

# Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenozucker 1, Selenozucker 2, Selenomethionin, Selenoethionin, methylseleniger Säure, Se-Methylselenocystein und Se-Methylselenoglutathion in Urin mittels Umkehrphasen-Chromatographie-ICP-MS

## Keywords

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

## Biomonitoring-Methode

J. Hildebrand<sup>1</sup>

T. Jäger<sup>1</sup>

T. Göen<sup>1,3,\*</sup>

B. Michalke<sup>2</sup>

A. Hartwig<sup>4,\*</sup>

MAK Commission<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup> Methodenentwicklung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen

<sup>2</sup> Methodenprüfung, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Abteilung Analytische BioGeoChemie, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 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

<sup>5</sup> Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

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

## Citation Note:

Hildebrand J, Jäger T, Göen T, Michalke B, Hartwig A, MAK Commission. Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenozucker 1, Selenozucker 2, Selenomethionin, Selenoethionin, methylseleniger Säure, Se-Methylselenocystein und Se-Methylselenoglutathion in Urin mittels Umkehrphasen-Chromatographie-ICP-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Jun;7(2):Doc039. [https://doi.org/10.34865/bi778249bd7\\_2or](https://doi.org/10.34865/bi778249bd7_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/).



## 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 relevant weakly polar or ionic organic selenium species in urine. They are separated by reversed-phase chromatography and subsequently detected using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Calibration is performed using standard solutions prepared in pooled urine, which are processed and analysed analogously to the samples. The analytical method allows for the selective and sensitive determination of seven selenium species without interferences by other species. The limits of quantitation for the determination of the individual species lie between 0.18 µg/l and 0.34 µg/l urine (as selenium) and are thereby sufficient to measure exposure levels which exceed the background exposure of the general population.

## 1 Kenndaten der Methode

<b>Matrix</b>	Urin
<b>Analytisches Messprinzip</b>	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	Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno- $\beta$ -D-galactopyranosid (Selenozucker 1, SeSug 1)	526222-32-2
		Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno- $\beta$ -D-glucoopyranosid (Selenozucker 2, SeSug 2)	408345-09-5
		Selenomethionin (SeMet)	1464-42-2
		Selenoethionin (SeEt)	6810-64-6
		Methylselenige Säure (MeSeA)	28274-57-9
		Se-Methylselenocystein (MeSeC)	26046-90-2
		Se-Methylselenoglutathion (MeSeG)	1207380-89-9

## Zuverlässigkeitskriterien

### Selenozucker 1 (SeSug 1)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,1\%$ bzw. $5,8\%$
	Streubereich	$u = 23,4\%$ bzw. $14,9\%$
bei einer Konzentration von $1,3\ \mu\text{g}$ bzw. $4,9\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,4\%$
	Streubereich	$u = 11,8\%$
bei einer Konzentration von $5\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 95,4\%$
bei einer dotierten Konzentration von $1,2\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 11$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,10 $\mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,30 $\mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Selenozucker 2 (SeSug 2)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,6\%$ bzw. $5,2\%$
	Streubereich	$u = 27,2\%$ bzw. $13,4\%$
bei einer Konzentration von $1,2\ \mu\text{g}$ bzw. $4,3\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		

Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 1,7\%$
	Streubereich	$u = 4,4\%$
	bei einer Konzentration von 5 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 98,9\%$
	bei einer dotierten Konzentration von 1,1 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 11 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,12 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,34 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Selenomethionin (SeMet)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,0\%$ bzw. 4,7 %
	Streubereich	$u = 25,7\%$ bzw. 12,1 %
	bei einer Konzentration von 0,8 µg bzw. 3,7 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,5\%$
	Streubereich	$u = 14,1\%$
	bei einer Konzentration von 5 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 97,4\%$
	bei einer dotierten Konzentration von 0,8 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 11 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,06 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,18 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Selenoethionin (SeEt)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,1\%$ bzw. 3,6 %
	Streubereich	$u = 23,4\%$ bzw. 9,26 %
	bei einer Konzentration von 0,9 µg bzw. 4,3 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%$
	Streubereich	$u = 12,6\%$
	bei einer Konzentration von 5 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 6 Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 97,7\%$
	bei einer dotierten Konzentration von 0,9 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und n = 11 Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	0,08 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,22 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Methylselenige Säure (MeSeA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,9\%$ bzw. $6,1\%$
	Streubereich	$u = 25,5\%$ bzw. $15,7\%$
bei einer Konzentration von $1,2\ \mu\text{g}$ bzw. $4,7\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,4\%$
	Streubereich	$u = 11,3\%$
bei einer Konzentration von $5\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 110\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,8\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 11$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,13\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	$0,33\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Se-Methylselenocystein (MeSeC)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,6\%$ bzw. $4,1\%$
	Streubereich	$u = 19,5\%$ bzw. $10,5\%$
bei einer Konzentration von $1,0\ \mu\text{g}$ bzw. $4,1\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,6\%$
	Streubereich	$u = 11,8\%$
bei einer Konzentration von $5\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 107\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $0,9\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 11$ Bestimmungen	
Nachweisgrenze:	$0,08\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	$0,22\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

<sup>a)</sup> Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

### Se-Methylselenoglutathion (MeSeG)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,6\%$ bzw. $7,0\%$
	Streubereich	$u = 17,0\%$ bzw. $18,0\%$
bei einer Konzentration von $1,1\ \mu\text{g}$ bzw. $5,3\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag <sup>a)</sup> :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 7,4\%$
	Streubereich	$u = 19,0\%$
bei einer Konzentration von $5\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 86,0\%$
	bei einer dotierten Konzentration von $1,3\ \mu\text{g}$ pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 11$ Bestimmungen	

Nachweisgrenze: 0,07 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)

Bestimmungsgrenze: 0,21 µg pro Liter Urin (als Selen berechnet)

<sup>a)</sup> 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  $162 \pm 9$  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 Selausscheidung 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** Selenskonzentrationen im Urin nach beruflicher Exposition

