

Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenozucker 3 und Trimethylselenonium in Urin mittels Kationenaustausch-Chromatographie-ICP-MS

Biomonitoring-Methode

J. Hildebrand¹

T. Jäger¹

T. Göen^{1,3,*}

B. Michalke²

A. Hartwig^{4,*}

MAK Commission^{5,*}

Keywords

Selenspezies; Speziesanalytik; Biomonitoring; Urin; Kationenaustausch-Chromatographie; 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.goeen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Citation Note:

Hildebrand J, Jäger T, Göen T, Michalke B, Hartwig A, MAK Commission. Selen und seine Verbindungen – Bestimmung von Selenozucker 3 und Trimethylselenonium in Urin mittels Kationenaustausch-Chromatographie-ICP-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Sep;7(3):Doc067. https://doi.org/10.34865/bi778249cd7_3or

Manuskript abgeschlossen:
11 Mrz 2021

Publikationsdatum:
30 Sep 2022

Lizenz: Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](#).



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 two organic selenium species with cationic character in urine. Selenosugar 3 (SeSug 3) and trimethylselenonium (TMSe) can be separated by cation-exchange chromatography and subsequently detected using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Calibration is performed using standard solutions in pooled urine, which are processed and analysed analogously to the samples.

1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin
Analytisches Messprinzip	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 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-amino-2-desoxy-1-seleno- β -D-galactopyranosid (Selenozucker 3, SeSug 3)	866430-57-1
		Trimethylselenonium (TMSe)	25930-79-4

Zuverlässigkeitskriterien

Selenozucker 3 (SeSug 3)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 11,3\%$
	Streubereich	$u = 25,6\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,2 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 10$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag ^{a)} :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 10,8\%$
	Streubereich	$u = 27,8\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit ^{a)} :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 93,9\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,10 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,28 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

^{a)} Die Daten wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

Trimethylselenonium (TMSe)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 9,4\%$
	Streubereich	$u = 21,3\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,9 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 10$ Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag ^{a)} :	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,4\%$
	Streubereich	$u = 16,5\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Richtigkeit ^{a)} :	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 100\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,5 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet) und $n = 6$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	0,10 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	
Bestimmungsgrenze:	0,28 μg pro Liter Urin (als Selen berechnet)	

^{a)} Die Daten wurden vom Prüfer der Methode erhoben.

2 Allgemeine Informationen zu Selen

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

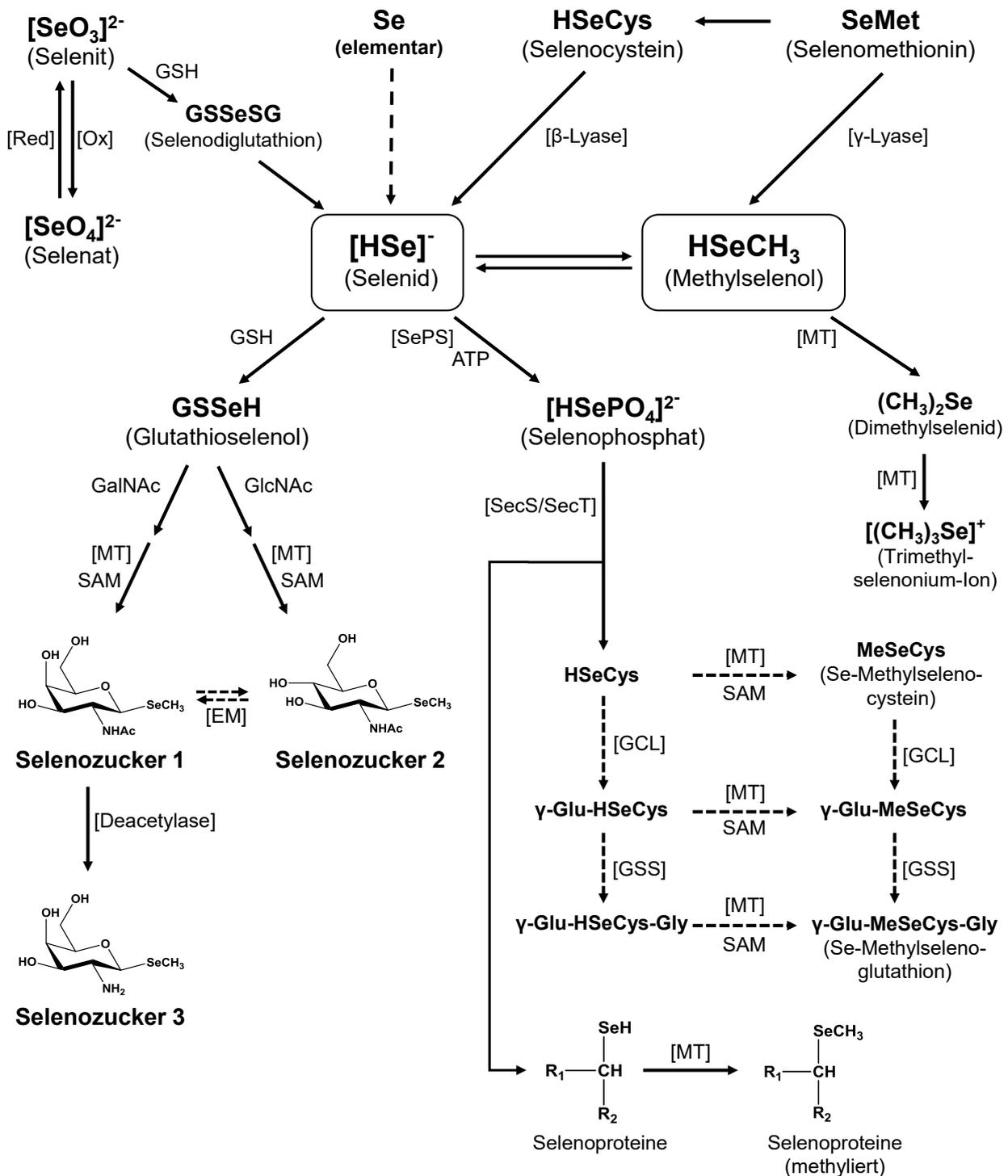
^{a)} Median (Bereich)

