

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Abteilung für Molekulare Innere Medizin in der Medizinischen Poliklinik

Leiter: Prof. Dr. H. Wajant

Spektrofluorimetrische Selenbestimmung in Urinproben

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ute Sieprath

aus Neu-Ulm

Würzburg, Juni 2005

Referent: Prof. Dr. F. Jakob

Koreferent: Prof. Dr. C. Reiners

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2006

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1. Geschichte und Bedeutung des Selen	1
1.2. Vorkommen und Funktionen von Selen, Selenmangel	1
1.3. Selenmetabolismus	3
1.4. Verfahren zur Selenbestimmung	4
1.5. Zielsetzung	5
<i>2. Material</i>	<i>6</i>
2.1. Geräte	6
2.2. Chemikalien	7
2.3. Lösungen	8
2.4. Urin- und Serumproben	9
<i>3. Methoden</i>	<i>11</i>
3.1. Beschreibung der optimierten Methode	11
3.1.1. Aufschluss der Proben	11
3.1.2. Reduktion von Se(VI) zu Se(IV)	11
3.1.3. Bildung des Se-DAN-Piazselenols	12
3.1.4. Extraktion des Se-DAN-Piazselenols	12
3.1.5. Spektrofluorimetrische Messung	12
3.2. Statistik zur Validierung der optimierten Analysemethode	13
3.2.1. Inter-Assay-Varianz, Ausreißertest nach Grubbs	13
3.2.2. Intra-Assay-Varianz	15

3.2.3. Blindwerte zur Festlegung der Nachweisgrenze	15
3.2.4. Standardadditionsverfahren	16
3.3. Validierung der optimierten Analysemethode für Urinproben	16
3.3.1. Richtigkeit des Verfahrens	16
3.3.2. Validierung mit externem Referenz-Urin	18
3.3.3. Einfluss von Störionen und Proteinen	18
3.3.4. Vergleich der Selenkonzentrationen in Urin und in Serum	20
3.4. Messung und Darstellung des Selengehaltes in Kinderurinen	21
3.4.1. Kinderurin-Messdaten, epidemiologischer Ansatz	21
3.4.2. Mittelwerte und Perzentilen des Selengehaltes bei Normierung auf Kreatinin	22
3.4.3. Perzentilen ohne Kreatininbezug	23
3.4.4. Selen-Jod-Korrelation	24
3.5. Diskussion der Ursachen von Ausreißern	24
3.6. Subjektive Erfahrungen mit der Durchführung der optimierten Methode	24
4. <i>Ergebnisse und Diskussion</i>	25
4.1. Statistische Auswertung	25
4.1.1. Inter-Assay-Varianz, Ausreißertest nach Grubbs	25
4.1.2. Intra-Assay-Varianz	27
4.1.3. Blindwerte zur Festlegung der Nachweisgrenze	27
4.1.4. Standardadditionsverfahren	28
4.2. Validierung der optimierten Analysemethode für Urinproben	29
4.2.1. Richtigkeit des Verfahrens	29
4.2.2. Validierung mit externem Referenz-Urin	31
4.2.3. Einfluss von Störionen und Proteinen	31

4.2.4. Vergleich der Selenkonzentrationen in Urin und in Serum	32
4.3. Messung und Darstellung des Selengehaltes in Kinderurinen	35
4.3.1. Kinderurin-Messdaten, epidemiologischer Ansatz	35
4.3.2. Mittelwerte und Perzentilen des Selengehaltes bei Normierung auf Kreatinin	36
4.3.3. Perzentilen ohne Kreatininbezug	37
4.3.4. Selen-Jod-Korrelation	38
4.4. Diskussion der Ursachen von Ausreißern	39
4.5. Erfahrungen und Empfehlungen	41
5. <i>Zusammenfassung, Ausblick</i>	43
6. <i>Anhang</i>	47
6.1. Kurven und Tabellen	47
6.2. Abkürzungsverzeichnis, Definitionen	75
7. <i>Literaturverzeichnis</i>	77

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Bedeutung des Selen

Das essentielle Spurenelement Selen wurde von dem schwedischen Chemiker Berzelius 1817 entdeckt [1,2]. Erst 1957 wurde seine herausragende Bedeutung für Säugetiere von Schwarz und Foltz [2,3,23,40] erkannt, lange nachdem die Bedeutung von Jod für die Schilddrüse bekannt und in den 1920ern schon Jodprophylaxeprogramme eingeführt waren [1].

Nun holt das Interesse an Selen stark auf. Die unverzichtbare Rolle des Selen beim Metabolismus der Thyreoidea läßt auch an eine Selen-Supplementation zur Vorbeugung von Schilddrüsenerkrankungen denken [1,2]. Derzeit gilt eine von der WHO empfohlene Tagesdosis von 20-80 µg Selen [2,4], die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt bis zu 100 µg Selen täglich [23]. Für Erwachsene wird eine tägliche Selenzufuhr von 50 bis 200 µg als sicher und adäquat eingeschätzt [49]. Endgültige Empfehlungen existieren jedoch noch nicht.

1.2 Vorkommen und Funktionen von Selen, Selenmangel

Selen kommt in diversen Oxidationszuständen als Selenium (0), Selenid (-2), Selenit (+4) und Selenat (+6) vor [41]. Es liegt auch in organischen Verbindungen als Selenomethionin und Selenocystein und im Gaszustand vor [5-8,41,42]. Man vermutet, dass Selen wie Jod nach der Eiszeit unterschiedlich intensiv aus dem Erdboden gewaschen wurde, so dass weltweit Unterschiede im Selengehalt des Bodens bestehen [4,6,40]. Somit gibt es Regionen, in denen die Selenversorgung über Getreide unzureichend ist und man über eine Supplementation nachdenkt [4,9,10,11,40]. Man weiß, dass Meeresfisch, Fleisch und Milchprodukte sehr selenreich sind [12,4,23], Getreide aber aufgrund der oben diskutierten Gründe in vielen Regionen eine unzureichende Selenquelle darstellt.

Selen wird im menschlichen Körper als 21. Aminosäure, als „Selenocystein“ ko-translational in Proteine eingebaut [13,2,1,48]. Diese Selenoproteine besitzen

katalytische Funktionen, die durch das aktive Zentrum, den Selenrest, ermöglicht werden [2].

In den letzten Jahrzehnten wurden diverse Selenoproteine und ihre Funktionen erforscht. Hier sind die Glutathionperoxidasen, die Dejodasen, das Selenoprotein P, die Thioredoxinreduktasen, die Selenophosphatsynthetase 2 und viele andere zu erwähnen [2,1,14,16,4,58]. Die Mehrzahl der Selenoproteine ist an Redoxreaktionen beteiligt. Dabei schützen sie die Zellen vor oxidativem Stress. Die Überlegungen gehen in der Onkologie in die Richtung, dass man Zellschäden und auch genetischen Alterationen durch ausreichende Selenversorgung vorbeugen kann. In diversen epidemiologischen Ansätzen zur Krebsforschung war eine Rolle des Selens bei der Senkung der Tumorinzidenz zu erkennen [2,30-32,46,58]. Auch bei der Prophylaxe von Atherogenese und kardiovaskulären Erkrankungen wie der Kardiomyopathie bei Hämochromatose spielt Selen eine Rolle [4,2,14,17,57].

Neben der Aufgabe als Komponente des zellulären Redox- und Antioxidationsystems wurden noch weitere Funktionen der Selenoproteine eruiert: Die Dejodasen aktivieren und deaktivieren die wirksame Form des Schilddrüsenhormons. Als struktureller, polymerisierter Bestandteil der Mitochondrienkapsel von Spermien trägt ein Selenoprotein zur Fertilität von Männern bei [17,1,14,2,58]. In der Intensivmedizin wurde unlängst die Bedeutung von Selen beim Immunstatus, der Sepsis/SIRS und der Pankreatitis erkannt [19,2]. Auch bei rheumatischen Erkrankungen wird Selen Beachtung geschenkt [23]. Im Gehirn nimmt Selen vielfältige Funktionen wahr, es beeinflusst unter anderem Gemütszustände wie Depression, Angst und Verwirrtheit [58]. Man vermutet, dass Selen bei Diabetes die Glucosehomöostase verbessern kann [47]. In der Gynäkologie wird Selenmangel mit Fehlgeburten und dem Zustand des Neuralrohrdefektes assoziiert [50,51]. In Verbindung mit Viren gilt Selenmangel als prädisponierend für den Ausbruch der Erkrankung, als Beispiele können Aids und die Keshan-Kardiomyopathie dienen [10,13,15,52,54,58]. Unter anderem wurde bei knock-out Mäusen die Beobachtung gemacht, dass Selenoproteine essentiell sind für das Leben, die Entwicklung und die Abwehr von Infektionen und

chronischen Entzündungen (z.B. Kolitis) [16,2]. Selbst beim Alterungsprozess scheinen Selenoproteine mitzuspielen [13].

Unter dem Zustand von Selendeprivation werden Selenoproteine nach einer hierarchischen Ordnung gebildet [15]. Bei endemischem Selenmangel kommt es in Verbindung mit anderen Faktoren zu Krankheitsbildern wie dem Keshan-Syndrom, der Kashin-Beck-Osteoarthropathie und der myxödematösen Form des Kretinismus [4,2,17,52]. Auch in Europa wurden Selenmangelzustände beobachtet, beispielsweise bei der Phenylketonurie, der total parenteralen Ernährung [53], dem Morbus Crohn oder der Sepsis [6,19,21-25]. Selenmängel werden bei den aufgeführten Erkrankungen zwar beobachtet, sind aber in ihrer genauen Bedeutung weitestgehend noch unklar. Zudem sind sie aufgrund des guten europäischen Ernährungsstandards meist nicht lebensgefährlich wie beispielsweise in China [2].

Hier bleibt zu erwähnen, daß auch toxische Selenzustände beschrieben wurden. Die Selenosis äußert sich unter anderem als knoblauchartiger Atem, Veränderungen an den Nägeln und Haaren, Leukopenie, hypochromer Anämie und neurologischen Manifestationen [40].