Kollektiv (Probenanzahl n)	Probenmatrix	Selen (MW ± SD (Bereich))		Literatur
		Beschäftigte	Kontrollen	
Selenverarbeitender Betrieb, Deutschland (20; 20 Kontrollen)	Urin (Nachschicht)	107 µg/g Kreatinin (16–816 µg/g Kreatinin) <sup>a)</sup>	23 µg/g Kreatinin (12–50 µg/g Kreatinin) <sup>a)</sup>	Göen et al. 2015
Selenverarbeitender Betrieb, Deutschland (14; 18 Kontrollen)	Urin (Vorschicht)	50,6 µg/g Kreatinin (20,7–253 µg/g Kreatinin) <sup>a)</sup>	18,7 µg/g Kreatinin (9,20–40,6 µg/g Kreatinin) <sup>a)</sup>	Greiner et al. 2020
	Urin (Nachschicht)	71,8 µg/g Kreatinin (22,1–340 µg/g Kreatinin) <sup>a)</sup>		
Herstellung von Selen-Gleichrichtern, England (1517 Proben von 200–300 Arbeitern; 793 Kontrollen)	Urin	84 µg/l	34 ± 24 µg/l (0–150 µg/l)	Glover 1967

Tab. 1 (Fortsetzung)

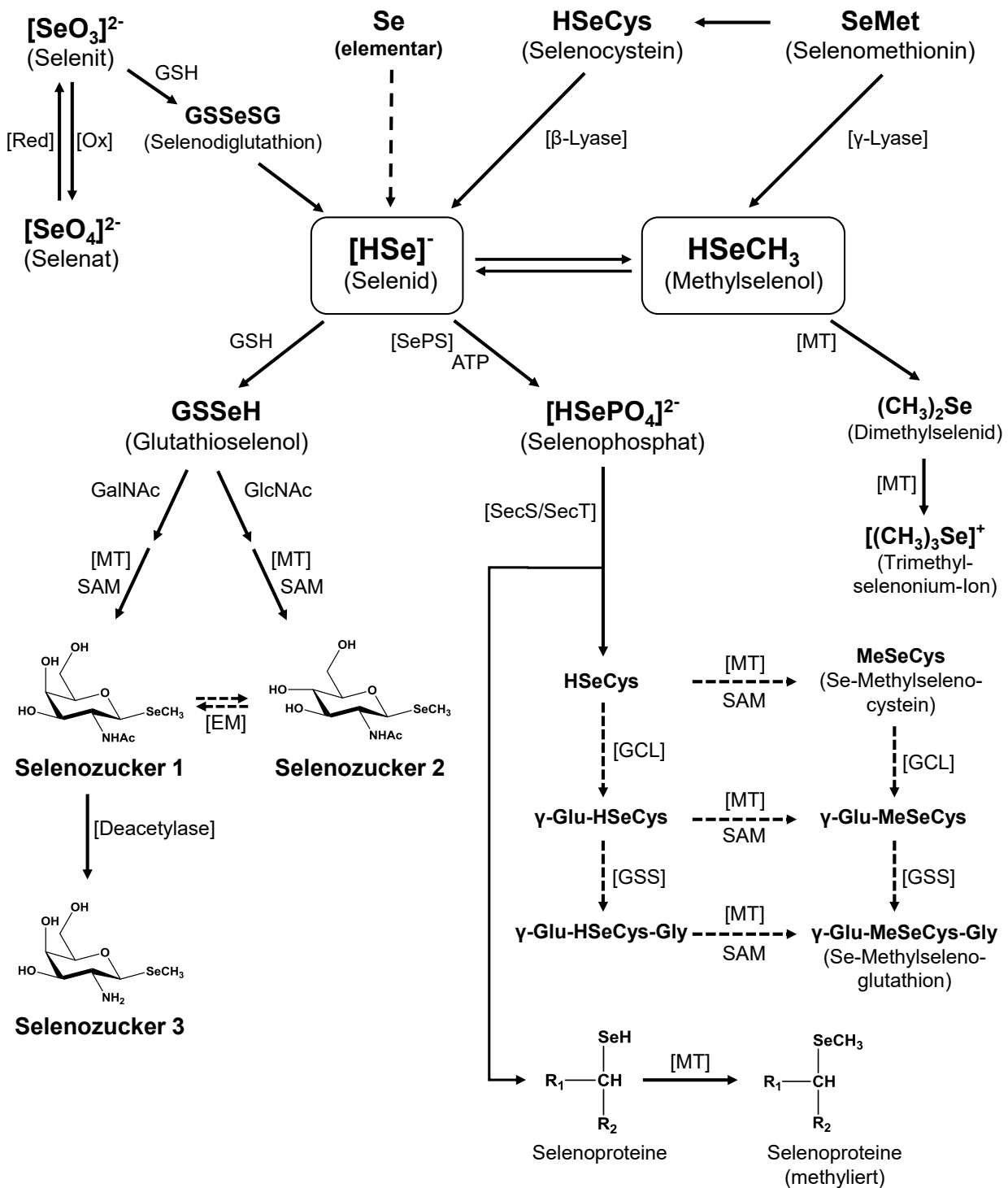
Kollektiv (Probenanzahl n)	Probenmatrix	Selen (MW $\pm$ SD (Bereich))		Literatur
		Beschäftigte	Kontrollen	
Kupferraffinerie, Kanada (20)	Urin	92,9 $\pm$ 42,8 $\mu$ g/l (34,0–190 $\mu$ g/l)	74,6 $\pm$ 25,3 $\mu$ g/l (26,7–118 $\mu$ g/l)	Rajotte et al. 1996
Stahlproduktion, Taiwan (23; 23 Kontrollen)	Urin	67,7 $\pm$ 27,4 $\mu$ g/l (24,1–114 $\mu$ g/l)	33,2 $\pm$ 12,9 $\mu$ g/l (13,0–58,9 $\mu$ g/l)	Horng et al. 1999

<sup>a)</sup> Median (Bereich)

Für Selen und seine anorganischen Verbindungen hat die Kommission einen Biologischen Arbeitsstofftoleranzwert (BAT-Wert) von 150  $\mu$ g Selen/l Plasma und eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) von 0,02 mg Selen/m<sup>3</sup> 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  $\mu$ g 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).

