

VLIV PĚSTEBNÍCH PODMÍNEK NA SPECIACI SELENU V TKÁNÍCH ŘEPKY OLEJKY

KAMILA KLOGNEROVÁ^a, MAGDA
VOSMANSKÁ^a, JIŘINA SZÁKOVÁ^b
a OTO MESTEK^a

^a Vysoká škola chemicko technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6
Oto.Mestek@vscht.cz

Došlo 26.9.14, přijato 20.11.14.

Klíčová slova: speciální analýza, selen, řepka olejka

Úvod

Selen je stopový prvek, který hraje v lidském organismu řadu důležitých rolí. Zájem o něj se v posledních letech značně zvýšil, a to především kvůli jeho rozdílnému působení¹. Selen je toxický prvek, ale současně patří mezi prvky esenciální. Jeho účinky souvisí s přijímaným množstvím a formou, ve které se vyskytuje v životním prostředí a potravinách². Biologická aktivita selenu je u člověka zprostředkována především prostřednictvím příslušných selenoproteinů a selenoenzymů. Je např. důležitou složkou antioxidantního enzymu glutathion peroxidasy, enzymů jodothyronin deiodas a důležitého selenoproteinu W, jehož nedostatek může vést k svalové degeneraci³. Dosud je známo 25 selenoproteinů vyskytujících se u lidí, avšak přesná funkce některých z nich není zatím známa. Charakteristickým rysem těchto látek je přítomnost selenu ve formě selenocysteinu (SeCys). Aminokyselina SeCys není přijímána z potravy, ale je v organismu syntetizována⁴. Řada nejenom selenoproteinů, ale i nízkomolekulárních látek obsahujících selen, jako je např. aminokyselina S-methylselenocystein, mají protinádorové účinky⁵.

Hranice mezi dlouhodobým nedostatkem selenu v přijímané potravě a množstvím, které je též z dlouhodobého hlediska toxické, je velmi úzká. Konzumace potravin, které obsahují méně než 0,1 mg Se kg⁻¹, má za následek nedostatek selenu v těle, zatímco pravidelná konzumace potravin, které obsahují více než 1 mg Se kg⁻¹, je toxická^{6,7}. Doporučený denní příjem selenu se pohybuje u žen okolo 60 μg den⁻¹ a u mužů okolo 70 μg den⁻¹, viz cit.⁸.

Pro člověka a zvířata jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů výživy rostliny. Rostliny přijímají selen z půdy, vody nebo z atmosféry kořeny i přes listové plochy. Selen se vyskytuje ve všech typech půd alespoň v malém množství. Obvyklý obsah Se v zemské kůře je 0,05–0,09 mg kg⁻¹. Obvyklý obsah Se v půdě je 0,1–2 mg kg⁻¹, viz cit.⁷. Na území České republiky se obsah selenu v různých typech půd pohybuje v rozmezí 0,14–1,65 mg kg⁻¹, viz cit.⁹. Nejvyšší obsah selenu mají vyvěřelé a sedimentární horniny. Důležitější než celkový obsah selenu v půdě je však jeho chemická forma a další půdní faktory, které určují využitelnost rostlinami. Selenany jsou v půdě více rozpuštěny a tím i dostupnější než seleničitany. Elementární selen, organické selenidy nebo selenidy kovů musí nejprve projít mikrobiální nebo chemickou transformací na selenany, než se stanou pro rostliny dostupné. Využitelnost je také závislá na pH půdního roztoku, obsahu vody, kyslíku, oxidů železa a hliníku v půdě. V mírně alkalickém aerobním prostředí je dostupnost selenu pro rostliny nejvyšší.

