis, M. Wierzbiecka, E. Bulska, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 3717
- [283] R. Abdulah, A. Faried, K. Kobayashi, C. Yamazaki, E. W. Suradji, K. Ito, K. Suzuki, M. Murakami, H. Kuwano, H. Koyama, *BMC Cancer* **9** (2009) 414

STRESZCZENIE

Selen jest niezbędnym składnikiem mineralnym dla zwierząt i ludzi, którego spożywanie oferuje korzyści zdrowotne, włączając w to ochronę przeciwnowotworową. Suplementacja za pomocą wzbogaconych w Se warzyw takich jak czosnek, czy brokuły, wykazuje większy efekt chemoochronny w porównaniu do Se (IV) i SeMet. Warzywa te kumulują nieorganiczne formy selenu i zamieniają je na formy organiczne, głównie SeMetSeCys. Jednak proces wytwarzania wzbogaconych w selen warzyw wymaga wstępnego etapu przygotowania gleby pod ich uprawę, czyli wzbogacenia nawozów za pomocą nieorganicznych soli selenu, co może stanowić ryzyko jej zanieczyszczenia. Dobrym rozwiązaniem dla dostarczania SeMetSeCys do organizmu człowieka wydaje się kiełkowanie roślin w kontrolowanym środowisku na pożywce bogatej w selen. Ponieważ bardzo ważne jest zachowanie bezpieczeństwa podczas stosowania wzbogaconej w selen żywności w profilaktyce przeciwnowotworowej, istnieje potrzeba posiadania certyfikowanego materiału odniesienia, który mógłby przyczynić się do rozwoju metod badawczych skierowanych na oznaczanie poszczególnych związków selenu. Z tego względu podjęto próbę sprawdzenia możliwości wytworzenia materiału odniesienia na potrzeby specjacji SeMetSeCys w oparciu o wzbogacone w selen kiełki roślin.

Do badań wybrano 6 rodzajów kiełków roślin (głównie z rodziny *Brassica*). Do procesu kiełkowania nasion użyto roztworów nieorganicznych soli selenu: Na_2SeO_4 i Na_2SeO_3 . Całkowita zawartość selenu w próbkach kiełków została oznaczona z wykorzystaniem techniki GF - AAS, a analiza specjacyjna została przeprowadzona z wykorzystaniem techniki HPLC – ICP – MS.

Wykazano, że kiełki roślin uprawiane na obydwu rodzajach pożywek kumulują znaczne ilości selenu. Jednak tylko kiełki uprawiane na pożywce zawierającej Na_2SeO_3 mają zdolność do przekształcania nieorganicznego selenu w SeMetSeCys oraz SeMet.

Jako potencjalnych kandydatów na certyfikowany materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu zakwalifikowano kiełki brokułów oraz gorczycy białej, uprawiane na pożywce zawierającej 10 mg/l Na_2SeO_3 .

ABSTRACT

Selenium is an essential element in animals and humans; its consumption provides health benefits, including protection against cancer. Diet supplementation with selenium-rich vegetables such as, garlic and broccoli has better chemoprotective effect than Se (IV) and SeMet. Se-enriched vegetables accumulate inorganic forms of selenium and convert them into organic forms, mainly SeMetSeCys. The production of selenium-enriched vegetables requires a preliminary stage in soil preparation, i.e. the enrichment of fertilizers with inorganic salts of selenium, which may subsequently pose a risk of soil contamination. It seems that the sprouting of seeds under controlled conditions in a Se-enriched medium would be a good solution for delivering SeMetSeCys to the human organism. The certified reference material is necessary in order to follow the safety rules during the application of selenium-enriched foods in cancer prevention. Such reference material will contribute to the development of research methods for determining specific species of selenium. Therefore, we undertook an effort to produce the appropriate reference material for Se speciation analysis by using Se-enriched sprouts.

Six types of sprouts, mainly from the family *Brassicaceae*, were selected for the study. The solutions of inorganic salts of selenium, i.e. Na_2SeO_4 and Na_2SeO_3 were used to germinate the seeds. The total Se content in the sprout samples was determined by using GF - AAS, while the speciation analysis was conducted by means of HPLC – ICP – MS.

It was demonstrated that sprouts grown in both media accumulate significant amounts of selenium. However, only the plants cultivated in the medium containing Na_2SeO_3 are capable of converting inorganic selenium into SeMetSeCys and SeMet.

The sprouts of broccoli and white mustard grown in the medium containing 10 mg/l Na_2SeO_3 were selected as potential candidates for certified reference materials for the purpose of selenium speciation.

