

Metodología recomendada para la medición del contenido de selenio en especímenes biológicos

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Elementos Traza¹

Documento B, Fase 3, Versión 1

Documento preparado por A. Montel Ruiz de Alda, J. L. López Colón y J. M. de Prádena y Lobón.

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto y campo de aplicación.
- 2 Revisión metodológica
 - 2.1 Espectrometría de fluorescencia molecular.
 - 2.2 Espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros.
 - 2.3 Espectrometría de absorción atómica electrotrémica.
 - 2.4 Espectrometría de plasma por acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS).
 - 2.5 Otros procedimientos.
 - 2.5.1 Activación neutrónica.
 - 2.5.2 Fluorescencia de rayos X.
 - 2.5.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
 - 2.5.4 Cromatografía en fase gaseosa.
- 3 Procedimientos analíticos recomendados.
 - 3.1 Obtención de especímenes.
 - a) Plasma y suero.
 - b) Sangre.
 - c) Orina.
 - d) Otros.
 - 3.2 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en plasma, suero, y sangre por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman.
 - a) Condiciones analíticas.
 - b) Modificador de matriz.
 - c) Preparación de la muestra.
 - d) Preparación de patrones.
 - e) Características metrológicas.
 - 3.3 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en orina por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman.
 - a) Condiciones analíticas.
 - b) Modificador de matriz.
 - c) Preparación de la muestra.
 - d) Preparación de patrones.
 - e) Características metrológicas.
 - 3.4 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en tejidos por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman.
 - a) Condiciones analíticas.
 - b) Modificador de matriz.
 - c) Preparación de la muestra.
 - d) Preparación de patrones.
 - e) Características metrológicas.
- 3.5 Control de la calidad.
 - a) Materiales de control.
 - b) Programas de evaluación externa de la calidad.
- 4 Intervalos de referencia.
- 5 Conclusiones.
- 6 Bibliografía.

0 INTRODUCCIÓN

El selenio es un elemento químico de número atómico 34 y de peso atómico 78,96 daltons, perteneciente al grupo VI de la tabla periódica. Su bioquímica, toxicología e importancia nutricional ha sido revisada minuciosamente durante la última década (1, 2). Es un elemento esencial para los mamíferos, incluido el hombre, por formar parte de numerosas enzimas: glutatión-peroxidasa, 1,5'iodotironina-desionidasa, seleno proteína-P, tioredoxin-reductasa, etc.

Su papel protector en la prevención del cáncer es objeto de intensos debates y estudios epidemiológicos (3), existiendo indicios de que esa acción puede ser más farmacológica que esencial (4, 5). En estudios en animales se ha demostrado que algunos virus benignos pueden llegar a ser virulentos en un medio deficiente de selenio (6).

El selenio, y su cuantificación en muestras biológicas, puede ser clínicamente importante en situaciones de ingesta excesiva o deficiente. Excepto en zonas aisladas de China y otros países donde la selenosis humana ha sido endémica (7), la intoxicación con selenio en el ser humano es poco habitual, pero puede llegar a ser grave. Han sido publicados casos en los que ha existido toxicidad debida a la ingestión de soluciones concentradas (8) y suplementos (9) incorrectamente formulados. Los síntomas que destacan en la intoxicación aguda son: vómitos, diarrea, aliento a ajo, daños en las mucosas, acidosis metabólica y espasmos musculares. Sin embargo la selenosis se manifiesta como un trastorno gastrointestinal, aliento a ajo, pérdida de pelo y uñas, lesiones dermatológicas y, en casos extremos, daño neurológico.

De mayor relevancia, como se comprueba en la práctica clínica actual, es el seguimiento de las concentraciones de selenio en el suero en pacientes a los que se les considera proclives a

¹Composición de la Comisión: J. A. Cocho de Juan, J.F. Escanero Marcen, M.D. Fernández González, L. García Beltrán, A. García de Jalón Comet, M. González Estecha (presidenta), J. González Revaldería, E. Herrero Huerta, I. Monreal Marquiegui, A. Montel Ruiz de Alda, C. Pintos Virgós, V. Seijas Martínez-Echevarría.

padecer una deficiencia de este elemento como consecuencia de una enfermedad, una terapia, o una ingesta deficiente y crónica (10). El origen de este interés procede de las dos manifestaciones clínicas producidas por la deficiencia endémica de selenio: el síndrome de Keshan, una cardiomiopatía frecuente en niños y mujeres, y la enfermedad de Kashin-Beck (11), una osteoartropatía que afecta a los niños.

Las mencionadas cardiomiopatías, así como mialgias, alteraciones hematológicas, y decoloración de pelo y uñas han sido estudiadas en pacientes que habían sido sometidos, durante un largo periodo de tiempo, a nutrición parenteral carente de selenio, produciéndose víctimas mortales después de 2, a 8 años. Estudios posteriores muestran que, aunque la deficiencia de selenio sintomática es rara, la disminución bioquímica sucede, inevitablemente, en ausencia de suplementación (12-14). La disminución de selenio también ha sido estudiada en la mucoviscidosis (fibrosis quística) (15, 16), en la enfermedad celíaca (17, 18), en la enfermedad de Crohn (19, 20), y en los neonatos y niños hospitalizados (21).

