

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Ανάπτυξη και Εφαρμογή Αναλυτικών Τεχνικών
Φασματομετρίας Μάζας για τον Ποσοτικό
Προσδιορισμό Σεληνίου και των Μορφών του στα
Τρόφιμα

ΤΣΙΑΜΟΥΡΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF MASS
SPECTROMETRY ANALYTICAL TECHNIQUES FOR THE
QUANTITATIVE DETERMINATION OF SELENIUM AND
SELENIUM SPECIES IN FOOD PRODUCTS.**

Tsiamourou Ioanna

Στην οικογένεια μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Σπύρο Περγαντή για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει και τις γνώσεις τις οποίες μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μου έρευνας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Π.Τρικαλίτη και τον κ.Ε.Στεφάνου που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη εξεταστική μου επιτροπή.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία με βοήθησαν, ο καθένας με το δικό του τρόπο σε δυσκολίες τις οποίες αντιμετώπιζα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους για την συμπαράστασή τους και ιδιαίτερα την οικογένεια μου (Δημήτρης, Πέτρος, Σταυρούλα, Όλγα, Τάσος) για την αμέριστη κατανόησή και υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σελήνιο αποτελεί ένα θρεπτικό ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό, το οποίο λαμβάνεται μέσω της τροφής. Συγκεκριμένα οι σημαντικότερες πηγές σεληνίου είναι τα ψάρια, το κρέας, το συκώτι, οι ξηροί καρποί και τα δημητριακά. Έτσι στη παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μέθοδος ολικού προσδιορισμού του σεληνίου με τη χρήση της Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος. Τα αποτελέσματα από τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου στις διάφορες τροφές, έχουν συνδιασθεί με τη Βάση Δεδομένων DAFNE, η οποία στοχεύει στη διαχρονική παρακολούθηση και σύγκριση των διατροφικών συνηθειών των Ευρωπαϊκών πληθυσμών και συγκεκριμένα των Ελλήνων και μας δίνει πληροφορίες για την μέση κατανάλωση τροφών ενός Έλληνα σε γραμμάρια, σε καθημερινή βάση, ώστε να υπολογιστεί η ποσοτική πρόσληψη Se από τον μέσο Έλληνα.

Με σκοπό την ειδοταυτοποίηση των ενώσεων σεληνίου αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης (υδατική εκχύλιση, εκχύλιση με buffer, ενζυματική χώνευση), σε δύο είδη ψαριών, ώστε να εξαχθεί η κατάλληλη μέθοδος που θα δώσει τη μεγαλύτερη ανάκτηση του σεληνίου από τα δείγματα (% απόδοση της εκχύλισης). Η μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης έχει βρεθεί από την μέθοδο ενζυματικής χώνευσης με τη προσθήκη του ενζύμου Pronase E.

Επίσης πραγματοποιήθηκε μέθοδος *in vitro* γαστρεντερικής χώνευσης, για την εύρεση της % βιοδιαθεσιμότητας του σεληνίου, δηλαδή της ποσότητας του σεληνίου η οποία απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό, όταν καταναλώνονται τα δύο είδη ψαριών. Η *in vitro* γαστρεντερική χώνευση περιλαμβάνει μία προσομοιωμένη γαστρεντερική χώνευση με την πεψίνη στο γαστρικό στάδιο και ένα μίγμα παγκρεατίνης, χολικών αλάτων και α-αμυλάσης κατά το εντερικό στάδιο.

Τα εκχυλίσματα της ενζυματικής χώνευσης και γαστρεντερικής χώνευσης έχουν αναλυθεί με τη χρήση HPLC-ICP-MS και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Τα αποτελέσματα της ειδοταυτοποίησης απέδειξαν ότι η κυρίαρχη μορφή του σεληνίου στα δύο είδη ψαριών είναι η σελινομεθειονίνη.

ABSTRACT

Selenium constitutes a nutritious trace element for the human organism, which is taken up via food. Concretely the more important sources of selenium are fish, meat, liver, nuts and cereals. Thus in the present study was developed a method for the total determination of selenium with Mass Spectrometry Inductively Coupled Plasma. The results from the total determination of selenium in the various foods, are combined with DAFNE (Data Food Networking), which aims in the diachronic follow-up and comparison of alimentary habits of European populations and concretely the Greeks and gives us information on the medium consumption of a Greek, in grams per day, so that we can calculate the quantitative intake of Se for a Greek.

Aiming at the speciation of selenium species were developed various methods of extraction (hydrolysis extraction, extraction with buffer, enzymatic extraction), in two kinds of fish, for the suitable method that will give the better desirable results and concrete, the higher recovery of the extraction. The higher recovery of the extraction has been found when we used the enzymatic digestion with the addition of enzyme Pronase E.

Also an *in vitro* gastrointestinal method was accomplished for the determination of % bioavailability of selenium, the quantity of selenium which is absorbed by the human organism, when he consumed the two kinds of fish. *In vitro* gastrointestinal digestion includes a simulated gastrointestinal digestion with the pepsin in gastric stage (juice) and a mixture of pancreatin, bile salts and α -amylase at the intestinal stage (juice).

The extracts of the enzymatic and gastrointestinal digestion have been analyzed with HPLC-ICP-MS (reversed phase chromatography). The results of speciation analysis proved that the dominant form of selenium in the two kinds of fish is selenomethionine (SeMet).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή.....	11
1.1Σελήνιο.....	11
1.1.1 Χημεία Σεληνίου.....	12
1.1.2 Σελήνιο και περιβάλλον.....	13
1.1.2.1 Σελήνιο στο έδαφος.....	13
1.1.2.2 Σελήνιο στο νερό.....	14
1.1.2.3 Σελήνιο στον αέρα.....	14
1.1.3 Κύκλος του σεληνίου.....	15
1.1.3.1 Κύκλος ειδών σεληνίου μέσω τροφικής αλυσίδας.....	15
1.1.4 Βιοχημεία του σεληνίου.....	16
1.1.4.1 Οργανικές ενώσεις σεληνίου.....	16
1.1.5 Φυτά.....	18
1.1.5.1 Πρόσληψη σεληνίου.....	18
1.1.5.2 Το μεταβολικό μονοπάτι του σεληνίου στα φυτά.....	18
1.1.6 Θρεπτικά συμπληρώματα.....	19
1.1.6.1 Εισαγωγή.....	19
1.1.6.2 Η μαγιά σεληνίου σαν θρεπτικό συμπλήρωμα.....	20
1.1.7 Φυστίκια Βραζιλίας.....	20
1.1.7.1 Εισαγωγή.....	20
1.1.8 Φυτά συσσώρευσης.....	21
1.1.8.1 Εισαγωγή.....	21
1.1.8.2 Allium genus.....	21
1.1.8.3 Γένος Brassica.....	22
1.1.8.4 Μανιτάρια.....	23
1.1.9 Θαλάσσιοι οργανισμοί.....	23
1.1.10 Ζώα.....	23
1.1.11 Σελήνιο στον άνθρωπο.....	24
1.1.11.1 Σελήνιο στις πρωτεΐνες.....	24
1.1.11.2 Σεληνοπρωτεΐνες.....	24
1.1.11.3 Λειτουργία της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.....	26
1.1.12 Τοξικότητα.....	26
1.1.13 Σελήνιο στη τροφή.....	27

1.1.13.1 Εισαγωγή.....	27
1.1.14 Ρόλος του σεληνίου στην ανθρώπινη υγεία.....	28
1.1.14.1 Ανθρώπινες ασθένειες που σχετίζονται με το σελήνιο.....	28
1.1.14.2 Σελήνωση.....	29
1.1.14.3 Σελήνιο στο αίμα.....	29
1.1.14.4 Σελήνιο στα ούρα.....	29
1.1.14.5 Σελήνιο στο γάλα θηλασμού.....	30
1.1.14.6 Σελήνιο στα όργανα του σώματος.....	30
1.1.15 Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη.....	31
1.2 Αναλυτικές Τεχνικές.....	32
1.2.1 Εισαγωγή.....	32
1.2.1.1 Φασματομετρία Ατομικού Φθορισμού Παραγωγής Υδριδίων.....	32
1.2.1.2 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης.....	33
1.2.1.3 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα.....	33
1.2.1.4 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με Ηλεκτροθερμικό Φούρνο Γραφίτη.....	34
1.2.1.5 Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής.....	35
1.2.1.6 Ανάλυση Ενεργοποίησης Νετρονίων	35
1.2.1.7 Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής - Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος.....	36
1.2.1.8 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος.....	36
1.2.2 Διαχωρισμός του σεληνίου με τη χρήση HPLC-ICP-MS.....	38
1.2.2.1 Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ιοντικού ζεύγους.....	38
1.2.2.2 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής.....	39
1.2.2.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.....	39
1.3 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος.....	40
1.3.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	41
1.3.1.1 Δημιουργία αερολύματος.....	42
1.3.1.2 Εκνεφωτές.....	43
1.3.1.3 Θάλαμος εκνέφωσης.....	44
1.3.2 Πηγή Ιόντων.....	45
1.3.3 Σημεία Διασύνδεσης.....	46
1.3.4 Φακοί Εστίασης.....	47
1.3.5 Φασματόμετρο Μάζας.....	48
1.3.6 Ανιχνευτής.....	49
1.3.7 Παρεμποδίσσεις.....	50
1.4 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2. Εισαγωγή	54
2.1 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος.....	54

2.1.1 Σύστημα Εισαγωγής Δείματος.....	55
2.1.2 Χώνευση με Οξέα και Μικροκύματα.....	55
2.1.3 Λυοφιλίωση.....	56
2.1.4 Φυγόκεντρος.....	57
2.2 Ολικός Προσδιορισμός Σεληνίου.....	58
2.2.1 Χημικά Αντιδραστήρια.....	58
2.2.2 Δείγματα.....	58
2.3 Βάση Δεδομένων DAFNE (Data Food Networking - Διαδυκτιακή Βάση Τροφίμων).....	59
2.4 Διαχωρισμός των ειδών Σεληνίου με τη χρήση Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία.....	61
2.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης.....	62
2.4.2 Ενζυματική Χώνευση.....	63
2.4.2.1 Δείγματα.....	63
2.4.2.2 Χημικά Αντιδραστήρια.....	63
2.4.2.3 Εκχύλιση δειγμάτων.....	64
2.4.3 Γαστρεντερική Χώνευση.....	64
2.4.3.1 Δείγματα.....	64
2.4.3.2 Χημικά Αντιδραστήρια.....	65
2.5 Απόδοση της εκχύλισης.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3. Εισαγωγή.....	67
3.1 Ανάπτυξη μεθόδου ICP-MS για τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου σε σειρά από δείγματα τροφής.....	68
3.1.1 Παρατηρήσεις.....	70
3.1.2 Όρια Ανίχνευσης.....	73
3.1.3 % Απόδοση της ανάλυσης.....	73
3.2 Σύγκριση με άλλες αναφορές.....	74
3.2.1 Παρατηρήσεις.....	75
3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων από 3 βδομάδες συλλογής μερίδας φαγητού.....	76
4. Βάση Δεδομένων DAFNE.....	81
4.1 Πληροφορίες δείγματος στην Ελλάδα.....	81
4.1.1 Παρατηρήσεις.....	83
4.2 Συνιστώμενη Πρόσληψη Σεληνίου σε άλλες χώρες.....	84
4.2.1 Παρατηρήσεις.....	85
5. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με τη Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (HPLC-ICP-MS) για την ειδοταυτοποίηση σεληνίου στις τροφές.....	86
5.1 Εισαγωγή.....	86

5.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC.....	86
5.2.1 Μπακαλιάρος.....	87
5.2.1.1 Υδατική Εκχύλιση.....	87
5.2.1.2 Εκχύλιση με buffer (Tris-HCl).....	88
5.2.1.3 Ενζυματική υδρόλυση – χώνευση.....	89
5.2.1.4 Pronase E.....	90
5.2.1.5 % Απόδοση της Εκχύλισης.....	94
5.2.1.6 Παρατηρήσεις.....	95
5.2.2 Σαρδέλα.....	95
5.2.2.1 Υδατική εκχύλιση.....	95
5.2.2.2 Ενζυματική χώνευση 2 σταδίων.....	96
5.2.2.3 % Απόδοση της εκχύλισης.....	98
6. Βιοδιαθεσιμότητα.....	99
6.1 Αποτελέσματα Γαστρεντερικής Χώνευσης.....	100
6.1.1 Μπακαλιάρος.....	102
6.1.2 Σαρδέλα.....	104
6.1.3 Αποτελέσματα της % Βιοδιαθεσιμότητας.....	106
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	108
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

1.1 Σελήνιο

Το σελήνιο (Se) ανακαλύφθηκε το 1817 από τον Σουηδό Jons Jacob Berzelius¹, ο οποίος είχε αρχικά προτείνει το σελήνιο ως τελλούριο², αλλά αργότερα διαπίστωσε ότι στην πραγματικότητα, πρόκειται για ένα πολύ συγγενές του στοιχείο, το οποίο και προσδιόρισε ως Se. Το όνομα του στοιχείου αυτού προέρχεται από την ελληνική λέξη σελήνη και είναι ένα ημιμεταλλικό στοιχείο με ηλεκτρονική διαμόρφωση: (Ar) 4s²3d¹⁰4p⁴. Το Se βρίσκεται στην 4^η περίοδο, μεταξύ του αρσενικού και του βρωμίου και στη 16^η ομάδα μεταξύ του θείου και τελλουρίου². Ο ατομικός του αριθμός είναι Z=34 και το ατομικό του βάρος A.B.=78,96 gr/mol. Η ιοντική του ακτίνα είναι 1,6 Å, ενώ η ηλεκτραρνητικότητά του είναι 2,4.

Το σελήνιο, στη στοιχειακή του μορφή είναι σχετικά μη τοξικό², και η λήψη του σε μικροποσότητες από τα θηλαστικά και τα ανώτερα φυτά, θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξή τους. Το ίδιο ισχύει και για τον άνθρωπο, και γι' αυτό το Se κατατάσσεται στα απαραίτητα για αυτόν ιχνοστοιχεία. Η βιολογική του σημασία οφείλεται στην ύπαρξή του, σε μια κατηγορία ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση, τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, οι οποίες περιέχουν Se στο ενεργό τους κέντρο³.

Η απαιτούμενη ημερήσια ποσότητα που θα πρέπει να λαμβάνει ένας ενήλικας κυμαίνεται από 0,05-0,2 mg². Οι τροφές που αποτελούν την κύρια πηγή Se για τον άνθρωπο είναι τα θαλασσινά, οι ξηροί καρποί, τα αυγά, το κρέας και οι νεφροί³. Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του ιχνοστοιχείου αυτού παρατηρούνται ανωμαλίες, καρδιοπάθειες έως και εκδήλωση καρκίνου. Ωστόσο, αρκετές ενώσεις του σεληνίου, όπως το σεληνιούχο υδρογόνο (H₂Se), είναι εξαιρετικά τοξικές και μάλιστα ομοιάζουν με το αρσενικό ως προς την βιολογική τους τοξικότητα⁴. Για παράδειγμα, το H₂Se, σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 1,5 ppm, μπορεί να αποβεί θανατηφόρο για τον άνθρωπο. Γενικότερα, οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες.

Εκτός από τον πολύ σημαντικό βιολογικό του ρόλο, το Se έχει και πολλές άλλες εφαρμογές. Δύο από τις βασικές του ιδιότητες, που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο, είναι η φωτοβολταϊκή του δράση, δηλαδή η ικανότητά του να μετατρέπει άμεσα το φως σε ηλεκτρισμό, και η ιδιότητα της φωτοαγωγιμότητας, κατά την οποία παρατηρείται μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Εξαιτίας αυτών, το Se χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή φωτοκύτταρων, ηλιακών κυττάρων καθώς και υλικών για φωτογραφική χρήση^{5,6}. Επιπλέον, επειδή έχει την ικανότητα να μετατρέπει το εναλλασσόμενο ρεύμα σε συνεχές, βρίσκει εφαρμογή στην κατασκευή ανορθωτών τάσης. Επίσης, στη στερεή του φάση, το Se αποτελεί έναν ημιαγωγό p-τύπου (p-type), γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο σε ηλεκτρονικές εφαρμογές. Ακόμη, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία γυαλιού, καθώς και ως πρόσθετο στην παρασκευή ανοξειδωτου χάλυβα.

1.1.1 Χημεία του σεληνίου

Το Se εμφανίζεται σε 4 φυσικές οξειδωτικές καταστάσεις^{2,4}
στοιχειακό Se (0)

σεληνιούχο (-2) → (Na₂Se), (H₂Se)

σεληνιώδες (+4) → (Na₂SeO₃), (SeO₂), (H₂SeO₃)

σεληνικό (+6) → (Na₂SeO₄), (H₂SeO₄)

Το στοιχειακό Se είναι ιδιαίτερα αδιάλυτο και πολύ σταθερό. Έχει θερμοκρασία τήξης 221C° (494 K) και θερμοκρασία βρασμού 684,9C° (958 K). Ως προς τις φυσικές του ιδιότητες, η πυκνότητα του είναι 4,8 g/cm³ και ο γραμμομοριακός του όγκος 16,42 cm³.

Το Se συναντάται είτε σε άμορφη, είτε σε κρυσταλλική μορφή. Οι δύο πιθανές κρυσταλλικές του δομές είναι η μονοκλινής, η οποία χαρακτηρίζεται από ένα βαθύ κόκκινο χρώμα, και η εξαγωνική, που είναι η πλέον σταθερή, και χαρακτηρίζεται από ένα μεταλλικό γκρι χρώμα. Επίσης το Se παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με το θείο^{5,7}, αν και ενσωματώνεται ευκολότερα, στα βιομόρια από ότι το θείο.

Το Se έχει 6 σταθερά ισότοπα, τα οποία αναφέρονται στον επόμενο πίνακα με τις ατομικές τους μάζες και τις φυσικές τους αφθονίες.

Πίνακας 1.1 Φυσικά Ισότοπα σεληνίου^{4,8}

Ισότοπα	Ατομική μάζα (u)	Φυσική αφθονία
⁷⁴ Se	73.92247	0.89
⁷⁶ Se	75.91921	9.37
⁷⁷ Se	76.91991	7.63
⁷⁸ Se	77.91731	23.77
⁸⁰ Se	79.91651	49.61
⁸² Se	81.91669	8.73

1.1.2 Σελήνιο και περιβάλλον

Η συμπεριφορά του σεληνίου στο περιβάλλον εξαρτάται από την οξειδωτική του κατάσταση καθώς και από φυσικούς παράγοντες όπως γεωλογία, κλίμα και υδρολογία. Επίσης το Se είναι περισσότερο άφθονο σε περιοχές με θαλάσσια ίζηματογενή πετρώματα.

Στα περιβαλλοντικά δείγματα το Se εμφανίζεται υπό τη μορφή ανόργανου Se όπως σεληνικό, σεληνιώδες και σεληνιούχο και οργανικού Se όπως σελινοαμινοξέα, σελινοπρωτείνες και άλλα είδη⁹.

1.1.2.1 Σελήνιο στο έδαφος

Οι συγκεντρώσεις του Se στο έδαφος κυμαίνονται μεταξύ 0.02 - 2.5 $\mu\text{g Se g}^{-1}$, στον άνθρακα κυμαίνονται μεταξύ 0.47-8.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ και στο μαζούτ (καύσιμη ύλη) μεταξύ 2.4-7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$. Η μέση τιμή του Se στο φλοιό της γης είναι 0.09 $\mu\text{g g}^{-1}$ ⁸. Η παρουσία του Se, στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα των φυσικών (ηφαιστειακή δραστηριότητα) και ανθρωπογενών διεργασιών (βιομηχανικές εκπομπές, χρήση λιπασμάτων)⁸.

Στο έδαφος, το Se μπορεί να υπάρξει σε 4 οξειδωτικές καταστάσεις (- II, 0, +IV, +VI) όπου αυτές οι μορφές διαφέρουν σε διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα⁹.

Η κινητικότητα του Se στο έδαφος εξαρτάται από το pH. Οι αλκαλικές συνθήκες ευνοούν τη μετατροπή του στοιχειακού Se σε σεληνικό (SeO_4^{2-}), το οποίο δεν σταθεροποιείται εύκολα στο έδαφος και είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμο από το σεληνιώδες. Υπό όξινες συνθήκες, ευνοείται ο σχηματισμός του σεληνιόδου (SeO_3^{2-})

όπου η ανόργανη αυτή μορφή έχει εξαιρετικά χαμηλή διαλυτότητα. Η παρουσία υψηλών ποσοτήτων οργανικής ύλης, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερα επίπεδα Se¹⁰.

1.1.2.2 Σελήνιο στο νερό

Στο νερό, συνήθως κυριαρχούν οι ανόργανες μορφές σεληνίου (σεληνικό και σεληνιώδες) ⁹. Οι βιομηχανικές και γεωργικές δραστηριότητες γίνονται η αιτία απελευθέρωσης του Se στο περιβάλλον όπου κύριες πηγές μόλυνσης του Se είναι το γεωργικό νερό αγωγών, οι ακαθαρσίες λυμάτων, τα διυλιστήρια πετρελαίου και η ορυκτοποίηση μετάλλων. Η συγκέντρωση του Se στα υπόγεια νερά κυμαίνεται μεταξύ 0,1-400 $\mu\text{g l}^{-1}$ ⁹. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει θέσει το μέγιστο όριο του Se στο πόσιμο νερό σε 0.01 mg l^{-1} .

1.1.2.3 Σελήνιο στον αέρα

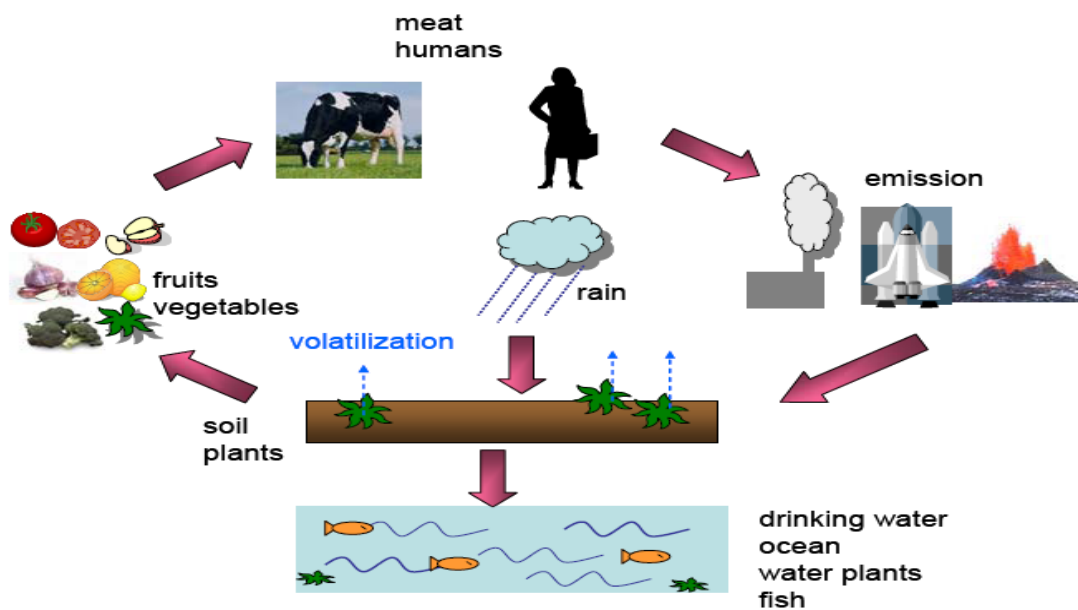
Στην ατμόσφαιρα απελευθερώνονται οι πτητικές ενώσεις Se, οι ανόργανες ενώσεις (διοξείδιο του σεληνίου, υδρίδιο του σεληνίου) και οι οργανικές ενώσεις (διμεθυλσεληνιούχο, διμεθυλδισεληνιούχο). Η ανόργανη ένωση του Se, υδρίδιο του σεληνίου (H_2Se) οξειδώνεται σε στοιχειακό σελήνιο και νερό. Το διοξείδιο του σεληνίου (SeO_2), απελευθερώνεται στον αέρα από την καύση των ορυκτών καυσίμων και αντιδρά με την ατμοσφαιρική υγρασία όπου σχηματίζει αερολύματα σεληνιώδους οξέος. Επίσης οι ενώσεις σεληνίου απομακρύνονται από την ατμόσφαιρα μέσω της ξηρής εναπόθεσης¹⁰.

1.1.3 Ο κύκλος του Se

1.1.3.1 Κύκλος ειδών Se μέσω της τροφικής αλυσίδας

Ο κύκλος του Se περιλαμβάνει τις φυσικές (ηφαιστειακή δραστηριότητα, διάβρωση πετρωμάτων) και τις ανθρωπογενής δραστηριότητες (καύση ορυκτών καυσίμων, χρήση λιπασμάτων Se, βιομηχανία γαλιού, ιατρικές εφαρμογές).

Ο κύκλος του Se, αρχίζει από τα πετρώματα, τα οποία περιέχουν Se και καταλήγει στο θαλάσσιο οικοσύστημα (μικροοργανισμούς) ή στα φυτά. Τα είδη Se τα οποία ενσωματώνονται στις πρωτεΐνες των φυτών και μικροοργανισμών, λαμβάνονται από το έδαφος, ενώ μερική ποσότητα Se μετατρέπεται σε πτητικούς μεταβολίτες. Αυτοί στη συνέχεια εισάγονται στην ατμόσφαιρα και τελικά καταλήγουν στο έδαφος. Το Se από το έδαφος μέσω των φυτών, μεταφέρεται στα ζώα και τελικά καταλήγει στον άνθρωπο ο οποίος καταναλώνει τα φυτά και τα ζώα.

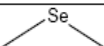
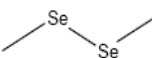
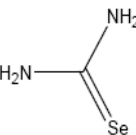
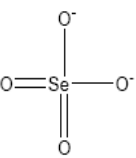
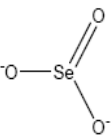
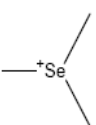
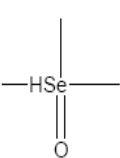


Σχήμα 1.2 Κύκλος εκπομπής σεληνίου ¹⁰

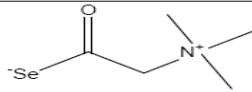
1.1.4 Βιοχημεία του σεληνίου

1.1.4.1 Οργανικές ενώσεις σεληνίου

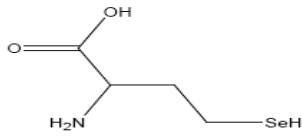
Οι οργανικές ενώσεις του Se, είναι παρόμοιες σε χημικές και φυσικές ιδιότητες με τις οργανικές ενώσεις του S^{5,8}. Η σταθερότητα όμως του δεσμού των οργανικών ενώσεων του Se είναι χαμηλότερη από τη σταθερότητα του δεσμού των οργανικών ενώσεων του S. Οι οργανικές ενώσεις Se οξειδώνονται ευκολότερα και είναι περισσότερο επιρρεπής στην αποσύνθεση λόγω της παρουσίας του αέρα και του φωτός. Αρκετές από τις οργανικές ενώσεις του Se διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη κυτταρική βιοχημεία και στη διατροφή. Ένας σημαντικός αριθμός οργανικών και ανόργανων ενώσεων Se φαίνεται παρακάτω¹⁰.

Name	Structural formulae
dimethylselenide	
dimethyldiselenide	
selenourea	
selenate (selenic acid)	
selenite (selenous acid)	
trimethylselenonium ion	
trimethylselenoxide	

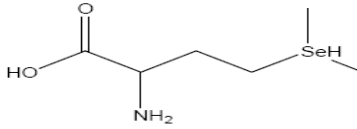
selenobetaine



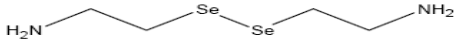
Se-Homocysteine



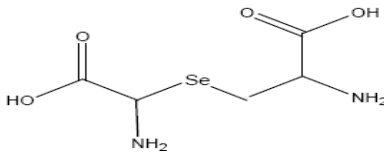
**Se-Methyl|SeMethionine
(Se-MeSeMet)**



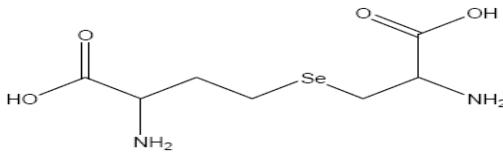
**Se-Cystamine
(Se-Cya)**



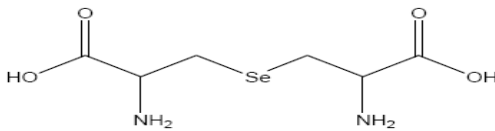
Se-Cystathione



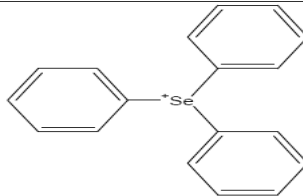
Se-Cystathionine



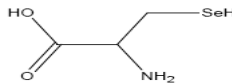
Se-Lanthionine



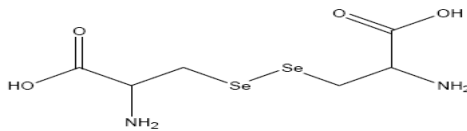
triphenylselenonium ion



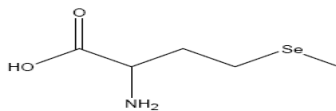
**Se-Cysteine
(Se-Cys)**



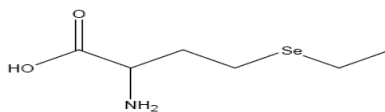
**Se-Cystine
(Se-(Cys)2)**



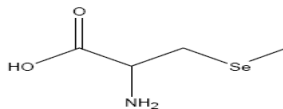
**Se-Methionine
(Se-Met)**

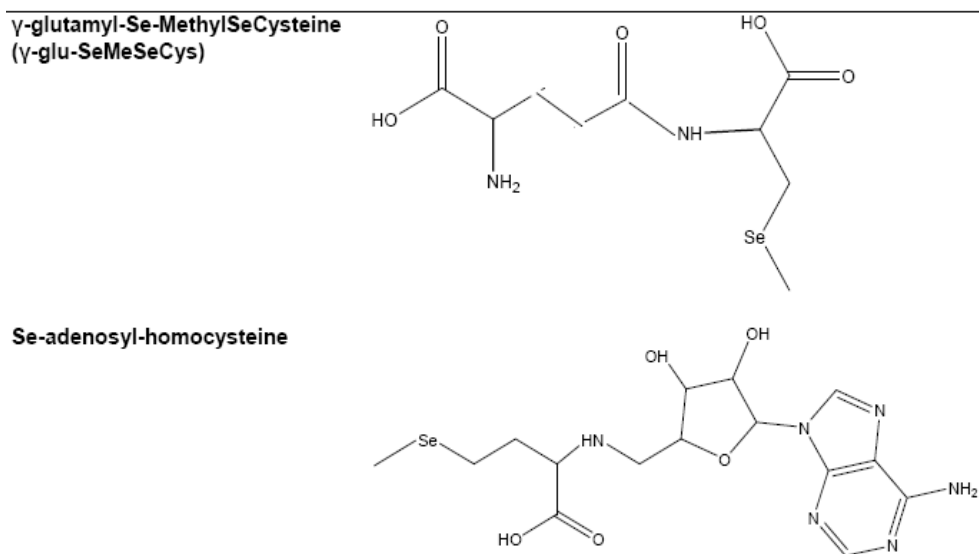


**Se-Ethionine
(Se-Et)**



**Se-Methyl|SeCysteine
(Se-MeSeCys)**





Σχήμα 1.3 Ανόργανες και Οργανικές ενώσεις Se¹⁰.

1.1.5 Φυτά

1.1.5.1 Πρόσληψη Se

Η ευκολία μεταφοράς του Se από τα φυτά στη μεμβράνη της ρίζας και στη συνέχεια στο βλαστό, εξαρτάται από τα είδη του Se. Το σεληνικό μεταφέρετε πολύ πιο εύκολα από το σεληνιώδες ή το οργανικό σεληνίο¹². Η κατανομή του σεληνίου στα διάφορα μέρη του φυτού εξαρτάται από το είδος του φυτού, τη φάση ανάπτυξής του, τη μορφή του Se, τη συγκέντρωση του Se που είναι διαθέσιμη και την παρουσία άλλων ενώσεων, ιδιαίτερα σουλφιδίων. Για παράδειγμα στους συσσωρευτές Se, το Se ενσωματώνεται στα νεαρά φύλλα κατά την διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης του σταδίου βλάστησης ενώ κατά την διάρκεια του αναπαραγωγικού σταδίου, υψηλές ποσότητες Se εμφανίζονται στους σπόρους^{10,11}. Ακόμη ένας τρόπος λήψης Se από τα φυτά είναι ατμοσφαιρικά μέσω της επιφάνειας του φύλλου.

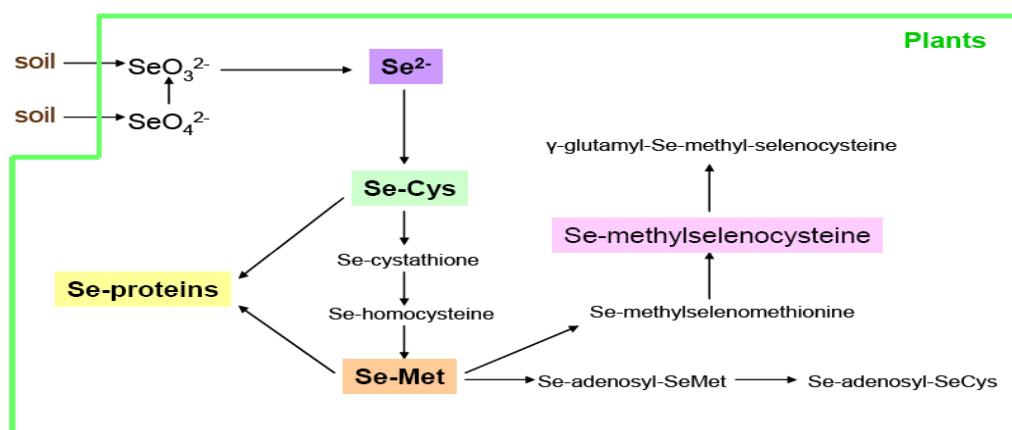
1.1.5.2 Το μεταβολικό μονοπάτι του σεληνίου στα φυτά

Η συγκέντρωση του Se στο φυτό σχετίζεται με τη συγκέντρωση του φυτού σε πρωτεΐνη. Το σεληνικό ανάγεται σε σεληνιώδες, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται

σε σεληνιούχο¹². Το σεληνιούχο τότε μετατρέπεται σε σεληνοκυστεΐνη (Se-Cys) με ένα τρόπο άμεσα συγκρίσιμο με αυτό του μεταβολισμού του θείου.

Το Se εισάγεται στη τροφική αλυσίδα μέσω της ενσωμάτωσης του στις πρωτεΐνες του φυτού, κυρίως ως σεληνοκυστεΐνη (Se-Cys) ή σεληνομεθειονίνη (Se-Met). Η Se-Met μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε διάφορες άλλες ενώσεις .

Στο παρακάτω σχήμα, αναπαρίσταται ο μεταβολισμός του Se στα φυτά. Οι μορφές του Se, που εμφανίζονται στις πρωτεΐνες, θα χρησιμοποιηθούν τελικά από τα ζώα για την σύνθεση των δικών τους πρωτεϊνών.



Σχήμα 1.4. Μεταβολισμός του σεληνίου στα φυτά^{10,12}

1.1.6 Θρεπτικά συμπληρώματα

1.1.6.1 Εισαγωγή

Κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας η φαρμακευτική αγορά περιλαμβάνει πολυάριθμα θρεπτικά συμπληρώματα που είναι βασισμένα στο Se. Δύο διαφορετικοί τύποι μπορούν να διακριθούν: οι πολυ-βιταμίνες και τα πολυ-στοιχειακά που περιέχουν Se¹². Επίσης υπάρχουν ιχνοστοιχεία και βιταμίνες, τα οποία περιέχουν Se σε ανόργανη μορφή και βασίζονται στην μαγιά *Saccharomyces cerevisiae*. Η διατροφή με συμπληρώματα, ενός πληθυσμού σε περιοχές όπου το Se είναι σχετικά χαμηλό, είναι ευεργετική.

1.1.6.2 Η μαγιά σεληνίου σαν θρεπτικό συμπλήρωμα

Η *Saccharomyces cerevisiae*¹³ έχει υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, που σχετίζεται με την δυνατότητα ενσωμάτωσης του σεληνίου. Περισσότερο Se μπορεί να ενσωματωθεί στη μαγιά από την αντικατάσταση του θείου, όπως συμβαίνει στη περίπτωση μερικών φυτών. Επιπλέον η παραγωγή της μαγιάς που είναι εμπλουτισμένη σε Se είναι πιο εύχρηστη από ότι η παραγωγή των φυτών που είναι εμπλουτισμένα σε Se. Η *Saccharomyces cerevisiae*, μπορεί να αναπτυχθεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Συνήθως το σελήνιο προστίθεται ως μέσο ανάπτυξης με τη μορφή σεληνιώδους (Na_2SeO_3)^{2,12}. Λόγω της ζύμωσης του εμπλουτισμένου θρεπτικού, το Se ενσωματώνεται οργανικά κυρίως ως σεληνομεθειονίνη (Se-Met) στις πρωτεΐνες της μαγιάς.

1.1.7 Καρύδια Βραζιλίας

1.1.7.1 Εισαγωγή

Τα καρύδια Βραζιλίας (*Bertholletia excelsa*)¹⁴ είναι γνωστά για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε σελήνιο. Τα δέντρα αναπτύσσονται δίπλα στο Ποτάμι του Αμαζονίου, κυρίως στη Βραζιλία καθώς και στο Περού, Βολιβία, Κολομβία, Βενεζουέλα και Εκουαδόρ. Η συγκέντρωση του σεληνίου στα καρύδια εξαρτάται από την συγκέντρωση του σεληνίου στο έδαφος. Είχε αποδειχθεί ότι οι ξηροί καρποί που πηγαίνουν από το κεντρικό μέρος της Βραζιλίας περιέχουν πάνω από 10 φορές περισσότερο σελήνιο από τους καρπούς στο δυτικό μέρος της Βραζιλίας. Ξηροί καρποί που προέρχονται από την ίδια περιοχή μπορεί επίσης να δείχνουν ενδιαφέρουσες διαφορές στην ποσότητα τους σε σελήνιο. Γενικά η συγκέντρωση του σεληνίου ποικίλει ακόμη και μεταξύ των ξηρών καρπών που βρίσκονται στο ίδιο δέντρο.

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στους ξηρούς καρπούς Βραζιλίας αποτελούνται από αμινοξέα τα οποία περιέχουν θείο^{10,12}. Η παρουσία τέτοιων αμινοξέων (κυρίως μεθειονίνης, Met) αυξάνουν την απορρόφηση σεληνίου. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την απορρόφηση Se, είναι ο τύπος του εδάφους, το pH, η υγρασία και οι ρίζες του δέντρου.

