

اندازه گیری و گونه شناسی عنصر سلنیم در برخی از گیاهان خوراکی و دارویی به سه روش استخراجی

فربیا زمانی هرگلانی^{a*}، پرویز آبرومند آذر^b، کامبیز لاریجانی^c، زهرا طیب زاده قمصری^d

^a مربی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، مجتمع آزمایشگاهی، تهران، ایران
^b دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، مجتمع آزمایشگاهی، تهران، ایران
^c استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، مجتمع آزمایشگاهی، تهران، ایران
^d کارشناس ارشد دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۶/۱۹

۸۷

چکیده

مقدمه: سلنیم یک ماده مغذی است که در بدن انسان نقش مهمی ایفا می کند و از بسیاری از سرطانها از جمله سرطان کبد جلوگیری می کند. مصرف سلنیم بصورت مکملها می تواند سمی و خطرناک باشد، لذا بهتر است از طریق مواد غذایی دریافت گردد.

مواد و روشها: در این تحقیق، سلنیم موجود در نمونه های گیاهی (سیر، پیاز، آویشن، هسته خرما، کلم، هویج، خیار، جعفری، شوید و کاهو) توسط سه روش مختلف هضم اسیدی، هضم با ماکروویو و هضم با اولتراسونیک استخراج شد و سپس مقادیر با دستگاه VGA-AAS اندازه گیری گردید.

یافته ها: هر سه روش استخراجی نشان دهنده اینست که میزان سلنیم در هویج و خیار ناچیز می باشد و همین طور سلنیم (VI) در هسته خرما به میزان خیلی کمی وجود دارد. مقدار سلنیم کل در جعفری بیشتر از بقیه و در هسته خرما کمتر از همه است. سلنیم (IV) در جعفری بیشتر و در آویشن کم می باشد. همچنین سلنیم (VI) در کلم بیشتر و در هسته خرما کمتر بود. این مقایسه با هر سه روش استخراجی تأیید می گردد. اختلاف بین مقادیر سلنیم (VI) و سلنیم (IV) در کلم تفاوت زیادی با هم دارند ولی در گیاهان دیگر این اختلاف کمتر خود را نشان می دهند.

نتیجه گیری: میزان سلنیم (IV) فقط در جعفری بیشتر از سلنیم (VI) است و به نظر می رسد در اکثر مواقع گونه سلنیم (VI) غالب بر گونه سلنیم (IV) است. از مقایسه سه روش استخراجی کارایی امواج اولتراسونیک بیشتر نشان داده می شود.

واژه های کلیدی: اولتراسونیک، دستگاه VGA-AAS، سلنیم (IV)، سلنیم (VI)

مقدمه

سلنیم جزء عناصر کمیاب ضروری شناخته شده است که عملکردهای حفاظتی در برابر بیماریها شامل بیماریهای قلبی و سرطان را دارد. برای عملکرد سلنیم، آنزیمهای خاصی به نام selenoproteins به عنوان تنظیم کننده هورمون و تنظیم سنتز پروتئین مورد نیاز است. سلنیم عمدتاً در گوشت، غذاهای دریایی، غلات و آجیل یافت می شود. بسیاری از سبزیجات حاوی مقادیر کمی از سلنیم هستند.

توصیه مصرف سلنیم ۲۰ تا ۴۰ میکروگرم برای کودکان و ۵۵ میکروگرم برای نوجوانان و بزرگسالان در روز است. بر اساس گفته موسسه لینوس پائولینگ مصرف مقادیر زیاد سلنیم میتواند سمی باشد. سلنیم اضافی می تواند موجب شکنندگی و از دست دادن ناخن و مو، مشکلات گوارشی، بثورات پوستی و اختلالات سیستم عصبی گردد. حداکثر مجاز مصرف سلنیم ۹۰ تا ۲۸۰ میکروگرم برای کودکان و نوجوانان و برای بزرگسالان ۴۰۰ میکروگرم است (Rayman, 2000; Larsen et al., 2004).