1.3 Selenmetabolismus

Über den Metabolismus des Selens im menschlichen Organismus ist noch nicht ausreichend viel bekannt. Es wird im Darm aus anorganischen Selenformen und aus organischen Verbindungen, meist tierischen Proteinen gespalten und aufgenommen, gelangt dann in die Leber und wird in diverse Selenoproteine eingebaut [26,43]. Es existiert die Modellvorstellung, dass Selen im Körper in mehreren „Pools“ gespeichert wird: zum geringeren Anteil in einem Selenomethionin-Pool, als Hauptanteil im Pool der selenocysteinhaltigen Proteine. Bei Patienten mit gut gesättigten Selenpools muss ein länger als zwei Monate bestehender Selenmangel herrschen, bis die Selenkonzentration im Urin abnimmt [43,59]. In der Schilddrüse wurde eine hohe Konzentration an Selen gefunden, da die Thyreoidea beständig H_2O_2 produziert und daher eines starken oxidativen Schutzes bedarf [1]. Im Vergleich mit anderen Organen weist die Schilddrüse die höchste physiologische Selenkonzentration vor [61]. Des

weiteren wurde in den Nieren ein sehr hoher Selenspiegel festgestellt [55]. Leber und Muskulatur fallen ebenfalls als „Selenspeicher“ auf.

Im Serum ist entweder über die Glutathionperoxidaseaktivität oder über die Selenkonzentration eine valide Aussage über den Selenernährungszustand möglich [16,21,40]. Selen kann bei übermäßigem Genuß toxisch sein. In diesem Fall reguliert der Körper den Selenstatus über die Ausscheidung und die Atmung. Der Hauptanteil wird über die Lunge und den Urin in methylierter Form ausgeschieden [8,5,43,45,59]. Selen kann im Urin jedoch auch in den anorganischen Formen Selenit und Selenat [56] oder als selenhaltige Aminosäuren wie Selenomethionin [45] ausgeschieden werden.

1.4 Verfahren zur Selenbestimmung

Schon vor 50 Jahren wurden die ersten Verfahren zur Selenbestimmung entwickelt. 1982 beschrieben Koh und Benson die Spektrofluorimetrie als eines der ältesten und einfachsten Verfahren [27]. Als aber neue elegante Methoden wie die Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) und die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) in den wissenschaftlichen Vordergrund rückten, geriet die Spektrofluorimetrie in den Hintergrund. Im klinischen Alltag sind verschiedene Verfahren der AAS im Gebrauch. Diese Verfahren beinhalten allerdings einen hohen Kostenfaktor und Zeitaufwand.

Im Jahre 1990 wurde die Spektrofluorimetrie von Sheehan und Gao dann wieder aufgegriffen. Sie modifizierten es für die präzise Selenbestimmung pädiatrischer Proben. Im klinischen Alltag fand die Spektrofluorimetrie jedoch bislang wenig Eingang.

Mit der Zielsetzung, das modifizierte Verfahren von Sheehan und Gao weiter zu optimieren, zu vereinfachen und zu validieren, hat C. Stober [29] an einem genauen und kostengünstigen Verfahren der Selenbestimmung im Serum gearbeitet.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit geht von dem optimierten Verfahren von C. Stober aus, das in der vorliegenden Arbeit auf die Anwendbarkeit für Urinproben getestet wird.

Mittels validierender Statistik wurde untersucht, ob die Methode ausreichend sensitiv für die Messung von Selen in Urin ist. Dazu wurden im Rahmen dieses Pilotprojekts 100 Urinproben von Schulkindern eines Würzburger Gymnasiums gemessen. Dabei wurde nicht der individuelle Selenstatus erfaßt, sondern mittels Spontanurinproben lediglich ein epidemiologischer Ansatz verfolgt. Da Franken ein selenarmes Gebiet ist, war der durchschnittliche Selenstatus zur Feststellung eines möglichen Selenmangels von Interesse. Da für Selenuntersuchungen standardmäßig Blut verwendet wird [40], wurde untersucht, ob die Selenwerte im Urin mit Referenzwerten im Serum korrelieren.

Weiterhin war auch der Zusammenhang zwischen Selen- und Jodwerten im Urin Gegenstand der Untersuchungen.

In der folgenden Arbeit wird zunächst die Methodik der Analyse vom Grundsatz her dargestellt und ihre Anwendung auf Urine allgemein und Kinderurine im besonderen beschrieben.

Im Auswertungsteil werden die Messergebnisse vorgestellt und gleichzeitig interpretiert.

Die zusammengefassten Ergebnisse bilden anschließend die Grundlage für einen Ausblick.

2 Material

2.1 Geräte

In Tabelle 1 sind alle für die Versuche eingesetzten Geräte und die jeweiligen Hersteller aufgelistet, teilweise sind auch die deutschen Vertriebsgesellschaften angegeben.

Gerät	Hersteller und Vertrieb in Deutschland
Reaktionsröhrchen (20 x 150 mm)	Wheaton, Millerville NJ, USA. Deutschland: Neolab Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg, Artikel-Nr. : 90000612
Teflon-Schraubverschlüsse GL18	Fischer Scientific: Artikel-Nr. : 62069018
Küvetten: Elkay Ultra-Vu, 4 klare Seiten (10 mm) Hellma Suprasil Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	Carl Roth GmbH & Co. D-76185 Karlsruhe, Artikel-Nr. : 8126.1 Hellma GmbH & Co. D-7840 Müllheim Hartenstein, TypeNr. 101. -QS
Heizblock VLM 1.0	VLM GmbH, D-33818 Leopoldshöhe, Bestellnummer: V.617.562.220
Magnetrührer IKA Combimag Reo	Janke & Kunkel, IKA Werk, Staufen
Mixer Vibrofix VF 1 Electronic	Janke & Kunkel, IKA Werk, Staufen
Pasteur Pipetten, 230 mm 5 ml Pipettor und Combitips plus (50 ml)	Eppendorf Reference
Scheidetrichter, 250 ml	Fluka Chemical Co. Ltd., Buchs, Schweiz Deutschland: Fluka, D-89203 Neu-Ulm
Spektrofluorimeter Perkin Elmer LS50B	Perkin-Elmer Corp. , Norwalk, CT, USA Deutschland: Perkin-Elmer Deutschland, D-88662 Überlingen
Ultraschallbad 3Mcompact, 240 V	Nuclear Products

Tabelle 1: Herstellerverzeichnis der benutzten Geräte.

2.2 Chemikalien

In Tabelle 2 sind die verwendeten Chemikalien mit ihrem Reinheitsgrad und die entsprechenden Hersteller bzw. deutschen Vertriebe aufgeführt.

Substanz	Qualität	Hersteller und Vertrieb in Deutschland
2,3-Diaminonaphtalin (=DAN)	Minimum 95 %	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA Deutschland: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim, Artikel-Nr.: D-2757
Cyclohexan	99 % (HPLC grade)	Sigma-Aldrich Chemie, Katalog Nr.: 27,062-8
Ethylen-diamin-tetraacetat, Na ₂ H ₂ EDTA	99 %	Fluka Chemical Artikel-Nr.: 03680
Salzsäure, HCl	0,1 M	Merck KG, Darmstadt, Germany
Salzsäure, HCl, rauchend	37 %	Merck
Salpetersäure, HNO ₃	65 % (16 M)	Fluka Chemical
Perchlorsäure, HClO ₄	70 % (11,6 M)	Fluka Chemical
Physiologische Kochsalzlösung, NaCl	0,9 % (154 mMol/ l H ₂ O)	Fluka Chemical
Seleno-DL-Methionin	99 %	Sigma-Aldrich Chemie
Seleno-Cystein	99 %	Sigma-Aldrich Chemie
Natriumselenit	99 %	Sigma-Aldrich Chemie
Referenzserum: Standardisiertes Serum, Seronorm	Konzentration: 80 µg/l	Seronorm Trace Elements Synlab diagnostic e.K., Friedrichsring 4, D-68161 Mannheim Artikel-Nr.: 201405
Referenzurin: Urine blank	Konzentration: 20 µg/l	Seronorm, s.o. Artikel-Nr.: 201305
Rinderserumalbumin; Bovine Albumine	Minimum 98 %, pH 7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, D-49-7329-970, Artikel-Nr. A-7906

Tabelle 2: Qualität und Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

2.3. Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser hergestellt.

Säuremischung zum Aufschluß der Proben:

16 M HNO₃ und 11,6 M HClO₄ wurden im Volumenverhältnis 4 + 1 gemischt.

EDTA-Lösung:

0,9306 g Na₂H₂EDTA wurden unter Verwendung eines Magnetrührers in 1 l destilliertem H₂O gelöst.

DAN-Lösung:

In einem 50 ml Kolben wurden 50 mg 2,3-DAN und 50 ml HCl für 2 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Für 5 Minuten verweilte der Kolben in einem 50-60°C heißen Wasserbad, anschließend stand er zum Abkühlen 5 Minuten im Ultraschallbad.

Die abgekühlte DAN-Salzsäure-Lösung wurde in einen Scheidetrichter gegossen, 12 ml Cyclohexan hinzugefügt und 2 min kräftig geschüttelt. Daraufhin blieb der Scheidetrichter mit dem Gemisch für mindestens 3 Minuten stehen, bis die Phasentrennung erfolgt war. Danach wurde die untere, wässrige Phase mit dem protonierten DAN in einen sauberen Scheidetrichter abgelassen, während die obere Cyclohexan-Phase verworfen wurde. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nachdem die wässrige Phase nach dem dritten Waschen mit Cyclohexan klar war, wurde sie in einem Becherglas bis zur Verwendung aufbewahrt.

Anmerkung: An jedem Versuchstag musste die DAN-Lösung neu angesetzt werden.

Se-Standardlösungen:

a) Se (IV)-Lösungen zur Erstellung einer Standardkurve:

10 mg Natriumselenit wurden in 1 l destilliertem H₂O gelöst. Diese Stammlösung wurde herunterverdünnt auf 5 µg/l (0,063 µmol/l), 15 µg/l (0,2 µmol/l),

25 µg/l (0,32 µmol/l), 50 µg/l (0,63 µmol/l), 75 µg/l (0,95 µmol/l), und 100 µg/l (1,3 µmol/l). Diese Lösungen wurden als Standardlösungen in Glasflaschen mit Schraubverschlüssen aufbewahrt.

b) Organische Standardlösungen:

Lösungen zu 25, 50, 75 und 100 µg/l Selenomethionin oder Selenocystein wurden - wie oben für die Se(IV)-Standardlösungen beschrieben - als organische Standardlösungen hergestellt.

