

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ СЕЛЕН ВО ВЕТЕРИНАРНИ ПРЕПАРАТИ СО ДЕРИВАТИВНА UV-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈА

DETERMINATION OF SELENIUM IN VETERINARIAN DRUGS USING DERIVATIVE UV-SPECTROSCOPY

Горан Стојковиќ¹, Верка Серафимовска², Богдан Богданов¹
 Goran Stojkovic¹, Verka Serafimovska², Bogdan Bogdanov¹

¹ Институт за хемија, Природно-математички факултет, Скопје, Република Македонија

² Ветеринарен Институт, Скопје, Република Македонија

¹ Institute of Chemistry, Faculty of Science, Skopje, Republic of Macedonia

² Veterinary Institute, Skopje, Republic of Macedonia

Прифатен (Accepted): Декември (December) 1996

Опишани се методи за определување селен(IV) како Se-DAB комплекс во ветеринарните препарати евитаселен и промтселен со помош на UV-VIS спектрофотометрија и деривативна спектроскопија преку мерење на амплитудата на негативниот пик ¹D₃₆₀ во водена средина и толуен (евитаселен) и амплитудата на негативниот пик ¹D₄₅₄ во толуен (промтселен). Валидноста на методите е проверена со HG-AAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry).

Клучни зборови: селен, ветеринарни препарати, деривативна UV-спектрофотометрија

Methods for determination of selenium (IV) in a form of Se-DAB complex in the veterinarian drugs evitaselen and promtselen with UV-VIS spectrophotometrics and derivative spectroscopy by measurement of the amplitude of the negative peak ¹D₃₆₀ in water solution and in toluen (evitaselen) and the amplitude of the negative peak ¹D₄₅₄ in toluen (promtselen) are described. The validity of the methods was established using HG-AAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry).

Key words: selenium, veterinarian drugs, derivative UV-spectroscopy

ВОВЕД

Важната улога што ја има селенот во живите системи стана широко призната во последните 30 год.(1-7). Докажано е дека е есенцијален микроелемент потребен во исхраната во количества помали од 1 ppm и е потенцијална заштита против неколку дегенеративни болести. Во тие спаѓаат некрозите на црниот дроб (кај свињите), дегенерации на панкреасот (кај кокошки и мисирки), репродуктивни недостатоци (ембрионска дегенерација кај овците и дегенерација на спермата кај овните), мускулна дистрофија кај говедата, козите, свињите, живината(8).

Сиромашната содржина на селен во почвата води кон тоа добиточната храна да содржи помалку од 0.1 ppm селен. Методите за борба со

INTRODUCTION

The important role of selenium for human and animal health has been widely recognized in the last 30 years(1-7). It has been proved that it is an essential microelement in nutrition in quantities smaller than 1 ppm and a potential protection against several degenerative diseases.

For example: necrosis of the liver (in pigs); degeneration of the pancreas (in chicken and turkeys); reproductive shortages (embryo degeneration in sheep and degeneration of the sperm in rams); nutritive muscle distrophy in cattle, dears, pigs and poultry (8).

The shortage of selenium in the soil leads to poor nutrition of the cattle when the food contains less than

недостигот на селен се востановени како примена на натриумселенит или натриумселенат во почвата заедно со суперфосфатните ѓубриња (Финска и Нов Зеланд) или директна примена кај животните.

Директната диетална примена се изведува на еден од следниве три начини :

(i) натриум селенит или натриум селенат се додава на водата за пиење.

(ii) Тешки пелети (апчиња) кои содржат збиена смеса од елементарен селен (3 g) и полнител од железо (27 g), и кои се даваат орално на преживари. Имено, пелетите, откриени во Австралија, ослободуваат селен во текот на 3 години.

(iii) Растворливи стаклени перли (откриени во Англија) или осмотски пумпи (во САД) кои може да се сместат во желудникот; и двата система обезбедуваат адекватно снабдување со селен за околу 5 месеци.

Како превенција и терапија во случај на заболувања се користат витаминско-минерални препарати што содржат селен во облик на селенити или селенати.