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

En este documento se revisan los procedimientos para la medida directa de la concentración o del contenido de selenio en especímenes biológicos, detallándose los procedimientos que presentan una mayor fiabilidad dentro de los procedimientos más accesibles al laboratorio clínico.

2 REVISIÓN METODOLÓGICA

2.1 Espectrometría de fluorescencia molecular

Este método se basa en la reacción en medio ácido del Se^{4+} con el 2,3-diamino-naftaleno (22), dando como resultado un piazoselenol fluorescente, que posteriormente es extraído de la solución acuosa ácida con ciclohexano, donde puede ser medida su fluorescencia (excitación: 366 nm; emisión 525 nm).

La espectrometría de fluorescencia molecular es un procedimiento robusto y capaz de obtener un buen rendimiento analítico. Los procedimientos publicados ofrecen exactitud en el análisis de controles de calidad comerciales, recuperaciones de más del 90% y una imprecisión del 5 al 7% (CV) (23, 24) en sangre, del 3 al 4% (2, 26) en el suero, del 6% (27) orina y del 10% en hígado. Mediante este procedimiento de fluorescencia se llega a unos límites de detección de 0,45 $\mu\text{mol/L}$ (28).

En la práctica, el procedimiento es el siguiente: los especímenes de sangre, suero, orina (0,1 a 4 mL) y tejidos (25 a 500 mg), son digeridos completamente mediante ácidos oxidantes con el fin de eliminar la materia orgánica. Los especímenes y los patrones son digeridos, generalmente con una mezcla ácida de nítrico y perclórico a 210 °C durante 13 h. (El uso de ácido perclórico requiere la utilización de procedimientos especiales de manipulación, pero se ha citado como el que presenta la recuperación de selenio más elevada para todos los especímenes (24)). A continuación de la digestión, el residuo se calienta con ácido clorhídrico a 100-150 °C durante 15-30 min, con el fin de reducir el Se^{6+} a Se^{4+} . Para que esta reducción se produzca, y como requisito previo a la formación del piazoselenol, se debe ajustar el pH a 1,75 (29). Otros autores sin embargo encuentran valores similares de piazoselenol a pH de 0,4 (24, 26), por lo que el objetivo de conseguir un pH preciso y siste-

mático no es necesario y cuando se consigue no se traduce en una ventaja analítica.

Un gran avance ha sido la introducción de un nuevo agente complejante (30): el 2,3-diamino-1,4-dibromonaftaleno. La formación del piazoselenol se produce con efectividad en el medio ácido de las muestras digeridas evitando la necesidad de un ajuste de pH. Además, el HBr en combinación con el 2,3-diamino-1,4-dibromonaftaleno permite un único paso de reducción y formación del complejo de Se^{4+} . El límite de detección es de 0,45 $\mu\text{mol/L}$, la recuperación de 98% y el coeficiente de variación de 1%.

La relación de volumen entre la solución ácida de digestión y de muestra debe ser optimizada para cada sistema de calentamiento (generalmente un bloque de aluminio). También afectan a la velocidad de calentamiento las dimensiones de los tubos de digestión. No tener en cuenta estos aspectos puede conducir a una digestión desigual dentro de un mismo análisis, provocando pobres resultados analíticos.

La pérdida de selenio volátil es poco probable a no ser que se exceda durante un tiempo prolongado los 200 °C de temperatura o los tubos se calienten en seco.

2.2 Espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros

Los procedimientos basados en este procedimiento ofrecen las ventajas de su alta detectabilidad y versatilidad, ya que especímenes como sangre, plasma, orina y tejidos, pueden ser analizados adecuadamente. El Se^{6+} se reduce a Se^{4+} con ácido clorhídrico, y posteriormente, el Se^{4+} se convierte en hidruro por medio del borohidruro de sodio. El hidruro se transporta por un flujo de gas (normalmente argón) a una celda de cuarzo situada en la trayectoria de un haz de luz de un espectrómetro de absorción atómica. La celda es calentada eléctricamente o por medio de una llama para romper el hidruro en átomos de selenio. La detectabilidad es alta, obteniéndose un límite de detección de 0,17 $\mu\text{mol/L}$ (31).

El procedimiento de digestión recomendado por la IUPAC (32) se basa en la utilización de ácido nítrico, sulfúrico y perclórico a una temperatura de hasta 310 °C. Este procedimiento, evaluado en un análisis intercomparativo, mostró una buena concordancia de resultados entre los distintos laboratorios participantes (32). El uso de ácido perclórico, sin embargo, conlleva el riesgo de explosión, por lo que otros autores (33) utilizan una mezcla de ácidos sulfúrico y nítrico, y otros realizan la digestión con una mezcla de ácido sulfúrico, agua oxigenada y vanadio a una temperatura constante de 100 °C. Ambos obtienen resultados que muestran una buena concordancia con el procedimiento recomendado por la IUPAC. Más recientemente (34, 35) se ha propuesto un procedimiento basado en ácido bromhídrico y bromuro que permite una completa descomposición de los compuestos orgánicos del selenio en menos de 90 minutos a 120 °C.

2.3 Espectrometría de absorción atómica electrotérmica

Este procedimiento ofrece un análisis directo sin previa digestión y ha sido ampliamente adoptada por los laboratorios clínicos para la determinación de selenio en el suero, plasma y sangre.