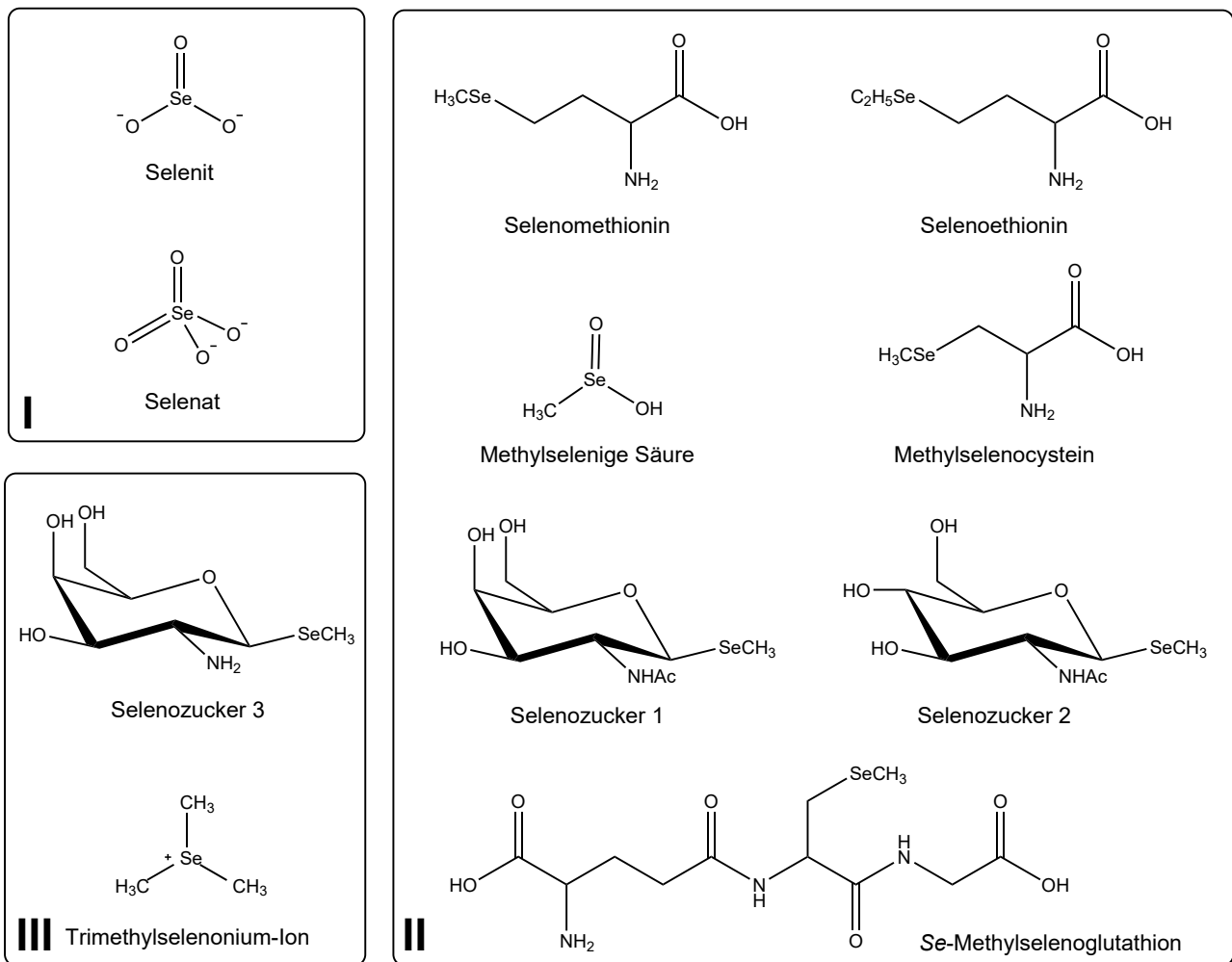
Die aufgenommenen anorganischen und organischen Selenverbindungen werden zu Selenid reduziert, wobei diese Reaktion bei Seleniten und Selenaten glutathionabhängig verläuft. Selenid ist die zentrale metabolische Selenspezies (siehe [Abbildung 1](#)) und dient als gemeinsame Quelle für die Synthese von 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- $\beta$ -D-galactopyranosid (SeSug 1), Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno- $\beta$ -D-glucopyranosid (SeSug 2) und Methyl-2-amino-2-desoxy-1-seleno- $\beta$ -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.



**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<sup>Sec</sup>-Selentransferase; SePS: Selenophosphatsynthetase

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 Selenpezies 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 Selenpezies dargestellt.



**Abb. 2** Strukturen der mit den drei Teilmethoden bestimmbaren Selenpezies

Die Bestimmung von SeSug 1, SeSug 2, SeMet, SeEt, MeSeA, MeSeC und MeSeG erfolgt mittels Umkehrphasen-Chromatographie und ist in der hier dargestellten Teilmethode II beschrieben.

