

Количественное определение Se в волосах методом мицеллярной жидкостной хроматографии

А.Ю. Куликов^{1,2}, О.С. Чернышёва²

¹ Государственный научно-экспертный фармакопейный центр качества лекарственных средств
Астрономическая, 33, г. Харьков, Украина, 61085, kulikov@phukr.kharkov.ua

² Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
пл. Свободы, 4, г. Харьков, Украина, 61022

Поступила: 12 апреля 2012 г / Принята к публикации: 21 мая 2012 г

Целью данного исследования было количественное определение содержания селена в волосах. Исследованы образцы волос 48 детей в возрасте от 1 до 8 лет, проживающих в Харькове и Харьковской области. Содержание селена в волосах определяли методом мицеллярной жидкостной хроматографии после микроволнового разложения образцов и предколоночной дериватизации с 2,3-диаминонафталином. В разработанной методике определение проводится на колонке Hypersil ODS, с использованием 10 % (v/v) раствора 1-бутанола в 0.05 моль/л додецилсульфата натрия в качестве подвижной фазы, и УФ-детектированием при длине волны 378 нм. Время удерживания составило менее 10 мин. Методика была валидирована согласно требованиям международной конференции по гармонизации (ICH). Диапазон линейности содержания Se(IV) составляет 10-531 нг/мл; пределы детектирования и количественного определения составили 1.6 нг/мл и 4.7 нг/мл соответственно. Разработанная методика может быть использована для контроля содержания селена в волосах и клинических исследований.

A.Yu. KULIKOV, O.S. CHERNYSHEVA. MICELLAR LC DETERMINATION OF SELENIUM IN HAIR.

The aim of the present study was to evaluate selenium concentration in hair samples. We studied 48 children, aged from 1 to 8 years, living in Kharkov region. The analysis of Se was performed by using micellar liquid chromatographic technique after hair microwave digestion and precolumn derivatization with 2,3-diaminonaphthalene. The method was developed using Hypersil ODS column, UV detection at 378 nm and 10% (v/v) 1-butanol in 0.05 M sodium dodecyl sulfate as the mobile phase, with the retention times below 10 min. Different validation parameters were evaluated. Linearity was established in the range 10-531 ng/mL of selenium (IV) content. The found limits of detection and quantitation are 1.6 ng/mL and 4.7 ng/mL (equivalent to 40 µg/kg of undried hair), respectively. This method can be used for the selenium monitoring and clinical investigations.

Ключевые слова: мицеллярная жидкостная хроматография, волосы, селен (IV), 2,3-диаминонафталин, нафтилпиазоселенол, додецилсульфат натрия, микроволновое разложение

Keywords: Micellar liquid chromatography; hair; selenium (IV); 2,3-diaminonaphthalene; naphthylpiazoselenol; sodium dodecyl sulfate; microwave digestion

Селен – неотъемлемая часть энзима глутатионопероксидазы и является необходимым микроэлементом для нормального развития детского организма. Недостаток селена в детском организме приводит к нарушению роста и неправильному развитию мозга ребенка. Определение общего содержания селена очень важно в установлении селенового статуса населения, выявлении селенодефицитных районов [1,2].

Определение содержания селена в биологических объектах – моче, крови, волосах – представляется довольно сложной задачей, поскольку селен содержится в них в виде селеноорганических соединений [3].

Для определения малых содержаний селена в пищевых и биологических объектах широко используется спектрофлуориметрический метод. Это высокочувствительный метод, который позволяет определять микроколичества селена. Определение основано на взаимодействии Se(IV) с

диаминами с образованием пиазоселенола, флуоресценцию которого и измеряют. Наиболее часто для этой реакции используют 2,3-диаминонафталин и 1,2-диамино-4-нитробензол.

Метод флуориметрии был использован для определения селена в волосах в виде нафтилпиазоселенола после озонирования образцов в смеси концентрированной азотной и хлорной кислот, и с дериватизацией с 2,3-диаминонафталином [4].