Česká republika patří mezi oblasti s nedostatkem selenu, což je dáno především složením geologického podloží a omezeným přechodem selenu z půdy do rostlin a následně do zvířecích i lidských organismů. V současné době probíhá proto výzkum fortifikace potravního řetězce selenem. Jednou z rostlin, která dobře selen přijímá po foliární aplikaci, je řepka olejka (*Brassica napus* L.). Fortifikace rostlin řepky selenem pomocí postřiku je podobně účinná, jako jeho přidávek do hnojiva. Tak např. ve studii¹⁰ při aplikaci 20 g Se/ha (ve formě selenanu) ve formě hnojiva bylo v semenech nalezeno 0,68–0,80 mg Se kg⁻¹, při aplikaci 30 g Se/ha postřikem bylo nalezeno 0,54–0,94 mg Se kg⁻¹ a při kombinované fortifikaci dokonce 0,89 až 1,07 mg Se kg⁻¹; u kontrolních rostlin pěstovaných bez fortifikace bylo v semenech nalezeno 0,05 mg Se kg⁻¹. Více než 85 % Se v semenech bylo obsaženo ve formě selenomethioninu, zbytek jako selenan. Žádné další organické specie selenu nalezeny nebyly. V semenech řepky je selen koncentrován v neolejnaté frakci¹⁰ a odtučněný řepkový šrot, který je odpadem z výroby řepkového oleje, pak může být následně využit jako krmivo hospodářských zvířat. Přidaný selen tak primárně zlepšuje zdravotní stav zvířat, sekundárně se potravní řetězcem může přenášet i do lidské stravy.

Cílem této práce bylo provést speciální analýzu selenu v tkáních řepky olejky (*Brassica napus*) pomocí on-line spojení HPLC a ICP-MS a vyhodnotit tak vliv pěstebních podmínek na speciaci selenu po foliární aplikaci seleničitanu sodného na dva kultivary řepky olejky pěstované ve třech různých pěstebních oblastech. Předmětem analýzy bylo stanovení selenoaminokyselin a anorganických forem selenu. Zvolená metodika, která zahrnovala enzymatickou

* Tato práce byla přednesena na soutěži O cenu firmy Merck 2014 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Pardubicích ve dnech 5. – 6. 2. 2014.

hydrolyzu vzorku, separaci uvolněných sloučenin selenu pomocí chromatografie na reverzní fázi a detekci selenu hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, byla ověřena a validována v naší předchozí studii¹¹.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Měření metodou ICP-MS byla realizována na spektrometru PerkinElmer ELAN DRC-e (PerkinElmer, Concord, Kanada) vybaveném dynamickou reakční celou (DRC) pro odstranění polyatomických iontů, zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou a vysoko účinnou plazmovou hlavici. Pro chromatografii s obrácenou fází byla použita kolona LichroCart® 250-4,6 s náplní Purospher® STAR, RP-8e, zrnitost 5 µm (Merck, Darmstadt, SRN). Aparatura se skládala dále z pumpy (Series 200, PerkinElmer, USA) a injektoru Rheodyne 9010 vybaveného 50 µl dávkovací smyčkou. Spojovací kapiláry a nástřiková smyčka byly vyrobeny z materiálu polyether ether keton.

Extrakce byla prováděna v polyfluorových centrifugačních zkumavkách o objemu 20 ml, které byly třepány na třepačce T22 (VD Loděva) umístěné v termostatu. Směs po enzymatické hydrolyze byla odstředěna na centrifuze 2-16K (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, SRN). Mikrovlnný rozklad probíhal v rozkladném zařízení Uni Clever (Plazmatronika, Polsko). K úpravě pH mobilní fáze byl použit digitální pH metr pH02 (Labio, Praha, ČR).

Reagencie a základní roztoky

Pro stanovení celkové koncentrace selenu i pro kalibraci speciální analýzy byl použit základní kalibrační roztok 1000 mg Se dm⁻³ připravený ze selenanu sodného (BioXtra).

K přípravě roztoků vnitřního standardu byl použit základní roztok 1000 ± 2 mg dm⁻³ Ge (Merck). Roztoky specií selenu sloužící pro identifikaci sloučenin selenu v analyzovaných vzorcích byly připraveny ze selenomethioninu (min. 99%), selenocystinu (min. 98%), Se-methylselenocysteinu (min. 99%), seleničitanu sodného (BioReagent) a selenanu sodného (BioXtra), vše Sigma-Aldrich (Steinheim, SRN).