Lösungen für den Störionen-Versuch:

a) Albuminlösung:

Aus zwei Urinpools A und B wurden je 4 Stammlösungen à 5ml hergestellt. Es wurden verschiedene Albuminmengen eingewogen und in den Urinen mit Hilfe des Vibrofix aufgelöst. Zu den Albuminmengen und dem näheren Procedere siehe Anhang, Tabelle 6 und Punkt 3.3.3.

b) Ionische Stammlösungen:

Die Salze NaCl, KCl und KH_2PO_4 wurden in verschiedenen Mengen in je 1 ml Urin A und B mit Hilfe des Vibrofix aufgelöst. Zu den genauen Mengen und dem näheren Procedere siehe Anhang, Tabelle 6 und Punkt 3.3.3.

2.4 Urin- und Serumproben

Urinproben von Kindern:

Im Rahmen einer Jodstudie von PD Dr. Rendl aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg wurden im Juli 1999 zahlreiche Urinproben von Kindern eines Würzburger Gymnasiums gesammelt, die Jodkonzentrationen bestimmt und die Kreatininwerte gemessen [62]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 100 von diesen Urinproben, die in Urinmonovetten tiefgekühlt in der Nuklearmedizinischen Klinik gelagert waren, von November 2001 bis Juni 2002 in Dreifachbestimmungen auf ihre Selenkonzentrationen untersucht. Während dieser Messungen wurden die Urinproben im Kühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

Urin- und Serumproben von Kommilitonen:

Für den anstehenden Vergleich der Selenkonzentrationen im Serum und Urin wurde der Urin von 13 Kommilitonen gesammelt und jeweils sofort hinterher Blut abgenommen. Dies geschah in der Nuklearmedizinischen Klinik, in der am gleichen Tag das Blut zentrifugiert wurde und die Kreatininwerte der Urinproben bestimmt wurden. Die Serum- und Urinmonovetten wurden dann im Kühlschrank bei -20°C gelagert.

Poolurin:

Bei den Messungen der Kinderurine wurden für die Versuche „Inter“- und „Intra-Assay“ und „Interner Standardurin“ mehrere Pools aus Eigenurin hergestellt. Diese wurden teilweise mit destilliertem Wasser auf verschiedene Konzentrationen herunterverdünnt, teilweise verschieden konzentriert ohne Zusatz von Wasser gewonnen. Die verschiedenen Pools unterschiedlicher Konzentration wurden beschriftet und in Eppendorf- Caps zu je 1,5 ml aliquotiert. Die Urinproben wurden dann im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Externer Urin- und Serumstandard:

Wie in der Bedienungsanleitung der Firma Seronorm beschrieben, wurde eine bestimmte Menge an destilliertem Wasser den jeweiligen kommerziellen Standards von Seronorm hinzupipettiert. Anschließend wurden die Gefäße wieder verschlossen und durch kräftiges Schütteln das komplette Pulver im Wasser aufgelöst. Die Standards wurden dann bei -20°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3 Methoden

3.1 Beschreibung der optimierten Methode

Auf der Grundlage des Verfahrens, das 1982 erstmals von Koh und Benson [27] beschrieben wurde, optimierte und vereinfachte C. Stober die spektrofluorimetrische Methode zur Selenbestimmung [29]. Mit dieser optimierten Methode wurden alle Urinmessungen durchgeführt. Im Folgenden werden die angewendeten Versuchsschritte kurz beschrieben.

3.1.1 Aufschluss der Proben

400 µl einer Standard-, Serum- oder Urinprobe wurde in ein Glasröhrchen pipetiert. Zum Aufschluss wurde 1 ml der unter 2.3 beschriebenen Säuremischung zu jeder Probe hinzugegeben, die Teflon-beschichteten Schraubverschlüsse fest auf die Röhrchen gedreht und diese in den nicht vorgeheizten Heizblock gestellt. Die Temperatur wurde auf 190 °C eingestellt und die Proben über Nacht (mindestens jedoch 6 Stunden) inkubiert.

3.1.2 Reduktion von Se(VI) zu Se(IV)

Am nächsten Morgen wurden die Proben aus dem Heizblock genommen und in einen Metallständer zum Abkühlen gestellt. Der Heizblock wurde vorbereitend auf 150 °C eingestellt. Nachdem die Proben Raumtemperatur erreicht hatten, wurden die Schraubverschlüsse unter dem Abzug abgedreht. Um einen Verlust von Selen, das im Deckel zurückbleiben könnte, zu vermeiden, wurden mit einer feinen Pipettenspitze die Tröpfchen aus den Schraubverschlüssen gesaugt und den Proben hinzugegeben. Die Deckel wurden anschließend zur Reinigung verworfen. Dann wurden 0,5 ml 11,6 M HCl mit einer Eppendorfpipette zu jeder Probe dazugegeben. Die offenen Probenröhrchen wurden 60 Minuten in den 150 °C heißen Heizblock gestellt. Nach 20 und 40 Minuten wurden erneut jeweils 0,5 ml der rauchenden Salzsäure hinzugegeben. Während dieser Inkubationszeit wurde die DAN-Lösung zubereitet. Dieser Versuchsschritt ist unter 2.3 beschrieben.

In oben beschriebenem Schritt wurde Se(VI) zu Se(IV) reduziert. Durch das offene Abbrauchen wurde gleichzeitig die überschüssige Salpetersäure eliminiert. Bei der dritten Zugabe von rauchender Salzsäure war deshalb eine deutliche Minderung, meistens eine völlige Entfärbung des sich entwickelnden gelben Rauches zu erkennen.

3.1.3 Bildung des Se-DAN-Piazselenols

Die Proben wurden auf Raumtemperatur heruntergekühlt und der Heizblock auf 60°C gestellt. Nach dem Abkühlen der Proben wurden jeweils 16 ml 0,0025 M Na₂H₂EDTA hinzugegeben. Diese Lösung fängt Interferenzsubstanzen ab, die an Stelle des Selen eine Bindung mit DAN eingehen könnten. Nun wurde 1 ml der DAN-Lösung zu jeder Probe pipettiert und die Glasröhrchen mit neuen Schraubverschlüssen fest verschlossen. Die Proben wurden kurz geschüttelt und dann 40 Minuten im 60°C heißen Heizblock inkubiert.

3.1.4 Extraktion des Se-DAN-Piazselenols

Die Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht und die Verschlüsse dann abgedreht. Unter dem Abzug erfolgte die Zugabe von je 5 ml Cyclohexan. Die Röhrchen wurden mit denselben Schraubverschlüssen wieder verschlossen und jeweils 2 Minuten lang kräftig geschüttelt. In dieser Zeit sollte sich der unpolare Se-DAN-Komplex vollständig in der Cyclohexan-Phase lösen. Dann blieben die Röhrchen 5 Minuten lang in einem Metallständer stehen. Nachdem sich die unpolare von der wässrigen Phase getrennt hatte, wurde unter dem Abzug aus jedem Probenröhrchen 2 ml der Cyclohexanphase in eine Küvette pipettiert.

3.1.5 Spektrofluorimetrische Messung

Das Spektrofluorimeter wurde auf folgende Werte eingestellt:

- Spaltbreite für Excitation: 2,5 nm
- Spaltbreite für Emission: 10 nm
- Integrationszeit: 1 Sekunde
- Wellenlänge bei Excitation: 364 nm
- Wellenlänge bei Emission: 520 nm.

Zunächst wurden die Standardlösungen in aufsteigender Konzentration wie unter 2.3 beschrieben gemessen, um die Standardkurve zu erstellen, durch die das Spektrofluorimeter kalibriert wurde. Im folgenden konnten die gemessenen Selenkonzentrationen der einzelnen unbekanntenen Proben in $\mu\text{g/l}$ abgelesen werden.

3.2 Statistik zur Validierung der optimierten Analysemethode

3.2.1 Inter-Assay-Varianz, Ausreißertest nach Grubbs

Die Präzision und Reproduzierbarkeit eines Analyseverfahrens kann durch vielfache Bestimmung der gleichen Proben im gleichen Assay (Intra-Assay-Varianz) oder in verschiedenen Assays (Inter-Assay-Varianz) bestimmt werden: Wird die gleiche Probe über mehrere Tage hinweg in verschiedenen Assays auf ihre Analytenkonzentration hin untersucht, wird die Präzision und Reproduzierbarkeit als sogenannte Inter-Assay-Varianz bestimmt. Wird die gleiche Probe in vielfacher Bestimmung im gleichen Assay an einem Tag gemessen, wird die Präzision und Reproduzierbarkeit als sogenannte Intra-Assay-Varianz bestimmt. Mittels der Inter-Assay-Varianz werden somit Fehler aufgedeckt, die bei Messungen über mehrere Tage hinweg auftreten können. Mittels der Intra-Assay-Varianz werden Fehler berücksichtigt, die innerhalb einer Messung auftreten.

Die Präzision bzw. Reproduzierbarkeit beschreibt also die Übereinstimmung zwischen Ergebnissen, die durch Wiederholung von Messvorgängen erhalten wurden. Mit der Präzision werden zufällige Fehler erfasst [33]. Ein Maß dafür ist die Standardabweichung bzw. die Varianz (das Quadrat der Standardabweichung). Über die Standardabweichung bzw. die Varianz werden Bereiche definiert, innerhalb derer ein Einzelwert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit anzutreffen ist. Da die Präzision allerdings von der Höhe der Analytenkonzentration abhängt, muss der sogenannte Variationskoeffizient bzw. die relative Standardabweichung (Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert) in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten bestimmt werden. Hieraus ergibt sich ein sogenanntes Präzisionsprofil, das die Höhe des Variationskoeffizienten in Abhängigkeit von der Analytenkonzentration darstellt. Beim Präzisionsprofil

zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz wird in der Kurve die gemessene Konzentration des Analyten bei dem Variationskoeffizienten von 20% als die funktionelle Sensitivität des Analyseverfahrens markiert und wird als untere Nachweisgrenze definiert.

Bei diesem Versuch wurde der Urin eines Probanden über 7 bis 14 Tage hinweg unter gleichen Bedingungen gemessen. Der Urin wurde als Stammlösung zu diversen Selenkonzentrationen herunterverdünnt und als Aliquots in Eppendorf-Caps im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Die verschiedenen Proben wurden dann als A bis F durchnummeriert, die jeweiligen Mittelwerte errechnet und in den Diagrammen Nr.1 und 2 im Anhang dargestellt. Darin wurden auf der Abszisse die verschiedenen Mittelwerte der sechs Lösungen aufgezeichnet und auf die Ordinate der dazugehörige Variationskoeffizient aufgetragen. Dieser ergibt sich per Definition, wenn man die jeweilige Standardabweichung durch den dazugehörigen Mittelwert teilt.