SPIS DOROBKU NAUKOWEGO

PUBLIKACJE W CZASOPISMACH WYRÓŻNIONYCH PRZEZ JOURNAL CITATION REPORTS

1. **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. The properties, functions and use of selenium compounds in living organism. *J. Environ. Sci. Heal. C* **30** (2012) 225;

IF = 5,16; liczba cytowań: 11

2. **M. Bodnar**, M. Szczygłowska, P. Konieczka, J. Namieśnik. Methods of selenium supplementation. Bioavailability and determination of selenium compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56** (2016) 36;

IF = 5,176; liczba cytowań: 0

3. M. Szczygłowska, **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. The use of vegetables in the biomonitoring of cadmium and lead pollution in the environment. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **44** (2014) 2

IF = 2,692; liczba cytowań: 0

4. **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik, *Validation of a sampling procedure. TRAC* **51** (2013) 117

IF = 6,612; liczba cytowań: 3

5. A. Piekarska, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, **M. Bodnar**, P. Konieczka, B. Kusznierevicz, F. S. Hanschen, M. Schreiner, J. Cyprys, M. Groszewska, J. Namieśnik, A. Bartoszek. The influence of selenium addition during germination of *Brassica* seeds on health-promoting potential of sprouts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65(6)** (2014) 692

IF = 1,202; liczba cytowań: 4

Sumaryczny IF: 20,842

H indeks: 3

Sumaryczna liczba cytowań: 20

PUBLIKACJE W INNYCH CZASOPISMACH RECENZOWANYCH KRAJOWYCH I ZAGRANICZNYCH

1. K. Dubalska, **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. Zdolność roślin do bioakumulacji. Wykorzystanie w fitoremediacji i fitogórnictwie. *Analityka: nauka i praktyka* **4** (2012) 51
2. M. Szczygłowska, **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. Wykorzystanie warzyw w biomonitoringu zanieczyszczenia środowiska przez kadm i ołów. *Analityka: nauka i praktyka*. **2** (2014) 50
3. **M. Bodnar**, K. Dubalska, M. Rutkowska, P. Konieczka, J. Namieśnik, Certyfikowane materiały odniesienia – narzędzie w QA/QC, *Analityka: nauka i praktyka* **3** (2013) 33
4. **M. Bodnar**, K. Dubalska, M. Rutkowska, P. Konieczka, J. Namieśnik. Certified Reference Materials – as a necessary tool for the quality control and quality assurance of measurements. *Analityka: Euroanalysis Special Edition* (2013) 14
5. **M. Bodnar**, K. Dubalska, M. Rutkowska, P. Konieczka, J. Namieśnik. Сертифицированные эталонные материалы - неотъемлемый инструмент при контроле и обеспечения качества измерений. *Analityka: nauka i praktyka* **1** (2014) 22
6. A. Piekarska, B. Kusznierevich, D. Kołodziejski, T. Pilipczuk, M. Szczygłowska, **M. Bodnar**, R. Bączek-Kwinta, P. Konieczka, J. Namieśnik, A. Bartoszek. The innovative exploitation of Brassica vegetables in the health quality food production chain. W: Proceedings of the VIth International Symposium on Brassicas and XVIIIth Crucifer Genetics Workshop. *Acta Hort.* **1005** (2013) 71

PUBLIKACJE W RECENZOWANYCH WYDAWNICTWACH ZBIOROWYCH

1. A. Bartoszek-Pączkowska, A. Piekarska, B. Kusznierevich, D. Kołodziejski, T. Pilipczuk, M. Szczygłowska, **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. The innovative exploitation of Brassica vegetables in the production of quality food for health. From lab bench to field and fork.// W : Pharmaceutical and food technologies and the system of education : legal aspects : cbornik haycznych stateli/, 2013, 3-7
2. **M. Bodnar**, P. Konieczka, J. Namieśnik. Sampling Strategies: Statistics of Sampling. W: Analytical Separation Science (praca zbiorowa pod redakcją: J. L. Anderson,

KOMUNIKATY I POSTERY

1. B. Kusznierevicz, P. Konieczka, A. Bartoszek, R. Bączek-Kwinta, A. Piekarska, M. Szczygłowska, G. Bajger, N. Kujawska, A. Milewczyk, **M. Bodnar**, K. Dubalska, J. Namieśnik, „The influence of soil contamination by heavy metals on bioactive compounds concentrations in white cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata f alba*)”, 16th European Conference on Analytical Chemistry: Challenges in Modern Analytical Chemistry, Belgrade, Serbia, 11-15.09.2011, nr EN47 , str.384 – poster
2. A. Piekarska, D. Kołodziejcki, T. Pilipczuk, **M. Bodnar**, P. Konieczka, B. Kusznierevicz, A. Bartoszek-Pączkowska. Zdolność roślin z rodziny kapustowatych (Brassicaceae) do akumulacji selenu. Badania modelowe z użyciem nasion kiełkowanych na pożywkach z selenem. W: Fitoremediacja: skuteczny zabieg szostotechniczny, Gdańsk, 5-7 czerwiec 2013 – poster