La corrección de fondo con deuterio no es suficiente para evitar el efecto matriz, por lo que los equipos dotados con esta corrección no son prácticamente aptos para el análisis de sele-

nio en muestras biológicas, ya que no son capaces de corregir las interferencias que producen las altas concentraciones de hierro y fosfatos en sangre y en orina respectivamente. Sin embargo la corrección de fondo por efecto Zeeman, ofrece una mejor solución a este problema, aunque no se encuentra completamente libre del efecto matriz (36-39).

En este procedimiento es muy importante la utilización de un modificador de matriz que produzca seleniuros refractarios con el fin de posibilitar que la temperatura de la fase de pirólisis sea lo más alta posible (1000-1300 °C), con objeto de eliminar la mayoría de la matriz sin pérdida de selenio. Se puede utilizar níquel como modificador, pero este ha sido casi totalmente sustituido por paladio, siendo en la actualidad considerado como el modificador universal ya que ofrece una alta detectabilidad, pocas interferencias y puede mezclarse con el plasma sin precipitación de proteínas. Mediante este procedimiento se consiguen límites de detección (37) de 0,02 µmol/L, sensiblemente inferiores a los conseguidos por los procedimientos anteriormente citados.

2.4 Espectrometría de plasma por acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS)

La espectrometría de masas con inducción de plasma se basa en el uso de un plasma de argón como fuente de ionización de los elementos de la muestra, siendo separados y detectados los distintos iones mediante un espectrómetro de masas de alta detectabilidad.

El procedimiento ICP-MS combina la eficiencia en la descomposición de las muestras para formar iones con la potencia de la espectrometría de masas para distinguir iones de masas diferentes, ofreciendo una gran detectabilidad en la determinación de selenio y otros elementos, pudiendo incluso realizar estudios de especiación.

Para la determinación de selenio en sangre existe un método sencillo que se describe a continuación (40): las muestras de sangre se diluyen 1:10 (v/v) con un diluyente que contiene Tritón X-100 y ácido nítrico. Los patrones se acondicionan para tener una concentración de selenio similar a la de la sangre. La corrección de interferencias no se considera necesaria.

Otro avance importante es la posibilidad de cuantificar individualmente cada uno de los isótopos del selenio, por lo que se considera un método ideal para el estudio del metabolismo utilizando isótopos estables de este metaloide en el plasma, eritrocitos, y orina (41). El límite de detección que se consigue en este procedimiento es de 0,02 µmol/L (42).

2.5 Otros procedimientos

2.5.1 Activación neutrónica

Este procedimiento consiste en el bombardeo de la muestra (sangre, plasma, suero, y orina) con neutrones para formar los isótopos inestables de selenio ⁷⁵Se y ⁷⁷Se, que se desintegran radiactivamente (43). La energía del fotón y la intensidad de la radiación gamma inducida se miden mediante un contador de radiación gamma que emplea un cristal de Ge-Li. La precisión obtenida con este procedimiento es del 5%. El análisis por activación neutrónica presenta algunas desventajas: en soluciones acuosas hay que realizar preconcentración de la muestra, como solo investiga el núcleo, no pueden realizarse estudios de especiación, y por último, el largo tiempo requerido para el análisis.

2.5.2 Fluorescencia de rayos X

Este procedimiento consiste en el bombardeo de la muestra con fotones de alta energía, que logran activar los electrones internos del selenio (43). Una proporción de átomos se desintegra con emisión de rayos X cuya longitud de onda es característica de este elemento, siendo su intensidad proporcional a la concentración de selenio presente en la muestra. La precisión de este procedimiento en sangre es del 8%.

2.5.3 Cromatografía líquida de alta resolución. (HPLC)

Una de las mayores ventajas de este procedimiento es la posibilidad de la utilización de distintos detectores: fluorometría, espectrometría de absorción atómica, amperometría, etc., alcanzándose en todos ellos buenos límites de detección (44) de 0,019 µmol/L siendo sus inconvenientes principales: el largo proceso de la digestión ácida del espécimen (suero, plasma, sangre, eritrocitos, o tejidos), y la imposibilidad de su automatización.

2.5.4 Cromatografía en fase gaseosa

Es el menos utilizado de los procedimientos que aquí se exponen, y requiere un detector de captura de electrones con el fin de aumentar su detectabilidad. Presenta, al igual que en el procedimiento anterior, el inconveniente de la digestión previa de la muestra (suero, plasma, sangre, eritrocitos, y tejidos) y la imposibilidad de su automatización. El límite de detección basado en este procedimiento es de 0,39 µmol/L (45).

3 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS RECOMENDADOS

Según numerosos estudios, la metodología recomendada en el análisis de selenio es la espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman (36, 37, 45, 46).

3.1 Obtención de especímenes

a) Plasma y suero

A diferencia de la mayoría de los análisis de elementos traza, la contaminación no es normalmente un problema, por lo que se pueden utilizar envases convencionales.

Se recomienda el empleo de plasma y suero en aquellos pacientes en que se tenga que realizar un seguimiento de este elemento en espacios cortos de tiempo: hemodializados, pacientes con nutrición parenteral, enfermedad de Crohn, fenilcetonuria, intoxicación aguda, etc.