1.1.8 Φυτά συσσώρευσης Σεληνίου

1.1.8.1 Εισαγωγή

Αν και τα φιστίκια Βραζιλίας είναι μία καλή πηγή σεληνίου για την διατροφή, δεν είναι κοινό προϊόν κατανάλωσης. Η κατανάλωση αυτών των ξηρών καρπών είναι περιορισμένη, καθώς τα δέντρα αναπτύσσονται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές ανά τον κόσμο. Ως αποτέλεσμα αυτού, ανακαλύφθηκαν διάφορα είδη φυτών τα οποία έχουν ονομαστεί σαν συσσωρευτές σεληνίου^{7,10,11,12} επειδή έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες σεληνίου (> 1,000 mg Se / kg). Δεν δείχνουν σημάδια τοξικότητας και χρησιμοποιούν τα αμινοξέα σεληνίου από τις πρωτεΐνες για την παραγωγή διαφόρων φυτοχημικών¹⁰.

Τα φυτά που συσσωρεύουν από εκατοντάδες μέχρι χιλιάδες mg Se kg⁻¹ ξηρού βάρους καλούνται, υπερσυσσωρευτές (ή αρχικοί συσσωρευτές), (*Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oenopsis*, *Xylorhiza*) και εκείνα που συσσωρεύουν μέχρι 1000 mg kg⁻¹ είναι οι δευτεροβάθμιοι συσσωρευτές (*Aster*, *Astragalus*, *Atriplex*, *Castilleja*, *Comandra*, *Grayia*, *Grindelia*, *Gutierrizia*, *Machaeranthera*)¹⁵. Υπάρχουν επίσης οι μη-συσσωρευτές που συσσωρεύουν μέχρι 100 mg Se kg⁻¹. Οι περισσότερες μελέτες στη συσσώρευση σεληνίου έχουν γίνει με το *Allium sativum* (σκόρδο), *Brassica juncea* (ινδική μουστάρδα), *Brassica napus* και κάποια μανιτάρια. Φυτά τα οποία συσσωρεύουν σελήνιο δεσμεύουν μόνο μικρή ποσότητα σεληνίου στις πρωτεΐνες τους και έτσι εξηγείται το γεγονός ότι ψηλές συγκεντρώσεις σεληνίου δεν τα καθιστούν τοξικά¹⁰.

1.1.8.2 Allium genus

Το γένος των λαχανικών *Allium*¹⁵, περιλαμβάνει τα εξής λαχανικά: σκόρδο, κρεμμύδια, πράσα και φρέσκα κρεμμύδια. Το σκόρδο και το κρεμμύδι, είναι καλές πηγές σεληνίου με ενδιαφέρουσες αντι-καρκινογονιδιακές ιδιότητες. Ακόμη, η διατροφή από αυτό το γένος λαχανικών δεν προκαλεί καμία περαιτέρω συσσώρευση του σεληνίου στις πρωτεΐνες.

Σκόρδο

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αντι-καρκινογονιακή ιδιότητα του σκόρδου (*Allium sativum*)^{16,17} οφείλεται στη παρουσία των ενώσεων σεληνίου. Οι αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντιθρομβωτικές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινογονιακές ιδιότητες του σεληνίου έχουν καταστήσει το φυτό αυτό ως ένα ενδιαφέρον αντικείμενο για επιστημονική έρευνα. Το σκόρδο αφού είναι μία πλούσια πηγή σεληνίου, μπορεί να θεωρηθεί ότι μετατρέπει το ανόργανο σελήνιο από το έδαφος, σε οργανική ένωση σεληνίου ακολουθώντας το μονοπάτι του S. Η σημαντικότερη βιοενεργή ένωση του S στο σκόρδο είναι η *alliin*¹⁸. Η λήψη του Se από το σκόρδο, μετατρέπει αυτή την ένωση σε διάφορες άλλες ενώσεις που περιέχουν Se, οι οποίες είναι τουλάχιστο 300 φορές περισσότερο δραστικές από ότι τα ισοδύναμα του S.

Κρεμμύδια

Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα εμπλουτισμένα σε σελήνιο πράσινα κρεμμύδια (*Allium cepa*)^{16,19}, έδωσαν κυρίως την ένωση σεληνομεθυλοσεληνοκυστεΐνη (Se-MeSeCys) και σε λιγότερη έκταση σεληνοκυστίνη [Se(Cys)₂] και σεληνομεθειονίνη (SeMet). Τα αμινοξέα αυτά που ήταν δεσμευμένα στις πρωτεΐνες απελευθερώθηκαν μετά από την ενζυματική υδρόλυση.

1.1.8.3 Γένος Brassica

Ανάμεσα στα πολύ γνωστά λαχανικά του γένους *Brassica*¹⁷ είναι, το μπρόκολο, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το λάχανο και το κουνουπίδι. Μελέτες έχουν δείξει ότι το γένος *Brassica* αναπτύσσεται σε σεληνιούχα εδάφη μετατρέποντας το σελήνιο σε αμινοξέα σεληνίου.

Brassica juncea (δευτερεύων συσσωρευτής)

Η *Brassica juncea*¹⁷ είναι μία ινδική μουστάρδα όπου η συσσώρευση του Se από αυτήν εξαρτάται από τα είδη του Se του φυτού. Η συσσώρευση της ανόργανης μορφής του Se, σεληνικό, έχει αποδειχθεί ότι είναι η περισσότερο αποδοτική συσσώρευση.

Μπρόκολο (*Brassica oleracea*)

Το μπρόκολο είναι ικανό να συσσωρεύει υψηλές ποσότητες Se και να διαμορφώνει ένα εξαιρετικό πρότυπο για την μελέτη της συσσώρευσης του σεληνίου στα φυτά. Επίσης έχει γίνει το αντικείμενο των διάφορων μελετών ειδοταυτοποίησης.

1.1.8.4 Μανιτάρια

Όχι όλα τα μανιτάρια, τείνουν να συσσωρεύουν Se. Το *Agaricus bisporus*²⁰ είναι ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα μανιτάρια για τις μελέτες ειδοταυτοποίησης του Se. Αυτό είναι το συνηθέστερο μανιτάρι, που καταναλώνεται στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Άλλα μανιτάρια, τα οποία συσσωρεύουν Se είναι: *Boletus edulis* και *B. Macrolepiota*. Το συνηθέστερο μανιτάρι στην διατροφή της Ανατολικής Ασίας είναι το *Lentilus edodes*. Οι αναλύσεις διαχωρισμού με υδατική εκχύλιση απέδειξαν ότι η SeMet είναι η κύρια ένωση η οποία υπάρχει στο μανιτάρι²⁰.

1.1.9 Θαλάσσιοι οργανισμοί

Τα ψάρια λαμβάνουν Se από το νερό, τα φυτά ή άλλους θαλάσσιους οργανισμούς. Η πρόσληψη των ενώσεων Se γίνεται μέσω της επιδερμίδας, του εντέρου ή από τα βράγχια του ψαριού. Η συσσώρευση του Se από τους θαλάσσιους οργανισμούς, φυτοπλαγκτόν και ζωοπλαγκτόν, είναι σημαντικότερη από τη συσσώρευση του Se από το νερό. Τα είδη των ψαριών που ζουν κοντά στο κατώτατο σημείο του υδρόβιου περιβάλλοντος, λαμβάνουν Se από τα ιζήματα. Το ψάρι είναι γνωστό ότι συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες Se και είναι ενδεχομένως μια καλή πηγή Se για τον άνθρωπο.

Η περιεκτικότητα του Se στους διαφορετικούς τύπους ψαριών κυμαίνεται μεταξύ 0.2-0.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ ¹⁰.

1.1.10 Ζώα

Η συγκέντρωση του Se στους μύς των ζώων, όπως το μοσχάρι, το κοτόπουλο και το χοιρινό κυμαίνεται μεταξύ 0,2-0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ¹⁰. Η συγκέντρωση του Se στα ζώα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του Se στο έδαφος, όπου τα ζώα βόσκουν.

1.1.11 Σελήνιο στον άνθρωπο

1.1.11.1 Se στις πρωτεΐνες

Το Se μπορεί να ενσωματωθεί στα βιοπολυμερή: πεπτίδια και πρωτεΐνες. Επίσης εμφανίζεται στα ανθρώπινα όργανα, συκώτι[30%] και νεφρό[15%]. Σε αντίθεση με τις μεταλλοπρωτεΐνες, το Se δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, ομοιοπολικά με το δεσμό C - Se. Οι πρωτεΐνες του Se μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: τις σεληνοπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες που περιέχουν Se. Στις σεληνοπρωτεΐνες, το Se ενσωματώνεται ως ένα σεληνοκυστεϊνώδες-κατάλοιπο (selenocysteiny), ενώ στις πρωτεΐνες που περιέχουν Se ως ένα σεληνομεθειονώδες-κατάλοιπο (selenomethionyl)^{3,11,15}.

Η σεληνοκυστεΐνη (Se-Cys) θεωρείται σήμερα ως το 21^ο αμινοξύ το οποίο ενσωματώνεται μέσω του UGA κωδικονίου^{21,22}. Μία σχηματική παρουσίαση και των δύο πρωτεϊνών φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 1.5 Παρουσίαση των σεληνοπρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που περιέχουν σελήνιο¹¹

1.1.11.2 Σεληνοπρωτεΐνες

Στις πρωτεΐνες των θηλαστικών έχουν ανιχνευθεί 30 σεληνοπρωτεΐνες. Είναι αναγκαίο να κατανοηθεί πώς αυτές οι διαφορετικές σεληνοπρωτεΐνες δίνουν διαφορετικά επίπεδα σεληνίου στη διατροφή. Επίσης όταν η διατροφική πρόσληψη του στοιχείου είναι ανεπαρκής, η σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών μειώνεται. Το περισσότερο διαθέσιμο Se χρησιμοποιείται στη σύνθεση των πρωτεϊνών παρά στη σύνθεση άλλων μεταβολιτών.

Το Se είναι το βασικό στοιχείο στα ένζυμα των σεληνοπρωτεϊνών^{21,22}. Αυτά τα ένζυμα χρησιμεύουν ως οξειδοαναγωγικοί καταλύτες και περιέχουν σεληνοκυστεΐνη (Se-Cys) στο ενεργό τους κέντρο. Διάφορες σεληνοπρωτεΐνες έχουν απομονωθεί και πιθανώς η περισσότερη γνωστή ομάδα είναι αυτή της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSHPx)^{21,23,24}.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης: Έχουν ταυτοποιηθεί 4 τύποι υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης οι οποίες περιέχουν Se: Κυτταρική (Cytosolic) υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx I). Εξωκυτταρική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx II). Γαστρεντερική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx III) και Φωσφολιπιδική υπεροξειδάση (GPx IV)^{25,26}.

Σεληνοπρωτεΐνη P: Βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος. Αποθηκεύει και μεταφέρει το σελήνιο και έχει αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Περιέχει πάνω από δέκα κατάλοιπα σεληνοκυστεΐνης (Se-Cys) ανά πολυπεπτιδική αλυσίδα^{25,26}.

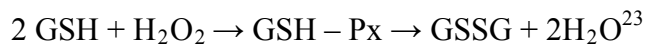
Αναγωγή της θυροεδοξίνης: Λαμβάνει μέρος στην έκφραση του γονιδίου. Υπάρχουν στοιχεία για αυξανόμενο κίνδυνο καρκίνου όταν η δραστηριότητα της αναγωγής της θυροεδοξίνης μειώνεται^{25,26}.

Δειδοδινάση της ιοδοθυρονίνης-5': Διατηρεί τη θυροεοειδή ορμόνη σε αναγόμενη μορφή για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και βιωσιμότητας των κυττάρων. Ο τύπος I 5'-δειοσινάση της ιοδοθυρονίνης διαδραματίζει ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού της θυροεοειδούς ορμόνης^{25,26}.

Σεληνοπρωτεΐνη W: Βρίσκεται στο μυ της καρδιάς και στο σκελετό, αποθηκεύει σελήνιο και έχει αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Η σεληνοπρωτεΐνη W είναι μία πρωτεΐνη χαμηλής μοριακής μάζας (10kDa)^{25,26}.

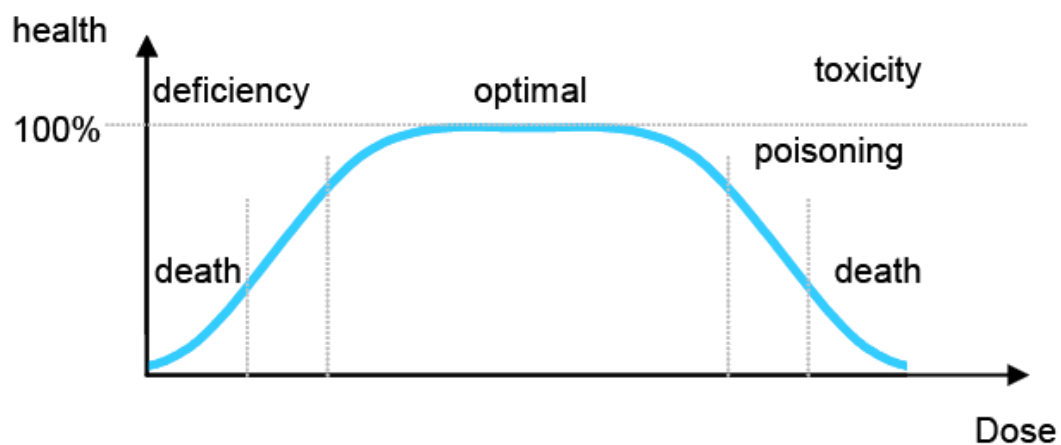
1.1.11.3 Λειτουργία της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) είναι μια τετραμερική πρωτεΐνη με 4 άτομα Se ανά μόριο. Η λειτουργία των GSHPx's είναι η αποβολή των υπεροξειδίων τα οποία καταστρέφουν τις μεμβράνες των κυττάρων και η προστασία των μεμβρανών των κυττάρων και των ιστών. Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μειώνεται όταν εμφανίζεται ανεπάρκεια Se. Οι GSHPx's επίσης συνδέονται με άλλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, ψευδάργυρος), τα οποία βοηθούν στο να αποτραπεί ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών και, ως εκ τούτου, βοηθούν στη μείωση του κινδύνου της οξειδωτικής καταστροφής των κυττάρων. Η GSHPx επίσης λειτουργεί σαν αποθήκη Se.



1.1.12 Τοξικότητα

Δεδομένου ότι μια ανεπαρκής διατροφή σε Se οδηγεί σε μια ελλιπή σύνθεση των Se-πρωτεϊνών, μία υπερβολική δόση Se προκαλεί τοξικότητα^{27,28}. Η τοξικότητα προκαλείται επίσης από το γεγονός ότι τα σεληνιούχα μπορούν να επιτεθούν στις γέφυρες δισουλφιδίου των πρωτεϊνών και να τις μετατρέψουν σε ομάδες θειολών, προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Τα σεληνιούχα επίσης μπορεί να απομακρύνουν απαραίτητα μέταλλα¹⁰.



Σχήμα 1.6 Αναπαράσταση ενός γραφήματος της υγείας σε σχέση με την δόση σεληνίου¹⁰

Στο παραπάνω σχήμα δίνεται το διάγραμμα της υγείας σε σχέση με την δόση. Όπως συμπεραίνουμε, η πολύ χαμηλή δόση σεληνίου, δηλαδή η ελλιπής διατροφή σε σελήνιο προκαλεί ανεπάρκεια και σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα επέρχεται ο θάνατος. Σε υψηλότερα επίπεδα (50 – 200 µg Se) έχουμε το βέλτιστο αποτέλεσμα και σε πολύ υψηλότερες δόσεις Se προκαλείται τοξικότητα (δηλητηρίαση), το ποσοστό της υγείας μειώνεται και επέρχεται ο θάνατος.

1.1.13 Σελήνιο στη τροφή

1.1.13.1 Εισαγωγή

Η τροφή (κρέας, ψάρι, κοτόπουλο, σιτηρά, δημητριακά, φρούτα και λαχανικά) είναι η κύρια πηγή σεληνίου για τον γενικό πληθυσμό. Η έκθεση του σεληνίου σε ένα ενήλικα μέσω της διατροφής κυμαίνεται μεταξύ 11 και 5,000 µg/ημερησίως ανά τον κόσμο ενώ η μέση διατροφική πρόσληψη κυμαίνεται κυρίως μεταξύ του εύρους 20-300 µg/ημερησίως^{2,12}.

Εκτός από τις σεληνοπρωτεΐνες όπου το σελήνιο βρίσκεται υπό την μορφή σεληνοκυστεΐνης (Se-Cys), υπάρχουν οι πρωτεΐνες που περιέχουν σελήνιο οι οποίες συντίθενται από τα φυτά και τα ζώα. Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν σεληνομεθειονίνη (Se-Met), την κύρια μορφή του σεληνίου στα δημητριακά και άλλα φυτά. Τα δύο αμινοξέα, σεληνομεθειονίνη (Se-Met) και μεθειονίνη (Met), ενσωματώνονται στις πρωτεΐνες μέσω της ίδιας ενζυμικής διάβασης. Η ύπαρξη αυτών των ενώσεων στις πρωτεΐνες εξαρτάται από την βιοδιαθεσιμότητα και των δύο ενώσεων.

Η συγκέντρωση του σεληνίου στην τροφή εξαρτάται από τη συγκέντρωση του σεληνίου στο έδαφος, όπου ποικίλει από χώρα σε χώρα και από περιοχή σε περιοχή και επίσης εξαρτάται από την ικανότητα των φυτών να συσσωρεύουν το στοιχείο²⁹.

Οι συγκεντρώσεις του σεληνίου στα δημητριακά ποικίλουν από 0,01-0,55 µg/g φρέσκο βάρος. Στο κρέας, το ψάρι και τα αυγά οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 0,01 και 0,36 µg/g φρέσκο βάρος. Η συγκέντρωση του σεληνίου στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να είναι χαμηλότερη από 0,001 µg/g φρέσκο βάρος και υψηλότερη από 0,17 µg/g φρέσκο βάρος. Τέλος η περιεκτικότητα του σεληνίου

στα λαχανικά και τα φρούτα είναι η χαμηλότερη με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 0,001-0,022 μg/g φρέσκο βάρος³⁰.

Η συγκέντρωση του Se στο έδαφος, προσδιορίζει την μέση συνολική πρόσληψη σε σελήνιο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του σεληνίου στο έδαφος, άρα και στη τροφή, έχουν ως αποτέλεσμα υψηλές συγκεντρώσεις σεληνίου στις πρωτεΐνες του σώματος. Επιπλέον, άτομα τα οποία καταναλώνουν τροφές με χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών, καταναλώνουν τροφές με χαμηλή περιεκτικότητα Se, καθώς το κύριο μέρος του Se στη τροφή ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες³¹.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διατροφή των ανθρώπων με τη χαμηλότερη πρόσληψη Se (<40μg ανά ημέρα), τα συμπληρώματα σεληνίου θεωρούνται ευεργετικά (200-300μg ανά ημέρα). Σε κάποιες περιοχές όπου το έδαφος σε σελήνιο είναι χαμηλό, διαφορετικές στρατηγικές έχουν ακολουθηθεί ώστε να αποκτήσει ο πληθυσμός επαρκές σελήνιο: Χρήση λιπασμάτων εμπλουτισμένα με σελήνιο και συμπληρώματα σεληνίου στη διατροφή των ζώων της φάρμας.

1.1.14 Ρόλος του σεληνίου στην ανθρώπινη υγεία

1.1.14.1 Ανθρώπινες ασθένειες σχετικές με Se

Δεδομένα τα οποία, πριν από δεκαετίες έκριναν το Se ως ένα απαραίτητο στοιχείο για τον άνθρωπο, αυξήθηκαν. Μειωμένη και ανεπαρκής πρόσληψη αυτού του στοιχείου οδήγησε σε προβλήματα υγείας. Δύο ενδημικές ασθένειες σχετικές με την ανεπαρκή πρόσληψη Se, έχουν διευκρινιστεί στην Κίνα σε μια περιοχή όπου το έδαφος περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις Se.

Η ασθένεια *Keshan*^{11,24,29} είναι μια καρδιαγγειακή πάθηση, η οποία έχει επιπτώσεις κυρίως στα παιδιά και τις νεαρές γυναίκες. Η ασθένεια περιλαμβάνει τη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, τη διεύρυνση της καρδιάς και την αρρυθμία.

Η ασθένεια *Kashin-Beck*^{11,24,29} χαρακτηρίζεται από τη χρόνια βλαβερή εκφυλιστική οστεοαρθρίτιδα και έχει επιπτώσεις σε περίπου 2 εκατομμύρια παιδιά στην Κίνα, τη βόρεια Κορέα και τη Ρωσία.

Οι ασθένειες μπορεί να επικρατούν λόγω του συνδυασμού διαφόρων παραγόντων όπως η μειωμένη διατροφή σε Se και η υψηλή οξειδωτική πίεση σε συνδυασμό με τη χαμηλή δραστηριότητα της GSHPx και τις ανεπαρκείς θρεπτικές ουσίες

1.1.14.2 Σελήνωση

Μία ελλιπής διατροφή σε Se οδηγεί σε διάφορες ασθένειες ενώ μια υπερβολική πρόσληψη του στοιχείου αυτού οδηγεί στη δηλητηρίαση ή την σελήνωση^{24,32}. Η σελήνωση εμφανίζεται σε περιοχές όπου το έδαφος περιέχει υψηλά ποσά Se (μέχρι 84 mg Se / kg). Οι άνθρωποι που καταναλώνουν τα φρούτα και τα λαχανικά που αναπτύσσονται σε αυτά τα εδάφη, καταναλώνουν έναν υψηλό ποσό Se, με συνέπεια την δηλητηρίαση. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται στην περίπτωση της σελήνωσης είναι: απώλεια μαλλιών, εύθραυστα νύχια, ανωμαλίες του νευρικού συστήματος, αναφυλαξία του δέρματος, γαστρεντερικές διαταραχές και αναπνοή με μυρωδιά σκόρδου.

Ένας άλλος τύπος δηλητηρίασης είναι αυτός που προκαλείται από την υπερβολική χρήση συμπληρωμάτων. Τα συμπτώματα της δηλητηρίασης αυτής περιλαμβάνουν τη ναυτία, τον εμετό, την αναπνοή με μυρωδιά σκόρδου³⁰, τα εύθραυστα νύχια, τις απώλειες μαλλιών και την οδοντική αποσύνθεση.

1.1.14.3 Σελήνιο στο αίμα

Περίπου το 75% του συνολικού Se βρίσκεται στο αίμα. Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης συχνά μετράται σε ολόκληρο το αίμα, καθώς αυτή η παράμετρος είναι καλός δείκτης Se. Πειραματική μελέτη απέδειξε ότι οι συγκεντρώσεις του Se στο πλάσμα ή τον ορό του αίματος είναι αντίστοιχα $53 \pm 20,7$ και $161 \pm 19 \mu\text{g Se} / \text{L}$ ³³.

1.1.14.4 Σελήνιο στα ούρα

Σχεδόν όλο το σελήνιο που χωνεύετε (70-100%) απορροφάται από το έντερο. Αυτό υποδηλώνει ότι η ποσότητα του σεληνίου που απορροφάται από το ανθρώπινο σώμα, στην ουσία εξαρτάται από την βιοδιαθεσιμότητα των ειδών του σεληνίου και την συγκέντρωσή τους. Το σελήνιο κυρίως (50-70%) εκκρίνεται στα ούρα μέσω των νεφρών, στα υπολείμματα μέσω της γαστρεντερικής περιοχής και στον εκπνευσμένο αέρα μέσω των πνευμόνων. Η έκκριση του σεληνίου μέσω της αναπνοής λαμβάνει μέρος μόνο όταν η πρόσληψη είναι εξαιρετικά υψηλή³⁰.

1.1.14.5 Σελήνιο στο γάλα θηλασμού

Τα επίπεδα Se στο ανθρώπινο γάλα θηλασμού, οφείλονται κυρίως στις ποικίλες τιμές της πρόσληψης του Se μέσω της τροφής. Η συγκέντρωση του Se στο γάλα θηλασμού ανταποκρίνεται στο οργανικό και ανόργανο συμπλήρωμα Se. Μία πειραματική μελέτη απέδειξε ότι το επίπεδο του Se στο γάλα θηλασμού στις γυναίκες κυμαινόταν μεταξύ 13-33 $\mu\text{g} / \text{L}$. Το Se κυρίως εμφανίζεται στο γάλα θηλασμού σαν ένα συστατικό των πρωτεϊνών. Μόνο μία μικρή ποσότητα Se βρίσκεται υπό τη μορφή λιπιδίων. Επίσης το Se στο γάλα θηλασμού βρίσκεται σαν υπεροξειδάση της γλουταθειόνης³⁴. Η έκκριση του Se από το γάλα θηλασμού είναι φυσιολογική και προστατεύει τα βρέφη από την σελήνωση.

1.1.14.6 Σελήνιο στα όργανα του σώματος

Εκτιμήσεις απέδειξαν ότι τα είδη Se, αποθηκεύονται σε όργανα του σώματος και αργά ή γρήγορα μετατρέπονται σε λειτουργικές, δραστικές μορφές. Η υψηλότερη συγκέντρωση Se βρίσκεται: νεφρά > συκώτι > σπλήνα > όρχεις > μυς της καρδιάς > πνεύμονες > εγκέφαλος³⁵. Το συκώτι γενικά θεωρείται σαν πολύ καλός δέκτης Se. Η συγκέντρωση του Se στο ανθρώπινο συκώτι κυμαίνεται μεταξύ 0,2-2,3 mg / kg υγρό βάρος και στους νεφρούς κυμαίνεται μεταξύ 0,75 mg/kg (περιοχές χαμηλές σε Se) και πάνω από 1,50 mg/kg (περιοχές υψηλές σε Se). Το Se το οποίο βρίσκεται στο μυ της καρδιάς μπορεί να είναι τόσο χαμηλό όσο 0,06 mg/kg (άτομα που υποφέρουν από καρδιομυοπάθειες). Οι συγκεντρώσεις του Se στους πνεύμονες κυμαίνονται μεταξύ 0,10-0,21 mg/kg ¹⁰.

1.1.15 Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη

Οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από δομικά συστατικά τα οποία δεν είναι αμετάβλητα, αλλά συνεχώς αποικοδομούνται είτε αποσυντίθενται. Οι ύλες οι οποίες βρίσκονται στα τρόφιμα και με τη λήψη τους συντελούν στη συντήρηση και ανάπτυξη του οργανισμού παρέχοντας τις απαραίτητες ενώσεις στον οργανισμό για να συνθέσει τα δομικά συστατικά του, ονομάζονται θρεπτικές ύλες.

Ένα σημαντικό διεθνές πρόβλημα είναι ο καθορισμός των ποσοτήτων των θρεπτικών υλών και της ενέργειας που πρέπει να λαμβάνονται σε καθημερινή βάση. Έτσι διάφοροι διεθνείς και επιστημονικοί οργανισμοί καθόρισαν τη Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (RDI), η οποία δηλώνει το μέσο όρο της ημερήσιας πρόσληψης θρεπτικών υλών που καλύπτει θεωρητικά τις ανάγκες όλων των υγιών ατόμων με κριτήριο τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών³⁶. Το μέσο επίπεδο πρόσληψης έχει καθορισθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, σε 55 μg / ημέρα.

Επίσης αναπτύχθηκε ο Καθορισμός Ανωτέρου Ασφαλούς Επιπέδου³⁶ (Tolerable Upper Intake Level, UL), όπου εκφράζει την ποσότητα που μπορεί να προσληφθεί ασφαλώς από μία τάξη θρεπτικών υλών (κυρίως για αυτές που σε μεγάλες δόσεις εμφανίζουν τοξικότητα πχ βιταμίνες). Το Ανώτερο Ασφαλές Επίπεδο έχει καθορισθεί σε 400 μg/ ημέρα.

1.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.2.1 Εισαγωγή

Αυτό το κεφάλαιο εξετάζει τις αρχές των διαφορετικών συστημάτων ανίχνευσης και διαχωρισμού. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στη χρήση των τεχνικών για τις αναλύσεις των ενώσεων Se, τα συγκεκριμένα προβλήματα που αναμένονται και πώς μπορούν να υπερνικηθούν.

1.2.1.1 Φασματομετρία Ατομικού Φθορισμού Παραγωγής Υδριδίων (HG - AFS)

Στην ατομική φασματομετρία φθορισμού (AFS) η ακτινοβολία από μια γραμμική ή μια συνεχή πηγή χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα άτομα σε μία υψηλότερη ηλεκτρονική κατάσταση. Η ακτινοβολία φθορισμού, που εκπέμπεται, μετρείται όταν τα άτομα επιστρέψουν στην επίγεια κατάσταση. Η ένταση της ατομικής ακτινοβολίας φθορισμού είναι ανάλογη της έντασης της διεγερμένης ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης των ατόμων του αναλύτη. Τα όρια ανίχνευσης μπορούν έτσι να βελτιωθούν, όταν χρησιμοποιείται μία έντονα διεγερμένη πηγή. Σε αυτό το σύστημα χρησιμοποιείται λυχνία κοίλης καθόδου, η οποία παράγει έντονο φάσμα, με ευρείες γραμμές. Η λυχνία, αποτελείται από μία άνοδο βολφραμίου και μία κυλινδρική κάθοδο

Ένα σύστημα AFS, αποτελείται από την κύρια πηγή, μία δεξαμενή ατόμων και ένα σύστημα ανίχνευσης για την μέτρηση της ακτινοβολίας φθορισμού³⁷. Τα όρια ανίχνευσης για σύστημα AFS, είναι χαμηλά, ιδιαίτερα για στοιχεία τα οποία έχουν υψηλές ενέργειες διέγερσης. Η ευαισθησία είναι ιδιαίτερα ευνοϊκή για τα στοιχεία τα οποία διαμορφώνουν τα πτητικά είδη.

Η παραγωγή υδριδίων(HG) σε συνδυασμό με την AFS είναι αρκετά ευαίσθητη τεχνική, για τον προσδιορισμό του Se. Είναι επίσης ένα σχετικά χαμηλού κόστους όργανο για σκοπούς ταυτοποίησης των στοιχείων.

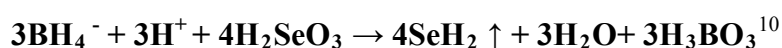
Η παραγωγή υδριδίων μπορεί να εκτελεσθεί αποτελεσματικά από την αντίδραση του οξινισμένου δείγματος με βορουδρίδιο του νατρίου (NaBH₄). Η γενική αντίδραση είναι:



όπου Em είναι ο αναλύτης με οξειδωτική κατάσταση m και EHn είναι το υδρίδιο του αναλύτη. Τα υδρίδια διαχωρίζονται από το υγρό, με ένα διαχωριστή αερίου-υγρού και οδηγούνται στη πηγή από το αδρανές αέριο (Ar). Τα υδρίδια ατομοποιούνται και ανιχνεύονται. Τα κύρια πλεονεκτήματα του HG-AFS είναι η εξαιρετική ευαισθησία, η ευρεία δυναμική περιοχή και το γεγονός ότι είναι σχετικά ελεύθερη από παρεμποδίσεις.

Στην περίπτωση του Se, μόνο το σεληνιώδες (Se σε οξειδωτική κατάσταση +4) μπορεί να μετατραπεί σε υδρίδιο (οξειδωτική κατάσταση -2).

Η αντίδραση με το βοροϋδρίδιο του νατρίου είναι:



1.2.1.2 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (AES)

Η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό περισσότερων από 60 μέταλλα και μεταλλοειδή. Κάθε στοιχείο έχει χαρακτηριστικές θεμελιώδεις και διεγερμένες στάθμες ενέργειας. Όταν διεγερθεί ένα στοιχείο απορροφά ενέργεια η οποία αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μήκος κύματος³⁸. Το μήκος κύματος λ, του απορροφημένου φωτός εξαρτάται από την θεμελιώδη και την διεγερμένη στάθμη του στοιχείου. Η ένταση της ακτινοβολίας του αντίστοιχου μήκους κύματος δίνει ποσοτικές πληροφορίες για το αντίστοιχο στοιχείο. Η διέγερση πραγματοποιείται είτε με την βοήθεια φλόγας (μίγμα καυσίμου-οξειδωτικού) είτε με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση η οποία συντελείται σε κυλινδρικό σωληνίσκο γραφίτη συνδεδεμένο με πηγή ηλεκτρικής ισχύος.

1.2.1.3 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα (FAAS)

Μία τεχνική η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του Se είναι η FAAS. Ο ρόλος της φλόγας είναι να μετατρέψει το μελετημένο στοιχείο σε ατομική μορφή. Οι λυχνίες που χρησιμοποιούνται στην ατομοποίηση με φλόγα βασίζονται στην αρχή της προανάμιξης στρωτής ροής: το κατάλληλο καύσιμο αέριο και το οξειδωτικό αναμειγνύονται και στη συνέχεια οδηγούνται στη φλόγα. Το δείγμα του αερολύματος αναμειγνύεται με τα αέρια πριν την καύση. Κατά τη διάρκεια της καύσης το αέριο έχει ατομοποιηθεί και τότε μπορεί να απορροφήσει ακτινοβολία. Το

υγρό δείγμα απορροφάται σε ειδικό ψεκαστήρα και εξέρχεται υπό μορφή σταγονιδίων, προωθούμενο από το οξειδωτικό αέριο³⁷. Επειδή το μέγεθος των σταγονιδίων είναι κρίσιμο στην φάση της μέτρησης, τελικά μόνο τα μικρά σταγονίδια κατευθύνονται στη φλόγα, ενώ τα μεγαλύτερα επανασυλλέγονται και απομακρύνονται σε κατάλληλη αποχέτευση. Συνήθως το νέφος που εισάγεται τελικά στη φλόγα περιέχει μόνο το 10-15% του αρχικού δείγματος. Αυτό είναι ένα από τα μειονεκτήματα της τεχνικής με φλόγα.

Οι ατομοποιητές φλόγας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση υγρών. Σήμερα οι πηγές της φλόγας ατομοποίησης επιτυγχάνουν υψηλό βαθμό αξιοπιστίας. Ωστόσο, απ' τη στιγμή που τα αέρια για τη φλόγα αραιώνουν το δείγμα, ένα σχήμα μακριάς φλόγας είναι επιθυμητό για να επιτευχθούν υψηλές ευαισθησίες. Μια μακριά φλόγα μπορεί να επιτευχθεί εύκολα χρησιμοποιώντας μία λυχνίας σχισμής.

1.2.1.4 Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με Ηλεκτροθερμικό Φούρνο Γραφίτη (GF-AAS)

Από τους τύπους των τεχνικών της ατομικής απορρόφησης χωρίς φλόγα η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι ο *θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη*. Η AAS χωρίς φλόγα είναι πολύ χρήσιμη όταν το μέγεθος του δείγματος είναι πολύ περιορισμένο, όταν το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης είναι απαραίτητο ή όταν χρειάζονται και τα δυο. Τυπικά σε AAS με φούρνο γραφίτη ο όγκος των δειγμάτων είναι 20-100μl ή όταν ένα από αυτά έχει να κάνει με στερεά δείγματα είναι 1-5 mg³⁸. Οι φούρνοι χρησιμοποιούνται πρωταρχικά για να ατομοποιήσουν στερεά, πυκνά εναιωρήματα και διαλύματα για την ατομική απορρόφηση.

Συνήθως αποτελείται από ένα σωλήνα γραφίτη με εσωτερική διάμετρο μερικών mm. Όταν ο σωλήνας του φούρνου ζεσταθεί με την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του γραφίτη η μέθοδος επίσης ονομάζεται *ηλεκτροθερμική ατομοποίηση*. Οι φούρνοι μπορούν να δεχτούν στο εσωτερικό τους μια μικρή πλάκα (εξέδρα) γραφίτη όπου τοποθετείται το δείγμα έτσι ώστε η θερμότητα από τα τοιχώματα του φούρνου να μην θερμαίνει απ' ευθείας το δείγμα. Το δείγμα θερμαίνεται αρχικά από ακτινοβολία που τείνει να παράγει περισσότερο ομοιόμορφη θερμότητα. Πρώτα θερμαίνονται τα τοιχώματα και μετά το δείγμα εξατμίζεται γεγονός που εμποδίζει το δείγμα να συμπυκνωθεί στην εσωτερική επιφάνεια του

φούρνου. Παρ' όλα αυτά ικανοποιητικές αναλύσεις μπορούν να επιτευχθούν και χωρίς την εξέδρα.

1.2.1.5 Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής (AES)

Ιστορικά η φασματομετρία ατομικής εκπομπής, βασίζεται στην ατομοποίηση και διέγερση με φλόγα, το ηλεκτρικό τόξο και τον ηλεκτρικό σπινθήρα^{37,38}. Οι τεχνικές αυτές βρίσκουν ακόμα σημαντικές εφαρμογές στο προσδιορισμό μεταλλικών στοιχείων. Ωστόσο σήμερα, οι πηγές πλάσματος είναι οι πιο ενδιαφέρουσες και οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες στη φασματομετρία ατομικής εκπομπής.

Οι τεχνικές φασματομετρίας εκπομπής πλάσματος, τόξου και σπινθήρα, προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις τεχνικές φλόγας και ηλεκτροθερμικής απορρόφησης. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων είναι η χαμηλότερη διαστοιχειακή παρεμπόδιση, που είναι άμεση συνέπεια των υψηλών θερμοκρασιών. Ένα άλλο πλεονέκτημα, των υψηλότερων ενεργειακά πηγών πλάσματος, είναι ότι αυτές επιτρέπουν τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων για στοιχεία που έχουν την τάση να σχηματίζουν θερμοανθεκτικές ενώσεις. Για τον προσδιορισμό του σεληνίου έχει χρησιμοποιηθεί συχνότερα η μέθοδος ICP-AES.

1.2.1.6 Ανάλυση ενεργοποίησης νετρονίων (Neutron activation analysis, NAA)

Η Ανάλυση Ενεργοποίησης νετρονίων, Neutron Activation Analysis (NAA) είναι πυρηνική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων συγκεντρώσεων στοιχείων σε μία τεράστια ποσότητα υλικών. Η NAA επιτρέπει διακριτή δειγματοληψία των στοιχείων, καθώς παραβλέπει τη χημική μορφή του δείγματος και αφοσιώνεται μόνο στο πυρήνα του. Η μέθοδος είναι βασισμένη στη πυρηνική ενεργοποίηση. Συχνά, οι διεγερμένοι πυρήνες μπορούν να αποσυντεθούν από εκπεμπόμενα σωματίδια (νετρόνια, πρωτόνια) παράγοντας ένα ισοδύναμο σε μάζα πυρήνα³⁹. Η NAA, έχει σαν κύριο πλεονέκτημα την εξαιρετική μείωση του χρόνου πειράματος και γενικά καλύτερη ευαισθησία και όρια ανίχνευση.