POZOSTAŁE

1. Udział w badaniach i pracach nad przygotowaniem pieczywa z dodatkiem ziarna soi kiełkowanego na pożywce z dodatkiem SeO₂ jako żywność funkcjonalna uzupełniająca niedobory selenu w diecie - przygotowanie do wdrożenia.
2. Uczestnictwo w 7-myh Targach Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji TECHNICON-INNOWACJE 2011, *Promowanie pieczywa z dodatkiem ziaren soi kiełkowanej na pożywce z dodatkiem SeO₂ jako żywność funkcjonalną uzupełniającą niedobory selenu w diecie*, Udział autorski – wystawca; uzyskanie srebrnego medalu INNOWACJE 2011

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

1. Stypendium za osiągnięcia naukowe w ramach programu MISTRZ przyznanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (2011/2012).
2. Stypendium za osiągnięcia naukowe finansowane w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” POKL.04.01.01-00-368/09, przyznane w latach 2012/2013 i 2013/2014.

3. Stypendium doktoranckie za osiągnięcia naukowe z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych, przyznane w latach 2012/2013, 2013/2014 i 2014/2015.
4. Stypendium naukowe Rektora Politechniki Gdańskiej dla najlepszych doktorantów z Własnego Funduszu Stypendialnego w latach 2013/2014 i 2014/2015.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2013/2014

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]			
Brokuły	22,3 ± 1,4	21,7 ± 1,6	20,2 ± 2,0	20,9 ± 1,4
Gorczyca biała	11,56 ± 0,66	12,6 ± 1,0	12,1 ± 1,1	11,47 ± 0,70
Kapusta czerwona	13,4 ± 1,4	15,01 ± 0,95	14,7 ± 1,0	13,4 ± 1,1
Rzodkiewka	10,13 ± 0,65	11,83 ± 0,88	11,02 ± 0,72	9,81 ± 0,56
Rzodkiew	12,83 ± 0,83	11,82 ± 0,74	11,94 ± 0,72	11,96 ± 0,79
Lucerna	12,8 ± 1,0	14,0 ± 1,2	15,03 ± 0,87	11,36 ± 0,80

t₁ = 28 dni, t₂ = 189 dni, t₃ = 314 dni

Załącznik 2. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2013/2014

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]			
Brokuły	133 ± 14	134 ± 18	123,7 ± 9,6	<i>brak próbki</i>
Gorczyca biała	78,0 ± 4,9	78,9 ± 8,1	79,5 ± 5,1	78,6 ± 4,6
Kapusta czerwona	82,2 ± 5,7	81 ± 13	72,9 ± 9,8	83,3 ± 5,9
Rzodkiewka	103,8 ± 7,3	113,6 ± 8,3	92,2 ± 6,4	99,2 ± 6,2
Rzodkiew	97,3 ± 6,6	107 ± 11	96,5 ± 6,5	108,8 ± 6,8
Lucerna	109 ± 14	113,9 ± 9,1	96,3 ± 5,5	101,3 ± 7,5

t₁ = 28 dni, t₂ = 189 dni, t₃ = 314 dni

Załącznik 3. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 1 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2014/2015

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)	x(t ₄) ± U(k=2)	x(t ₅) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]					
Brokuły	10,90 ± 0,74	11,52 ± 0,65	10,2 ± 1,2	10,83 ± 0,82	10,85 ± 0,78	11,31 ± 0,66
Gorzycza biała	9,36 ± 0,55	10,22 ± 0,71	10,2 ± 1,4	11,09 ± 0,81	9,19 ± 0,79	11,38 ± 0,64
Kapusta czerwona	6,28 ± 0,36	6,17 ± 0,41	6,00 ± 0,39	5,71 ± 0,40	5,90 ± 0,39	6,33 ± 0,49
Rzodkiewka	2,44 ± 0,14	2,41 ± 0,17	2,42 ± 0,23	2,40 ± 0,14	2,46 ± 0,17	2,39 ± 0,14
Rzodkiew	2,50 ± 0,21	2,14 ± 0,12	2,37 ± 0,13	2,26 ± 0,16	2,16 ± 0,15	2,51 ± 0,20
Lucerna	9,1 ± 1,0	9,30 ± 0,73	8,54 ± 0,74	9,03 ± 0,63	8,38 ± 0,71	8,02 ± 0,45

t₁ = 62 dni, t₂ = 104 dni, t₃ = 174 dni, t₄ = 223 dni, t₅ = 271 dni

Załącznik 4. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 5 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2014/2015