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия (ААС) – один из наиболее часто используемых методов для определения следовых количеств элементов, включая и селен. ААС эффективный и воспроизводимый метод, позволяющий определять содержание Se в биологических объектах в диапазоне содержаний ниже мкг/г [5]. Однако при этом возникают экспериментальные трудности, связанные с влиянием компонентов матрицы, особенно фосфатов, и чрезмерного испарения. В литературе описано определение Se в волосах у

детей в диапазоне содержаний 300-1700 мкг/кг с использованием микроволнового разложения с последующим электрохимическим атомно-абсорбционно-спектрофотометрическим определением [6].

Для определения следовых количеств Se также часто используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с разными способами детектирования: спектрофотометрическим [7], ААС с графитовой кюветой [8], АЭС с индуктивно связанной плазмой [9], атомно-флуоресцентно-спектрометрическим [10,11], масс-спектрометрическим с индуктивно связанной плазмой [5,12]. Существуют также методики с использованием ионообменной [13], обращено-фазовой [14], ионпарной, эксклюзионной, хиральной и других видов хроматографии. Преимущество ВЭЖХ заключается в возможности разделения отдельных форм Se без их разрушения. Хотя все эти методы и позволяют определить содержание известного селеноорганического соединения, но требуют использования соответствующего стандартного образца [15].

Для определения микроколичеств Se в поливитаминных препаратах было предложено использовать мицеллярную жидкостную хроматографию (МЖХ) [16], которая является альтернативой обращено-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) [17-19]. МЖХ успешно применяется для анализа лекарственных средств [20], биологических жидкостей [18,19] и в мониторинге окружающей среды. К тому же МЖХ позволяет расширить перечень соединений, которые обычно разделяют с помощью ОФ ВЭЖХ, вплоть до почти всех гидрофобных и многих гидрофильных соединений солюбилизирующихся мицеллами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Главным преимуществом МЖХ над ОФ ВЭЖХ является возможность одновременного разделения как ионных так и не ионных соединений без необходимости градиентного элюирования. Подвижная фаза при этом относительно дешевая, не токсичная, не летучая и улучшает чувствительность детектирования.

Цель данной работы - разработать и валидировать методику определения микроколичеств селена в биологических объектах (волосах) с использованием метода МЖХ и спектрофотометрического детектирования. В качестве метода пробоподготовки предложено использовать микроволновое озоление с последующей дериватизацией с 2,3-диаминонафталином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реагенты и стандартные растворы

Селенит натрия (содержание основного вещества 99.0 %, Aldrich, Milwaukee, WI, США), 2,3-диаминонафталин (содержание основного вещества 98.0 %, Sigma-Aldrich Chemie, Германия), 1-бутанол (1-BuOH), концентрированная азотная кислота, металлический Mg и додецилсульфат натрия (ДСН) производства Fluka Chemie (Buchs,

Швейцария). Хлороводородная кислота и н-гептан производства Merck (Darmstadt, Германия). Все растворы готовились на бидистиллированной воде (удельная проводимость $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Стандартный образец CRM 397 (образец человеческих волос для определения следовых элементов) был предоставлен фирмой LGC Standards GmbH (Wesel, Германия). Сертифицированное содержание Se в стандартном образце было 2.00 ± 0.08 мкг/г сухой массы.

Раствор 2,3-диаминонафталина готовили путем растворения 0.1000 г вещества в 50 мл 1 моль/л хлороводородной кислоты при энергичном встряхивании около 30 мин в мерной колбе. Объем раствора доводили до 100 мл тем же растворителем. Полученный раствор переносили в делительную воронку объемом 250 мл, добавляли 20 мл н-гептана, энергично встряхивали 10 мин и оставляли до расслаивания фаз. После этого верхний (гептановый) слой удаляли, раствор реагента переносили в темный сосуд и использовали для дериватизации. Реагент хранили при температуре 5°C , в темноте и использовали в течение 14 дней.

Исходный стандартный раствор Se готовили следующим способом: навеску 0.1550 г предварительно высушенного до постоянной массы селенита натрия помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяли в 50 мл воды, доводили объем раствора до метки и перемешивали. 1 мл такого раствора содержал 353.9 мкг Se. Раствор хранили при температуре 5°C , в темноте и использовали в течение 5 дней.