In der Allgemeinbevölkerung stellt SeSug 1 die in der höchsten Konzentration im Urin vorkommende Selenpezies dar. So ließ sich SeSug 1 in allen der von Jäger et al. (2013) analysierten Urinproben der deutschen Allgemeinbevölkerung nachweisen (Median: 1,44 µg Se/l; Bereich: 0,13–5,05 µg Se/l; n = 47). Diese Konzentrationen entsprechen den von Letsiou et al. (2007) sowie Lu et al. (2012) publizierten Werten von 1,3 µg Se/l (n = 1) sowie < 0,6–1,3 µg Se/l (n = 2). Die von Lajin et al. (2016) publizierten Hintergrundgehalte in Österreich lagen geringfügig über diesen Werten (Median: 3,7 µg Se/l; Bereich: 0,9–24,4 µg Se/l; n = 8). Nach Supplementierung steigt die Ausscheidung von SeSug 1 deutlich an: nach oraler Aufnahme von 200 µg Selen (Nahrungsergänzungsmittel, nicht spezifiziert) auf 62 µg Se/l (n = 1) (Letsiou et al. 2007), von 200 µg Se als Selenhefe auf 11,0–31,2 µg Se/l (n = 2) (Lu et al. 2012) und von 200 µg bzw. 400 µg Selen als Selenit auf



mittlere Gehalte von 22,5 bzw. 80,8 µg Se/l (n=8) (Lajin et al. 2016). Bei noch höheren Selenitdosen (1000 µg Selen als Selenit) steigen die Gehalte an SeSug 1 im Urin weiter an (Median: 218 µg Se/l; n=1) (Kuehnelt et al. 2005).

In einer Studie mit einem Probanden lag die Konzentration des SeSug 2 im Urin zu Beginn unterhalb der Nachweisgrenze und stieg nach oraler Gabe von 1000 µg Selen (als Natriumselenit, L-SeMet, DL-SeMet) auf 1,9 bis 3,8 µg Se/l an (Kuehnelt et al. 2005).

Die MeSeA wird nicht als Stoffwechselprodukt mit dem Urin ausgeschieden, sondern entsteht durch oxidativen Abbau des SeSug 1 im Urin (Hildebrand et al. 2020; Ogra et al. 2003). Bislang sind noch keine Daten zu MeSeA-Konzentrationen in nativen Urinproben publiziert.

Der Hintergrundgehalt an SeMet wurde in mehreren Studien untersucht, jedoch lagen die Konzentrationen im Urin stets unterhalb der Nachweisgrenze (Gómez-Ariza et al. 2000; Jäger et al. 2013; Lu et al. 2012; Mao et al. 2012; Zheng et al. 2002). Nach Selensupplementierung konnte SeMet jedoch im unteren µg/l-Bereich im Urin nachgewiesen werden. So wurde SeMet nach Supplementierung mit 100 µg Selen als Selenat bzw. 100 µg Selen als Selenhefe im Urin nachgewiesen, wobei die Gehalte zwischen der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze lagen (Eichler et al. 2015). SeMet wurde nach Gabe von 400 µg DL-SeMet in einer Konzentration von etwa 11 µg Se/l (Cao et al. 2001) und nach Gabe von 1000 µg DL-SeMet in einer Konzentration von 21 µg Se/l (Kuehnelt et al. 2005) nachgewiesen.

SeEt wurde in Urinproben der Allgemeinbevölkerung bislang nicht (Jäger et al. 2013) oder nur in geringen Konzentrationen, die zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen (Zheng et al. 2002), nachgewiesen.

MeSeC wurde im Urin der beruflich nicht belasteten sowie nicht Selen-supplementierten Allgemeinbevölkerung entweder nicht (Mao et al. 2012) oder nur in sehr geringen Gehalten nachgewiesen. So ließ sich der Analyt in einer in Deutschland durchgeführten Studie in 9 von 47 Urinproben quantifizieren, wobei der Median bei 0,13 µg Se/l (Bereich: 0,03–0,41 µg Se/l) lag (Jäger et al. 2013). Nach Supplementierung steigt die MeSeC-Konzentration im Urin an: nach oraler Gabe von 100 µg Selen als Selenhefe auf im Mittel 3,68 µg Se/l (n=5) (Eichler et al. 2015) oder nach oraler Gabe von 200 µg Selen als MeSeC auf bis zu 6,8 µg Se/l (Kokarnig et al. 2015).

MeSeG wurde von Marschall et al. (2017) in *In-vitro*-Untersuchungen als Metabolit des MeSeC nachgewiesen. In einer in Deutschland durchgeführten Studie konnte es allerdings nicht in Urinproben der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen werden (Jäger et al. 2013).

### 3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene analytische Verfahren dient der Bestimmung relevanter organischer Selenspezies mit schwach polarem bzw. ionischem Charakter in Urin. Selenozucker 1, Selenozucker 2, Selenomethionin, Selenoethionin, methylselenige Säure, *Se*-Methylselenocystein und *Se*-Methylselenoglutathion werden mittels Umkehrphasen-Chromatographie getrennt und anschließend mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) quantifiziert. Die Kalibrierung erfolgt mit Standardlösungen, die in Poolurin angesetzt, 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: Phenomenex Luna C18(2) (150 × 4,6 mm; 3 µm) mit Phenomenex Security Guard System (C18; 4 × 3,0 mm) (z. B. Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- Ultraschallbad (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vortexmischer (z. B. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Präzisionswaage (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Zellulosefilter, 0,45 µm Porengröße, Membran aus gemischten Zelluloseestern (z. B. Merck KGaA, Darmstadt)
- 15- und 50-ml-Polypropylen-Röhrchen (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- 0,7-ml-Polypropylen-Mikrovials mit Schnappverschluss-Kappen (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 10-, 100- und 1000-ml-Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Verschiedene Pipetten und Multipetten<sup>®</sup> 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.

