

Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin mittels Anionenaustausch-Chromatographie-ICP-MS

Biomonitoring-Methode

T. Jäger¹

T. Göen^{1,3,*}

B. Michalke²

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

Keywords

Selenspezies; Speziesanalytik;
Biomonitoring; Urin; HPLC;
ICP-MS

- ¹ *Methodenentwicklung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- ² *Methodenprüfung, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Abteilung Analytische BioGeoChemie, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg*
- ³ *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- ⁴ *Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe*
- ⁵ *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

* E-Mail: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method. This analytical method is used to determine selenite and selenate in urine, which are separated by anion-exchange chromatography and subsequently detected by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Calibration is performed using standard solutions, which are prepared in pooled urine, processed, and analysed analogously to the samples. The analytical method allows for the sensitive and precise determination of selenite and selenate without interferences by other selenium species. The low limits of quantitation enable the determination of very low urinary concentrations of selenite or selenate. However, selenite and selenate do not normally contribute substantially to total selenium content in urine.

Citation Note:

Jäger T, Göen T, Michalke B, Hartwig A, MAK Commission. Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin mittels Anionenaustausch-Chromatographie-ICP-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Jun;7(2):Doc038. https://doi.org/10.34865/bi778249ad7_2or

Manuskript abgeschlossen:
11 Mrz 2021

Publikationsdatum:
29 Jun 2022

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (HPLC-ICP-MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoffe	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Selen und seine Verbindungen	7782-49-2	Selenit	14124-67-5
		Selenat	14124-68-6

Zuverlässigkeitskriterien

Selenit (Se(IV))

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 0,77 µg bzw. 7,46 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 5,3\%$ bzw. 4,5 % $u = 13,6\%$ bzw. 11,6 %
Präzision von Tag zu Tag ^{a)} :	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 0,24 µg, 2,92 µg bzw. 10,7 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 8,1\%$, 11,8 % bzw. 10,2 % $u = 20,8\%$, 30,3 % bzw. 26,2 %
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 2,0 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 10 Bestimmungen	$r = 111\%$
Nachweisgrenze:	0,19 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,57 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

^{a)} Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

Selenat (Se(VI))

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 0,78 µg bzw. 7,69 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 6,6\%$ bzw. 3,9 % $u = 17,0\%$ bzw. 10,0 %
Präzision von Tag zu Tag ^{a)} :	Standardabweichung (rel.) Streubereich bei einer Konzentration von 0,928 µg, 3,37 µg bzw. 9,16 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	$s_w = 5,6\%$, 10,3 % bzw. 9,6 % $u = 14,4\%$, 26,5 % bzw. 24,7 %
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.) bei einer dotierten Konzentration von 2,0 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 10 Bestimmungen	$r = 115\%$
Nachweisgrenze:	0,10 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,30 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

^{a)} Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

2 Allgemeine Informationen zu Selen und seinen Verbindungen

Selen (Se; relative Atommasse: 78,97; Ordnungszahl: 34) ist ein ubiquitär in der Umwelt vorkommendes Element, das in Verbindungen am häufigsten in den Oxidationsstufen –II, +IV und +VI auftritt. Die wichtigsten Selenproduzenten sind die USA, Kanada und Japan, die zusammen ca. 70 % der Weltproduktion erzeugen. Dabei werden etwa 45 % der Selenproduktion in der Elektrotechnik, 20 % zur Herstellung von Pigmenten, 8 % in der chemischen Industrie und etwa 27 % in der Keramik- und Glasindustrie sowie für weitere industrielle Zwecke eingesetzt (Butterman und Brown 2004; RÖMPP-Redaktion und Hartwig 2006). Im europäischen Wirtschaftsraum werden jährlich 1000 bis 10 000 Tonnen Selen hergestellt bzw. in diesen importiert (ECHA 2022).

Für den Menschen stellt Selen ein essenzielles Spurenelement dar. In Form von Selenocystein ist es struktureller Bestandteil von über 25 verschiedenen Enzymen und kommt beispielsweise in Glutathionperoxidasen, Thioredoxinreduktasen und Iodothyronin-Deiodinasen vor (Lu und Holmgren 2009). Dadurch ist Selen an einer Reihe physiologischer Prozesse beteiligt, wie an der Abwehr von oxidativem Stress, an redoxregulierten Signalwegen und an der Synthese von Schilddrüsenhormonen (Rayman 2000, 2012). Die außerberufliche Exposition gegen Selen erfolgt in erster Linie über die Nahrung, wobei eine tägliche Aufnahme von 70 µg (Männer) bzw. 60 µg (Frauen) empfohlen wird (D-A-CH 2016). Die sichere tägliche Höchstmenge (*Tolerable Upper Intake Level*) liegt bei 300 µg Selen (SCF 2006).

Beschäftigte am Arbeitsplatz sind vor allem gegen elementares Selen und anorganische Selenverbindungen exponiert, wobei die Selenverbindungen in Form überwiegend wasserlöslicher anorganischer Verbindungen oral, inhalativ und dermal aufgenommen werden können. Hingegen nimmt die beruflich nicht belastete Allgemeinbevölkerung über die Ernährung überwiegend organische Selenverbindungen wie Selenomethionin und Selenocystein auf (WHO 1987). Die Resorptionsquoten der anorganischen Selenite und Selenate liegen bei 62–84 % und 92–94 %, die der organischen Selenverbindungen bei 75–95 % (Rettenmeier 2013).

Die Elimination von Selen erfolgt biphasisch mit mittleren Halbwertszeiten von $2,4 \pm 0,3$ und 162 ± 9 Tagen. Anorganische Selenite oder Selenate werden rascher als die organischen Selenverbindungen (wie Selenomethionin) ausgeschieden, was mit dem Einbau des Selenomethionins in Proteine erklärt wird (RKI 2006).

Die Beurteilung der essenziellen Selenversorgung sowie einer darüber hinausgehenden Selenbelastung erfolgt in der Regel über den Selenspiegel im Blutplasma. Zur renalen Selenausscheidung nach beruflicher Exposition gibt es bislang nur wenige Studien (Göen und Greiner 2018), in denen zumeist die Gesamtgehalte an Selen im Urin der Beschäftigten bestimmt wurden (Tabelle 1).

Tab. 1 Selenkonzentrationen im Urin nach beruflicher Exposition

Kollektiv (Probenanzahl n)	Probenmatrix	Selen (MW \pm SD (Bereich))		Literatur
		Beschäftigte	Kontrollen	
Selenverarbeitender Betrieb, Deutschland (20; 20 Kontrollen)	Urin (Nachschicht)	107 µg/g Kreatinin (16–816 µg/g Kreatinin) ^{a)}	23 µg/g Kreatinin (12–50 µg/g Kreatinin) ^{a)}	Göen et al. 2015
Selenverarbeitender Betrieb, Deutschland (14; 18 Kontrollen)	Urin (Vorschicht)	50,6 µg/g Kreatinin (20,7–253 µg/g Kreatinin) ^{a)}	18,7 µg/g Kreatinin (9,20–40,6 µg/g Kreatinin) ^{a)}	Greiner et al. 2020
	Urin (Nachschicht)	71,8 µg/g Kreatinin (22,1–340 µg/g Kreatinin) ^{a)}		
Herstellung von Selen-Gleichrichtern, England (1517 Proben von 200– 300 Arbeitern; 793 Kontrollen)	Urin	84 µg/l	34 \pm 24 µg/l (0–150 µg/l)	Glover 1967
Kupferraffinerie, Kanada (20)	Urin	92,9 \pm 42,8 µg/l (34,0–190 µg/l)	74,6 \pm 25,3 µg/l (26,7–118 µg/l)	Rajotte et al. 1996
Stahlproduktion, Taiwan (23; 23 Kontrollen)	Urin	67,7 \pm 27,4 µg/l (24,1–114 µg/l)	33,2 \pm 12,9 µg/l (13,0–58,9 µg/l)	Horng et al. 1999

