

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Doris Kopf

Određivanje selenija fluorescentnom spektrometrijom

Determination of selenium by fluorescence spectrometry

Završni rad

Mentorica: doc.dr.sc. Mirela Samardžić

Neposredna voditeljica: dr.sc. Mateja Hajduković

Osijek, 2018.

Sažetak

Selenij je element 16. skupine periodnog sustava elemenata, odnosno halkogene skupine. Pripada skupini metaloida što znači da ima karakteristike metala i nemetala. Selenij je esencijalan element za čovjeka, a sadržan je u enzimima glutation peroksidazi i jodotironin 5'-dejodinazi, kao i u selenoproteinima P i N. Fluorescentna spektrometrija je metoda koja se temelji na svojstvu fluorescencije atoma ili molekula, a često se koristi za određivanje selenija. Budući da selenij nema svojstvo fluorescencije, potrebno je dodati mu reagens koji će dati odziv tijekom mjerenja u fluorimetru. U ovom radu kao fluorescentni reagens koristio se 2,3-diaminonaftalen (DAN) koji sa selenijem tvori kompleks, čiji se fluorescencijski intenzitet mjerio kako bi se odredila masena koncentracija selenija u otopinama.

Rad je podijeljen u nekoliko poglavlja. Nakon uvoda slijedi literaturni pregled u kojem se govori o seleniju i njegovim svojstvima te o fluorescentnoj spektrometriji i njenoj primjeni. Iza toga slijedi eksperimentalni dio te rasprava o dobivenim rezultatima. Na kraju su zaključak i popis korištene literature.

Ključne riječi: selenij, 2,3-diaminonaftalen, fluorescencija, fluorescentna spektrometrija

Abstract

Selenium is an element located in group 16 of the periodic table of elements, respectively it is a member of chalcogen family. It is a metalloid, which means it has characteristics of a metal and of a non-metal. Selenium is an essential element for humans, and it is found in enzymes glutathione peroxidase and iodothyronine 5'-de-iodinase, as well as in selenoproteins P and N. Fluorescence spectrometry is a method based on fluorescence property of an atom or a molecule and it is often used for selenium determination. Since selenium does not have fluorescence property, it is necessary to add a fluorescent reagent that will give response during measurements in fluorometer. In this paper, 2,3-diaminonaphthalene (DAN) was used as a fluorescent reagent which made a complex compound with selenium, whose fluorescence intensity was measured and the mass concentration of selenium in solutions was determined.

The paper is divided in several chapters. Introduction chapter is followed by literature review in which selenium and its properties are presented as well as fluorescence spectrometry and its uses. After that, experimental procedure and discussion of obtained results are presented. In the end there is a final conclusion and a list of used literature.

Key words: selenium, 2,3-diaminonaphthalene, fluorescence, fluorescence spectrometry

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Selenij	2
2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva selenija	2
2.1.2. Selenij u ljudskom organizmu	4
2.1.3. Se-DAN kompleks	5
2.2. Fluorescentna spektrometrija	7
2.2.1. Fluorescencija	7
2.2.2. Instrumenti za mjerenje fluorescencije.....	8
2.2.3. Primjena fluorescentne spektrometrije.....	9
3. EKSPERIMENTALNI PODACI	11
3.1. Korištene kemikalije.....	11
3.2. Aparatura.....	11
3.3. Priprema otopina	12
3.4. Postupak.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
5. ZAKLJUČAK.....	21
6. LITERATURA	22

1. UVOD

Selenij je 34. element periodnog sustava elemenata, a nalazi se u 16. skupini i 4. periodi. Tvori grupu halkogenih elemenata zajedno s kisikom, sumporom i telurijem. Simbol selenija je Se, pripada skupini metaloida i ima atomsku masu 78,963 Da. Iako je jedan od važnijih mikroelemenata u organizmu, prekomjerni dnevni unos može uzrokovati zdravstvene probleme. Zbog toga, ali i zbog činjenice da su neki spojevi selenija toksični, i sam selenij se smatra toksičnim elementom. Međutim, zbog svojih raznih svojstava nalazi primjenu u više vrsta industrija.

Fluorescencija je pojava u kojoj se pobuđene molekule vraćaju u osnovno stanje i pri tom emitiraju zračenje u obliku fotona. Ona prestaje čim prestane dovodenje energije potrebne za pobudu molekula. Na fluorescenciji se temelji metoda fluorescentne spektrometrije, koja je osjetljivija od metoda temeljenih na apsorpciji.

2,3-Diaminonaftalen (DAN) je reagens koji se u ovom radu koristio kako bi sa selenijem tvorio spoj 2,1,3-nafto(2,3-c)selenadiazol, čiji je fluorescencijski intenzitet moguće mjeriti fluorescentnom spektrometrijom. 2,3-Diaminonaftalen je krutina u obliku bijelih iglica, a stajanjem na svjetlu se raspada te nastaje smeđi talog.

Cilj ovog rada je prikazati metodu fluorescentne spektrometrije pri određivanju selenija te odrediti masene koncentracije tri različite otopine selenija. U radu se mjeri fluorescencijski intenzitet Se-DAN kompleksa te se dobivaju podaci za kalibracijski pravac na temelju kojeg se izračunavaju masene koncentracije selenija u otopinama.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Selenij

Selenij je element 16. skupine periodnog sustava elemenata. Otkrio ga je švedski kemičar i izumitelj Jöns Jakob Berzelius 1817. godine. Zajedno s Johanom Gottliebom Gahnom analizirao je crvenkasti mulj koji je zaostajao nakon postupka dobivanja sumporne kiseline u olovnim komorama u tvornici Gripsholm u Švedskoj. Zagrijavanjem 200 kg sumpora dobili su otprilike 3 g taloga na kojem su provodili razne analize. Prvi rezultati su pokazivali kako bi dobiveni talog u sebi mogao sadržavati telurij, ali ponavljanjem pokusa Berzelius je zaključio kako se radi o novom elementu. Taj novi element imao je svojstva metala i bio je sličan sumporu. U metalnom stanju bio je sivog sjaja, gorio je plavim plamenom i imao miris po hrenu, što odgovara tipičnom mirisu telurija. Berzelius je novom elementu dao ime selenij, prema grčkoj riječi za mjesec: *selene*. Kako bi potvrdio da se radi o novom elementu ustanovio je njegova svojstva, ali i svojstva njegovih spojeva s metalima, kisikom, vodikom, sumporom, fosforom te različitim solima. Jednim od mnogih otkrića, otkrićem novog elementa selenija, Berzelius je dobio reputaciju vodećeg svjetskog kemičara 19. stoljeća [1].