- Malonsäure zur Synthese (z. B. Nr. 800387, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methanol Supelco LiChrosolv<sup>®</sup> (z. B. Nr. 106035, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q<sup>®</sup> Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Poolurin von Personen, die weder beruflich gegen Selen exponiert sind noch Selen über Nahrungsergänzungsmitteln zu sich nehmen; für 48 h im Kühlschrank gelagert
- Argon 5.0 (Linde GmbH, Pullach)
- Wasserstoff 5.0 (Linde GmbH, Pullach)

## 4.3 Referenzmaterialien

- Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno-β-D-galactopyranosid > 95 % (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Methyl-2-acetamido-2-desoxy-1-seleno-β-D-glucopyranosid > 95 % (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Se-Methylselenogluthathion > 95 % (z. B. Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Se-Methylselenocysteinhydrochlorid (2-Amino-3-(methylselenyl)propionsäurehydrochlorid) ≥ 95 % (z. B. Nr. M6680, Merck KGaA, Darmstadt)
- Seleno-D,L-methionin (2-Amino-4-(methylselenyl)buttersäure) ≥ 99 % (z. B. Nr. S3875, Merck KGaA, Darmstadt)
- Seleno-D,L-ethionin (2-Amino-4-(ethylselenyl)buttersäure) ≥ 95 % (z. B. Nr. E5139, Merck KGaA, Darmstadt)
- Methylselenige Säure 95 % (z. B. Nr. 541281, Merck KGaA, Darmstadt)
- Selen-ICP-Standard Certipur<sup>®</sup>, SeO<sub>2</sub> in 2–3%iger HNO<sub>3</sub>, 1000 mg Se/l (z. B. Nr. 1.70350, Merck KGaA, Darmstadt)

## 4.4 Lösungen

- Malonsäurelösung (1 mol/l)  
In einen 100-ml-Messkolben werden 10,4 g Malonsäure eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Malonsäurelösung (4 mmol/l) mit 0,1 % Methanol  
Es werden etwa 900 ml hochreines Wasser in einem 1000-ml-Messkolben vorgelegt und mit 4 ml der Malonsäurelösung sowie 1 ml Methanol versetzt. Anschließend wird der Messkolben mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Das Fließmittel wird für jede Analyse frisch hergestellt, vor Verwendung filtriert und im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast.

## 4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg Se/l)  
Die in [Tabelle 2](#) angegebenen Mengen der Referenzsubstanzen werden in jeweils 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.

**Tab. 2** Molmassen und Einwaagen der Referenzsubstanzen für die Herstellung der jeweiligen Stammlösungen für die Bestimmung von SeSug 1, SeSug 2, SeMet, SeEt, MeSeA, MeSeC und MeSeG in Urin

Referenzsubstanz	Molmasse [g/mol]	Einwaage [mg]
SeSug 1	299,2	38
SeSug 2	299,2	38
SeMet	196,1	25
SeEt	209,1	26
MeSeA	127,0	16
MeSeC	214,1	27
MeSeG	369,3	47

- Arbeitslösungen (10 mg Se/l)  
Abhängig von den gemessenen Konzentrationen der Stammlösungen werden etwa 1000 µl der Stammlösungen 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 µl der Arbeitslösungen werden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend werden 300 µl hochreines Wasser hinzupipettiert und die Lösung wird gut gemischt.
- Dotierlösung II (0,1 mg Se/l)  
100 µl der Dotierlösung I werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 900 µl hochreinem Wasser versetzt und gemischt.

Die Stamm- und Arbeitslösungen der Analyten werden bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. In Hinsicht auf den SeSug 1 und den SeSug 2 hat sich der Anwender der Methode bei längerer Lagerungsdauer von der Stabilität der Analyten in den hergestellten Lösungen zu überzeugen. Die Konzentration der MeSeA kann durch Abbau des SeSug 1 und SeSug 2 zunehmen.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards werden die Dotierlösungen I und II gemäß dem in [Tabelle 3](#) 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. 3** Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen für die Bestimmung von SeSug 1, SeSug 2, SeMet, SeEt, MeSeA, MeSeC und MeSeG in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Poolurin [ml]	Konzentration [µg Se/l]
0	–	–		0
1	–	25		0,25
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 SeSug 1 und SeSug 2 sollten die Proben – sofern möglich – direkt nach Probenahme aufgearbeitet und analysiert werden. Ist dies nicht möglich, sollten die Urinproben nach Probenahme dunkel gelagert und eingefroren werden und so bald wie möglich analysiert werden. Der Anwender der Methode muss in diesem Fall Maßnahmen treffen, um die Stabilität des SeSug 1 und SeSug 2 in der Probe zu gewährleisten (siehe [Abschnitt 11.4](#)).

### 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 und mit der gleichen Menge Fließmittel versetzt. Die Probe wird für zehn Sekunden auf einem 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:	Phenomenex Luna C18(2) (150 × 4,6 mm; 3 µm) mit Phenomenex Security Guard System (C18; 4 × 3,0 mm)
Trennprinzip:	Umkehrphase-Chromatographie ( <i>Reversed-phase</i> )
Fließmittel:	Malonsäurelösung (4 mmol/l) mit 0,1 % Methanol

Flussrate:	0–8 min: 0,6 ml/min 8–16 min: 0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Laufzeit:	16 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 <sub>2</sub>
Flussrate Reaktions-/Kollisionsgas:	1,5 ml/min
Messmodus:	<i>Time Resolved Analysis</i>
Anzahl der Messungen pro Massenspur (Repetition):	1
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe <a href="#">Tabelle 4</a>

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 Messungen für diese Methode erfolgen im Kollisionszellenbetrieb unter Verwendung von Wasserstoff als Kollisionsgas. Grundsätzlich sollte das ICP-MS entsprechend den Herstellerangaben die tägliche Optimierungsroutine durchlaufen und die Spezifikationswerte erreichen, die je nach Gerätehersteller unterschiedlich sind. Für eine ausreichende chromatographische Auflösung sollte eine *Dwelltime* von 100–150 ms gewählt werden. Prinzipiell sind auch andere Zerstäuber zur Probenzuführung verwendbar. Die ausgewählten Massenspuren sind zusammen mit den Retentionszeiten in [Tabelle 4](#) zusammengefasst. Für die Quantifizierung wird die Massenspur <sup>78</sup>Se herangezogen.