^{a)} Median (Bereich)

Für Selen und seine anorganischen Verbindungen hat die Kommission einen Biologischen Arbeitsstofftoleranzwert (BAT-Wert) von 150 µg Selen/l Plasma und eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) von 0,02 mg Selen/m³ E (als Selen berechnet) abgeleitet. Selen und seine anorganischen Verbindungen sind außerdem in die Kanzerogenitätskategorie 3 eingestuft und wegen der gegebenen Gefahr durch Hautresorption mit einem „H“ markiert. Details zur toxikologischen Bewertung können der entsprechenden MAK-Begründung der Kommission entnommen werden (DFG 2021; Hartwig 2011, 2014). Darüber hinaus hat die Kommission für die Matrix Urin einen Biologischen Referenzwert (BAR) von 30 µg Selen/g Kreatinin abgeleitet (Greiner et al. 2021). Zur Ableitung dieses BAR wurden nur deutsche und westeuropäische Studien herangezogen, da die unterschiedlichen Selengehalte der Böden die Selenkonzentration in den Lebensmitteln und damit die Selenaufnahme stark beeinflussen (Combs 2001).

Die aufgenommenen anorganischen und organischen Selenverbindungen werden zu Selenid reduziert, wobei diese Reaktion bei Seleniten und Selenaten glutathionabhängig verläuft. Selenid ist die zentrale metabolische Selenspezies (siehe [Abbildung 1](#)) und dient als gemeinsame Quelle für die Synthese von Selenoproteinen und Selenozuckern (Birringer et al. 2002; Fairweather-Tait et al. 2011; Navarro-Alarcon und Cabrera-Vique 2008; Ohta und Suzuki 2008). Überschüssiges Selenid kann über drei Stoffwechselwege eliminiert werden. Hierbei stellen die selenhaltigen Zucker die wichtigsten Ausscheidungsprodukte von Selen dar (Francesconi und Pannier 2004; Kuehnelt et al. 2005). Bisher wurden die drei Verbindungen Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno-β-D-galactopyranosid (SeSug 1), Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno-β-D-glucopyranosid (SeSug 2) und Methyl-2-amino-2-desoxy-1-seleno-β-D-galactopyranosid (SeSug 3) im menschlichen Urin nachgewiesen, wobei dem SeSug 1 die größte Bedeutung zukommt (Hildebrand et al. 2020; Jäger et al. 2013). Ein weiterer Stoffwechselweg führt mit Hilfe von Methyltransferasen vom intermediären Selenid zu methylierten Verbindungen wie Monomethylselenol, Dimethylselenid und dem Trimethylselenonium-Ion (TMSe) (Kremer et al. 2005; Ohta und Suzuki 2008). Die Exkretion des Dimethylselenids erfolgt über Haut (Ganther 1986) und Lunge (Jiang et al. 1983), TMSe wird renal ausgeschieden (Kuehnelt et al. 2006). Dabei unterliegt die Ausscheidung des TMSe über die Niere großen interindividuellen Schwankungen und reicht vom Spurenbereich bis hin zum Haupteliminationsprodukt (Gammelgaard und Jøns 2000; Kuehnelt et al. 2006; Lu und Holmgren 2009). TMSe war in einer Studie in Deutschland bei 80 % der Studienteilnehmenden nicht oder nur marginal nachweisbar, bei den übrigen 20 % stellte es jedoch den Hauptmetaboliten dar (Jäger et al. 2013). Für die Selenspezies Selenat konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des oral aufgenommenen Selenats unverstoffwechselt renal ausgeschieden wird und somit nicht dem zentralen Selenidpool zur Verfügung steht (Gammelgaard et al. 2012; Jäger et al. 2016). Ein Teil des Selens wird auch biliär ausgeschieden und unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf (RKI 2006).

Die einzelnen vom Körper aufgenommenen oder metabolisch gebildeten Selenspezies können sich erheblich in ihren physikalischen Eigenschaften sowie in ihrem toxikologischen Potential unterscheiden (Nuttall 2006). Für die Bioverfügbarkeit und die biochemische oder toxische Wirkung ist daher die Art und Menge der Spezies entscheidend, was von der Gesamtkonzentration an Selen im Urin nicht widerspiegelt wird (Cornelis et al. 1993; Kiss und Odani 2007; Lund 1990; Michalke 2002 a, b). Eine analytische Differenzierung der im Urin vorliegenden relevanten Selenspezies ist deshalb für die Beurteilung einer beruflichen oder nicht-beruflichen Exposition unabdingbar.

In der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ wurden drei Methoden erarbeitet und validiert, die auf unterschiedlichen flüssigchromatographischen Trennmechanismen beruhen und die Quantifizierung von insgesamt elf Selenspezies erlauben (I: Anionenaustausch-Chromatographie; II: Umkehrphasen-Chromatographie; III: Kationenaustausch-Chromatographie). Aufgrund der unterschiedlichen flüssigchromatographischen Trennmechanismen werden die drei Teilmethoden separat publiziert. In [Abbildung 2](#) sind die Strukturen der mit den drei Teilmethoden bestimmbaren Selenspezies dargestellt.

Die Bestimmung von Selenit und Selenat erfolgt mittels Anionenaustausch-Chromatographie und ist in der hier dargestellten Teilmethode I beschrieben.

Daten zu Selenit- und Selenatgehalten im Urin nach beruflicher Exposition sind nicht publiziert. Die veröffentlichten Konzentrationen dieser Spezies sind in Urinproben der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung bzw. nach Supplementierung mit selenhaltigen Präparaten bestimmt worden.