Es importante evitar la hemólisis puesto que incrementaría de forma importante el contenido de selenio y de hierro, haciendo las muestras no apropiadas para el análisis.

La muestra con el tapón puesto en el tubo se centrifuga durante 10 minutos a 500 g, con el fin de evitar posibles contaminaciones y se trasvasa a un tubo de polipropileno, refrigerándose a +4 °C. La muestra es estable por congelación a -20 °C durante meses, aunque repetidas congelaciones y descongelaciones pueden desnaturalizar las proteínas lo que podría afectar a los resultados analíticos.

b) Sangre

Tanto la heparina como el EDTA (46) son apropiados como anticoagulantes si se requiere analizar sangre. Se recomienda el empleo de sangre cuando se necesite estudiar la concentra-

ción de este elemento en personas que no requieran ser sometidas a monitorización, ya que su valor en sangre puede permanecer constante durante meses. El hierro produce un elevado efecto matriz que no puede ser eliminado por la lámpara de deuterio, por lo que debe de emplearse siempre la espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman.

Tabla I. Programa de temperatura del horno de grafito.

	Temp. °C	Rampa s	Tiempo s	Flujo mL/min	Gas	Lectura
1	110	1	20	250	Argón	No
2	130	1	30	250	Argón	No
3	1250	5	30	250	Argón	No
4	2000	0	4	0	Argón	Si
5	2450	1	3	250	Argón	No

c) Orina

Se recomienda la obtención de orina de 24 horas recogida sobre 10 ml de ácido nítrico suprapuro. La orina así tratada permanece estable durante una semana. El crecimiento bacteriano disminuye el nivel de selenio en orina, ya que algunas bacterias son capaces de reducir este elemento a H_2Se que es volátil y se desprende con facilidad. La determinación de las concentraciones de selenio en orina no ayuda a la determinación del estado nutricional, (46) pero es útil para detectar toxicidad, por lo que la orina se considera el espécimen de elección para la monitorización del selenio ocupacional, realizándose el análisis en suero o sangre si la excreción es elevada. También se emplea en selenosis endémica, síndrome de Keshan, etc. La orina es de análisis complicado debido al efecto matriz que producen los fosfatos, por lo que requiere al igual que la sangre la espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman.

d) Otros

El análisis de la concentración de selenio en pelo se ha utilizado en estudios epidemiológicos como indicador a largo plazo en el cáncer, en el síndrome de Keshan, selenosis endémica, intoxicación aguda, etc (47). La manipulación del cabello requiere un cuidado especial, particularmente en países en los que el selenio puede ser un ingrediente de champús.

También se emplea el hígado (45) de biopias y necropsias para la medición de la exposición ocupacional y en medicina forense.

3.2 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en el plasma, suero y sangre por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman

La gran ventaja de este procedimiento es la utilización de las mismas rampas de temperatura para las tres matrices indistintamente.

a) Condiciones analíticas

Se utiliza un espectrómetro de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman (37, 48). La lámpara empleada es de descarga sin electrodos con el fin de evitar la fluctuación que se produce en las lámparas de cátodo hueco, además de su escasa duración. La longitud de onda empleada es de 196,2 nm, la intensidad de corriente de 290 mA y la rendija de 0,7 nm. Se hace necesario un precalentamiento de la lámpara

de al menos media hora antes de comenzar el análisis.

Se utilizan tubos de grafito con plataforma integrada, realizando la lectura en área de pico, utilizando un tiempo de integración de 4 s y un volumen de muestra de 20 μ L.

El programa de temperatura del horno de grafito es el de la tabla 1 (48).

b) Modificador de matriz

Los componentes primarios del modificador de matriz son: paladio (10g/L de $Pd(NO_3)_2$ en HNO_3 al 15%), Tritón X-100 y agua suprapura de 18 $M\Omega/cm$ de resistividad.

Como modificador de la matriz de trabajo se emplean los componentes anteriores en la siguiente concentración: modificador de paladio 1 mL, Tritón X-100 0,1 mL y agua suprapura c.s.p. 100 mL.

c) Preparación del espécimen

El espécimen en el caso de suero o plasma, debe de ser centrifugado 10 minutos a 500 g, mientras que la muestra de sangre debe de homogeneizarse 20 minutos como mínimo.

El espécimen (suero, plasma y sangre) se diluye en modificador de matriz 1/9 (v/v), procediéndose a su homogeneización.

d) Preparación de patrones

Se parte de un patrón certificado de 1 g/L, que es diluido en un matraz aforado hasta concentración de 10 mg/L, estable en nevera al menos durante tres meses. Con este último se realizan los patrones de trabajo diluidos en modificador de matriz (paladio y tritón X-100®), 1/9 (v/v), de concentración final: 0,63, 1,26 y 2,53 μ mol/L.

El blanco es agua suprapura diluida 1/9 (v/v) con modificador de matriz.

e) Características metroológicas

El procedimiento es lineal hasta los 5,06 μ mol/L. El límite de detección obtenido es de 0,01 μ mol/L, la masa característica de 39,1 pg/0,0044 unidades de absorbancia, la recuperación media de 102,3% y la precisión media de 4,5%.