2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva selenija

Gustoća selenija je $4,809 \text{ g/cm}^3$, a pri sobnoj temperaturi je krutina. Elementarni selenij je relativno netoksičan i smatra se esencijalnim mikroelementom [2]. U Tablici 1. navedena su osnovna atomska i fizikalna svojstva selenija.

Tablica 1. Atomska i fizikalna svojstva selenija [2].

Atomski broj	34
Atomska masa	78,963 Da
Elektronska konfiguracija	$[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^4$
Atomski radijus	103 pm
Kovalentni radijus	116 pm
van der Waalsov radijus	190 pm
Uobičajena oksidacijska stanja	-2, 0, +4, +6

Energija veze M-M	44 kcal/mol
Energija veze M-H	67 kcal/mol
Ionizacijski potencijal	1.: 941,0 kJ/mol 2.: 2045,0 kJ/mol 3.: 2973,7 kJ/mol
Elektronski afinitet	-4,21 eV
Elektronegativnost (Paulingova skala)	2,55
Temperatura tališta	494 K, 221°C
Temperatura vrelišta	958 K, 685°C

Elektronska konfiguracija valentne ljuske selenija ($[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^4$) je ekvivalentna elektronskoj konfiguraciji valentne ljuske sumpora ($[\text{Ne}] 3s^2 3p^4$) što objašnjava sličnosti u atomskim i fizikalnim svojstvima tih elemenata. Unatoč tome, spojevi selenija se razlikuju od spojeva sumpora u dva važna svojstva: u kiselosti i redukcijsko-oksidacijskom svojstvu. Spojevi selenija se češće metaboliziraju do reduciranog stanja, a spojevi sumpora do oksidiranih stanja. Iako kiseline selenija i sumpora imaju slične pK_a vrijednosti, H_2Se je kiselija od H_2S , što je potvrđeno u istraživanjima disocijacije selenocisteina i cisteina [2]. U prirodi, selenij se rijetko nalazi u elementarnom stanju, već je dio nekih minerala kao što su CuAgSe i CuThSe [3]. Postoji šest prirodnih izotopa selenija, od kojih je 5 stabilnih: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se i ^{82}Se , a od kojih su izotopi ^{80}Se i ^{78}Se najučestaliji [4]. Selenij se javlja u tri alotropske modifikacije, koje imaju različite molekulske oblike te zbog toga i različita fizikalna svojstva. Slika 1. prikazuje alotropske modifikacije selenija redom: amorfni crni selenij, metalni sivi selenij te amorfni crveni selenij. Metalni sivi selenij jedini ima kristalnu heksagonalnu strukturu te je zbog toga stabilan. Crveni amorfni selenij nema kristalnu strukturu i javlja se u obliku crvenog praha. Najveći dio selenija se dobiva upravo u tom obliku u procesu elektrolitičkog oplemenjivanja bakra [5].



Slika 1. Alotropne modifikacije selenija [6].

Jedno od važnijih fizikalnih svojstava selenija je njegovo električno svojstvo. Selenij je poluvodič, što znači da mu je električna vodljivost bolja od one nekog izolatora, ali slabija od nekog vodiča. Zbog tog svojstva često se koristi u elektroničkoj industriji [7]. Na otpornost selenija za vođenje električne struje uvelike utječe količina svjetlosti kojom je obasjan. Kada je obasjan većim intenzitetom svjetlosti, dolazi do povećanja električne vodljivosti, a to svojstvo se naziva fotovodljivost. Zbog navedenog svojstva selenij se koristi u fotoćelijama, uređajima za fotokopiranje i sl. Osim toga, selenij se koristi i u proizvodnji stakla. Kada se selenij doda staklu, ima mogućnost odstraniti boje drugih elemenata, odnosno nečistoća, koje se nalaze u staklu, te ga čini bezbojnim [8]. Selenij je prilično reaktivan element i lako se spaja s vodikom, fluorom, klorom i bromom, a reagira i s dušičnom te sumpornom kiselinom. S metalima tvori spojeve koji se zovu selenidi. U reakciji s kisikom gori svijetlo plavim plamenom te tako tvori selenijev dioksid (SeO_2), koji ima karakterističan miris po trulom hrenu [7].

2.1.2. Selenij u ljudskom organizmu

Selenij je esencijalan element za sisavce, uključujući i čovjeka, a sadržan je u dva enzima: glutation peroksidazi te jodotironin 5'-dejodinazi. Također je komponenta dva proteina: selenoproteina P, koji se nalazi u plazmi, te selenoproteina N, a oni su važni u raznim

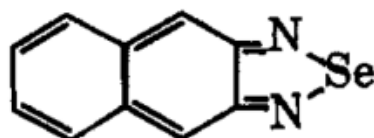
metaboličkim putevima [9]. Selenoprotein P (SePP) je najzastupljeniji protein u plazmi koji sadrži selenij, a odgovoran je za do 60% sastava selenija u plazmi. Važan je za održavanje razina selenija u mozgu i sjemenicima jer prenosi i pohranjuje uneseni selenij. Kada je u tijelu manjak selenija, SePP održava koncentraciju selenija u mozgu stalnom. Nedostatak selenija, kao i nedostatak selenoproteina N (SePN), ali i njegove mutacije mogu dovesti do poremećaja kao što su distrofija mišića kralježnice ili miopatija s kongenitalnim disproporcijama. Miopatije povezane s nedostatkom SePN su karakterizirane atrofijom ili slabosti mišića, skoliozom i dišnim problemima [2]. Nedostatak selenija u organizmu također može uzrokovati razne bolesti kardiovaskularnog sustava ili oslabiti imunost sustav. Međutim, prekomjerni unos selenija u organizam može uzrokovati selenozu, odnosno kronično trovanje selenijem. Simptomi selenoze su smetnje u gastro-intestinalnom sustavu, gubitak kose i noktiju, lezije kože, a u ekstremnim slučajevima i neurološki poremećaji [9]. U mnogim zemljama meso, morski plodovi, riža, tjestenina i kruh su uobičajeni izvori selenija. Prema Medicinskom institutu Nacionalne akademije znanosti u SAD-u, preporučeni dnevni unos selenija od 55 µg po danu može se unijeti konzumiranjem jednog suhog brazilskog oraščića. Najveća podnošljiva dnevna doza unosa selenija za odraslog čovjeka je 400 µg/dan [4].