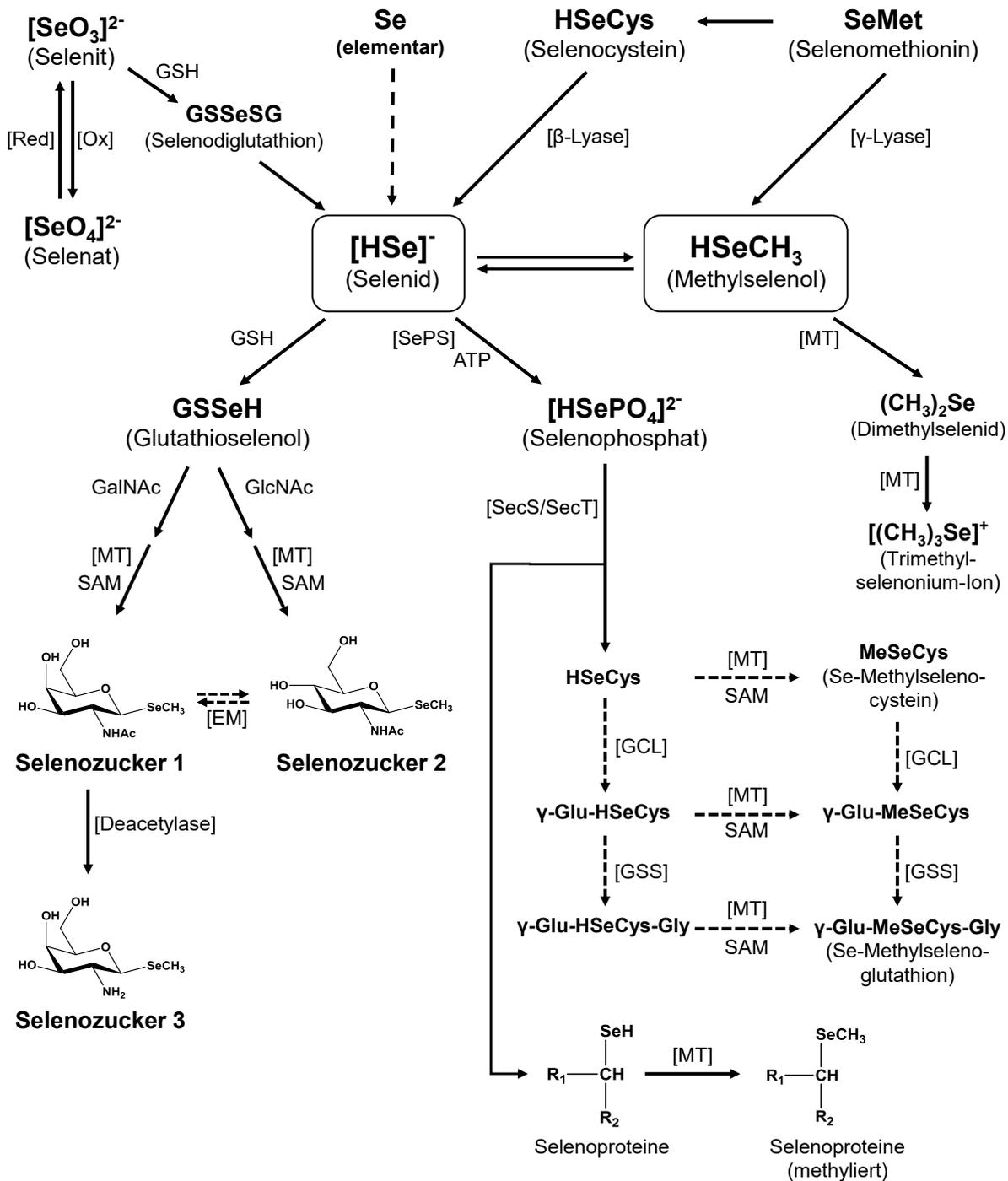


Abb. 1 Metabolismusschema von Selen nach Navarro-Alarcon und Cabrera-Vique (2008) sowie Fairweather-Tait et al. (2011). EM: Epimerase; GalNAc: N-Acetylgalactosamin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; GCL: Glutamylcysteinligase; GSH: Glutathion; GSS: Glutathionsynthetase; MT: Methyltransferase; SAM: S-Adenosylmethionin; SecS/SecT: L-Seryl-tRNA^{Sec}-Selentransferase; SePS: Selenophosphatsynthetase