1.2.1.7 Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής - Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-AES)

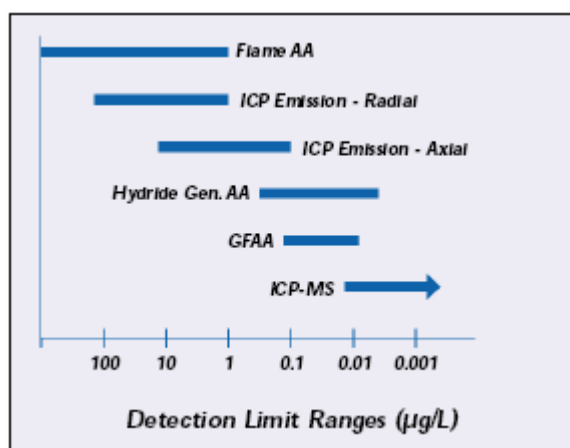
Η Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES), χρησιμοποιεί ως μέσο διεγέρσεως των ατόμων του αναλύτη, πλάσμα αργού το οποίο έχει εξαιρετική σταθερότητα, σε αντίθεση με τις παλαιότερες τεχνικές εκπομπής τόξου και εκκενώσεως. Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται μέσα στο πλάσμα, όπου (λόγω της υψηλής θερμοκρασίας) εξαερώνεται και ατομοποιείται. Τα διεγερμένα άτομα του αναλύτη εκπέμπουν ακτινοβολία, καθώς μεταπίπτουν στην βασική ενεργειακή τους κατάσταση. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στον υπολογισμό αυτής της ακτινοβολίας³⁷. Κάθε στοιχείο εκπέμπει ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, γεγονός που επιτρέπει την ταυτοποίησή του. Η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του στοιχείου στο προς ανάλυση δείγμα, γεγονός που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του στοιχείου.

1.2.1.8 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

Η τεχνική ICP-MS, έχει ως βασική αρχή της, την δημιουργία θετικά φορτισμένων ιόντων με την χρήση υψηλών θερμοκρασιών (5000-10000 K) στο πλάσμα. Το δείγμα, τυπικά σε υγρή μορφή, αντλείται στο σύστημα εισαγωγής δείγματος. Προκύπτει τότε ένα αερόλυμα, όπου βρίσκει το δρόμο του στη βάση του πλάσματος. Καθώς ταξιδεύει, διαμέσου των διαφόρων ζωνών θερμότητας του πλάσματος του πυρσού, εξαερώνεται, ατομοποιείται και κατόπιν ιονίζεται. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδρομής, το δείγμα μετατρέπεται από υγρό αερόλυμα, σε στερεά σωματίδια και στη συνέχεια σε αέριο. Όταν τελικά φθάσει στην αναλυτική ζώνη του πλάσματος σε θερμοκρασίες περίπου 6000-7000 K, επικρατεί σαν διεγερμένο άτομο (κατιόν), παρουσιάζοντας την στοιχειακή σύνθεση του δείγματος. Τα ιόντα που παράγονται στο πλάσμα, μεταφέρονται και διαχωρίζονται από το λόγο μάζα / φορτίο, χρησιμοποιώντας φασματόμετρο μάζας^{37,38}. Η διαμόρφωση τέτοιων μεγάλων αριθμών θετικά φορτισμένων ιόντων, επιτρέπουν στο ICP-MS, να επιτυγχάνει όρια ανίχνευσης σε επίπεδο συγκέντρωσης, ppt. Τα πλεονεκτήματα του ICP-MS, περιλαμβάνουν την πολυστοιχειακή και πολυισοτοπική ανάλυση και υψηλή ευαισθησία με μία ευρεία γραμμική δυναμική περιοχή³⁷. Ο προσδιορισμός του σεληνίου με το ICP-MS, δίνει συγκριτικά μειωμένη ευαισθησία και αυτό λόγω της

υψηλής πρώτης ενέργειας ιονισμού του σεληνίου και των ισοβαρικών και πολυατομικών παρεμποδίσεων, οι οποίες ταλανίζουν τα ισότοπα.

Οι παρεμποδίσεις μπορούν να ξεπεραστούν εάν χρησιμοποιηθεί όργανο ICP-MS εξοπλισμένο με κυψελίδα πρόσκρουσης, η οποία τοποθετείται μεταξύ φακών εστίασης και τετραπόλου. Τότε ένα αδρανές αέριο ή μίγμα αερίων, εισάγεται και τα ιόντα του δείγματος, βομβαρδίζονται από τα συγκρουόμενα μόρια του αερίου και τελικά θραυσματοποιούνται. Επίσης οι παρεμποδίσεις μπορούν να μειωθούν από τη χρήση αναλυτή υψηλής διακρισιμότητας δηλαδή να έχει την ικανότητα ο αναλυτής να αποδίδει ξεχωριστά σήματα για ιόντα με μικρή διαφορά μάζας.



Σχήμα 1.7 Εύρος ορίων ανίχνευσης σε $\mu\text{g} / \text{l}$ για τις κύριες τεχνικές Ατομικής Φασματομετρίας.

(www.groco.is/.../files/manualar_fra_birgjum/pe/icp_7_mai_2008/gde_atomicspectroscopytechniquesapps.pdf)

1.2.2 Διαχωρισμός Se με τη χρήση HPLC-ICP-MS

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης αποτελεί την πλέον συνηθέστερη τεχνική διαχωρισμού των ενώσεων Se. Το πλεονέκτημά της είναι οι διαχωρισμοί μη-πτητικών ειδών Se. Επίσης η HPLC, αποφεύγει πιθανές θερμικές αποσυνθέσεις. Χρησιμοποιώντας την HPLC που είναι συζευγμένη με ICP-MS για τον προσδιορισμό του σεληνίου, τα όρια ανίχνευσης είναι γενικά αρκετά χαμηλά.

Η ευκολία σύζευξης των συστημάτων HPLC και ICP-MS, καθώς και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, καθιστούν το ICP-MS μία επιτυχημένη τεχνική ανίχνευσης για τις αναλύσεις διαχωρισμού του Se. Οι περισσότερες μέθοδοι διαχωρισμού της HPLC, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση διαχωρισμού του Se με το ICP-MS είναι η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η χρωματογραφία ιοντικού ζεύγους, η χρωματογραφία αποκλεισμού μοριακού μεγέθους, η χειρόμορφη χρωματογραφία και άλλες.

1.2.2.1 Αντίστροφης φάσης και ιοντικού ζεύγους HPLC

Οι χρωματογραφίες, απλής αντίστροφης φάσης και ιοντικού ζεύγους της HPLC, χρησιμοποιούνται συχνά, για την ανάλυση διαχωρισμού του σεληνίου. Στην απλή αντίστροφης φάσης HPLC, μια υδατική κινητή φάση χρησιμοποιείται όπου μπορεί να περιέχει μία μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη. Ο διαχωρισμός του αναλύτη πραγματοποιείται με τη χρήση στατικών φάσεων που έχουν επιφάνεια λιγότερο πολική από την κινητή φάση³⁹. Στην αντίστροφης φάσης- ιοντικού ζεύγους χρωματογραφία, ένα αντισταθμιστικό ιόν, προστίθεται στη κινητή φάση και ένα δευτερεύων χημικό ισοδύναμο χρησιμοποιείται για να ρυθμίσει την επιλεκτικότητα και την κατακράτηση του αναλύτη. Η χρωματογραφία ιοντικού ζεύγους, διευκολύνει τον διαχωρισμό των ιοντικών ειδών, όπως και των μη-φορτισμένων μοριακών ειδών, όπου αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα. Ο διαχωρισμός του αναλύτη από την ιοντικού ζεύγους χρωματογραφία, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως, συγκέντρωση του buffer, το pH, η ιοντική δύναμη της κινητής φάσης, η υδροφοβικότητα του αντισταθμιστικού ιόντος και οι ιδιότητες της στατικής φάσης. Η επιλογή της στατικής φάσης βασίζεται στον αναλύτη.

Στην ανάλυση σεληνοαμινοξέων, χρησιμοποιούνται στήλες μεγάλης αλυσίδας της στατικής φάσης, ενώ στην ανάλυση σεληνοπρωτεϊνών ή μεγάλων πεπτιδίων, χρησιμοποιούνται στήλες με στατική φάση μικρής αλυσίδας.

1.2.2.2 Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

Σε αυτού του είδους τη χρωματογραφία (που διακρίνεται επιμέρους σε κατιονανταλλαγής και ανιονανταλλαγής), ο μηχανισμός διαχωρισμού βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb ανάμεσα στα ιόντα του αναλύτη και στις φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, που βρίσκονται προσαρτημένες στο υλικό στήριξης της στήλης και φέρουν αντίθετο φορτίο από αυτό του αναλύτη³⁸. Το υλικό στήριξης της στατικής φάσης αποτελείται συνήθως από πολυστυρένιο, αιθυλοβινυλοβενζόλιο ή μέθυλακρυλικές ρητίνες. Στη χρωματογραφία κατιονανταλλαγής οι θετικά φορτισμένες ενώσεις κατακρατούνται στη στήλη, λόγω αλληλεπίδρασης με τις αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες (π.χ. φωσφορικό οξύ) που φέρει η στατική φάση. Αντίθετα, στη χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, τα ανιονικά είδη είναι εκείνα που κατακρατούνται, λόγω αλληλεπίδρασης με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης (π.χ. τεταρτοταγές αμμωνιακό κατιόν).

1.2.2.3 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

Η Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, χρησιμοποιείται συχνά στο διαχωρισμό του σεληνίου, ώστε να χαρακτηρίσει ποικίλες σεληνοπρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικές μήτρες δείγματος. Η SEC, είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό βιοχημικών μακρομορίων, καθώς συνδέονται με διάφορες σεληνοπρωτεΐνες. Στη SEC, ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε μία πορώδη μη-απορροφητική στατική φάση, με πόρους σχεδόν στο ίδιο μέγεθος με τις διαστάσεις του διαλύματος του αναλύτη³⁷.

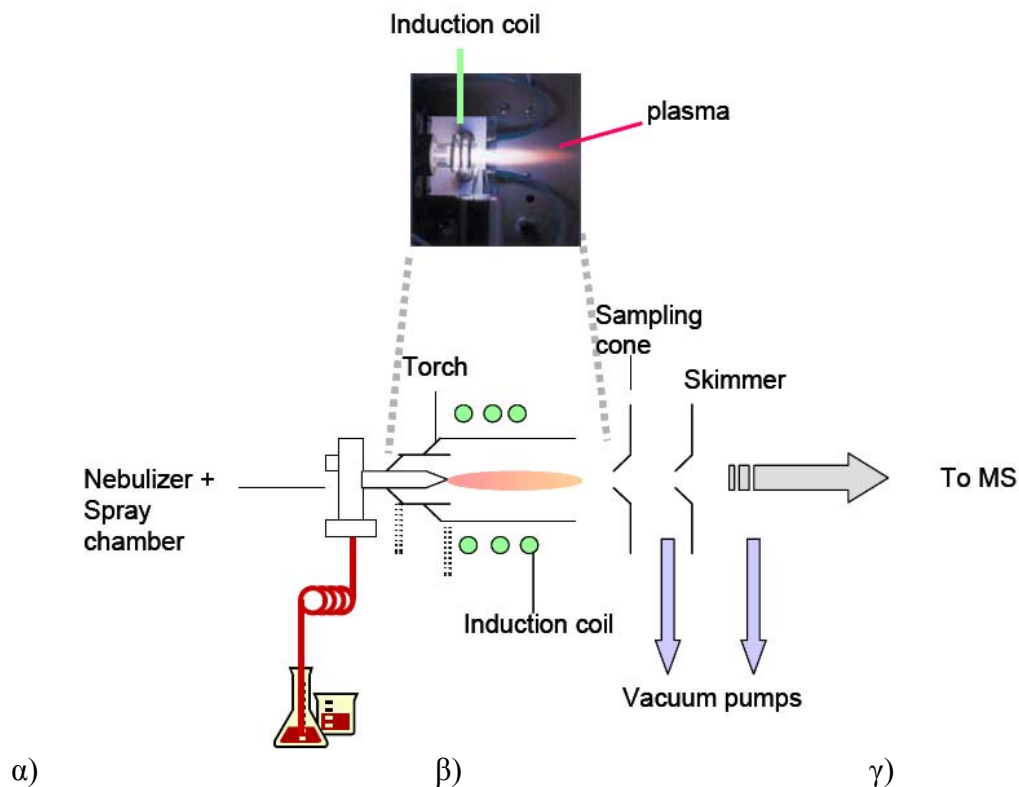
1.3 Φασματομετρία Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

Το Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα, είναι μία δυναμική τεχνική ανίχνευσης και προσδιορισμού πολύ μικρών επιπέδων ιχνοστοιχείου. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας σε ένα ποιοτικό έλεγχο. Επίσης είναι μία άριστη τεχνική για τον προσδιορισμό των ιχνοστοιχείων σε μια ποικιλομορφία από μήτρες. Όπως όλες οι τεχνικές έτσι και αυτή, έχει μερικά κύρια πλεονεκτήματα και μερικά μειονεκτήματα.

Το ICP-MS χαρακτηρίζεται από χαμηλά όρια ανίχνευσης (ng / L), μία ευρεία γραμμική δυναμική περιοχή, τη πολυστοιχειακή ικανότητα και μία υψηλή απόδοση για τα δείγματα. Μπορεί επίσης, εξοπλισμένο με την περισταλτική αντλία, να χρησιμοποιείται για στοιχειακή ανάλυση. Το ICP-MS μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο για ανίχνευση συγκεκριμένων ειδών εάν προηγείται μία τεχνική διαχωρισμού. Σε αυτή την διαμόρφωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας ευαίσθητος πολυστοιχειακός on-line ανιχνευτής.

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα του είναι οι φασματοσκοπικές και μη-φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις οι οποίες συζητούνται παρακάτω.

Στο ICP-MS, η υψηλή αποδοτικότητα της ατομοποίησης και διαμόρφωσης ιόντος του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, συνδέεται με την ιδιαίτερη και ευαίσθητη ικανότητα ανίχνευσης, η οποία προσφέρεται από την φασματομετρία μάζας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ICP λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση, καθώς το MS λειτουργεί υπό υψηλό κενό.



Σχήμα 1.8 Παραπάνω φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση του ICP-MS , η οποία αποτελείται από τρία βασικά μέρη: α) Το σύστημα εισαγωγής υγρού δείγματος (Αχιλλείος πτέρνα), β) η πηγή ιόντων (πλάσμα αργού) και γ) ο αναλυτής μάζας¹⁰.

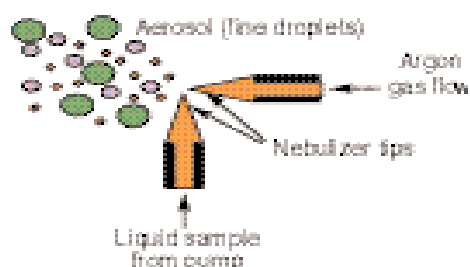
1.3.1 Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής υγρού δείγματος αποκαλείται ως η Αχιλλείος πτέρνα του ICP-MS, δηλαδή το ασθενές σύστημα του οργάνου, αφού μόνο το 1 - 2% του δείγματος βρίσκει το δρόμο του στο πλάσμα και το υπόλοιπο απομακρύνεται μέσω των αποβλήτων. Ο μηχανισμός εισαγωγής ενός υγρού δείγματος στο αναλυτικό πλάσμα, διαχωρίζεται σε δύο τάξεις: α) Την δημιουργία αερολύματος χρησιμοποιώντας εκνεφωτή και β) την επιλογή σταγονιδίων μέσω του θαλάμου εκνέφωσης.

1.3.1.1 Δημιουργία Αερολύματος

Κύρια λειτουργία του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η δημιουργία ενός λεπτού αερολύματος, όπου επιτυγχάνεται με ένα εκνεφωτή και ένα θάλαμο ψεκασμού. Το δείγμα αντλείται μέσω της περισταλτικής αντλίας στον εκνεφωτή, με ταχύτητα ροής 1 ml/min. Η περισταλτική αντλία, είναι μια μικρή αντλία με πολλούς κυλίνδρους που περιστρέφονται με την ίδια ταχύτητα. Η σταθερά κίνησης και η πίεση των κυλίνδρων στα σωληνάκια, οδηγούν το δείγμα στον εκνεφωτή.

Τα πλεονεκτήματα της περισταλτικής αντλίας, είναι ότι εξασφαλίζει την σταθερή ροή του υγρού, ασχέτως των διαφορών στη ταχύτητα μεταξύ του δείγματος, προτύπου και τυφλού. Όταν το δείγμα εισάγεται στον εκνεφωτή, το υγρό διασπάται σε λεπτό αερόλυμα από την δράση της ταχύτητας ροής αερίου αργού (1 L / min), συνθλίβοντας το υγρό σε μικρά σταγονίδια. Επειδή το πλάσμα είναι ανεπαρκές στο διαχωρισμό των μεγάλων σταγόνων, ο θάλαμος ψεκασμού λειτουργεί αρχικά στην επιλογή των μικρών σταγονιδίων και την είσοδό τους στο πλάσμα. Ο δευτερεύων σκοπός του θαλάμου είναι η εξομάλυνση των παλμών που επικρατούν κατά την διάρκεια της διαδικασίας εκνέφωσης και που κυρίως οφείλονται στη περισταλτική αντλία. Καθώς εισέρχεται το αερόλυμα στο θάλαμο εκνέφωσης, οι σταγόνες ταξιδεύουν κατά μήκος του σωλήνα όπου λόγω βαρύτητας τα μεγάλα σταγονίδια (με διάμετρο < 10 μm) πέφτουν και απομακρύνονται προς τα απόβλητα, ενώ τα μικρά σταγονίδια (με διάμετρο 5 – 10 μm) μεταφέρονται στον εισαγωγέα δείγματος και καταλήγουν στο πυρσό του πλάσματος⁴⁰. Τελικά, η κύρια λειτουργία του θαλάμου εκνέφωσης είναι να επιτρέψει στα μικρότερα σταγονίδια να εισέλθουν στο πλάσμα για διαχωρισμό, ατομοποίηση και τελικά ιονισμό των στοιχειακών συστατικών του δείγματος.



Σχήμα 1.9 Αναπαράσταση της δημιουργίας αερολύματος με τη βοήθεια εκνεφωτή⁴¹

1.3.1.2 Εκνεφωτές

Ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος εκνεφωτής για το ICP-MS είναι ο πνευματικός εκνεφωτής, όπου χρησιμοποιεί τις μηχανικές δυνάμεις μίας ροής αερίου (αργού σε πίεση 20-30 psi) για να δημιουργήσει το αερόλυμα δείγματος. Οι περισσότερο κοινοί πνευματικοί εκνεφωτές είναι ο ομόκεντρος, ο μικροομόκεντρος, ο μικροροής και ο διασταυρούμενης ροής⁴¹. Είναι συνήθως φτιαγμένοι από γυαλί, όμως άλλα υλικά, όπως διάφορα είδη πολυμερών, είναι περισσότερο διαδεδομένα λόγω της διάβρωσης των δειγμάτων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στο όργανο ομόκεντρος εκνεφωτής, που είναι κατάλληλος για την ανάλυση δειγμάτων τροφής.

- Ομόκεντρος

Στον ομόκεντρο εκνεφωτή, το διάλυμα εισάγεται μέσω του τριχοειδούς σωλήνα σε μία χαμηλής πίεσης περιοχή, η οποία δημιουργείται από μία ταχεία ροή αερίου αργού. Η χαμηλή πίεση και η ταχεία ροή αερίου, συνδέονται για να διασπάσουν το διάλυμα σε αερόλυμα, όπου δημιουργείται στο τελευταίο άνοιγμα της άκρης του εκνεφωτή. Οι ομόκεντροι πνευματικοί εκνεφωτές⁴¹ μπορούν να δώσουν εξαιρετική ευαισθησία και σταθερότητα, συγκεκριμένα με καθαρά διαλύματα. Οποσδήποτε τα μικρά ανοίγματα μπορούν να μπλοκαρισθούν από προβλήματα φραγμού, ιδιαίτερα εάν αναλύονται δείγματα πολύπλοκης μήτρας.

- Διασταυρούμενης ροής

Για δείγματα, τα οποία περιέχουν πολύπλοκη μήτρα ή μικρές ποσότητες αδιάλυτου υλικού, ο εκνεφωτής διασταυρούμενης ροής ίσως είναι η κατάλληλη επιλογή. Το αέριο αργό κατευθύνεται σε ορθή γωνία στο τριχοειδή, σε αντίθεση με τον ομόκεντρο που η ροή αργού είναι παράλληλα στο τριχοειδή. Οι διασταυρούμενης ροής εκνεφωτές γενικά δεν είναι τόσο αποδοτικοί όσο είναι οι ομόκεντροι στη δημιουργία πολύ μικρών σταγονιδίων που χρειάζονται για την ανάλυση με ICP-MS. Οποσδήποτε, η μεγάλη διάμετρος του υγρού τριχοειδούς και η μεγάλη απόσταση των εισαγωγέων υγρού και αερίου μειώνει τα προβλήματα φραγμού.



Σχήμα 1.10 Σχηματική αναπαράσταση ενός πνευματικού ομόκεντρου εκνεφωτή (<http://perso.wanadoo.fr/courtage.analyses.services/icp/productsge/nebs/Slurries/ar301fs6.html>).

1.3.1.3 Θάλαμος Εκνέφωσης

Στην οργανολογία του ICP-MS, χρησιμοποιούνται 2 βασικοί θάλαμοι εκνέφωσης: α) Διπλής διόδου β) Κυκλωνικός θάλαμος εκνέφωσης

Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα η λειτουργία του θαλάμου εκνέφωσης είναι να απορρίπτει τα μεγάλου μεγέθους αερολύματα και επίσης να εξομαλύνει τους παλμούς οι οποίοι δημιουργούνται από την περισταλτική αντλία. Επίσης κάποιοι θάλαμοι εκνέφωσης του ICP-MS είναι εξαιρετικά ψυκτικοί (2-5 °C) για θερμική σταθερότητα του δείγματος και ελαχιστοποίηση της ποσότητας του διαλύτη που εισέρχεται στο πλάσμα. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτού είναι η αναγωγή των ειδών οξειδίου και η ικανότητα να απομακρύνει πτητικούς οργανικούς διαλύτες.

Συχνότερα χρησιμοποιείται ο θάλαμος διπλής διόδου, ο οποίος αποτελείται από δύο ομόκεντρους σωλήνες. Τα μικρά σταγονίδια συλλέγονται καθώς το αερόλυμα κατευθύνεται στο κεντρικό σωλήνα. Οι μεγαλύτερες σταγόνες απομακρύνονται από το σωλήνα λόγω βαρύτητας και εξέρχονται από το θάλαμο εκνέφωσης μέσω του σωλήνα αποβλήτων.

Ο κυκλωνικός θάλαμος εκνέφωσης βασίζει την λειτουργία του στη φυγόκεντρο δύναμη. Οι σταγόνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, υπό την επίδραση δίνης, η οποία δημιουργείται από την εφαιπτόμενη ροή του αερολύματος του δείγματος και του αερίου αργού μέσα στο θάλαμο. Τα μικρότερα σταγονίδια κατευθύνονται με το ρεύμα αερίου στο ICP-MS, καθώς οι μεγαλύτερες σταγόνες, χτυπούν στα τοιχώματα και απομακρύνονται.

1.3.2 Πηγή Ιόντων

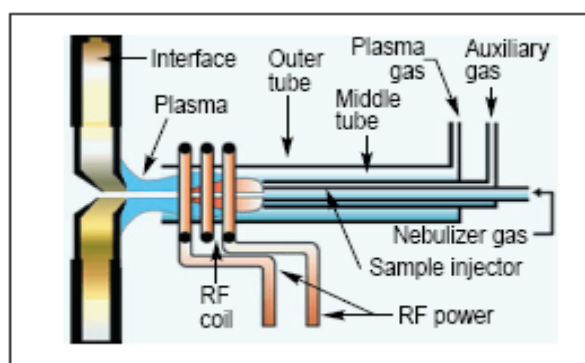
Για την δημιουργία της πηγής ιόντων του ICP-MS, απαιτούνται τρία βασικά τμήματα: α) Πυρσός πλάσματος (torch) β) ένα σπείραμα ραδιοσυχνοτήτων (RF coil) και μία γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF power).

Ο πυρσός αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία. Τον εξωτερικό σωλήνα (outer tube), τον ενδιάμεσο σωλήνα (middle tube) και το κεντρικό σωλήνα (injector tube)⁴¹. Για να δημιουργηθεί το πλάσμα, χρησιμοποιείται αέριο αργό, το οποίο περνά μεταξύ του εξωτερικού και ενδιάμεσου σωλήνα με ροή ταχύτητας 12-17 L / min, το οποίο αποσκοπεί στη διατήρηση και σταθεροποίηση του πλάσματος. Επιπλέον προστατεύει τον εξωτερικό σωλήνα από την υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο πλάσμα. Μια δεύτερη ροή αερίου, το βοηθητικό αέριο (auxiliary gas)⁴¹, διέρχεται μεταξύ του ενδιάμεσου και κεντρικού σωλήνα με ταχύτητα ροής 1 L / min, όπου βοηθά την κατεύθυνση του πλάσματος στο πυρσό. Αυτή η ροή αργού προστατεύει τον κεντρικό σωλήνα, εμποδίζοντας την υπερθέρμανση του από τις υψηλές θερμοκρασίες του πλάσματος. Μία τρίτη ροή αερίου (nebulizer gas)⁴¹, η οποία διέρχεται από τον εκνεφωτή με ταχύτητα ροής 1 L / min, μεταφέρει το δείγμα με τη μορφή μίας λεπτής σταγόνας αερολύματος και συμβάλει στην εισαγωγή του στο κεντρικό τμήμα του πλάσματος.

Ο πυρσός πλάσματος είναι τοποθετημένος οριζόντια στο κέντρο ενός υδρόψυκτου σπειράματος (RF coil), περίπου 10-20 mm, από την σύνδεση του με την γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (ισχύος 1-5 kW και συχνότητας 27- 41 MHz)⁴¹. Το επαγωγικό σπείραμα, τροφοδοτείται από την γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων, με εναλλασσόμενο ρεύμα το οποίο δημιουργεί ισχυρό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στα άκρα του πυρσού. Με την ροή του αερίου αργού μέσω του πυρσού, ένας σπινθήρας υψηλής τάσης, προστίθεται στο αέριο και προκαλεί την απομάκρυνση μερικών ηλεκτρονίων από τα άτομα αργού τους. Αυτά τα ηλεκτρόνια, τα οποία συσσωρεύονται στο μαγνητικό πεδίο, προσκρούονται σε άλλα άτομα αργού, απομακρύνοντας και άλλα ηλεκτρόνια. Αυτή η πρόσκρουση προκαλεί ιονισμό του αργού, συνεχίζοντας μία αλυσίδα αντίδρασης, διασπώντας το αέριο σε άτομα αργού, ιόντα αργού⁴⁰ και ηλεκτρόνια δημιουργώντας ότι είναι γνωστό σαν επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα. Το αερόλυμα του δείγματος καθώς εξέρχεται του κεντρικού σωλήνα, κινείται σε τέτοια ταχύτητα όπου δημιουργεί μία οπή στο κέντρο του πλάσματος. Διέρχεται μετά μέσω αριθμού φυσικών αλλαγών, ξεκινώντας στη

προθερμαινόμενη ζώνη και συνεχίζοντας μέσω της ζώνης ακτινοβολίας τελικά γίνεται ένα θετικά φορτισμένο ιόν στην αναλυτική ζώνη⁴¹.

Για να εξηγηθεί με πιο απλό τρόπο, η υγρή σταγόνα μετατρέπεται σε στερεό υπόλειμμα, καθώς το στερεό δείγμα κινείται στο πλάσμα, μετατρέπεται σε αέριο και τελικά ατομοποιείται. Η τελική διαδικασία της μετατροπής του ατόμου σε ιόν επιτυγχάνεται με την σύγκρουση των ουδέτερων ατόμων του στοιχείου με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια καθώς και με τα κατιόντα αργού. Το ιόν τότε εξέρχεται του πλάσματος και κατευθύνεται στα σημεία διασύνδεσης του φασματομέτρου μάζας.



Σχήμα 1.11 Λεπτομερής απεικόνιση του πυρσού και του σπειράματος ραδιοσυχνότητας⁴².

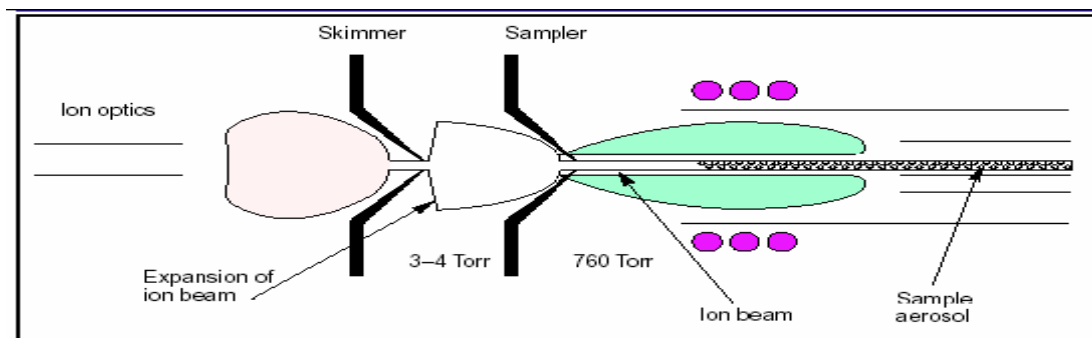
1.3.3 Σημεία Διασύνδεσης

Ο σκοπός της περιοχής διασύνδεσης είναι η αποδοτική και με ηλεκτρική ακεραιότητα, μεταφορά των ιόντων από το πλάσμα, που βρίσκεται σε ατμοσφαιρική πίεση (760 Torr), στον αναλυτή μαζών που βρίσκεται σε πίεση 10^{-6} Torr⁴³.

Η περιοχή διασύνδεσης αποτελείται από δύο μεταλλικούς κώνους με πολύ μικρά ανοίγματα, που διατηρούνται σε πίεση (κενό) 2 Torr περίπου, με μία μηχανική αντλία. Όταν τα ιόντα δημιουργηθούν στο πλάσμα, περνούν μέσω του πρώτου κώνου, γνωστός ως κώνος δειγματοληψίας (sampler cone), που έχει άνοιγμα διαμέτρου 0,8 – 1,2 mm. Από εκεί ταξιδεύουν σε μικρή απόσταση στο κώνο αποκορυφωτή (skimmer cone) που είναι γενικά οξύτερος και έχει μικρότερο άνοιγμα (0,4-0,8 mm). Τα ιόντα στη συνέχεια εξέρχονται από τον αποκορυφωτή, όπου κατευθύνονται προς τους φακούς εστίασης και οδηγούνται τελικά στο φασματομέτρο μάζας³². Οι δύο κώνοι είναι συνήθως κατασκευασμένοι από νικέλιο, αλλά επίσης

μπορεί να φτιάχονται και από άλλα υλικά όπως πλατίνα που είναι περισσότερο ανθεκτικά στα υγρά που διαβρώνουν.

Προκειμένου να μειωθούν οι συνέπειες των υψηλών θερμοκρασιών του πλάσματος στους κώνους, το κάλυμμα της περιοχής διασύνδεσης είναι υδρόψυκτο και κατασκευασμένο από υλικά όπως χαλκός και αλουμίνιο ώστε να σπαταλούν ενέργεια εύκολα.



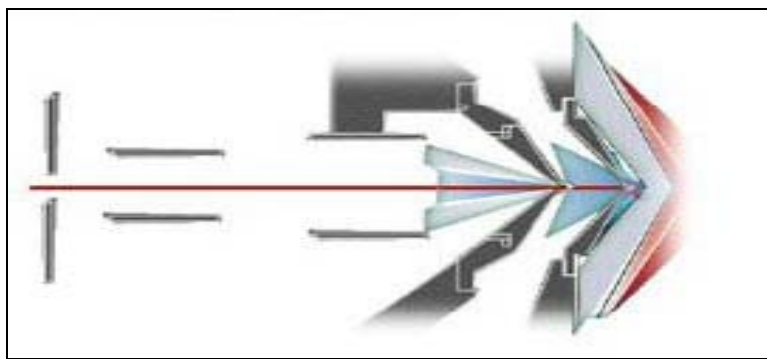
Σχήμα 1.12 Σχηματική παράσταση του συστήματος σύζευξης του πυρσού με το φασματομέτρο μάζας⁴³.

1.3.4 Φακοί εστίασης

Οι φακοί εστίασης είναι τοποθετημένοι μεταξύ του κώνου αποκορυφωτή και του φασματομέτρου μάζας, όπου αποτελούνται από ένα ή περισσότερους ηλεκτροστατικούς φακούς κατασκευασμένους από σειρά μεταλλικών πλακιδίων, δίσκων ή κυλίνδρων, στους οποίους εφαρμόζονται υψηλά δυναμικά.

Η λειτουργία του συστήματος των φακών εστίασης είναι η μεταφορά ιόντων από ένα αφιλόξενο περιβάλλον του πλάσματος σε ατμοσφαιρική πίεση μέσω των κώνων διασύνδεσης και κατεύθυνση τους, στον αναλυτή μάζας, ο οποίος βρίσκεται υπό υψηλή πίεση με ταυτόχρονο αποπροσανατολισμό των συστατικών της μήτρας του δείγματος τα οποία όντας σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τον αναλυτή, επιφέρουν μεγάλες παρεμπόδισεις κατά τον προσδιορισμό του⁴⁷.

Ένας δεύτερος ρόλος των φακών εστίασης είναι η παρεμπόδιση της εισόδου των σωματιδίων, ουδέτερων ειδών και φωτονίων στον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Αυτά τα είδη προκαλούν αστάθεια του σήματος και συμβάλλουν στην ανάπτυξη θορύβου του σήματος, επηρεάζοντας την παρουσίαση του συστήματος.



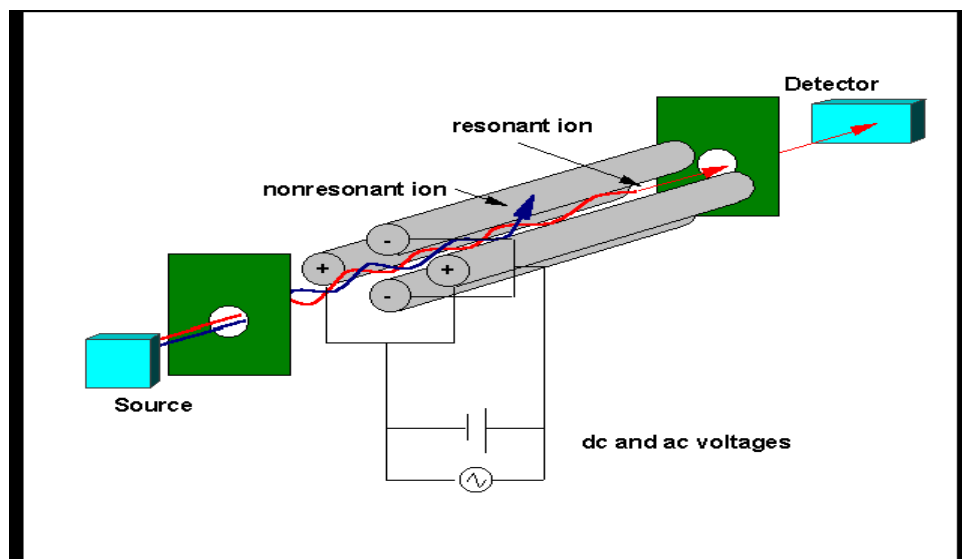
Σχήμα 1.13 Σχηματική Αναπαράσταση των φακών εστίασης (<http://www.uea.ac.uk/env/technical/lab/icp-ms1.shtml>).

1.3.6 Φασματόμετρο μάζας

Ο αναλυτής μάζας τοποθετείται μεταξύ των φακών εστίασης και του ανιχνευτή και διατηρείται σε πίεση 10^{-6} Torr με μία τουρμπομοριακή αντλία. Υποθέτοντας ότι τα ιόντα εξέρχονται από τους φακούς εστίασης στην βέλτιστη κινητική ενέργεια, είναι και έτοιμα να διαχωριστούν σύμφωνα με το λόγο μάζα/φορτίο από τον αναλυτή μάζας. Ο περισσότερο διαδεδομένος αναλυτής μαζών είναι το τετράπολο ή αλλιώς τετραπολικός αναλυτής μαζών⁴⁵. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους του ίδιου μήκους και διαμέτρου, οι οποίες δρουν σαν ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Τοποθετώντας ένα πεδίο συνεχούς ρεύματος (dc) στο ένα ζεύγος και ένα πεδίο ραδιοσυχνότητας (rf) στο αντίθετο ζεύγος, ιόντα της επιλεγμένης μάζας, επιτρέπεται να περάσουν διαμέσου των ράβδων στον ανιχνευτή, ενώ άλλα ιόντα εξέρχονται από το τετράπολο.

Στις δύο αντίθετες ράβδους εφαρμόζεται δυναμικό $+ (U + V\cos(\omega t))$ ενώ στις άλλες δύο $- (U + V\cos(\omega t))$ όπου U η συνεχής τάση και $V\cos(\omega t)$ αναπαριστά ένα πεδίο ραδιοσυχνότητας με πλάτος V και συχνότητα ω . Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Τα ιόντα με συγκεκριμένη τιμή m/z θα φτάσουν στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα, θα προσκρούσουν στις ράβδους και θα εξέλθουν από το τετράπολο³⁸. Μεταβάλλοντας την ένταση και την συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου, αλλάζει και το είδος του ιόντος το οποίο φτάνει στον ανιχνευτή. Συγκεκριμένα, στον κεντρικό άξονα της διάταξης του τετραπόλου η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι μηδενική. Αντίθετα, στην κάθετη κατεύθυνση του τετραπόλου το ιόν ταλαντώνεται με τρόπο ο οποίος

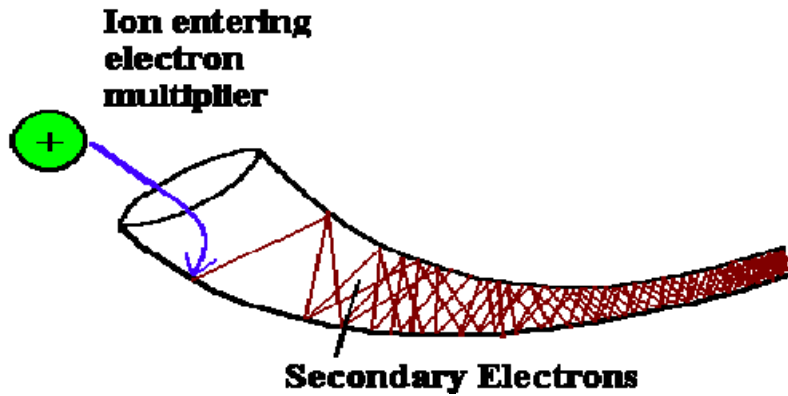
εξαρτάται από την τιμή του m/z , τη συχνότητα και τα δυναμικά U και V . Με επιλογή των κατάλληλων τιμών των παραπάνω, ένα ιόν ταλαντώνεται στο διάστημα μεταξύ των ράβδων και κατευθύνεται στον ανιχνευτή.