Da die zunächst dargestellte Kurve des Präzisionsprofils zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz in Abbildung 1 zu sehr von einer erwarteten Idealform abwich, wurden signifikante Ausreißer herausgenommen. Dies geschah nach den Vorgaben des Ausreißertests nach Grubbs. Mit dem Ausreißertest kann man prüfen, ob die Abweichung eines Einzelwertes vom Mittelwert innerhalb einer Meßreihe nur zufälliger Natur ist oder ob die Abweichung auf einen systematischen Einfluß zurückzuführen ist. Liegt eine systematische Abweichung vor, so muß der Ausreißer entfernt werden, da er nicht zu der Grundgesamtheit der Daten gehört. Die Standardabweichung bzw. Varianz ist nur dann ein zuverlässiger Schätzwert für die Streuung der Einzelwerte, wenn Einzelwerte, die durch systematische Abweichungen bedingt sind, entfernt wurden [33]. In Abbildung 2 wurde die Kurve des Präzisionsprofils zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz ohne Ausreißer dargestellt. Aus dieser Kurve wurde ebenfalls die untere Nachweisgrenze bei dem Variationskoeffizienten von 20% abgelesen.

3.2.2 Intra-Assay-Varianz

Die Intra-Assay-Varianz ist ebenfalls ein Maß für die Präzision und Reproduzierbarkeit eines Analyseverfahrens. Wie beim Versuchsansatz zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurde auch hier ein Präzisionsprofil erstellt. Im Gegensatz zum Versuchsansatz zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurden die gleichen Proben jedoch nicht über mehrere Tage hinweg gemessen, sondern in vielfacher Bestimmung an einem Tag. Laut Definition wird das Präzisionsprofil zur Beschreibung der Intra-Assay-Varianz zudem nicht wie das zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze herangezogen.

Bei diesem Versuch wurden vier Urinproben unterschiedlicher Konzentration in einem Durchlauf an einem Tag siebenfach bestimmt. Die Urinproben lagerten zuvor bei -20°C aliquotiert im Kühlschrank. Da es differierende Ergebnisse brachte, wenn die Urinproben nicht gänzlich aufgetaut waren, war es wichtig, die Eppendorf-Caps frühzeitig aus dem Kühlschrank zu nehmen und über mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur auftauen zu lassen. Diese Feststellung der systematischen Meßungenauigkeit bei unvollkommen aufgetauten Urinproben führte zu der Vermutung, daß dies an dem im eingefrorenem Urin-sediment enthaltenem Selen liegen müsse. Diese Beobachtung konnte dann später bei der Messung der Kinderurine vorteilhaft genutzt werden.

3.2.3 Blindwerte zur Festlegung der Nachweisgrenze

Eine zweite Methode, die untere Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens festzulegen, beruht auf der Bestimmung der sogenannten Blindwerte bzw. Leerwerte. Dabei wurden zehn "Leerwerte" gemessen: Das waren Proben, die wie die anderen Proben im Durchlaufen der verschiedenen Versuchsschritte behandelt wurden, aber keine zu messenden Substanzen besaßen, sozusagen "leer" an Selen waren. Dazu wurde destilliertes Wasser benutzt.

Zunächst wurde aus einer Stichprobe von 10 Leerwerten Mittelwert und Streuung der Leerwerte bestimmt. Zur Festsetzung der unteren Nachweisgrenze einer Testprobe mit Selen wurde die dreifache Standardabweichung festgelegt. Dies bedeutet, dass eine selenfreie Testprobe mit 99,9% Wahrscheinlichkeit in

den "Nullbereich" fällt, d.h. alle Leerwerte korrekt erkannt werden. Werte oberhalb des gesetzten Schwellenwertes werden als selenhaltig erkannt.

3.2.4 Standardadditionsverfahren

Um sogenannte Matrixeffekte durch "Störpartikel" (Ionen...) zu untersuchen, wurde die Analysemethode modifiziert (Standardadditionsmethode), indem den gleichen Urinproben Selenmengen in aufsteigender Konzentration zugegeben wurden.

Bei diesem Verfahren kann untersucht werden, ob sich die Empfindlichkeit entlang der Messkurve in Gegenwart der Matrix des Urins ändert. Die Messkurve sollte der Geradengleichung $y=b_0+b_1x$ folgen. Der Parameter b_0 steht für den Nullwert der untersuchten Urinproben, b_1 für die Steigung. Die Steigung b_1 bezeichnet man als "Empfindlichkeit". Falls die Messkurve gekrümmt verläuft, kann man keine einheitliche Empfindlichkeit auf Matrixeffekte angeben [34].

Es wurden fünf Urinproben unterschiedlichen Selengehalts verwendet. Zu den fünf verschiedenen Urinproben wurden definierte Selenkonzentrationen in aufsteigender Tendenz hinzugegeben. Den Urinen wurden jeweils 20, 40, 60, 80 und 100 μl der "Selenstandardlösung 200 $\mu\text{g/l}$ " hinzugefügt. Anschließend wurden die 25 Proben mit der optimierten Analysemethode auf ihren Selengehalt hin untersucht.

Aufgrund eines Versehens wurden die fünf Urine nicht als "Nullwerte" ohne Selenzugabe gemessen. Deshalb wurden die Nullwerte aus vorherigen Messungen der Urine über den Mittelwert bestimmt. Korrekterweise hätte der Urin ohne Zusatz von definierten Selenkonzentrationen als "Nullwert" b_0 bei diesem Versuch bestimmt werden sollen.

3.3 Validierung der optimierten Analysemethode für Urinproben

3.3.1 Richtigkeit des Verfahrens

Mit Hilfe der Präzision eines Analyseverfahrens lässt sich nur seine Reproduzierbarkeit charakterisieren. Die vielleicht gut reproduzierbaren Analysenwerte können allerdings trotzdem falsch sein, das heißt, die ermittelte Konzentration

des Analyten kann sich von seiner wahren Konzentration in der Probe deutlich unterscheiden. Die „systematische Abweichung“ zwischen dem Mittelwert und dem wahren Wert wird als Richtigkeit definiert. Der Fehler eines einzelnen Konzentrationswertes setzt sich somit aus den zufälligen und systematischen Abweichungen zusammen.

Als Maß für die Richtigkeit ist die Wiederfindungsrate üblich. Sie beschreibt den prozentualen Anteil der wiedergefundenen Konzentration an der wahren Konzentration.

Wahre Analysenwerte erhält man über unabhängige unterschiedliche Analysemethoden oder über Standardreferenzmaterial [34]. In diesem Fall wurde aus Kostengründen auf andere Selenmessmethoden wie die Atomabsorptionsspektrometrie oder die Neutronenaktivierungsanalyse verzichtet und mit Standardreferenzmaterial gearbeitet. Dabei wurde sowohl zertifiziertes externes Standardmaterial als auch selbst hergestelltes Standardmaterial benutzt.

Bei diesem Versuch zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde immer eine Standardreferenz mitgemessen, um die wahre Selenkonzentration festzustellen. Die mit der optimierten Analysemethode „wiedergefundene“ Selenkonzentration ist stark davon abhängig, ob Selen vollständig aus organischen Verbindungen gelöst wird. Die organischen Verbindungen Selenomethionin und Selenocystein sind Aminosäuren, die hauptsächlich in Fleisch, Gemüse oder Getreide vorkommen [41]. Der Mensch in Mitteleuropa erhält Selenomethionin aus den Nahrungsquellen Tier und Pflanze; Selenocystein hingegen wird nur über tierisches Protein aufgenommen. Es ist von Wichtigkeit, dass das Messverfahren diese Verbindungen gut aufschließen kann, da Selen im Urin auch in Form von organischen Verbindungen wie Selenomethionin ausgeschieden wird [45].

Selenomethionin und Selenocystein wurden in den Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 µg/l H₂O hergestellt und in verschlossenen Glasflaschen aufbewahrt. Die Lösungen wurden per Doppelbestimmungen gemessen. Der Mittelwert der Zweifachmessungen wurde mit dem vorgegebenen wahren Wert verglichen. So war es möglich, einmal die systematische Abweichung zu beurteilen

und ebenso in Prozentangaben den Aufschluß der organischen Verbindungen zu dokumentieren.

Es bleibt zu erwähnen, daß mehrere Messungen des Aufschlusses von Selenomethionin und Selenocystein durchgeführt werden mussten. Oftmals war ein Wert ausgerissen, die Probe wurde verschüttet oder im Verfahren verkocht. Fehlerquellen, die zu begründeten Ausreißern führten, werden später unter Punkt 4.4 noch diskutiert.

Zum Einsatz von Selenocystein als organische Standardlösung muss noch bemerkt werden, dass diese Aminosäure in neutraler oder alkalischer Lösung sehr instabil ist und leicht oxidiert. Obwohl dies keine optimale Voraussetzung für einen Standard darstellt, wurde Selenocystein eingesetzt.

Als weitere organische Standardlösung sollte ursprünglich Selen-Harnstoff verwendet werden. Der Ansatz mit Selen-Harnstoff wurde allerdings verworfen, da ein systematischer Fehler auftrat: Gegenüber dem erwarteten Selengehalt wurde in allen Lösungen viel zu geringe Selenkonzentrationen gemessen. Dies war wohl auf die instabilen Selen-Harnstofflösungen zurückzuführen, die beim Zeitpunkt der Messung über ein Jahr alt waren.

3.3.2 Validierung mit externem Referenz-Urin

Über die Firma Seronorm wurde ein Blank-Standard-Urin der Konzentration 20 µg/l bestellt. Dieser Urin wurde an fünf Tagen mit dem optimierten Verfahren in Doppelbestimmung gemessen. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert bestimmt und für jeden Mittelwert die Standardabweichung angegeben. Dann wurde die zugehörige Gauß-Kurve ermittelt und graphisch dargestellt (Abbildung 9). Schließlich wurde der Gesamtmittelwert μ daraufhin untersucht, ob er innerhalb akzeptabler Standardabweichungsgrenzen liegt.

Dieser Ansatz unterstützt 3.3.1 in der Validierung der Richtigkeit des Analyseverfahrens.