تولید رادیکال های آزاد، مسئله ای طبیعی است و در طی عمل تنفس به وجود می آید. میوه ها و سبزی ها غنی از آنتی اکسیدان ها و مهم ترین عوامل از بین برنده رادیکال های آزاد هستند. آنتی اکسیدان ها به عنوان عوامل کمکی، عملکرد سیستم ایمنی بدن را از طریق از بین بردن رادیکال های آزاد - از عوامل مهم بیماری زا در بدن - تقویت می کنند. شواهد حاکی از آن هستند که مکمل های حاوی ضد اکسنده، به اندازه آنتی اکسیدان های طبیعی موثر نیستند و بهتر است سلنیم لازم را از طریق مواد غذایی دریافت کنند زیرا دریافت مقادیر بالای سلنیم از طریق مکمل ها برای بدن سمی و خطرناک است (Hartikainen, 2005; Brown et al., 2001).

مقدار و فرم شیمیایی سلنیم در آزمایشی بر جلبک ها بررسی گردید. اثر سلنیم بر جلبک سبز نه تنها به مقدار عنصر بلکه به فرم شیمیایی آن نیز مربوط است و سمیت سلنیم با کمبود گوگرد افزایش می یابد (Umysova et al., 2009). در یک بررسی بر روی اندازه گیری سلنیم در سبزیجات با HG-AFS که هضم آن در مخلوطی از اسیدها انجام شده است مشخص گردید که این روش مطمئن و با حد تشخیص 0.14 ngg^{-1} می باشد. میزان

سلنیم در ۴۴ گونه بررسی شد رنجی مابین 0.3 ngg^{-1} تا 77 محاسبه گردید (Smrkolija et al., 2004).

مطالعه برای اندازه گیری سلنیم در نمونه های محیطی با دستگاه های مختلف از جمله آنالیز فعال سازی نوترون، طیف سنجی گاما، طیف سنجی فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت (Chai et al., 1994). روش هضم دیگری بوسیله ماکروویو برای نمونه های شیر و محصولات لبنی با استفاده از دستگاه AAS-HG در تعیین سطح سلنیم مورد مطالعه قرار گرفت بالاترین سطح سلنیم در آب پنیر گزارش شد. همچنین این مطالعه ارتباط مستقیمی سطح پروتئین را در ترکیبات شیر نشان داد (Óscar Muñoz et al., 2005). در شوید سلنیم توسط روش کروماتوگرافی معکوس تبادل یون کاتیونی مورد سنجش واقع گردید در آن تحقیق معلوم شد که گونه های سلنیم در اندام های مختلف بصورت سلنومیتوین (SeMet) وجود داشت (Cankur et al., 2006).

برای اندازه گیری سلنیم چهار ظرفیتی میتوان از روش اسپکتروفتومتری با حضور معرف ۴- متیل ارتو فیلین دی آمین بعنوان معرف استفاده کرد (Kartal et al., 2010). روش پیشرفته برای گونه شناسی سلنیم ۴ و ۶ ظرفیتی، استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا و اسپکتروسکوپی ICP_Mass است که با این روش گونه شناسی سلنیم در مقادیر کم هم انجام می شود (Ruth et al., 2011). در بررسی دیگری برای سلنیم با HPLC-UV-HG-AFS بر روی گندم سیاه مشخص گردید که میزان سلنیم در طی گل دهی کمتر از 200 ngg^{-1} بوده و در آن تحقیق مشخص شد بیشتر سلنیم محلول بشکل سلنیم (VI) است. قابلیت انحلال $\text{Se}^{(VI)}$ بیشتر از $\text{Se}^{(IV)}$ است و دسترس پذیری زیستی بالاتری نیز دارد. $\text{Se}^{(IV)}$ بیشتر در اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن وجود دارد (Smrkolija et al., 2005).

به منظور ارزیابی تکنیک های استخراج و تعیین سلنیم در دو گیاه *Allium Sativum* و *Brassica jenncea* با استفاده از سه روش استخراجی مورد بررسی قرار گرفت اثر استفاده از پروب اولتراسونیک بهترین جواب را داد و پس از آن هضم مایکروویو بهترین ارزیابی گردید (Bayon et al., 2005).

نمونه اضافه شده و حرارت دادن به مدت ۳ ساعت ادامه پیدا می‌کند تا نمونه کاملاً حل شود (uana et al., 1994).