Σχήμα 1.14 Σχηματική αναπαράσταση του αναλυτή μάζας, τετραπόλου. (<http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>)

1.3.7 Ανιχνευτής

Ο συνηθέστερος τύπος ανιχνευτή στη φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier) συνεχούς δυνόδου. Αντί να χρησιμοποιεί ατομικούς δυνόδους για να μετατρέψει τα φωτόνια σε ηλεκτρόνια, είναι ένας ανοικτός υάλινος κώνος – καλυμμένος με ημιαγωγικό υλικό (μόλυβδο), όπου αναγεννά ηλεκτρόνια από τα ιόντα που προσκρούονται στην επιφάνεια του. Όταν το ιόν εξέρχεται από τον αναλυτή μάζας, έλκεται από το υψηλό αρνητικό δυναμικό του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή και όταν χτυπήσει σε αυτή την επιφάνεια, ένα ή περισσότερα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια δημιουργούνται³⁹. Καθώς αυτά τα ηλεκτρόνια χτυπούν και πάλι στα τοιχώματα, περισσότερα ηλεκτρόνια εκπέμπονται. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Το αποτέλεσμα είναι ένας διακριτός παλμός που περιέχει πολλά εκατομμύρια ηλεκτρόνια, τα οποία διαμορφώνονται από ένα ιόν όπου πρώτα χτυπά τον ανιχνευτή. Γενικά με την πρόσκρουση ενός ηλεκτρονίου στη πρώτη δύνοδο παράγονται περίπου 10^6 ηλεκτρόνια στην έξοδο του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή.



Σχήμα 1.15 Σχηματική αναπαράσταση, ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή
(<http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm>)

1.3.8 Παρεμποδίσεις

Στη φασματομετρία μαζών παρουσιάζονται επίσης σοβαρά προβλήματα παρεμποδίσεων εκτός από τα πλεονεκτήματα. Οι παρεμποδίσεις διαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες : φασματοσκοπικές και μη φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις.

- *Φασματοσκοπικές Παρεμποδίσεις*³⁷

Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις προκύπτουν όταν ένα ιοντικό σωματίδιο στο πλάσμα, έχει τον ίδιο λόγο m / z με το ιόν του αναλύτη. Διακρίνονται οι εξής κατηγορίες φασματικών παρεμποδίσεων: ισοβαρικά ιόντα, ιόντα πολυατομικά ή σύνθετα, διπλοφορτισμένα ιόντα και ιόντα δύστηκτων οξειδίων.

- *Ισοβαρικές παρεμποδίσεις*

Ισοβαρικά σωματίδια είναι δύο στοιχεία με ισότοπα, που έχουν την ίδια μάζα. Στη φασματομετρία ατομικών μαζών, όταν κάνουμε λόγο για ισοβαρικά σωματίδια εννοούμε ισότοπα που διαφέρουν ως προς τη μάζα τους λιγότερο από μια μονάδα μάζας. Συνήθως, ισοβαρικές παρεμποδίσεις παρουσιάζονται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας, επομένως επηρεάζουν την πιο ευαίσθητη κορυφή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επικάλυψη της κορυφής του ασβεστίου $^{40}\text{Ca}^+$ το οποίο είναι το πιο άφθονο ισότοπο του ασβεστίου (97%), από την

κορυφή του $^{40}\text{Ar}^+$. Όπως επίσης και του ^{80}Se το οποίο επικαλύπτεται από το διμερές του αργού $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$.

▪ *Παρεμποδίσεις πολυατομικών ιόντων*

Ένα σοβαρότερο πρόβλημα παρεμπόδισης δημιουργείται από διάφορα πολυατομικά σωματίδια, που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων του πλάσματος και σωματιδίων της μήτρας του δείγματος ή της ατμόσφαιρας. Συνέπεια των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι ο σχηματισμός διαφόρων μοριακών ιόντων, τα οποία είναι δυνατό να παρεμποδίζουν. Μεταξύ των πιθανών παρεμποδιστών είναι τα σωματίδια $^{40}\text{Ar}^{2+}$, $^{40}\text{ArH}^+$, $^{16}\text{O}_2^+$, H_2 , $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{OH}^+$, $^{14}\text{N}^+$. Μερικές από τις παραπάνω παρεμποδίσεις μπορούν να διορθωθούν με μέτρηση τυφλού διαλύματος, ενώ σε άλλες επιλέγεται ένα διαφορετικό ισότοπο του αναλύτη.

▪ *Παρεμποδίσεις από οξείδια και υδροξείδια*

Οι σοβαρότερες παρεμποδίσεις στην ICP-MS οφείλονται στα οξείδια και υδροξείδια, τα οποία σχηματίζονται από τον ίδιο τον αναλύτη, από τα συστατικά της μήτρας, από τον διαλύτη και τα αέρια του πλάσματος. Ακόμα σοβαρότερες παρεμποδίσεις αυτού του τύπου φαίνεται να προέρχονται από τα οξείδια και υδροξείδια του αναλύτη και των συστατικών της μήτρας του δείγματος. Σχεδόν όλα αυτά τα χημικά σωματίδια σχηματίζουν σε κάποιο βαθμό ιόντα MO^+ και MOH^+ , όπου το M αντιπροσωπεύει τον αναλύτη ή ένα στοιχείο της μήτρας. Υπάρχει πιθανότητα οι κορυφές ενός από τα ιόντα του αναλύτη να επικαλύπτονται από τις κορυφές των σωματιδίων αυτών. Επιπλέον, στη κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι παρεμποδίσεις που προέρχονται από διπλά φορτισμένα ιόντα.

Ο σχηματισμός ενός οξειδίου εξαρτάται από πειραματικές συνθήκες, όπως η ταχύτητα ροής του εκτοξευτή, η ισχύς της ακτινοβολίας ραδιοσυχνότητας, η τοποθέτηση του αποκορυφωτή του δείγματος, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής του δείγματος, η σύσταση των αερίων του πλάσματος, ο αποκλεισμός του οξυγόνου και το ποσοστό του απομακρυνόμενου διαλύτη. Όλες αυτές οι πειραματικές μεταβλητές μπορούν να ρυθμιστούν, ώστε να εξουδετερωθεί το πρόβλημα των επικαλύψεων από κορυφές οξειδίων και υδροξειδίων.

▪ *Μη Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις*³⁷

Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας προκαλούνται κυρίως από τις υψηλές συγκεντρώσεις των συστατικών της μήτρας του δείγματος. Από αυτές τις επιδράσεις το σήμα του αναλύτη μπορεί να μειωθεί ή να ενισχυθεί. Οι επιδράσεις των συστατικών της μήτρας μπορούν γενικά να ελαχιστοποιηθούν με τη χρήση αραιότερων διαλυμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος ή με απομάκρυνση των ουσιών, που προκαλούν το πρόβλημα. Επίσης οι παρεμποδίσεις αυτές μπορούν να εξουδετερωθούν με χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου, το οποίο θα πρέπει να είναι ένα στοιχείο με μάζα και δυναμικό ιονισμού περίπου ίδια με εκείνα του αναλύτη. Παράλληλα, το στοιχείο που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι σπάνιο στη φύση, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα να υπάρχει στο εξεταζόμενο δείγμα (π.χ. ¹¹⁵In, ¹⁰³Rh, ⁹Be, ²³²Th).

1.4 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Με βάση τα παραπάνω το σελήνιο, αποτελεί ένα θρεπτικό στοιχείο όταν λαμβάνεται στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις και ένα τοξικό στοιχείο όταν γίνεται υπερβολική χρήση του (κατάποση). Για το λόγο αυτό η μελέτη της παρουσίας του στα τρόφιμα, είναι αναγκαία για να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά του και οι ευεργετικές του ιδιότητες, στην καταπολέμηση του καρκίνου και άλλων ασθενειών.

Στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται:

- Ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου για τον ολικό προσδιορισμό του Se σε μαγειρεμένες τροφές χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.
- Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας Se σε μερίδες εστιατορίου ώστε να υπολογισθεί η καθημερινή ποσοτική πρόσληψή του και να εκτιμηθεί αν είναι επαρκής.
- Χρησιμοποίηση της βάσης δεδομένων DAFNE (Data Food Networking) η οποία στοχεύει στη διαχρονική παρακολούθηση και σύγκριση των διατροφικών συνηθειών των Ευρωπαϊκών πληθυσμών και συγκεκριμένα των Ελλήνων και μας δίνει πληροφορίες για την μέση κατανάλωση τροφών ενός Έλληνα σε γραμμάρια, σε καθημερινή βάση, για να υπολογίσουμε την ποσοτική πρόσληψη Se από τον μέσο Έλληνα
- Ειδοταυτοποίηση ενώσεων Se σε δύο είδη ψαριών χρησιμοποιώντας HPLC - ICP – MS, αναπτύσσοντας μέθοδο εκχύλισης (ενζυμική χώνευση) με σκοπό την μέγιστη ανάκτηση Se.
- Ανάπτυξη μεθόδου, γαστρεντερικής χώνευσης σε δύο είδη ψαριών για να ληφθεί η % βιοδιαθεσιμότητα του Se δηλαδή η εύρεση της ποσότητας και του είδους Se που απορροφάται από τον άνθρωπο, όταν καταναλώνει αυτά τα είδη ψαριών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Εισαγωγή

Σε αυτό το μέρος της παρούσας εργασίας, περιγράφεται αναλυτικά ο συνολικός προσδιορισμός του σεληνίου και ο διαχωρισμός των χημικών ειδών του σεληνίου με τις πειραματικές διατάξεις καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων και οι διαδικασίες εκχύλισης.

2.1 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP – MS)

Για τον ολικό προσδιορισμό του Se, χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Thermo Electron X Series ICP-MS, Winsford, UK), με τετραπολικό αναλυτή μάζας, ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή και θάλαμο εκνέφωσης από γυαλί. Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας ρυθμίστηκε να μετράει την ένταση σήματος ιόντων με m/z 77, 78, 82 για το σελήνιο ($^{77}\text{Se}^+$, $^{78}\text{Se}^+$, $^{82}\text{Se}^+$) και m/z 115 ($^{115}\text{In}^+$), το οποίο ίνδιο χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο, ουσία η οποία δεν βρίσκεται στη μήτρα του δείγματος, όπου με τη χρήση της πραγματοποιείται διόρθωση των μη φασματομετρικών παρεμποδίσεων και τυχόν αστάθειας και θορύβου του σήματος του φασματόμετρου μάζας. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η ακρίβεια της αντίστοιχης συγκέντρωσης του αναλύτη.

Στο παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου, όπως έχουν ρυθμιστεί, ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη ένταση απόκρισης των ιόντων σεληνίου.

Πίνακας 2.1 Παράμετροι λειτουργίας ICP-MS

Ισχύς του πλάσματος	1250 W
Βάθος λήψης δείγματος	100 (αυθαίρετες μονάδες)
Ροή ψυκτικού αργού	13,5 L / min
Ροή βοηθητικού αργού	1,00 L / min
Ροή αργού του εκνεφωτή	0,92 L / min
Αποκορυφωτής	Νικελίου, στόμιο διαμέτρου 0,75 mm
Κώνος δειγματοληψίας	Νικελίου, στόμιο διαμέτρου 1,0 mm

2.1.1.1 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος είναι το κρίσιμο μέρος του οργάνου και η εισαγωγή του δείγματος στο ICP-MS πραγματοποιείται μέσω του εκνεφωτή με την βοήθεια της περισταλτικής αντλίας (ταχύτητα ροής ~ 0.8 mL/min). Το σχηματιζόμενο αερόλυμα μεταφέρεται στο ICP-MS, ενώ τα υγρά απόβλητα απομακρύνονται από την έξοδο του θαλάμου εκνέφωσης. Ο πυρσός πλάσματος είναι κατασκευασμένος από χαλαζία και φέρει στο άκρο του ένα γειωμένο μεταλλικό περίβλημα (shield), με σκοπό την βελτίωση της ευαισθησίας της τεχνικής. Παρακάτω δίνονται οι σχηματικές αναπαραστάσεις του πυρσού και του θαλάμου εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 2.1 α) Θάλαμος εκνέφωσης από γυαλί και β) Πυρσός πλάσματος από χαλαζία θάλαμος εκνέφωσης από γυαλί.

(Thermo Electron Corporation, X Series ICP-MS Getting Started Guide)

Ο αναλυτής μάζας που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι τετραπολικός αναλυτής μάζας, ο οποίος βρίσκεται μεταξύ των φακών εστίασης και του ανιχνευτή. Καθώς τα ιόντα εξέρχονται από το σύστημα φακών, εισέρχονται στον αναλυτή μάζας προκειμένου να διαχωριστούν ανάλογα με τη τιμή του λόγου m/z .

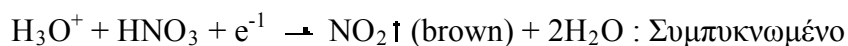
Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier), όπου η τυπική ενίσχυση του είναι 1 εκατομμύριο.

2.1.2 Χώνευση με Οξέα και Μικροκύματα

Η χώνευση με μικροκύματα είναι μια κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αποσύνθεση των σύνθετων μητρών δείγματος. Η στοιχειακή ανάλυση, με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, απαιτεί την

διαλυτοποίηση του δείγματος πριν από την ανάλυση. Με την οξείδωση απομακρύνονται κάποια είδη που παρεμποδίζουν την φασματομετρική ανάλυση.

Το νιτρικό οξύ (HNO_3), είναι το συνηθέστερο οξύ, το οποίο διαλυτοποιεί τα περισσότερα μέταλλα για να παράγει τα διαλυτά νιτρώδη μέταλλα.



Το νιτρικό οξύ υποβάλλεται σε ανταλλαγές 1 και 3 ηλεκτρονίων. Η ανταλλαγή ενός ηλεκτρονίου παρατηρείται όταν είναι πυκνό το οξύ ενώ η ανταλλαγή 3 ηλεκτρονίων παρατηρείται όταν είναι αραιό το οξύ⁴⁸. Επίσης όταν το οξύ είναι πυκνό σχηματίζεται ευκολότερα το διοξείδιο του αζώτου, ενώ όταν είναι αραιό σχηματίζεται το μονοξείδιο του αζώτου. Το οξύ με αδιάλυτο διοξείδιο του αζώτου, δίνει καφέ ατμούς.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω συσκευή για όξινη χώνευση με τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων (Speedwave™, MWS-2, BERGHOF).



Σχήμα 2.2 Συσκευή Όξινης Χώνευσης με τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων

2.1.3 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση είναι μία διαδικασία αφυδάτωσης που χρησιμοποιείται για να διατηρήσει ένα υλικό που υφίσταται αποσύνθεση. Είναι η εξάτμιση / απομάκρυνση του διαλύτη, στην περίπτωσή μας νερό, από υλικά και συγκεκριμένα κατεψυγμένα τρόφιμα. Η αφυδάτωση πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού, με το υλικό να ψύχεται κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

Στη λυοφιλίωση συμβαίνει:

A) Ψύξη : Το προϊόν ψύχεται

Β) Κενό: Μετά από την ψύξη το προϊόν τοποθετείται σε κενό. Ο διαλύτης (νερό) εξατμίζεται, χωρίς να περνά μέσω της υγρής φάσης.

Γ) Θέρμανση: Η θέρμανση βοηθά στην επιτάχυνση της εξάτμισης.

Δ) Συμπύκνωση

Η εργαστηριακή συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν CHRiST Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrators (ALPHA 1-4 LSC)

2.1.4 Φυγόκεντρος

Η φυγόκεντρος χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του ανεπιθύμητου αδιάλυτου υλικού και την χρησιμοποίηση του επιθυμητού ώστε να καταστεί δυνατή η εργαστηριακή διαδικασία και να πετύχουμε την μέγιστη απόδοση της εκχύλισης. Ο τύπος της φυγόκεντρου είναι Rotor Type S 1615 , NF 400, nuve, Germany.

2.2. ΟΛΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕΛΗΝΙΟΥ

2.2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις των δειγμάτων για τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου δίνονται παρακάτω:

- Πρότυπο διάλυμα σεληνίου 1000 mg / L (CPI INTERNATIONAL, USA , P/N 4400-1000491).
- MeOH (Μεθανόλη) (gradient grade HPLC, Merck, Darmstadt, Germany).
- Νιτρικό οξύ (65%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Πρότυπο διάλυμα ινδίου 1000 mg / L (In, CPI International, P/N S4400-1000241).

2.2.2 Δείγματα

Τα δείγματα ήταν 30, δηλαδή 30 διαφορετικές τροφές, όπου η κάθε τροφή αναλύθηκε 12 φορές για 12 διαφορετικές ημερήσιες συλλογές. Επίσης κάθε τροφή αναλυόταν δύο φορές ώστε να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα τα οποία συλλεχθήκαν, ομογενοποιήθηκαν αφού πρώτα μετρήθηκε το συνολικό τους βάρος και αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη. Για τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου στα εξεταζόμενα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ICP-MS. Πριν την ανάλυση, κρίθηκε απαραίτητη η λυοφιλίωση των δειγμάτων (CHRiST Freeze Dryers) για την απομάκρυνση του νερού της τροφής. Επίσης υπολογίστηκε, η % ποσότητα του νερού σε κάθε τροφή. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η διαλυτοποίηση των στερεών δειγμάτων, με τη μέθοδο της όξινης χώνευσης και τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων (microwave assisted acid digestion). Συγκεκριμένα, για τη διαλυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πυκνό HNO₃ (65% κ.ο.) και εργαστηριακή συσκευή φούρνου μικροκυμάτων (Speedwave™, MWS-2, BERGHOF). Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης του στοιχείου στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εσωτερικού προτύπου ¹¹⁵In, συγκέντρωσης 5 μg / L σε διάλυμα αραιού νιτρικού οξέος (5 % HNO₃).

Χρησιμοποιήθηκε, σειρά προτύπων διαλυμάτων σεληνίου συγκεντρώσεων, 0, 1, 5, 10, 25, 50 ppb (για τις πλούσιες σε σελήνιο τροφές) και 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 ppb (για τις φτωχές σε σελήνιο τροφές), τα οποία παρασκευάστηκαν με αραιώση του

πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης $100 \mu\text{g Se L}^{-1}$ σε διάλυμα νιτρικού οξέος. Επίσης για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας, η οποία προστίθεται στα δείγματα για να τροποποιήσει τη μήτρα του δείγματος και να υπάρξουν πλεονεκτήματα στον προσδιορισμό του Se και επίσης διατηρεί τη σταθερότητα του πλάσματος. Μεγάλες ποσότητες μεθανόλης, προκαλούν επιπτώσεις στο πλάσμα, μέχρι που μπορούν και να το σβήσουν. Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση απιοντισμένου νερού υψηλής καθαρότητας ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Για την μέτρηση με την τεχνική ICP-MS, αναλύθηκαν τα τρία ισότοπα [^{77}Se (7,63%), ^{78}Se (23,77%), ^{82}Se (8,73%)] , το ^{80}Se (49,61%) δεν μπορεί να αναλυθεί λόγω της παρεμπόδισης του από το διμερές του Ar, $^{40}\text{Ar}^+_2$.

2.3. ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ DAFNE (Data Food Networking)

Σε αυτή την ενότητα προσδιορίζεται η μέση διατροφική πρόσληψη του σεληνίου σε καθημερινή βάση από ένα Έλληνα. Τα αποτελέσματα εξάγονται από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της συνολικής ποσότητας του σεληνίου, η οποία προσδιορίστηκε στη παρούσα εργασία, στις διάφορες τροφές που καταναλώνονται συνήθως στην Ελλάδα και από τη κατανάλωση των τροφίμων σε γραμμάρια/άτομο/ημέρα για κάθε τροφή, η οποία παρουσιάζεται από την βάση δεδομένων DAFNE.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, η Ελλάδα συντονίζει το χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση πρόγραμμα **DAFNE**⁴⁹, που στοχεύει στη διαχρονική παρακολούθηση και σύγκριση των διατροφικών συνηθειών των Ευρωπαϊκών πληθυσμών με τη δημιουργία μίας δυναμικής και διαρκώς εμπλουτιζόμενης βάσης δεδομένων. Η βάση δεδομένων DAFNE περιλαμβάνει επεξεργασμένα στοιχεία των Ερευνών Οικογενειακών Προϋπολογισμών (ΕΟΠ). Οι ΕΟΠ διενεργούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα από τις Εθνικές Στατικές Υπηρεσίες των περισσότερων Ευρωπαϊκών χωρών, με παραπλήσια μεθοδολογία, επιτρέποντας έτσι διακρατικές συγκρίσεις. Οι ΕΟΠ δεν έχουν ως πρωταρχικό λόγο τη συλλογή διατροφικών πληροφοριών, αλλά την καταγραφή των αγαθών και υπηρεσιών, που διατίθενται στα μέλη αντιπροσωπευτικού δείγματος νοικοκυριών κάθε χώρας. Εντούτοις, συλλέγοντας τις πληροφορίες για τις ποσότητες και αξίες των τροφίμων που είναι διαθέσιμα στο νοικοκυριό, αποτυπώνουν ικανοποιητικά τις

διατροφικές επιλογές ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος του πληθυσμού. Παράλληλα, η ταυτόχρονη καταγραφή δημογραφικών και κοινωνικό-οικονομικών χαρακτηριστικών επιτρέπει τη συνεκτίμηση της επίδρασης των χαρακτηριστικών αυτών στη διαμόρφωση των διατροφικών επιλογών. Καθώς η διεξαγωγή ειδικών διατροφικών ερευνών σε τακτά χρονικά διαστήματα συνεπάγεται σημαντική οικονομική επιβάρυνση για μία χώρα, οι περιοδικά επαναλαμβανόμενες ΕΟΠ αποτελούν μια ικανοποιητική εναλλακτική λύση για τη διαχρονική παρακολούθηση της διατροφής ενός πληθυσμού και τη σύγκρισή της με αυτή άλλων Ευρωπαϊκών πληθυσμών^{49,50}.

Η βάση DAFNE περιλαμβάνει στοιχεία των ΕΟΠ δεκαέξι Ευρωπαϊκών κρατών, (Αυστρία, Βέλγιο, Φιλανδία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λουξεμβούργο, Νορβηγία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ισπανία, Σουηδία, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ ήδη προετοιμάζεται η ενσωμάτωση στοιχείων από οκτώ νέα κράτη: την Αλβανία, Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρο, Λετονία, Μάλτα, Σλοβακία και Σλοβενία.

Η ημερήσια ατομική διαθεσιμότητα τροφίμων υπολογίζεται σε διάφορα, κοινά μεταξύ των χωρών, επίπεδα εκτίμησης που κυμαίνονται από 12 συγκεντρωτικές μέχρι 57 αναλυτικές ομάδες τροφίμων. Η μέση διαθεσιμότητα υπολογίζεται περαιτέρω χρησιμοποιώντας τρία κοινωνικό-οικονομικά χαρακτηριστικά, την αστικότητα, το μορφωτικό επίπεδο και το επάγγελμα του αρχηγού του νοικοκυριού⁴⁹.

Στοιχεία αυτής της βάσης δεδομένων φανερώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη διατροφική συμπεριφορά των Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται και στις διατροφικές επιλογές διαφορετικών κοινωνικό-οικονομικών ομάδων. Στη Νορβηγία, αν και η συνολική διαθεσιμότητα προστιθέμενων λιπιδίων είναι μεγαλύτερη στους αγρότες, τα αστικά νοικοκυριά εμφανίζουν υψηλότερη διαθεσιμότητα ελαίων φυτικής προέλευσης, αποτέλεσμα μιάς επιτυχούς διατροφικής πολιτικής των Σκανδιναβικών χωρών. Στη χώρα μας και το μορφωτικό επίπεδο αποτελεί παράγοντα διαφοροποίησης, καθώς οι μορφωμένοι Έλληνες, πιθανόν ως καλύτεροι αποδέκτες μηνυμάτων υγείας, προτιμούν μεγαλύτερες ποσότητες φρούτων και μικρότερες κόκκινου κρέατος. Η διαθεσιμότητα όμως των λαχανικών, οσπρίων και ελαιολάδου, συστατικών χαρακτηριστικών της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής, είναι μεγαλύτερη μεταξύ ατόμων χαμηλότερου επιπέδου εκπαίδευσης.

Η προσέγγιση της βάσης DAFNE δίνει επίσης τη δυνατότητα να μελετώνται διαχρονικές μεταβολές και να συγκρίνονται, σε επίπεδο οικολογικών συσχετίσεων, οι διατροφικές συνήθειες ενός πληθυσμού με το νοσολογικό του φάσμα.

2.4. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία σήμερα, αποτελεί την πλέον διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό μιγμάτων και την ταυτοποίηση των συστατικών τους σε αναλυτικό και παρασκευαστικό επίπεδο. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '70 και οφείλει την ανάπτυξή της στην εμφάνιση χρωματογραφικών στηλών, με υψηλή δυνατότητα διαχωρισμού και στη δημιουργία on-line ανιχνευτών.

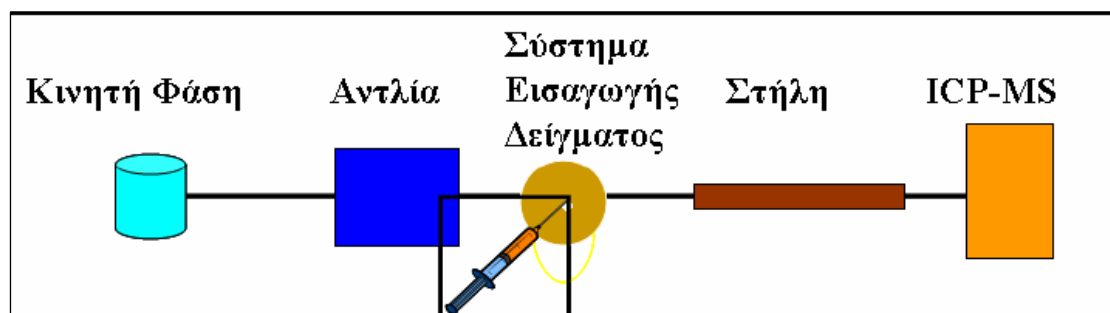
Για το διαχωρισμό των ενώσεων σεληνίου χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC, το οποίο περιλαμβάνει:

- Σύστημα παροχής κινητής φάσης, αποτελούμενο από μια αντλία για ισοκρατική έκλυση (Marathon Series IV HPLC Pump, Rigas Labs, Thessaloniki), με μέγιστη επιτρεπόμενη πίεση 6000 psi. Από την αντλία αυτή μεταφέρετε η κινητή φάση στη στήλη και στη συνέχεια στο ICP-MS.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector), αποτελούμενο από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσεως έξι εισόδων, με βρόγχο εισαγωγής δείγματος (loop) όγκου 50 μ L. Η εισαγωγή δείγματος γίνεται στη θέση load ενώ γίνεται αμέσως περιστροφή της βαλβίδας στη θέση inject ώστε να εισέλθει το δείγμα στο ICP-MS.
- Χρωματογραφική στήλη

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σωληνώσεις από υλικό PEEK (Polyetheretherketone) για τις συνδέσεις μεταξύ της στήλης, του εισαγωγέα και των σωληνώσεων που υπάρχουν στον εκνεφωτή ώστε να επιτυγχάνεται η εισαγωγή του δείγματος στο πλάσμα του ICP-MS. Επίσης η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης,

πρέπει να είναι ιδιαίτερα σταθερή, ανεξάρτητα από την πίεση που αναπτύσσεται, ώστε να μην επηρεάζεται η διαχωριστική ικανότητα της στήλης και οι χρόνοι κατακράτησης των συστατικών. Ο διαχωρισμός των συστατικών στην HPLC στηρίζεται στην αλληλεπίδραση τους με το υλικό πληρώσεως της στήλης.

Για τον κατάλληλο διαχωρισμό των συστατικών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε στήλη διαχωρισμού αντίστροφης φάσης, C8-3, 5μm PerfectSil Target, 150 x 4.0 mm με ταχύτητα ροής 0,5 ml/min.



Σχήμα 2.3 Πειραματική Διάταξη HPLC-ICP-MS

2.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης

Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης εξαρτάται από την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλυτού μορίου στη κινητή φάση και του ακίνητου υδρόφοβου (λιγότερο πολικού) υποστρώματος, δηλαδή της στατικής φάσης. Η στήλη διαχωρισμού είναι η C8 με στατική φάση silica gel. Η χημεία της silica gel επιτρέπει την παραγωγή με υποστρώματα ποικίλων αλυσίδων άνθρακα και στη περίπτωση μας αλειφατικών αλυσίδων με οκτώ άτομα άνθρακα.



Σχήμα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση του υποστρώματος C8³⁹.

2.4.2 ENZYMATΙΚΗ ΧΩΝΕΥΣΗ

Για την επιτυχή εκχύλιση των ειδών σεληνίου από τις πρωτεΐνες, αναπτύχθηκε μέθοδος προσθήκης ενζύμου και συγκεκριμένα η ενζυματική χώνευση όπου το κύριο πλεονέκτημα της είναι η επιλεκτικότητα⁵², επειδή τα ένζυμα ενεργούν μόνο σε συγκεκριμένους χημικούς δεσμούς⁵³. Επίσης, με τη χρήση της ενζυματικής χώνευσης η χημική μορφή των ειδών ενός στοιχείου δεν αλλάζει γι' αυτό και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως.

2.4.2.1 Δείγματα

- Φιλέτο Μπακαλιάρου μαγειρεμένο
- Φιλέτο Μπακαλιάρου αμαγείρευτο, κατεψυγμένο, από την κεντρική αγορά.
- Σαρδέλα, φρέσκια, από την κεντρική αγορά.

Όλα τα δείγματα αφού αφαιρέθηκαν από τα οστά και πλύθηκαν με νερό υψηλής καθαρότητας, ομογενοποιήθηκαν με την χρήση μίξερ και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη. Έπειτα, με την χρήση του Freeze Dryer, έγινε η λυοφιλίωσή τους και διατηρήθηκαν σε ξηρό μέρος μέχρι την εκχύλιση τους και κατόπιν την ανάλυσή τους. Επίσης υπολογίσθηκε και ο ολικός προσδιορισμός του σεληνίου για κάθε δείγμα καθώς προηγήθηκε όξινη χώνευση με τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων.

2.4.2.2 Χημικά Αντιδραστήρια

- Tris – HCl buffer ($C_4H_{11}NO_3$. HCl) (Fluka)
- Μεθανόλη (gradient grade HPLC, Merck, Darmstadt, Germany) η οποία χρησιμοποιείται στη κινητή φάση.
- Οξικό αμμώνιο ($COOCH_3NH_4$), χρησιμοποιείται στη κινητή φάση.(Fluka)
- Πρωτεάση- Pronase E ή Protease Type XIV from *Streptomyces griseus*, Type XIV, ≥ 3.5 units/mg solid, powder (Sigma Aldrich)

2.4.2.3 Εκχύλιση δειγμάτων

Σε κάθε δείγμα (0,2gr), είχε προστεθεί H₂O (3ml) υψηλής καθαρότητας (18,2 MΩ cm). Στη συνέχεια αυτό το μίγμα, τοποθετείτε στους υπερήχους για 30 λεπτά, ώστε να σπάσουν οι ιστοί του ψαριού, να διαλυτοποιηθεί δηλαδή καλύτερα. Στη συνέχεια τοποθετείτε στη φυγόκεντρο 30 λεπτά στους 4000 rpm. Λαμβάνεται στη συνέχεια το ίζημα-κατακάθι, όπου γίνεται η λυοφιλίωση του για την απομάκρυνση του διαλύτη-νερού και στη συνέχεια προστίθεται το Tris – HCl buffer (0,1M, 5ml) και το ένζυμο, Pronase E (0,02gr). Αυτό το δείγμα αφήνεται για επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, όπου μετά το πέρας των 24 ωρών, επαναλαμβάνεται η προσθήκη του ενζύμου (0,02gr) και η επώαση του δείγματος στους 37 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετείτε στη φυγόκεντρο 30 λεπτά στους 4000 rpm και λαμβάνεται το υπερκείμενο, όπου και αποθηκεύεται στη κατάψυξη μέχρι την ανάλυση του.

2.4.3 ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΩΝΕΥΣΗ

Χρησιμοποιήθηκε επίσης μία δεύτερη εκχύλιση των ίδιων δειγμάτων με σκοπό την εύρεση της % βιοδιαθεσιμότητας του σεληνίου, δηλαδή της ποσότητας του σεληνίου η οποία απορροφάται από τον άνθρωπο όταν καταναλώνει (χωνεύει) αυτά τα ψάρια. Αυτό έγινε ώστε να κατανοηθεί το γεγονός, ότι η ποσότητα σεληνίου που καταναλώνουμε, δεν είναι και η ποσότητα του σεληνίου που απορροφάμε⁵⁴. Έτσι πραγματοποιήθηκε μια *in vitro* μέθοδος γαστρεντερικής χώνευσης, στην οποία εξομοιώσαμε το στομάχι και παρατηρήσαμε τις διεργασίες που εκτελούνται σε αυτό κατά την χώνευση.

2.4.3.1 Δείγματα

- Φιλέτο Μπακαλιάρου αμαγείρευτο, κατεψυγμένο, από την κεντρική αγορά.
- Σαρδέλα, φρέσκια, από την κεντρική αγορά.

Όλα τα δείγματα, όπως και στην προηγούμενη διαδικασία, πλύθηκαν, ομογενοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στη κατάψυξη. Στη συνέχεια υπέστησαν

λυοφιλίωση και αποθηκεύτηκαν σε ξηρό μέρος μέχρι την εκχύλιση και έπειτα την ανάλυσή τους.

2.4.3.2 Χημικά Αντιδραστήρια

- Χλωριούχο νάτριο, NaCl (Sigma Aldrich)
- Πepsίνη - Pepsin from porcine gastric mucosa powder, 800-2,500 units/mg protein, P7000 (Sigma-Aldrich)
- Παγκρεατίνη - Pancreatic from porcine pancreas 4× USP specifications P1750 (Sigma-Aldrich)
- Χολικά άλατα - Bile salts B- 8756 (Sigma-Aldrich)
- α-αμυλάση (Porcine Pancreas, Type VI-B, 10-30 units/mg solid , Sigma Aldrich)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο NaHCO₃
- Υδροχλωρικό οξύ (37%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 0,45 μm Millipore filter για τη μείωση της μικροβιακής δραστηριότητας.

2.4.3.3 Διαδικασία μεθόδου in vitro γαστρεντερικής χώνευσης

- ❖ 25 gr δείγματος + 75 ml γαστρικό υγρό (6% w/v σε 0,15M NaCl, οξειδωμένο με HCl σε p H 1.8).
- ❖ Επώαση για 4 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου – ανάδευση.
- ❖ Πριν να ολοκληρωθεί η επώαση, μετά από το πέρας 1 ώρας, το pH ρυθμίστηκε σε 3 με 6M HCl.
- ❖ Μετά την γαστρική χώνευση, το κορεσμένο όξινο ανθρακικό νάτριο, προστέθηκε ώστε να αυξήσει το pH στα 6.8.
- ❖ Στη συνέχεια προστέθηκαν 50 ml εντερικού υγρού (1,5% w/v παγκρεατίνη, 0,5% w/v αμυλάση και 0,15% w/v χολικά άλατα σε 0,15 M NaCl).
- ❖ Το μίγμα κρατήθηκε για επώαση στους 37 βαθμούς Κελσίου για 4 ώρες - ανάδευση

❖ Φυγοκέντρωση για 1 ώρα στις 3500 rpm

❖ Φιλτράρισμα με 0,45 µm Millipore filter

2.5 Απόδοση Εκχύλισης

Μετά από όλες αυτές τις αναλύσεις προσδιορίστηκε η απόδοση της εκχύλισης και στις δύο διαδικασίες, όπου αναλύθηκαν τα εκχυλίσματα όπως ακριβώς και τα δείγματα για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας σεληνίου. Η απόδοση της εκχύλισης προσδιορίζεται με την παρακάτω σχέση:

$$\text{Απόδοση της εκχύλισης} = \frac{\text{Συγκέντρωση του σεληνίου στο εκχύλισμα}}{\text{Συγκέντρωση του σεληνίου στο στερεό δείγμα}} * 100$$

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες πρότυπες ενώσεις σεληνίου, όπου με τις κατάλληλες αραιώσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα και αναλύθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες ώστε να μπορούν να αξιολογηθούν και να συγκριθούν οι χρόνοι κατακράτησης των χρωματογραφημάτων. Οι ενώσεις που αναλύθηκαν ήταν η σεληνομεθειονίνη, (Seleno – DL – methionine, C₅ H₁₁NO₂ Se, Sigma Aldrich), σεληνιώδες [Se (IV)(Sodium selenite anhydrous Na₂O₃Se), Fluka], σεληνικό [Se(VI)(Sodium selenate Na₂O₄Se), Fluka], σεληνοκυστίνη, τριμεθυλοσεληνικό ιόν (TMSe⁺) και σεληνοκυσταμίνη [(selenocystamine dihydrochloride)], Sigma- Aldrich.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. *Εισαγωγή*

Σε καθημερινή βάση, η διατροφή μας σε σελήνιο, εξαρτάται από την συγκέντρωση του σεληνίου στην τροφή και την ποσότητα της τροφής, η οποία καταναλώνεται. Η πρόσληψη του σεληνίου από την τροφική αλυσίδα, φυτό-ζώο-άνθρωπος είναι αποτέλεσμα της περιεκτικότητας του σεληνίου στα εδάφη. Το Se ποικίλει γεωγραφικά μεταξύ και ανάμεσα στις χώρες και γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικός ο προσδιορισμός της ποσότητάς του στις διάφορες τροφές και η εκτίμηση της καθημερινής διατροφικής πρόσληψης σε σελήνιο για τους κατοίκους της κάθε χώρας^{31,55}. Αν και από γεωγραφικής άποψης υπάρχει μια τεράστια διακύμανση στη ποσότητα του σεληνίου στις τροφές, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η βιοδιαθεσιμότητα του στοιχείου αυτού από τις τροφές. Η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως το ποσοτικό μέτρο της χρησιμοποίησης ενός θρεπτικού στοιχείου που βρίσκεται στα τρόφιμα ή σε ένα γεύμα, ώστε να υποστηριχθούν οι δομικές και φυσιολογικές διαδικασίες που επικρατούν στο σώμα. Η βιοδιαθεσιμότητα επηρεάζεται από τη χημική μορφή του Se και από την πρόσληψη άλλων συστατικών των τροφίμων. Η βιοδιαθεσιμότητα του Se μπορεί να ενισχυθεί από την παρουσία αντιοξειδωτικών (Γ βιταμινών και E), και τη συνολική πρωτεΐνη. Ενώ, παρεμποδίζεται από την πρόσληψη μερικών μετάλλων, την έλλειψη των βιταμινών B και τα υψηλά επίπεδα μερικών ενώσεων θείου.