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 Kanzerogenitäts-Kategorie 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 Trimethylselenoniumion (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 flüssigkeitschromatographischen Trennmechanismen beruhen und die Quantifizierung von insgesamt elf Selenspezies erlauben (I: Anionenaustausch-Chromatographie; II: Umkehrphasen-Chromatographie; III: Kationenaustausch-Chromatographie). Aufgrund der unterschiedlichen flüssigkeitschromatographischen Trennmechanismen werden die drei Teilmethoden separat publiziert. In [Abbildung 2](#) sind die Strukturen der mit den drei Teilmethoden bestimmbaren Selenspezies dargestellt.



EM: Epimerase; GalNAc: *N*-Acetylgalactosamin; GCL: Glutamylcysteinligase; GlcNAc: *N*-Acetylglucosamin; GSH: Glutathion; GSS: Glutathionsynthetase; MT: Methyltransferase; SAM: *S*-Adenosylmethionin; SecS/SecT: *L*-Seryl-tRNA^{Sec}-Selentransferase; SePS: Selenophosphatsynthetase

Abb. 1 Metabolismusschema von Selen nach Navarro-Alarcon und Cabrero-Vique (2008) sowie Fairweather-Tait et al. (2011)

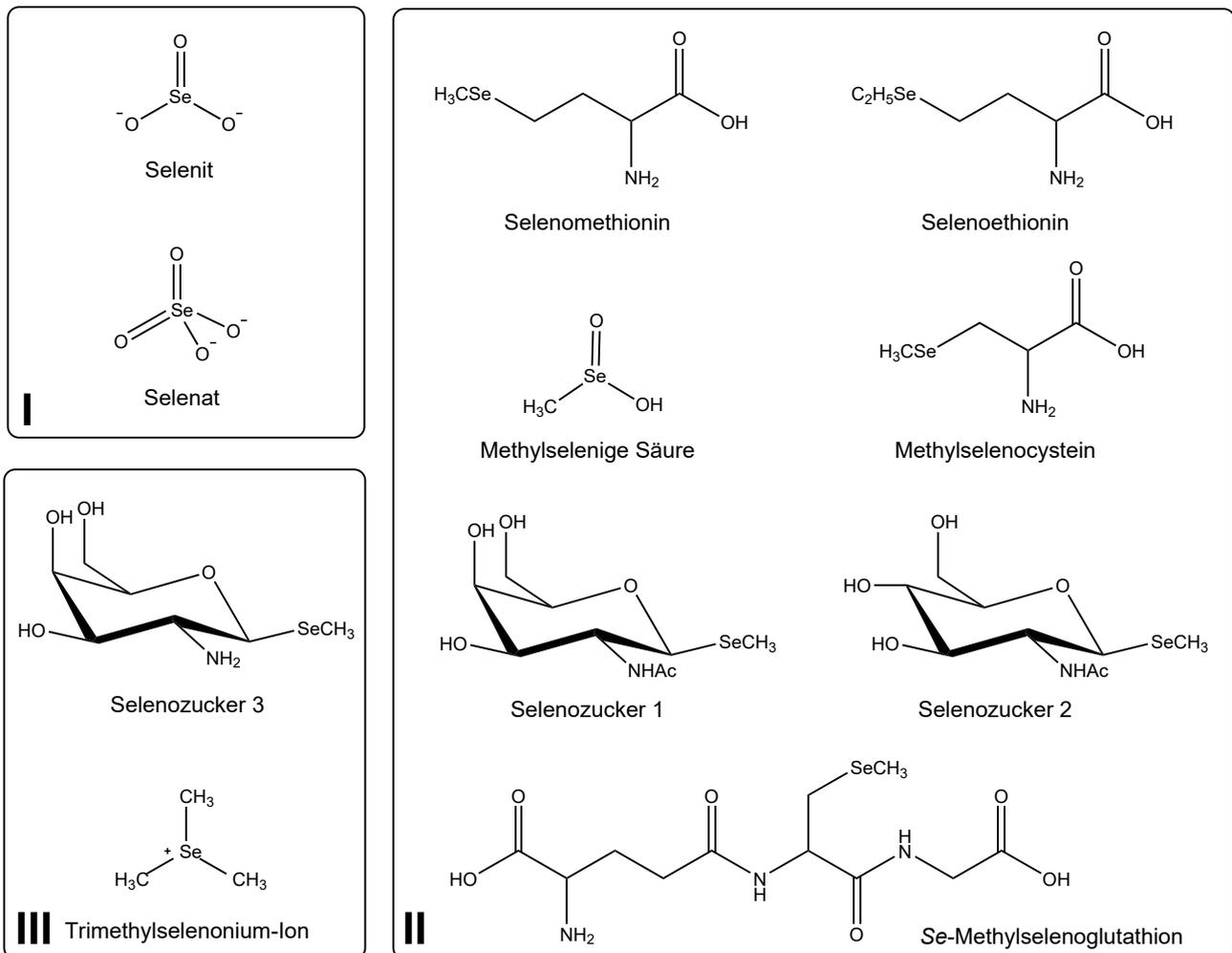


Abb. 2 Strukturen der mit den drei Teilmethoden bestimmaren Selenspezies