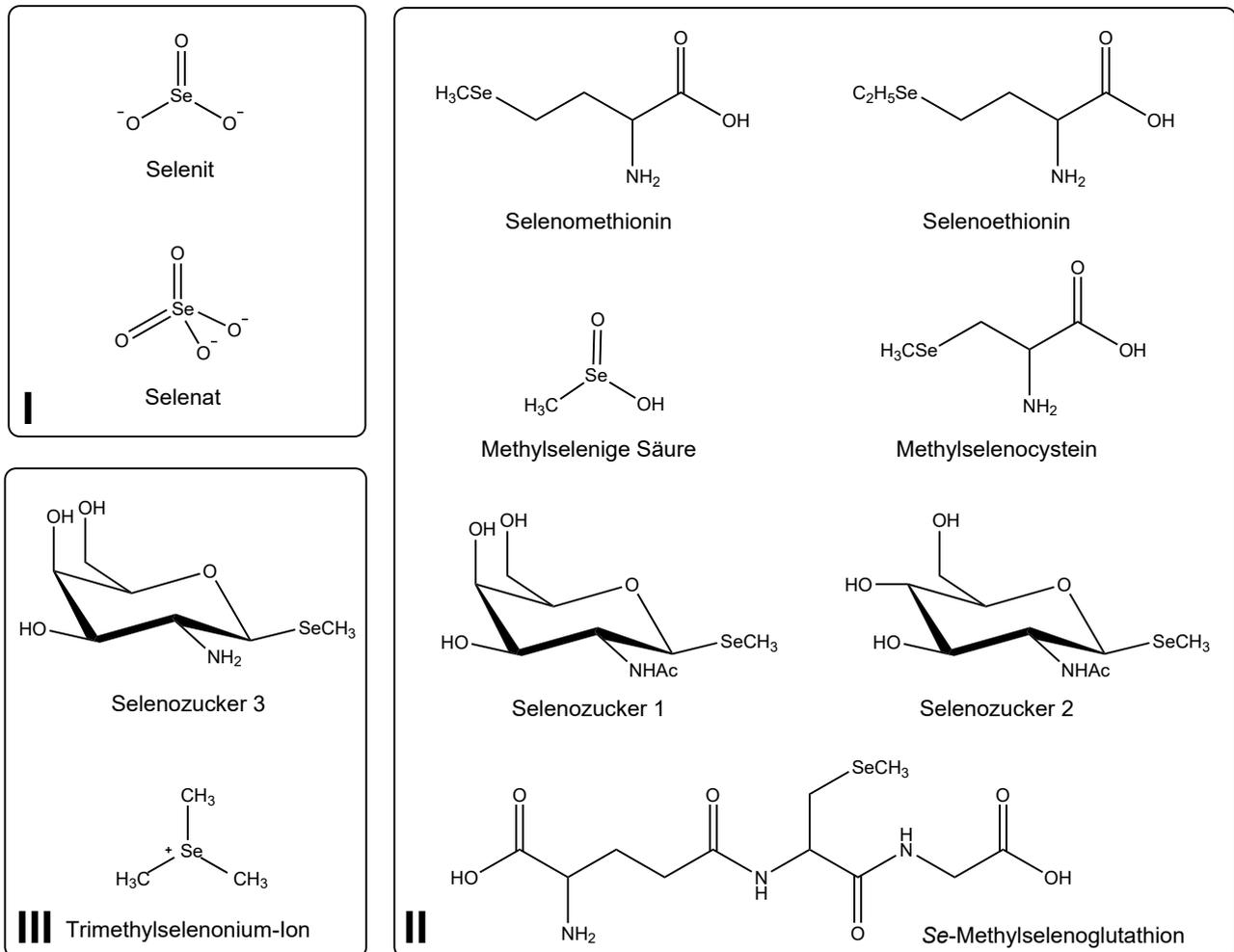


Abb. 2 Strukturen der mit den drei Teilmethoden bestimmaren Selenpezies

Für Selenit wurden in neueren Studien Gehalte gefunden, die in einem Bereich von unterhalb der Bestimmungsgrenze (Lajin et al. 2016) bis zu $7,1 \mu\text{g Se/l}$ (Gammelgaard und Jøns 2000) lagen. In Urinproben aus Deutschland konnte weder bei der Allgemeinbevölkerung noch nach Supplementierung Selenit nachgewiesen werden (Jäger et al. 2013, 2016) (siehe Abschnitt 11.4). Für Selenat sind Konzentrationen in Urin in einem Bereich von unterhalb der Nachweisgrenze (Gammelgaard und Jøns 2000; Zheng et al. 2002) bis über $80 \mu\text{g Se/l}$ (Eichler et al. 2015) publiziert. In Urinproben der Allgemeinbevölkerung in Deutschland ($n = 47$) wurden Selenat-Hintergrundgehalte von $0,19\text{--}0,82 \mu\text{g Se/l}$ quantifiziert (19% der Proben $>$ NWG) (Jäger et al. 2013). Nach Supplementierung mit Natriumselenit wurden Selenatausscheidungen von $1,2 \pm 0,4 \mu\text{g Se/24 h}$ ermittelt (Jäger et al. 2016).

3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene analytische Verfahren dient der Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin. Die Urinproben werden mit dem Fließmittel verdünnt, die Analyten mittels Anionenaustausch-Chromatographie getrennt und anschließend mittels ICP-MS analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Standardlösungen, die in Poolurin angesetzt und analog zu den Proben aufgearbeitet und analysiert werden.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- HPLC-Anlage (z. B. Agilent 1200 Serie mit binärer Pumpe (G1312A) und Autosampler (G1329A), Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer mit Kollisions-/Reaktionszelle (z. B. Agilent 7500cx, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Analytische Säule: Hamilton PRP-X100 PEEK (150 × 4,6 mm; 5 µm) mit PRP-X100 PEEK-Vorsäule (8 × 3 mm; 10 µm) (z. B. Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)
- Ultraschallbad (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vortexmischer (z. B. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- pH-Meter (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Präzisionswaage (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Zellulosefilter, 0,45 µm Porengröße, Membran aus gemischten Zelluloseestern (z. B. Merck KGaA, Darmstadt)
- 0,7-ml-Polypropylen-Mikrovials mit Schnappverschluss-Kappen (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 1000-ml-Bechergläser (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 10-, 100- und 1000-ml-Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 100-ml-Messzylinder (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Verschiedene Pipetten und Multipipetten® mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)

4.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- Ameisensäure 98–100 % (z. B. Nr. 100264, Merck KGaA, Darmstadt)
- Diammoniumoxalat-Monohydrat (z. B. Nr. 101192, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol ≥ 99,9 % (z. B. Nr. 34860, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Poolurin von Personen, die weder beruflich gegen Selen exponiert sind noch Selen über Nahrungsergänzungsmittel zu sich nehmen; für 48 h im Kühlschrank gelagert
- Argon 5.0 (Linde GmbH, Pullach)
- Wasserstoff 5.0 (Linde GmbH, Pullach)

4.3 Referenzmaterialien

- Natriumselenit-Pentahydrat ≥ 99 % (z. B. Nr. 15670510, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

- Natriumselenat $\geq 95\%$ (z. B. Nr. S0882, Merck KGaA, Darmstadt)
- Selen-ICP-Standard Certipur[®], SeO₂ in 2–3%iger HNO₃, 1000 mg Se/l (z. B. Nr. 1.70350, Merck KGaA, Darmstadt)

4.4 Lösungen

- Ameisensäure (2,5%)
In einem 100-ml-Messkolben werden etwa 50 ml hochreines Wasser vorgelegt. Nach Zugabe von 2,5 ml Ameisensäure wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Diammoniumoxalat-Lösung (100 mmol/l)
1,42 g Diammoniumoxalat-Monohydrat werden in einem 100-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird anschließend mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Diammoniumoxalat-Lösung (10 mmol/l) mit 2% Methanol (pH = 5,0)
In einem 1000-ml-Becherglas werden etwa 800 ml hochreines Wasser vorgelegt und 100 ml Diammoniumoxalatlösung (100 mmol/l) sowie 20 ml Methanol dazugegeben. Der pH-Wert der Lösung wird mit 2,5%iger Ameisensäure auf pH = 5,0 eingestellt. Anschließend wird die Lösung in einen 1000-ml-Messkolben überführt und dieser mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
Das Fließmittel wird für jede Analysenserie frisch hergestellt, vor der Verwendung filtriert und im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast.

4.5 Kalibrierstandards

Aufgrund der Instabilität des Selenits (siehe [Abschnitt 11.4](#)) werden die für die Herstellung der Kalibrierstandards benötigten Stamm-, Arbeits- und Dotierlösungen in Poolurin angesetzt, der zuvor 48 h im Kühlschrank gelagert wurde.

- Stammlösungen (1000 mg Se/l)
33 mg Natriumselenit-Pentahydrat (263 g/mol) und 24 mg Natriumselenat (188,9 g/mol) werden in je einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Die Messkolben werden mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Die so hergestellten Lösungen enthalten etwa 1 g Se/l. Um die exakte Selenkonzentration zu bestimmen, werden die Stammlösungen gegen einen ICP-Einzelementstandard gemessen, um gegebenenfalls Ungenauigkeiten bei der Einwaage zu korrigieren.
- Arbeitslösungen (10 mg Se/l)
Abhängig von den gemessenen Konzentrationen der Stammlösungen werden etwa 1000 μ l der Stammlösung in jeweils einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Die Messkolben werden mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- Dotierlösung I (1 mg Se/l)
Jeweils 100 μ l der Arbeitslösungen werden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend werden 800 μ l hochreines Wasser hinzupipettiert und die Lösung wird gut gemischt.
- Dotierlösung II (0,1 mg Se/l)
100 μ l der Dotierlösung I werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 900 μ l hochreinem Wasser versetzt und gemischt.

Die Stamm- und Arbeitslösungen der Analyten werden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Gerade in Hinblick auf das Selenit hat sich der Anwender der Methode bei längerer Lagerungsdauer von der Stabilität des Selenits in den hergestellten Lösungen zu vergewissern.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen I und II gemäß dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema mit Poolurin auf ein Endvolumen von 10 ml gebracht. Die Dotier- und Kalibrierlösungen werden für

jede Analysenserie frisch hergestellt. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards erfolgt analog zur Probenaufbereitung wie in [Abschnitt 5.2](#) beschrieben.

Tab. 2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Poolurin [ml]	Konzentration [µg Se/l]
0	–	–		0
1	–	20		0,2
2	–	50		0,5
3	–	200	ad 10	2
4	50	–		5
5	100	–		10
6	250	–		25

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in Urinbechern gesammelt. Wegen der Instabilität des Selenits (siehe [Abschnitt 11.4](#)) sollten die Proben – sofern möglich – direkt nach Probenahme aufgearbeitet und analysiert werden. Ist dies nicht möglich, sollten die Urinproben direkt nach Probenahme bei -18°C eingefroren und so bald wie möglich analysiert werden. Der Anwender der Methode muss in diesem Fall Maßnahmen treffen, um die Stabilität des Selenits in der Probe zu gewährleisten.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden gegebenenfalls auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. 300 µl der Probe werden in ein 0,7-ml-Polypropylen-Mikrovial überführt. Die Probe wird mit 300 µl des Fließmittels versetzt und anschließend für zehn Sekunden auf dem Vortexmischer gründlich durchmischt. Von der so verdünnten Probe werden 50 µl für die Analyse eingesetzt.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer HPLC-Anlage mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (HPLC-ICP-MS).