Начелно, изворите на селен кои се користат се обично водата (главно како селенити и селенати), животинските (селеноцистеин) и растителните (селенометионин) селенопротеини.

Селен е откриен во два важни ензими (кај цицачите) кои како активен дел содржат остаток на селеноцистеин врзан за полипептидни вериги :

(i) Глутатион пероксидаза (Se-GPx) која го катализира разложувањето на пероксидите и

(ii) јодотирониндејодиназа (I-D) кој го создава тироидниот хормон 3,5,3'-тријодотиронин (T3), основен за регулирање на метаболизмот.

Присуството на селенот во овие ензими може да објасни многу биолошки функции на Se.

Метаболизмот на селенот се претпоставува дека го следи патот на метаболизмот на сулфурот. Претпоставката е потврдена со демонстрацијата дека растенијата и бактериите го метаболираат неорганскиот селен во селеноаминокиселини како што е селенометионин (животните се неспособни да синтетизираат селенометионин директно од неорганскиот селен), за кој е пронајдено дека е супстрат за ензимите кои користат метионин. Уште повеќе, SeAM (селенаминометилаза) е подобар метил донор отколку SAM (сулфураминометилаза) кај цицачите.

0.1 ppm selenium. The shortage of selenium is compensated for by the use of sodium selenite, or even better, with sodium selenate together with superphosphate fertilizers (in Finland and New Zealand) or with direct feeding of the animals.

The direct feeding may be applied in three ways:

i) Sodium selenite or sodium selenate is added to the drinking water;

ii) With heavy pellets (tablets) containing an amalgam of pure selenium (3 g) and iron (27 g) which are given orally to ruminants. The pellets, invented in Australia, release the selenium for 3 years;

iii) With dissoluble glass pearls (invented in England) or osmotic pumps (invented in USA) which can be put in the stomach. Both methods insure adequate input of selenium in a period of approximately 5 months.

Preventive therapy in the case of some of the diseases mentioned consists of application of vitamin-mineral drugs which have selenium in the form of selenites or selenates.

Basically, the usual selenium sources are water (with selenites and selenates), and animal (selenocystein) and herbal (selenomethionin) selenoproteins.

Selenium is found in two important mammal enzymes which have an active part that consists of selenocystein connected to the polypeptide chains:

i) Glutathione peroxidase (Se-GPx), which catalyses the dissolution of peroxides and

ii) iodothyronine-deiodinase (I-D), which creates the thyroid hormone, 3, 5, 3' - triiodothyronine (T3), essential for the regulation of the metabolism.

The presence of selenium in these enzymes explains its various biological functions.

The metabolism of selenium is hypothetically the same as the metabolism of sulfur. This is proved with the observation that plants and bacterium metabolate the anorganic selenium in selenoaminoacids like selenomethionin, which animals are incapable of synthesizing. Also, the selenaminomethylase SeAM is a better methyl donor than sulphuraminomethylase SAM in mammals.

Дозволените количества селен во комплетната исхрана се разликуваат од земја до земја : 0.1 ppm во Канада , 0.3 ppm во САД , 0.5 ppm во Велика Британија.

Поради потребите на селен како есенцијален микроелемент, како и поради неговата ниска токсична доза кај домашните животни од 3 ppm (8), контролата на квалитетот на ветеринарните препарати што содржат селен претставува прв чекор во нивната примена.

Опишани се повеќе инструментални методи за определување селен: спектрофотометриски со 3,3'-диаминобензидин (9,10), флуориметриски со 2,3-диаминонафтален (11), спектрофотометриски со 4-нитро-1,2-диаминобензен (12), каталитичка метода со метиленско сино (13).