3.3.3 Einfluss von Störionen und Proteinen

Diesem Versuch liegt die Überlegung zugrunde, daß Matrixeffekte wie Störionen, die im Urin vorkommen, die Messungen beeinflussen könnten. Diese Ionen könnten in den Versuchsschritten mit dem Selen um Bindungsstellen

konkurrieren und so die Selenmessungen fälschlicherweise zu niedrig erscheinen lassen. Die relevantesten Ionen, die im Urin auftauchen, sind Natrium, Chlorid, Kalium und Phosphat. Da diese Ionen nur als Salze verfügbar sind, wurden KH_2PO_4 , KCl und NaCl verwendet. Interessant erschien auch die Frage, ob bei Nierenfunktionsstörungen mit erhöhter Albuminausscheidung die Messungen signifikant verschoben werden.

Zwei Urinpools A und B unterschiedlichen Selengehalts wurden auf Eppendorf-Caps zu je 1 ml verteilt. Die diversen Salze wurden auf einer genauen Waage abgewogen und in die Urinansätze gegeben. Dann wurden die Salze in den Urinen mittels des Vibrofix aufgelöst und anschließend 2 Stunden stehengelassen. Danach waren keine Überstände sichtbar, alles hatte sich restlos aufgelöst. Die eingewogenen Mengen kann man in Tabelle 6 einsehen. Die mittleren Urinkonzentrationen an Salzen und Albumin wurden den "Wissenschaftlichen Tabellen" von Geigy [35] entnommen. Da diese Angaben sich auf die Ausscheidung pro Tag beziehen, wurde der Wert 2 Liter Urinausscheidung pro Tag als Norm angenommen. Basierend auf den angegebenen Mittelwerten wurden mehrere Stammlösungen angesetzt, die das zwei-, fünf- und zehnfache des Salzgehaltes von Normurin enthielten. Bei Albumin wird im Urin der Normmittelwert von ca. 3 mg/l bei Geigy angenommen. Bei körperlicher Anstrengung soll der Albumingehalt um das fünfzig- bis hundertfache im Urin ansteigen. Hier wurde das 100, 200, 500 und 1000fache des Normgehaltes als Stammlösungen angesetzt. Da die Albuminmengen für 1 ml Urin zu klein für ein genaues Abmessen waren, wurden die Urinpools A und B zu je 5 ml in Eppendorf-Caps aliquotiert. In Diagramm Nr. 10 sind 1, 2, 5 und 10 Volumenprozent des Selengehaltes 1 g/ml angegeben.

Von allen angesetzten Stammlösungen wurden je 400 μl abpipettiert und den wie oben beschriebenen Schritten der optimierten Methode unterzogen.

Es wurden in diesem Versuch keine Doppelwerte bestimmt, da der Heizblock maximal 30 Proben Platz bietet und somit diese Möglichkeit ausgeschöpft war. Zu erwähnen bleibt auch, daß diese Messung in drei Versuchsansätzen durchgeführt werden musste, da begründete Ausreißer bestimmte Messungen unbrauchbar machten. Ursachen waren das Verschütten von Probenflüssigkeit,

die Undichtigkeit der Deckel, die Korrosion des Deckelplastiks etc.. Hierzu siehe auch 4.4.

3.3.4 Vergleich der Selenkonzentrationen in Urin und in Serum

Da diese Promotionsarbeit neben der Validierung der optimierten Methode für Urin einen epidemiologischen Ansatz verfolgt, wurde auch noch der Frage nachgegangen, ob die gemessenen Selenwerte im Urin den gesamten Selenhaushalt des Körpers widerspiegeln. Nur wenn dies zutrifft, könnten epidemiologische Untersuchungen zur regionalen Selenversorgung mit Urinproben durchgeführt werden.

In der Fachliteratur herrscht Uneinigkeit über die Aussagefähigkeit des Urins für den Selenstatus des Organismus. Oft wird der Selenstatus bzw. die Selen-Gesamtkonzentration des Körpers als Selenkonzentration des Blutes unter Berücksichtigung der GPX (Glutathionperoxidaseaktivität) angegeben [25,9,26,21,40]. Urin wird von einigen Autoren als unsensitiver Indikator für Selenmangel beschrieben [25]; andere Autoren sehen die Notwendigkeit, 24-Stunden-Sammelurin heranzuziehen [9,44,59]. Die Selenausscheidung variiert in Abhängigkeit von der Tageszeit und von der Menge und Art der Nahrungsaufnahme. Dennoch sehen verschiedene Autoren den Urin als guten Repräsentanten des Selenstatus an [6,5,36,43,56,59,60]. Combs et al. etwa veröffentlichten schon 1986 die Beobachtung eines direkten Zusammenhanges zwischen der Höhe der Selenaufnahme und der Selenausscheidung im 24-Stunden-Urin.

Ob sich die Selenkonzentration im Urin in gleicher Relation wie im Serum widerspiegelt, wurde in diesem Versuchsansatz geprüft. Es wurden 13 Kommilitonen der Universität Würzburg angesprochen, Urin und Blut abzugeben. In der nuklearmedizinischen Klinik stellte man uns einen Raum zur Verfügung, um sowohl Blut abzunehmen als auch den Urin in Monovetten abzufüllen. Die Urinproben wurden dann im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg auf die Kreatininwerte hin analysiert, die Blutproben zentrifugiert. Gelagert wurden die Röhrchen bei -20° im Kühlschrank. Für die Validierung der Serummessung wurde gleichzeitig ein externer Serumstandard von Seronorm mitgemessen; die Selenkon-

zentrationen der Serumproben wurden in Zweifachbestimmung ermittelt. Bei der Urinmessung wurden ebenfalls Doppelbestimmungen durchgeführt, dabei liefen zwei Proben externen Urinstandards von Seronorm mit.

Da diese geringe Probandenzahl keinem fundierten epidemiologischen Ansatz gerecht wird, können keine signifikanten, verallgemeinerbaren Ergebnisse erbracht werden. Dieser Versuchsansatz ist als Zusatzuntersuchung zu verstehen, deren Fragestellung sich im Verlauf der Arbeit ergab, im Umfang aber begrenzt bleiben musste.

3.4 Messung und Darstellung des Selengehaltes in Kinderurinen

3.4.1 Kinderurin-Messdaten, epidemiologischer Ansatz

Die Kinderurinproben waren 1999 im Rahmen einer Jodstudie von Dr. Rendl auf Jod hin untersucht worden [62]. Dabei wurden unter anderem die Kreatininwerte in der nuklearmedizinischen Klinik bestimmt, die in dieser Arbeit verwendet werden konnten. An einem Würzburger Gymnasium waren mehrere hundert Proben Spontan-Urin mit Erlaubnis der Eltern gesammelt worden. Bis im Jahre 2001 mit den Versuchen begonnen wurde, waren die Urine tiefgefroren in der Nuklearmedizin gelagert.

100 Proben wurden in Dreifachbestimmung mit der optimierten Methode gemessen, wobei an jedem Versuchstag die Kalibrierungskurve mit Hilfe von sieben Standardlösungen der Konzentrationen 0, 5, 15, 25, 50, 75 und 100 µg/l neu erstellt wurde.

Zudem lief jedesmal entweder ein externer oder interner Standard mit, d.h. entweder der Blank Standard-Urin von Seronorm oder ein selbst hergestellter interner Standard aus einem angesetzten Urinpool. Es bleibt zu erwähnen, dass einige begründbare Ausreißer vorkamen, aufgrund derer einige Messungen wiederholt werden mussten. Dies wird später unter 4.4 noch diskutiert.

In dieser Arbeit, die sich als Pilotprojekt versteht, ist auch ein epidemiologischer Ansatz erkennbar. Nachdem die Mittelwerte der 100 Proben bekannt waren, konnten diese auf die Frage nach einem möglichen Selenmangel hin untersucht werden. Eine solche Aussage ist wiederum nicht für ein Individuum, sondern für die Gruppe von 100 Probanden insgesamt zu treffen.

Es existieren Richtlinien von der WHO für die empfohlene Tagesdosis an Selen. Für die Selenkonzentrationen im Urin liegen allerdings in der wissenschaftlichen Literatur diverse, teilweise sehr differierende Werte vor. In den wissenschaftlichen Tabellen von Geigy wird die tägliche Selenausscheidung im Harn im Mittel als 30 µg angegeben. Der Extrembereich reicht von 3 bis 52 µg/d. In Deutschland wurden 1997 gesunde Kinder auf ihren Selenstatus hin untersucht. Sie wiesen den mittleren Wert von 14,8 +/- 4,2 µg/l Selen im Urin auf. Kinder mit Phenylketonurie, die einen Selenmangel aufwiesen, präsentierten den Mittelwert 8,5 +/- 3,5 µg/l Selen [6,37].

Aufgrund einer fehlenden einheitlichen Definition der unteren Grenze der Selenkonzentration im Urin, die einen Selenmangel feststellen würde, ist es deshalb sehr schwer, einen Selenmangel anhand von Urinselenkonzentrationen festzumachen.

3.4.2 Mittelwerte und Perzentilen des Selengehaltes bei Normierung auf Kreatinin

Hier wurden die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen der 100 Kinderurinproben auf die dazugehörigen Kreatininwerte bezogen. Dieses Vorgehen lässt sich auch in anderen Arbeiten zur Untersuchung der Selenkonzentrationen im Urin finden [6,9]. Dabei wird vorausgesetzt, dass ein Individuum jeden Tag eine konstante Menge an Kreatinin ausscheidet [9,38]. Diese Kreatininmenge hängt mit dem Geschlecht, der Körpergröße und der Muskelmasse zusammen. Allerdings ist bekannt, dass die Kreatininmenge sowohl zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen als auch intraindividuell von Tag zu Tag variieren kann. Faktoren, die die Kreatininausscheidung beeinflussen können, sind emotionaler und körperlicher Stress, Infektionen, Fieber und Trauma [9,39].

Da die Selenausscheidung über den Tag variiert und sehr abhängig von der Art und Menge der Nahrungszufuhr ist, wäre ein Sammelurin über 24 Stunden repräsentativer für den Selenstatus eines Individuums [6]. Da in dieser Arbeit aber Spontan-Urinproben und keine 24-Stunden-Sammelurine verwendet wurden, sollen die Kreatininwerte zur Normierung und Vergleichbarkeit der Proben dienen.

Wenn man die Selenkonzentrationen auf die dazugehörigen Kreatininwerte bezieht, kann auf das Volumen des ausgeschiedenen Urins geschlossen werden. Die verschiedenen Selenkonzentrationen werden somit unter Berücksichtigung des Urinvolumens miteinander vergleichbar.