2.1.3. Se-DAN kompleks

Iako ima brojna svojstva, selenij ne posjeduje svojstvo fluorescencije pa je potrebno dodati mu reagens s kojim će tvoriti spoj koji je fluorescentan kako bi se mogao određivati fluorescentnom spektrometrijom. Neki od reagensa koji se mogu koristiti su 3,3'-diaminobenzidin, DAN i 2,3-diamino-1,4-dibromonaftalen (Br₂-DAN). Reakcija selenija s 3,3'-diaminobenzidinom je specifična, osjetljiva i brza. Nastali spoj daje žuto obojano otopinu u kiselom mediju (pH ispod 4), a kvantitativno se može ekstrahirati tek pri pH višem od 5. Nedostatak ovog reagensa je što je nestabilan u vodenim otopinama pri sobnoj temperaturi [10]. Br₂-DAN je noviji reagens te prema radu Johansson et al. [11] ima svoje prednosti i mane. Prednost je što ga se može koristiti u vrlo kiselom mediju, stabilan je i ne mora ga se pripremati u zatamnjenom prostoru. Međutim, poznato je da se fluorescencija aromatskih spojeva smanjuje kada se supstituiraju teškim atomima pa zbog toga ovaj reagens nije dovoljno istražen.

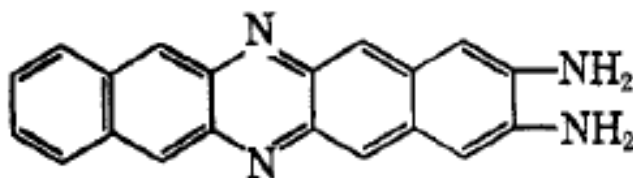
Prema literaturi, jedan od boljih reagenasa i najčešće korišten za izravno određivanje mikrogramskih i submikrogramskih količina selenija pomoću spektrofotometrije ili

fluorimetrije, je DAN pa je zbog toga korišten i u ovom radu. Pročišćeni DAN je u obliku bijelih iglica. Polako oksidira na zraku, tvoreći žuto-smeđi materijal. Vodena otopina se brže oksidira, ali može se pohraniti do 3 dana u hladnjaku, bez da utječe na postupak određivanja selenija. Selenij reagira s DAN-om i tvori piazselenol, crvenkasti talog [12]. Piazselenol koji nastaje reakcijom između selenija i DAN-a je spoj 2,1,3-nafto(2,3-c)selenadiazol struktune formule prikazane na Slici 2.



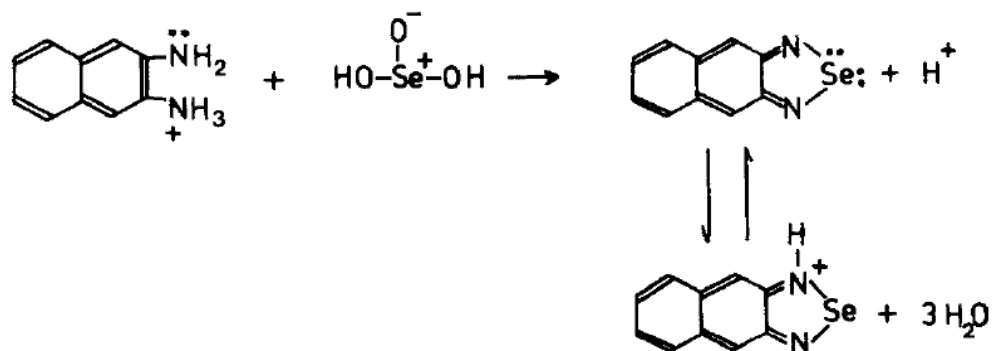
Slika 2. Strukturna formula 2,1,3-nafto(2,3-c)selenadiazola [13].

Zbog osjetljivosti na danje svjetlo, provedena su istraživanja o brzini kemijske reakcije DAN-a u prisutnosti i u odsustvu svjetla. Zaključeno je da je pri danjem svjetlu teško izvodljivo odrediti brzinu reakcije, ali u odsustvu svjetla, određivanje brzine reakcije bilo je moguće. Uzorci DAN-a izloženi danjem i ultraljubičastom svjetlu polako su se raspadali te je nastao smeđi talog. Na temelju mikroanaliza ugljika, vodika i dušika te podataka iz IR-spektra, talog je određen kao polimer DAN-a (Slika 3.) [13].



Slika 3. Strukturna formula polimera DAN-a [13].

U radu Bayfield et al. [14] promatrao se utjecaj pH na reakciju između DAN-a i selenija te je predložen mehanizam u kojem su reagensi monoprotoniran 2,3-diaminonaftalen i selenijeva kiselina (H_2SeO_3), koji je prikazan na Slici 4. Optimalna pH vrijednost za ovu reakciju bila je između 1 i 2, a kada je korišten metiloranž umjesto krezol crvenog, optimalan pH je bio dosljedan pa je metiloranž izabran za korištenje prilikom određivanja selenija u ovom radu.