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Испитани се препаратите:

ЕВИТАСЕЛЕН од Галеника, Белград-Земун
1 ml раствор содржи 20 mg токоферолацетат (вит. Е) и 0,5 mg натриум селенит

ПРОМТСЕЛЕН од Ветеринарски завод "Суботица", Суботица

состав: 1 ml раствор содржи 50000 I.E. ретинол (вит. А), 25000 I.E. холекалциферол (вит. D3), 20 mg токоферол (вит. Е) и 0,5 mg селен во облик на натриум селенит

АПАРАТУРА

Atomic Absorption Spectrophotometer Perkin Elmer 1100 B

Mercury Hydride System MHS 10

Hewlett Packard Model 8452A Diode Array UV-visible Spectrophotometer

селенова катодна ламба

кварцна кивета од 1 cm

За обработка и деривација на UV-VIS спектри е користен програмот Grams 386 Version 2.02 , Galactic Industries Corporation

За обработка на експерименталните податоци е користен компјутерски програм Excel Version 7.0 , Microsoft Corporation

РЕАГЕНСИ

3,3'-диаминобензидин (DAB), 0,5 % раствор во 0,1 moldm⁻³ HCl

мравја киселина, 2,5 moldm⁻³

амониум хидроксид,

The permitted quantities of selenium in the diet differ from country to country: 0.1 ppm in Canada, 0.3 ppm in USA and 0.5 ppm in Great Britain.

Because of the essential role of selenium as a microelement and because its level of toxicity is 3 ppm (8), control of the quality of the veterinarian drugs containing selenium is necessary before they are used.

Several instrumental methods for determining the presence of selenium are described below: spectrophotometric with 3,3'-diaminobenzidine (9, 10); fluorometric with 2,3-diaminonaphthalene (11); spectrophotometric with 4-nitro-1,2-diaminobenzene (12) and the catalytic method with methylen blue (13).

MATERIALS AND METHODS

The following drugs were tested:

EVITASELEN from "Galenika", Belgrade-Zemun
1 ml solution contains 20 mg tocopherolacetate (vitamin E) and 0,5 mg sodium selenite

PROMTSELEN from the "Subotica" Veterinarian institute, Subotica

1 ml solution contains 50000 I.E. retinol (vitamin A), 25000 I.E. holecalfiferol (vitamin D3), 20 mg tocopherole (vitamin E) i 0,5 mg selenium in the form of sodium selenite.

EQUIPMENT

Hewlett Packard Model 8452A Diode Array UV-visible Spectrophotometer

Atomic Absorption Spectrophotometer Perkin Elmer 1100 B

Mercury Hydride System MHS 10

selenium hollow cathode lamp

quartz cells 1 cm

For the derivation of the UV-VIS spectrum, the Grams / 386 Version 2.02 program, Galactic Industries Corporation was used.

For the processing of the data from the experiment the computer Excel Version 7.0 program, Microsoft Corporation was used.

REAGENTS

3,3'-diaminobenzidine (DAB), 0.5 % solution in 0.1 moldm⁻³ HCl;

formic acid, 2.5 moldm⁻³;

ammonium hydroxide;

натриум сулфат, анхидриран,
толуен,
азотна киселина, концентрирана,
хлороводородна киселина, концентрирана,
дејонизирана вода.

Стандарден раствор од селен, $\gamma=100 \mu\text{g/ml}$ (0,219 g натриум селенит се мери и се суши 30 минути на 110°C , се мери и се раствора во одмерна колба од 100 ml) работен стандарден раствор со $\gamma=10 \mu\text{g/ml}$ се приготвува со разредување.

ПРОБА

5 ml евитаселен се пипетираат во одмерна колба од 50 ml и се дополнува со дејонизирана вода.

5 ml промтселен се пипетираат во одмерна колба од 100 ml и се дополнува со дејонизирана вода.

МЕТОДА А

Во одмерна колба од 50 ml се пипетира определен волумен проба, кој содржи од 0,2 до 5 μg селен, се додаваат 1 ml мравја киселина и 1 ml 0,5 % раствор диаминобензидин (DAB), се дополнува и се остава на темно 40-45 минути. Потоа се спектрофотометрира во подрачје од 190 до 820 nm.