Die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe erfolgt mittels Kationenaustausch-Chromatographie und ist in der hier dargestellten Teilmethode III beschrieben. Daten zu SeSug 3- und TMSe-Gehalten im Urin nach beruflicher Exposition sind nicht publiziert. Die veröffentlichten Daten zu Uringehalten dieser Spezies sind in der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung bzw. nach Supplementierung mit selenhaltigen Präparaten bestimmt worden.

Die TMSe-Bildung unterliegt großen interindividuellen Schwankungen, weshalb „TMSe-Ausscheider“ und „Nicht-TMSe-Ausscheider“ unterschieden werden. Die Hintergrundgehalte der Nicht-TMSe-Ausscheider liegen in der Regel unterhalb der Nachweisgrenzen der jeweiligen analytischen Methoden (Jäger et al. 2013, 2016; Lu et al. 2012) oder es wurden sehr geringe Konzentrationen im Bereich von <NWG–0,2 µg Se/l (Lajin et al. 2016), <NWG–0,09 µg Se/l (Kuehnelt et al. 2006) bzw. $0,092 \pm 0,089$ µg Se/l (Kuehnelt et al. 2015) gemessen. Bei Nicht-TMSe-Ausscheidern wird auch nach Selen-Supplementierung kein Anstieg der TMSe-Konzentration beobachtet (Jäger et al. 2016; Kuehnelt et al. 2006; Lajin et al. 2016; Lu et al. 2012). Im Gegensatz dazu werden bei TMSe-Ausscheidern deutlich höhere Hintergrundgehalte gefunden. Zudem steigen bei diesen die TMSe-Gehalte im Urin nach Selen-Supplementierung deutlich an (siehe Tabelle 2).

Tab. 2 TMSe-Konzentrationen im Urin von TMSe-Ausscheidern (Hintergrundgehalt bzw. nach Selen-Supplementierung)