**Tab. 4** Retentionszeiten und parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin

Analyt	Retentionszeit [min]	Analysierte Massenspur	Messzeit pro Massenspur [s]
MeSeC	3,4	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3
SeMet	4,8	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3
MeSeA	5,8	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3
SeSug 2	8,8	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3

Tab. 4 (Fortsetzung)

Analyt	Retentionszeit [min]	Analyalisierte Massenspur	Messzeit pro Massenspur [s]
SeEt	9,8	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3
SeSug 1	10,5	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> Se	0,3
MeSeG	11,6	<sup>78</sup> Se	0,5
		<sup>82</sup> 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 der Selenspezies erfolgt anhand der jeweiligen Retentionszeit. Die in [Tabelle 4](#) 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 der Urinprobe) mitgeführt. [Abbildung 3](#) zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer mit den mit dieser Methode erfassten Selenspezies dotierten Urinprobe.

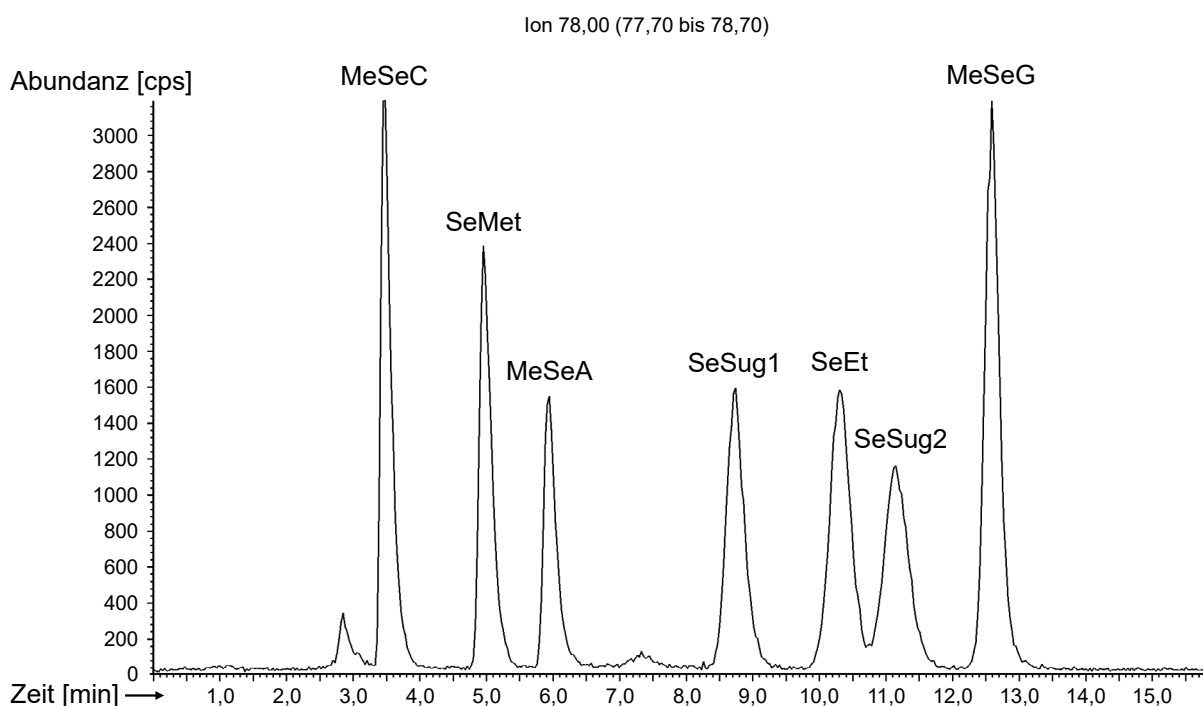
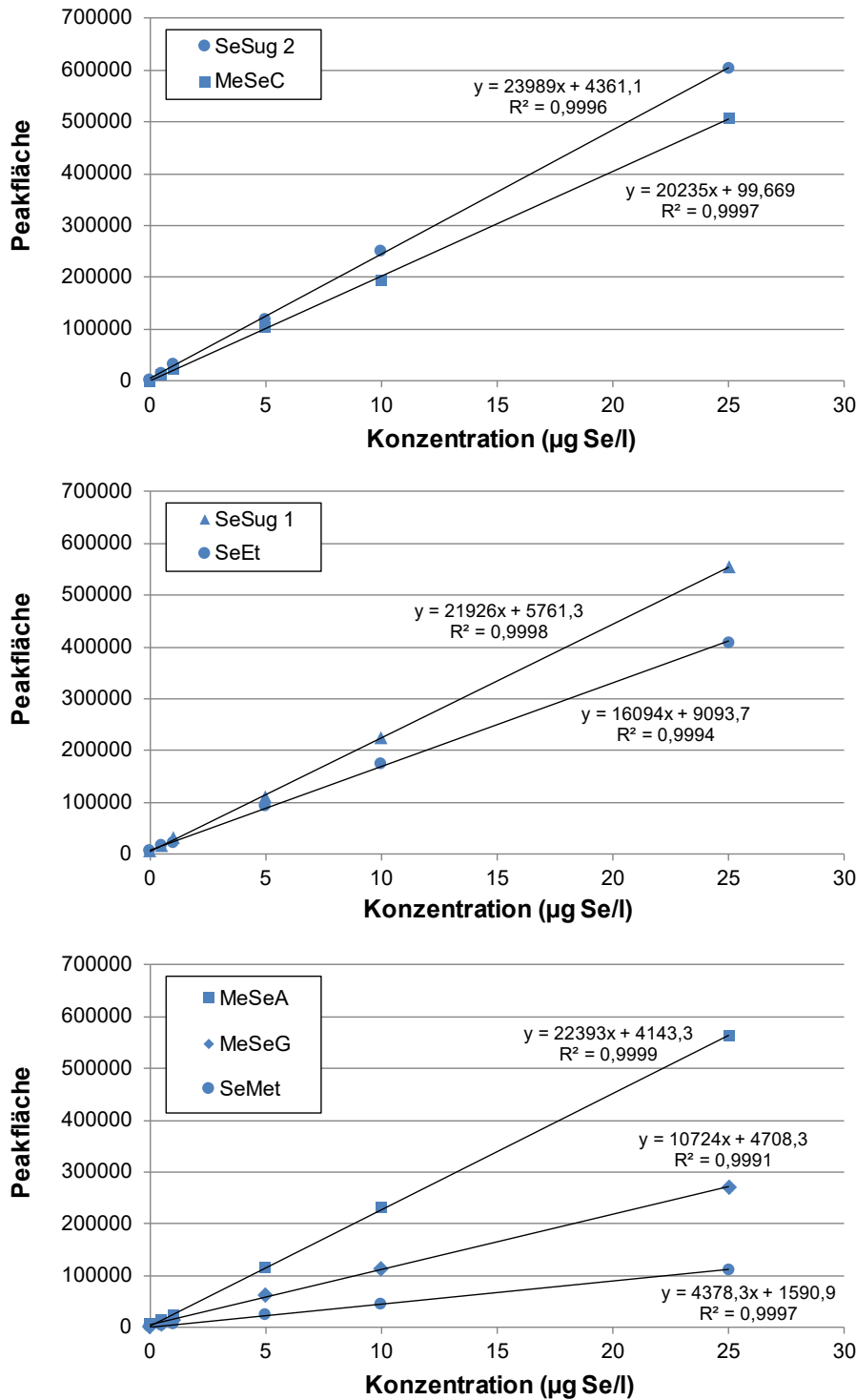