МЕТОДА Б

Во одмерна колба од 100 ml се пипетира определен волумен проба, кој содржи од 10 до 80 μg селен, се додаваат 50 ml вода, 2 ml мравја киселина и 2 ml 0,5 % раствор диаминобензидин и се остава на темно 40-45 минути. Потоа се додава амониум хидроксид до приближно неутрална средина ($\text{pH} = 6-7$) и растворот се префрла во одделителна инка од каде што се врши екстракција со точно 10 ml толуен. Се додава малку анхидриран натриум сулфат за да се раздвојат двата слоја. Водениот слој се отстранува. На толуенскиот слој се додава малку анхидриран натриумсулфат и се филтрира. Потоа се спектрофотометрира во подрачје од 190 до 820 nm.

Валидизација на методата е извршена со модифицираната метода /14/. Определувањето е извршено со пламена AAS, користејќи MHS-10 (Mercury Hydride System), редуценс 3 % NaBH_4 во 1% NaOH, ацетилен (8 l/min)-воздух (3,4 l/min),

sodium sulfate, anhydride;
toluen;
concentrated nitrogen acid;
concentrated hydrochloric acid;
deionized water.

A stock solution of selenium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.219 g sodium selenite is measured and dried for 30 minutes at 110°C , then measured and dissolved in a 100 ml volumetric flask with deionized water). A standard solution contains 10 $\mu\text{g/ml}$ selenium prepared by diluting the stock solution.

SAMPLE

5 ml evitaselen is pipetted in a 50 ml volumetric flask and diluted to volume with deionized water.

5 ml promtselen is pipetted in a 100 ml volumetric flask and diluted to volume with deionized water.

METHOD A

In a 50 ml volumetric flask a sample that contains 0.2 to 5 μg selenium is pipetted, 1 ml formic acid and 1 ml 0.5 % diaminobenzidine (DAB) solution is added, diluted with water and left in a dark place for 40-45 minutes. Then it is measured with the spectrophotometer in the wavelength range of 190 to 820 nm.

METHOD B

In a 100 ml volumetric flask a sample that contains 10 to 80 μg selenium is pipetted, 50 ml water, 2 ml formic acid and 2 ml 0.5 % diaminobenzidine (DAB) solution is added, and it is left in a dark place for 40-45 minutes. Then ammonium hydroxide is added to approximately $\text{pH} = 6-7$ and the solution is transferred to a separation funnel from which an extraction with exactly 10 ml toluen is made. A little anhydride sodium sulfate is added and the solution is left until two layers appear. The water layer is then removed. A little anhydride sodium sulfate is added to the toluen layer and the whole solution is filtrated. Then it is measured with the spectrophotometer in the wavelength range of 190 to 820 nm.

The validity of the method was established using the modified method (14), using flame AAS, with MHS-10 (Mercury Hydride System), reductant 3 % NaBH_4 in 1% NaOH, acetylene (8 l/min)-air (3,4 l/min), lamp energy 11 mA, wavelength 196 nm, slit 2,0 nm.

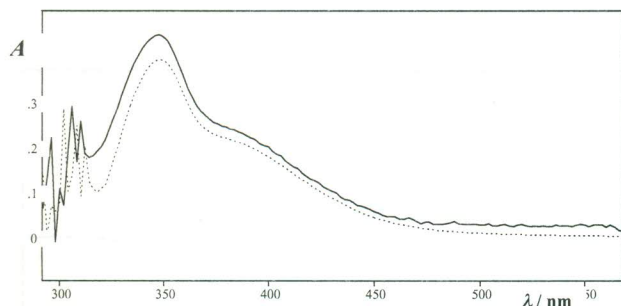
енергија на ламба 11 mA, $\lambda = 196 \text{ nm}$, процеп 2,0 nm.

Стандарден раствор од Se (1 mg/ml) е приготвен со растворање на метален селен (99,99 %) во малку HNO_3 и дополнување со 10 % (V/V). Концентрациско подрачје е од 0,02 до 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Препаратите се влажно минерализирани : на 2,5 ml евитаселен (промтселен), се додаваат 2,5 ml конц. HNO_3 , 5 ml H_2O и се загрева околу 5 часа на водена бања. Потоа се филтрира и филтратот се собира во одмерна колба од 25 ml.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Формираниот Se-DAB комплекс (пиазоселен) во водена средина има максимум на апсорпција на 348 nm (сл.1). Со цел да се избегнат можните интерференции помеѓу апсорбанците на пиазоселенот и витаминот E (кој апсорбира во подрачје околу 300 nm) направена е деривација на спектрите (сл. 2).