Η απορρόφηση των οργανικών ενώσεων Se από τα τρόφιμα ποικίλει σύμφωνα με την χώνευση των πρωτεϊνών των τροφίμων και το τύπο των ενώσεων Se που εμφανίζονται στα τρόφιμα. Η βιοδιαθεσιμότητα του Se από τις φυτικές πηγές είναι υψηλή (85-100%), ενώ η βιοδιαθεσιμότητα από τις ζωικές πηγές είναι μάλλον χαμηλή (15%). Αν και η υψηλότερη συγκέντρωση Se, προσδιορίζεται στα θαλασσινά, η βιοδιαθεσιμότητα του Se από αυτήν την πηγή τροφίμων (20-50%) είναι αρκετά χαμηλότερη απ' ό,τι στα λαχανικά. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν τη χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα Se που κυμαίνεται από 2% ως 7%¹⁰.

Πρώτος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας του σεληνίου στις συνηθισμένες τροφές, οι οποίες καταναλώνονται στην

Ελλάδα καθώς και η εκτίμηση της καθημερινής διατροφής σε σεληνίο από τον μέσο Έλληνα.

3.1 Ανάπτυξη μεθόδου ICP-MS για τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου σε σειρά από δείγματα τροφής

Για τον ολικό προσδιορισμό του σεληνίου στα εξεταζόμενα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ICP-MS. Πριν την ανάλυση, κρίθηκε απαραίτητη η διαλυτοποίηση των στερεών δειγμάτων με τη μέθοδο της όξινης χώνευσης με τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων (microwave assisted acid digestion). Συγκεκριμένα, για τη διαλυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πυκνό HNO₃ (65% κ.ο.) και εργαστηριακή συσκευή φούρνου μικροκυμάτων (SpeedwaveTM, MWS-2, BERGHOF). Σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης του στοιχείου στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο ¹¹⁵In, συγκέντρωσης 5 μg/l.

Χρησιμοποιήθηκαν 5 πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 1, 5, 10, 25, 50 μg Se l⁻¹, για τον ποσοτικό προσδιορισμό Se στις πλούσιες σε σεληνίο τροφές και 5 πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.5, 1, 2, 3, 5 μg Se l⁻¹, για τις φτωχές σε σεληνίο τροφές. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές προτύπων διαλυμάτων διότι οι τροφές που περιέχουν μικρή συγκέντρωση σεληνίου απαιτούν την χρησιμοποίηση της δεύτερης σειράς ώστε η ποσοτικοποίηση να είναι εφικτή αφού και τα όρια αντίχενυσης είναι χαμηλότερα.

Τα είδη των τροφών που αναλύθηκαν ήταν 30 και αναφέρονται σε ξηρό δείγμα αφού αναφέρθηκε ότι υφίστανται λυοφιλίωση. Έγινε μέτρηση για το κάθε δείγμα, 12 φορές για 12 διαφορετικές ημερήσιες συλλογές και επίσης το κάθε δείγμα αναλυόταν εις διπλούν. Παρακάτω φαίνονται τα 30 τρόφιμα όπου υπολογίζονται τα 3 ισότοπα [⁷⁷Se (7,63%), ⁷⁸Se (23,77%), ⁸²Se (8,73%), σε παρένθεση η φυσική αφθονία του κάθε ισότοπου], {το ⁸⁰Se (49,61%) δεν μπορεί να αναλυθεί λόγω της παρεμπόδισης που υφίσταται από το διμερές Ar₂⁺}, η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και η υγρασία τους μετά από τη λυοφιλίωσή τους.

Πίνακας 3.1 Τροφές οι οποίες αναλύθηκαν με τη τεχνική ICP-MS. Δίνονται τα τρία ισότοπα του σεληνίου, η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και η υγρασία κάθε τροφίμου.

	⁷⁷ Se (μg Se / g ξηρού δείγματος)	⁷⁸ Se (μg Se / g ξηρού δείγματος)	⁸² Se (μg Se / g ξηρού δείγματος)	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση (sd)	H ₂ O%
Κοτόπουλο	0,433	0,415	0,428	0,425	0,0094	64%
Πέρκα	1,066	1,077	1,074	1,072	0,0062	70,20%
Ρεβίθια	0,034	0,022	0,025	0,027	0,0061	62,10%
Ρύζι	0,022	0,013	0,024	0,019	0,0062	69,20%
Μαύρο ψωμί	0,032	0,019	0,021	0,024	0,0072	26,50%
Άσπρο ψωμί	0,046	0,055	0,044	0,048	0,0057	27,10%
Πατάτα	0,029	0,014	0,033	0,025	0,0097	71,30%
Φέτα	0,176	0,165	0,175	0,172	0,0062	58,60%
Αγγουράκι	0,107	0,079	0,105	0,097	0,0154	93,20%
Ντομάτα	0,031	0,022	0,051	0,035	0,0145	86,70%
Καλαμπόκι	0,037	0,031	0,038	0,035	0,0036	62,50%
Μακαρόνια	0,011	0,070	0,075	0,052	0,0356	69,40%
Αρακάς	0,016	0,054	0,064	0,045	0,0253	67,40%
Φακές	0,016	0,032	0,032	0,026	0,0088	70,30%
Μελιτζάνες	0,012	0,019	0,079	0,037	0,0367	77,20%
Φας.μαυρομάτικα	0,148	0,140	0,124	0,137	0,0120	62%
Φασολάδα	0,081	0,083	0,086	0,084	0,0025	62,20%
Παντζάρι	0,047	0,058	0,074	0,060	0,0132	90,60%
Μπάμιες	0,031	0,034	0,100	0,055	0,0392	92,60%
Φασολάκια	0,027	0,017	0,025	0,023	0,0049	94%
Κουνουπίδι	0,064	-	0,071	0,068	0,0045	42,80%
Κριθαράκι	0,046	0,047	0,027	0,040	0,0112	81%
Λάχανο	0,068	0,044	0,064	0,059	0,0129	90,90%
Χοιρινό	0,524	0,519	0,520	0,521	0,0031	64,50%
Μοσχάρι	0,343	0,334	0,346	0,341	0,0059	84%
Μπριζόλα χοιρινή	0,438	0,450	0,477	0,455	0,0204	60,10%
Μανιτάρια	0,244	0,254	0,300	0,266	0,0243	50,02%
Κρεμμύδι	0,116	0,133	0,143	0,131	0,0135	88,40%
Λουκάνικο	0,185	0,187	0,191	0,188	0,0029	46,10%
Μπακαλιάρος	1,300	1,260	1,433	1,331	0,0902	72%

N = 24. *Όπου N ο αριθμός των αναλύσεων που έχουν γίνει για κάθε τρόφιμο.

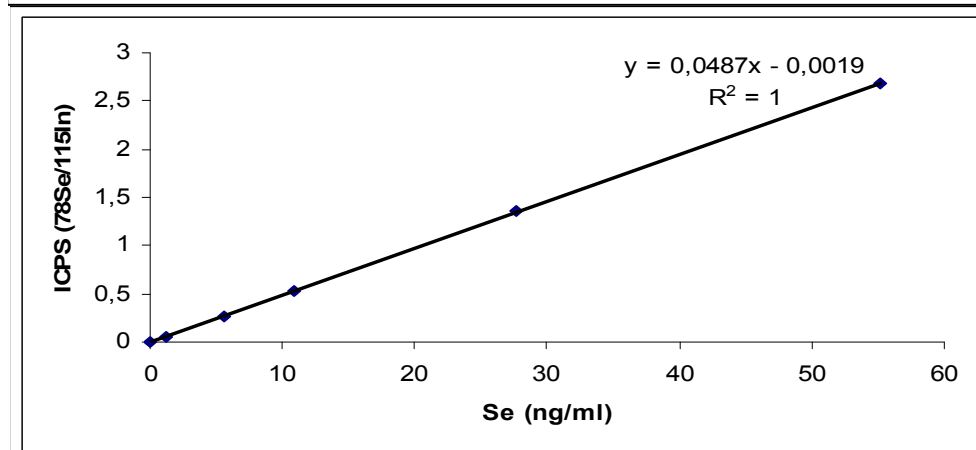
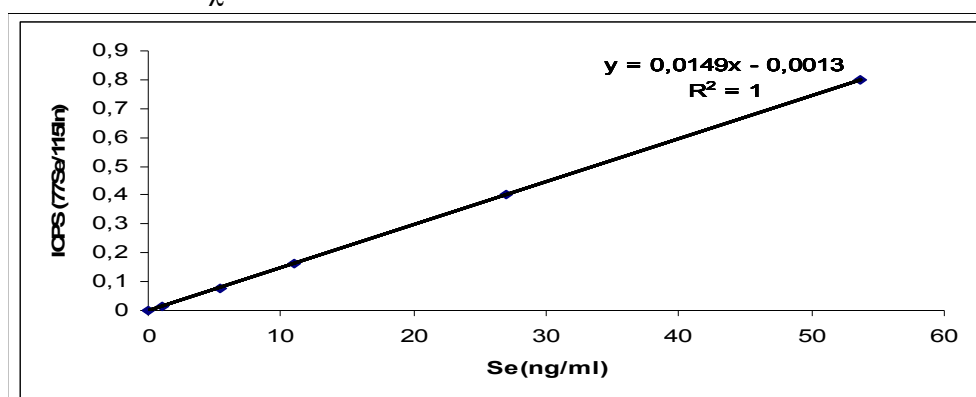
3.1.1 Παρατηρήσεις

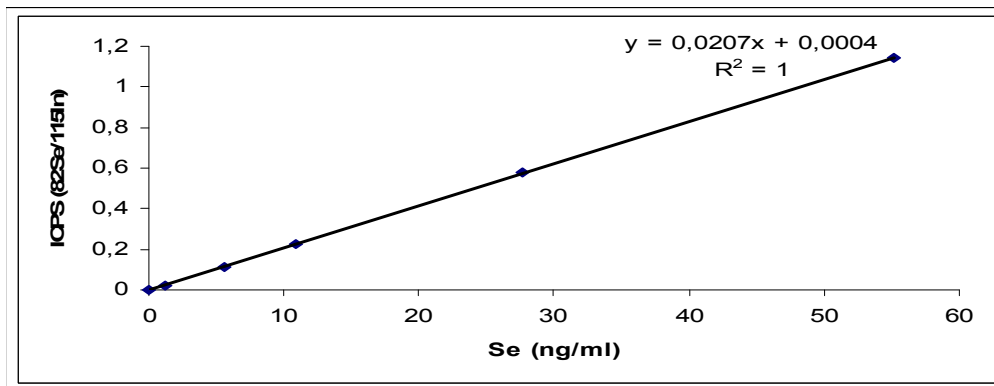
Όπως παρατηρείτε, στις τροφές με υψηλότερη συγκέντρωση Se, όπως κρέας, μανιτάρια, κοτόπουλο, φέτα, ψάρι, οι τιμές για τα 3 ισότοπα είναι σταθερότερες από ότι για τις υπόλοιπες τροφές. Οι τροφές αυτές είναι πλούσιες σε πρωτεΐνη και έτσι αναμένεται να περιέχουν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Se. Ενώ τα λαχανικά με περιεκτικότητα πρωτεϊνών πολύ χαμηλή, είναι φτωχές πηγές σεληνίου. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φυτά το κρεμμύδι, έχει υψηλότερες συγκεντρώσεις σεληνίου επειδή τα αμινοξέα που περιλαμβάνει, περιέχουν υψηλή ποσότητα θείου. Ανάλογα σεληνίου μπορούν να σχηματιστούν από αντικατάσταση του θείου από το σελήνιο. Το κρεμμύδι, συγκεκριμένου γένους, όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος είναι φυτό συσσώρευσης, δηλαδή συσσωρεύει αρκετό Se.

Καθώς η συγκέντρωση του αναλύτη και συγκεκριμένα του Se, μειώνεται, η ακρίβεια των συγκεντρώσεων του στοιχείου, επίσης μειώνεται.

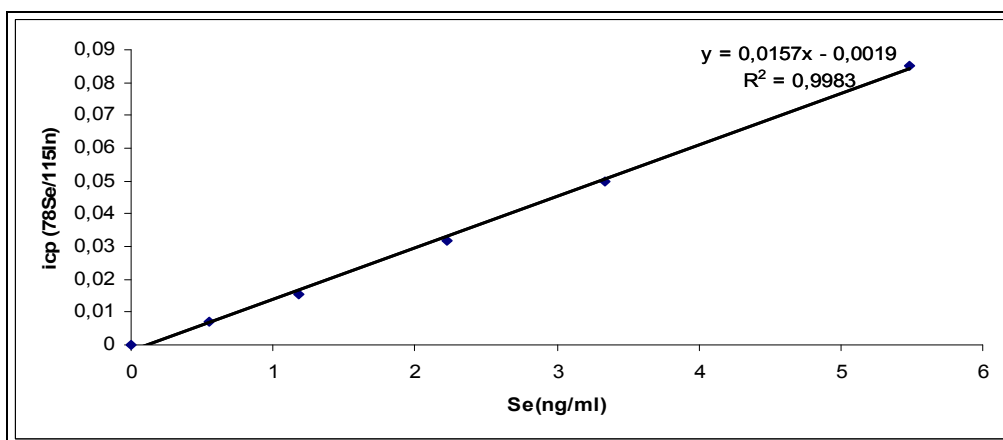
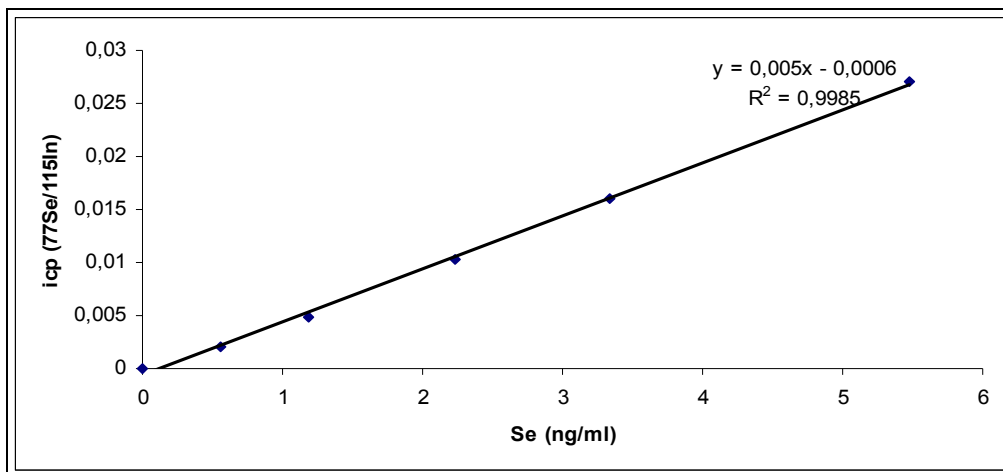
Παρατηρείτε επίσης ότι το κουνουπίδι για το ισότοπο ^{78}Se , δίνει αρνητική τιμή. Η αρνητική τιμή οφείλεται σε παρεμπόδιση, η οποία επικαλύπτει το ισότοπο του Se, ^{78}Se . Η παρεμπόδιση αυτή οφείλεται στο αέριο αργό και είναι ^{40}Ar ^{38}Ar .

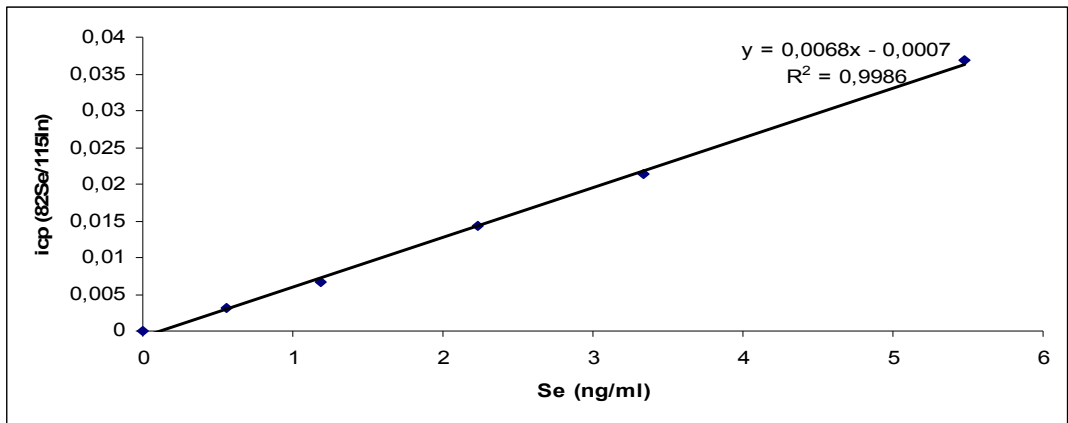
Πιθανές παρεμποδίσσεις στα ισότοπα ^{82}Se και ^{77}Se είναι ^{34}S $^{16}\text{O}_3$, ^{81}Br $^1\text{H}^+$ και ^{40}Ar ^{37}Cl αντίστοιχα.



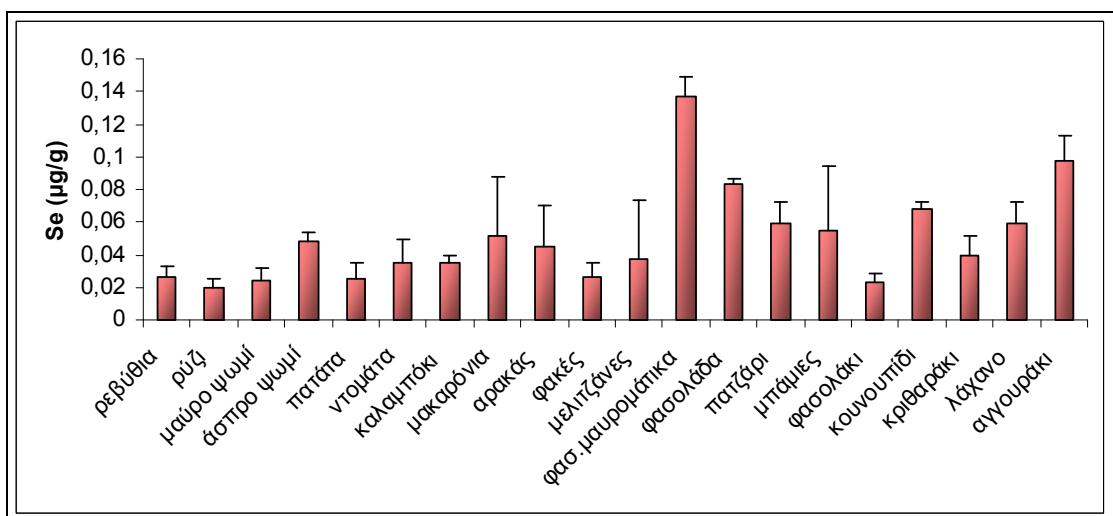
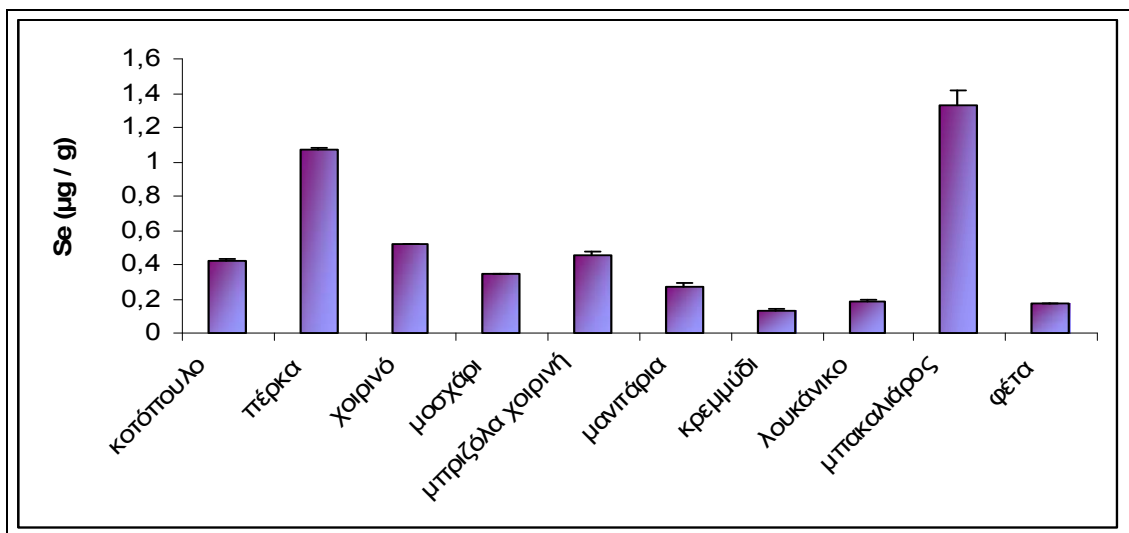


Σχήμα 3.1 Καμπύλες βαθμονόμησης για τα πρότυπα διαλύματα Se (0,1,5,10,25,50μg/L) για τα 3 ισότοπα (77, 78 και 82) που μετρήθηκαν.





Σχήμα 3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης για τα πρότυπα διαλύματα Se (0,0.5, 1, 2, 3, 5 $\mu\text{g} / \text{L}$) για τα 3 ισότοπα (77, 78 και 82) που μετρήθηκαν.



Σχήμα 3.3 Γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων Se στις τροφές που αναλύθηκαν (αναγράφονται αναλυτικά στο πίνακα 3.1). Επίσης δίνονται οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων.

3.1.2 Όρια ανίχνευσης για τα τρία ισότοπα του σεληνίου.

Πίνακας 3.2 Όρια ανίχνευσης του οργάνου για τα πρότυπα διαλύματα Se

LOD	μg /L
⁷⁷ Se	0,07 – 1,1
⁷⁸ Se	0,6 – 1,7
⁸² Se	0,07 – 1,4

Όπως παρατηρούμε παραπάνω δίνονται τα ισότοπα Se και οι τιμές των ορίων ανίχνευσης οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ στενών ορίων για τις πολλαπλές μετρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας και επιτυγχάνονται με τη παρούσα μέθοδο. Όπως γνωρίζουμε τα όρια ανίχνευσης πρέπει να είναι όσο το δυνατό χαμηλότερα³⁷ ώστε να ανιχνεύεται η όσο το δυνατό μικρότερη συγκέντρωση Se στη ξηρή τροφή. Τα αυξανόμενα όρια ανίχνευσης μπορεί να οφείλονται σε παρεμποδίσεις των ισωτόπων, οι οποίες αναφέρονται παραπάνω.

3.1.3 % Απόδοση ανάλυσης

Πίνακας 3.3 % Απόδοση των παρακάτω τροφίμων με τον εμβολιασμό ίσης συγκέντρωσης σεληνίου με αυτή που περιέχει κάθε τροφή.

Φέτα	% Απόδοση		
	⁷⁷ Se	⁷⁸ Se	⁸² Se
Χοιρινό	104%	98%	95%
Πέρκα	90%	98%	92%
Μπριζόλα χοιρινή	92%	91%	95%
Μοσχάρι	97%	99%	101%
Κοτόπουλο	98%	90%	100%

Με τον εμβολιασμό ίσης συγκέντρωσης σεληνίου (πρότυπου διαλύματος) με τη συγκέντρωση Se που περιέχει κάθε παραπάνω τροφή, βρέθηκε η % απόδοση της ανάλυσης, η οποία ισούται με τη πειραματική τιμή / θεωρητική τιμή. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η επεξεργασία και η αποσύνθεση που έχει γίνει με τη χρήση της μεθόδου όξινης χώνευσης δεν επηρέασε τις μετρήσεις με αποτέλεσμα την ανάκτηση της συνολικής συγκέντρωσης Se που υπάρχει στο δείγμα.

3.1 Σύγκριση με άλλες αναφορές

Πίνακας 3.4 Σύγκριση συγκεντρώσεων Se σε τρόφιμα από άλλες αναφορές

Τρόφιμα	Se (μg /g ξηρού δείγματος)	Se (μg /g υγρού δείγματος)	Se (μg /g)
Φέτα	0,172	0,071	0.52 ¹ , 0.66 ² , 0.50 ⁵
Κουνουπίδι	0,068	0,039	0.03 ¹ , 0.09 ² , 0.022 ³ , 0.03 ⁴ , 0.24 ⁶ , 0.06 ⁷ , 0.07 ⁸
Κρεμμύδι	0,131	0,015	0.07 ¹ , 0.15 ² , 0.06 ³ , 0.12 ⁴ , 0.12 ⁶
Ντομάτα	0,035	0,005	0.02 ¹ , 0.10 ² , 0.005 ³ , 0.006 ⁴ , 0.005 ⁹ , 0.01 ¹² , 0.08 ⁶ , 0.04 ⁷
Μακαρόνι	0,052	0,016	0.16 ¹³
Ρύζι	0,019	0,006	0.10 ¹³
Πατάτα	0,025	0,007	0.01 ¹³ , 0.008 ¹⁴
Λάχανο	0,059	0,005	0.86 ⁷ , 0.01 ¹³
Μανιτάρια	0,266	0,133	0.08 - 0.10 ¹³
Κοτόπουλο	0,425	0,153	0.79 ¹ , 0.80 ² , 1.4 ³ , 2 ¹¹ , 0.6 ¹² , 1.2 ⁶ , 0.73 ⁵
Μοσχάρι	0,341	0,055	0.49 ¹ , 0.84 ² , 0.57 ³ , 0.11 ⁴ , 1.1 ⁹ , 0.58 ¹¹ , 0.53 ¹⁰ , 0.99 ¹²
Χοιρινό	0,521	0,185	0.94 ¹ , 0.99 ² , 1.1 ³ , 0.57 ⁴ , 1.2 ¹¹ , 1.3 ⁶ , 1.3 ¹²
Καλαμπόκι	0,035	0,013	0.011 ¹⁴
Άσπρο ψωμί	0,048	0,035	0.18 ¹⁴

* Η δεύτερη και η τρίτη στήλη αντιπροσωπεύει την ποσότητα Se σε μg /g δείγματος από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Οι τιμές που δίνονται στη δεύτερη στήλη είναι για ξηρό δείγμα. Ενώ οι τιμές που δίνονται στη τρίτη και στη τέταρτη στήλη είναι για υγρό δείγμα.

1.Greece (Eleni C.Pappa, Athanasios C.Pappa, Peter F. Surai) 2.Greece (Bratakos et al., 1989) 3.Slovakia (Kadrabova et al.,1997) 4.New Zealand (Thompson and Robinson, 1980) 5.UK (Barclay et al., 1995) 6.Croatia (Klapec et al.,2004) 7.USA (USDA, 2002) 8.Thailand (Sirichakwal et al., 2005) 9.Australia, (McNaughton and Marks, 2002) 10.Egypt (Hussein and Bruggeman, 1999) 11.Germany (Osterand, Prellwitz, 1989) 12.France (Simonoff et al., 1988) 13.Britain (Janet Thorn, Jean Robertson and D.H Buss, 1977) 14.USA (William R. Mindak and Scott P.Dolan).

3.2.1 Παρατηρήσεις

Στη παρούσα μελέτη οι αναλύσεις διεξήχθησαν σε ξηρό δείγμα για τον ακριβή προσδιορισμό του Se στα τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του Se σε υγρό δείγμα από τη ποσότητα του νερού κάθε δείγματος, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση με τις παραπάνω αναφορές, οι οποίες αναφέρονται σε υγρό δείγμα.

Τα λαχανικά όπως το κουνουπίδι και η ντομάτα περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις σεληνίου όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τη παρούσα μελέτη και τις άλλες αναφορές, στις οποίες συγκεντρώσεις Se, δεν διαφέρουν πολύ. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το χαμηλό κλάσμα πρωτεΐνης (υψηλό κλάσμα νερού) που διαθέτουν τα λαχανικά και από το γεγονός ότι το Se ενσωματώνεται στη πρωτεΐνη, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα λαχανικά διαθέτουν μικρή συγκέντρωση Se.

Είναι γνωστό ότι κάποια λαχανικά έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σεληνίου όπως το κρεμμύδι και το σκόρδο, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στη παρούσα μελέτη, αφού το κρεμμύδι βρέθηκε να περιέχει 0,015 $\mu\text{g Se / g}$, συγκέντρωση χαμηλότερη από τις παραπάνω αναφορές. Όταν η συγκέντρωση του σεληνίου σε αυτά τα φυτά είναι υψηλή, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι το σελήνιο αντικαθιστά το θείο σε ορισμένα πρωτεϊνικά αμινοξέα, από το γεγονός ότι αυτά τα φυτά διαθέτουν υψηλότερο κλάσμα αμινοξέων τα οποία περιέχουν θείο.

Η συγκέντρωση του σεληνίου σταμανιτάρια, στη παρούσα έρευνα (0,13 $\mu\text{g / g}$) δεν διαφέρει από τις παραπάνω αναφορές (0,10 $\mu\text{g / g}$). Συγκεκριμένα είδημανιταριών έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σελήνιο από το έδαφος και να το αποθηκεύουν σε υψηλά επίπεδα, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει σε καμία από τις παραπάνω αναφορές, αλλά ούτε και στη παρούσα εργασία.

Το κρέας είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και έτσι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σεληνίου όταν αναλύεται σε ξηρό δείγμα. Σε υγρό δείγμα όμως, η συγκέντρωση του σεληνίου είναι αρκετά μικρότερη όπως παρατηρήθηκε από τη παρούσα εργασία, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αναφορές.

Οι οποιεσδήποτε διαφορές που παρατηρούνται από τη σύγκριση των παραπάνω αναφορών σε σχέση με την παρούσα εργασία (υγρό δείγμα) μπορεί να οφείλονται, στο γεγονός ότι το σελήνιο ποικίλει γεωγραφικά μεταξύ και διαμέσου των χωρών λόγω της ποικιλομορφίας των συγκεντρώσεων του στο έδαφος.

3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων από 3 βδομάδες συλλογής μερίδας φαγητού

1^η βδομάδα

Στο πλαίσιο της 1^{ης} δειγματοληψίας, αναλύθηκε μερίδα φαγητού που περιείχε ρύζι, κοτόπουλο, ψωμί άσπρο και φακές. Πριν από την επεξεργασία των δειγμάτων ζυγίστηκε η ολική ποσότητα της κάθε μερίδας τροφίμου. Έτσι αφού αναλύθηκαν τα τρόφιμα και βρέθηκε η ποσότητα Se σε $\mu\text{g/g}$, υπολογίστηκε και η ποσότητα του Se που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη μερίδα φαγητού. Το ίδιο πραγματοποιήθηκε τις υπόλοιπες μέρες της βδομάδας δειγματοληψίας. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα αυτά.

- Η δεύτερη στήλη αντιπροσωπεύει την ολική ποσότητα κάθε τροφίμου, σε γραμμάρια (ξηρό δείγμα).
- Η τρίτη στήλη αντιπροσωπεύει την ποσότητα Se σε $\mu\text{g} / \text{g}$, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σε ξηρό δείγμα.
- Η τέταρτη στήλη αντιπροσωπεύει την ποσότητα του Se σε μg , (ξηρού δείγματος), όπου λαμβάνεται όταν καταναλώνεται η ολική ποσότητα του τροφίμου με βάση τις μερίδες που δίνονται καθημερινά.

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα μετρήσεων από 3 βδομάδες συλλογής φαγητού

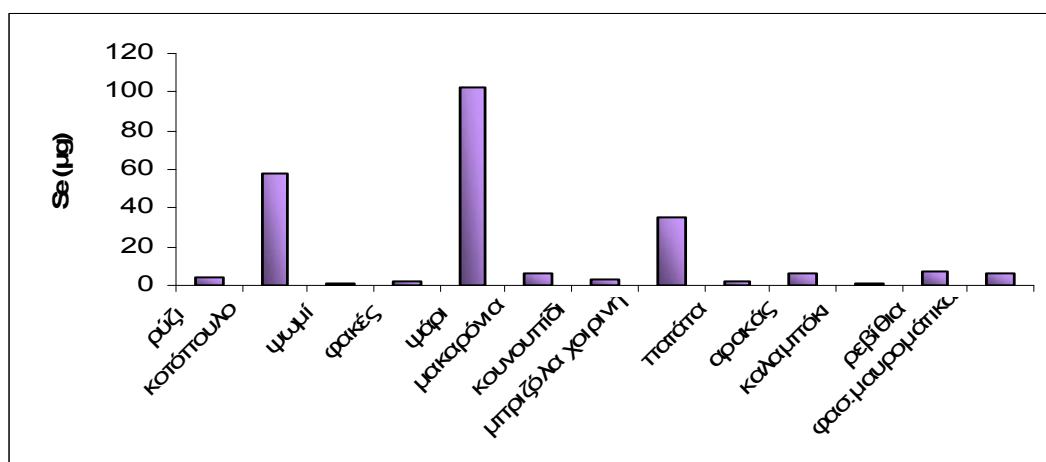
Δευτέρα			
	Ποσότητα τροφίμου (g ξηρού δείγματος)	Se ($\mu\text{g} / \text{g}$ ξηρού δείγματος)	Se (μg)
Ρύζι	229,7	0,019	4,36
Κοτόπουλο	137,5	0,425	58,4
Ψωμί άσπρο	20,9	0,048	1,00
Φακές (σαλάτα)	80,5	0,026	2,09
Συνολικά			65,8

Τρίτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se ($\mu\text{g} / \text{g}$)	Se (μg)
Πέρκα	95,1	1,072	102
Μακαρόνια	125,0	0,052	6,5
Κουνουπίδι	40,4	0,068	2,75
Συνολικά			111,2

Τετάρτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Μπριζόλα χοιρινή	76,4	0,455	34,8
Πατάτα	82,8	0,025	2,07
Συνολικά			36,9

Πέμπτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Αρακάς	131,8	0,045	5,93
Καλαμπόκι	38,7	0,035	1,35
Συνολικά			7,28

Παρασκευή			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Ρεβίθια	254,4	0,027	6,87
Φασολ.μαυρομάτικα	41,9	0,137	5,74
Συνολικά			12,61



Σχήμα 3.4 Ολικές ποσότητες Se σε τροφές οι οποίες αναφέρονται στα αποτελέσματα μετρήσεων της 1^{ης} εβδομάδας συλλογής μερίδων.

2^η εβδομάδα

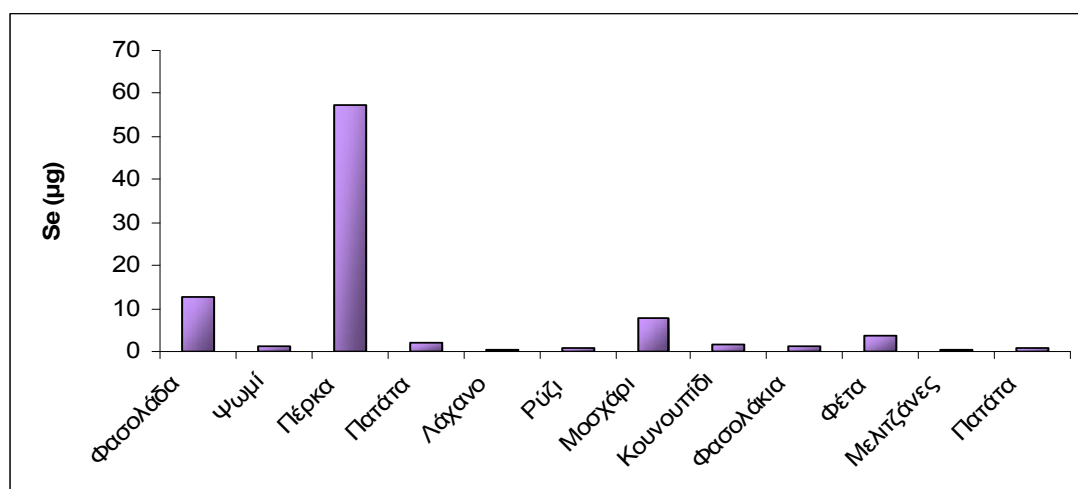
Δευτέρα			
	Ποσότητα τροφίμου (g ξηρού δείγματος)	Se (μg / g ξηρού δείγματος)	Se (μg)
Φασολάδα	148,6	0,084	12,5
Ψωμί	22,5	0,048	1,08
Συνολικά			13,6

Τρίτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Πέρκα	53,4	1,072	57,2
Πατάτα	87,9	0,025	2,2
Λάχανο	4,27	0,059	0,25
Συνολικά			59,7

Τετάρτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Ρύζι	52,1	0,019	0,99
Μοσχάρι	23,4	0,341	7,98
Κουνουπίδι	24,8	0,068	1,69
Συνολικά			10,7

Πέμπτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Φασολάκια	45,5	0,023	1,05
Φέτα	21,0	0,172	3,61
Συνολικά			4,66

Παρασκευή			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Μελιτζάνες	15,9	0,037	0,59
Πατάτα	36,8	0,025	0,92
Συνολικά			1,51



Σχήμα 3.5 Ολικές ποσότητες Se σε τροφές οι οποίες αναφέρονται στα αποτελέσματα μετρήσεων της ^{75}Se βδομάδας συλλογής μερίδων.