- هضم نمونه به روش مایکروویو

۰/۵۰۰ گرم از نمونه گیاهی خشک و هموژن شده را وزن کرده داخل ظروف تفلونی مایکروویو TFM ریخته و به آن ۷ میلی لیتر HNO_3 و ۱ میلی لیتر H_2O_2 اضافه کرده درب ظروف تفلونی را کاملاً بسته و داخل مایکروویو بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۳ بار با توان ۸۰۰ وات قرار داده می‌شود (ÓscarMuñiz et al., 2005).

- هضم نمونه به روش اولتراسونیک

۰/۵۰۰ گرم از نمونه گیاهی خشک و هموژن شده را وزن کرده داخل ظروف شیشه‌ای ریخته به آن ۵ میلی لیتر HNO_3 و ۲ میلی لیتر HClO_4 افزوده و بمدت ۲۰ دقیقه تحت امواج فراصوت با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و توان ۲۳۰ وات قرار می‌گیرد (Bayon et al., 2005).

- گونه شناسی سلنیم

برای احیاء $\text{Se}^{(\text{VI})}$ به $\text{Se}^{(\text{IV})}$ و بدست آوردن سلنیم کل به محلول‌های بدست آمده از روش‌های بالا ۲/۵ میلی‌لیتر HCl افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای 100°C حرارت داده می‌شود، سلنیم محلول آماده‌سازی شده توسط دستگاه جذب اتمی قرائت می‌گردد.

برای گونه‌شناسی، مطابق روشهای بالا یک سری محلول‌های دیگر بدون افزودن اسید کلریدریک آماده شده و سلنیم موجود در آن اندازه‌گیری می‌شود. سلنیم اندازه‌گیری شده در این مرحله $\text{Se}^{(\text{IV})}$ می‌باشد. تفاوت سلنیم کل با $\text{Se}^{(\text{IV})}$ ، غلظت $\text{Se}^{(\text{VI})}$ است (Juana et al., 1994; Sharmasarkar et al., 1998).

یافته‌ها

با دستگاه جذب اتمی مقادیر سلنیم کل و سلنیم (IV) بطور جداگانه برای تمام نمونه‌ها با سه روش استخراجی اندازه‌گیری می‌گردد و نتایج بدست آمده از دستگاه برای تکرارها میانگین گرفته شده و در مقدار کل نمونه محاسبه می‌شود. برای گونه‌شناسی و بدست آوردن مقدار سلنیم (VI) از تفاوت سلنیم کل با $\text{Se}^{(\text{IV})}$ استفاده می‌شود، در هر

در این تحقیق، سلنیم موجود در نمونه‌های گیاهی مختلف توسط سه روش مختلف هضم اسیدی، هضم با ماکروویو و هضم با اولتراسونیک مورد مقایسه قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

- دستگاه‌ها

همه آنالیزها با دستگاه جذب اتمی (Varain مدل SpectrAA.200) با کوره گرافیتی (VGA-AAS (VGA-77)، دستگاه خشک‌کن انجمادی، دستگاه مایکروویو، دستگاه اولتراسونیک MPI Ultrasonic انجام گردید.

- نمونه برداری

ده نوع گیاه (سیب، پیاز، آویشن، هسته خرما، کلم، هویج، خیار، جعفری، شویب و کاهو) از مزرعه تحقیقاتی رودهن در تیر ماه سال ۱۳۸۶ جمع‌آوری گردید. این گیاهان در سه نوبت برداشت از مزارع مختلف گردآوری شد.

نمونه‌های گیاهی انتخاب شده در سه بار تکرار با آب شسته شده سپس با فریز درایر خشک شده و کاملاً پودر و هموژن گردیدند.

- هضم نمونه‌ها

در این تحقیق برای بهینه‌سازی و بدست آوردن بهترین نتایج سه روش مختلف هضم و محلول‌سازی نمونه‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد از جمله هضم اسیدی که روش‌های متفاوتی برای محلول‌سازی نمونه‌ها دارد (Cankur et al., 2006; Smrkolj et al., 2004; Juana et al., 1994)، دومین روش هضم استفاده از محلول‌سازی نمونه‌ها به روش ماکروویو است (ÓscarMuñiz et al., 2005)، روش هضم اولتراسونیک متد جدید برای محلول‌سازی نمونه‌ها است (Bayon et al., 2005).