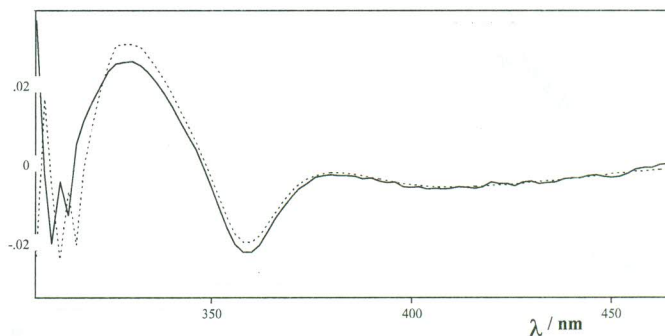


Сл.1. - UV-VIS спектри на Se-DAB комплексите од стандардот со $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и од евитаселенот разреден 100 пати (полна линија)

Figure 1. - UV-VIS spectra of the Se-DAB complexes from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the evitaselen diluted 100 times (solid line)

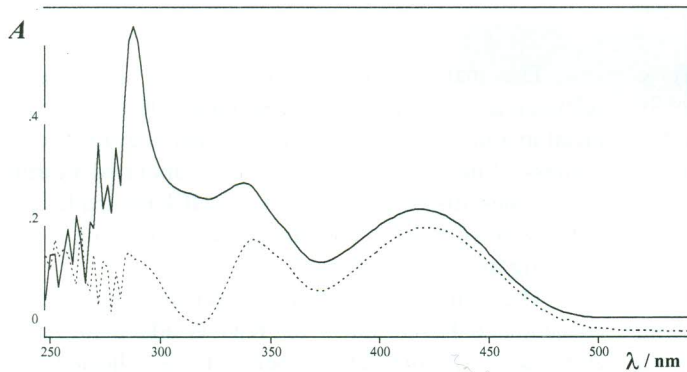
Сл.2. - Прв извод од спектрите на пиазоселените од стандардот со $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и од евитаселенот разреден 100 пати (полна линија)

Figure 2. - First order of the derivative UV spectra of the Se-DAB complexes from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the evitaselen diluted 100 times (solid line)



RESULTS AND DISCUSSION

The Se-DAB complex (piazoselenol) in the water solution has a maximum absorbency on a wavelength of 348 nm (fig. 1). In order to evade possible interference between the absorbency of piazoselenol and vitamin E (which is absorbed in the range of approximately 300 nm), a derivation of the spectrum was made (fig. 2).



Сл.3. - Спектри на пиасоселенолите (во толуен) од стандардот со $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и од евитаселенот разреден 100 пати (полна линија)

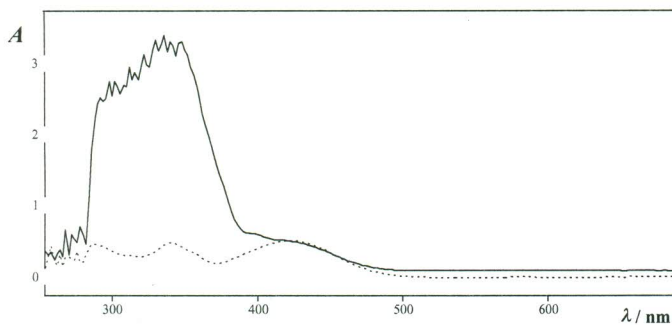
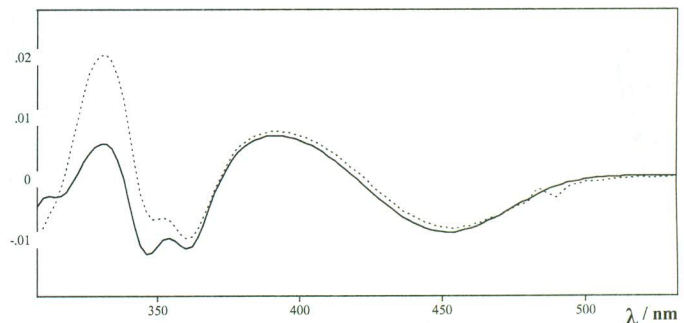
Figure 3. - UV-VIS spectra of the Se-DAB complexes (in toluen) from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the evitaselen diluted 100 times (solid line)