Kollektiv (Probenanzahl n; Anzahl > NWG ^{a)})	TMSe		Literatur
	Hintergrundgehalt	nach Supplementierung	
Allgemeinbevölkerung, Deutschland (47; 8)	2,11 µg Se/l ^{b)} (1,12–4,95 µg Se/l)	–	Jäger et al. 2013
Allgemeinbevölkerung, USA (13; 9)	11–63 µg Se/l	–	Blotcky et al. 1987
Allgemeinbevölkerung, Spanien (3)	14,3–19,8 µg Se/l	–	Quijano et al. 1999
Allgemeinbevölkerung (Frauen), Bangladesch (75) und Argentinien (3)	1,9 ± 0,87 µg Se/l bis 3,2 ± 0,59 µg Se/l	–	Kuehnelt et al. 2015
Allgemeinbevölkerung, Taiwan (4; 2)	11–13,2 µg Se/l	–	Yang und Jiang 1995
Allgemeinbevölkerung, Japan (9)	5,4–26,5 µg Se/l	–	Zheng et al. 2002
Selen-Supplementierung, 200 µg Se als Selenit (9; 3) bzw. 100 µg Se als Selenhefe (7; 3), Deutschland	2,9 ± 1,1 µg Se/24 h bzw. 2,6 ± 0,5 µg Se/24 h	9,6 ± 3,9 µg Se/24 h bzw. 5,3 ± 2,8 µg Se/24 h	Jäger et al. 2016
Selen-Supplementierung, 200 µg Se als Selenit, gefolgt von 400 µg Se als Selenit, Österreich (8; 2)	4,4 µg Se/l (3,2–6,2 µg Se/l) ^{c)}	8,4 µg Se/l (5,7–13 µg Se/l) bzw. 15,9 µg Se/l (7,9–24,8 µg Se/l) ^{c)}	Lajin et al. 2016
Selen-Supplementierung, 200 µg Se als Selenit, Österreich (7; 2)	0,18–0,37 µg Se/l	4,6–15 µg Se/l	Kuehnelt et al. 2006
Selen-Supplementierung, 200 µg Se als Selenat bzw. 200 µg Se als Selenomethionin, Neuseeland (26)	0,3–0,9 µg Se/24 h	1,7–2,3 µg Se/24 h bzw. 0,9–1,9 µg Se/24 h	Robinson et al. 1997
Selen-Supplementierung, 200 µg Se als Selenomethionin, Griechenland (2; 1)	< NWG–0,79 µg Se/l	< NWG–10,2 µg Se/l	Lu et al. 2012

a) NWG: Nachweisgrenze

b) Median (Bereich)

c) Mittelwert (Bereich)

Hintergrundgehalte von SeSug 3 wurden in mehreren Studien untersucht. Dabei fanden sich in der deutschen Allgemeinbevölkerung Konzentrationen im Bereich < NWG–2,41 µg Se/l (Median: 0,74 µg Se/l; n = 47) (Jäger et al. 2013). Diese Konzentrationen entsprechen den von Kuehnelt et al. (2006) publizierten Werten (< NWG–1,7 µg Se/l; n = 7), während Lajin et al. (2016) geringfügig höhere Konzentrationen beobachteten (Mittelwert: 2,3 µg Se/l; Bereich: 0,8–4,1 µg Se/l; n = 8). Nach Supplementierung mit 200 µg Selen als Selenit stieg die SeSug 3-Ausscheidung an und betrug 1,0–9,1 µg Se/l (Mittelwert: 3,9 µg Se/l); nach Supplementierung mit 400 µg Selen als Selenit betrug sie 2,7–16,7 µg Se/l (Mittelwert: 9,0 µg Se/l) (Lajin et al. 2016). Kuehnelt et al. (2006) beobachteten nach Supplementierung mit 200 µg Selen als Selenit ebenfalls einen Anstieg der SeSug 3-Konzentrationen und berichteten Werte von 0,9–3,7 µg Se/l. Jäger et al. (2016) fanden vor der Supplementierung mit 200 µg Selen als Selenit bzw. 100 µg Selen als Selenhefe SeSug 3-Gehalte im Bereich von 1,7 ± 1,0 µg Se/24 h bzw. 1,3 ± 0,7 µg Se/24 h. Nach Supplementierung lagen die Konzentrationen bei 2,1 ± 0,9 µg Se/24 h bzw. 1,7 ± 0,9 µg Se/24 h und damit geringfügig höher als vor der Supplementierung.

3 Grundlage des Verfahrens

Das hier beschriebene analytische Verfahren dient der Bestimmung von zwei organischen Selenspezies mit kationischem Charakter in Urin. SeSug 3 und TMSe werden mittels Kationenaustausch-Chromatographie getrennt und anschließend mittels ICP-MS quantifiziert. 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 (z. B. Shodex RSpak NN-614 (150 × 6 mm; 10 µm) mit Shodex RSpak NN-G-Vorsäule (50 × 6,0 mm; 10 µm), Showa Denko Europe GmbH, München)
- Ultraschallbad (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vortexmischer (z. B. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Zentrifuge (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- pH-Meter (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 13-ml-Polypropylenröhrchen mit Deckel (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Präzisionswaage (z. B. Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Zellulosefilter, 0,45 µm Porengröße, Membran aus gemischten Zelluloseestern (z. B. Merck KGaA, Darmstadt)
- 1,5-ml-Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- 250- und 1000-ml-Bechergläser (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 100-ml-Laborglasflasche (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 10-, 100- und 1000-ml-Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- 1,5-ml-Braunglasvials (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Urinbecher (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Verschiedene Pipetten 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.