Рабочие стандартные растворы готовили разбавлением исходного стандартного раствора Se 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты. Для исследования линейности аналитического сигнала готовили шесть рабочих стандартных растворов в диапазоне содержаний 35.4 - 531 нг/мл. Стандартные растворы использовали для оценки прецизионности предложенной методики определения Se. Для этого известные объемы исходного стандартного раствора Se разбавили, чтобы получить пять растворов с различной концентрацией Se (IV): 53.1, 77.9, 106, 124 и 152 нг/мл. Эти растворы содержали около 50%, 75%, 100%, 125% и 150% описанного в литературе количества Se - 800 мкг/кг не высушенных волос (после пробоподготовки около 100 нг/мл). Растворы готовили непосредственно перед измерениями.

Оборудование

Хроматографические измерения проводили с использованием жидкостного хроматографа Hewlett Packard (Agilent Technologies, Walbronn, Германия) с насосом серии 1050, спектрофотометрическим детектором с регулируемой длиной волны серии 1050 и интегратором серии 3395. В качестве аналитической колонки использовали обращено-фазовую колонку Hypersil ODS

(150 мм×4.6 мм, 5 мкм, Merck KgaA, Darmstadt, Германия).

Спектрофотометрические исследования проводили с использованием спектрофотометра HP 8453 UV-VIS (Agilent Technologies, Walbronn, Германия). pH определяли с помощью pH-метра Beckman Ф-200 (Beckman Instruments, Fullerton, США). Разложение проб проводили с использованием системы микроволнового разложения Ethos EZ (Milestone, Shelton, США).

Пробоподготовка и дериватизация

Пробоподготовку проводили микроволновым разложением в присутствии кислоты с использованием тефлоновой посуды.

Для образцов волос: 0.2-0.3 г образца помещали в 50 мл закрывающийся тефлоновый сосуд, добавляли 4.0 мл концентрированной азотной кислоты, 2.0 мл бидистиллированной воды и разлагали в микроволновой печи при мощности 800 Вт в течение 20 мин. Пробу количественно при помощи 10 мл бидистиллированной воды переносили в коническую колбу вместимостью 50 мл и осторожно порциями прибавляли около 2 г порошка магния до прекращения выделения диоксида азота. Полученный раствор кипятили в течение 10 мин, прибавляли 2.0 мл концентрированной хлороводородной кислоты, и опять кипятили на водяной бане в течение 20 мин. К полученному раствору прибавляли 10 мл бидистиллированной воды и 5.0 мл 2,3-диамино-нафталина, выдерживали на кипящей водяной бане 10 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Раствор количественно переносили в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляли 2.0 мл н-гептана, энергично встряхивали в течение 2 мин и оставляли для расслаивания фаз. Верхний (гептановый) слой фильтровали через 0.45 мкм тефлоновый фильтр вials для ВЭЖХ и использовали для определения Se.

Для стандартов: 2.0 мл рабочего раствора Se помещали в 50 мл закрывающийся тефлоновый сосуд и проводили все процедуры, описанные выше для образцов волос.

Хроматографическое разделение

В качестве подвижной фазы использовали раствор 0.05 моль/л ДСН, содержащий 10 % (v/v) 1-бутанола. Скорость потока составляла 1.0 мл/мин, объем вводимой пробы – 50 мкл. Хроматографирование проводили при температуре $(40.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, детектирование при длине волны 378 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В статье [16] подробно обсуждалось, почему 2,3-диаминонафталин использовался как реагент для дериватизации, а также выбор условий МЖХ для разделения и анализа 4,5-нафтилпиазоселенола (продукт взаимодействия селенит-иона и 2,3-диаминонафталина в кислой среде).

Одной из основных целей этой работы был выбор состава разлагающей смеси при микроволновой обработке, подходящей для определения Se в образцах волос.

В литературе упоминается несколько методов разложения образцов при определении селена. Известно, что для таких целей чаще всего используют озоление при помощи концентрированной азотной кислоты с последующим прибавлением пероксида водорода. Смесь азотной и хлороводородной кислот не используется, так как при этом могут образовываться летучие соединения, такие как SeOCl_2 , $\text{SeO}_2 \cdot 2\text{HCl}$.

Концентрированная серная кислота также используется для “мокрого” озоления, однако она оказалась менее эффективной и не полностью извлекает селен из биологического образца. Добавка хлорной кислоты устраняет этот недостаток, однако при такой пробоподготовке содержание селена в образце значительно снижается вследствие летучести селеносодержащих соединений. Избежать этого возможно при уменьшении температуры минерализации, однако при этом сильно увеличивается время пробоподготовки – до нескольких суток.