Од сл. 3 се забележува дека пикот на 286 nm кој е јасно изразен кај стандардот, во пробата е препокриен со пикот кој се јавува како резултат на апсорпција на витаминот E, така што не може да се примени за квантитативно определување на селенот. За пикот на 342 nm кај пробата не може со сигурност да се тврди дали интерферира со пикот од витаминот E. Тоа можеме да утврдиме со деривативниот сигнал на 360 nm $^1D_{360}$ (сл. 4). Спектралната анализа покажува дека единствено пикот на 422 nm е толку дефиниран, што може да се примени за квантитативно определување на селенот во евитаселенот, односно сигналот $^1D_{454}$ кај деривираниот спектар.

The peak of the standard solution on wavelength 286 nm is covered with the peak of the vitamin E in the sample (fig. 3), so it cannot be used for a quantitative determination of selenium. It cannot be determined whether the peak at 342 nm in the sample is interfering with the peak of vitamin E. It can only be determined with the derivative signal at 360 nm $^1D_{360}$ (fig. 4). The spectral analysis shows that only the peak at 422 nm is sufficiently defined for quantitative determination of the selenium in the evitaselen, respectively the signal $^1D_{454}$ in the derivative spectrum.

Сл.4. - Прв извод од спектрите на пиасоселенолите (во толуен) од стандардот со $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и од евитаселенот разреден 100 пати (полна линија)

Figure 4. - First order of the derivative UV spectra of the Se-DAB complexes (in toluen) from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=2 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the evitaselen diluted 100 times (solid line)



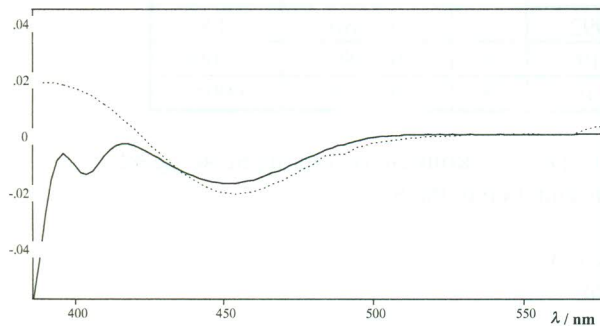
Сл.5. - Спектри на пиасоселенолите (во толуен) од стандард со $\gamma(\text{Se})=5 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и од промтселен разреден 100 пати (полна линија)

Figure 5. - UV-VIS spectra of the Se-DAB complexes (in toluen) from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=5 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the promtselen diluted 100 times (solid line)

Поради голема апсорпција на самата проба, на спектарот (сл. 5) не се забележува пикот од комплексот Se-DAB кој би требало да се јави на 422 nm.

По извршената деривација на спектрите се издвојува пикот на амплитудата на 454 nm, односно се елиминираат страничните интерференции (сл. 6,7).

Because of the absorbency of the sample in the spectrum (fig. 5), the peak of the Se-DAB complex which should appear at 422 nm cannot be observed. After the derivation of the spectra the peak of amplitude at 454 nm is differentiated. (fig. 6 and 7).