3^η βδομάδα

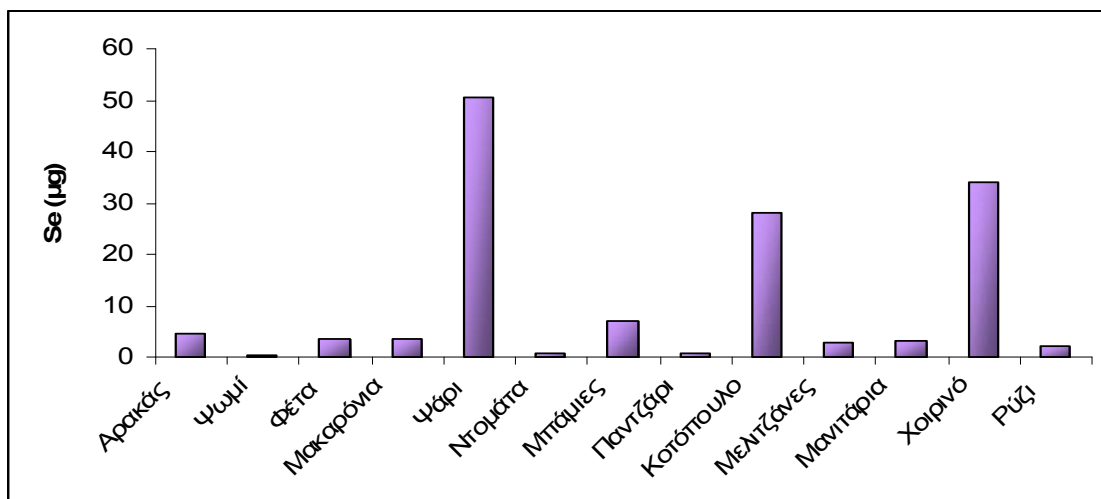
Δευτέρα			
	Ποσότητα τροφίμου (g ξηρού δείγματος)	Se (μg / g ξηρού δείγματος)	Se (μg)
Αρακάς	103,5	0,045	4,66
Ψωμί	10,5	0,048	0,50
Φέτα	21,3	0,172	3,66
Συνολικά			8,82

Τρίτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Μακαρόνια	70,03	0,052	3,64
Πέρκα	47,2	1,072	50,6
Ντομάτα	16,9	0,035	0,59
Συνολικά			54,8

Τετάρτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Μπάμιες	127,8	0,055	7,03
Παντζάρι	9,15	0,060	0,55
Συνολικά			7,58

Πέμπτη			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Κοτόπουλο	66,0	0,425	28,05
Μελιτζάνες	76,0	0,037	2,81
Μανιτάρια	11,3	0,266	3,01
Συνολικά			33,9

Παρασκευή			
	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Χοιρινό	65,2	0,521	34,0
Ρύζι	106,1	0,019	2,02
Συνολικά			36,02



Σχήμα 3.6 Ολικές ποσότητες Se σε τροφές οι οποίες αναφέρονται στα αποτελέσματα μετρήσεων της 3^{ης} εβδομάδας συλλογής μερίδων.

Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη όπως έχει καθορισθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση, είναι 55 µg /ημέρα. Όπως παρατηρούμε παραπάνω, τις περισσότερες μέρες της εβδομάδας η πρόσληψη από μία μερίδα φαγητού, που αντιπροσωπεύει ένα ημερήσιο γεύμα είναι χαμηλότερη από τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη. Μόνο τις ημέρες που υπάρχει ψάρι στη διατροφή η ημερήσια πρόσληψη είναι υψηλότερη (111.2 µg Se), από την συνιστώμενη (55 µg Se/ημέρα) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ψάρι περιέχει υψηλή συγκέντρωση σεληνίου.

Βέβαια ο κατάλληλος συνδυασμός δύο εκ των παραπάνω μερίδων φέρνει τα επίπεδα του ολικού σεληνίου πάνω από τα συνιστώμενα όρια.

4. DAFNE –Βάση δεδομένων

Η βάση δεδομένων DAFNE (Data Food Networking), στοχεύει στη δημιουργία Ευρωπαϊκής τράπεζας δεδομένων, βασισμένη στα κοινωνικό-οικονομικά και δημογραφικά δεδομένα τροφίμων από τις εθνικές αντιπροσωπευτικές έρευνες οικογενειακών προϋπολογισμών. Είναι μια προσπάθεια, να συγκριθούν οι συνήθειες τροφίμων των ευρωπαϊκών πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τα στοιχεία από τις εθνικές έρευνες οικιακών προϋπολογισμών, και να δημιουργηθεί μια τακτικά ενημερωμένη τράπεζα δεδομένων τροφίμων⁴⁹.

Από το 1987, το Εθνικό Κέντρο Διατροφής στην Αθήνα, έχει οργανώσει σειρά από έρευνες αποσκοπώντας στην ανάπτυξη του καταλληλότερου τρόπου χρησιμοποίησης των τροφίμων και των σχετικών δεδομένων από τις Έρευνες του Οικογενειακού Προϋπολογισμού. Ο χρήστης της βάσης δεδομένων DAFNE μπορεί να ακολουθήσει τη διαθεσιμότητα τροφίμων (ανά άτομο, ανά ημέρα) σε διάφορα επίπεδα λεπτομέρειας, που κυμαίνονται από 15 κύριες ομάδες τροφίμων ως 57 αναλυμένες τροφές. Οι εκτιμήσεις της διαθεσιμότητας παρουσιάζονται για το γενικό πληθυσμό της χώρας σε σχέση με^{50,51} :

- την αστικοποίηση της περιοχής κατοικίας
- το μορφωτικό επίπεδο του αρχηγού του νοικοκυριού
- την επαγγελματική απασχόληση του αρχηγού του νοικοκυριού
- την σύνθεση του νοικοκυριού

4.1 Πληροφορίες δείγματος στην Ελλάδα

Το μέγεθος του δείγματος ήταν 6258 (hhs-household surveys) οικιακοί προϋπολογισμοί και η περίοδος καταγραφής των τροφίμων 14 ημέρες. Σαν νοικοκυριό, είχε αποφασιστεί πως θα αντιπροσωπεύει, ένα άτομο που μένει μόνο του σε κατοικία, ή ομάδα ατόμων, που είναι συγγενείς ή όχι, που μένουν όμως στην ίδια κατοικία με κοινή οικοκυρά και γενικά που τρώνε μαζί⁵⁰.

Στοιχεία αυτής της βάσης δεδομένων φανερώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη διατροφική συμπεριφορά των Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Μεταξύ των δέκα Ευρωπαϊκών χωρών, οι Έλληνες κατατάσσονται πρώτοι στη κατανάλωση κόκκινου κρέατος (89 g/ άτομο / ημέρα), λαχανικών (229 g/ άτομο

/ημέρα) και ελαιολάδου (59 g/ άτομο/ ημέρα), ενώ έπονται των Ισπανών στη κατανάλωση φρούτων (282 και 308 g/άτομο / ημέρα, αντίστοιχα)⁴⁹.

Στο παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα διάφορα τρόφιμα, η τιμή Se (μg/g) σε, που έχει αναλυθεί σε κάθε τρόφιμο με τη τεχνική ICP-MS (μέγιστη και ελάχιστη τιμή) από την παρούσα εργασία (υγρό δείγμα) και η μέση κατανάλωση (g/άτομο/ ημέρα) κάθε Έλληνα σε καθημερινή βάση, η οποία δίνεται από τη βάση δεδομένων DAFNE. Με την συσχέτιση αυτών των στοιχείων, έχει εξαχθεί η συγκέντρωση του Se σε μg για κάθε τρόφιμο, όπου καταναλώνεται από ένα Έλληνα σε καθημερινή βάση.

Πίνακας 4.1 Μέση κατανάλωση των τροφών σε g/ημέρα από ένα έλληνα και ποσότητα του σεληνίου που λαμβάνει σε μg/ημέρα

	Se(μg/g) υγρού δείγματος	± sd	max	min	Μέση κατανάλωση (g/άτομο/ημέρα) DAFNE	Se(μg/ημέρα)	
						max	min
Κουνουπίδι	0,039	0,0028	0,0418	0,0362	6,06	0,2533	0,2192
Φακές	0,008	0,0027	0,0107	0,0053	5,27	0,0564	0,0277
Παντζάρι	0,006	0,0013	0,0073	0,0047	2,19	0,0160	0,0103
Λάχανο	0,005	0,0012	0,0062	0,0038	14	0,0868	0,0536
Ντομάτα	0,005	0,0020	0,0070	0,0030	80	0,5600	0,2421
Ρεβίθια	0,010	0,0024	0,0124	0,0076	1,47	0,0182	0,0112
Αρακάς	0,015	0,0083	0,0233	0,0067	0,56	0,0130	0,0038
Αγγουράκι	0,007	0,0011	0,0081	0,0059	14	0,1134	0,0831
φασ.μαυρο- μάτικα	0,052	0,0046	0,0566	0,0474	6,86	0,3883	0,3249
Μπάμιες	0,004	0,0029	0,0069	0,0011	1,63	0,0112	0,0018
Ψωμί άσπρο	0,035	0,0043	0,0393	0,0307	167	6,5631	5,1316
Ψωμί μαύρο	0,018	0,0051	0,0231	0,0129	167	3,8577	2,1468
Καλαμπόκι	0,013	0,0014	0,0144	0,0116	2,47	0,0356	0,0286
Φασολάδα	0,032	0,0010	0,0329	0,0310	6,86	0,2257	0,2130
Πατάτα	0,007	0,0029	0,0099	0,0041	136	1,3464	0,5610
Ρύζι	0,006	0,0018	0,0078	0,0042	15	0,1170	0,0629
Μακαρόνια	0,016	0,0109	0,0269	0,0051	28	0,7532	0,1430
Μανιτάρια	0,133	0,0149	0,1479	0,1181	0,82	0,1213	0,0968
Φέτα	0,071	0,0025	0,0735	0,0685	31	2,2785	2,1229
Κοτόπουλο	0,055	0,0033	0,0583	0,0517	37	2,1571	1,9112
Χοιρινό	0,185	0,0009	0,1859	0,1841	22	4,0898	4,0493
Μοσχάρι	0,055	0,0010	0,0560	0,0540	52	2,912	2,8080
Μπριζόλα χοιρινή	0,182	0,0080	0,1899	0,1740	22	4,1778	3,8287
Πέρκα	0,319	0,0017	0,3207	0,3173	6,03	1,9338	1,9134
Μπακαλιάρος	0,373	0,0254	0,3984	0,3476	5,53	2,2032	1,9224
					Συνολικά	34,3	27,9

4.1.1 Παρατηρήσεις

Η Διατροφή μελετά τις θρεπτικές ύλες, τις ποσοτικές ανάγκες του οργανισμού σε αυτές, τα αποτελέσματα της ανεπάρκειας ή υπερβολικής λήψης των θρεπτικών υλών, τη πέψη και απορρόφηση των τελικών προϊόντων των θρεπτικών υλών και το ρόλο τους στον οργανισμό και γενικά τις μεταβολές και τα αποτελέσματα των μεταβολών των διαφόρων τροφίμων στον οργανισμό.

Η ποσότητα που χρειάζεται το σώμα για να διατηρήσει το υγιές βάρος, κυμαίνεται ανάλογα με την ηλικία, το φύλλο, το μέγεθος του σώματος, την φυσική δραστηριότητα και αν είναι το άτομο εγκυμονούσα ή θηλάζουσα.

Συνολικά από τις μετρήσεις και την επεξεργασία που έχει διεξαχθεί στη παρούσα μελέτη, εξάγεται το συμπέρασμα, ότι ο Έλληνας καταναλώνει 34,3 (μέγιστη τιμή) – 27,9 (ελάχιστη τιμή) μg Se ημερησίως (το αποτέλεσμα αυτό είναι η μέση κατανάλωση η οποία εξάγεται από τα στοιχεία αστικοποίησης, το μορφωτικό επίπεδο, την επαγγελματική απασχόληση και τη σύνθεση του νοικοκυριού μέσα από τη βάση δεδομένων *dafne*). Παρατηρούμε ότι αυτές οι τιμές είναι μικρότερες από τη τιμή της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης και αυτό ίσως να οφείλεται είτε στο ποσό κατανάλωσης των τροφίμων, είτε στη κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων που περιέχουν μειωμένη συγκέντρωση Se.

4.2 ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ Se ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΧΩΡΕΣ

Πίνακας 4.2 Ημερήσια Πρόσληψη σεληνίου όπως έχει προσδιορισθεί σε διάφορες μελέτες.

Χώρα	Πρόσληψη Se (μg /άτομο/ Ημέρα)
Ελλάδα (παρούσα μελέτη*)	34,3-27,9
Ελλάδα	39,3 ¹
Ελλάδα	110 ²
Τουρκία	30 ³
Ισπανία	32,3 ⁴
Πολωνία	30-40 ⁵
Ηνωμένο Βασίλειο	34 ⁶
Ελβετία	70 ⁷
Ολλανδία	67 & 110 ⁸
Κροατία	33,9 ⁹
Αίγυπτος	49 ¹⁰
Αυστρία	48 ¹¹
Αυστραλία	110-120 ¹²
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	60-150 ¹³
Καναδάς	110-220 ¹⁴
Γαλλία	166 ¹⁵
Ιταλία	141 ¹⁵

* Σε συνδυασμό με τη βάση δεδομένων DAFNE.

¹Eleni C.Pappa, Athanasios C.Pappa, Peter F. Surai, (2006), ²Bratakos and Ioannou, (1991), ³Foster and Sumar, (1997), ⁴Diaz-Alarcon et al.,(1996),⁵Wasowicz et al., (2003), ⁶Barclay et al., (1995),⁷Foster and Sumar, (1997), ⁸ Foster and Sumar, (1997) & Cresta (1976), ⁹Matecet et al., (2000), ¹⁰ Hussein and Bruggeman, (1999), ¹¹Wilpinger et al., (1998), ¹²McNaughton and Marks, (2002), ¹³Schroeder et al.,(1970), ¹⁴Thompson, Erdody & Smith, (1975), ¹⁵Cresta, (1976)

4.2.1 Παρατηρήσεις

Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του Se σε μg /άτομο/ ημέρα, στις διάφορες χώρες, ίσως να οφείλονται στην υψηλότερη ή χαμηλότερη περιεκτικότητα σεληνίου στις διάφορες τροφές αφού το σελήνιο ποικίλει ανάμεσα στις χώρες λόγω της ύπαρξης και ποικιλίας του στο έδαφος. Επίσης ίσως να οφείλεται στην επιλογή των ανθρώπων ή της οικογένειας όπου έγινε η μελέτη και στο χρονικό διάστημα το οποίο καταγράφηκε και υπολογίσθηκε η κατανάλωση των τροφίμων.

Όπως παρατηρούμε, έχουν γίνει προηγουμένως 2 μελέτες στην Ελλάδα. Ενώ στη μία μελέτη⁵⁵, η ημερήσια πρόσληψη Se ($110 \mu\text{g}$ / ημέρα), υπερβαίνει την Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη ($55 \mu\text{g}$ / ημέρα), στην άλλη μελέτη⁵⁶ η ημερήσια πρόσληψη Se ($39,3 \mu\text{g}$ / ημέρα), είναι χαμηλότερη της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης. Ναι μεν το Se, ποικίλει ανάμεσα στις χώρες, αλλά επίσης, ποικίλει και μεταξύ της ίδιας χώρας. Αυτό ίσως να οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση Se, που παρατηρείτε στα τρόφιμα στη μία μελέτη⁵⁵. Ακόμη ένας λόγος ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι στη μία μελέτη η καθημερινή πρόσληψη Se έχει εκτιμηθεί επιλέγοντας μία οικογένεια μεσαίου-εισοδήματος, αντιπροσωπευτική της πλειοψηφίας των ελληνικών οικογενειών και επίσης ότι καταγράφηκε η κατανάλωση τροφίμων για 30 μέρες⁵⁵. Στη παρούσα μελέτη η ημερήσια πρόσληψη σεληνίου ($34,3 \mu\text{g}$ / ημέρα), δεν υπερβαίνει την Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη, αλλά είναι μικρότερη από αυτή τη τιμή. Η τιμή αυτή, η οποία εξάγεται από την παρούσα εργασία συμφωνεί με τις αναφορές της Ελλάδας¹, της Τουρκίας³, της Ισπανίας⁴, της Πολωνίας⁵, του Ηνωμένου Βασιλείου⁶ και της Κροατίας⁹. Η καταγραφή των αγαθών στη παρούσα εργασία έγινε στο χρονικό διάστημα των 14 ημερών, το έτος 1998.

5. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με τη Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (HPLC – ICP-MS) για την ειδοταυτοποίηση Σεληνίου στις τροφές.

5.1 Εισαγωγή

Ο συνδυασμός μίας χρωματογραφικής τεχνικής διαχωρισμού, με την φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, επιτρέπει την ανίχνευση των μορφών ενός στοιχείου. Στοχεύοντας στον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών του σεληνίου σε δείγματα ψαριών, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι ώστε να βρεθεί η αποδοτικότερη, η οποία θα δώσει την μέγιστη ανάκτηση του ενδιαφέροντος στοιχείου και των μορφών του.

Τα ψάρια χαρακτηρίζονται από μία υψηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών, εξαιρετικά ποικιλόμορφη περιεκτικότητα λιπιδίων και ασήμαντη ποσότητα υδατανθράκων. Η περιεκτικότητα των ψαριών σε νερό ποικίλει πάρα πολύ (28-90%) στα διάφορα είδη και είναι γενικά αντιστρόφως ανάλογη προς την λιποπεριεκτικότητά τους. Η χημική σύσταση των ψαριών εξαρτάται από το είδος τους, τη περιοχή (βιότοπο) που ζουν, την ηλικία τους και τη διατροφή τους. Τα ψάρια έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν εξαιρετικές ποσότητες σεληνίου και έτσι ξεχωρίζουν ως μία σημαντική πηγή διατροφής γι' αυτό το στοιχείο⁵⁸. Η διατροφή σε ψάρι έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται σημαντικά με την δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και τις συγκεντρώσεις Se στη σεληνοπρωτεΐνη P⁵⁹.

5.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης - HPLC

Η επιλογή μίας κατάλληλης προεργασίας είναι κλειδί για τον προσδιορισμό των μορφών του σεληνίου. Η κύρια δυσκολία για τη ταυτοποίηση του σεληνίου και των μορφών του είναι η διαδικασία της εκχύλισης. Κατά την εκχύλιση δεν πρέπει να αλλοιωθεί η χημική μορφή των ειδών του στοιχείου και έτσι οι συνθήκες της εκχύλισης πρέπει να είναι χημικά ήπιες, ενώ παράλληλα πρέπει να επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση εκχύλισης. Γενικά η εκχύλιση είναι ένα κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση ειδοπροσδιορισμού του σεληνίου.

Διαφορετικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές αναφορές για να ανακτηθούν οι ενώσεις σεληνίου από βιολογικά δείγματα. Οι εκχύλισεις αυτές περιλαμβάνουν υδατικά διαλύματα και υδατο-οργανικά μίγματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αποδέσμευση ελευθέρων αμινοξέων όσο και διαλυτών και ασθενώς δεσμευμένων ειδών σεληνίου από διάφορες βιολογικές μήτρες. Σαν γενικό συμπέρασμα, χαμηλές αποδόσεις σεληνίου εμφανίζονταν σε όλες τις περιπτώσεις^{60,61}.

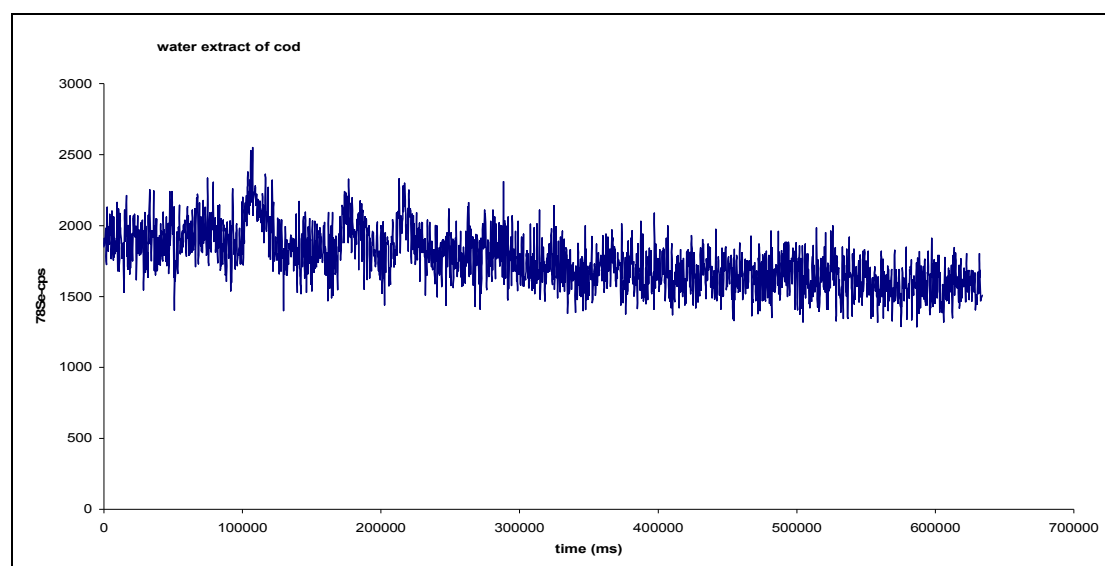
Στη παρούσα μελέτη αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης σε δύο είδη ψαριών, το μπακαλιάρο και τη σαρδέλα, για το ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών σεληνίου ώστε να βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος που θα δώσει τα καλύτερα επιθυμητά αποτελέσματα (% απόδοση της εκχύλισης).

Έτσι χρησιμοποιήθηκε σύστημα παροχής κινητής φάσης αποτελούμενο από μια αντλία για ισοκρατική έκλυση συνδεδεμένο με ICP-MS και σαν χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιήθηκε η C8-3, 5 μ m PerfectSil Target, 150 x 4.0 mm με ταχύτητα ροής 0,5 ml/min.

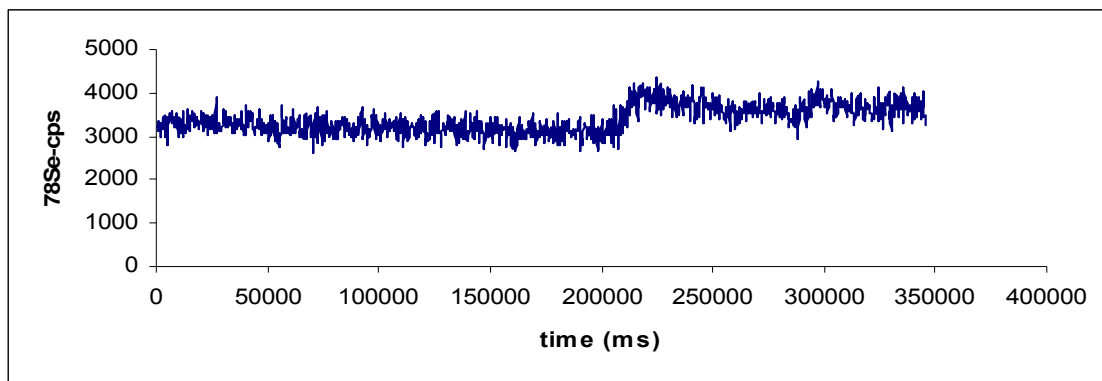
5.2.1 Μπακαλιάρος

Μέθοδοι εκχύλισης :

5.2.1.1 Υδατική εκχύλιση



Σχήμα 5.1 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος αμαγείρευτου μπακαλιάρου με νερό, στη συνέχεια στους υπερήχους και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά.

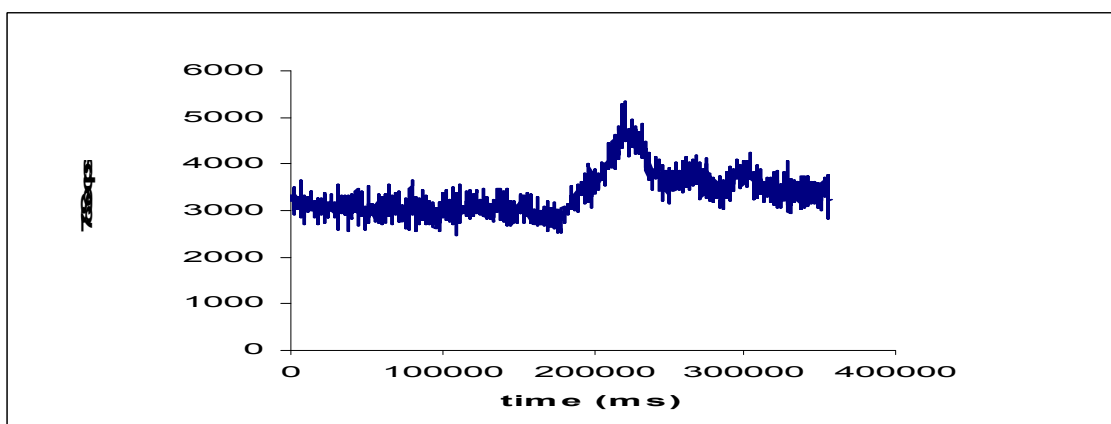


Σχήμα 5.2 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος μαγειρεμένου μπακαλιάρου με νερό , στη συνέχεια στους υπερήχους και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά.

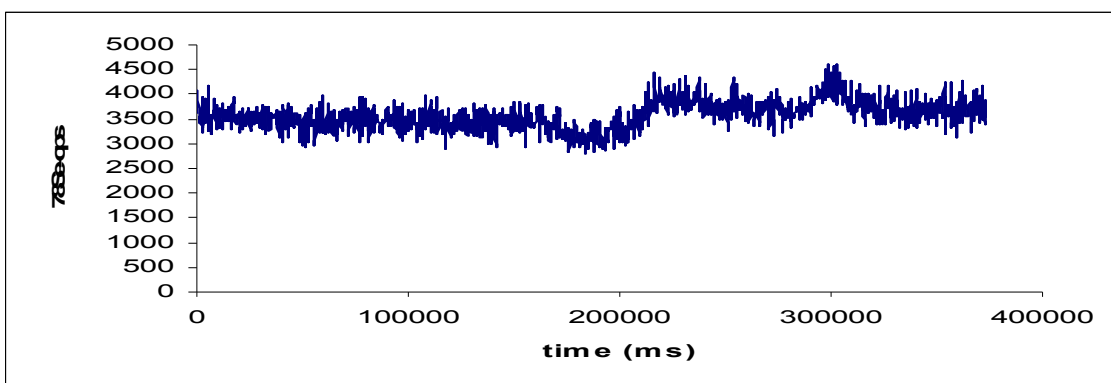
Με την υδατική εκχύλιση ανιχνεύονται μόνο οι ελεύθερες ανόργανες ενώσεις σεληνίου και τα ευδιάλυτα αμινοξέα σεληνίου¹⁹. Όπως παρατηρήθηκε στα παραπάνω χρωματογραφήματα η υδατική εκχύλιση δεν δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα και αυτό φαίνεται από τις χαμηλές εντάσεις των κορυφών και τη πολύ χαμηλή απόδοση της εκχύλισης (7%).

5.2.1.2 Εκχύλιση με buffer (Tris- HCl)

Tris- HCl : Χρησιμοποιείται σαν ρυθμιστικό λόγω της σταθερότητας του και της συμβατότητας του με τα βιολογικά συστήματα. Επίσης απαιτείται η χρήση του buffer σε φυσιολογικό pH ώστε να αποφευχθεί η διάσπαση και ο διαχωρισμός των ενώσεων⁶².



Σχήμα 5.3 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος αμαγείρευτου μπακαλιάρου με Tris-HCl, pH 7.2



Σχήμα 5.4 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχύλισματος μαγειρεμένου μπακαλιάρου με Tris-HCl, pH 7.2

Όπως παρατηρήθηκε και πάλι, οι κορυφές δεν είχαν αυξημένη ένταση και επίσης η απόδοση της εκχύλισης ήταν πολύ μικρή (11%) που σημαίνει ότι από το ψάρι, έχει ανακτηθεί ένα μικρό μέρος του συνολικού Se. Φαίνεται ότι το Tris-HCl buffer ελευθερώνει μόνο τις ασθενώς δεσμευμένες μορφές σεληνίου.

5.2.1.3 Ενζυματική υδρόλυση – χώνευση

Για την απελευθέρωση των ειδών σεληνίου πραγματοποιείται επίσης η ενζυματική χώνευση, όπου χρησιμοποιείται ένα είδος ενζύμου το οποίο δρα σε συγκεκριμένους χημικούς δεσμούς. Έτσι στη παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ενζυματική χώνευση αφού η χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία διασπών τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, είναι η πιο συχνή εφαρμογή.

Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα τα οποία υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων στις πρωτεΐνες, παρέχοντας πεπτίδια και αμινοξέα^{19,52}. Μη συγκεκριμένα ένζυμα πρωτεάσης είναι ικανά ώστε να διασπών ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών στα επιμέρους αμινοξέα. Έτσι η ενζυματική υδρόλυση, απελευθερώνει τα δεσμευμένα ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες, σεληνοαμινοξέα.

Η απόδοση της εκχύλισης με τη μέθοδο της ενζυματικής υδρόλυσης εξαρτάται από τον τύπο του ενζύμου και τις συνθήκες εκχύλισης (π.χ χρόνος επώασης και αναλογία δείγματος / ένζυμο)⁶³. Ακόμη η ενζυματική χώνευση οδηγεί σε μια σημαντική μείωση στο επίπεδο της μήτρας των πρωτεϊνών και αυτές οι διαδικασίες μπορούν να είναι χρήσιμες και στα υγρά βιολογικά δείγματα. Επίσης, τα μικρά πεπτίδια που παρατηρούνται μετά από την διάσπαση των πρωτεϊνών δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθοδολογίας.

5.2.1.4 Pronase E

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Pronase E, μία πρωτεάση με ευρεία λειτουργικότητα η οποία απομονώνεται από το *Streptomyces griseus*⁶⁴ και αποτελείται από 10 τουλάχιστον πρωτεολυτικά συστατικά⁶⁵. Επίσης η Pronase E είναι μία μη-συγκεκριμένη πρωτεάση, ικανή να διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς οποιασδήποτε πρωτεΐνης.

Προτεινόμενη σχάση⁶⁶

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa hydrophobic ↓ hydrophobic Xaa Xaa Xaa

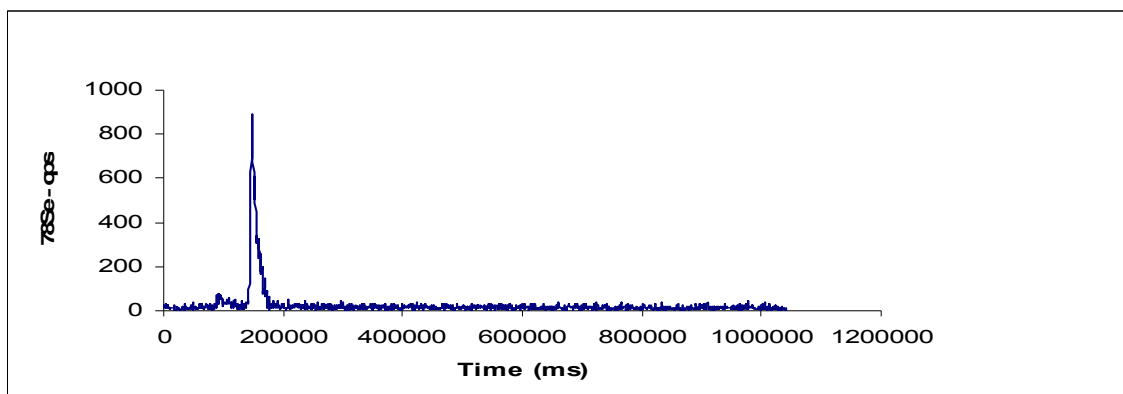
Xaa = οποιοδήποτε κατάλοιπο αμινοξέος

Υδρόφοβο= Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr

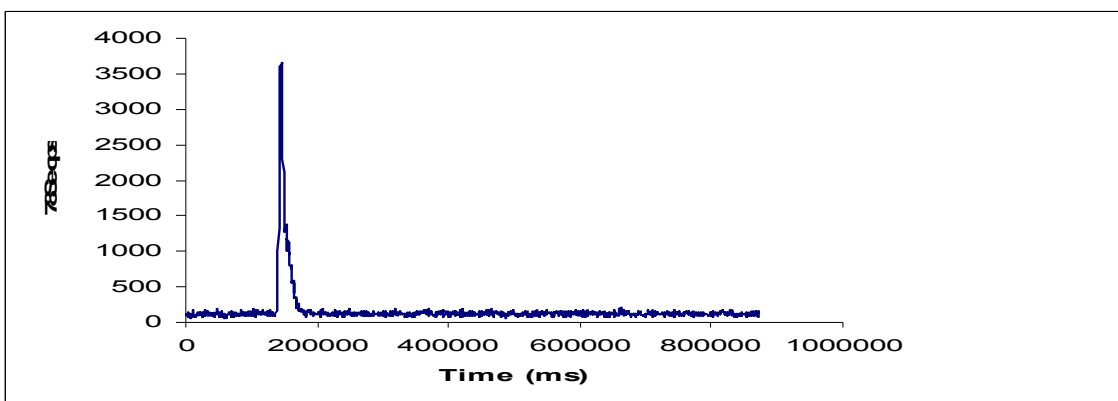
↓ = πλευρά σχάσης

Έτσι χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Pronase E (0,02g) σε δείγμα μπακαλιάρου (0,4g) με 30mM Tris-HCl buffer pH 7.2 και το δείγμα κρατήθηκε για επώαση 24 ώρες στους 37 °C. Μετά φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά. Ο χρόνος της επώασης εξαρτάται από το στοιχείο ενδιαφέροντος, που σχετίζεται με την δέσμευση του στις πρωτεΐνες της μήτρας.

- Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν το οξικό αμμώνιο ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) και 5% MeOH με pH 7.
- Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η BDS HYPERSIL C18

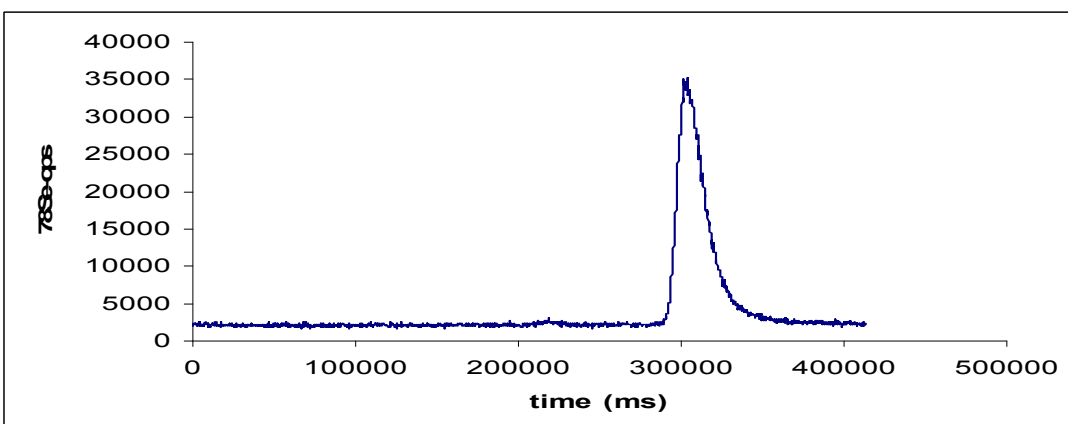


Σχήμα 5.5 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος μαγειρεμένου μπακαλιάρου με το ένζυμο Pronase E και το Tris-HCl buffer.

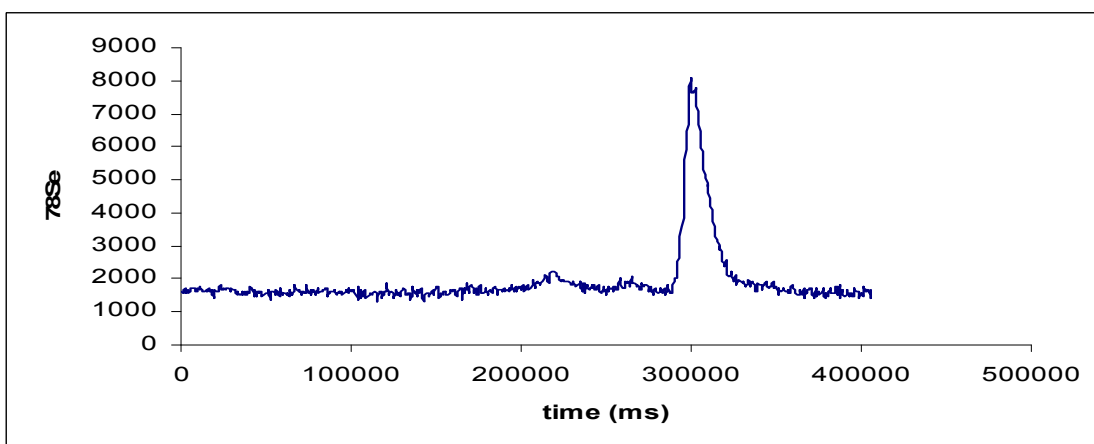


Σχήμα 5.6 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS προτύπου σεληνομεθειονίνης - 50ppb

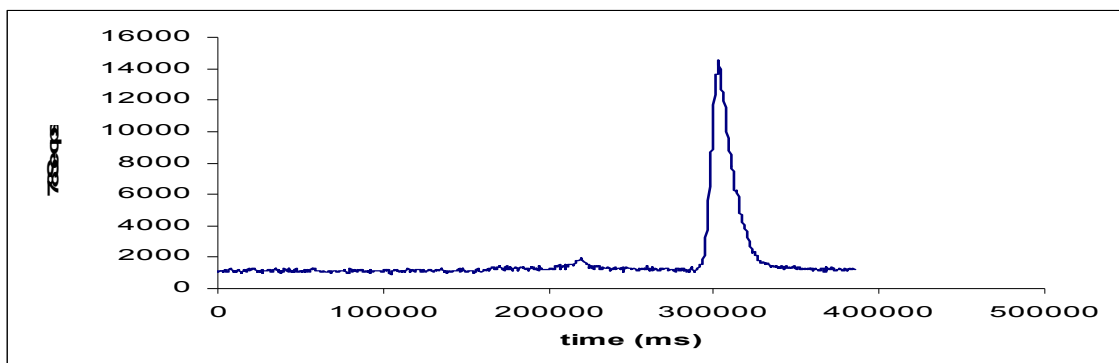
Παρατηρήθηκε ότι η κορυφή έχει μικρό χρόνο κατακράτησης και επίσης η ένταση της κορυφής είναι μικρή. Προς διόρθωση έγινε αλλαγή της χρωματογραφικής στήλης από C18 σε C8.