Лучший способ минерализации, при котором возможно уберечься от потерь селена, это минерализация в закрытом сосуде. Такая техника уже используется для разложения биологических объектов с использованием серной, азотной и хлорной кислот. Сжигание и окисление биологических объектов проводят при температуре около 200°C в течение четырех часов. Однако нагревание до такой высокой температуры и длительность процесса оказались не очень приемлемыми для рутинного анализа.

В качестве метода озоления нами был выбран метод сжигания (в азотной кислоте) в закрытом сосуде с использованием микроволнового излучения, предложенный и валидированный авторами работы [21]. Такой метод пробоподготовки характеризуется быстротой процесса, возможностью работы с небольшим объемом биологического материала, исключает потери при озолении.

При таком способе пробоподготовки селеноорганические соединения разрушаются, и в растворе образуется селенат-ион, то есть Se(VI) .

Избыток азотной кислоты и окислы азота удаляются из реакционной смеси путем: 1) реакции с металлическим магнием, 2) кипячением реакционной смеси на водяной бане до прекращения выделения оксидов азота. Далее, при помощи концентрированной хлороводородной кислоты при нагревании Se(VI) переводим в Se(IV) , то есть селенит-ион, который может вступать в реакцию с 2,3-диаминонафталином. Концентрация 4,5-нафтилпиазоселенола, который образуется в результате данной реакции, прямо пропорциональна концентрации селена в образце. Оптимальный состав подвижной фазы (0.05 моль/л ДСН с 10 % (v/v) 1-бутанола) позволяет получать пики 4,5-нафтилпиазоселенола с удовлетворительной эффективностью и фактором асимметрии [16].

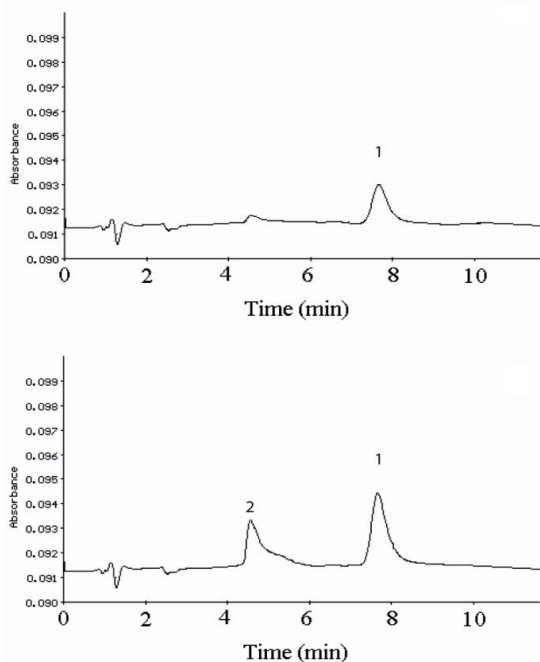


Рис. 1 Хроматограммы раствора стандартного образца (вверху) и испытуемого раствора препарата (внизу). 1 – 4,5-нафтилпиазоселенол; 2 – неизвестная примесь

Валидация методики МЖХ количественного определения селена(IV) в волосах

Методики и параметры, используемые для метода хроматографии, усовершенствованные в нашем исследовании, также описаны в фармакопее Америки [22], руководствах ICH [23] и работе [24]. Селективность предложенной методики определения методом МЖХ, где анализировали растворы 4,5-нафтилпиазоселенола, которые были окислены 10 % H_2O_2 и подвергались жесткому УФ-излучению ртутной лампой, полностью описана в [16]. Показано, что пик 4,5-нафтилпиазоселенола успешно отделен от пика примеси, которая является продуктом разложения или окисления.

На рис. 1 приведены хроматограммы раствора стандартного образца и испытуемого раствора, полученные по разработанной методике.