Abb. 3 Chromatogramm eines mit MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG dotierten Urins (jeweils 25 µg Se/l)

## 8 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards (siehe [Abschnitt 4.5](#)) werden analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Peakflächen der Analyten gegen die jeweilige Konzen-

tration der Kalibrierlösung aufgetragen werden. Die Kalibriergeraden der Selenpezies sind unter den beschriebenen Analysebedingungen von 0,25–25 µg/l (als Selen berechnet) linear. **Abbildung 4** zeigt beispielhaft Kalibriergeraden für die mit dieser Methode erfassbaren Selenpezies in Urin.



**Abb. 4** Kalibriergeraden für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin

## 9 Berechnung der Analysenergebnisse

Der Analytgehalt einer Probe in  $\mu\text{g/l}$  Urin (als Selen berechnet) kann durch Einsetzen der Peakfläche des jeweiligen Analyten in die zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion berechnet werden. 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  $1,0 \mu\text{g/l}$  (als Selen berechnet;  $Q_{\text{low}}$  – niedrige Qualitätskontrolle) bzw.  $4,0 \mu\text{g/l}$  (als Selen berechnet;  $Q_{\text{high}}$  – hohe Qualitätskontrolle) jeder Spezies dotiert. Die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien werden zu  $300 \mu\text{l}$  aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-18^\circ\text{C}$  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

Für die Bestimmung der Präzision in der Serie wurden die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien an einem Tag sechsfach parallel aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Daten zur Präzision in der Serie sind in [Tabelle 5](#) zusammengefasst.

**Tab. 5** Präzision in der Serie für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin ( $n = 6$ )

Analyt	Dotierte Konzentration [ $\mu\text{g Se/l}$ ]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
MeSeC	1,0	7,6	19,5
	4,1	4,1	10,5
SeMet	0,8	10,0	25,7
	3,7	4,7	12,1
MeSeA	1,2	9,9	25,5
	4,7	6,1	15,7
SeSug 2	1,2	10,6	27,3
	4,3	5,2	13,4



**Tab. 5** (Fortsetzung)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg Se/l]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
SeEt	0,9	9,1	23,4
	4,3	3,6	9,26
SeSug 1	1,3	9,1	23,4
	4,9	5,8	14,9
MeSeG	1,1	6,6	17,0
	5,3	7,0	18,0

### Präzision von Tag zu Tag

Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag wurden vom Prüfer der Methode erhoben. Die Urinproben wurden mit 5 µg/l jedes Analyten dotiert und an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die erhaltenen Daten sind in [Tabelle 6](#) zusammengestellt.

**Tab. 6** Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin (n = 6)

Analyt	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
MeSeC	4,6	11,8
SeMet	5,5	14,1
MeSeA	4,4	11,3
SeSug 2	1,7	4,4
SeEt	4,9	12,6
SeSug 1	5,4	13,9
MeSeG	7,4	19,0

### 11.2 Richtigkeit

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen, wurden zehn Individualurine mit den Selenspezies in einer Konzentration von 2 µg/l (als Selen berechnet) dotiert. 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 7](#) aufgeführt.

**Tab. 7** Relative Wiederfindungsraten für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin

Analyt	Mittlere rel. Wiederfindung $r$ [%]	Bereich [%]
MeSeC	107	104–109
SeMet	97,4	78,4–116
MeSeA	110	94,6–126
SeSug 2	98,9	90,8–107
SeEt	97,7	92,0–103
SeSug 1	95,4	74,8–116
MeSeG	86,0	82,8–89,2

### 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. [Tabelle 8](#) zeigt die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die mit dieser Methode erfassbaren Selenspezies.

**Tab. 8** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von MeSeC, SeMet, MeSeA, SeSug 2, SeEt, SeSug 1 und MeSeG in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg Se/l]	Bestimmungsgrenze [µg Se/l]
MeSeC	0,08	0,22
SeMet	0,06	0,18
MeSeA	0,13	0,33
SeSug 2	0,12	0,34
SeEt	0,08	0,22
SeSug 1	0,10	0,30
MeSeG	0,07	0,21

### 11.4 Störeinflüsse

Die Entwickler der Methode haben bei der Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag für die Analyten SeSug 1, SeSug 2 und MeSeA eine größere Streuung der Messwerte gefunden als der Prüfer der Methode. Die schlechteren Präzisionsdaten sind wahrscheinlich auf die Zersetzung des SeSug 1 und SeSug 2 unter Bildung von MeSeA als Zersetzungsprodukt zurückzuführen. Bei einer Zersetzung des SeSug 1 und SeSug 2, zu der es bei längerer Lagerung der Urinproben kommen kann, spielen mikrobielle, chemische und physikalische Einflussfaktoren eine Rolle (Hildebrand et al. 2020; Juresa et al. 2006). Sowohl Dimethyldiselenid (Juresa et al. 2006) als auch MeSeA (Hildebrand et al. 2020; Ogra et al. 2003) wurden als Zersetzungsprodukte von SeSug 1 und SeSug 2 identifiziert. Um einen Abbau der Selenozucker zu vermeiden, sollten die Urinproben nach Probenahme so schnell wie möglich aufgearbeitet und analysiert werden.