Σχήμα 5.7 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS προτύπου σεληνομεθειονίνης -50 ppb



Σχήμα 5.8 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος μαγειρεμένου μπακαλιάρου με ενζυματική υδρόλυση (Pronase E) ενός σταδίου (Tris-HCl buffer)



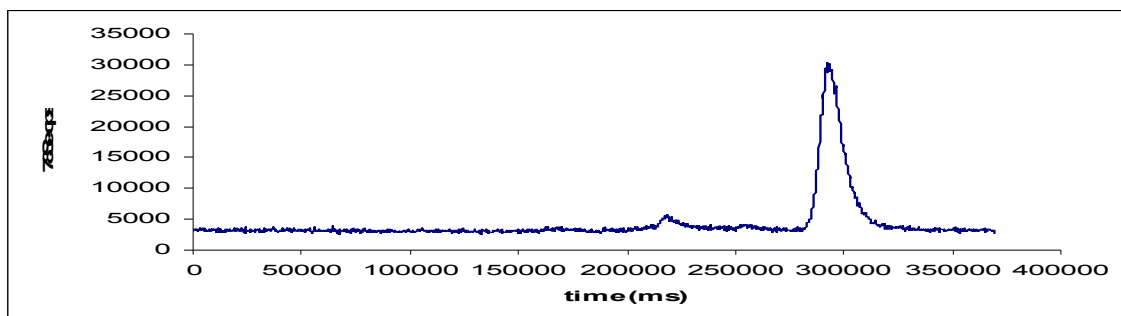
Σχήμα 5.9 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος αμαγείρευτου μπακαλιάρου με ενζυματική υδρόλυση (Pronase E) ενός σταδίου (Tris-HCl buffer)

Όπως παρατηρούμε η κορυφή είχε μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης αλλά η απόδοση της εκχύλισης ήταν χαμηλή (18 %), οπότε συμπεραίνουμε ότι και πάλι δεν ανακτήθηκε όλο το σελήνιο από το ψάρι με αυτή τη μέθοδο. Άρα η ενζυματική χώνευση ενός σταδίου δεν ήταν αποδοτική στη διάσπαση των πεπτιδίων ή πρωτεϊνών σε μικρότερα θραύσματα και γι' αυτό το λόγο μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι μερική ποσότητα σεληνίου έχει παραμείνει σε πεπτιδική μορφή.

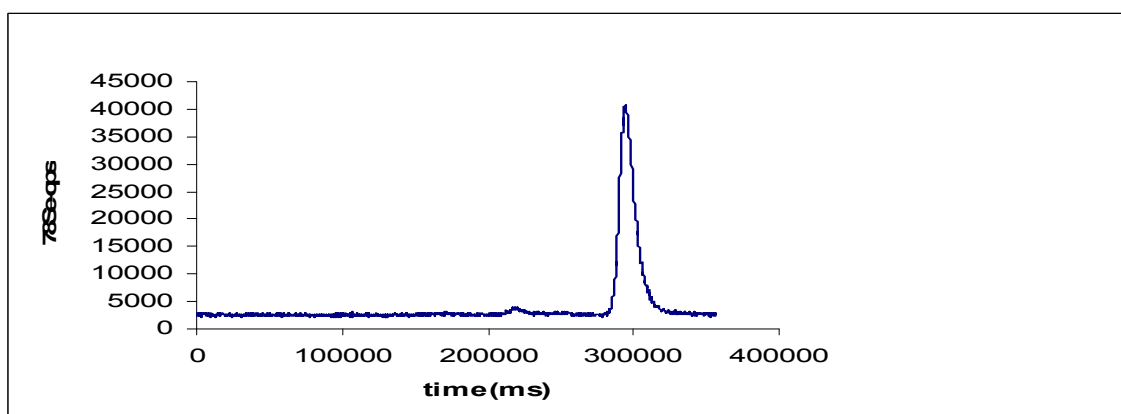
Συγκρίνοντας το μαγειρεμένο και αμαγείρευτο μπακαλιάρo διαπιστώσαμε ότι η ένταση της κορυφής Se στο αμαγείρευτο είναι μεγαλύτερη από ότι στο μαγειρεμένο. Προς απλούστευση της ανάπτυξης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια της μελέτης το αμαγείρευτο ψάρι. Η περιεκτικότητα τους σε σελήνιο δεν διαφέρει και πολύ, δηλαδή η συγκέντρωση του Se δεν επηρεάστηκε σχεδόν καθόλου από το μαγείρεμα (μαγειρεμένο: 1,28 μg/g και αμαγείρευτο: 1,33 μg/g) και έτσι μας επιτρέπεται να χρησιμοποιήσουμε στις παρακάτω μετρήσεις το αμαγείρευτο ψάρι.

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι για την καλύτερη απόδοση της εκχύλισης χρειάζονται επιπλέον στάδια ενζυματικής χώνευσης. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ενζυματική χώνευση 2 σταδίων όπου το δείγμα κρατήθηκε για επώαση 24 ώρες με το ένζυμο Pronase E και μετά από 24 ώρες προστέθηκε το ίδιο ένζυμο στην ίδια ποσότητα και κρατήθηκε για επώαση ακόμη 24 ώρες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι στην αρχή κάθε σταδίου ενζυματικής χώνευσης γίνεται υδατική εκχύλιση όπου προστίθεται νερό στο δείγμα και στην συνέχεια μεταφέρετε στους υπερήχους για 30 λεπτά, ώστε να σπάσουν οι ιστοί, δηλαδή να επιταχυνθεί η διάλυση. Στη συνέχεια φυγοκεντρείτε και λαμβάνετε το κατακάθι (ίζημα), εισάγεται

στο freeze drier όπου γίνεται η λυοφιλίωση του και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία με το Tris-HCl buffer (0,1 M) και το ένζυμο.



Σχήμα 5.10 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εκχυλίσματος ενζυματικής (Pronase E) υδρόλυσης 2 σταδίων (αμαγείρευτου μπακαλιάρου)



Σχήμα 5.11 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εμβολιασμού - spike (εκχύλισμα ενζυματικής υδρόλυσης 2 σταδίων + 50ppb SeMet)

Όπως παρατηρούμε από τα παραπάνω χρωματογραφήματα, η εκχύλιση και η ανάλυση διαχωρισμού έχουν βελτιωθεί σημαντικά. Η αναγνώριση της χρωματογραφικής κορυφής επιτυγχάνεται με τον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης του διαθέσιμου προτύπου και με τη μέθοδο εμβολιασμού. Έτσι με την μέθοδο εμβολιασμού προτύπου σεληνομεθειονίνης, συμπεραίνουμε ότι η κορυφή αυτή είναι όντως η σεληνομεθειονίνη η οποία έχει χρόνο κατακράτησης περίπου 5 λεπτά.

Η σεληνομεθειονίνη έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες ότι τείνει να συσσωρεύεται στις πρωτεΐνες. Είναι η κύρια μορφή σεληνίου η οποία ενσωματώνεται μη-συγκεκριμένα στις πρωτεΐνες στη θέση της μεθειονίνης⁶⁷.

Οι ενζυματικές εκχυλίσεις, γενικά ελευθερώνουν σεληνομεθειονίνη. Έτσι και στη μελέτη που διεξήχθη, συμπεράναμε ότι η ενζυματική εκχύλιση ελευθέρωσε

σεληνομεθειονίνη, τη κυρίαρχη μορφή του σεληνίου στα περισσότερα τρόφιμα, η οποία απορροφάται και αποθηκεύεται στο ανθρώπινο σώμα.

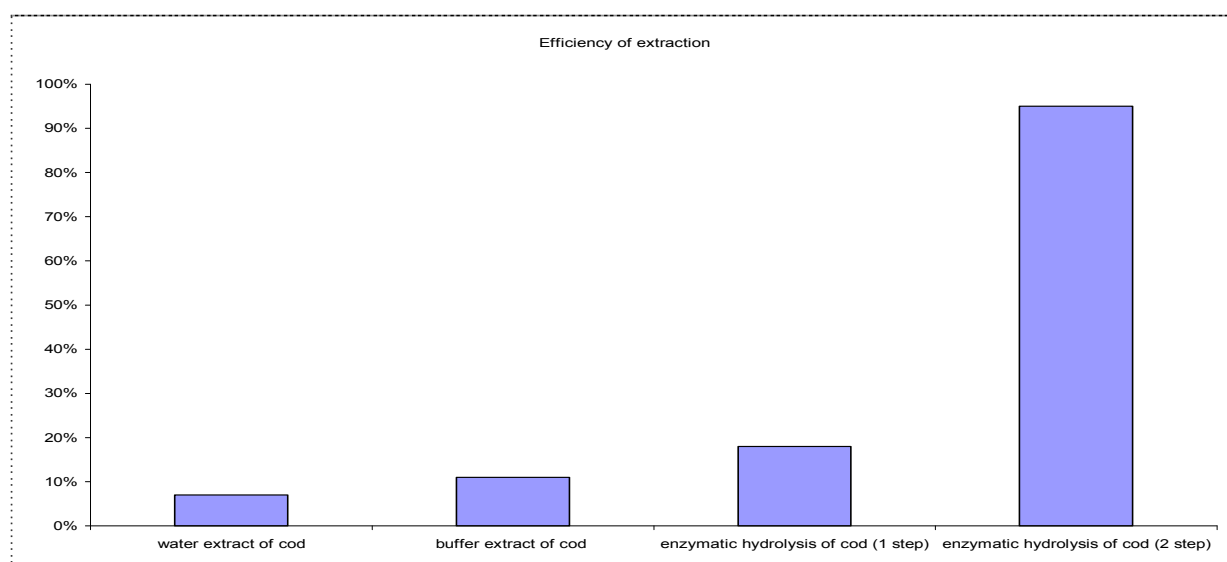
5.2.1.5 Απόδοση της εκχύλισης

Η απόδοση της εκχύλισης είναι απαραίτητη ώστε να διεξαχθεί το συμπέρασμα αν όντως έχει ανακτηθεί όλη η ποσότητα σεληνίου από το δείγμα δηλαδή αν έχει βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης και ελευθέρωσης των ειδών και μορφών του ενδιαφέροντος στοιχείου.

Απόδοση της εκχύλισης =

$$\frac{\text{Συγκέντρωση του σεληνίου στο εκχύλισμα}}{\text{Συγκέντρωση του σεληνίου στο στερεό δείγμα}} * 100$$

Η συγκέντρωση του σεληνίου στο εκχύλισμα προσδιορίζεται από τη μέθοδο όξινης χώνευσης χρησιμοποιώντας 65% HNO₃, όπου το εκχύλισμα προετοιμάζεται ακριβώς όπως τα δείγματα και μετρείται μέσω της τεχνικής του ICP-MS.



Σχήμα 5.12. % Απόδοση της εκχύλισης για τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης

5.2.1.6 Παρατηρήσεις

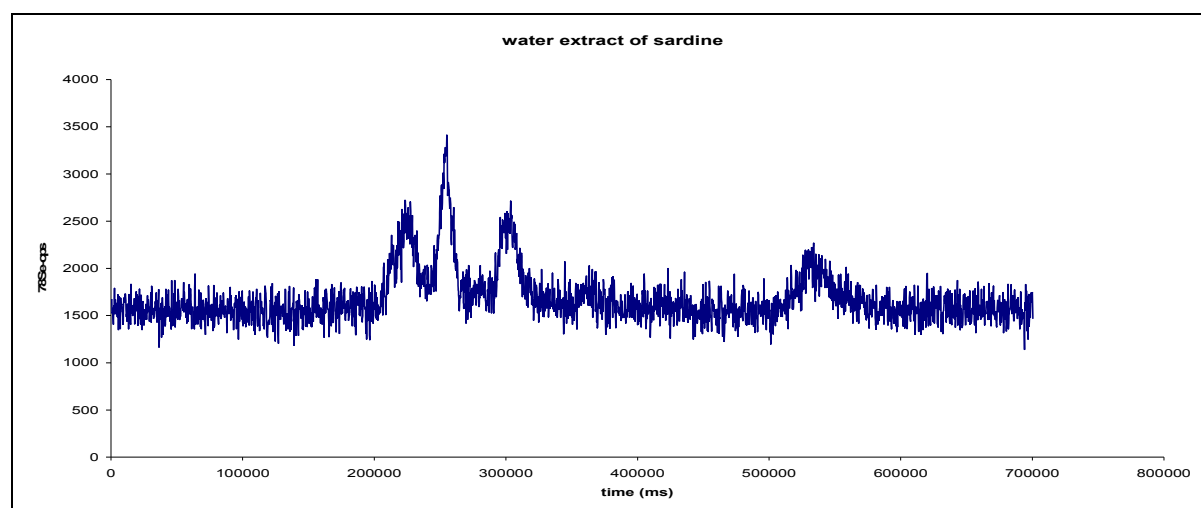
Όντως η ενζυματική χώνευση 2 σταδίων δίνει την καλύτερη απόδοση της εκχύλισης (98%). Έτσι συμπεραίνουμε ότι το 98% του Se έχει περάσει από το δείγμα-ψάρι, στο εκχύλισμα. Οι χαμηλές αποδόσεις εκχύλισης της υδατικής, όξινης και ενζυματικής εκχύλισης ενός σταδίου οφείλονται στη μη-ολοκληρωμένη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών, λόγω του ότι η δομή της πρωτεΐνης δεν μπορεί να αποσυντεθεί πλήρως από τα πρωτεολυτικά ένζυμα.

5.2.2 Σαρδέλα

Χρησιμοποιήθηκε ακόμη ένα δείγμα ψαριού, η σαρδέλα, όπου και αναλύθηκε με τη χρήση της τεχνικής ICP-MS αποσκοπώντας στο προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας σεληνίου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι εκχυλίσεις που είχαν γίνει για το δείγμα του μπακαλιάρου.

Σαρδέλα : 2 μg Se / g, συνολική συγκέντρωση Se.

5.2.2.1 Υδατική εκχύλιση

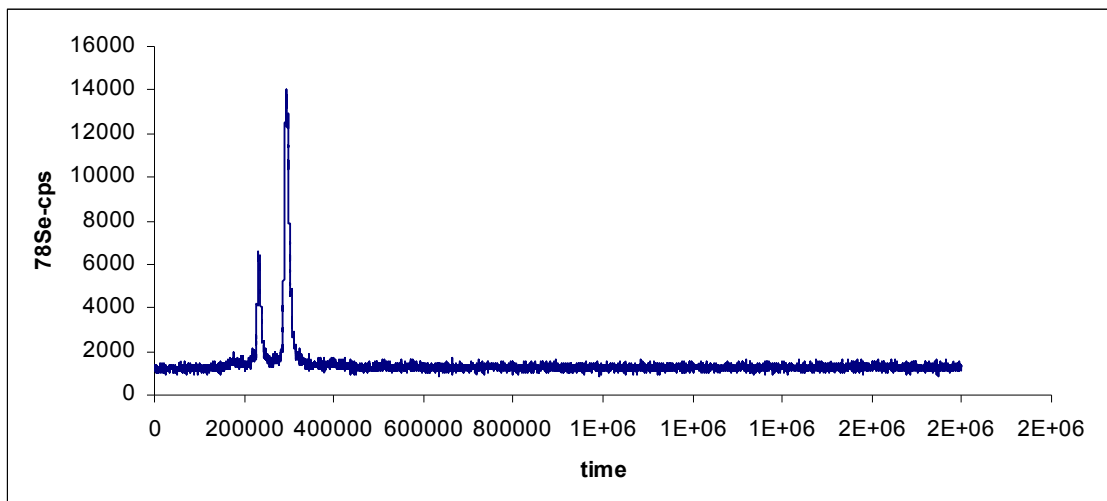


Σχήμα 5.13 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS υδατικής εκχύλισης του δείγματος σαρδέλα

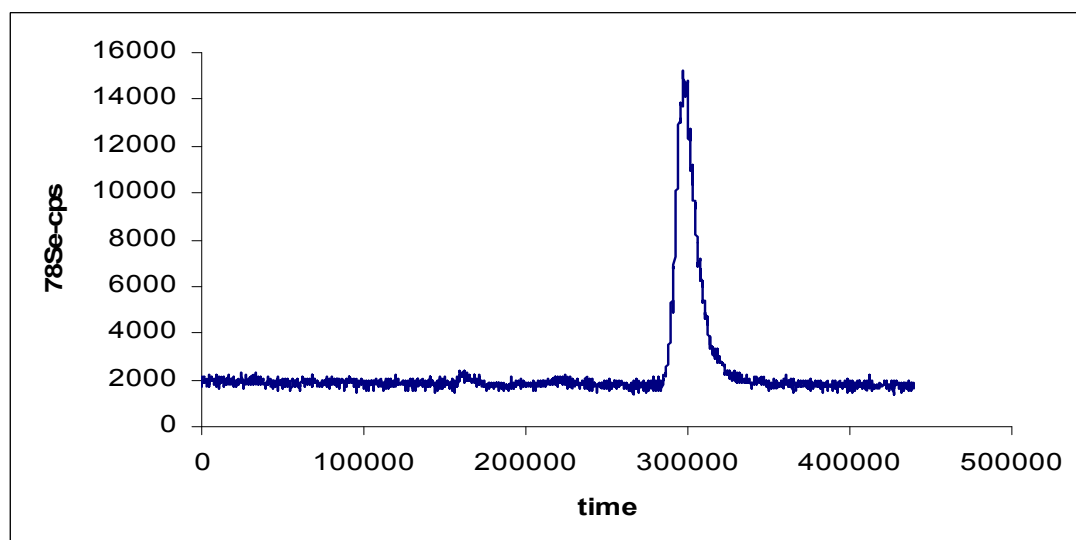
Όπως παρατηρούμε η υδατική εκχύλιση δεν είναι κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης αφού η απόδοση της εκχύλισης βρέθηκε να είναι 11%. Η υδατική εκχύλιση όπως αναφέραμε και προηγουμένως μπορεί να ελευθερώσει το ασθενές δεσμευμένο ανόργανο σεληνίο και τυχόν διαλυτά αμινοξέα σεληνίου.

5.2.2.2 Ενζυματική Χώνευση δύο σταδίων

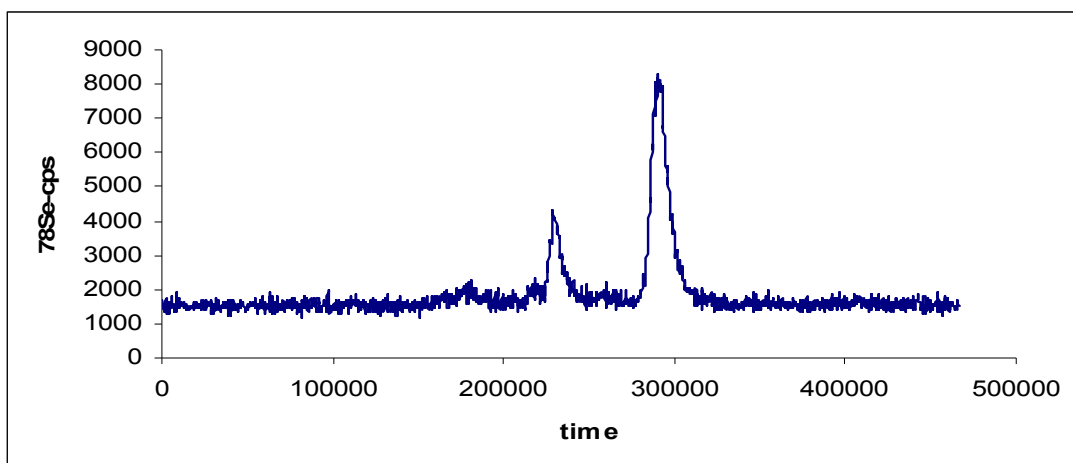
Στη συνέχεια προς βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία ενζυμικής χώνευσης 2 σταδίων όπως και στο μπακαλιάρο.



Σχήμα 5.14 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS ενζυματικής χώνευσης δύο σταδίων του δείγματος σαρδέλας



Σχήμα 5.15 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS προτύπου σεληνομεθειονίνης 50ppb

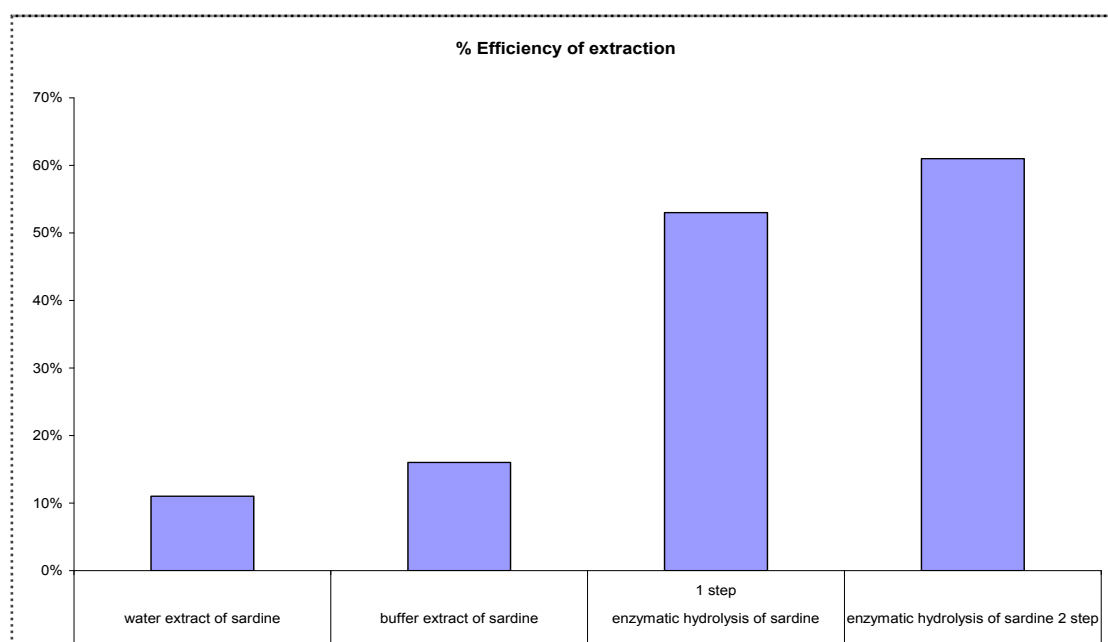


Σχήμα 5.16 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εμβολιασμού - Spike : σεληνομεθειονίνη + δείγμα σαρδέλας

Η μεγάλη κορυφή συμπεραίνουμε ότι είναι η σεληνομεθειονίνη λόγω του αντίστοιχου διαθέσιμου προτύπου της σεληνομεθειονίνης και της μεθόδου εμβολιασμού συγκρινόμενου του χρόνου κατακράτησης.

Η μικρότερη κορυφή στο χρωματογράφημα, παραμένει άγνωστη για το λόγο ότι και άλλα διαθέσιμα πρότυπα (σεληνοκυστίνη, τριμεθυλοσεληνικό ιόν (TlMe^+), σεληνοκυσταμίνη, σεληνικό, σεληνιώδες) αναλύθηκαν και κανένα δεν είχε τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αυτή. Η άγνωστη αυτή κορυφή ίσως να ανήκει σε μία ανιοντική μορφή σεληνίου.

5.2.2.3 % Απόδοση της εκχύλισης



Η απόδοση της εκχύλισης για το δείγμα της σαρδέλας, για την υδατική εκχύλιση βρέθηκε να είναι 11%, για την εκχύλιση με buffer 16%, για την ενζυματική χώνευση 1 σταδίου 53% και την ενζυματική χώνευση 2 σταδίων 61%.

Όταν η απόδοση της εκχύλισης δεν είναι τόσο αποτελεσματική, σημαίνει ότι δεν έχουν διασπαστεί επαρκώς τα πεπτίδια ή οι πρωτεΐνες σε μικρότερα θραύσματα και έτσι μερική ποσότητα σεληνίου μπορεί να παραμένει σε πεπτιδική μορφή.

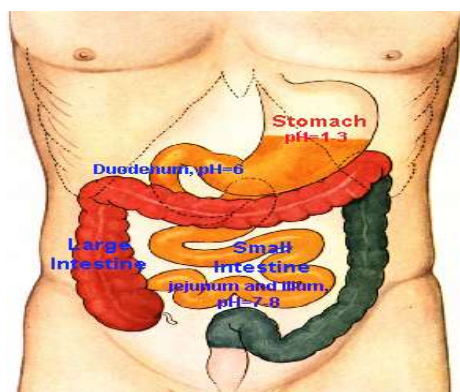
6. Βιοδιαθεσιμότητα

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος μελετάμε την βιοδιαθεσιμότητα του σεληνίου σε ψάρια, δηλαδή το ποσοστό της λαμβανόμενης ποσότητας σεληνίου που μπορεί να απορροφηθεί κατά την διάρκεια της γαστρικής χώνευσης και συνεπώς να μετατραπεί σε δραστικά μεταβολικά είδη⁶⁸. Η βιοδιαθεσιμότητα του θρεπτικού είναι το σημαντικότερο κριτήριο για την θρεπτική ποιότητα της κάθε τροφής.

Η βιοδιαθεσιμότητα του σεληνίου επηρεάζεται από τη χημική μορφή του σεληνίου και άλλους διατροφικούς παράγοντες που αυξάνουν ή μειώνουν την απορρόφησή του. Αυτές οι μορφές μπορεί να υπάρξουν στη τροφή χωρίς να τροποποιηθούν κατά την διάρκεια της χώνευσης αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις σχηματίζονται στην γαστρεντερική περιοχή. Συνεπώς, μόνο μία ποσότητα αυτών των συστατικών των τροφών απορροφάται και χρησιμοποιείται.

Μία διατροφή με επαρκή επίπεδα σεληνίου, δεν σημαίνει απαραίτητως ότι το ανθρώπινο σώμα έχει απορροφήσει όλη την ποσότητα σεληνίου που καταναλώθηκε⁵⁴. Έτσι παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μιας *in vitro* μεθόδου χώνευσης για τον μπακαλιάρο και την σαρδέλα και η βιοδιαθεσιμότητα του σεληνίου στα δείγματα.

Τα *in vitro* γαστρεντερικά μοντέλα προσφέρουν μια απλή και γρήγορη εφαρμογή για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των στοιχείων. Οι περισσότερες *in vitro* μέθοδοι περιλαμβάνουν μία προσομοιωμένη γαστρεντερική χώνευση με την πεψίνη στο γαστρικό στάδιο και ένα μίγμα παγκρεατίνης, χολικών αλάτων και α-αμυλάσης κατά το εντερικό στάδιο⁵⁴.



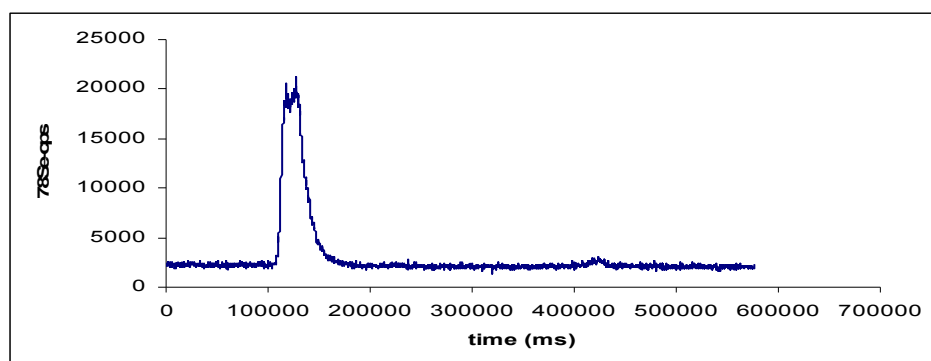
Σχήμα 6.1 Ανθρώπινο σώμα με τις διάφορες τιμές του pH που υπάρχουν σε κάθε όργανο⁶⁹.

Όταν η τροφή εισέρχεται στο στομάχι, προκαλεί την παραγωγή και την έκκριση υδροχλωρικού οξέος και το pH στο στομάχι μειώνεται από 4 σε 2. Όταν η τροφή στη συνέχεια εισέρχεται στο δωδεκαδάκτυλο, εκκρίνονται δισανθρακικά ιόντα, τα οποία εξουδετερώνουν το όξινο περιβάλλον και έτσι το pH στο δωδεκαδάκτυλο γίνεται 6. Τελικά το pH του λεπτού εντέρου γίνεται αλκαλικό και συγκεκριμένα 7-8.

6.1 Αποτελέσματα Γαστρεντερικής χώνευσης

6.1.1 Μπακαλιάρος

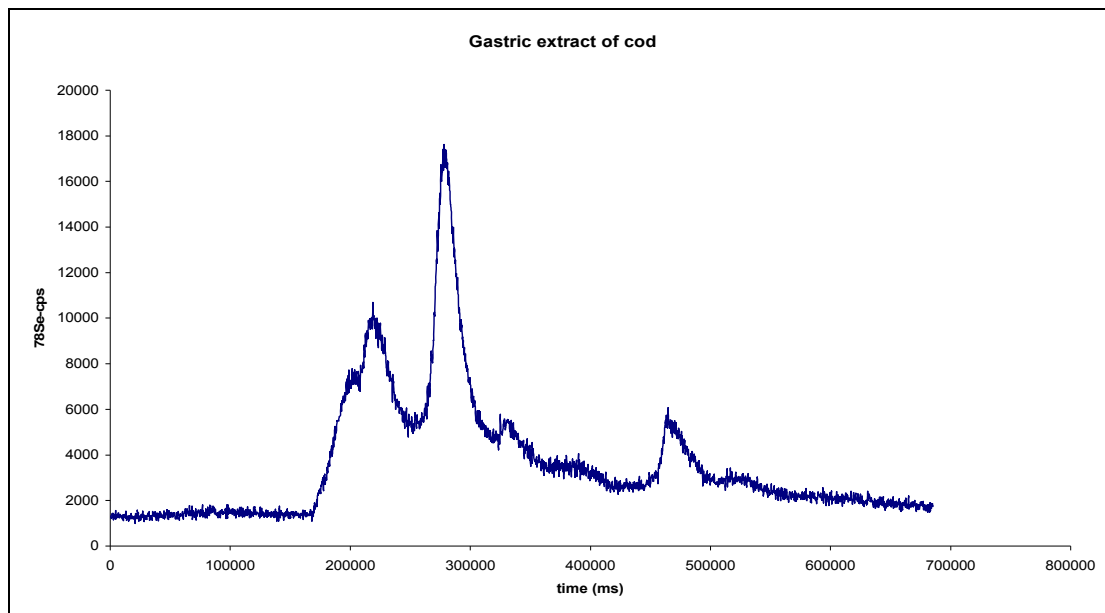
Στην αρχή χρησιμοποιήθηκε στήλη κατιονανταλλαγής, Zorbax SCX και κινητή φάση 4mM πυριδίνη με 3% μεθανόλη όπου το pH ρυθμίστηκε με φορμικό οξύ στα 4,7. Με την χρωματογραφία κατιονανταλλαγής, θεωρήθηκε ότι θα διαχωριστούν τα οποιαδήποτε κατιόντα που υπάρχουν στο δείγμα.



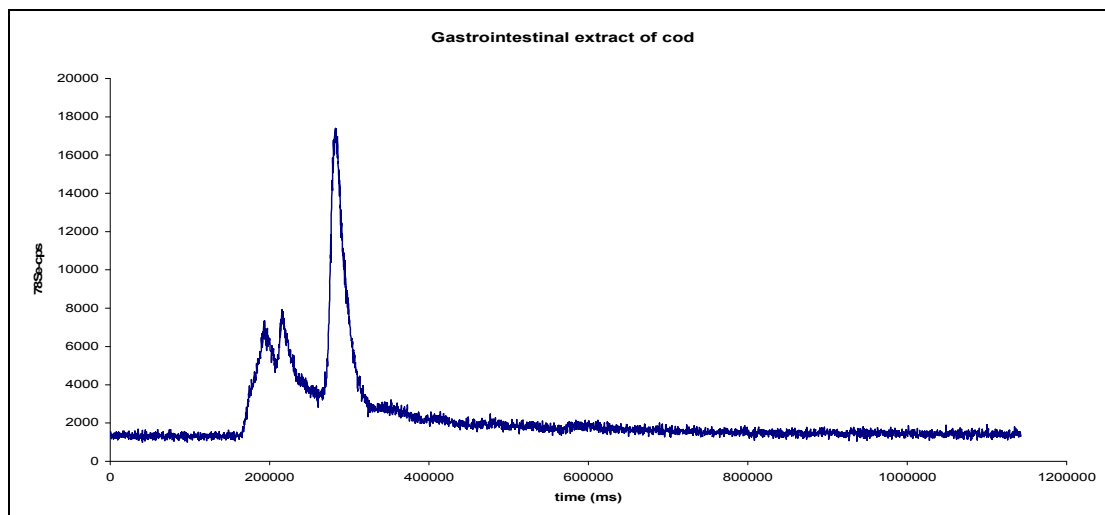
Σχήμα 6.1 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS δείγματος γαστρεντερικής χώνευσης μπακαλιάρου.

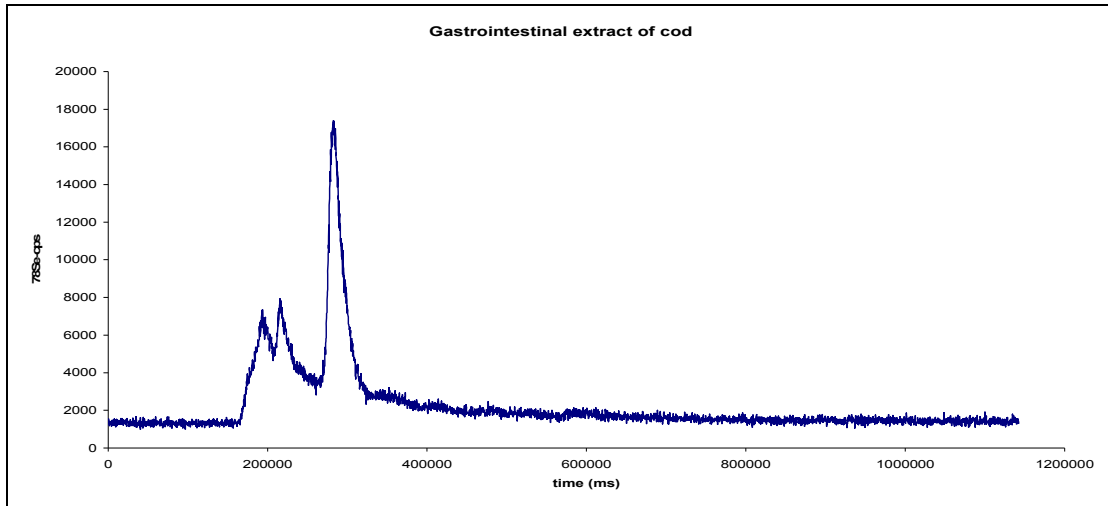
- Εξάγεται το συμπέρασμα, ότι η κατιονανταλλακτική χρωματογραφία δεν είναι κατάλληλη αφού δεν υπήρξε καλός διαχωρισμός και έτσι χρησιμοποιήθηκε και πάλι η αντίστροφης φάσης χρωματογραφία και στήλη C8 με κινητή φάση, οξικό αμμώνιο ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) και 5% MeOH με pH 7.
- Καθώς ένα υδρόφοβο βιομόριο κατακρατείται στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η έκλουση του επιτυγχάνεται με την προσθήκη μεθανόλης καθώς μειώνει τη πολικότητα της κινητής φάσης. Η μεθανόλη επίσης αυξάνει την ευαισθησία του οργάνου, όταν χρησιμοποιείται σε ποσοστό μικρότερο από 5% .

- Για να προληφθεί το φαινόμενο αλατότητας στους κώνους, δειγματολήπτη και αποκορυφωτή, η κινητή φάση είναι προτιμότερο να περιλαμβάνει άλατα με οργανικά ανιόντα, όπως οξικά, φορμικά και κιτρικά.

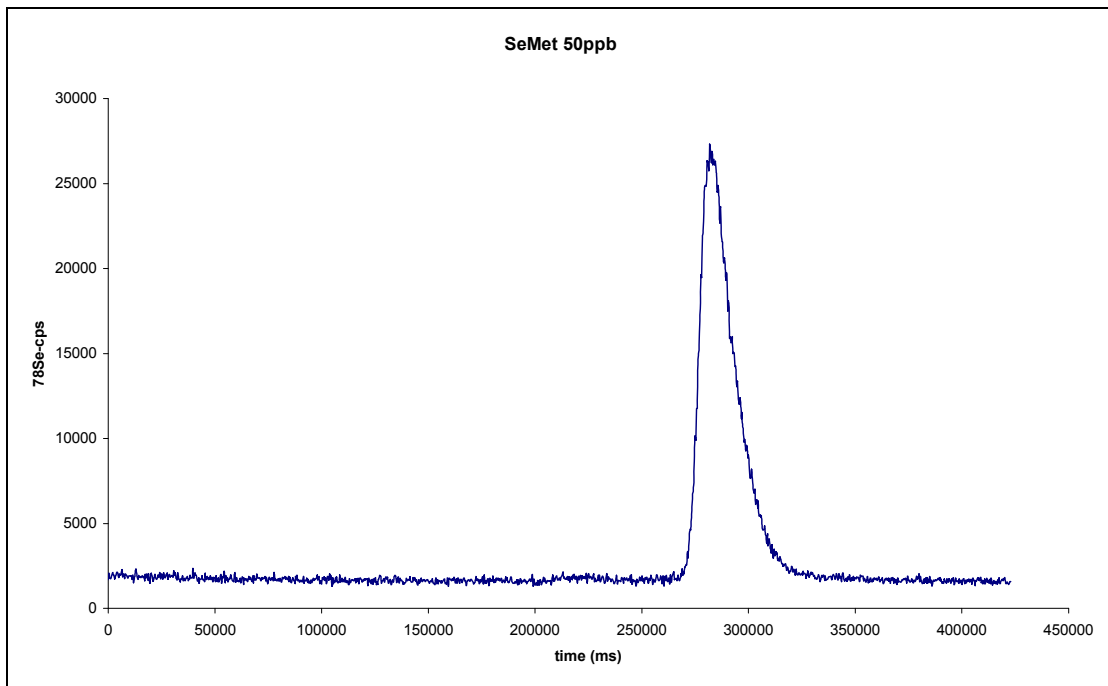


Σχήμα 6.2 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS γαστρικού εκχυλίσματος μπακαλιάρου.

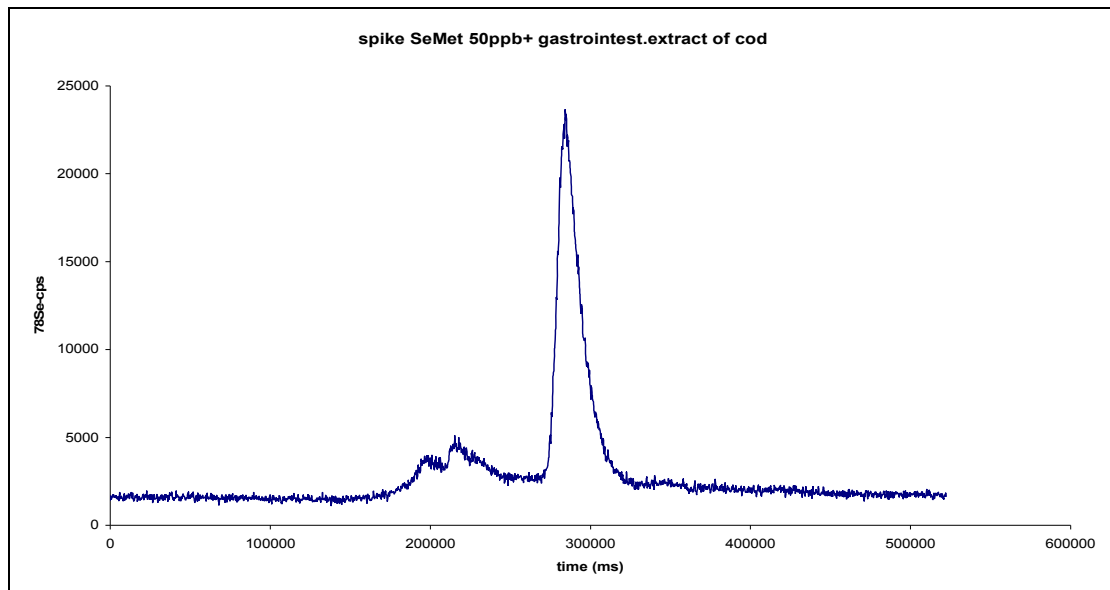




Σχήμα 6.3 Χρωματογραφήματα HPLC-ICP-MS γαστρεντερικού εκχυλίσματος μπακαλιάρου. Στήλη C8 και η κινητή φάση οξικό αμμώνιο και μεθανόλη.