- Ammoniumdihydrogenphosphat (z. B. Nr. 1.01126, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumhydroxidplättchen (z. B. Nr. 1.06469, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethanol (z. B. Nr. 1.00983, 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 (z. B. Linde GmbH, Pullach)
- Wasserstoff 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)

4.3 Referenzmaterialien

- Methyl-2-amino-2-desoxy-1-seleno- β -D-galactopyranosid (SeSug 3); Reinheit: > 95 % (Auftragssynthese, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)
- Trimethylselenoniumiodid (Synthese nach Hoffman (1991), Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen)
- 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

- Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (1 mol/l)
In einen 100-ml-Messkolben werden 11,5 g Ammoniumdihydrogenphosphat eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Natriumhydroxidlösung (1 mol/l)
In einem 250-ml-Becherglas werden 90 ml hochreines Wasser vorgelegt. 4,0 g Natriumhydroxidplättchen werden vorsichtig in das vorgelegte Wasser gegeben und unter Rühren gelöst. Die Natriumhydroxidlösung wird in einen 100-ml-Messkolben überführt und dieser bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird in einer Laborglasflasche mit Schraubverschluss aufbewahrt.
- Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (30 mmol/l) mit 1% Ethanol (pH = 6,3; Fließmittel A)
In einem 1000-ml-Becherglas werden 900 ml hochreines Wasser vorgelegt. Anschließend werden 30 ml der Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (1 mol/l) und 10 ml Ethanol zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung (1 mol/l) auf pH = 6,3 eingestellt und die Lösung in einen 1000-ml-Messkolben umgefüllt. Der Messkolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Das Fließmittel A wird für jede Analyse frisch hergestellt, vor der Verwendung filtriert und im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast.
- Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (0,5 mmol/l) mit 1% Ethanol (pH = 6,3; Fließmittel B)
In einem 1000-ml-Becherglas werden 900 ml hochreines Wasser vorgelegt. Anschließend werden 0,5 ml der Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (1 mol/l) und 10 ml Ethanol zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung (1 mol/l) auf pH = 6,3 eingestellt und die Lösung in einen 1000-ml-Messkolben umgefüllt. Der Messkolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Das Fließmittel B wird für jede Analyse frisch hergestellt, vor der Verwendung filtriert und im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast.

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösungen (1000 mg Se/l)
33 mg SeSug 3 (257,2 g/mol) bzw. 32 mg TMSe-Iodid (251,0 g/mol) werden in jeweils einen 10-ml-Messkolben eingewogen. Die Messkolben werden mit hochreinem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Bezogen auf das Selen weisen die so hergestellten Lösungen Konzentrationen von etwa 1 g Se/l auf. 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)
Von beiden Arbeitslösungen werden jeweils 100 µl in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend werden 800 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 °C in Polypropylenröhrchen gelagert.

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.

Da in Fließmittel bzw. Poolurin angesetzte Kalibriergeraden unterschiedliche Steigungen aufweisen, müssen die Kalibrierstandards für die korrekte Quantifizierung der betrachteten Selenspezies in Urin angesetzt werden.

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung I [µl]	Dotierlösung II [µl]	Poolurin [ml]	Konzentration [µg Se/l]
0	–	–		0
1	–	20		0,20
2	–	50		0,50
3	–	100	ad 10	1,0
4	–	200		2,0
5	50	–		5,0
6	100	–		10,0
7	250	–		25,0

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in Urinbechern gesammelt. Nach der Probenahme sollten die Urinproben so schnell wie möglich aufgearbeitet und analysiert werden. Zu Fragen der Stabilität des SeSug 3 bei Lagerung siehe auch [Abschnitt 11.4](#)

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt. 900 µl der Probe werden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl Fließmittel A (Ammoniumdihydrogenphosphatlösung (30 mmol/l) mit 1 % Ethanol (pH = 6,3)) versetzt und anschließend für zehn Sekunden gründlich durchmischt. Von der so verdünnten Probe werden 50 µl für die Analyse verwendet.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgt an einer HPLC-Anlage mit induktiv gekoppeltem Plasma-Massenspektrometer (HPLC-ICP-MS).

6.1 Flüssigkeitschromatographie

Trennsäule:	Shodex RSpak NN-614 (150 × 6 mm; 10 µm) mit Shodex RSpak NN-G-Vorsäule (50 × 6,0 mm; 10 µm)
Trennprinzip:	Kationenaustausch-Chromatographie
Säulentemperatur:	50 °C
Fließmittel A:	Ammoniumdihydrogenphosphat (30 mmol/l) mit 1 % Ethanol (pH = 6,3)
Fließmittel B:	Ammoniumdihydrogenphosphat (0,5 mmol/l) mit 1 % Ethanol (pH = 6,3)
Flussrate:	0–14,5 min: 0,8 ml/min Fließmittel A 14,5–19,5 min: 0,8 ml/min Fließmittel B 19,5–20 min: 0,8 ml/min Fließmittel A
Injektionsvolumen:	50 µl
Laufzeit:	20 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:	20 °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:	1,0 ml/min
Messmodus:	<i>Time-resolved analysis</i>
Messungen pro Massenspur (<i>Repetition</i>):	1
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe Tabelle 4

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 4](#) zusammengefasst. Für die Quantifizierung wird die Massenspur ⁷⁸Se herangezogen.