Bei 5 der 100 Probanden waren keine Kreatininwerte angegeben. Diese Proben konnten daher in die folgenden Diagramme mit Bezug auf die Kreatininwerte nicht einfließen.

In den Abbildungen 16 und 17 wurden die Mittelwerte auf der Ordinate und die dazugehörigen Kreatininwerte auf der Abszisse aufgetragen. Somit wird überprüft, ob es Ausreißer gibt, die auffallend hohe oder niedrige Selenkonzentrationen im Vergleich zu den Kreatininwerten aufweisen.

Die Kreatininwerte wurden in einem weiteren Diagramm (Abbildung 18) berücksichtigt. Aus den 95 Mittelwerten wurden 5 Perzentilengruppen à 19 Proben gebildet, die nach aufsteigenden Selenkonzentrationen geordnet wurden. Die Selenkonzentrationen wurden in Bezug zu ihren Kreatininwerten gesetzt. In jeder Perzentilengruppe wurde der Mittelwert der Selenkonzentrationen errechnet und der Selen-Mittelwert normiert auf den jeweiligen Kreatininwert auf der Ordinate aufgetragen. Mit diesen als Histogramm veranschaulichten Perzentilen soll ein eventueller Trend oder Ausreißer aus diesem Trend sichtbar werden

3.4.3 Perzentilen ohne Kreatininbezug

Da diese Promotionsarbeit vielmehr ein Pilotprojekt als eine fundierte epidemiologische Arbeit darstellt, werden die 100 Selenmittelwerte auch ohne Bezug auf die Kreatininwerte dargestellt (Abbildung 19). Es werden keine individuellen Selenkonzentrationen wie unter 3.4.2 verglichen, sondern vielmehr ein momentaner Querschnitt durch einige Spontan-Urinproben gemacht. Dabei wurden vier Perzentilengruppen à 25 Probenmittelwerte der aufsteigenden Konzentration an Selen nach geordnet. In diesem Histogramm wurde die Standardabweichung der einzelnen Gruppen als Fehlerindikatoren graphisch eingearbeitet und dargestellt. Wieder wurde nach signifikanten Ausreißern aus dem erwarteten Trend Ausschau gehalten.

3.4.4 Selen-Jod-Korrelation

Es ist bekannt, dass sowohl Jod als auch Selen für die Funktion der Schilddrüse essentiell ist. Ohne adäquate Jodzufuhr kann bei schwerem Selenmangel beispielsweise die myxödematöse Form des Kretinismus beobachtet werden [1,2]. In der Literatur wurden schon Korrelationen zwischen den Jod- und Selenkonzentrationen im Urin festgestellt [9]. Aus diesem bekannten Sachverhalt und auch aus anderen Zusammenhängen heraus interessierte der Vergleich zwischen dem Jod- und Selenstatus der Probanden.

Der Jodhaushalt wird standardmäßig im Urin bestimmt, da Jodid hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden wird [9,21]. Die Jodkonzentrationen der Probanden waren aus der Studie von PD Dr. Rendl [62] bekannt, sie wurden gegen die ermittelten Selenkonzentrationen auf der Ordinate aufgetragen. Dabei war von Interesse, ob ein direkter proportionaler oder inverser Zusammenhang besteht und ob Ausreißer auffallen.

3.5 Diskussion der Ursachen von Ausreißern

In der bisherigen Darstellung der verschiedenen Versuchsansätze wurde oft auf begründete Ausreißer verwiesen, die aus den Messergebnissen mittels des Ausreißertests nach Grubbs herausgenommen wurden. Unter diesem Punkt sollen die Ursachen für solche herausfallenden Extremwerte diskutiert werden.

3.6 Subjektive Erfahrungen mit der Durchführung der optimierten Methode

In Kapitel 4.5 werden Erfahrungswerte mit der Versuchsdurchführung beschrieben, die nicht wissenschaftlich fundiert oder validiert sind, aber eine Hilfestellung bei zukünftiger Anwendung dieser Methode sein können. Einige Verbesserungsvorschläge kommen hier zum Tragen, da Probleme bei einigen Versuchsschritten des Messverfahrens nach [29] auftraten.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Statistische Auswertung

4.1.1 Inter-Assay-Varianz, Ausreißertest nach Grubbs

Mit diesem Versuch wurde die optimierte Methode nach [29] auf die Präzision und Reproduzierbarkeit in bezug auf die Selenbestimmung in Urinproben untersucht. In Abbildung 1 ist die Kurve des Präzisionsprofils zur näheren Beschreibung der Inter-Assay-Varianz ohne Ausreißertest dargestellt. Die Mittelwerte der über 7 bis 14 Tagen einfach bestimmten Urinproben wurden errechnet und auf der Abszisse aufgezeichnet. Auf die Ordinate wurde die jeweils errechnete Standardabweichung s normiert auf den dazugehörigen Mittelwert aufgetragen. Dieser Variationskoeffizient bzw. die relative Standardabweichung wurde hier in Prozentangaben dargestellt.

Wie erwartet stellt sich die Kurve als exponentiell abnehmend dar, mit einer Näherung nahe der Selenkonzentration "0" an den Variationskoeffizienten "unendlich" und vice versa. Dieses Präzisionsprofil beschreibt also eine mit der zunehmenden Selenkonzentration höhere Messgenauigkeit bzw. Präzision und Reproduzierbarkeit, da die relative Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient bei der Messung höherer Selenkonzentrationen abnimmt. Anhand der sechs Mittelwerte könnte man eine Ausgleichskurve nach der Formel $y=a+bx$ erstellen und die Präzision für andere, hier nicht gemessene Selenkonzentrationen ungefähr vorhersagen. Hier sind die Messpunkte jedoch nur durch eine Linie verbunden - ohne Extra- oder Interpolation. Dies begründet sich auf der Einschätzung, dass sechs Messwerte unzureichend für die Erstellung einer Ausgleichskurve über den gesamten Messraum sind. Der Trend ist jedoch erkennbar.

Dass sich die Präzision bei größer werdender Selenkonzentration immer weiter verbessert, der Variationskoeffizient also abnimmt, lässt sich schon aus der Formel (siehe Anhang) ableiten. Zufällige und systematische Fehler fallen bei einer höheren Selenkonzentration nicht so sehr ins Gewicht wie bei kleinen Konzentrationen. Bei der Betrachtung der Kurve ist allerdings auffällig, dass der

Urin mit der mittleren Selenkonzentration $14,48 \mu\text{g/l}$ und einem Variationskoeffizienten von ca. $19,04\%$ dem allgemeinen Trend der exponentiell abnehmenden Kurve nicht präzise folgt.

Wegen diesem auffälligen Messpunkt wurden die gemessenen Selenwerte dem Ausreißertest nach Grubbs unterzogen [33]. Dieser kann begründet Ausreißer definieren und aus den Messergebnissen herausnehmen, wenn diese Ausreißer signifikant von den Mittelwerten abweichen. Mit dem Verfahren von Grubbs werden zufällige von systematischen Fehlern unterschieden. Beim Vorliegen von systematischen Abweichungen wird der Ausreißer entfernt, da er nicht zur Grundgesamtheit der Daten gehört. Mittelwert und Standardabweichung sind aus den verbliebenen Daten neu zu berechnen. Zum genauen Rechengang siehe "Rechentafeln..." S.289 ff. [33].

In Abbildung 2 ist die mit dem Ausreißertest behandelte Kurve des Präzisionsprofils zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz dargestellt. Nun hat die aus den sechs Werten ermittelte exponentiell abnehmende Kurve keine Auffälligkeiten mehr. Somit ist diese Kurve auch für die untere Nachweisgrenze aussagekräftig. Diese Nachweisgrenze wird in der Literatur als diejenige Selenkonzentration bei einem Variationskoeffizienten von 20% definiert. Hier kann aus Abbildung 2 die untere Nachweisgrenze von $7,5 \mu\text{g/l}$ Selen bei einer relativen Standardabweichung von 20% abgelesen werden.

Bei Koh und Benson [27] wird keine untere Nachweisgrenze angegeben, Sheehan und Gao [28] liegen mit ihrer spektrofluorimetrischen Methode bei $10 \mu\text{g/l}$. Somit ist die hier festgestellte untere Nachweisgrenze im Vergleich zu den angeführten Arbeiten durchaus akzeptabel.

Mit Serumproben hingegen wird nach [29] mit der optimierten Analysemethode eine untere Nachweisgrenze von $3 \mu\text{g/l}$ erreicht. Die Gründe für diese unterschiedlichen Nachweisgrenzen mit derselben optimierten Methode sind wohl in unterschiedlichen systematischen Fehlern wie ungenauem Pipettieren oder Abmessen zu suchen. Im Falle unterschiedlicher Probensubstanzen (Urin oder Serum) können unterschiedliche Matrixeffekte vermutet werden.

4.1.2 Intra-Assay-Varianz

Dieser Versuch verfolgt wie der Versuchsansatz zur Bestimmung des Präzisionsprofils der Inter-Assay-Varianz das Ziel der Bestimmung der Präzision und Reproduzierbarkeit des Analyseverfahrens, mit dem Unterschied, dass die Genauigkeit von Messungen innerhalb eines einzigen Testansatzes untersucht wird.

Vier unterschiedliche Urinproben wurden siebenfach an einem Tag gemessen. Die ermittelte Kurve in Abbildung 3 entspricht der erwarteten abnehmenden exponentiellen Form, Ausreißer treten nicht auf. In der Abbildung 3 ist die deutlich unterschiedliche Skalierung der Ordinate im Vergleich zu Abbildung 2 zu beachten. Wie man sieht, liegt die Selenkonzentration bei dem Variationskoeffizienten „20%“ viel niedriger als beim Präzisionsprofil zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz, was auf eine höhere Präzision und eine entsprechend niedrigere Nachweisgrenze als beim Präzisionsprofil zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz hinweist.

Damit zeigt sich bei der Auswertung des Präzisionsprofils zur Beschreibung der Intra-Assay-Varianz eine deutlich höhere Genauigkeit bzw. Präzision als bei der Inter-Assay-Varianz. Allerdings wird die untere Nachweisgrenze in der Literatur allein über das Präzisionsprofil zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz definiert.