Se considera el método de elección debido a la facilidad de tratamiento del espécimen (no es necesaria la digestión), la economía de tiempo y reactivos y la relativa ausencia de interferencias.

3.3 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en orina por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman

El gran inconveniente de la medida de la concentración de selenio en orina es el efecto matriz que producen los fosfatos. Este análisis debe realizarse sobre una alícuota de orina de 24 horas, en la que no exista hematuria.

a) Condiciones analíticas

Se utiliza un espectrómetro de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman (37, 48-50). La lámpara empleada es de descarga sin electrodos. La longitud de onda empleada es de 196,2 nm, la intensidad de corriente de 290 mA y la rendija de 0,7 nm. Se hace necesario un precalentamiento de la lámpara de al menos media hora antes de comenzar el análisis. Se utilizan tubos de grafito con plataforma integrada, realizando la lectura en área de pico, utilizando un tiempo de integración de 4 s y un volumen de muestra de 20 µL.

El programa de temperatura para el horno es el de la tabla 2.

Tabla II. Programa de temperatura del horno de grafito para análisis de orina.

	Temp. °C	Rampa s	Tiempo s	Flujo mL/min	Gas	Lectura
1	110	1	20	250	Argón	No
2	130	1	30	250	Argón	No
3	1200	5	30	250	Argón	No
4	2200	0	4	0	Argón	Sí
5	2600	1	3	250	Argón	No

b) Modificador de matriz

Los componentes primarios del modificador de matriz son: paladio (10g/L de Pd(NO₃)₂ en HNO₃ al 15%), ácido nítrico suprapuro al 65% (p/p), Tritón X-100 y agua suprapura de 18

3.4 Procedimiento de medida de la concentración de selenio en tejidos por espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrección de fondo Zeeman

a) Condiciones analíticas

Se utiliza un espectrómetro de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman (51). La lámpara empleada es de descarga sin electrodos. La longitud de onda empleada es de 196,2 nm, la intensidad de corriente de 290 mA y la rendija de 0,7 nm. Se hace necesario un precalentamiento de la lámpara de al menos media hora antes de comenzar el análisis. Se

utiliza un introductor de muestras sólidas. La lectura se realiza en área de pico, utilizando un tiempo de integración de 8 segundos.

El programa de temperatura para el horno es el de la tabla 3.

Tabla III. Programa de temperatura del horno de grafito para análisis de tejidos.

	Temp. °C	Rampa s	Tiempo s	Flujo mL/min	Gas	Lectura
1	180	10	20	250	Argón	No
2	300	30	20	250	Argón	No
3	600	20	5	250	Argón	No
4	1200	10	10	250	Argón	No
5	300	5	10	250	Argón	No
6	2400	0	8	0	No	Sí
7	2500	1	3	250	Argón	No

MΩ/cm de resistividad.

Como modificador de la matriz de trabajo se emplean los componentes anteriores en la siguiente concentración: modificador de paladio 1 mL, HNO₃ suprapuro 2 mL, Tritón X-100® 0,1 mL y agua suprapura c.s.p. 100 mL.

c) Preparación de la muestra

El análisis se realiza en orina de 24 horas recogida en frasco de polipropileno y conservada a +4 °C. Se toma una alícuota de ésta y se centrifuga a 500 g, durante 10 minutos.

La orina se diluye 1/4 (v/v) con modificador de matriz, homogeneizándose correctamente.

d) Preparación de patrones

Se parte del mismo patrón acuoso de 1g/L que en el método anterior. Se utilizan los patrones de trabajo diluidos en modificador de matriz (paladio, HNO₃ y tritón X-100®), 1/4 (v/v) de concentración 0,63, 1,26 y 2,53 µmol/L.

El blanco es agua suprapura diluida 1/4 (v/v) con modificador de matriz.

e) Características metrológicas

Con este método se obtiene una recuperación media del 102,9%, un límite de detección de 0,04 µmol/L y un coeficiente de correlación lineal de 0,999.

b) Modificador de matriz

Se utiliza como modificador de matriz primario: paladio (10g/L de Pd(NO₃)₂ en HNO₃ al 15%, HNO₃ al 65% (p/p)).

Como modificador de matriz de trabajo se emplea 5 µL de paladio al 0,4%, 10 µL de HNO₃ suprapuro al 5% (v/v).

c) Preparación de la muestra

Se utiliza un tubo de atomización cerrado dentro del cual se colocan pequeñas cantidades de polvo seco y debidamente pesado de tejido, posteriormente se adiciona el modificador encima de la muestra.

d) Preparación de patrones

La calibración se realiza por adiciones de selenio (0,63, 1,26 y 2,53 µmol/L), a la muestra de referencia de hígado bovino del NIST (National Institute of Science and Technology).

e) Características metrológicas

La precisión obtenida en este método es del 10% y el límite de detección de 0,1 µmol/L y un coeficiente de correlación lineal de 0,998.

3.5 Control de la calidad

a) Materiales de control

Se encuentran en el mercado un gran número de muestras de origen humano, que pueden ser utilizadas para la validación y

para el control interno analítico, entre las que podemos destacar:

Para suero: Nycomed (Seronorm Trace Elements) y Breitländer GMBH.