Mobilní fáze pro chromatografii s obrácenou fází (RP-HPLC) obsahovala 0,80 g dm⁻³ sodné soli butan-1-sulfonové kyseliny (p.a., Merck), 2,90 g dm⁻³ hydroxidu tetramethylamonného (p.a., Merck), 0,42 g dm⁻³ malonové kyseliny (pro syntézu, Merck) a 1 % methanolu (čistoty Uvasol®, Merck). Výsledné pH bylo upraveno na hodnotu 5 pomocí HCl (Suprapur®, Merck) o koncentraci 1 mol dm⁻³. Pro stanovení specií Se obsahovala mobilní fáze roztok vnitřního standardu Ge o koncentraci 100 µg dm⁻³.

Pro enzymatickou hydrolyzu byla použita proteasa XIV (Sigma-Aldrich, Japonsko). Pufir Tris-HCl o koncentraci 0,02 mol dm⁻³ byl připraven z tris-(hydroxymethyl)-

aminomethanu (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Výsledné pH tohoto roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,5 kyselinou chlorovodíkovou (Suprapur®, Merck).

Při rozkladu vzorků pro stanovení celkového obsahu selenu se používala kyselina dusičná (Suprapur®, Merck). Všechny roztoky byly připraveny v destilované a demineralizované vodě (Millipore, Bedford, USA). V DRC byl jako reakční plyn použit methan čistoty 5.0 (Siad, Braňany u Mostu, ČR).

Vzorky

Pěstování rostlinného materiálu zajišťovala Česká zemědělská univerzita. Pro předběžné pokusy byly zvoleny dva kultivary řepky olejky a tři různé lokality. Lokality se od sebe liší typem půd. Charakteristické půdy vyskytující se v Červeném Újezdu jsou luvizemě, tedy půdy kyselé až mírně kyselé, dobře zásobeny živinami, hůře vodou a mající méně příznivé fyzikální vlastnosti (jsou uléhavé). V Hněvčevsi se vyskytují půdy typu hnědozem, které jsou mírně kyselé až neutrální. Půdotvorným substrátem je většinou spraš a sprašová hlína, někdy jemné váté písky. Půdy jsou dobře zásobeny živinami, ale jsou poněkud vysychavé. V Humpolci jsou půdy typu kambizem (hnědá půda nižších poloh).

První zvolený kultivar řepky Sitro představuje ve stávajícím sortimentu nejvýnosnější hybrid, má nejvyšší výnos semen a oleje (4,95 t semen z 1 ha) a je vhodný především na intenzivní agrotechniku¹². Druhý kultivar NK Oktans má vysoký výnos semen a obsah oleje. Vyniká dobrou odolností vůči černi řepkové (*Alternaria brassicicola*), sclerotiniové hnilobě (*Sclerotinia sclerotiorum*) a fomovému černání stonků.

Vzorky rostlinného materiálu pro pokus byly odebírány z parcelek o ploše 10 m². Ve vegetační fázi dlouhivého růstu byl proveden postřik rostlin seleničitanem sodným, celková dávka selenu byla 50 g Se/ha. Souběžně s tímto byly pěstovány kontrolní rostliny řepky bez postřiku. Ve fázi počátku kvetení byly prováděny odběry nadzemní hmoty rostlinného materiálu. Analyzované vzorky vznikly homogenizací lyofilizovaných vzorků ze čtyř náhodně vybraných parcelek.

Analytické postupy

Stanovení celkového obsahu selenu bylo prováděno po rozkladu vzorků v mikrovlnném rozkladném zařízení. Navážka 0,5–0,6 g vzorku rostlinné tkáně byla rozložena v 110 ml teflonové rozkladné nádobce s 3 ml HNO₃ a mineralizát byl převeden do 50 ml odměrné baňky. Měření metodou ICP-MS probíhalo za podmínek uvedených v tab. I. Kalibrační roztoky (0 a 25 µg Se dm⁻³) i vzorky obsahovaly vnitřní standard Ge o koncentraci 100 µg dm⁻³.