- هضم نمونه به روش هضم اسیدی

۰/۳۰۰ گرم از نمونه گیاهی خشک و هموژن شده را وزن کرده در ظرف PTFE ریخته و به آن ۵ میلی لیتر HNO_3 اضافه می‌گردد در تیوب را بسته و به مدت یک ساعت در دمای 80°C روی حمام شن حرارت داده می‌شود، بعد ۵ میلی لیتر مخلوط ۱:۴ HNO_3 و HClO_4 به

اندازه گیری و گونه شناسی عنصر سلنیم در برخی از گیاهان خوراکی و دارویی

سلنیم (IV) به ترتیب در جعفری، پیاز، کاهو، شوید، کلم، سیر و آویشن وجود داشته و در نمونه های هویج، خیار و هسته خرما تشخیص داده نشد، سلنیم (VI) در گیاهان کلم، کاهو، پیاز، سیر، جعفری، شوید، آویشن و هسته خرما بوده و در خیار و هویج دستگاه سلنیم را تشخیص نداد. از نتایج بدست آمده می توان استنباط کرد که بجز جعفری که در آن سلنیم (IV) بیشتر از سلنیم (VI) است در بقیه نمونه ها سلنیم (VI) از سلنیم (IV) بیشتر است و در هسته خرما مقدار سلنیم (IV) ناچیز بوده و سلنیم (VI) وجود دارد.

تفاوت سلنیم کل و سلنیم چهار ظرفیتی در کلم بیشتر از همه سبزیجات است و بعد از آن این مسئله در کاهو مشهود است، و این تفاوت در جعفری کمتر دیده می شود. جعفری بیشترین تفاوت را در مقدار سلنیم کل و سلنیم (VI) دارد، و در کلم این تفاوت کمترین مقدار را دارد.

کدام از گیاهان مقدار $Se^{(IV)}$ از سلنیم کل کم شده و مقدار باقی مانده مقدار $Se^{(VI)}$ است که نتایج نهایی در جدول ۱ آمده است.

حد تشخیص کمترین مقدار یون مورد نظر که روش ارائه شده قادر به تشخیص آن باشد، است. بر طبق تعریف حد تشخیص یا LOD را می توان بصورت $LOD = 3\delta b/m$ نوشت.

که در این اندازه گیری حد تشخیص دستگاه برای بدست آوردن مقدار سلنیم بصورت $LOD = 0.02026 \mu g/L$ است.

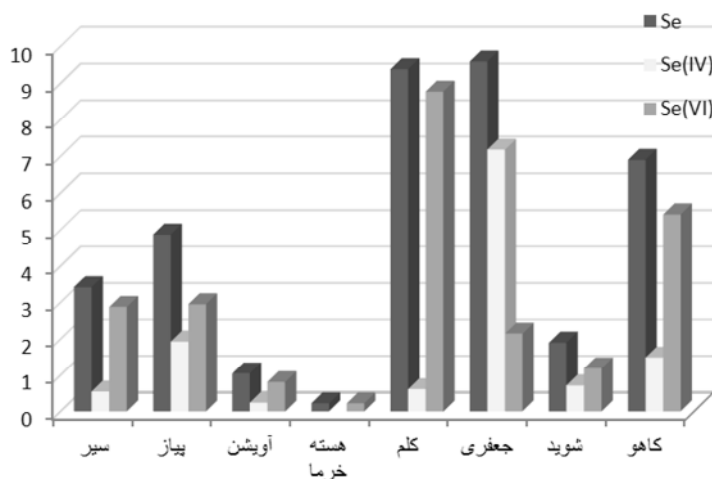
بحث

نتایج نشان می دهد که سلنیم کل بترتیب در گیاهان جعفری، کلم، کاهو، پیاز، سیر، شوید، آویشن، هسته خرما وجود دارد و در هویج و خیار سلنیم قابل تشخیص نبود.