6.1 Flüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Hamilton PRP-X100 PEEK (150 × 4,6 mm; 5 µm) mit PRP-X100 PEEK-Vorsäule (8 × 3 mm; 10 µm)
Trennprinzip:	Anionenaustausch-Chromatographie
Fließmittel:	Diammoniumoxalat-Lösung (10 mmol/l) mit 2 % Methanol (pH = 5)
Flussrate:	0–6 min: 0,8 ml/min 6–18 min: 1,2 ml/min

Injektionsvolumen:	50 µl
Laufzeit:	18 min

Die angegebenen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

6.2 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie

Rf Power:	1500 W
Zerstäuber:	MikroMist
Sprühkammer:	Scott Quarz
Temperatur der Sprühkammer:	10 °C
Carrier Gas:	0,9 l Argon /min
Make-Up Gas:	0,2 l Argon /min
Sampling-/Skimmer-Cone:	Nickel
Reaktions-/Kollisionsgas:	H ₂
Flussrate Reaktions-/Kollisionsgas:	3,5 ml/min
Messmodus:	Spectrum Multi Tune
Anzahl der Messungen pro Massenspur (Repetition):	1
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 3

Die gerätespezifischen Parameter müssen vom Anwender individuell für das eingesetzte ICP-MS-System ermittelt und eingestellt werden. Die in diesem Abschnitt genannten Parameter sind für die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendete Gerätekonfiguration bestimmt und optimiert worden. Die ausgewählten Massenspuren sind zusammen mit den Retentionszeiten in [Tabelle 3](#) zusammengefasst. Für die Quantifizierung wird die Massenspur ⁷⁸Se herangezogen.

Tab. 3 Retentionszeiten und parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin

Analyt	Retentionszeit [min]	Analysierte Massenspuren	Messzeit pro Massenspur [s]
Selenit	3,9	⁷⁸ Se	0,5
		⁸² Se	0,3
		⁷⁷ Se	0,3
Selenat	12,0	⁷⁸ Se	0,5
		⁸² Se	0,3
		⁷⁷ Se	0,3

7 Analytische Bestimmung

Von den nach [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeiteten Proben werden jeweils 50 µl in das HPLC-ICP-MS-System injiziert. Die Identifizierung des Selenits und Selenats erfolgt anhand der jeweiligen Retentionszeit. Die in [Tabelle 3](#) angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten HPLC-Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Analyten zu überzeugen. Bei jeder Analysenserie wird ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser anstelle einer Urinprobe) mitgeführt. [Abbildung 3](#) zeigt beispielhaft ein Chromatogramm eines mit Selenit und Selenat dotierten Urins.

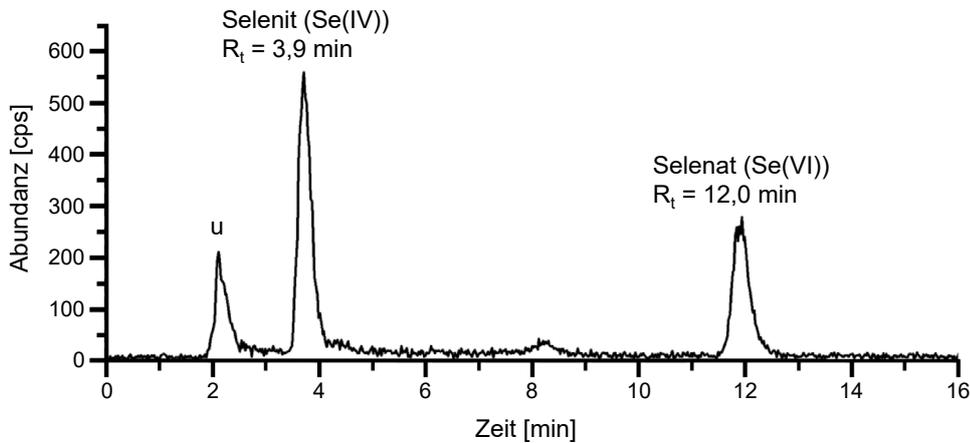


Abb. 3 Chromatogramm eines mit Selenit (5 µg Se/l) und Selenat (5 µg Se/l) dotierten Urins; u = unbekannter Metabolit

8 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards (siehe [Abschnitt 4.5](#)) werden analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Durch Auftragen der Peakflächen der Analyten gegen die Konzentration des jeweiligen Kalibrierstandards werden Kalibriergeraden erstellt. Die Kalibriergeraden sind für Selenit und Selenat unter den beschriebenen Bedingungen von 0,25–25,0 µg/l (als Selen berechnet) linear. [Abbildung 4](#) zeigt beispielhaft Kalibriergeraden für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin.

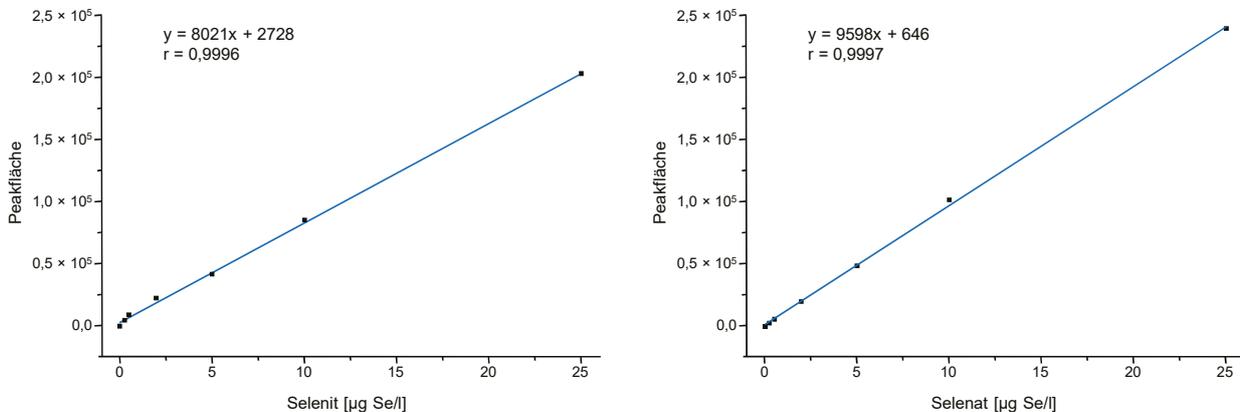


Abb. 4 Kalibriergeraden für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Der Analytgehalt einer Probe in µg/l Urin (als Selen berechnet) wird durch Einsetzen der Peakfläche des jeweiligen Analyten in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion berechnet. Der Kalibrierbereich muss gegebenenfalls an die zu erwartenden Konzentrationen angepasst werden. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereiches, so wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Qualitätssicherung der Analysenergebnisse werden in jeder Analysenserie zwei Qualitätskontrollproben mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen parallel zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Da Kontrollmaterialien derzeit kommerziell nicht erhältlich sind, muss das Material selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolurin von Personen, die weder beruflich gegen Selen exponiert sind noch Selen über Nahrungsergänzungsmittel zu sich nehmen, mit 0,75 µg/l (als Selen berechnet; Q_{low} – niedrige Qualitätskontrolle) bzw. 7,5 µg/l (als Selen berechnet; Q_{high} – hohe Qualitätskontrolle) jeder Spezies dotiert. Vor Herstellung der Qualitätskontrollmaterialien sollte der Poolurin für 48 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden, um die Stabilität des dotierten Selenits zu gewährleisten. Die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien werden zu 300 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -18 °C tiefgefroren.

Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorperiode (an zehn Tagen je eine Analyse der Kontrollmaterialien) ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

11.1 Präzision

Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden die Qualitätskontrollmaterialien Q_{low} und Q_{high} an einem Tag sechsfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Daten zur Präzision in der Serie sind in [Tabelle 4](#) zusammengefasst.

Tab. 4 Präzision in der Serie für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg Se/l]	Gemessene Konzentration [µg Se/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Selenit	0,75	0,77	5,3	13,6
	7,5	7,46	4,5	11,6
Selenat	0,75	0,78	6,6	17,0
	7,5	7,69	3,9	10,0

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Selenit und Selenat wurde vom Prüfer der Methode ermittelt. Hierzu wurde undotierter und mit 2,5 µg/l sowie 10 µg/l Selenit bzw. Selenat (als Selen berechnet) dotierter Poolurin an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag sind in [Tabelle 5](#) zusammengestellt.

Tab. 5 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg Se/l]	Gemessene Konzentration [µg Se/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Selenit	0,0	0,24	8,1	20,8
	2,5	2,92	11,8	30,3
	10,0	10,7	10,2	26,2
Selenat	0,0	0,93	5,6	14,4
	2,5	3,37	10,3	26,5
	10,0	9,16	9,6	24,7

11.2 Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden Individualurine (Kreatiningehalt im Bereich von 0,25–2,21 g/l) von zehn Personen mit jeweils 2 µg/l (Selenit und Selenat, als Selen berechnet) dotiert, aufgearbeitet und vermessen. Zusätzlich wurden die Urine undotiert aufgearbeitet und analysiert. Die Berechnung der relativen Wiederfindung erfolgte anhand der ermittelten Gehalte in den dotierten Urinen unter Abzug eventueller Hintergrundgehalte der Analyten in den undotierten Urinen. Die so erhaltenen relativen Wiederfindungsraten sind in [Tabelle 6](#) aufgeführt.

Tab. 6 Mittlere relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von Selenit und Selenat in zehn Individualurinen

Analyt	Dotierte Konzentration [µg Se/l]	Mittlere rel. Wiederfindung r [%]	Bereich [%]
Selenit	2,0	111	105–118
Selenat	2,0	115	103–125

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach DIN 32645 (DIN 2008). Hierzu wurde eine äquidistante 10-Punkt-Kalibrierung erstellt und zusammen mit einem Leerwert (Poolurin ohne Dotierung) aufgearbeitet und vermessen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen sich nach DIN 32645 aus den Standardabweichungen der erhaltenen Kalibrierfunktionen. [Tabelle 7](#) zeigt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Selenit und Selenat.

Tab. 7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von Selenit und Selenat in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg Se/l]	Bestimmungsgrenze [µg Se/l]
Selenit	0,19	0,57
Selenat	0,10	0,30

11.4 Störeinflüsse

Im Zuge der Methodenentwicklung zeigte sich, dass der Selenitgehalt in einigen frisch gewonnenen Urinproben innerhalb weniger Stunden deutlich abnahm. Bei wiederholter Messung dieser frischen Urinproben, die mit Selenit dotiert waren (25 µg/l als Selen berechnet), verringerten sich die Peakflächen des Selenits nach fünfstündiger Lagerung bei Raumtemperatur um 60 %, ohne dass ein Abbauprodukt als neuer Peak im Chromatogramm erschien. Der Gesamtgehalt an Selen in den gelagerten Proben blieb konstant. Wurde Poolurin, der zuvor 48 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt wurde, dotiert und nach Lagerung bei Raumtemperatur analysiert, wurde kein Abbau des Selenits beobachtet (siehe [Abbildungen 5 und 6](#)).

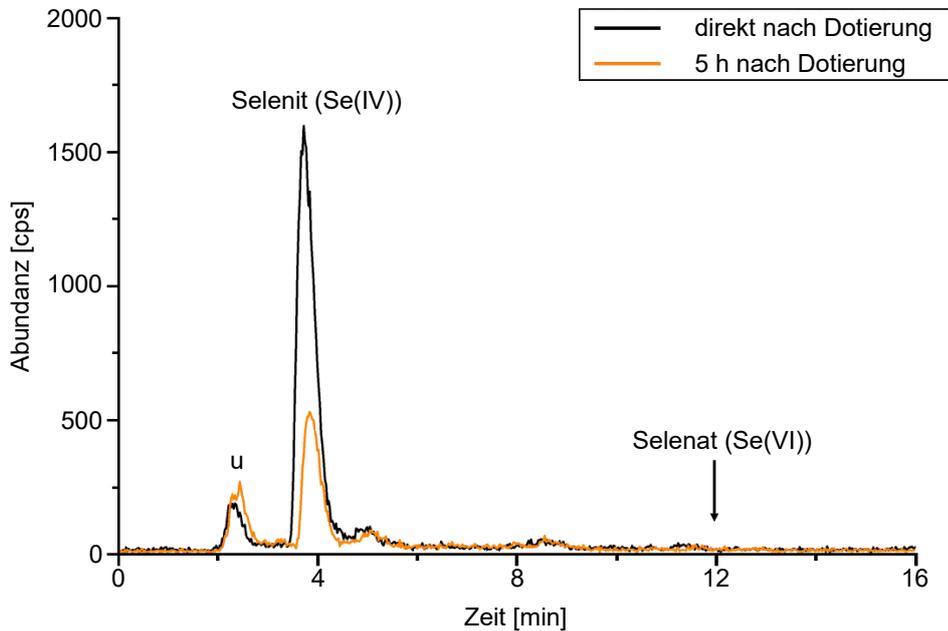


Abb. 5 Chromatogramm einer mit Selenit (25 µg Se/l) dotierten Urinprobe (schwarz: direkt nach Dotierung; orange: Messung nachdem die Probe für 5 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler gelagert wurde; u = unbekannte Selenpezies der Hintergrundbelastung)