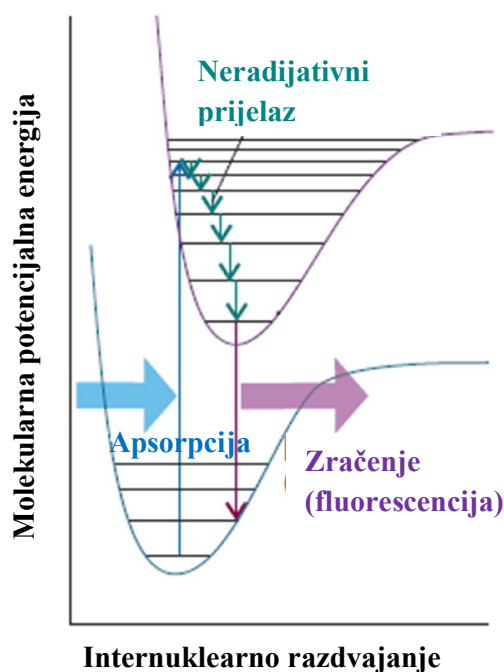


Slika 4. Mehanizam nastajanja 2,1,3-nafto(2,3-c)selenadiazola [14].

2.2. Fluorescentna spektrometrija

2.2.1. Fluorescencija

Fluorescencija je oblik fotoluminiscencije odnosno posljedica obasjavanja tvari svjetlošću svih valnih duljina. Iako završava za 10^{-5} sekundi ili manje, fluorescencija je važan analitički emisijski proces. Pobuđene vrste vraćaju se u osnovno stanje otpuštanjem jednog dijela energije u obliku fotona [15].



Slika 5. Koraci koji dovode do pojave fluorescencije [16].

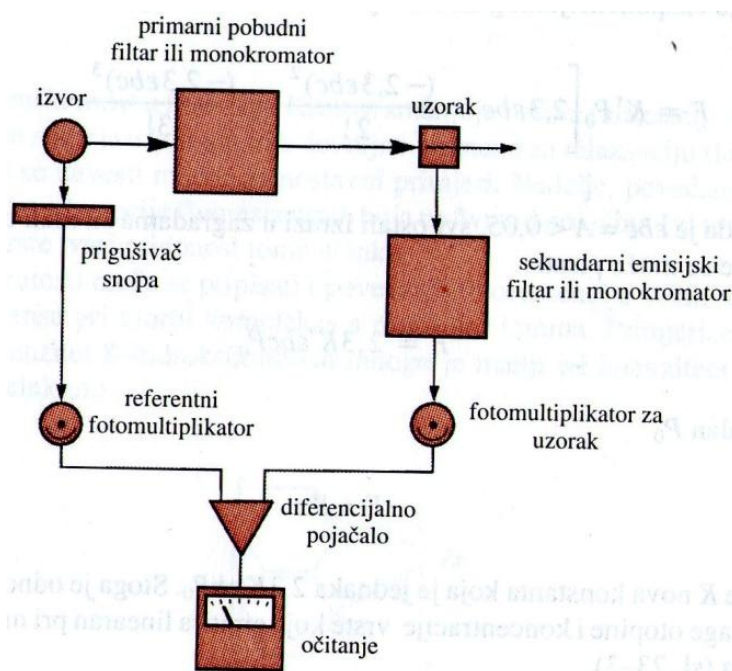
Slika 5. prikazuje korake koji dovode do pojave fluorescencije. Nakon početne apsorpcije, molekula prelazi iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. Zatim pobuđena molekula može gubiti energiju neradijativnim prijelazom, što znači da unutrašnjom konverzijom u sudarima s drugim molekulama u gornjim vibracijskim razinama predaje energiju susjednim molekulama te prelazi u najnižu vibracijsku razinu pobuđenog stanja. Molekula također može imati dovoljno dug životni vijek da spontano emitira višak energije kao zračenje. Fluorescencija se javlja pri nižim frekvencijama, odnosno pri višim valnim duljinama od induciranog zračenja jer se prijelaz emisije odvija nakon što se dio vibracijske energije otpustio u okolinu [16]. Kada su na apsorpcijskom dijagramu fluorescencijske i apsorpcijske valne duljine jednake, linije kojima su označene nazivaju se rezonancijskim linijama. Fluorescencijske vrpce molekulskih vrsta su uobičajeno sastavljene od linija većih valnih duljina, odnosno manjih frekvencija. Takav pomak prema valnim duljinama većih vrijednosti naziva se Stokesovim pomakom [15].

Budući da je fluorescencija jedan od mehanizama povratka molekule u osnovno stanje, sve molekule koje apsorbiraju mogle bi fluorescirati. Međutim, mogućnost fluoresciranja ovisi o strukturi molekule. Aromatski spojevi imaju najintenzivnije fluorescencijske emisije i stoga se najčešće upotrebljavaju u analizama. Fluorescencija nesupstituiranih aromatskih ugljikovodika se može povećati povećanjem broja aromatskih prstenova te stupnjem kondenzacije. Pomaci u valnim duljinama apsorpcijskih i fluorescencijskih maksimuma uzrokovani su supstitucijama na aromatskom prstenu. Na povećanje fluorescencijske djelotvornosti utječe i krutost strukture molekula, jer krutost smanjuje brzinu relaksacije bez pojave zračenja [15].

2.2.2. Instrumenti za mjerenje fluorescencije

Instrumenti za mjerenje fluorescencije su fluorimetri i spektrofluorimetri. Dijelovi tih instrumenata su ekvivalentni dijelovima uređaja za spektroskopiju, a navedeni su na Slici 6. Najčešće se koriste spektrofluorimetri s dva monokromatora koji snimaju fluorescencijske pobudne i emisijske spektre. Prvo se propušta zračenje koje uzrokuje fluorescenciju kroz primarni monokromator, a ograničava se zračenje valnih duljina koje odgovaraju valnim duljinama fluorescencije. Fluorescencijsko zračenje je najbolje promatrati pod pravim kutom u odnosu prema pobudnom snopu zračenja. Na kraju,

emitirano zračenje prolazi kroz drugi monokromator i dolazi do detektora gdje se očitava signal [15].



Slika 6. Sastavni dijelovi fluorimetra i spektrofluorimetra [15].