Sofern eine Lagerung der Urinproben unvermeidlich ist, sollten die Proben dunkel und gekühlt, besser noch tiefgefroren, aufbewahrt werden (Juresa et al. 2006). Grundsätzlich können SeSug 1 und SeSug 2 in den Urinproben durch pH-Wert-Einstellung und Natriumazidzusatz stabilisiert werden (pH = 5,5; 0,1% Natriumazid) (Hildebrand et al. 2020). Von Juresa et al. (2006) wurde zur Stabilisierung der Selenozucker eine Aufbewahrung der Urine bei -80 °C oder der lyophilisierten Urinproben bei -20 °C erfolgreich getestet. Des Weiteren empfehlen die Autoren ebenfalls einen Natriumazidzusatz oder auch die Durchleitung von Stickstoff durch die Proben.

Vor dem Hintergrund der Zersetzung des SeSug 1 und SeSug 2 können die selbst hergestellten Qualitätskontrollmaterialien über längere Zeiträume nur verwendet werden, sofern entsprechende Maßnahmen zur Stabilisierung der Analyten getroffen wurden.

## 12 Diskussion der Methode

Das hier beschriebene Verfahren dient der Bestimmung von sieben Selenspezies in Urin: SeSug 1, SeSug 2, SeMet, SeEt, MeSeA, MeSeC und MeSeG. Die Umkehrphasen-Methode ist angelehnt an eine Methode zur Bestimmung verschiedener Selenspezies in Humanurin nach Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (Jäger et al. 2013). Mittels Umkehrphasen-Chromatographie können alle sieben Selenspezies sauber getrennt werden. Das angewandte Verfahren zeichnet sich durch einen geringen Aufwand hinsichtlich der Probenaufarbeitung aus, da die Proben nur 1:1 (V:V) mit Fließmittel versetzt und anschließend direkt analysiert werden. Die Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung

der einzelnen Spezies liegen zwischen 0,18 µg und 0,34 µg Selen pro Liter Urin und sind ausreichend, um eine über die Hintergrundbelastung in der Allgemeinbevölkerung hinausgehende Zusatzbelastung zu erfassen.

**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](http://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>
- 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
- Cao TH, Cooney RA, Woznichak MM, May SW, Browner RF (2001) Speciation and identification of organoselenium metabolites in human urine using inductively coupled plasma mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 73(13): 2898–2902. <https://doi.org/10.1021/ac0100244>
- 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](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 <sup>82</sup>Se-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](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-Ariza JL, Sánchez-Rodas D, Caro de la Torre MA, Giráldez I, Morales E (2000) Column-switching system for selenium speciation by coupling reversed-phase and ion-exchange high-performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *J Chromatogr A* 889(1–2): 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00349-6)
- 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](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, 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>
- Juresa D, Darrouzès J, Kienzl N, Bueno M, Pannier F, Potin-Gautier M, Francesconi KA, Kuehnelt D (2006) An HPLC/ICP-MS study of the stability of selenosugars in human urine: implications for quantification, sample handling, and storage. *J Anal At Spectrom* 21: 684–690. <https://doi.org/10.1039/b602976k>
- 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>
- Kokarnig S, Tsirigotaki A, Wiesenhofer T, Lackner V, Francesconi KA, Pergantis SA, Kuehnelt D (2015) Concurrent quantitative HPLC–mass spectrometry profiling of small selenium species in human serum and urine after ingestion of selenium supplements. *J Trace Elem Med Biol* 29: 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.06.012>
- Kremer D, Ilgen G, Feldmann J (2005) GC–ICP–MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of <sup>77</sup>Se-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/ICP-MS. *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 trimethylselenium ion in human urine determined by HPLC/ICP-MS and HPLC/vapor generation/ICP-MS. *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>
- Letsiou S, Nischwitz V, Traar P, Francesconi KA, Pergantis SA (2007) Determination of selenosugars in crude human urine using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(3): 343–351. <https://doi.org/10.1002/rcm.2843>

- Lu J, Holmgren A (2009) Selenoproteins. *J Biol Chem* 284(2): 723–727. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800045200>
- Lu Y, Rumpfer A, Francesconi KA, Pergantis SA (2012) Quantitative selenium speciation in human urine by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 731: 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.016>
- Lund W (1990) Speciation analysis – why and how? *Fresenius J Anal Chem* 337(5): 557–564. <https://doi.org/10.1007/BF00322862>
- Mao X, Hu B, He M, Chen B (2012) High polar organic–inorganic hybrid coating stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of seleno-amino acids and seleno-oligopeptides in biological samples. *J Chromatogr A* 1256: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.080>
- Marschall TA, Kroepfl N, Jensen KB, Bornhorst J, Meermann B, Kuehnelt D, Schwerdtle T (2017) Tracing cytotoxic effects of small organic Se species in human liver cells back to total cellular Se and Se metabolites. *Metallomics* 9(3): 268–277. <https://doi.org/10.1039/C6MT00300A>
- 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
- Ogra Y, Hatano T, Ohmichi M, Suzuki KT (2003) Oxidative production of monomethylated selenium from the major urinary selenometabolite, selenosugar. *J Anal At Spectrom* 18(10): 1252–1255. <https://doi.org/10.1039/b306710f>
- 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](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>