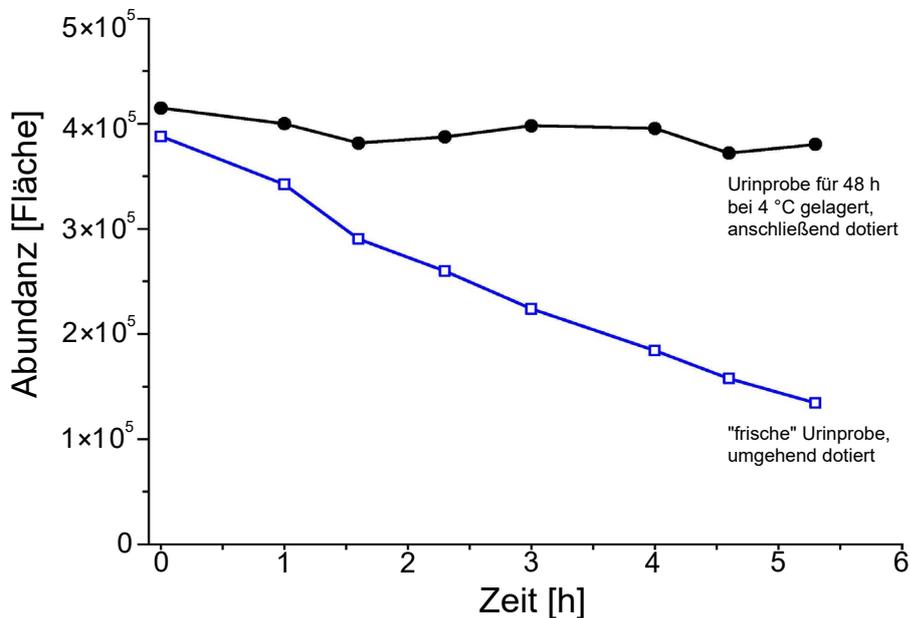


Abb. 6 Peakfläche des Selenits während der Probenlagerung bei Raumtemperatur (frische bzw. 48 h zuvor im Kühlschrank gelagerte Urinprobe, jeweils mit Selenit (25 µg Se/l) dotiert)

Die Instabilität von Selenit in Urinproben wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Eichler et al. 2015; Gammelgaard und Jøns 2000; Gómez et al. 1998). In Poolurin, der mit Selenit (20 µg Se/l) dotiert wurde, fanden Gammelgaard und Jøns (2000) innerhalb von 24 Stunden einen Verlust von 5%. Ein Verlust von 30% des in Urin

dotierten Selenits (100 bzw. 200 µg Se/l) innerhalb von fünf Stunden wurde von Gómez et al. (1998) beschrieben. Die Stabilität verschiedener Selenspezies in Urin bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen wurde von Eichler et al. (2015) untersucht. Während Selenat selbst bei Raumtemperatur über einen Lagerungszeitraum von zehn Wochen stabil war, war das zugesetzte Selenit bei Raumtemperatur, -5 °C sowie -35 °C nach drei Tagen fast vollständig abgebaut. Eine detaillierte Lagerungsstudie ergab, dass Urinproben für die Selenitbestimmung direkt nach Probenahme eingefroren und innerhalb von zwölf Stunden analysiert werden sollten. Bei Raumtemperatur müssen die Urinproben innerhalb von drei Stunden analysiert sein, wenn Selenit bestimmt werden soll.

Eine mögliche Erklärung für die Instabilität des Selenits ist, dass diese Spezies durch in der Urinmatrix vorkommende Reduktionsmittel wie z. B. Ascorbinsäure zu elementarem Selen reduziert wird (Biswas et al. 2011; Jäger 2014) und somit nicht mit der jeweils verwendeten Biomonitoringmethode erfasst werden kann. Hingegen gehen Gómez et al. (1998) von einer Adsorption des Selenits an organische Kolloide aus, die sich mit der Zeit im Urin bilden und von der HPLC-Säule zurückgehalten werden.

Für die Anwendung dieser Methode bedeutet dies, dass die Urinproben, in denen Selenit bestimmt werden soll, innerhalb von drei Stunden nach Probenahme analysiert werden sollten. Der Einfluss des Einfrierens und Auftauens der Urinproben bzw. der Zusatz möglicher Additive zur Stabilisierung des Selenitgehaltes ist von den Entwicklern der Methode nicht untersucht worden.

12 Diskussion der Methode

Die Methode ermöglicht die selektive und sensitive Erfassung von Selenit und Selenat in menschlichem Urin. Die als Fließmittel verwendete Diammoniumoxalat-Lösung (10 mmol/l) mit 2 % Methanolanteil und einem pH-Wert von 5,0 ermöglicht die Trennung von Selenit und Selenat innerhalb von 18 Minuten ohne Störung durch andere Selenspezies. Das angewandte Verfahren zeichnet sich durch einen geringen Aufwand hinsichtlich der Probenaufarbeitung aus, da die Proben nur 1:1 mit Fließmittel verdünnt und anschließend direkt analysiert werden. Die Bestimmungsgrenzen von Selenit und Selenat liegen bei 0,57 µg bzw. 0,30 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und sind somit ausreichend, um auch geringe Selenit- bzw. Selenatgehalte in Urin zu erfassen.

Untersuchungsergebnisse weisen aber darauf hin, dass sowohl Selenit als auch Selenat nur nach spezifischer Selenit- bzw. Selenat-Exposition substantiell zum Gesamtgehalt an Selen in Urinproben beitragen.

Verwendete Messgeräte HPLC-Anlage Agilent 1200 Serie mit binärer Pumpe (G1312A) und Autosampler (G1329A) (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn) sowie Agilent 7500cx induktiv-gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer mit Kollisions-/Reaktionszelle (Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. 19. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Birringer M, Pilawa S, Flohé L (2002) Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 19(6): 693–718. <https://doi.org/10.1039/B205802M>
- Biswas KC, Barton LL, Tsui WL, Shuman K, Gillespie J, Eze CS (2011) A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial reduction of selenite. *J Microbiol Methods* 86(2): 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.009>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111(38): A1583–A1618
- Butterman WC, Brown RD Jr (2004) Selenium. Mineral commodity profiles. Open-File Report 03–018. Reston: United States Geological Survey (USGS). <https://pubs.usgs.gov/of/2003/of03-018/of03-018.pdf>, abgerufen am 28 Jan 2022
- Combs GF Jr (2001) Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85(5): 517–547. <https://doi.org/10.1079/BJN2000280>
- Cornelis R, Borguet F, De Kimpe J (1993) Trace elements in medicine. Speciation: the new frontier. *Anal Chim Acta* 283(1): 183–189. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85221-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)85221-5)
- D-A-CH (Deutsche Gesellschaft für Ernährung; Österreichische Gesellschaft für Ernährung; Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung; Schweizerische Vereinigung für Ernährung), Hrsg (2016) Selen. In: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2. Aufl. Frankfurt am Main: Umschau Braus GmbH Verlagsgesellschaft
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Hrsg (2021) MAK- und BAT-Werte-Liste 2021. Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 57. Düsseldorf: German Medical Science. https://doi.org/10.34865/mbwl_2021_deu
- DIN (Deutsches Institut für Normung), Hrsg (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin: Beuth. <https://doi.org/10.31030/1465413>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2022) Substance infocard – Selenium. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substance-info/100.029.052>, abgerufen am 28 Jan 2022
- Eichler Š, Kaňa A, Kalousová M, Vosmanská M, Korotvička M, Zima T, Mestek O (2015) Speciation analysis of selenium in human urine by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for monitoring of selenium in body fluids. *Chem Speciation Bioavailability* 27(3): 127–138. <https://doi.org/10.1080/09542299.2015.1107502>
- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R (2011) Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 14(7): 1337–1383. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3275>
- Francesconi KA, Pannier F (2004) Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status. *Clin Chem* 50(12): 2240–2253. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.039875>
- Gammelgaard B, Jøns O (2000) Determination of selenite and selenate in human urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 15(8): 945–949. <https://doi.org/10.1039/B003637O>
- Gammelgaard B, Stürup S, Christensen MV (2012) Human urinary excretion and metabolism of ⁸²Se-enriched selenite and selenate determined by LC-ICP-MS. *Metallomics* 4(2): 149–155. <https://doi.org/10.1039/c2mt00163b>
- Ganther HE (1986) Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J Am Coll Toxicol* 5(1): 1–5. <https://doi.org/10.3109/10915818609140731>
- Glover JR (1967) Selenium in human urine: a tentative maximum allowable concentration for industrial and rural populations. *Ann Occup Hyg* 10(1): 3–14. <https://doi.org/10.1093/annhyg/10.1.3>
- Göen T, Greiner A (2018) Human biomonitoring of selenium exposure. In: Michalke B, Hrsg. Selenium. Molecular and integrative toxicology. Cham: Springer International Publishing. S. 467–494. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95390-8_24
- Göen T, Schaller B, Jäger T, Bräu-Dümler C, Schaller KH, Drexler H (2015) Biological monitoring of exposure and effects in workers employed in a selenium-processing plant. *Int Arch Occup Environ Health* 88(5): 623–630. <https://doi.org/10.1007/s00420-014-0989-7>
- Gómez MM, Gasparic T, Palacios MA, Camara C (1998) Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation–atomic absorption spectrometric detection. *Anal Chim Acta* 374(2–3): 241–251. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00417-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00417-6)
- Greiner A, Hildebrand J, Feltes R, Uter W, Drexler H, Göen T (2020) Evaluation of urinary selenium as a biomarker of human occupational exposure to elemental and inorganic selenium. *Int Arch Occup Environ Health* 93(3): 325–335. <https://doi.org/10.1007/s00420-019-01489-2>
- Greiner A, Drexler H, Hartwig A, MAK Commission (2021) Selen und seine anorganischen Verbindungen – Addendum zur Ableitung von BAR. Beurteilungswerte in biologischem Material. *MAK Collect Occup Health Saf* 6(3): Doc064. https://doi.org/10.34865/bb778249d6_3ad