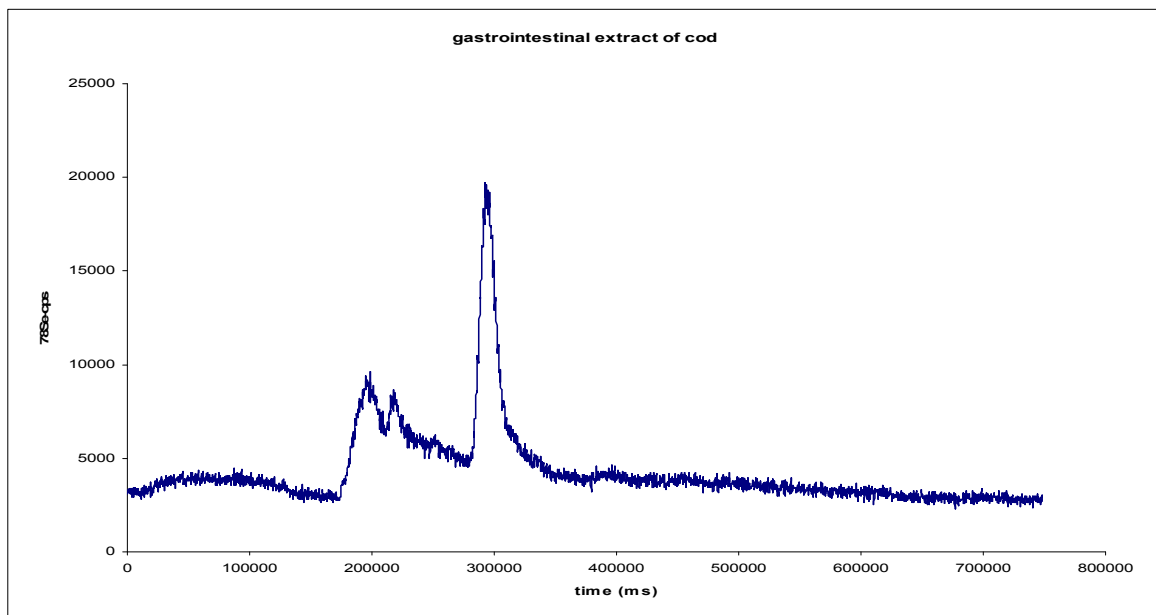
Σχήμα 6.4 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS προτύπου σεληνομεθειονίνης 50ppb

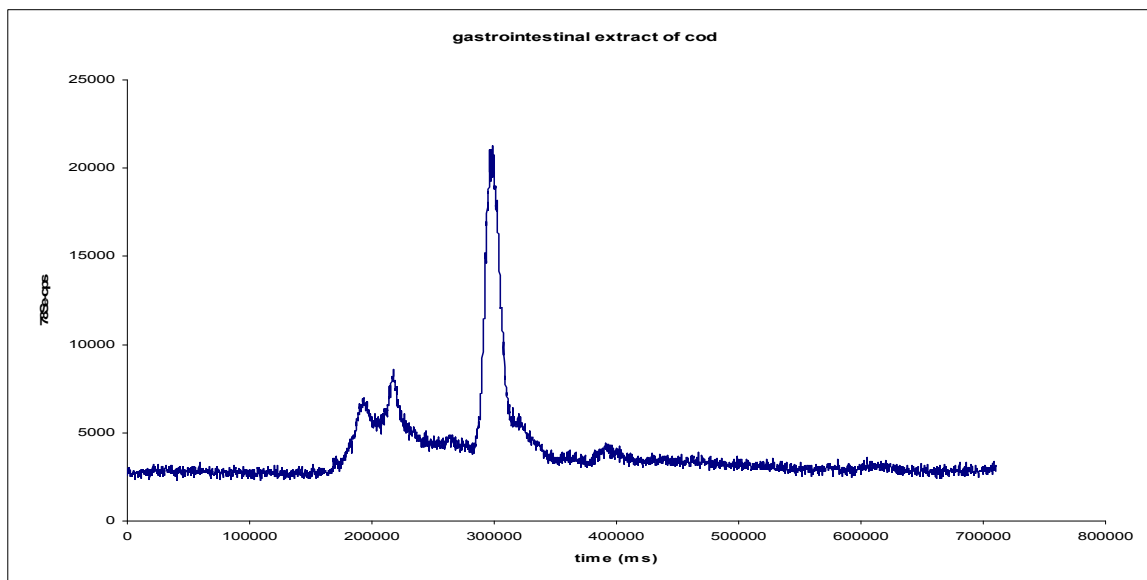


Σχήμα 6.5 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εμβολιασμού- Spike: SeMeth 50ppb + γαστρεντερικό εκχύλισμα μπακαλιάρου

Όπως μπορούμε να συμπεράνουμε από τη μέθοδο εμβολιασμού και το χρόνο κατακράτησης του διαθέσιμου προτύπου, η οξεία κορυφή αντιστοιχεί στην σεληνομεθειονίνη, που είναι και η κύρια μορφή σεληνίου.

Όπως παρατηρούμε η πρώτη άγνωστη κορυφή παραμένει σταθερή με αυτή την κινητή φάση, σε αντίθεση με την αστάθεια της σε κινητή φάση πυριδίνης, pH 4.7 και 3% μεθανόλη (σχ. 6.6), οπότε συμπεραίνουμε ότι με την στήλη C8 η καταλληλότερη κινητή φάση είναι το οξικό αμμώνιο με 5% μεθανόλη σε pH 7.



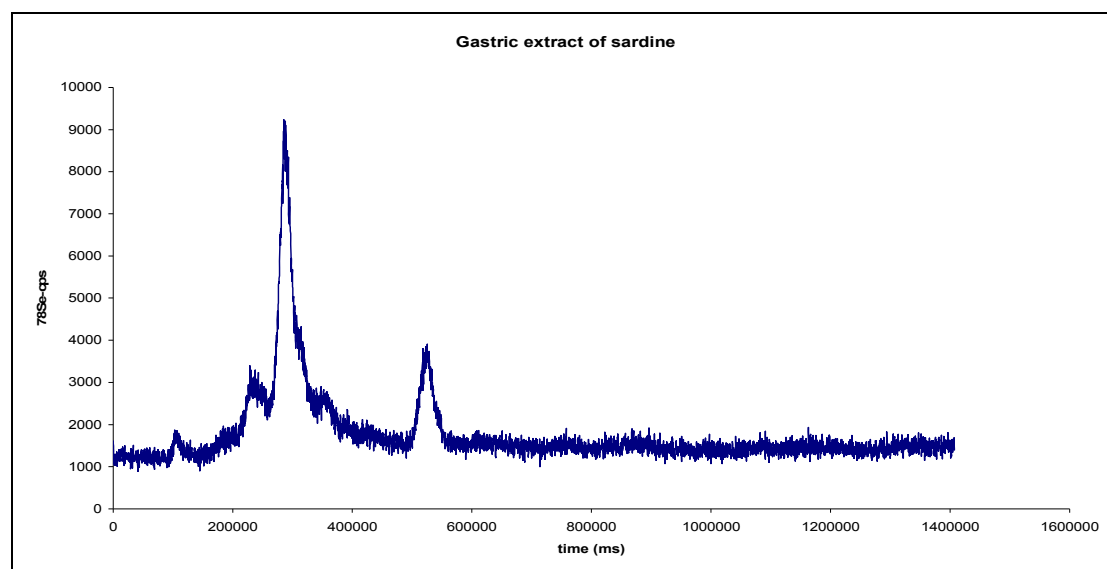


Σχήμα 6.6 Χρωματογραφήματα HPLC-ICP-MS γαστρεντερικού εκχυλίσματος μπακαλιάρου. Στήλη C8 και η κινητή φάση πυριδίνη σε pH 4.7 + 3% μεθανόλη

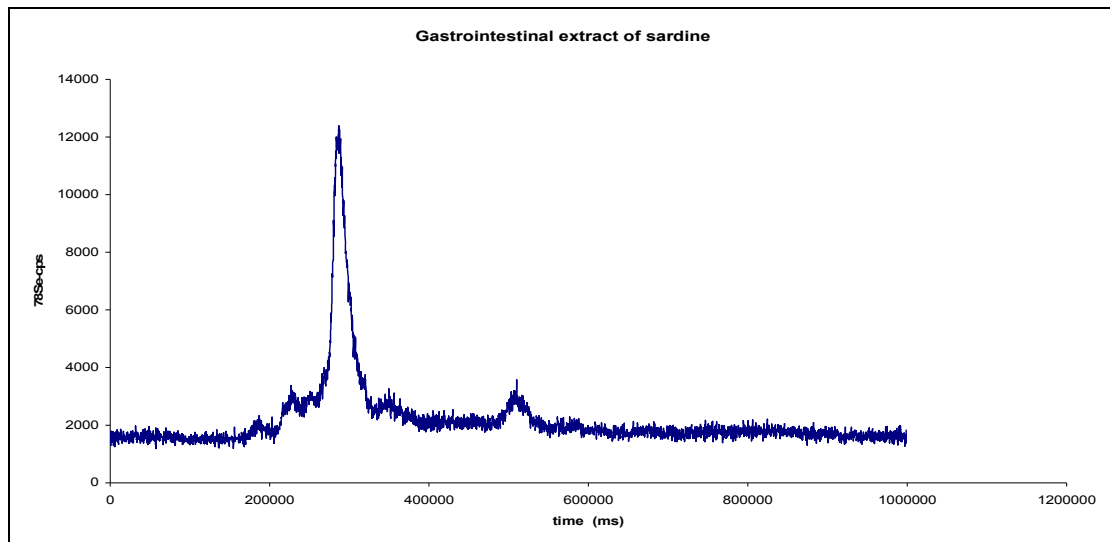
6.1.2 Σαρδέλα

Στη συνέχεια η διαδικασία της γαστρεντερικής χώνευσης πραγματοποιήθηκε και στο δείγμα της σαρδέλας.

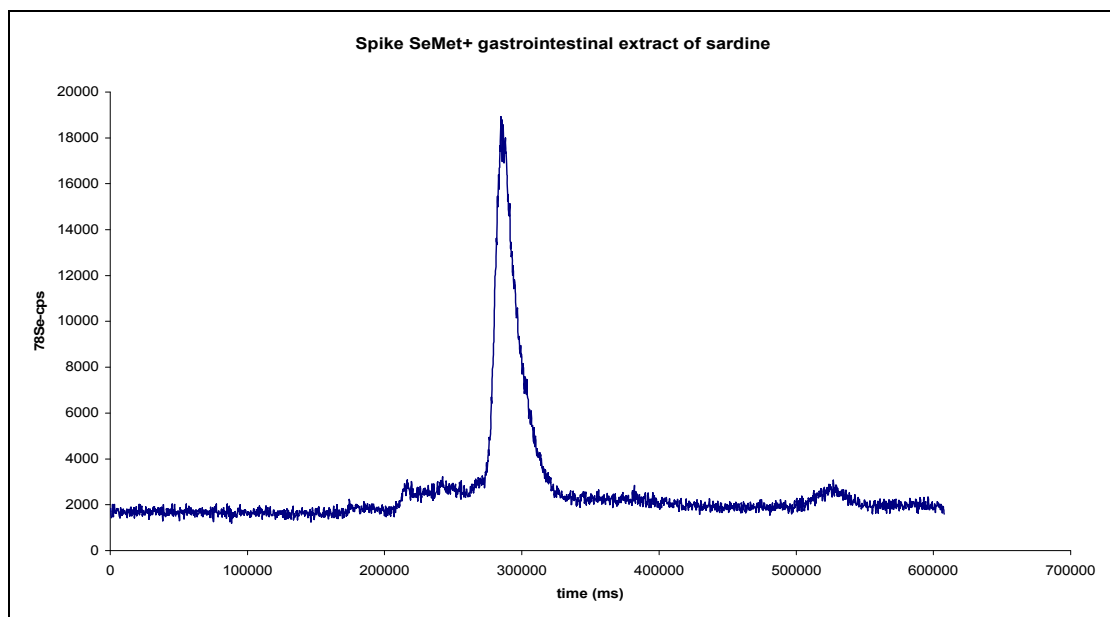
Κινητή φάση: Οξικό αμμώνιο με pH 7 - 5% μεθανόλη



Σχήμα 6.10 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS γαστρικού εκχυλίσματος σαρδέλας



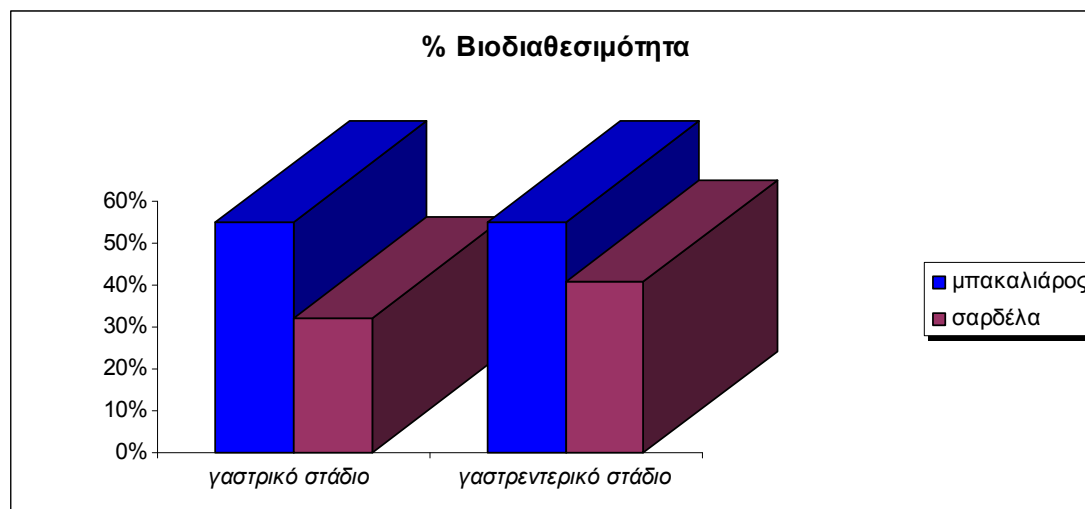
Σχήμα 6.11 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS γαστρεντερικού εκχυλίσματος σαρδέλας



Σχήμα 6.12 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS εμβολιασμού γαστρεντερικού εκχυλίσματος σαρδέλας

Από τον εμβολιασμό του δείγματος της σαρδέλας με το πρότυπο διάλυμα σεληνομεθειονίνης 50ppb, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μεγάλη κορυφή είναι όντως η σεληνομεθειονίνη. Οι υπόλοιπες μικρές κορυφές παραμένουν άγνωστες αφού οι χρόνοι κατακράτησης των διαθέσιμων προτύπων δεν αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης των άγνωστων κορυφών.

6.1.3 Αποτελέσματα της % Βιοδιαθεσιμότητας



Η γαστρεντερική βιοδιαθεσιμότητα του σεληνίου από το μπακαλιάρo (54%) φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από τη σαρδέλα (41%). Αυτό ίσως να οφείλετε στις διαφορές που υπάρχουν σε κάθε είδος ψαριού, καθώς η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη μπορεί να επηρεάζει τη διαλυτότητα του σεληνίου. Επίσης οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στην διαφορετική ικανότητα των ένζυμων, στην *in vitro* μέθοδο, να απελευθερώνουν το Se που υπάρχει σε κάθε δείγμα⁷⁰.

Οι χαμηλές τιμές βιοδιαθεσιμότητας που λαμβάνονται από τα ψάρια, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες αναφορές ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες Hg στις πρωτεΐνες τους και έτσι δημιουργούν δεσμούς Se-Hg, οι οποίοι μπορεί να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του Se από τα ψάρια^{71,72}.

Η χώνευση είναι η χημική διάσπαση των μεγάλων μορίων της τροφής σε μικρότερα μόρια. Η διάσπαση επικρατεί, όταν συγκεκριμένα ένζυμα αναμειγνύονται με την τροφή. Η διαδικασία γαστρικής χώνευσης (πεψίνη + HCl) κυρίως διασπά τις πρωτεΐνες σε χαμηλότερου μοριακού βάρους πεπτίδια, μέσω της δράσης των πρωτεϊνάσων και πεπτιδάσων. Η εντερική χώνευση μέσω της χρήσης της παγκρεατίνης (μίγματος που περιέχει κυρίως λιπάση και πρωτεάση), σχάζει υδρογονάνθρακες σε μονοσακχαρίτες και πρωτεΐνες σε πεπτίδια. Τα χολικά άλατα που παράγονται στο συκώτι, χωνεύουν εύκολα τα λίπη και το παγκρεατικό υγρό παράγει όξινο ανθρακικό νάτριο, το οποίο χρησιμοποιείται στη διαδικασία της

χώνευσης ώστε να αυξήσει το pH από όξινο που είναι στο στομάχι σε ουδέτερο στο δωδεκαδάκτυλο.

Το γαστρικό υγρό είναι ισχυρώς όξινο υγρό, το pH του κυμαίνεται από 1-3 στον άνθρωπο και είναι σχεδόν έγχρωμο. Επίσης εκκρίνεται από τους γαστρικούς αδένες στο στομάχι. Τα απαραίτητα συστατικά του είναι τα ένζυμα χώνευσης πεψίνη, ρεννίνη, HCl και βλέννα. Η πεψίνη μετατρέπει τις πρωτεΐνες σε απλούστερες, ευκολότερης απορρόφησης ουσίες λόγω του HCl⁷³. Η γαστρική έκκριση διεγείρεται από ένα αριθμό ορμονών και χημικών ουσιών, από την παρουσία της τροφής στο στομάχι και ενός αριθμού από φυσιολογικούς παράγοντες, όπως η οσμή μίας αγαπημένης τροφής. Μείωση ή ολική απουσία της έκκρισης του υγρού μπορεί να είναι μία εκ γενετής ανωμαλία.

Πέραν από τις πεπτικές του λειτουργίες, προστατεύει, λόγω της οξύτητας του, τον οργανισμό, από τη δράση μικροοργανισμών, που τυχόν συνοδεύουν την τροφή, αλλά ακόμη ρυθμίζει την ποιοτική σύσταση της χλωρίδας του εντέρου.

Το εντερικό υγρό, αναφέρεται σε κίτρινες εκκρίσεις από τους αδένες που πλαισιώνουν τα εντερικά τοιχώματα. Αποτελείται από ορμόνες, ένζυμα χώνευσης, τα οποία διευκολύνουν τη πέψη. Επίσης εξουδετερώνει το HCl που προέρχεται από το στομάχι και ελευθερώνει γαστρεντερικές ορμόνες στο αίμα⁷⁴.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τροφή αποτελεί μία σημαντική πηγή Se για τον άνθρωπο. Ως γνωστό το Se, αποτελεί ένα θρεπτικό ιχνοστοιχείο όταν η τροφή που καταναλώνεται περιέχει Se στις απαιτούμενες για τον άνθρωπο, συγκεντρώσεις. Αυτές οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 55-200 µg. Συγκεκριμένα, οι σημαντικότερες πηγές Se είναι οι θαλάσσιοι οργανισμοί, το κρέας, το συκώτι και τα δημητριακά. Αυτές οι τροφές είναι πλούσιες πηγές Se, γιατί είναι πλούσιες πηγές πρωτεϊνών. Αυτό το συμπέρασμα εξάγεται από την ενσωμάτωση του Se στις πρωτεΐνες, όταν απορροφάται. Επίσης το Se, είναι συστατικό αριθμού σημαντικών πρωτεϊνών και ενζύμων που απαιτούνται για τις λειτουργίες του σώματος. Τα δύο κύρια αμινοξέα που έχουν ως συστατικό το Se, είναι η σεληνομεθειονίνη (SeMet) και σεληνοκυστεΐνη (SeCys) που είναι ανάλογα της μεθειονίνης και κυστεΐνης αντίστοιχα. Η μεθειονίνη, είναι το αμινοξύ στο οποίο ενσωματώνεται η σεληνομεθειονίνη, όταν αντικαθίσταται το θείο από το σελήνιο. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν σεληνοκυστεΐνη αναφέρονται ως σεληνοπρωτεΐνες, εν αντιθέση με τις πρωτεΐνες που περιέχουν Se, όπως είναι η σεληνομεθειονίνη (SeMet).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αναπτύχθηκε μέθοδος ολικού προσδιορισμού του Se, σε διάφορα είδη μαγειρεμένων τροφίμων, με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, ώστε να προσδιοριστούν οι πλούσιες τροφές Se και να γίνει σύγκριση με άλλες αναφορές. Όντως τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σημαντικότερη πηγή Se, είναι το ψάρι. Συγκεκριμένα είχε υπολογιστεί το Se, για τον μπακαλιάρο και τη πέρκα και βρέθηκε να είναι 1,3 µg Se/g και 1,1 µg Se/g αντίστοιχα.

Η διατροφή σε Se παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία, για το λόγο ότι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Se προκαλούν ανεπάρκεια στον άνθρωπο, προκαλώντας ασθένειες. Επίσης πολύ υψηλές συγκεντρώσεις Se προκαλούν και πάλι ασθένειες, όπως είναι η σελήνωση. Γι' αυτό το λόγο έχει διαμορφωθεί από διάφορους επιστημονικούς και διεθνείς οργανισμούς ο όρος της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης, ο οποίος δηλώνει, το μέσο όρο της ημερήσιας πρόσληψης θρεπτικών υλών που καλύπτει θεωρητικά τις ανάγκες όλων των υγιών ατόμων. Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη έχει εκτιμηθεί ως 55 µg Se/ ημέρα. Έτσι με τα συνολικά

αποτελέσματα από τις μαγειρεμένες τροφές θελήσαμε να εκτιμήσουμε την καθημερινή διατροφή σε Se, ανά άτομο στην Ελλάδα.

Χρησιμοποιώντας μία βάση δεδομένων, τη λεγόμενη DAFNE, η οποία επεξεργάζεται στοιχεία μέσω των οικογενειακών προϋπολογισμών με βάση την κατανάλωση των τροφών, δίνει τη μέση κατανάλωση των τροφών σε γραμμάρια/άτομο/ημέρα για την Ελλάδα και για άλλες χώρες. Η DAFNE είναι μια προσπάθεια ώστε να συγκριθούν οι συνήθειες τροφίμων των ευρωπαϊκών πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τα στοιχεία από τις εθνικές έρευνες οικιακών προϋπολογισμών, και να δημιουργηθεί μια τακτικά ενημερωμένη τράπεζα δεδομένων τροφίμων.

Η συνολική ποσότητα του Se σε μg / ημέρα για το μέσο έλληνα έχει βρεθεί με την επεξεργασία της ποσότητας του Se σε μg / g και την μέση κατανάλωση των τροφίμων σε $\mu\text{g}/\text{άτομο}/\text{ημέρα}$, να είναι $34,3 \mu\text{g Se} / \text{ημέρα}$, η μέγιστη τιμή και $27,9 \mu\text{g Se} / \text{ημέρα}$, η ελάχιστη τιμή. Η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη από την Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη. Επίσης έγινε σύγκριση της Ημερήσιας Πρόσληψης σεληνίου, διαφόρων χωρών. Οι τιμές της ημερήσιας πρόσληψης σεληνίου για κάθε χώρα ήταν διαφορετικές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα σεληνίου ποικίλουν γεωγραφικά μεταξύ και διαμέσου των χωρών, αφού η περιεκτικότητα του Se στα τρόφιμα οφείλεται στο έδαφος που το περιέχει.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPLC - ICP-MS, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας της, για τον διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό των ενώσεων σεληνίου, στα ψάρια, μπακαλιάρος και σαρδέλα.

Η εκχύλιση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην ανάλυση διαχωρισμού ενός δείγματος, έτσι αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης για την απομόνωση των ενώσεων σεληνίου από τα δύο είδη ψαριών. Τελικά η καλύτερη απόδοση της εκχύλισης λήφθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ενζυματική χώνευση δύο σταδίων, όπου γινόταν προσθήκη ενζύμου και συγκεκριμένα του ενζύμου Pronase E. Στην ενζυματική χώνευση συγκεκριμένες πρωτεΐνες του δείγματος υδρολύονται από την προσθήκη του ενζύμου και παράγονται ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια, χωρίς την αλλοίωση των ενώσεων που σχηματίζονται. Για τον μπακαλιάρο, η απόδοση της ενζυματικής χώνευσης βρέθηκε 98%, ενώ για την σαρδέλα βρέθηκε 61%. Όταν η απόδοση της εκχύλισης δεν είναι τόσο αποτελεσματική, εξάγεται το συμπέρασμα, ότι δεν έχουν διασπαστεί επαρκώς τα πεπτίδια ή οι πρωτεΐνες σε μικρότερα θραύσματα έτσι μερική ποσότητα σεληνίου μπορεί να παραμένει σε πεπτιδική μορφή.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στη διατροφή, είναι η βιοδιαθεσιμότητα ενός θρεπτικού δηλαδή η ποσότητα εκείνη του θρεπτικού που απορροφάται ώστε να χρησιμοποιηθεί για μεταβολικές λειτουργίες. Όμως δεν απορροφάται όλη η ποσότητα των θρεπτικών στοιχείων, όταν καταναλώνονται. Αυτό οφείλεται στις ποικίλες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται στο σύστημα χώνευσης. Επίσης πολλές ουσίες και στοιχεία, μη-θρεπτικά, που εμποδίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα, μειώνουν δραματικά την ποσότητα του θρεπτικού στοιχείου που έχει απορροφηθεί.

Αναλύθηκαν δύο είδη ψαριών, ο μπακαλιάρος και η σαρδέλα, με αποτέλεσμα το σελήνιο να απορροφάται στο μπακαλιάρο 54% και στη σαρδέλα 41%. Αυτό ίσως να οφείλετε, στο είδος του ψαριού, καθώς η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη μπορεί να επηρεάζει τη διαλυτότητα και αποδέσμευση του σεληνίου.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Rombert L. Payne, Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College, 2004.
- ² L.H. Foster and S. Sumar, Nutrition & Food Science Number 5, September/October 1995, 17–23.
- ³ J.R. Arthur and G.J. Beckett, Trace Elements in Man and Animals 10, 2000, 843-847.
- ⁴ Journal of Toxicology, Clinical Toxicology, 1999, Vol.37, 2, 145-172
- ⁵ Philip J. White, Martin Broadly, Helen C.Bowen and Sarah E.Johnson, 2007, Vol.6, 225-252.
- ⁶ Donald G. Barseloux, Clinical Toxicology, 1999, 37(2), 145-172.
- ⁷ Conor Reilly, Food Science & Technology, REVIEW, 1998, 114-118
- ⁸ John S. Esmonds, Masatoshi Morita, Applied Organometallic Chem.2000, **14**, 133-145.
- ⁹ Krystyna Pyrzynska, Microchimica Acta, 2002, 140, 55-62
- ¹⁰ Emmie Dumont, Hyphenated techniques for speciation of Se in biological matrices, 2005-2006
- ¹¹ C. B'Hymer, J.A. Caruso, Journal of Chromatography A, 2006, 1114, 1–20.
- ¹² Emmie Dumont, Frank Vanhaecke, Rita Cornelis, Anal.Bioanal.Chem.2004, 379: 504–511
- ¹³ L. Hinojosa Reyes, F. Moreno Sanz, P. Herrero Espilez, J. M. Marchante-Gayon, J. I. Garcia Alonso and A. Sanz-Medela, Journal of Anal.At.Spectrom.,2004, 19, 1230-1235.
- ¹⁴ Sasi S. Kannamkumarath, Kazimierz Wrobel Katarzyna Wrobel, Anne Vonderheide, Joseph A. Caruso, Anal Bioanal Chem, 2002, 373 :454–460
- ¹⁵ Kazuo T. Suzuki, Journal of Health Science, 2005, 51(2), 107-114
- ¹⁶ Ingrid Arnault, Jacques Auger, Journal of Chromatography A, 2006, 1112, 23-30
- ¹⁷ Monika Shah, Sasi S. Kannamkumarath, Jorgelina C. A. Wuilloud, Rodolfo G. Wuilloud and Joseph A. Caruso, Journal of Anal.Atom.Spectrom., 2004, 19, 381-386
- ¹⁸ Montes- Bayon, Maria Jose Diaz-Molet, Elisa Blanco Gonzalez and Alfredo Sanz-Medel, Talanta, 2005, Volume 68, Issue 4, pages 1287-1293
- ¹⁹ Vanesa Díaz Huerta, María Luisa Fernández Sánchez, Alfredo Sanz-Medel, Anal Bioanal.Chem.2006, 384: 902–907.
- ²⁰ J. Auger, W. Yang, I. Arnault , F. Pannier , M. Potin-Gautier, Journal of Chromatography A, 2004, 1032, 103–107.
- ²¹ Linda Johanson, Guro Gafvelin, Elias S.J. Arner, Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1726, 1-13.
- ²² Laura Vandra Papp., Jun Lu, Arne Holmgren and Kum Kum Khanna, Antioxidants & Redox Signaling, 2007, Vol.9, Number 7.
- ²³ Kim Perry, University of Nottingham, The bioavailability of Se enriched milk proteins.
- ²⁴ Helina Hartikainen, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 18, 309–318.
- ²⁵ Margaret P Rayman, Review, THE LANCET, 2000, Vol.356
- ²⁶ Marc Birringer, Sandra Pilawa, Leopold Flohe, The Royal Society of Chemistry, 2002, 19, 693-718.
- ²⁷ U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- ²⁸ Cristine D. Thomson, Analyst, May, 1998, Vol.123 (827-831).

- ²⁹ P. Smrkolj , L. Pograjc , C. Hlastan-Ribic, V. Stibilj, *Food Chemistry*, 2005, 90, 691–697.
- ³⁰ Conor Reilly, *Selenium in food and health*, 1996
- ³¹ Michael S. Bratakos , Helen C. Kanaki , Alexandra Vasiliou-Waite and Panayiotis V. Ioannou, *The Science of the Total Environment*, 1990, 91, 161-176.
- ³² Ujang Tinggi, *Toxicology Letters*, 2003, Vol.137, Issue 1-2, 103-110
- ³³ Jonh R.Arthur and Geoffvey J.Beckett, *British Medical Buletin*, 1999, 55: 658-668.
- ³⁴ Jose G.Dorea, *British Journal of Nutrition*, 2002, Vol.88, Issue 5, 443-461.
- ³⁵ Chen C.Y, Zhao JJ, Gao YX, Chai ZI, *Chemia Analityczna*, 2005, 50: 169-178
- ³⁶ www.chem.uoa.gr
- ³⁷ Skoog, Holler, Nieman, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*.
- ³⁸ Θ. Π. Χατζηϊωάννου και Μ. Α. Κουππάρη, *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα, 2000
- ³⁹ *Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods*, Amersham Biosciences.
- ⁴⁰ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(4), 38-42.
- ⁴¹ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(5), 56-60.
- ⁴² R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(6), 26-30.
- ⁴³ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(7), 26-34.
- ⁴⁴ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(9), 38-44.
- ⁴⁵ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 16(10), 44-48.
- ⁴⁶ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2002, 17(4), 34-39.
- ⁴⁷ R.Thomas, *Spectroscopy*, 2001, 17(10), 24-31.
- ⁴⁸ <http://Acid Digestions of Organic Samples ICP and ICP-MS Reliable Measurements.html>.
- ⁴⁹ Μονάδα Διατροφής στη Δημόσια Υγεία και Διατροφικής Επιδημιολογίας, Ιατρική Σχολή Υγιεινής και Επιδημιολογίας, 1999.
- ⁵⁰ Antonia Trichopoulou, Androniki Naska and the DAFNE III GROUP, *European Journal of Public Health* 2003, 13, 24-28.
- ⁵¹ <http://www.nut.uoa.gr/dafnesoftweb/SampleInfo.aspx.com>
- ⁵² N. Gilon, A. Astruc, M. Astruc and M. Potin-Gautier, *APPLIED ORGANOMETALLIC CHEMISTRY*, 1995, Vol. 9, 623-628.
- ⁵³ J.L. Capelo, C. Fernandez, B. Pedras, P. Santos, Pablo Gonzalez, C.Vaz, *Talanta*, 2006, 68, 1442-1447
- ⁵⁴ Emese Kapolna & Peter Fodor, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2007, 58, 282-296.
- ⁵⁵ Eleni C. Pappa, Athanasios C. Pappas , Peter F. Surai, *Science of the Total Environment*, 2006, 372, 100–108.
- ⁵⁶ Bratakos M.S, Ioannou PV, *Selenium in human milk and dietary selenium intake by Greeks*, *Sci.Total Environ.*, 1991, 105:107-7
- ⁵⁷ M.S Bratakos, T.F. Zafirooulos, P.A. Siskos and P.V. Ioannou, *International Journal of Food Science and Technology*, 1988, **23**, 585-590.
- ⁵⁸ Gunilla Önning and Ingvar A. Bergdahl, *Analyst*, 1999, **124**, 1435–1438
- ⁵⁹ G. Onning, *Food Chemistry*, 2000, 68, 133-139.
- ⁶⁰ Roland Karosi, *Selenium Speciation - Use of Enzymatic extraction*.
- ⁶¹ Mariana Siwek, Amir Bari Noubar, Jan Bergmann, Bernd Niemeyer, Boris Galunsky, *Anal.Bioanal.Chem.*2006, 384: 244–249.
- ⁶² Richard A.Durst and Bert R. Staples, *Clinical Chemistry*, 1972, Vol.18, No.3.
- ⁶³ Mariana Siwek, Boris Galunsky, Bernd Niemeyer, *Anal.Bioanal.Chem.*2005, 381: 737-741.

- Fadi R. Abou-Shakra, Margaret P. Rayman, Neil I. Ward, Valerie Hotton and Geraldine Bastian, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, Vol.12, 429-433.
- ⁶⁵ Carlos Pena-Farfal, Antonio Moreda-Pineiro, Adela Bermejo- Barrera, Pilar Bermejo- Barrera, Hugo Pinochet- Cancino and Ida de Gregori – Henriguez, *Talanta*, 2004, Vol.64, Issue 3, 671-681.
- ⁶⁶ Sigma – Aldrich Co. Pronase E, <http://www.sigmaaldrich.com/>
- ⁶⁷ Aleksandra Polatajko, Barbara Banas, Jorge Ruiz Encinar, Joanna Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 844-849.
- ⁶⁸ TE Fox, EGHM Van den Heuvel, CA Atherton, JR Dainty, DJ Lewis, NJ Langford, HM Crews, JB Luten, M Lorentzen, FW Sieling, P van Aken-Schneyder, M Hoek, MJJ Kotterman, P van Dael and SJ Fairweather-Tait, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 58, 343–349
- ⁶⁹ <http://www.science.kennesaw.edu/~mhermes/pheno/pheno4.htm>
- ⁷⁰ Ana I. Cabanero, Yolanda Madrid, Carmen Camara, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 526, 51–61
- ⁷¹ Ana I. Cabanero, Cristina Carvalho, Yolanda Madrid, Camilan Batoreu and Carmen Camara, 2004, Humana Press Inc. Vol.101
- ⁷² Maria Plessil, Davide Bertelli, and Agar Monzani, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, 14, 461-467
- ⁷³ <http://www.infoplease.com>
- ⁷⁴ <http://www.abbyseior.com>
- ⁷⁵ M. Angeles Quijano, Patricia Moreno, Ana Maria Gutierrez, M. Concepcion Perez – Conde and Carmen Camara., *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, 35, 878-884.
- ⁷⁶ P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutierrez, M. C. Perez-Conde and C. Camara, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 1044–1050.
- ⁷⁷ P. Moreno, M. A. Quijano, A. M. Gutiérrez, M. C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 374: 466–476
- ⁷⁸ O. Ringdal and K. Julshamn, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1985, 35:335-344.
- ⁷⁹ Chris J. Cappon and J. Crispin Smith, *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 1981, 10, 305-319.
- ⁸⁰ <http://www.foodinfonet.htm>
- ⁸¹ John N. Hathcock, *Vitamin and Mineral Safety* 2nd Edition, 2004.
- ⁸² Ryszard Lobinski, Dirk Schaumloffel and Joanna Szpunar, *Mass Spectrometry in Bioinorganic Analytical Chemistry*, 2006, 25, 255-289.
- ⁸³ Darla J. Higgs, Virginia C. Morris and Orville A. Levander, *J. Agr. Food Chem.*, 1972 Vol.20, No 3.
- ⁸⁴ Miklos Mezes, Krisztian Balogh, *Trace Elements in the Food Chain*, Budapest, 2006.
- ⁸⁵ Marijana Matek, Maja Blanusa, Jerica Grgic, *Eur. Food Res. Technol.* 2000, 210: 155-160.
- ⁸⁶ Marcia Goncalves Ventura, Maria do Carmo Freitas, Adriano Pacheco, Thea van Meerten, Hubert Theodore Wolterbeek, *Eur. Food Res. Technol.*, 2007, 224: 395-401
- ⁸⁷ H.M. Crews, D.J. Lewis, S.J. Fairweather- Tait, T. Fox, J.R Arthur and K.M. Brown, *Nutrition & Food Science*, Number 6, November/December 1997, 221-224.
- ⁸⁸ M. A. Bryszewska, W. Ambroziak, A. Diowksz, M. J. Baxter, N. J. Langford, & D. J. Lewis, *Food Additives and Contaminants*, February 2005, 22(2): 135–140.
- ⁸⁹ T. Klapac, M.L. Mandic, J. Grgic, Lj. Primorac, A. Perl and V. Krstanovic, *Food Chemistry*, 2004, Vol. 85, 3, 445-452.
- ⁹⁰ P. Tsoumaris, H. Tsoukali- Papadopoulou, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1994, 53: 67-70.

⁹¹ Scott P. Dolan and Stephen G. Capar, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2002, 15, 593–615

⁹² Peter C.Uden, Harriet Totoe Boakye, Chethaka Kahakachchi, Julian F. Tyson, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1050, 85-93. *Chimica Acta*, 2006, 565, 214-221.

⁹³ Emma Warburton and Heidi Goenaga-Infante, www.rsc.org/jaas | *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

⁹⁴ Susan J. Fairweather-Tait, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 363 :536–540.

⁹⁵ The Human GI Tract, <http://users.rcn.com/>