Линейность, предел количественного определения, предел детектирования

Для проверки линейности градуировочного графика были проанализированы пять растворов с различной концентрацией селена в диапазоне от 35.4 до 531 нг/мл (пять параллельных определений). По результатам хроматографирования были рассчитаны параметры уравнения $Y = A + B \cdot C$, где C – концентрация селена в растворе стандартного образца, мкг/мл; Y – площадь пика 4,5-нафтилпиазоселенола, предел детектирования и предел количественного определения. Было получено уравнение градуировочной функции:

$$Y = (2 \pm 6) \cdot 10^2 + (854 \pm 4) \cdot X,$$

коэффициент корреляции - 0.9993. Предел детектирования составил 1.6 нг/мл; предел количественного

определения - 4.7 нг/мл. Пределы вычисляли согласно 3.3 s/m и 10 s/m критериям, где s – стандартное отклонение площади пика образца, m – угол наклона градуировочной прямой.

Стабильность растворов

Для изучения стабильности растворов 4,5-нафтилпиазоселенола, полученных экстракцией в гептан, было проведено несколько экспериментов.

1. При работе со стандартными растворами (водные растворы селенита натрия) были получены производные селена, которые хроматографировали через 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 7 часов после приготовления. Через 4 часа после приготовления растворов концентрация 4,5-нафтилпиазоселенола падала примерно на 20%, а через 7 часов в 2.5 раза. Следовательно, полученный 4,5-нафтилпиазоселенол стабилен в течение 3-3.5 часов. Далее во всех экспериментах растворы были свежеприготовленными или хроматографировались в течение 1 часа после приготовления.

2. Были проанализированы образцы волос. После сжигания образцы выдерживались 1, 3, 5, 7 часов, 1, 2, 3 и 5 суток. Затем образцы были подвергнуты дериватизации и хроматографированию. Проведенный эксперимент показал, что после сжигания и хранения образца в плотно закупоренной таре, потеря селена не происходит в течение 5 суток.

3. Образцы волос после сжигания были подвергнуты соответствующей пробоподготовке в результате чего был получен 4,5-нафтилпиазоселенол. Полученные растворы выдерживались 0, 1, 2, 3, 4 и 5 часов после дериватизации, но без экстракции (модель проведения рутинного анализа). После соответствующей выдержки проводилась экстракция n-гептаном и хроматографирование. Было отмечено, что через 3-4 часа концентрация 4,5-нафтилпиазоселенола уменьшается примерно на 25-30%. Следовательно, 4,5-нафтилпиазоселенол разлагается при хранении в реакционной среде.

4. К раствору стандартного образца селенита натрия прибавляли 1000-кратный избыток Mg^{2+} , NO_3^- , и совместно Mg^{2+} и NO_3^- . В сильноокислой среде нитрат-ион оказывает разрушающее действие на 4,5-нафтилпиазоселенол. Комплекс стабилен приблизительно 3 часа. Магний такого эффекта не оказывает.

Из проведенных экспериментов по стабильности можно сделать вывод, что дериват должен быть свежеприготовленным; экстракция в нормальный алкан и хроматографическое определение должны проводиться не позднее двух часов после получения нафтилпиазоселенола.

Правильность результатов анализа

Правильность результатов анализа проверялась несколькими способами: 1) анализ образца известной концентрации и сравнение полученных данных с истинным значением (табл. 1); 2) определение содержания селена в образце волос методом добавок (табл. 2).

Таблица 1. Правильность результатов анализа (анализ образца известной концентрации)

Концентрация Se в стандартном образце, нг/мл	Найдено*, нг/мл	Возврат, %
53.1	54.2	102.1
77.9	80.4	103.2
106	105.9	99.9
124	122.6	98.9
152	151.4	99.6
Среднее значение		100.7
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		2.3

Примечание. среднее значение четырех параллельных определений, доверительная вероятность – 95 %

Таблица 2. Определение правильности результатов анализа методом введено-найденно

Введено Se(IV), нг	Найдено Se(IV), нг/г		Возврат, %
	с добавкой	с учетом добавки	
–	–	616	–
248	849	601	97.6
354	993	693	103.7
531	1160	629	102.1
708	1314	606	98.4
Среднее значение			100.5

Примечание. среднее значение трех параллельных определений, доверительная вероятность – 95 %