2.2.3. Primjena fluorescentne spektrometrije

Fluorescentna spektrometrija je osjetljivija metoda od onih temeljenih na apsorpciji jer joj se osjetljivost može povećati pojačanjem signala detektora ili povećanjem snage snopa zračenja koje pobuđuje molekulu. Ovom metodom moguće je analizirati i određivati anorganske vrste, ali i organske te biokemijske vrste. Kod određivanja anorganskih vrsta postoje izravne i neizravne metode. Izravne su one kod kojih uzorak reagira s kelatnim reagensom te tako nastaje kompleks koji posjeduje svojstvo fluorescencije. U ovom radu se primjenjuje izravna metoda, jer se mjeri fluorescencijski intenzitet kompleksa nastalog reakcijom između selenija i DAN-a. Neizravne su pak one metode koje ovise o smanjenju fluorescencijskog intenziteta reakcijom između reagensa i uzorka. Osjetljivost i selektivnost ove metode osobito su važni čimbenici za njenu primjenu u analizi biokemijskih (adenin, indol, cistein, triptofan i dr.), prehrambenih, farmaceutskih

(adrenalin, penicilin, klorokvin i dr.) te kliničkih uzoraka, ali i prirodnih spojeva (klorofil, alkaloidi, flavonoidi i steroidi) [15].

Nakon korištenja klasičnih metoda, kao što je jodometrijska titracija, sredinom 1980.-ih godina molekularna fluorescentna spektrometrija (MFS) se počela sve češće koristiti za određivanje selenija u biološkim uzorcima. Razlozi tome su što se MFS-om mogu mjeriti mikrokoličine selenija u uzorcima, metoda ne zahtijeva skupu aparaturu te se pokazala dosljednom u rezultatima u usporedbi s nekim drugim metodama [9].

3. EKSPERIMENTALNI PODACI

3.1. Korištene kemikalije

U eksperimentalnom dijelu korištene su sljedeće kemikalije:

- standardna otopina selenija
- otopina 2,3-diaminonaftalena (DAN)
- otopina etilendiamintetraoctene kiseline i hidroksilamin hidroklorida (EDTA-HONH₂·HCl)
- otopina klorovodične kiseline ($c(\text{HCl})=0,1 \text{ mol/dm}^3$ i $c(\text{HCl})=1 \text{ mol/dm}^3$)
- otopina amonijaka ($w(\text{NH}_3)=25\%$)
- cikloheksan (C₆H₁₂)
- koncentrirana dušična kiselina ($w(\text{HNO}_3)=68\%$)
- metiloranž.

3.2. Aparatura

Prilikom pripreme otopina, uzoraka i mjerenja fluorescencijskog intenziteta u svrhu određivanja masene koncentracije selenija korištena je sljedeća aparatura:

- odmjerne tikvice
- vodena kupelj
- analitička vaga
- lijevak za odjeljivanje
- vortex miješalica
- pločice s jažicama za fluorimetriju (96 jažica, $V_{max}=340 \mu\text{L}$)
- modularni čitač mikrotitar pločica (MTP) s modulom za apsorbanciju i fluorescenciju.

MTP korišten u eksperimentalnom dijelu ima mogućnost rada s raznim aplikacijama, od kojih su neke: apsorbancija, fluorescencija, fluorescencijska polarizacija, FRET (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), TRF (eng. *Time Resolved Fluorescence*), TR-FRET, luminiscencija, luminiscencijsko skeniranje i dr. Kod modula za fluorescenciju izvor svjetla je ksenonska bljeskalica visoke energije, a detektor je poboljšana fotomultiplikatorska cijev. Raspon spektra kod emisije i ekscitacije je 230-900 nm.

Temperatura u uređaju se može kontrolirati, a postoji i opcija miješanja uzoraka. Tijekom određivanja selenija u ovom radu koristilo se linearno miješanje. Prilikom mjerenja mogu se koristiti i pločice s poklopcima, što je prednost kod korištenja organskih otapala, kao što je cikloheksan koji je korišten u ovom radu.

3.3. Priprema otopina

Priprema standardne otopine selenija

Za pripremu standardne otopine selenija masene koncentracije 0,001 g/L potrebno je prvo prirediti otopinu selenija masene koncentracije 1 g/L te ju dalje razrijediti. Za otopinu $\gamma(\text{Se})=1$ g/L potrebno je otopiti 1 g praha selenija u dušičnoj kiselini, HNO_3 . Volumen dušične kiseline koji se dodaje je 3 – 5 mL, odnosno onaj volumen koji je potreban da se sav prah selenija otopi. Zatim se tamna odmjerna tikvica od 1 L nadopuni destiliranom vodom do oznake. Selenij se otapanjem u HNO_3 reducira u Se^{4+} prema reakciji:



Otopinu je zatim potrebno razrijediti na masenu koncentraciju 0,1 g/L kako bi se dalje mogla razrijediti do otopine željene masene koncentracije, koja iznosi 0,001 g/L. Za pripremu 50 mL otopine selenija $\gamma(\text{Se})=0,1$ g/L, potrebno je 5 mL otopine selenija, čija je masena koncentracija 1 g/L, uliti u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Zatim, kako bi se dobilo 500 μL otopine masene koncentracije 0,001 g/L, s kojom se ulazi u postupak, potrebno je razrijediti 5 μL otopine selenija $\gamma(\text{Se})=0,1$ g/L s 495 μL destilirane vode.

Priprema otopine DAN-a

Kod pripreme otopine DAN-a važno je napomenuti kako je on reagens koji je osjetljiv na svjetlo te ga treba čuvati, ali i prirediti na tamnom mjestu. Najbolje je otopinu DAN-a svježe prirediti svaki put prije korištenja u eksperimentu. Na analitičkoj vagi izvažuje se 0,05 g DAN-a te se uz grijanje na 50 °C otopi u 50 mL klorovodične kiseline, HCl , množinske koncentracije 0,1 mol/dm³. Kada se otopina ohladi, potrebno ju je pročistiti s cikloheksanom pa se cijeli sadržaj tikvice prebaci u lijevak za odjeljivanje. Ekstrakcija se vrši tri puta, a za volumen cikloheksana se uzima petina volumena prethodno pripravljene

otopine DAN-a. U eksperimentu se pripremljalo 50 mL otopine, pa se ekstrahiralo tri puta s po 10 mL cikloheksana. Tijekom ekstrakcije, gornji sloj će biti cikloheksan, a donji sloj će biti pročišćena otopina DAN-a. Ekstrakcija se vrši tri puta s manjom količinom otapala jer je tada postupak pročišćavanja otopine najučinkovitiji.