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)	x(t ₄) ± U(k=2)	x(t ₅) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]					
Brokuły	54,0 ± 3,1	50,6 ± 3,2	51,0 ± 2,9	52,6 ± 5,6	53,5 ± 4,8	51,3 ± 3,8
Gorzycza biała	67,2 ± 4,0	67,8 ± 7,0	62,7 ± 3,7	67,2 ± 3,8	59,2 ± 6,8	62,4 ± 3,5
Kapusta czerwona	40,3 ± 2,7	40,0 ± 3,1	38,8 ± 2,2	42,5 ± 4,4	38,5 ± 2,3	36,2 ± 2,2
Rzodkiewka	18,1 ± 1,0	20,1 ± 1,4	20,0 ± 1,1	20,2 ± 1,3	19,7 ± 1,3	17,9 ± 1,0
Rzodkiew	18,5 ± 1,0	18,6 ± 1,1	18,6 ± 1,1	18,5 ± 1,2	17,6 ± 1,3	18,6 ± 1,2
Lucerna	29,7 ± 1,7	26,9 ± 2,8	28,1 ± 2,3	27,7 ± 1,7	27,2 ± 3,0	26,9 ± 1,6

t₁ = 62 dni, t₂ = 104 dni, t₃ = 174 dni, t₄ = 223 dni, t₅ = 271 dni

Załącznik 5. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 10 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2014/2015

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)	x(t ₄) ± U(k=2)	x(t ₅) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]					
Brokuły	80,6 ± 5,1	82,2 ± 9,5	84,5 ± 5,6	78,4 ± 4,7	75,8 ± 7,2	85,8 ± 5,7
Gorzycza biała	98,1 ± 7,6	97,5 ± 6,8	87,3 ± 4,9	89 ± 11	82,9 ± 8,1	92,5 ± 5,9
Kapusta czerwona	72,0 ± 7,4	73,9 ± 8,2	74,4 ± 5,6	63,8 ± 5,7	70,7 ± 4,1	71,4 ± 4,6
Rzodkiewka	47,8 ± 2,8	44,2 ± 3,0	43,2 ± 3,5	42,6 ± 2,6	42,2 ± 2,4	49,1 ± 4,6
Rzodkiew	44,6 ± 3,2	43,3 ± 2,9	40,3 ± 2,4	44,9 ± 2,7	39,0 ± 2,3	40,4 ± 2,5
Lucerna	59,9 ± 3,9	61,6 ± 4,0	57,3 ± 3,5	53,1 ± 3,1	66,1 ± 4,1	67,2 ± 4,8

t₁ = 62 dni, t₂ = 104 dni, t₃ = 174 dni, t₄ = 223 dni, t₅ = 271 dni

Załącznik 6. Zawartość selenu w próbkach kiełków roślin hodowanych na pożywce zawierającej 15 mg/l Na₂SeO₃ - rok badawczy 2014/2015

PRÓBKA	x(t ₀) ± U(k=2)	x(t ₁) ± U(k=2)	x(t ₂) ± U(k=2)	x(t ₃) ± U(k=2)	x(t ₄) ± U(k=2)	x(t ₅) ± U(k=2)
	[mg/kg s.m.]					
Brokuły	119,7 ± 7,8	119,1 ± 6,9	123,8 ± 9,4	124,5 ± 7,6	119 ± 18	116 ± 11
Gorzycza biała	151 ± 11	157,5 ± 8,9	146 ± 13	149 ± 13	155,0 ± 8,8	141,4 ± 8,9
Kapusta czerwona	95,2 ± 8,4	101,0 ± 6,0	102 ± 11	109 ± 11	112 ± 14	110,8 ± 8,5
Rzodkiewka	83,2 ± 5,2	91,1 ± 5,5	73,6 ± 4,2	76,9 ± 5,0	81,8 ± 4,7	79,1 ± 4,7
Rzodkiew	67,4 ± 5,2	67,0 ± 5,3	61,2 ± 3,5	60,5 ± 7,2	56,6 ± 3,4	62,5 ± 6,5
Lucerna	46,3 ± 2,9	59,1 ± 5,2	49,4 ± 4,4	49,7 ± 3,0	49,5 ± 3,2	59,2 ± 3,5

t₁ = 62 dni, t₂ = 104 dni, t₃ = 174 dni, t₄ = 223 dni, t₅ = 271 dni