Таблица 3. Сходимость и воспроизводимость результатов анализа

Теоретическая концентрация, нг/мл	Сходимость Среднее значение ± RSD, (%)	Воспроизводимость			Среднее ± RSD, (%)
		Среднее значение ± RSD, (%)			
		День 1	День 2	День 3	
53.1	103.3±0.8	104.1±0.9	102.5±0.6	102.7±0.6	103.2±1.1
106	101.2±0.9	100.1±0.9	100.7±0.8	99.9±0.9	100.5±0.9
152	99.5±0.6	100.3±0.5	99.3±0.5	100.1±0.9	99.8±0.8

Примечание. среднее значение пяти параллельных определений, доверительная вероятность – 95 %

Также правильность результатов анализа была проверена путем анализа стандартного образца (CRM 397) с сертифицированным содержанием селена в образце 2.00 ± 0.08 мкг/г (в пересчете на сухое вещество). Найденное из трех параллельных определений содержание селена составило 2.08 ± 0.14 мкг/г (в пересчете на сухое вещество).

Прецизионность результатов анализа

Было проведено определение прецизионности результатов анализа как сходимость (внутри одного дня) и воспроизводимость (в течение нескольких дней). Стандартные растворы были каждый раз свежеприготовленными. Результаты определения приведены в таблице 3. Как видно из полученных данных, нет существенных различий в результатах количественно определения селена в испытуемом образце.

Анализ реальных образцов волос

Разработанная методика была использована для определения Se в волосах детей возрастом от 1 года до 8 лет (28 мальчиков и 20 девочек) методом МЖХ. Общий анализ содержания селена показал, что нет существенного различия в среднем содержании селена между мальчиками и девочками (рис. 2). Было найдено, что содержание селена в волосах здоровых

мальчиков составило около 742 мкг/кг ($n=17$), а девочек около 678 мкг/кг ($n=10$) не высушенных волос. Полученные данные достаточно хорошо согласуются с литературными [6, 25].

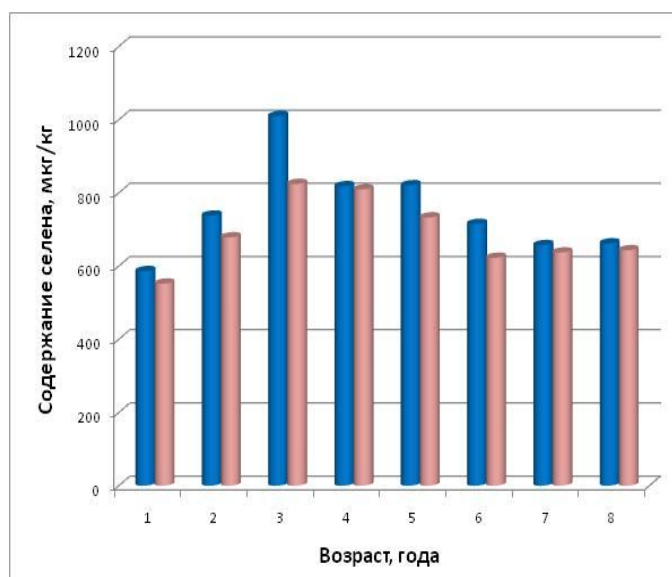


Рис. 2. Среднее содержание селена в волосах мальчиков (синие столбики) и девочек (розовые столбики) в зависимости от возраста ребенка

Также можно отметить, что содержание селена в волосах детей от 2 лет до 6 лет несколько больше, чем у детей старшего возраста. Это также было отмечено в медицинской литературе – содержание селена в волосах детей до 8 лет больше, нежели у подростков и взрослых людей [26].

ВЫВОДЫ

Была разработана и валидирована новая методика определения содержания селена(IV) в волосах методом мицеллярной жидкостной хроматографии. Предложенная методика является лучшей альтернативой используемым.