Tab. 4 Retentionszeiten und parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung von SeSug 3 und TMS_e in Urin

Analyt	Retentionszeit [min]	Analysierte Massenspur	Messzeit pro Massenspur [s]
SeSug 3	8,5	⁷⁸ Se	6
TMS _e	12,0	⁷⁸ Se	6

7 Analytische Bestimmung

Von den nach [Abschnitt 5.2](#) aufgearbeiteten Proben werden jeweils 50 µl in das HPLC-ICP-MS-Gerät injiziert. Die Identifizierung des SeSug 3 und des TMSe 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. [Abbildung 3](#) zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer mit SeSug 3 und TMSe dotierten Urinprobe.

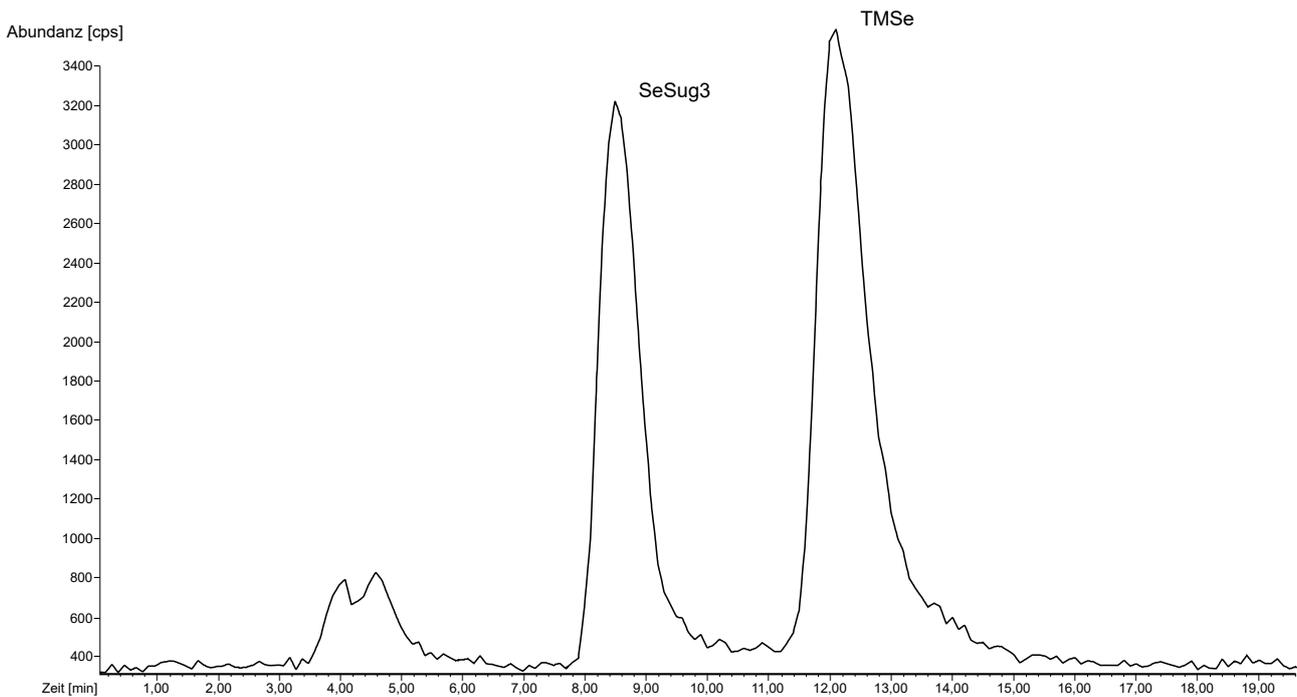


Abb. 3 Chromatogramm eines mit SeSug 3 (25 µg Se/l) und TMSe (25 µg Se/l) dotierten Urins

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 unter den beschriebenen Bedingungen von 0,25 bis 25,0 µg/l (als Selen berechnet) linear. [Abbildung 4](#) zeigt beispielhaft Kalibriergeraden für die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe in Urin.