Para sangre: Nycomed (Seronorm Trace Elements Whole Blood).

Para orina: Nycomed (Seronorm TE Urine) y Breitländer GMBH y Bio-Rad (Lyphocheck Quantitative Urine Control).

Para tejidos: NIST (National Institute of Science and Technology).

b) Programas de evaluación externa de la calidad

Se considera recomendable que además de utilizar los controles anteriores, se participe en los programas de garantía de calidad externa, entre los que podemos destacar:

-The Interlaboratory Comparison Program, Le Centre de Toxicologie du Quebec, Sainte-Foy, Canada.

-Guilford Trace Elements Quality Assesment Scheme, TE-QAS, Centre for Clinical Science and Measurement, University of Surrey, Guilford.

4 INTERVALOS DE REFERENCIA

La concentración de selenio en el plasma (o suero) esta relacionada con la ingesta y responde de forma relativamente rápida a los cambios en la dieta y varía con la situación geográfica (33, 52-62), por lo que no puede trasladarse de unos grupos a otros. Dentro de una misma población, los niños tienen concentraciones más bajas que los adultos. Al nacer, el selenio plasmático es de un 40 a un 70% del valor maternal decreciendo su concentración durante los 4 primeros meses de vida (63), y elevándose gradualmente, hasta alcanzar los valores de un adulto en los últimos años de la adolescencia. La concentración en sangre y en eritrocitos es aproximadamente un 15% y un 37%, respectivamente, más elevada que en el plasma (63). La excreción urinaria de selenio varía con la dieta.

Existen distintos estudios en los que se expresan las variaciones en la concentración de selenio en plasma en distintas Comunidades y ciudades españolas:

AREA GEOGRÁFICA	SEXO	*MEDIA $\mu\text{mol/L}$	INTERVALO $\mu\text{mol/L}$	NUMERO	EDAD	REF.
Barcelona	H	1,03	0,62-1,84	31	28-53	(64)
Barcelona	M	1,06	0,68-1,64	27	26-49	(64)
Galicia	Neonat.	0,52	0,29-0,91	108	0-28 d	(65)
Galicia	M	0,72	0,41-1,07	107	Adultos	(65)
Galicia	Niños	0,72	0,32-1,12	89	6-10	(66)
Madrid	H	1,43 (Sangre)	0,62-2,01	50	65-86	(67)
Madrid	M	1,60 (Sangre)	0,64-2,15	42	67-91	(67)
Madrid	H/M	0,76	0,48-1,40	118	19-70	(68)
Zaragoza	Neonat.	0,39	0,19-0,56	—	0-28 d	(69)
Zaragoza	Niños	0,64	0,26-1,04	—	0,3-1,9	(69)
Zaragoza	Niños	0,90	0,62-1,19	44	2-10	(69)
Zaragoza	H/M	0,96	0,53-1,32	277	21-80	(69)
Zaragoza	H/M	0,79	0,43-1,15	20	>80	(69)

*Plasma-selenio; concentración media de sustancia ($\mu\text{mol/L}$).

H: Hombre. M: mujer

5 CONCLUSIONES

El selenio es un elemento traza esencial de suficiente relevancia clínica para justificar la monitorización de su estado en de-

terminados pacientes, siendo la vía más adecuada para conseguirlo la medida de la concentración total de selenio en el plasma o suero. Se considera como método de referencia la espectrometría de absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman tal y como se describe en este documento.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Levander OA. Selenium. In: Mertz W, ed. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. New York. Academic Press. 1985: 209-79.
- IPCS. Environmental Health Criteria, N°. 58: Selenium. Geneva: WHO, 1987.
- Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker D, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. J Am Med Assoc 1996; 276: 1957-63.
- Schrauzer GN. Selenium. Mechanistic aspects of anticarcinogenic action. Biol Trace Elem Res 1992; 33: 51-62.
- Spallholtz JA. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. Free Radic Biol Med 1994; 17: 45-64.
- Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander OA. Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackie virus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. Nat Med 1995; 1: 433-6.
- Yang G, Wang S, Zhou R, Sun S. Endemic selenium intoxication of humans in China. Am J Clin Nutr 1983; 37: 872-81.
- Lombeck I, Menzel H, Frosch D. Acute selenium poisoning of a 2-year-old child. Eur J Pediatr 1987; 146: 308-412.
- Clark RF, Strukle E, Willians SR, Manogerra AS. Selenium poisoning from a nutritional supplement. J Am Med Assoc 1996; 275: 1087-8.
- Rayman MP. Dietary selenium: time to act. BMJ 1997; 314: 387-8.
- Yi-Fang Jiang, Guang-lu Xu. The relativity between some epidemiological characteristics of Kashin-Beck Disease and selenium deficiency. In: Wendel A, ed. Selenium in Biology and Medicine. Berlin. Springer-Verlag. 1989; 263-9.
- Lane HW, Barroso AO, Englert D, Dudrick SJ, Macfadden BS. Selenium status of seven chronic intravenous hyperalimentation patients. J Parent Ent Nutr 1982; 6: 426-31.
- Shenkin A, Fell GS, Halls DJ, Dunbar PM, Hollbrook IB, Irving MH. Essential trace element provision to patients receiving home intravenous nutrition in the United Kingdom. Clin Nutr 1986; 5: 91-7.
- Smith DK, Teague RJ, McAdam PA, Felman DS, Feldman EB. Selenium status of malnourished hospitalized patients. J Am Coll Nutr 1986; 5: 249-52.
- Loyd-Stihill JD, Ganther HE. Selenium and glutathione peroxidase levels in cystic fibrosis. Pediatrics 1980; 65: 1010-2.
- Castillo R, Landon C, Eckhartz K, Morris V, Levander O, Lewiston N. Selenium and vitamin E status in cystic fibrosis. J Pediatr 1981; 99: 583-5.
- Hincks LJ, Inwards KD, Lloyd B, Clayton BE. Body content of selenium in coeliac disease. BMJ 1984; 288: 1862-3.
- Collins BJ, Bell PM, McMaster D, Love AHG. Selenium in coeliac disease. BMJ 1984; 289: 439.
- Loeschke K, Koning A, Haeberlin ST, Lux F. Low blood selenium concentrations in Crohn's disease. Ann Intern Med 1987; 106: 908.
- Hinks LJ, Inwards KD, Lloyd B, Clayton BE. Reduced concentrations of selenium in mild Crohn's disease. J Clin Pathol 1988; 41: 198-201.
- Farriau JP, Guisolfi J, Navarro J, Putet G, Rey J, Ricour C, et al. Selenium in pediatric nutrition. Arch Franc Pediatr 1993; 50: 715-9.