Priprema otopine EDTA-HONH₂·HCl

Za pripremu ove otopine potrebno je otopiti 1 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i 2,5 g hidroksilamin hidroklorida (HONH₂·HCl) u destiliranoj vodi te zatim nadopuniti odmjernu tikvicu od 100 mL do oznake s destiliranom vodom.

Priprema otopine HCl (c(HCl)=0,1 mol/dm³)

Za pripremu otopine klorovodične kiseline množinske koncentracije 0,1 mol/dm³ potrebno je u odmjernu tikvicu od 250 mL dodati 2,0877 mL koncentrirane klorovodične kiseline (w=37%) te nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake s destiliranom vodom. Potreban volumen koncentrirane klorovodične kiseline dobiven je računom kako slijedi:

$$c(\text{konc. HCl}) = \frac{\rho \cdot w}{M} = \frac{1180 \text{ g/dm}^3 \cdot 0,37}{36,458 \text{ g/mol}} = 11,975 \text{ mol/dm}^3 \quad (2)$$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{0,1 \text{ mol/dm}^3 \cdot 0,25 \text{ dm}^3}{11,975 \text{ mol/dm}^3} = 2,0877 \text{ mL} \quad (3).$$

3.4. Postupak

Nakon što su pripremljene sve potrebne otopine, može krenuti priprema otopina za kalibraciju. Postupak je proveden na temelju rada U. Tinggi et al. iz 1992. godine [17]. U epruvetu se doda 0,5 mL standardne otopine selenija ($\gamma(\text{Se})=0,001 \text{ g/L}$), 1 mL otopine EDTA-HONH₂·HCl te jedna kap metiloranža. Zatim se kap po kap dodaje 25%-tna otopina amonijaka do pojave žute boje, a nakon toga kap po kap otopine klorovodične kiseline ($c(\text{HCl})=1 \text{ mol/dm}^3$) do pojave ružičastog obojenja (pH vrijednost iznosi približno 3, što se provjerava univerzalnim indikatorskim papirom). Zatim se doda 5 mL

pripremljene otopine DAN-a, epruveta se začepi i stavi na vortex (pH vrijednost je sada približno 2). Epruveta s takvom otopinom se stavi u vodenu kupelj 20 minuta na 60°C. Tijekom zagrijavanja stvara se kompleks Se(IV) s 2,3-diaminonaftalenom, piazselenol koji ima mogućnost fluorescencije. Slijedi hlađenje u ledenoj vodi, a nakon hlađenja se dodaje 5 mL cikloheksana, zatvori se te stavi na vortex 60 - 90 sekundi. Zatim se epruveta ostavi 5 minuta kako bi se slojevi mogli odvojiti i kreće se s punjenjem jažica za fluorimetriju. Jažice se pune cikloheksanom i gornjim slojem iz epruvete, dobivenim nakon opisanog postupka. U Tablici 2. dane su koncentracije i volumeni otopina korištenih za kalibraciju.

Tablica 2. Podaci o koncentracijama i volumenima otopina korištenih za kalibraciju.

Oznaka jažice	$\gamma(\text{Se})$ za kalibraciju / ng/mL	$V(\text{Se})$ nakon postupka / μL	$V(\text{cikloheksan})$ / μL	$\gamma(\text{Se})$ nakon postupka / ng/mL	$V(\text{jažica})$ / μL
1A	0	0	300	100	300
1B	10	30	270	100	300
1C	20	60	240	100	300
1D	30	90	210	100	300
1E	40	120	180	100	300
1F	50	150	150	100	300
1G	60	180	120	100	300
1H	70	210	90	100	300

Kada su jažice popunjene, provodi se mjerenje fluorescencijskog intenziteta u modularnom čitaču mikrotitar pločica. Prije samog mjerenja na uređaju treba postaviti optimalno pojačanje signala koje iznosi 70. Valna duljina ekscitacije se postavi na 360 nm (uređaj mjeri ± 50 nm) jer je ona najveća pri 382 nm, a za emisiju se postavi na 530 nm jer je ona najveća pri 522 nm. Osim mjerenja fluorescencijskih intenziteta otopina za kalibracijski pravac, također se mjere intenziteti fluorescencije otopina triju različitih masenih koncentracija selenija kako bi se utvrdila točnost mjerenja. Ta mjerenja se provode pri istim uvjetima, a podaci o korištenim otopinama nalaze se u Tablici 3.

Tablica 3. Podaci o koncentracijama i volumenima otopina korištenih za utvrđivanje točnosti mjerenja.

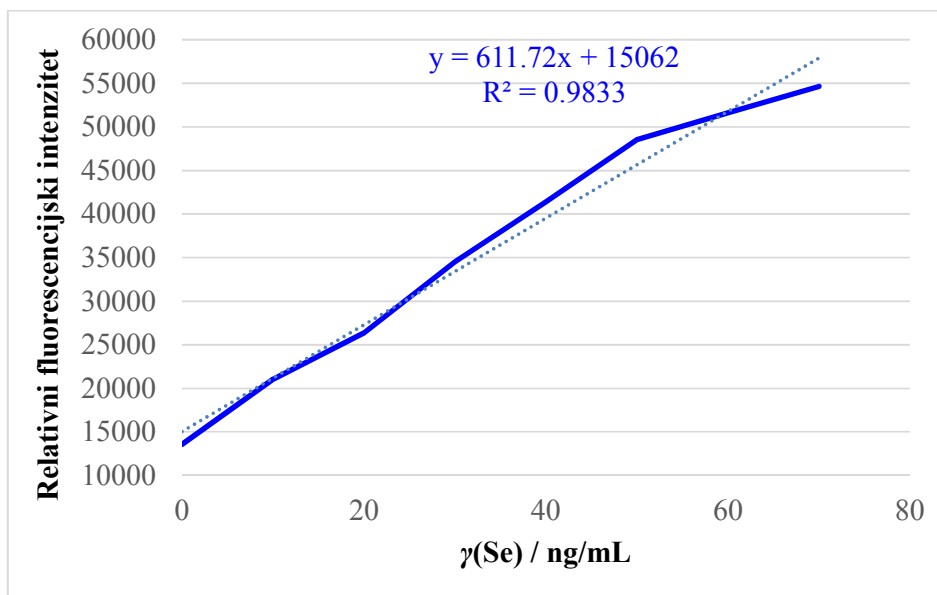
Oznaka jažice	V(Se) nakon postupka / μL	V(cikloheksan) / μL	$\gamma(\text{Se})$ nakon postupka / ng/mL	V(jažica) / μL
2A, 2B, 2C	50	250	100	300
2D, 2E, 2F	100	200	100	300
2G, 2H, 3A	170	130	100	300

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvi rezultati dobiveni mjerenjem fluorescencijskog intenziteta su podaci za kalibracijsku krivulju. Za mjerenje je korišteno osam otopina različitih koncentracija, a rezultati su prikazani u Tablici 4. Kalibracijska krivulja je dobivena uvrštavanjem vrijednosti masene koncentracije selenija na x os te odgovarajućih vrijednosti fluorescencijskog intenziteta na y os (Slika 7.).