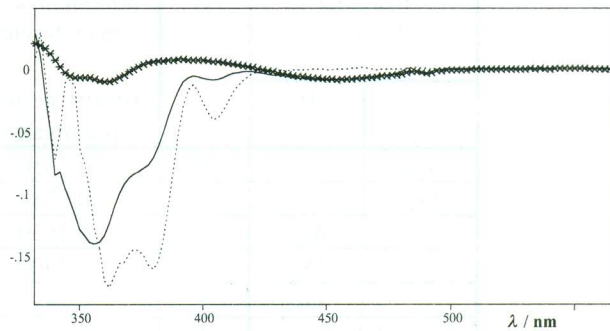


Сл.6. - Прв извод на спектрите на пиазоселенолите (во толуен) од стандард со $\gamma(\text{Se})=5 \mu\text{g/ml}$ (испрекината линија) и промтселен разреден 100 пати (полна линија)

Figure 6. - First order of the derivative UV spectra of the Se-DAB complexes (in toluen) from the standard solution of $\gamma(\text{Se})=5 \mu\text{g/ml}$ (broken line) and from the promtselen diluted 100 times (solid line)

Сл. 7. - Прв извод на спектрите : промтселен 1:200 (испрекината линија); промтселен + ДАБ (полна линија) и стандард + ДАБ (* линија)

Figure 7. - First order of the derivative UV spectra : of the promtselen diluted 200 times (broken line); of the Se-DAB complex (in toluen) from the promtselen (solid line) and of the Se-DAB complex from the standard solution (* line)



Добиена е висока корелација помеѓу концентрација на Se и вредноста на апсорбанцата односно деривативниот сигнал за одбрана бранова должина во испитуваното концентрациско подрачје.

Linear correlation was obtained between the concentration of Se and the value of the absorbency and the derivative signal of the selected wavelength in the observed range of concentration.

Таб. 1. - Равенки на калибрациона права за одбраниот сигнал
Table 1. - Equations of the Calibration Curve of the Selected Signal.

Метода Method		равенка на калибрациона права * equations of the calibration curve *	n	r	S _{y,x}
A	Б				
A ₃₄₈		$y = 0,18348 x + 0,01475$	7	0,9990	0,0177
¹ D ₃₆₀		$y = 0,00966 x + 0,00050$	7	0,9989	0,0010
	A ₄₂₂	$y = 0,10314 x - 0,03835$	5	0,9996	0,0088
	¹ D ₃₆₀	$y = 0,005158 x - 0,00092$	5	0,9986	0,0008
	¹ D ₄₅₄	$y = 0,00441 x - 0,00119$	5	0,9989	0,0006
AAS		$y = 27,88776 x + 0,0246$	3	0,9999	0,0050

* y - вредноста на апсорбанцата A_λ или изместувањето D_λ ; x - концентрација на Se во μg/ml

* y - values of the absorbance A_λ or the shift of ¹D_λ ; x - concentration of the Se in μg/ml

Таб. 2. - Концентрација на Se во евитаселен и промтселен
Table 2. - Concentration of the Se in evitaselen and promtselen

Метода Method		N	γ(Se) / mgml ⁻¹ во евитаселен in evitaselen (промтселен)* (promtselen)*	S.D.	F-тест	t-тест
A	Б				Fp #	t #
A ₃₄₈		5	0,2650	0,0606	4,718	0,398
¹ D ₃₆₀		5	0,2715	0,0688	6,064	0,181
	A ₄₂₂	5	0,2530	0,0412	2,179	1,040
	¹ D ₃₆₀	5	0,2607	0,0387	1,923	0,756
	¹ D ₄₅₄	5	0,2417	0,0285	1,038	1,923
AAS		4	0,2782	0,0279		
	A ₄₂₂	5	0,5511 *	0,1173	2,391	0,935
	¹ D ₄₅₄	5	0,4846 *	0,0926	1,488	0,157
AAS		5	0,4930 *	0,0758		

- F и t вредности се пресметани во однос на компаративна метода (AAS)

- F and t values calculated in relation to the comparative method (AAS)

ЗАКЛУЧОК

Вредностите за концентрација на селен добиени преку деривативната спектроскопија имаат пониски стандардни девијации во споредба со тие добиени преку апсорбанците, освен кај методата А. Пресметаните t вредности за t - тестот се помали од табличните за даден број мерења, t(7)=2.365 и t(8)=2.306 ; за статистичка веројатност p=95 %, што укажува дека не постои

CONCLUSION

The values of the concentration of selenium obtained with derivative spectroscopy have lower standard deviations in comparison with the same deviations obtained with absorbencies, except in method A. The calculated values for the t-test are lower than the table values for the same number of measurements, t(7)=2,365 and t(8)=2,306 for the statistical confidence p=95%, which indicates that there is no statistically

статистички значајна разлика на средните вредности за концентрација на селен кај опишани методи во споредба со компаративна метода.