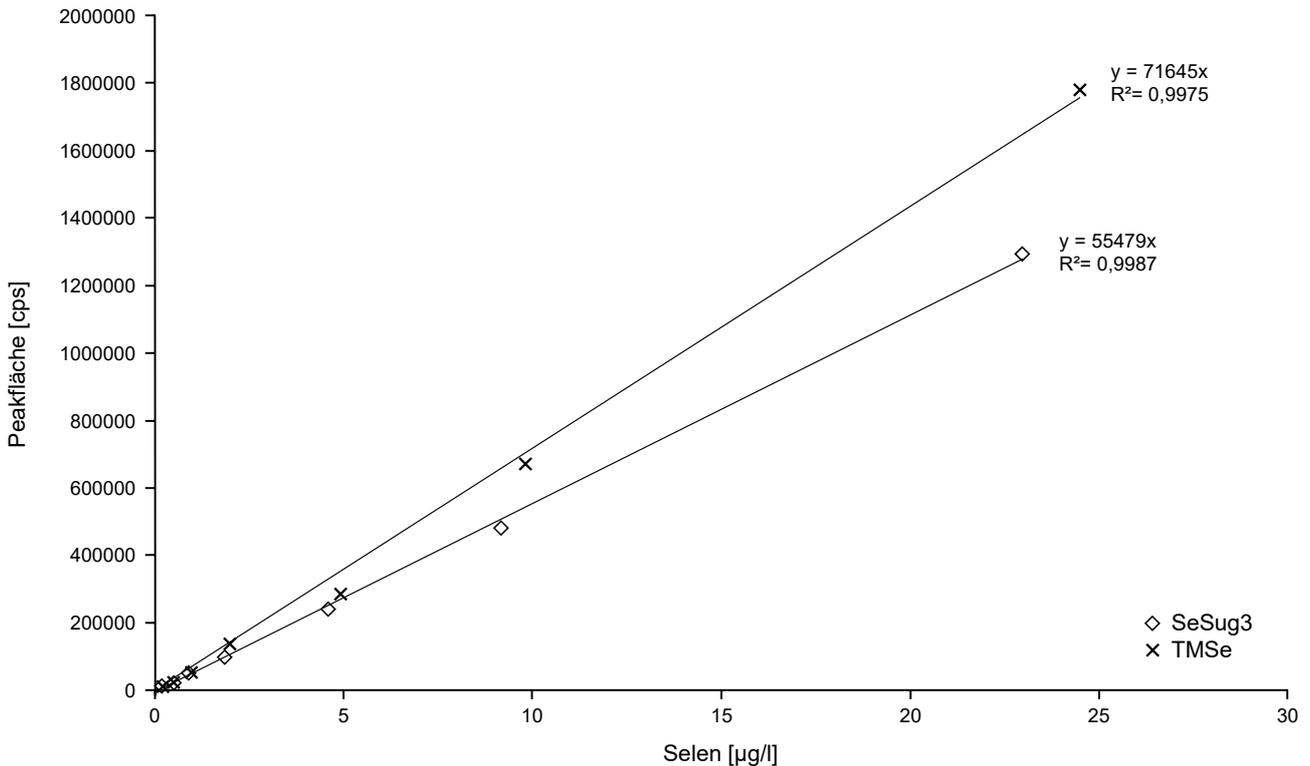


Abb. 4 Kalibriergeraden für die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe in Urin

9 Berechnung der Analysenergebnisse

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, 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 den beiden Selenspezies dotiert. Dabei muss die Dotierung im erwarteten Konzentrationsbereich liegen. Die hergestellten Qualitätskontrollmaterialien werden zu je 900 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

Der Sollwert und der Toleranzbereich (Mittelwert \pm zwei Standardabweichungen) des jeweiligen Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode bestimmt (Bader et al. 2010).

Zusätzlich wird bei jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert, bestehend aus 1 ml hochreinem Wasser, mitanalysiert.

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 wurde Poolurin mit SeSug 3 und TMSe in einer Konzentration von 2,2 $\mu\text{g/l}$ bzw. 2,9 $\mu\text{g/l}$ (als Selen berechnet) dotiert. Das Material wurde an einem Tag zehnfach 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 SeSug 3 und TMSe in Urin (n = 10)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g Se/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
SeSug 3	2,2	11,3	25,6
TMSe	2,9	9,4	21,3

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe wurde vom Prüfer der Methode ermittelt. Hierzu wurde Poolurin mit dem jeweiligen Analyten in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/l}$ (als Selen berechnet) 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 SeSug 3 und TMSe in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g Se/l}$]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
SeSug 3	2,5	10,8	27,8
TMSe	2,5	6,4	16,5

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde vom Prüfer der Methode ermittelt. Dazu wurden sechs Aliquote einer Urinprobe mit je 2,5 $\mu\text{g/l}$ (als Selen berechnet) jedes Analyten 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 SeSug 3 und TMSe in Urin (n = 6)

Analyt	Dotierte Konzentration [µg Se/l]	Mittlere rel. Wiederfindung <i>r</i> [%]
SeSug 3	2,5	93,9
TMSe	2,5	100

11.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 (DIN 2008) ermittelt. 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 Bestimmung von SeSug 3 und TMSe in Urin.