جدول ۱- مقادیر بدست آمده سلنیم در گیاهان

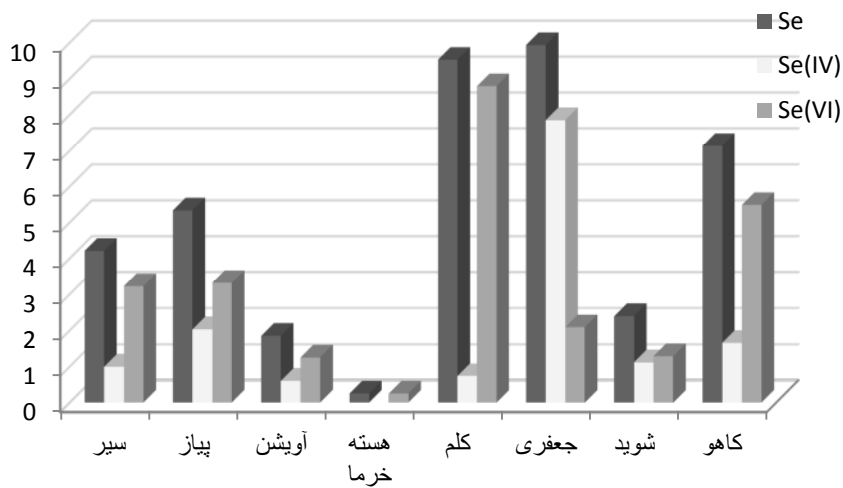
$\mu g/kg$	استخراج اسیدی			استخراج مایکروویو			استخراج اولتراسونیک		
	Se_{total}	$Se^{(IV)}$	$Se^{(VI)}$	Se_{total}	$Se^{(IV)}$	$Se^{(VI)}$	Se_{total}	$Se^{(IV)}$	$Se^{(VI)}$
سیر	۳/۴۱	۰/۵۴	۲/۸۷	۴/۲۱	۰/۹۹	۳/۲۲	۴/۴۱	۱/۵۴	۲/۸۷
پیاز	۴/۸۶	۱/۹۲	۲/۹۴	۵/۳۳	۲/۰۲	۳/۳۱	۵/۹۸	۲/۲۲	۳/۷۶
آویشن	۱/۰۴	۰/۲۵	۰/۸	۱/۸۴	۰/۶۰	۱/۲۴	۲/۱۶	۰/۷۳	۱/۴۸
هویج	nd*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
هسته خرما	۰/۲۲	nd	۰/۲۲	۰/۲۵	nd	۰/۲۵	۰/۵۳	nd	۰/۵۳
کلم	۹/۳۷	۰/۶۱	۸/۷۶	۹/۵۲	۰/۷۳	۸/۷۹	۹/۸۷	۰/۹	۸/۹۷
خیار	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
جعفری	۹/۵۸	۷/۱۷	۶/۸۹	۹/۹۳	۷/۸۵	۲/۰۸	۱۰/۲۷	۸/۰۷	۲/۲۰
شوید	۱/۸۹	۰/۷۱	۱/۴۸	۲/۳۹	۱/۱۱	۱/۲۸	۲/۹۳	۱/۴۳	۱/۵۰
کاهو	۶/۸۹	۱/۴۸	۵/۴۱	۷/۱۳	۱/۶۵	۵/۴۸	۷/۵۴	۱/۷۳	۵/۸۱