Tablica 4. Podaci o fluorescencijskom intenzitetu uzoraka korištenih za dobivanje kalibracijske krivulje.

Oznaka jažice	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H
$\gamma(\text{Se})$ nakon postupka / ng/mL	0	10	20	30	40	50	60	70
Fluorescencijski intenzitet	13559	21064	26388	34529	41411	48535	51628	54659



Slika 7. Kalibracijska krivulja dobivena prema podacima iz Tablice 4.

Iz Slike 7. vidljivo je da je kalibracijska krivulja linearna. Kako se masena koncentracija selenija povećava odnos je i dalje linearan, ali pravac mijenja nagib. To se može objasniti činjenicom kako se pri većim koncentracijama selenija kompleks Se-DAN, kojeg se promatra pri mjerenjima, raspada te više ne daje jednak odnos koncentracije i fluorescencijskog intenziteta. Jednadžba dobivenog pravca je:

$$y=611,72x+15062 \quad (4)$$

a vrijednost R^2 iznosi 0,9833. Vrijednost R^2 u linearnoj regresiji predstavlja koeficijent determinacije, odnosno predstavlja omjer protumačenih i ukupnih odstupanja, a što je bliži 1 to je model reprezentativniji. U Tablici 5. prikazane su vrijednosti dobivene mjerenjem fluorescencijskih intenziteta tri različite otopine selenija, kojima se provjeravala koncentracija odnosno točnost određivanja koncentracije selenija.

Tablica 5. Podaci o fluorescencijskom intenzitetu za otopine selenija različitih koncentracija.

Oznaka jažice	V(Se) nakon postupka / μL	$\gamma(\text{Se})$ / ng/mL	Fluorescencijski intenzitet
2A	50	16,67	26630
2B	50	16,67	25873
2C	50	16,67	25831
2D	100	33,33	36010
2E	100	33,33	35370
2F	100	33,33	35507
2G	170	56,67	53007
2H	170	56,67	52206
3A	170	56,67	53822

Prema dobivenoj jednadžbi pravca (4) izračunate su vrijednosti x , koje predstavljaju koncentracije selenija u ispitivanim otopinama, kako slijedi:

$$x = \frac{y-15062}{611,72} \quad (5).$$

Također je izračunata greška u mjerenju prema formuli (6), a svi dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 6.

$$\%_{greška} = \left| \left(\frac{x}{x_{teor.}} - 1 \right) * 100 \right| \quad (6).$$

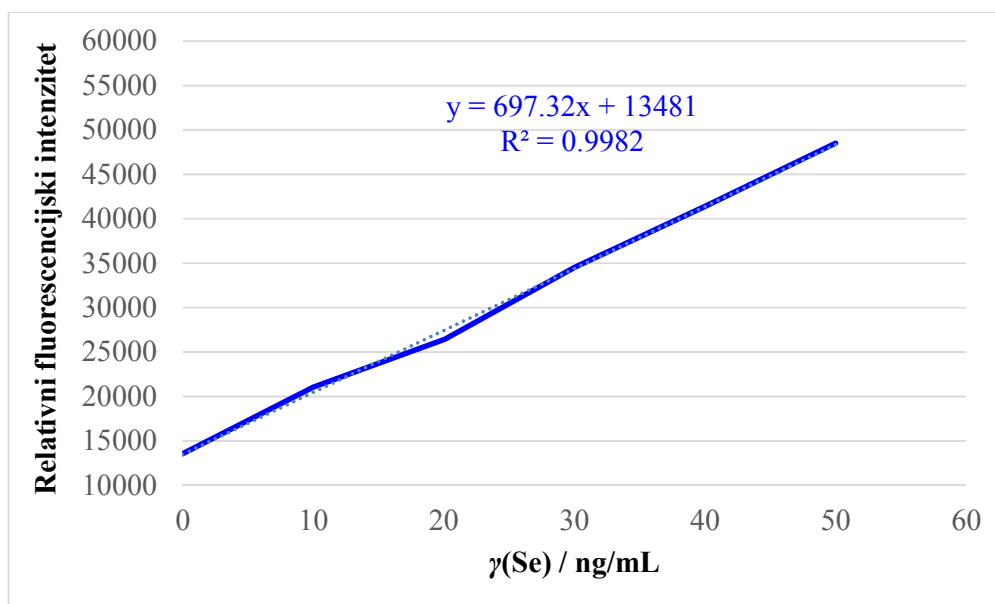
Tablica 6. Vrijednosti masenih koncentracija (x) te grešaka u mjerenju prema izračunu iz formula (5) i (6).

y	x	$x_{teor.}$	Greška u mjerenju / %
26630	18,91061	16,67	13,44
25873	17,67312	16,67	6,02
25831	17,60446	16,67	5,61
36010	34,24443	33,33	2,74
35370	33,1982	33,33	0,40
35507	33,42215	33,33	0,28
53007	62,03001	56,67	9,46
52206	60,72059	56,67	7,15
53822	63,36232	56,67	11,81

Kako bi se dobili precizniji podaci o masenim koncentracijama selenija u otopinama, pri izradi kalibracijskog pravca zanemarene su dobivene vrijednosti fluorescencijskih intenziteta pri masenim koncentracijama većim od 50 ng/mL s obzirom da se pri većim koncentracijama smanjio nagib pravca. Tim postupkom dobiven je novi kalibracijski pravac (Slika 8.) s novom jednažbom:

$$y=697,32x+13481 \quad (7).$$

Vrijednost R^2 ovog pravca iznosi 0,9982 iz čega je vidljivo kako je ovaj model reprezentativniji od prethodnog te da postoji manje odstupanja. Osim iz vrijednosti R^2 , i iz podataka o greškama u mjerenju vidljivo je kako je drugi model reprezentativniji jer su greške manje nego pri računanju vrijednosti x iz jednažbe pravca sa Slike 7.