22. Parker CA, Harvey LG. Luminiscence of somepiazoselenols a new fluorimetric reagent for selenium. *Analyst* 1962; 87: 558-65.
23. Pettersson J, Hansson L, Örnemark U, Olin A. Fluorimetry of selenium in body fluids after digestion with nitric acid, magnesium nitrate hexahydrate, and hydrochloric acid. *Clin Chem* 1988; 34: 1908-10.
24. Koh TS, Benson TH. Critical re-appraisal of fluorometric method for determination of selenium in biological materials. *J Assoc Anal Chem* 1983; 66: 918-26.
25. Lalonde L, Jean Y, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G. Fluorometric of selenium in serum and urine. *Clin Chem* 1982; 28: 172-4.
26. Sheehan TMT, Gao M. Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine. *Clin Chem* 1990; 36: 2124-6.
27. Alfthan G. A micromethod for the determination of selenium in tissues and biological fluids by single test-tube fluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 1984; 165.
28. Neve J, Hanocq M, Molle L, Lefebvre G. Study of some systematic errors during the determination of total selenium and some of its ionic species in biological materials. *Analyst* 1982; 107: 934-41.
29. Bayfield RF, Romalis RF. pH control in the fluorometric assay for selenium with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal Biochem* 1985; 144: 569-76.
30. Johansson K, Andersson O, Olin A. New spectrofluorometric reagent, 2,3-diamino-1,4-bromo-naphthalene, for the determination of selenium in biological materials. *Analyst* 1995; 120: 423-9.
31. Lloyd B; Holt P; Delves T. Determination of selenium in biological samples by hydride generation and atomic-absorption spectrometry. *Analyst* 1982; 107.
32. Inhat M; Wolynetz MS; Thomassen Y; Verlinden M. Interlaboratory trial on the determination of total selenium in lyophilized human blood serum. *Pure Appl Chem* 1986; 58: 765-89.
33. Tiran B, Tiran A, Rossipal A, Lorenz O. Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood, serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1993; 7: 211-6.
34. D'Ulivo A, Lampugnani L, Sfetsios I, Zambioni R. Studies on total selenium determination in biological samples by hydride generation non-dispersive atomic fluorescence spectrometry after hydrobromic acid/bromine digestion. *Spectrochim Acta* 1993; 48B: 387-96.
35. D'Ulivo A, Lampugnani L, Sfetsios I, Zambioni R, Forte C. Studies on the breakdown of organo-selenium compounds in a hydrobromic acid bromine digestion system. *Analyst* 1994; 119: 633-40.
36. Radziuk B, Thomassen Y. Chemical modification and spectral interferences in selenium determination using Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1992; 7: 397-403.
37. Feuerstein M, Schlemmer G. Determination of Se in human serum by GFAAS with transversely heated graphite atomizer and longitudinal Zeeman-effect background correction. *Atomic spectroscopy* 1999; 20 (5): 180-5.
38. Gardiner. PHE, Littlejohn D, Halls DJ, Fell GS. Direct determination of selenium in human blood serum and plasma by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Trace Elements Med Biol* 1995; 9: 74-81.
39. Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Deelstra H, Picramenos D, Kostakopoulos A. Selenium concentration in serum of healthy greek adults. *Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1994; 99-109.
40. Mestek O, Suchanck M, Vodickova, Z, Zemanova B, Zima T. Comparison of the suitability of various atomic spectroscopic techniques for the determination of selenium in human blood. *J Anal At Spectrom* 1997; 12: 85-9.
41. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst* 1996; 121: 189-4.
42. Delves HT., Sieniawska CE. Simple method for the accurate determination of selenium in serum by using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1997; 12: 387-89.
43. Shambenger RJ. Selenio. En: *Química Clínica. Métodos*. Edit. Panamericana. 1990; 554-61.
44. Handelman GL, Kosted P, Shot S, Dratz EA. Determination of selenium in human blood by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem* 1989; 61: 2244-9.
45. Sanz M, Diaz C. Analysis of selenium in body fluids: a review. *Chem Rev* 1995; 227-57.
46. Sheehan TMT, Halls D. Measurement of selenium in clinical specimens. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 301-5.