Tab. 8 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von SeSug 3 und TMSe in Urin (n = 3)

Analyt	Nachweisgrenze [µg Se/l]	Bestimmungsgrenze [µg Se/l]
SeSug 3	0,10	0,28
TMSe	0,10	0,28

11.4 Störeinflüsse

Die Entwickler der Methode haben bei der Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag für den Analyten SeSug 3 eine größere Streuung der Messwerte gefunden als der Prüfer der Methode. Ob die schlechteren Präzisionsdaten auf die Zersetzung des SeSug 3 zurückzuführen waren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um einen möglichen Abbau des SeSug 3 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). Da SeSug 1 und SeSug 2 in Urinproben durch pH-Wert-Einstellung und Natriumazidzusatz stabilisiert werden können (pH = 5,5; 0,1 % Natriumazid) (Hildebrand et al. 2020), kann gegebenenfalls auch SeSug 3 entsprechend stabilisiert werden. Von Juresa et al. (2006) wurde zur Stabilisierung von SeSug 1 und SeSug 2 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 Einleitung von Stickstoff durch die Proben.

12 Diskussion der Methode

Das hier beschriebene Teilverfahren dient der Bestimmung von zwei kationischen Selenspezies in Urin: SeSug 3 und TMSe. Die Methode ist angelehnt an eine Methode von Kuehnelt et al. (2006) zur Bestimmung von TMSe in Urin. Im Fließmittel können mit der Kationenaustausch-Chromatographie SeSug 3 und TMSe von den übrigen Selenspezies abgetrennt und selektiv bestimmt werden. Die Bestimmungsgrenzen der beiden Spezies liegen bei 0,28 µg/l (als Selen berechnet) und sind somit größtenteils ausreichend, um auch die Hintergrundgehalte der Allgemeinbevölkerung zu erfassen.

Der Prüfer der Methode konnte die Methode auch unter Verwendung einer anderen Säule (Hamilton PRP X 200 PEEK (250 × 4,6 mm; 10 µm) mit Hamilton PRP X 200 Vorsäule (20 × 2 mm; 10 µm)) gut nachstellen, wobei die Retentionszeiten der Analyten allerdings deutlich nach vorne verschoben waren.

Bei hinreichend guter Sensitivität kann gegebenenfalls das Probenvolumen von 50 µl auf 25 µl reduziert werden, um die Standzeit der Säule zu erhöhen.

Verwendete Messgeräte HPLC-Anlage Agilent 1200 Serie mit binärer Pumpe (G1312A) und Autosampler (G1329A) (Agilent Technologies Germany & Co. KG, Waldbronn) und Agilent 7500cx induktiv-gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer mit Kollisions-/Reaktionszelle (Agilent Technologies Germany & 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>
- Blotcky AJ, Hansen GT, Borkar N, Ebrahim A, Rack EP (1987) Simultaneous determination of selenite and trimethylselenonium ions in urine by anion exchange chromatography and molecular neutron activation analysis. *Anal Chem* 59(17): 2063–2066. <https://doi.org/10.1021/ac00144a012>
- 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/-/substanceinfo/100.029.052>, abgerufen am 28 Jan 2022
- 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>
- 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>
- Hoffman JL (1991) Ion chromatographic analysis of the purity and synthesis of sulfonium and selenonium ions. *J Chromatogr A* 588(1–2): 211–216. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)85025-B](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)85025-B)
- 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/ICPMS 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>
- 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>
- Kuehnelt D, Engström K, Skróder H, Kokarnig S, Schlebusch C, Kippler M, Alhamdow A, Nermell B, Francesconi K, Broberg K, Vahter M (2015) Selenium metabolism to the trimethylselenonium ion (TMSe) varies markedly because of polymorphisms in the indolethylamine N-methyltransferase gene. *Am J Clin Nutr* 102(6): 1406–1415. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.114157>
- 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>
- Lu Y, Rumpler 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>
- 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>
- Quijano MA, Gutiérrez AM, Pérez-Conde MC, Cámara C (1999) Determination of selenium species in human urine by high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 50(1): 165–173. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00115-0)
- 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>
- Robinson MF, Thomson CD, Jenkinson CP, Luzhen G, Whanger PD (1997) Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: urinary excretion by New Zealand women. *Br J Nutr* 77(4): 551–563. <https://doi.org/10.1079/BJN19970056>
- 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
- Yang K-L, Jiang S-J (1995) Determination of selenium compounds in urine samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with an ultrasonic nebulizer. *Anal Chim Acta* 307(1): 109–115. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00010-W](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00010-W)
- 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>