Před speciální analýzou selenu byla prováděna enzymatická hydrolyza vzorku. Před vlastní hydrolyzou bylo vždy nutné centrifugační zkumavky vyčistit vyvařením v kyselině chlorovodíkové o koncentraci 2 mol dm⁻³ po dobu 2 h. Pro hydrolyzu bylo do centrifugačních zkuma-

Tabulka I

Podmínky stanovení Se metodou ICP-MS

Parametr	Stanovení celkového obsahu	Speciační analýza
Průtok Ar zmlžovačem, dm ³ min ⁻¹	0,78–0,82 (vždy optimalizováno)	
Průtok plazmového Ar, dm ³ min ⁻¹	11	
Průtok pomocného Ar, dm ³ min ⁻¹	1	
Příkon do plazmatu, W	1 400	
Napětí na čočkách	režim Autolens	
Režim měření	odečet na vrcholu píku	
Sledované nuklidy	⁸⁰ Se, ⁷⁴ Ge	
Průtok reakčního plynu (CH ₄), dm ³ min ⁻¹	0,6	
RPa	0	
RPq	0,15	
Trvání jednoho skenu (Dwell Time), ms/nuklid	50	50
Počet skenů na odečet (Sweep/Reading)	10	10
Počet odečtů na opakování (Reading/Replicate)	1	1000
Počet opakování (Replicates)	20	1
Celková doba měření, s	20	1000

vek naváženo 0,5 g rostlinného materiálu, poté bylo přidáno 50 mg proteasy XIV a 10 ml pufru Tris HCl o koncentraci 0,02 mol dm⁻³ a pH 7,5. Enzymatická hydrolyza probíhala při teplotě 37 °C po dobu 22 h, poté byla směs odstředěna po dobu 30 min při 14 000 ot min⁻¹ a 5 °C. Po přefiltrování přes nylonové filtry 0,45 μm byl čirý roztok analyzován. V jedné dávce bylo zpracováno vždy deset vzorků a dva slepé pokusy. Každý ze vzorků byl analyzován dvakrát.

Chromatografická separace specií selenu byla provedena pomocí RP-HPLC, nástřík vzorku byl 50 μl, průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹. Kvantitativní stanovení obsahu sloučenin selenu bylo provedeno pomocí on-line spojení HPLC a ICP-MS, podmínky měření jsou uvedeny v tab. I. Vysoký zvolený příkon do plazmatu zaručuje, že za zvolených podmínek všechny specíe selenu vykazují shodnou citlivost a kalibraci lze provést pouze pomocí jediné specíe. Kalibrační roztok obsahující selenan o koncentraci 50 μg Se dm⁻³ byl analyzován na začátku měřicí série a pak následně vždy po každém druhém vzorku. Vyhodnocení obsahu selenu v jednotlivých speciích bylo založeno na porovnání plochy píku kalibračního roztoku s plochou píků příslušných specií.

Statistické zpracování

Zjištění vlivu fortifikace a odrůdy na obsah jednotlivých selenoaminokyselin a celkového obsahu Se bylo statisticky vyhodnoceno Studentovým *t*-testem pro dva výběry. Pro vyhodnocení vlivu lokality byla použita analýza rozptylu (ANOVA). Naměřená a vypočtená data byla uspořádána do matice x_{ijkl} .

- i – fortifikace / nefortifikace; $n_i = 2$, $i=1$ fortifikované, $i=2$ nefortifikované;
- j – lokalita; $n_j = 3$, $j=1$ Červený Újezd, $j=2$ Hněvčev, $j=3$ Humpolec

- k – kultivar; $n_k = 2$, $k = 1$ Sitro, $k = 2$ NK Oktans
- l – opakování měření, $n_l = 2$

Pro posouzení vlivu fortifikace byly Studentovým *t*-testem navzájem porovnávány průměrné hodnoty $x_{1...}$ a $x_{2...}$ (počet stupňů volnosti $2 \cdot n_j \cdot n_k \cdot n_l - 2 = 22$) Pro posouzení vlivu odrůdy byly vyhodnoceny a porovnány průměrné hodnoty $x_{i.1}$ a $x_{i.2}$ (počet stupňů volnosti $2 \cdot n_j \cdot n_l - 2 = 10$), a to samostatně pro fortifikované a nefortifikované rostliny. Konečně vliv lokality na obsah jednotlivých selenoaminokyselin a celkového obsahu selenu byl vyhodnocen dvoufaktorovou analýzou rozptylu (počet stupňů volnosti $n_j - 1 = 2$ a $n_j \cdot n_k \cdot (n_l - 1) = 6$). Tento test byl proveden pouze pro fortifikované rostliny.