47. Chen X, Yang G, Chen J, Chen X, Wen Z, Ge K. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Element Res* 1980; 2: 91-107.
48. Montel A, Lopez Colón JL, De Pradena J.M, Alvarez G, Hoya T. Evaluación de un método para la determinación de selenio en sangre total. *Quím Clín* 1998; 17: 88.
49. Kao CM, Cherng YJ, Wung MH, Tsao PY, Kuo MS. Determination of total selenium in human urinary and serum by graphite-furnace atomic-absorption spectrophotometry with palladium-niquel-amonium nitrates as a matrix modifier. *J Chin Chem Society* 1993; 40.
50. Horg CJ, Tsai JL, Lin SR. Determination of urinary arsenic, mercury, and selenium in steel production workers. *Biol Trace Elem Res* 1998; 70: 29-40.
51. Lindberg I, Lundberg E, Arkhammer P, Berggren PO. Direct determination of selenium in solid biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1988; 3: 497-501.
52. Fell GS. Trace metals in renal failure. In: Taylor A ed. *Aluminium and Other Trace Elements in Renal Disease*. London. Bailliere Tindall. 1986; 325-31.
53. Tiran B, Tiran A, Petec W, Rossipal E, Wawschinec O. Selenium status of healthy children and adults in Styria (Austria). Investigation of possible undersupply in the Styrian population. *Trace Elem Med* 1992; 9: 75-9.
54. Tarp U, Steengard K, Hansen JC, Thorling EB. Glutathione redox cycle enzymes and selenium in severe rheumatoid arthritis: lack of antioxidant response in selenium supplementation in polymorphonuclear leucocytes. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1044-9.
55. Dubois F, Teby A, Belleville F, Nabel P, Paysant P. Selenium status in Eastern France. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 28-32.
56. Pearson DJ, Suárez-Méndez VJ, Day JP, Miller PF. Selenium status in relation to reduced glutathione peroxidase activity in aspirin-sensitive asthma. *Clin Esp Allergy* 1991; 21: 203-8.
57. Gerli G, Locatelli GF, Mongiat R, Zenoni R, Agostini A, et al. Erythrocyte antioxidant activity, serum ceruloplasmin, and trace element levels in subjects with alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 614-8.
58. Marano G, Fischioni P, Graziano C, Iannone M, Morisi G. Increased serum selenium levels in patients under corticoid treatment. *Pharmacol Toxicol* 1990; 67: 120-2.
59. Rossi B, Siciliano G, Risaliti R, Muratorio A. Effects of selenium and vitamin E on muscular strength and blood parameters in Steiner disease. *J Neurol Sci* 1990; 11:37-42.
60. Viegas-Crespo AM, Pavao ML, Santos V, Santos MC, Neve J. Trace element status (Se, Cu, Zn) and serum lipid profile in Portuguese subjects of San Miguel Island from Azores' archipelago. *J Trace Elem Med Biol*. 2000; 14: 1-5.
61. Golubkina NA, Alfthan GV. The human selenium status in 27 regions of Russia. *J Trace Elem Med Biol*. 1999; 13: 15-20.
62. Suadicaní P, Hein HO, Gyntelberg F. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. *Atherosclerosis* 1992; 96: 33-42.
63. Johannessen JK, Gammelgaard B, Jons O, Hansen SH. Comparison of chemical modifiers for simultaneous determination of different selenium compounds in serum and urine by Zeeman-effect electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* 1993; 8: 999-1004.
64. Sabé R, Rubio R, García-Beltrán L. Selenium determination in human serum by zetaas: relevant analytical aspects. *Metal Ions in Biology and Medicine*. 2000; 6: 270-72.
65. Fraga JM, Cocho JA, Alvela M, Alonso JR, Peña J, Tojo R. Selenium state of children. The selenium content of the serum of normal children and children with inborn errors of metabolism. *J Inher Metab. Dis* 1983; 2: 99-100.
66. Cocho J.A, Parrado C, Cervilla J.R, Alonso-Fernández J.R, Fraga J.M. Determinación fluorimétrica de selenio. Estudios séricos en un grupo de población. *Quím Clín* 1984, 3:19-22.
67. Montel A. Muñoz R, Alvarez Bustamante G, López Colón JL, De Pradena J.M, Hoya T. Estudio de los valores de selenio en sangre total en enfermos de Alzheimer. *Quím Clín* 2000, 19:155.
68. Seijas MV, Gil A, Muñoz MT, Lozano R. Therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. Ed. Irving Sunshine, California. Marcel Dekker, Inc. 1992; 271-4.
69. Pérez Beriain R.M, García de Jalón A, Calvo Ruata M.L, Pérez Beriain M.T. Selenio: valores de normalidad según grupos etarios. *Quím Clín* 2000, 19:154.

Correspondencia:
SEQC
Comisión de Elementos Traza
c/ Padilla, 323-325
08025 Barcelona