Slika 8. Kalibracijski pravac s užim koncentracijskim područjem selenija.

U Tablici 7. prikazani su podaci o vrijednostima x , koje predstavljaju masene koncentracije selenija u otopinama, a dobiveni su izračunom prema formuli (8) te su također navedeni podaci o greškama u mjerenju dobiveni izračunom prema formuli (6).

$$x = \frac{y-13481}{697,32} \quad (8)$$

Tablica 7. Vrijednosti masenih koncentracija (x) te grešaka u mjerenju prema izračunu iz formula (8) i (6).

y	x	$x_{\text{teor.}}$	Greška u mjerenju / %
26630	18,85648	16,67	13,12
25873	17,77089	16,67	6,60
25831	17,71066	16,67	6,24
36010	32,30798	33,33	3,07
35370	31,39018	33,33	5,82
35507	31,58665	33,33	5,23
53007	56,68273	56,67	0,02
52206	55,53404	56,67	2,00
53822	57,85149	56,67	2,08

S obzirom da je greška od 13,12% dobivena samo pri jednom od tri ponovljena mjerenja te da značajno odstupa od druga dva mjerenja, može se zaključiti da je došlo do pogreške pri punjenju jažice te se taj podatak može odbaciti.

5. ZAKLJUČAK

Selenij je metaloidni element čija su razna svojstva, a najviše ona povezana s vođenjem električne struje, razlog njegovoj primjeni u raznim industrijskim granama. On je također esencijalni mikroelement u ljudskom tijelu, a njegov manjak ili pretjerani višak mogu uzrokovati razne zdravstvene probleme.

U ovom radu opisana je fluorescentna spektrometrija kao metoda određivanja selenija te je određivana masena koncentracija selenija u tri različite otopine. Ta metoda se temelji na svojstvu fluorescencije kojeg selenij kao element ne posjeduje. Kako bi se uspio mjeriti fluorescencijski intenzitet, selenij je kompleksiran s 2,3-diaminonaftalenom.

Nakon mjerenja, dobiveni su podaci o fluorescencijskom intenzitetu te je nacrtan kalibracijski pravac, iz čije jednadžbe su izračunati podaci o masenim koncentracijama selenija u otopinama čije su se koncentracije provjeravale. Nakon modifikacije pravca, izračunati su isti podaci, ali prema novoj jednadžbi pravca. Postotak greške je u prosjeku za sva mjerenja manji od 5%, iz čega se može zaključiti kako je 2,3-diaminonaftalen pogodan reagens za određivanje selenija u otopinama fluorescentnom spektrometrijom.

6. LITERATURA

1. J. Trofast, *Berzelius' Discovery of Selenium*, Chemistry International, IUPAC, Vol.33, No.5, 2011.
2. *Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Urednik: V.R. Preedy, Food & Nutritional Components in Focus, No 9, The Royal Society of Chemistry, 2015.
3. Royal Society of Chemistry, <http://www.rsc.org/news-events/features/2017/aug/200-years-selenium-research/>, (pristup 14. srpnja 2018.)
4. Nature chemistry, <https://www.nature.com/articles/nchem.1076>, (pristup 16. srpnja 2018.)
5. Chemistry LibreTexts Library, [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/2_p-Block_Elements/Group_16%3A_The_Oxygen_Family_\(The_Chalcogens\)/Z%3D034_Chemistry_of_Selenium_\(Z%3D34\)](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/2_p-Block_Elements/Group_16%3A_The_Oxygen_Family_(The_Chalcogens)/Z%3D034_Chemistry_of_Selenium_(Z%3D34)), (pristup 13. srpnja 2018.)
6. Wonder Whizkids, https://www.wonderwhizkids.com/images/content/chemistry/metals_and_non_metals/overview/conceptmap/Metalloids.html, (pristup 14. srpnja 2018.)
7. Chemistry explained, <http://www.chemistryexplained.com/elements/P-T/Selenium.html>, (pristup 14. srpnja 2018.)
8. Jefferson Lab, <https://education.jlab.org/itselemental/ele034.html>, (pristup 13. srpnja 2018.)
9. T. M. T. Sheehan, D. J. Halls, *Measurement of selenium in clinical specimens*, Ann. Clin. Biochem. 36 (1999) 301-315.
10. K. L. Cheng, *Determination of Traces of Selenium, 3,3'-Diaminobenzidine as Selenium(IV) Organic Reagent*, Analytical Chemistry 28 (1956) 1738-1742.
11. K. Johansson, Ö. Andersson, Å. Olin, *New Spectrofluorimetric Reagent, 2,3-Diamino-1,4-dibromonaphthalene, for the Determination of Selenium in Biological Materials*, Analyst 120 (1995) 423-429.
12. P. F. Lott, P. Cukor, G. Moriber, J. Solga, *2,3-Diaminonaphthalene as a Reagent for the Determination of Milligram to Submicrogram Amounts of Selenium*, Analytical Chemistry 35 (1963) 1159-1163.
13. P. Cukor, P. F. Lott, *The Kinetics of the Reaction of Selenium (IV) with 2,3-Diaminonaphthalene*, The Journal of Physical Chemistry 69 (1965) 3232-3239.

14. R. F. Bayfield, L. F. Romalis, *pH Control in the Fluorometric Assay for Selenium with 2,3-Diaminonaphthalene*, *Analytical Biochemistry* 144 (1985) 569-576.
15. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, 585-593, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
16. P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 8th Edition, Oxford University Press, 492-494, 2006.
17. U. Tinggi, C. Reilly, C. M. Patterson, *Determination of Selenium in Foodstuffs Using Spectrofluorometry and Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, *Journal of Food Composition and Analysis* 5 (1992) 269-280.