* غیر قابل تشخیص

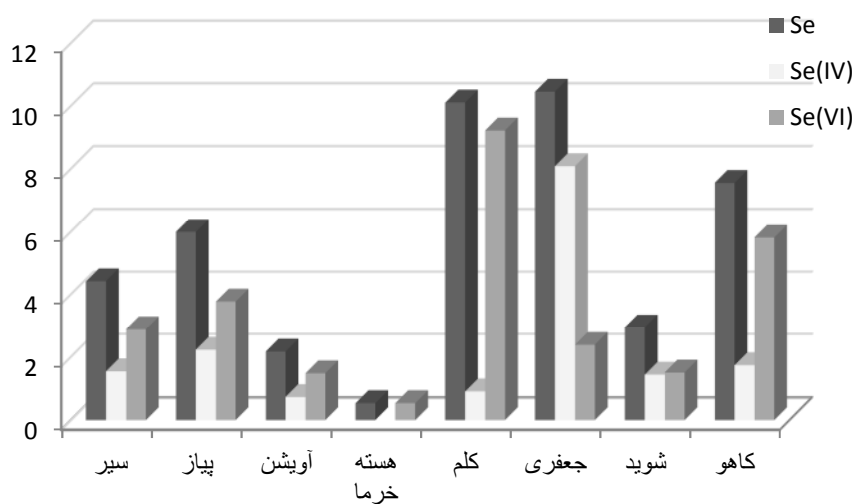


نمودار ۱- مقادیر سلنیم در گیاهان به روش استخراج اسیدی

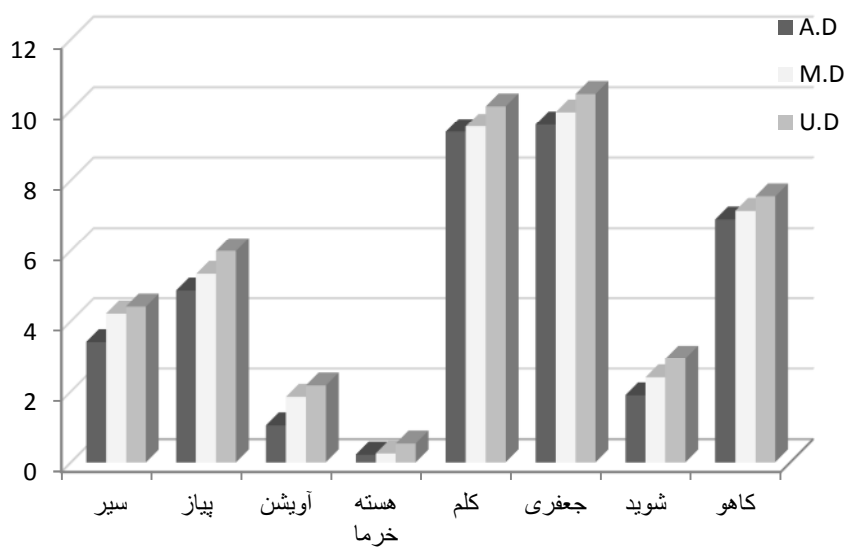
فربیا زمانی هرگلانی و همکاران



نمودار ۲- مقادیر سلنیم در گیاهان به روش استخراج ماکروویو



نمودار ۳- مقادیر سلنیم در گیاهان به روش استخراج اولتراسونیک



نمودار ۴- مقایسه سلنیم کل در گیاهان به سه روش استخراجی

اندازه گیری و گونه شناسی عنصر سلنیم در برخی از گیاهان خوراکی و دارویی

کمتری است. این نتایج حاکی از آن است که مقدار $Se^{(IV)}$ در گیاهان دیگر کمترین میزان را دارند میزان پائین $Se^{(IV)}$ در کلم نسبت به سلنیم کل در این گیاه بیشتر مشهود است. بررسی روشهای استخراجی بهتر بودن پروب اولتراسونیک را تأیید می کند.

بیشترین مقدار سلنیم (VI) در کلم است که استخراج ماکروویو (M.D) و اسیدی (A.D) مقادیر نزدیک بهم دارند در حالیکه هضم اولتراسونیک (U.D) میزان بیشتری را نشان میدهد، این موضوع در مورد کاهو و هسته خرما صدق می کند، میزان سلنیم (VI) در سیر، پیاز و آویشن در سه روش استخراجی بترتیب زیاد می گردد، و استثنا فقط در جعفری مشهود است که Se^{VI} در روش استخراجی ماکروویو نسبت به دو روش دیگر کمتر است.