Пресметаните вредности за F - тестот се помали од табличните за даден број мерења, $F(4,3)=9,117$ $F(4,4)=6,388$ за $p=0,05$, што укажува дека не постои статистички значајна разлика во прецизноста на опишаните методи во споредба со компаративната метода. Со оглед на тоа дека нема потреба од подготовка на пробата, или премногу софистицирана опрема, опишаната метода може да најде примена за квантитативно определување на селен во контролата на испитуваните препарати.

ЛИТЕРАТУРА

1. R.J. Shamberger. 1993. *Biochemistry of Selenium*; E. Freiden; *Plenum press*, New York
2. J.E. Oldfield. 1990. *Selenium: Its Uses in Agriculture, Nutrition and Health and Environment*, *Selenium-Tellurium Development Association publication*, *Selenium-Tellurium Development Association*, Inc. 301, Borgstraat B-1850 Grimbergen, Belgium.
- 3a. Subcommittee on Selenium: Committee on Animal Nutrition; National Research Council. *Selenium in Nutrition*. *National Academy Press*, Washington DC, 79 (1971)
- 3b. Subcommittee on Selenium: Committee on Animal Nutrition; National Research Council. *Selenium in Nutrition*, revised edition. *National Academy Press*, Washington DC, 174 (1983)
4. J.E. Spallholz, J.L. Martin, H.E. Ganther. 1981. *Selenium in Biology and Medicine*. AVI Pub. Co., Westport, CT 573.
5. J.F. Combs jr., J.E. Spallholz, O.A. Levander, J.E. Oldfield. 1987. *Selenium in Biology and Medicine*. (Part A & B) Van Nostrand, Reinhold Co. Inc. New York, NY, 1138.
6. E. Normann. 1985. *An Essential Trace Element*. *Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala, Sweden, 99.

significant difference of the mean values of the concentration of selenium in the described methods in comparison with the comparative method.

The calculated values of the F-test are lower than the table values for the respective number of measurements, $F(4,3)=9,117$, $F(4,4)=6,388$ for $p=0,05$, which indicates that there is no statistically significant difference in the precision of the described methods in comparison with AAS. Since there is no need of sample preparation or too sophisticated apparatus, the described method can be used for quantitative determination of selenium in controlling the drugs that are used.

REFERENCES

7. O.A. Levander. 1987. *Selenium*. *Environmental Health Criteria* 58, *World Health Organization*, Geneva, 306.
8. Чрчев Дино. 1991. Утицај дефицита селена на здравствено стање и репродуктивне способности коза, *Докторска дисертација*, Универзитет у Београду, Ветеринарски факултет, Београд.
9. Cummins L. M., Martin J. L., Maag D. D., 1965. An improved method for determination of selenium in biological material, *Anal. Chemistry*, 37, 430-431.
10. Jenik M., Madarik A., 1974. *Cesk. Hyg.* 19 (10), 465-9.
11. Lindberg P. 1968. Selenium determination in plant and animal material, and in water. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 23, pp. 1-41.
12. Stibilj V., Dermelj M., Franko M., Byrne A. R., 1994. Spectrophotometric determination of the chemical-yield in radiochemical neutron-activation analysis of selenium, *Analytical Sciences*, 10, Iss 5, pp 789-793.
13. Gokmen I. G., Abdelqader E., 1994. Determination of selenium in biological matrices using a kinetic catalytic method, *Analyst*, Vol 119, Iss 4, pp 703-8.
14. AOAC, Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium and Zinc in Human and Pet Foods, *AOAC International*, 1996.