Для определения содержания селена она полезнее с точки зрения концепции безопасного анализа и “зеленой химии” (снижение токсичности и загрязнителей окружающей среды). К тому же предложенная методика позволяет исключить некоторые стадии пробоподготовки и снизить стоимость подвижной фазы (в частности, подвижная фаза остается стабильной длительный период). Найдено, что нет практически никакой разницы между содержанием селена в волосах у мальчиков и девочек (742 мкг/кг и 678 мкг/кг соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

- Hopkins W.A., Staub B.P., Baionno J.A., Jackson B.P., Roe J.H., Ford N.B. Trophic and maternal transfer of selenium in brown house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, 58, 285–293.
- Bem E.M. Determination of selenium in the environment and in biological material. *Environmental Health Perspectives*. 1981, 37, 183-200.
- Walthner-Toews D., Martin S.W., Meek A.H. Selenium content in the hair calves and its association with preweaning morbidity and mortality. *Can. J. Vet. Res.* 1986, 50,347-350.
- Thimaya S., Ganapathy S.N. Selenium in human hair in relation to age, diet, pathological condition and serum levels. *Sci. of Total Environment*. 1982, 24(1), 41-49.
- B'Hymer C., Caruso J.A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2006, 1114(1), 1-20.
- Bermejo Barrera P., Lorenzo Alonso M.J., Bermejo Barrera A.A., Cocho de Juan J.A., Fraga Bermudez J.M. Selenium determination in mother and child's hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Forensic Sci. Intern.* 2000, 107, 149-156.
- Velez D., Ybanez N., Montoro R. Optimization of the extraction and determination of monomethylarsonic and dimethylarsinic acids in sea-food products by coupling liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1996, 11, 271-278.
- Gilon N., Potin-Gautier M., Asturic M. Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1996, 750(1,2), 327-334.
- Amran M.B., Lagarde F., Leroy M.J.F. Determination of arsenic species in marine organisms by HPLC-ICP-OES and HPLC-HG-QFAAS. *Microchim. Acta*. 1997, 127(3,4), 195-205.
- Puskel E., Mester Z., Fodor P. Determination of selenoamino acids by high-performance liquid chromatography–hydraulic high pressure nebulization–atomic fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999, 14, 973-976.
- Chen M., Yang T., Wang J. Precipitate coating on cellulose fibre as sorption medium for selenium preconcentration and speciation with hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2009, 631(1), 74-79.
- Zheng J., Kosmus W. Simultaneous Speciation of Arsenic and Selenium Compounds by Ion-Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry as Elemental Specific Detector. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 1998, 21, 2831-2839.
- Ge H., Cai X.J., Tyson J.F., Uden P.C., Denoyer R.E., Block E. Identification of selenium in selenium-enriched garlic, onion and broccoli using high-performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Anal. Commun.* 1996, 33, 279-281.
- Kotrbai M., Tyson J.F., Block E., Uden P.C. High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. 2000, 866(1), 51-63.
- Elis. The optimization of a method for total selenium analysis and application to cereal grain foods: Hons, RMIT University, 2008. P. 92.
- Kulikov A.U. Determination of Selenium (IV) in Pharmaceuticals and Premixes by Micellar Liquid Chromatography Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43(4), 1283-1289.
- A. Berthod, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, Micellar Liquid Chromatography, Marcel Dekker Inc.: New York-Bazel, 2000. P.632.

18. Басова Е.М., Иванов В.М., Шпигун О.А. Мицеллярная жидкостная хроматография. *Успехи химии*. 1999, 68(12), 1083–1101.

19. Okada T. Micellar chromatography of inorganic compounds *J. Chromatogr. A*. 1997, 780(1,2), 343–360.

20. Kulikov A.U., Verushkin A.G., Loginova L.P. Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim. *Chromatographia*. 2005, 61(9,10), 455–463.

21. Беликов К.Н., Гребенюк Н.Н., Друзенко Т.В., Кисиль Е.П., Беликова Л.И. Микроволновое разложение образцов органического происхождения при определении примесей методами атомно-абсорбционной спектрометрии, атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и инверсионной вольтамперометрии. *Вопросы химии и химической технологии*. 2005, № 3, 9–12.

22. United States Pharmacopoeia / National Formulary 30th ed. 2009 United State Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.

23. *Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. In: www.ich.org

24. Ermer J., Ploss H.-J. Validation in pharmaceutical analysis. Part II. Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37(5), 859–870.

25. Harrison I., Littlejohn D., Fell G.S. Determination of selenium in human hair and nail by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1995, 10, 215–219.

26. Lemire M., Mergler D., Huel G., Passos C.J.S., Fillion M., Philibert A., Guimaraes J.R.D., Rheault I., Borduas J., Normand G. Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: Blood, urine and sequential hair segments. *J. Exp. Sci. Envir. Epiderm.* 2009, 19, 213–222.