4.1.3 Blindwerte zur Festlegung der Nachweisgrenze

In Abbildung 4 ist die Gauß-Kurve des Versuches mit Leerproben (Blindwerten) dargestellt. Dieser Versuch wurde zweimal an verschiedenen Tagen durchgeführt. Der erste Ansatz fiel durch Ausreißer auf und wurde aus diesem Grunde wiederholt. Der Vollständigkeit halber wird der erste fehlgeschlagene Ansatz dennoch im Folgenden beschrieben: Nachdem an einem Tag zehn Leerproben, bestehend aus destilliertem Wasser, gemessen worden waren, wurde der Mittelwert dieser zehn Blindwerte errechnet. Dieser betrug $0,035 \mu\text{g/l}$ Selen. Nachdem Ausreißer nach der Methode nach Grubbs herausgenommen worden waren, belief sich der Mittelwert auf $-0,684 \mu\text{g/l}$ Selen. Die Standardabweichung veränderte sich nach dem Ausreißertest von $2,857 \mu\text{g/l}$ auf $2,003 \mu\text{g/l}$. Die un-

tere Nachweisgrenze, die definiert wird als Selenkonzentration bei der dreifachen Standardabweichung, betrug 6,01 µg/l Selen. Ohne die Anwendung des Ausreißertests kam man aufgrund der unterschiedlichen Mittelwerte und Standardabweichungen auf den Wert 8,571 µg/l Selen, also einer schlechteren Nachweisgrenze.

Dieser Versuch wurde aufgrund der zahlreichen aufgetretenen Ausreißer in einem 2. Ansatz wiederholt. Die Abbildung 4 bezieht sich auf diese Messdaten. Der Mittelwert μ beträgt hier -0,24 µg/l Selen, die Standardabweichung beläuft sich auf 2,27 µg/l und die Nachweisgrenze bei $3\cdot s$ ist 6,58 µg/l Selen.

Die Messergebnisse der beiden Ansätze weichen bei genauer Betrachtung nicht allzu stark voneinander ab. Die Werte der unteren Nachweisgrenze bestätigten nochmals das Ergebnis des Präzisionsprofils zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz mit einer unteren Nachweisgrenze von 7,5 µg/l Selen.

4.1.4 Standardadditionsverfahren

Beim Standardadditionsverfahren zur Überprüfung von Matrixeffekten werden den Urinen vorgegebene feste Selenmengen hinzugegeben.

Die Werte, die man nach Zugabe von 20, 40, 60, 80 und 100 µl der "Selenlösung 200 µg/l" zu den fünf Urinen erhielt (Aufstockproben), folgten der erwarteten Geradenform, wobei die Ausgleichsgeraden nach der Formel $y=b_0+b_1x$ erstellt wurden.

Die Geraden in Abbildung 5 nehmen entsprechend der definierten Menge an zugegebener aufsteigender Selenkonzentration zu. Da die fünf Geraden annähernd parallel zueinander verlaufen, trifft die Schlussfolgerung zu, dass bei unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Urin keine offensichtlichen Matrixeffekte auftreten. Die zugegebenen Selenkonzentrationen wurden mit dem optimierten Analyseverfahren in den verschiedenen Urinproben also im annähernd gleichen Maße wiedergefunden.

Die Empfindlichkeit des optimierten Analyseverfahrens wird mit dem Regressionskoeffizienten beschrieben. Aus Abbildung 5 ergeben sich aufgrund der ungefähren Parallelität der Kurven annähernd gleiche Werte für die Empfindlich-

keit: Geraden A, B und E weisen den Wert 0,55 auf, die Gerade C den Wert 0,56, die Gerade D den Wert 0,599.

Fazit: Die optimierte Methode ist somit reproduzierbar. Ionen und Proteine, die im Urin vorkommen, beeinflussen die Selenmessung der Urinproben nicht.

4.2 Validierung der optimierten Analyseverfahren für Urinproben

4.2.1 Richtigkeit des Verfahrens

Ziel dieses Versuchsansatzes war die Bestimmung der Wiederfindungsrate aus organischen Verbindungen. Für die spektrofluorimetrische Erfassung der vollständigen Selenkonzentration von Urinproben ist Voraussetzung, dass Selen aus den organischen Verbindungen freigesetzt wird, damit es sich an DAN bindet. Diese Voraussetzung wird in den ersten Versuchsschritten des optimierten Analyseverfahrens sichergestellt (siehe Kapitel 3.1).

Das Selen aus den organischen Verbindungen Selenomethionin und Selenocystein wurde spektrofluorimetrisch zu beinahe 100 % wiedergefunden (siehe Tabelle 3 im Anhang). Das bedeutet, dass die angewendete optimierte Methode in der Lage ist, Selen vollständig aus den genannten organischen Verbindungen freizusetzen. Zudem bestätigen die Messergebnisse, dass die in neutraler oder alkalischer Lösung leicht oxidierbare Aminosäure Selenocystein gut als Standard einsetzbar ist. Da Selen im Urin neben den Hauptformen Mono- und Trimethylselenol [5,45] auch in selenhaltigen Aminosäuren wie Selenomethionin ausgeschieden wird [45], ist die wichtige Frage nach dem Grad der Richtigkeit des Messverfahrens bei Urinproben beantwortet.

Die Selenwiederfindungsrate ist in Abbildung 6, 7 und 8 graphisch dargestellt. In Abbildung 6 sind die Sollgerade und die tatsächlich gemessenen Werte eingezeichnet. In Abbildung 7 sind diese Ergebnisse als Histogramm zur genaueren Beurteilung der Abweichung der Soll- von den Istwerten dargestellt. In Abbildung 8 sind nur die Abweichungen in $\mu\text{g/l}$ Selen vom angestrebten Sollwert graphisch veranschaulicht. Als Sollwerte wurden die eingewogenen, in Wasser gelösten Selenoaminosäuren zugrunde gelegt.

In Abbildung 8 läßt sich erkennen, daß die optimierte Methode den Selengehalt der organischen Verbindungen meist etwas zu hoch misst. Im Falle von Seleno-

cystein wird der Selengehalt bei fast allen Lösungen um 0,5 bis 1,29 $\mu\text{g/l}$ zu hoch eingeschätzt. Ausnahme bildet die Messung von Selenocystein 25 $\mu\text{g/l}$; hier wird um 0,54 $\mu\text{g/l}$ zu niedrig gemessen. Bei Selenomethionin liefert die Selenmessung fast ausschließlich Werte im überhöhten Bereich von 0,12 bis 2,6 $\mu\text{g/l}$. Hier ist ebenfalls eine Ausnahme festzustellen: Selenomethionin 25 $\mu\text{g/l}$ wird um 0,78 $\mu\text{g/l}$ zu gering eingeschätzt.

Diese absoluten Werte der Abweichungen (absoluter Fehler) kann man auf den Sollwert beziehen: So erhält man den relativen Fehler, der als Maß für die Messungsgenauigkeit des Messverfahrens definiert wird. Der relative Fehler ist aussagekräftiger als der absolute Fehler, da er die gemessenen Selenwerte auf die vorgegebenen Selenkonzentrationen (Sollwert) bezieht, auf diese Weise die Fehlerangabe relativiert und im Sinne von Messungsgenauigkeits-Aussagen vergleichbar macht. Der relative Fehler wird hier in Prozenten dargestellt und ist mit anderen prozentualen Fehlerangaben direkt vergleichbar.

Selen aus Selenocystein sollte aus fünf Ansätzen zu 10, 25, 50, 75 und 100 $\mu\text{g/l}$ wiedergefunden werden. Relativ wurden +8,3; -2,16; +1,72; +0,66 und +1,29 Prozent zu hohe bzw. niedrige Selenwerte gemessen. Der Selengehalt in Selenomethionin sollte in der gleichen Konzentration wie bei Selenocystein wiedergefunden werden. Hier wurde Selen um +1,2; -3,12; +1,12; +1,77 und +2,6 Prozent zu hoch bzw. niedrig gemessen.

In beiden Fällen wird mit zunehmender Selenkonzentration der absolute Fehler der Selenmessung größer, der relative Fehler hingegen zeigt einen solchen Trend nicht. Einzig im Falle von Selenocystein sticht der relative Fehler von 8,3% bei der Konzentration 10 $\mu\text{g/l}$ als Ausreißer heraus. Da bei 10 $\mu\text{g/l}$ Selenomethionin demgegenüber der relative Fehler der Selenmessung nur 1,2% beträgt und generell alle anderen prozentualen Messfehler sehr gering sind, kann dieser Ausreißer vernachlässigt werden und ein Trend der zunehmenden Messungsgenauigkeit bei kleineren Selenmengen ausgeschlossen werden.

Die Genauigkeit der Selenmessung von selenhaltigen Aminosäuren bewegt sich also insgesamt in einem akzeptablen Rahmen.

4.2.2 Validierung mit externem Referenz-Urin

Es wurden fünf Messungen des externen Standardurins in Doppelbestimmung an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Standardabweichungen der Doppelmessungen können in Tabelle 5 eingesehen werden. Der Mittelwert aller Messwerte beträgt 19,183 $\mu\text{g/l}$ Selen und ist in Abbildung 9 als Wert μ eingetragen. Auf der Grundlage dieses Mittelwertes und der Standardabweichung von $s=1,49$ wurde die Gauß-Kurve in Abbildung 9 erstellt. Die zweifache Standardabweichung kann aus den Kurvenpunkten $\mu+2\cdot s=22,16$ bzw. $\mu-2\cdot s=16,21$ $\mu\text{g/l}$ Selen abgelesen werden.

Die gemessenen Urinwerte liegen alle im Bereich 17,39 bis 21,77 $\mu\text{g/l}$ Selenkonzentration. Damit liegen alle Messergebnisse innerhalb des Bereiches der zweifachen Standardabweichung. Dies entspricht einem Konfidenzintervall von ca. 95%. Es zeigt sich, dass die hier angewendete optimierte Methode der Spektrofluorimetrie mit anderen Verfahren zur Selenbestimmung konkurrieren kann. Bei der Firma Seronorm wurde der Wert 20 $\mu\text{g/l}$ Selen mittels des Verfahrens der AAS ermittelt.

Da die hier gemessenen Werte alle innerhalb der standardmäßig festgelegten Schwankungsbreite von $2\cdot s$ liegen, sind die Messungen ausreichend präzise und richtig, es liegt also kein immanenter systematischer Fehler bei der Methodik vor; die Richtigkeit des Messverfahrens wurde durch die Validierung mit einem externen Standard bestätigt.