- Hartwig A, Hrsg (2011) Selen und seine anorganischen Verbindungen. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 51. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb778249verd0051>
- Hartwig A, Hrsg (2014) Selen und seine anorganischen Verbindungen. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 56. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb778249verd0056>
- Hildebrand J, Greiner A, Drexler H, Göen T (2020) Determination of eleven small selenium species in human urine by chromatographic-coupled ICP-MS methods. *J Trace Elem Med Biol* 61: 126519. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126519>
- Horng CJ, Tsai JL, Lin SR (1999) Determination of urinary arsenic, mercury, and selenium in steel production workers. *Biol Trace Elem Res* 70(1): 29–40. <https://doi.org/10.1007/BF02783847>
- Jäger T (2014) Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Bestimmung von Selen-Spezies in human-biologischem Material. Dissertation. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/frontdoor/deliver/index/docId/5052/file/ThomasJ%c3%a4gerDissertation.pdf>, abgerufen am 05 Apr 2022
- Jäger T, Drexler H, Göen T (2013) Ion pairing and ion exchange chromatography coupled to ICP-MS to determine selenium species in human urine. *J Anal At Spectrom* 28(9): 1402–1409. <https://doi.org/10.1039/c3ja50083g>
- Jäger T, Drexler H, Göen T (2016) Human metabolism and renal excretion of selenium compounds after oral ingestion of sodium selenite and selenized yeast dependent on the trimethylselenium ion (TMSe) status. *Arch Toxicol* 90(5): 1069–1080. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1548-z>
- Jiang S, Robberecht H, Vanden Berghe D (1983) Elimination of selenium compounds by mice through formation of different volatile selenides. *Experientia* 39(3): 293–294. <https://doi.org/10.1007/BF01955311>
- Kiss T, Odani A (2007) Demonstration of the importance of metal ion speciation in bioactive systems. *Bull Chem Soc Jpn* 80(9): 1691–1702. <https://doi.org/10.1246/bcsj.80.1691>
- Kremer D, Ilgen G, Feldmann J (2005) GC–ICP–MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of ⁷⁷Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium. *Anal Bioanal Chem* 383(3): 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0001-1>
- Kuehnelt D, Kienzl N, Traar P, Le NH, Francesconi KA, Ochi T (2005) Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: a quantitative case study by HPLC/ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 383(2): 235–246. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0007-8>
- Kuehnelt D, Juresa D, Kienzl N, Francesconi KA (2006) Marked individual variability in the levels of trimethylselenonium ion in human urine determined by HPLC/ICPMS and HPLC/vapor generation/ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 386(7–8): 2207–2212. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0848-9>
- Lajin B, Kuehnelt D, Jensen KB, Francesconi KA (2016) Investigating the intra-individual variability in the human metabolic profile of urinary selenium. *J Trace Elem Med Biol* 37: 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.06.008>
- Lu J, Holmgren A (2009) Selenoproteins. *J Biol Chem* 284(2): 723–727. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800045200>
- Lund W (1990) Speciation analysis – why and how? *Fresenius J Anal Chem* 337(5): 557–564. <https://doi.org/10.1007/BF00322862>
- Michalke B (2002 a) The coupling of LC to ICP-MS in element speciation – Part II: Recent trends in application. *Trends Analyt Chem* 21(3): 154–165. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00303-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00303-5)
- Michalke B (2002 b) The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects. *Trends Analyt Chem* 21(2): 142–153. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00146-7)
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C (2008) Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* 400(1–3): 115–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024>
- Nuttall KL (2006) Evaluating selenium poisoning. *Ann Clin Lab Sci* 36(4): 409–420
- Ohta Y, Suzuki KT (2008) Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium. *Toxicol Appl Pharmacol* 226(2): 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.09.011>
- Rajotte BJP, P'an AYS, Malick A, Robin J-P (1996) Evaluation of selenium exposure in copper refinery workers. *J Toxicol Environ Health* 48(3): 239–251. <https://doi.org/10.1080/009841096161311>
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356(9225): 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02490-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02490-9)
- Rayman MP (2012) Selenium and human health. *Lancet* 379(9822): 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
- Rettenmeier AW (2013) Selen und seine anorganischen Verbindungen. In: Drexler H, Hartwig A, Hrsg. Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte), Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), Biologische Leitwerte (BLW) und Biologische Arbeitsstoff-Referenzwerte (BAR). 18. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bb778249verd0018>
- RKI (Robert Koch-Institut) (2006) Selen in der Umweltmedizin: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 49(1): 88–101. <https://doi.org/10.1007/s00103-005-1185-4>
- RÖMPP-Redaktion, Hartwig A (2006) Selen. <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-19-01826>, abgerufen am 21 Feb 2022

- SCF (Scientific Committee on Food) (2006) Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Parma: EFSA. https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf, abgerufen am 28 Jan 2022
- WHO (World Health Organization) (1987) Selenium. Environmental health criteria, No. 58. Geneva: WHO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37268/9241542586-eng.pdf?sequence=1%26isAllowed=y>, abgerufen am 21 Feb 2022
- Zheng J, Ohata M, Furuta N (2002) Reversed-phase liquid chromatography with mixed ion-pair reagents coupled with ICP-MS for the direct speciation analysis of selenium compounds in human urine. *J Anal At Spectrom* 17(7): 730–735. <https://doi.org/10.1039/b202531k>