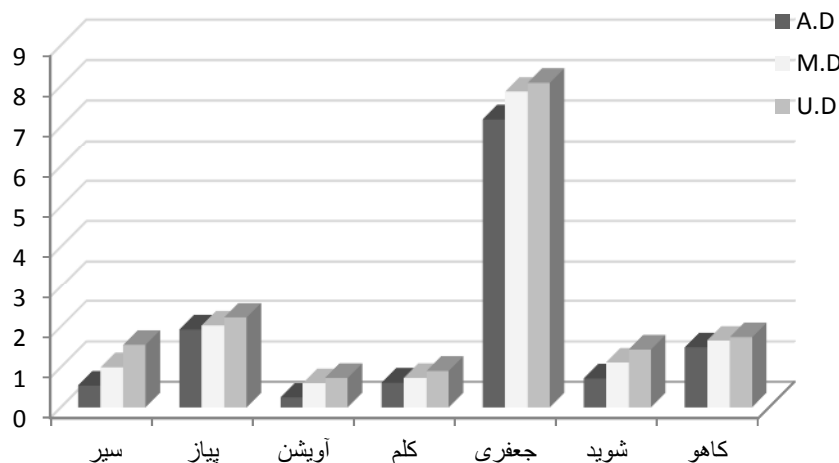
نتیجه گیری

با توجه به سه روش انجام شده برای استخراج سلنیم، نتایج حاصل نشان میدهد که استخراج فلز سلنیم با روش اولتراسونیک بالاتر از روش ماکروویو و این روش بالاتر از استخراج اسیدی است. افزایش استخراج فلز با اولتراسونیک در گیاهان پیاز، کلم و جعفری بیشتر نشان داده میشود، این افزایش ممکن است به دلیل ساختار سلولی این گیاهان باشد. بطور کلی نتایج حاصل از هر سه استخراج نشان دهنده اینست که میزان سلنیم کل در جعفری حداکثر و در هسته خرما حداقل می باشد این در حالیکه $Se^{(IV)}$ در جعفری نیز حداکثر ولی در هسته خرما ناچیز و همچنین $Se^{(VI)}$ در جعفری حداکثر و در هسته خرما حداقل است. در خیار و هویج مقدار سلنیم ناچیز می باشد.

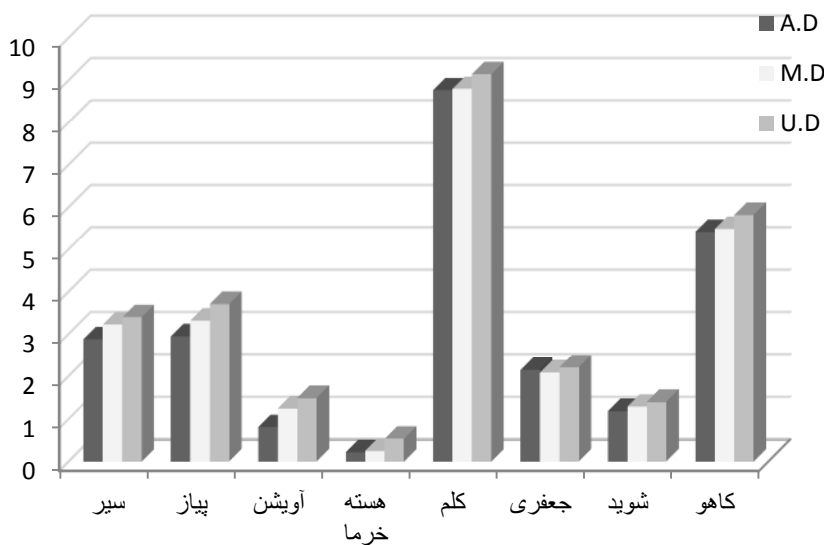
روش استخراج ماکروویو هم نشان می دهد که در هویج و خیار سلنیم وجود ندارد، میزان سلنیم کل در جعفری، کلم، کاهو زیاد و در هسته خرما کمتر از همه است و سلنیم در هسته خرما بصورت سلنیم (IV) موجود است. نتایج نشان میدهد که بجز جعفری در بقیه نمونه ها سلنیم (VI) از سلنیم (IV) بیشتر است همه نتایج بدست آمده از ماکروویو نشان دهنده مقادیر بالاتری از هضم اسیدی هستند. روش استخراج سلنیم با اولتراسونیک نشان دهنده کارایی بالای اولتراسونیک نسبت به روشهای دیگر است در این روش علاوه بر بدست آوردن نتایج بهتر سرعت عمل بالاتری نیز می توان داشت. روش پیشرفته پروب اولتراسونیک میتواند جایگزین خوبی در هضم های آزمایشگاهی باشد.