Výsledky a diskuse

Celkový obsah a speciace selenu

Celkové obsahy selenu stanovené po mikrovlnném rozkladu a obsahy jednotlivých specií nalezených v enzymatickém extraktu jsou uvedeny v tab. II. Hodnoty nalezené ve vzorcích kultivaru řepky NK Oktans pěstované v oblasti Červený Újezd bez fortifikace napovídají, že během odběru došlo zřejmě k záměně se selenizovaným materiálem. Pro další statistické zpracování musely být tyto vzorky bohužel vyřazeny.

Identifikace jednotlivých specií selenu byla provedena na základě srovnání retenčních časů příslušných píků v chromatogramech extraktů rostlin s retenčními časy roztoků standardů. V extraktech získaných enzymatickou hydrolyzou rostlin řepky olejky, na které byl aplikován postřík roztokem seleničitanu sodného, bylo zjištěno pět rozdílných specií selenu. Byl identifikován Se^{VI}, SeCys2, SeMeSeCys, SeMet a dále byla nalezena jedna neznámá

Tabulka II

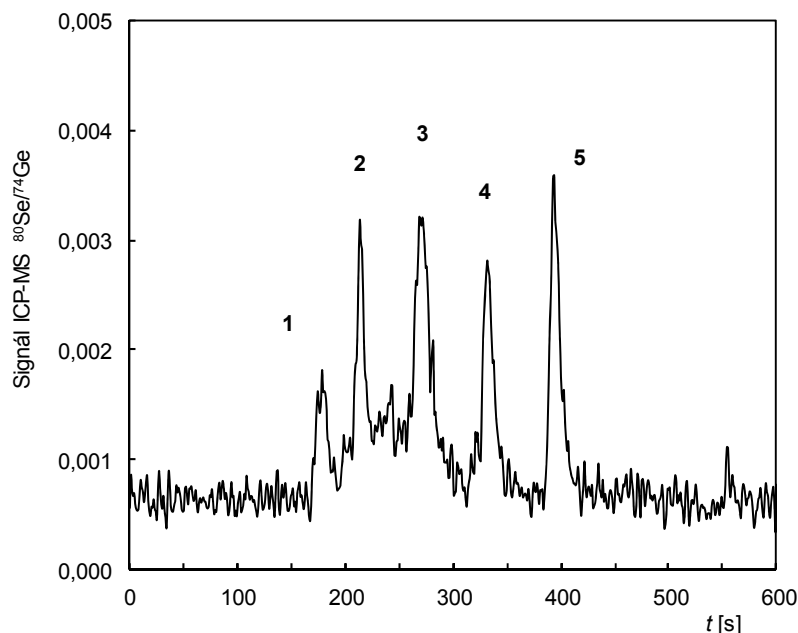
Obsah sloučenin selenu přítomných v extraktech [mg Se kg^{-1}] a celkový obsah Se zjištěný po mikrovlnném rozkladu [mg kg^{-1}]. Výsledky dvou paralelních stanovení

Kultivar		Se ^{VI}	SeCys2	SeMe- SeCys	Neznámá specie	SeMet	Celkový obsah Se		
Fortifikované rostliny	Humpolec	NK Oktans	0,002	0,039	0,047	0,075	0,051	0,622	
			0,005	0,040	0,047	0,069	0,038	0,607	
	Sitro		0,001	0,033	0,049	0,052	0,025	0,543	
			<0,001	0,034	0,047	0,049	0,027	0,678	
	Hněvčeves	NK Oktans		0,012	0,037	0,044	0,051	0,028	0,585
				0,014	0,032	0,038	0,048	0,030	0,895
		Sitro		0,016	0,054	0,061	0,044	0,028	0,532
	Červený Újezd	NK Oktans		0,029	0,085	0,027	0,032	0,026	0,737
				0,028	0,077	0,032	0,034	0,026	0,596
		Sitro		0,090	0,053	0,036	0,017	0,012	0,844
				0,092	0,057	0,026	0,021	0,010	0,426
	Nefortifikované rostliny	Humpolec	NK Oktans		0,003	0,005	0,031	0,003	<0,001
				0,001	0,005	0,028	<0,001	<0,001	0,131
Sitro				0,000	0,005	0,032	0,009	<0,001	0,214
				0,000	0,010	0,036	0,007	<0,001	0,264
Hněvčeves		NK Oktans		0,007	0,016	0,022	<0,001	<0,001	0,081
				0,007	0,017	0,019	<0,001	<0,001	0,163
		Sitro		0,009	0,021	0,018	<0,001	<0,001	0,093
				0,010	0,019	0,018	<0,001	<0,001	0,152
Červený Újezd		NK Oktans		0,092	0,041	0,024	0,014	<0,001	0,521
				0,088	0,040	0,027	0,011	<0,001	0,508
		Sitro		0,043	0,040	0,016	<0,001	<0,001	0,268
				0,049	0,028	0,018	<0,001	<0,001	0,145

specie s retenčním časem 330 s, viz obr. 1. V extraktech rostlin, na které nebyl aplikován postřik roztokem seleničitanu sodného, byly zjištěny pouze čtyři specie selenu. Byl identifikován Se^{VI}, SeCys2, SeMeSeCys a dále byla nalezena neznámá specie se stejným retenčním časem, jako v případě fortifikovaných rostlin. Tyto sloučeniny však nebyly přítomny ve všech testovaných extraktech, viz tab. II. V žádném z extraktů řepky olejky bez fortifikace nebyl identifikován SeMet. Průměrná hodnota výtěžnosti extrakce vztažená k celkovému obsahu Se byla 32 %.

Vyhodnocení vlivu fortifikace

Průměrné hodnoty obsahu specií Se a celkového obsahu Se pro fortifikované a nefortifikované vzorky byly porovnány Studentovým *t*-testem pro dva výběry. Výsledky porovnání jsou uvedeny v tab. III. Pro daný pokus je kritická hodnota testu $t_{\text{krit}}(0,95, 22) = 2,07$, je tedy patrné, že obsah SeCys2, SeMeSeCys, SeMet, neznámé specie a celkového obsahu Se po fortifikaci významně vzrostl. Lze tedy předpokládat, že došlo k metabolizaci seleničitanu, kterým byly rostliny fortifikovány. Obsah Se^{VI} se neliší



Obr. 1. Příklad chromatogramu RPC-HPLC-ICP-MS, extrakt řepky olejky kultivar Sitro s postřikem z oblasti Hněvčeves: 1 – Se^{VI} , 2 – SeCys2, 3 – SeMeSeCys, 4 – neznámá specie, 5 – SeMet

u řepky s postřikem a bez postřiku, lze z toho tedy usuzovat, že Se^{VI} přítomný v rostlině byl zredukován na selenid a ten transformován na SeCys, který byl metabolizován na SeMet stejně jako je uváděno v literatuře⁶.

Statistické vyhodnocení vlivu kultivaru

Podobným způsobem byl Studentův t -test použit při porovnání průměrných hodnot obsahu specií a celkového obsahu Se v obou kultivarech. Tento test byl proveden zvláště pro fortifikované a nefortifikované rostliny. Výsledky testu jsou uvedeny v tab. IV, kritická hodnota t -testu je $t_{\text{krit}}(0,95; 10) = 2,23$. Z testů vyplývá, že obsah většiny specií selenu a celkového obsahu selenu je srovnatelný v obou kultivarech. Lze tedy usuzovat, že dva rozdílné kultivary řepky olejky, a to Sitro a NK Oktans, selen metabolizují velice podobně. Výjimku tvoří neznámá specie,

jejíž obsah byl u nefortifikovaných rostlin vyšší u kultivaru NK Oktans.