کارائی روش اولتراسونیک (U.D.) برای استخراج سلنیم کل نسبت به روشهای ماکروویو (M.D.) و استخراج اسیدی (A.D.) به ترتیب در پیاز، کلم، جعفری، شوید و هسته خرما خود را نشان می دهد، این در حالیکه هضم اسیدی در آویشن، سیر و شوید کمترین مقدار را نسبت به دو روش دیگر دارد. تفاوت روش ماکروویو و هضم اسیدی در آویشن و سیر بیشتر نشان داده می شود، این تفاوت در جعفری و کلم که بیشترین مقدار سلنیم را دارند کمترین میزان را نشان می دهد.

جعفری تنها گیاهی است که در آن سلنیم (IV) بیشتر از سلنیم (VI) است و میتوان گفت مقدار سلنیم (IV) آن قابل توجه است استخراج ماکروویو (M.D.) نسبت به اسیدی (A.D.) میزان بیشتری را نشان می دهد ولی تفاوت هضم التراسونیک (U.D.) به ماکروویو (M.D.) میزان



نمودار ۵- مقایسه سلنیم (IV) در گیاهان به سه روش استخراجی



نمودار ۶- مقایسه سلنیم (VI) در گیاهان به سه روش استخراجی

منابع

Bayon, M., DiazMolet, M., Gonzalez, E. & Medel, A. (2005). Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS, *Talanta.*, 15, 68 (4), 1287-1293.

Brown, K. M. & Arthur, J. R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health. *Public Health Nutr.* 4, 593-599.

Cankur, O., Yathavakilla, S. K. V. & Caruso, J. A. (2006). Selenium speciation in dill (*Anethum graveolens L.*) by ion pairing reversed phase and cation exchange HPLC with ICP-MS detection. *Talanta.*, 15, 70(4), 784-790.

Chai, C., Tian, J., Qian, Q., Zhang, P., Xu, Q. & Mao, D. (1994). Study of a low-selenium environment in China by INAA and Mössbauer spectrometry. *J Biol Trace Elem Res.*, 43-45, 177-184.

Juana, P., Miguel, N., Herminia, L. & Maria, C. L. (1994). Determination of Selenium Levels in Vegetables and Fruits by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (12), 2848-2851.

Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Element Med Biol.*, 18(4), 309-318.

Kartal, Ş., Oymak, T. & Tokalıolu, Ş. (2010). Spectrophotometric determination of

selenium (IV) with 4-methyl-*o*-phenylenediamine based on piazselenol formation, *J Analytical Chemistry*, 1221-1227.

Larsen, Eh., Hansen, M., Paulin, H., Moesgaard, S., Reid, M. & Rayman, M. (2004). Speciation and bioavailability of selenium in yeast-based intervention agents used in cancer chemoprevention studies. *J AOAC Int.* 87.

Muñiz-Naveiro, O., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, A., José, A., Cocho, J., Fraga, M. & Bermejo-Barrera, P. (2005). Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS. *J Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 1145-1151.

Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356(9225), 233-241.

Ruth, E., Suzette, W., Morman, A., Hageman, P. L., Hoefen, T. M. & Plumlee, G. S. (2011). Simultaneous speciation of arsenic, selenium, and chromium: species stability, sample preservation, and analysis of ash and soil leachates, *J Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2733-2745.

Sharmasarkar, S., Vance, G. F., Cassel-Sharmasarkar, F. (1998). Analysis and speciation of selenium ions in mine environments. *Environmental Geology*, 34(1), 31-38.

Smrkolja, P. & Stibilj, V. (2004). Determination of selenium in vegetables by

hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 512 (1), 11-17.

Smrkolja P., Stibilja, V., Kreftb, I. & Germ, M. (2005). Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 96(4), 675-681.

Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Čížková, M., Machát, J., Doucha, J. & Zachleder, V. (2009), Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmusquadricauda*. *J. BMC Plant Biology*, 9, 58.