Statistické vyhodnocení vlivu lokality

Posledním studovaným parametrem, který může mít vliv na metabolismus selenu v rostlinách, je složení půdy. Pro zjištění vlivu lokality na obsah selenoaminokyselin a celkového obsahu Se v rostlině byla použita dvouparametrová ANOVA. Tento test byl aplikován pouze na fortifikované rostliny; z důvodu pravděpodobné záměny vzorků nemohl test být aplikován i na rostliny nefortifikované. V tab. V jsou uvedeny hodnoty vypočteného testovacího kritéria pro jednotlivé specie a celkový obsah Se, pro dané experimentální uspořádání kritická hodnota F rozdělení je $F_{0,95}(2, 6) = 5,14$. Výsledky testu jsou velice zajímavé. Zatímco složení půdy

Tabulka III

Statistické vyhodnocení vlivu fortifikace, průměrné hodnoty jsou uvedeny v mg Se kg^{-1}

Fortifikace	Se^{VI}	SeCys2	SeMeSeCys	Neznámá specie	SeMet	Celkový obsah Se
Fortifikované $x_1...$	0,025	0,051	0,041	0,045	0,028	0,637
Nefortifikované $x_2...$	0,013	0,017	0,024	0,005	<0,001	0,169
t	1,07	5,16*	4,54*	7,21*		10,16*

* $P < 0,05$; $t_{\text{krit}}(0,95, 22) = 2,07$

Tabulka IV

Statistické vyhodnocení vlivu kultivaru řepky olejky, průměrné hodnoty jsou uvedeny v mg Se kg⁻¹

Kultivar		Se ^{VI}	SeCys2	SeMe- SeCys	Neznámá specie	SeMet	Celkový obsah Se
Fortifikované	Sitro $x_{1.1}$.	0,035	0,059	0,043	0,038	0,023	0,600
	NK Oktans $x_{1.2}$.	0,015	0,052	0,039	0,051	0,033	0,674
	<i>t</i>	1,10	0,56	0,72	1,42	1,88	0,96
Nefortifikované	Sitro $x_{2.1}$.	0,018	0,021	0,023	0,008	<0,001	0,189
	NK Oktans $x_{2.1}$.	0,005	0,011	0,025	0,002	<0,001	0,138
	<i>t</i>	1,24	1,45	0,36	5,18*		0,86

* $P < 0,05$; $t_{\text{krit}}(0,95, 10) = 2,23$

Tabulka V

Statistické vyhodnocení vlivu pěstební lokality pomocí *F* testu (pouze fortifikované rostliny), průměrné hodnoty jsou uvedeny v mg Se kg⁻¹

Lokalita	Se ^{VI}	SeCys2	SeMeSeCys	Neznámá specie	SeMet	Celkový obsah Se
Červený Újezd $x_{11..}$	0,060	0,068	0,030	0,026	0,019	0,651
Hněvčeves $x_{12..}$	0,014	0,048	0,046	0,047	0,030	0,647
Humpolec $x_{13..}$	0,002	0,037	0,048	0,061	0,035	0,613
<i>F</i>	1379*	38,18*	8,53*	96,61*	15,25*	0,07

* $P < 0,05$; $F_{0,95}(2, 6) = 5,14$

a klimatické podmínky na stanovišti neovlivnily celkový obsah Se v rostlinách, statistický rozdíl obsahu specií selenu u rostlin z různých pěstebních lokalit byl potvrzen. V každé lokalitě je jiný typ půd a potvrdilo se tedy, že obsah jednotlivých specií selenu závisí na fyzikálních podmínkách půdy, ze které rostliny odebírají živiny, a na klimatických podmínkách.

Závěr

Testy foliární aplikace seleničitanu sodného prokázaly, že je selen v této formě řepkou olejkou přijímán a došlo nejenom ke zvýšení jeho obsahu v rostlinných tkáních, ale byl i metabolizován na další sloučeniny selenu. Průměrný celkový obsah selenu ve fortifikovaných rostlinách (0,637 mg Se kg⁻¹) byl oproti kontrolním rostlinám (0,169 mg kg⁻¹) významně zvýšen a došlo i ke změnám v jeho speciaci. Zatímco v kontrolních rostlinách pěstovaných bez aplikace seleničitanu byly speciální analýzou nalezeny selenan, selenocystin, Se-methylselenocystein a jedna zatím neidentifikovaná specie, u fortifikovaných rostlin došlo jednak ke zvýšení obsahu všech těchto specií kromě selenanu, jednak byl nalezen i selenomethionin, který

v kontrolních rostlinách nalezen nebyl.

Během našich výzkumů se také podařilo ukázat, že metabolismus selenu ve dvou důležitých kultivarech řepky olejky Sitro a NK Oktans je podobný a neměl na speciaci selenu vliv. Oproti tomu obsah specií selenu v rostlinách fortifikovaných selenem byl ovlivněn zvolenou pěstební oblastí. Celkový obsah selenu, který rostliny získaly převážně vstřebáváním listy, se ovšem u vzorků získaných z různých lokalit nelišil, pěstební podmínky reprezentované zejména různými typy půd (luzizem, hnědozem, kambizem) však měly vliv na jeho další metabolismus.

Tato práce vznikla za podpory projektu GAČR 13-04580S.

LITERATURA

- Clough R., Harrington C. F., Hill S. J., Madrid Y., Tyson J. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1153 (2013).
- Maseko T., Callahan D. L., Dunshea F. R., Doronila A., Kolev S. D., Ng K.: *Food Chem.* 141, 3681 (2013).
- Zima T., Tesař V., Mestek O., Němeček K.: *Blood Purif.* 17, 187 (1999).

- Zwolak I., Zaporowska H.: *Cell Biol. Toxicol.* 28, 31 (2012).
- Irons R., Carlson B. A., Hatfield D. L., Davis C. D.: *J. Nutr.* 136, 1311 (2006).
- Pyrzynska K.: *Food Chem.* 114, 1183 (2009).
- Dumont E., Vanhaecke F., Cornelis R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304 (2006).
- Mehdi Y., Hornick J. L., Istasse L., Dufrasne I.: *Molecules* 18, 3292 (2013).
- Poláková Š.: *Obsah Selenu (Se) v zemědělských půdách ČR*. ÚKZUZ, Brno 2010.
- Seppanen M. M., Kontturi J., Heras I. L., Madrid Y., Cámara C., Hartikainen H.: *Plant Soil* 337, 273 (2010).
- Balán J., Vosmanská M., Száková J., Mestek O.: *Chem. Listy* 108, 256 (2014).
- Vašák J., Bečka D., Mikšík V.: *Úroda* 58, 25 (2010).

K. Klognerová^a, M. Vosmanská^a, J. Száková^b, and O. Mestek^a (^a*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague,* ^b*Czech University of Life Sciences, Prague*): **Effect of Growing Conditions on Selenium Speciation in Rapeseed (*Brassica napus*) Tissue**

Se speciation analyses were performed in the rapeseed plants fortified with Na₂SeO₃ (50 g/hectar) and in the control. Foliar application of the selenite was carried out in the vegetative phase of extensive growth. Samples of shoots were taken at the early flowering stage. The tests comprised cultivars Sitro and NK Oktans in three Bohemian agricultural regions including luvisol, brown and cambisol soils. The total Se content of was determined by inductively coupled plasma MS after pressurized microwave digestion with HNO₃. Speciation analysis was performed after enzymatic hydrolysis by the nonspecific protease XIV using the on-line of reverse phase chromatography and inductively coupled plasma. The mean extraction efficiency was 32 %. Selenate, selenocystine, Se-methylselenocysteine, and one as yet unidentified species were found in extracts of control plants. In addition, the extracts of the fortified plant contained selenomethionine. The analytical data were compared using Student t-test and ANOVA. The fortification significantly increased the total Se content (0.169 mg kg⁻¹ in control vs. 0.637 mg kg⁻¹). The contents of individual Se species also increased; the only exception was selenate. Both cultivars did not differ either in the total Se content or in its speciation. The choice of cultivated area, although not reflected in the total Se content in plants, significantly affected the proportional representation of each species. The growing conditions and climate show a significant effect on the Se metabolism in plants.