4.2.3 Einfluss von Störionen und Proteinen

In Abbildung 10 beschreiben Geraden Urinproben, die mit Störionen oder Albumin versetzt wurden. Die mit vermuteten Störionen beladenen Urine zeigen eine gewisse Schwankungsbreite um den jeweiligen Leerwert des Urins.

Es fällt vor allem die Urinprobe B, die mit der fünffachen KCl-Menge versetzt ist, als Ausreißer auf. Dieser Ausreißer muss jedoch auf einen zufälligen Fehler zurückgeführt werden, da die gleiche mit der zehnfachen KCl-Menge zuge setzte Urinprobe einen akzeptablen Wert aufweist. Zudem sind die Werte der Urinprobe A, die auch mit KCl versehen ist, ohne Auffälligkeiten.

Einige andere Werte zeigen ebenfalls leichte Abweichungen vom erwarteten horizontalen Geradenverlauf. Dies lässt sich jedoch mit keiner Störionen-Interferenz erklären, da die mit höheren Vielfachen an Ionen versetzten Proben oder die andere Urinprobe solche Abweichungen nicht aufweisen.

Bei den Urinproben, denen Albumin hinzugegeben wurde, fällt das Ansteigen der Geraden mit zunehmender Albuminkonzentration auf. Beide Kurven verlaufen außerdem parallel. Der dargestellte Kurvenverlauf entspricht in beiden Fällen der Erwartung, da in bovinem Albumin Selen in gebundener Form vorliegt. Wird dieses Selen bei der Behandlung mit der optimierten Methode aus der Proteinbindung freigesetzt, bindet es an DAN und wird wie zuvor ausgeführt spektrofluorimetrisch richtig erfasst. So lässt sich die Geradensteigung erklären, da diese die zunehmende Selenkonzentration in der zunehmenden Albuminmenge widerspiegelt. Diese Parallelität untermauert somit die Präzision des Messverfahrens.

4.2.4 Vergleich der Selenkonzentrationen in Urin und in Serum

Zusätzlich zur Anwendung des spektrofluorimetrischen Verfahrens bei Urinproben wurde auch die Selenkonzentration in Serumproben gemessen, um eine mögliche Korrelation im Vergleich aufzuzeigen.

Die Abbildungen 11, 12, 13 und 14 beschäftigen sich mit dem Vergleich der Selenkonzentrationen in Serum und Urin.

Es lagen von 13 Probanden Blutproben vor, die zuvor zentrifugiert worden waren, so dass das Serum, das in den Röhrchen als obere Phase vorlag, zu je 400 µl abpipettiert werden konnte. Die Serumproben wurden bei allen Versuchsschritten genauso wie die Urinproben behandelt. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Zur Kontrolle lief ein externes Standard-Serum mit, das bei der Firma Seronorm wie auch der Standard-Urin mit der Atomabsorptionsspektrofluorimetrie-Methode vermessen worden war und mit dem Normwert 83 µg/l Selen ausgezeichnet war. Mit dem optimierten Verfahren der Spektrofluorimetrie wurden für dieses Standard-Serum die Werte 84,08 und 83,53 µg/l Selen ermittelt, die beide nahe am angegebenen Normwert liegen.

Von den gleichen Probanden lagen ebenfalls 13 Spontan-Urinproben vor, die kurze Zeit nach den Blutproben abgegeben worden waren und die mit Doppelbestimmungen vermessen wurden. Auch in diesem Falle wurde ein externer Referenz-Urin zur Kontrolle mitgemessen. Die Werte 21,86 und 21,08 $\mu\text{g/l}$ Selen lagen wiederum nahe bei dem vorgegebenen Normwert von 20 $\mu\text{g/l}$ Selen der Firma Seronorm. Bei der Normierung der Selenkonzentration ($\mu\text{g/l}$) im Urin auf den dazugehörigen Kreatininwert (mg/dl) wurde auf die Einheit " $\mu\text{g/g}$ " umgerechnet. Man erhält also im Ergebnis die Einheit μg Selen pro g Kreatinin. Die Einheit wurde in dieser Darstellung zur Veranschaulichung der zwei Stoffe, die aufeinander bezogen werden, im Quotienten ungekürzt belassen.

Die Selenkonzentration im Spontan-Urin bezogen auf den Kreatininwert wird in Abbildung 11 und 12 auf der Ordinate dargestellt. In Abbildung 11, in der auf der Abszisse die Selenkonzentration im Serum aufgetragen ist, erkennt man eine Punktwolke, die in einem großen Rahmen streut. In Abbildung 12 wird der Selengehalt im Serum mit dem im Spontan-Urin verglichen. Auf der Y-Achse ist der Selengehalt im Spontan-Urin bezogen auf den Kreatininwert aufgetragen, auf der sekundären Y-Achse die Selenkonzentration im Serum. Auf der gemeinsamen Abszisse sind die 13 Probanden durchnummeriert aufgelistet.

Aus beiden Abbildungen läßt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Selenkonzentration im Serum und der auf den Kreatininwert normierten Selenkonzentration im Spontan-Urin ablesen. Der Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Falle $-0,29$, wobei die statistische Aussagekraft bei nur 13 Probanden natürlich sehr begrenzt ist. Um einen statistisch signifikanten Zusammenhang nachzuweisen, sind deutlich mehr Proben notwendig (z.B. 40 Proben). Für weitere Untersuchungen wird vorgeschlagen, neben ausreichend hohen Probenzahlen 24-Stunden-Urine heranzuziehen und mehrmals am Tag Blut abzunehmen.

Beim Vergleich der Selenkonzentrationen ohne Normierung der Spontanurin-Werte auf die jeweiligen Kreatininwerte sieht man in Abbildung 13 eine Punktwolke, die im Vergleich zu Abbildung 11 besser zusammenhängt und tendenziell einer zunehmenden Ausgleichsgeraden folgt. Die Trendlinie ist in Abbildung 13 eingezeichnet. Der Korrelationskoeffizient weist hier den Wert $0,44$ auf.

Signifikanz ist allerdings bei nur 13 Proben auch in diesem Falle nicht gegeben. In Abbildung 14 sind die Spontanurin-Werte diesmal ohne Normierung auf Kreatinin auf der Y-Achse eingezeichnet, die Serumwerte wieder auf der sekundären Y-Achse. Auf der Abszisse werden die 13 Probanden durchnummeriert aufgelistet. Bei diesem Versuchsteil kann man bei etwa der Hälfte der Probanden einen tendenziellen Zusammenhang der Selenwerte im Serum und Urin ausmachen. Wenn nur die Probanden Nr. 2, 3, 4, 8 und 9 betrachtet werden, kann eine gute Korrelation der Selenkonzentration in Serum und Spontan-Urin festgestellt werden. Der Selengehalt im Serum und im Spontan-Urin dieser Probanden zeigt in Darstellung 14 einen übereinstimmenden ansteigenden Verlauf. Bei den anderen Probanden lässt sich dagegen ein solcher tendenzieller Zusammenhang nicht feststellen, die Selenkonzentration im Spontan-Urin zeigt sich also unabhängig von der Konzentration im Serum.

An dieser Stelle ist ein wichtiger Punkt für den Anspruch auf epidemiologische Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf Spontan-Urinproben herauszustellen. Um die optimierte Methode der Spektrofluorimetrie mit Spontan-Urin für diesen Anspruch zu validieren, muss eine noch umfangreichere Probenanzahl zur Verfügung stehen, mit der ein möglicher Zusammenhang zwischen Selenwerten in Spontan-Urin und Serum fundiert herausgearbeitet werden kann. In der Literatur werden größer angelegte Experimente zu diesem Thema beschrieben. Bei Combs et al. [60] wird eine direkte Korrelation von Selenzufuhr und Selenausscheidung im 24-Stunden-Urin beobachtet. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass Selenmessungen im Urin auch auf die Selenwerte im Serum rückschließen lassen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen regen zu weitergehenden Überlegungen an: Es ist wichtig, welche selenhaltige Nahrung die Schüler vor der Urinabgabe zu sich genommen haben. Bei zu großer Selenzufuhr wird überschüssiges Selen, das der Körper nicht braucht, über den Urin wieder ausgeschieden [5]. Wahrscheinlich existieren im Körper auch Selenreserven, die der Organismus bei ausreichender Selenversorgung auffüllt oder bei Selenmangel angreift [43,59]. Jedenfalls legen die hier vorliegenden Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die Selenkonzentration in einer Spontanurinprobe den Körper-

gesamthaushalt an Selen im Einzelfall nicht zutreffend widerspiegeln kann. Im Spontan-Urin tauchen Selenkonzentrationen auf, die den Versuch des Körpers darstellen, den Selenhaushalt in einer Homöostase zu halten und ein Zuviel an Selen auszuscheiden. Ob auch eine Selen-Basisausscheidung im 24-Stunden-Urin stattfindet, lässt sich nur vermuten. Für eine Antwort auf diese Frage wären entsprechende Untersuchungen in endemischen Selenmangelgebieten vorzunehmen.

4.3 Messung und Darstellung des Selengehaltes in Kinderurinen

4.3.1 Kinderurin-Messdaten, epidemiologischer Ansatz

In Tabelle 4 des Anhangs sind sämtliche Kinderurin-Messdaten, die dazugehörigen Kreatininwerte und die Joddaten aufgeführt. Aus den in Dreifachbestimmung gemessenen Werten wurde der jeweilige Mittelwert bestimmt und ebenfalls in der Tabelle angegeben. Da die Namen der Schüler unter das ärztliche Schweigerecht fallen und die Proben nur anonym veröffentlicht werden dürfen, sind die Urine ohne weitere Angaben einfach von 1 bis 100 durchnummeriert worden.

Aus den gemessenen Werten der Selenkonzentrationen kann man ableiten, dass die optimierte Methode für die Anwendung bei Urinproben geeignet ist: Bis auf die Urinproben Nr. 45, 72 und 79 liegen alle gemessenen Werte über der wie in Kapitel 4.1.1 ermittelten unteren Nachweisgrenze von $7,5 \mu\text{g/l}$ Selen. Die Mehrzahl der Urine bewegte sich um die mittlere Konzentration von 20 bis $35 \mu\text{g/l}$ Selen und ist somit mit der optimierten Methode gut erfassbar. Um diese Aussage zu veranschaulichen, ist die Häufigkeitsverteilung der Selenurinkonzentrationen der 100 Probanden im Histogramm der Abbildung 15 dargestellt. Dabei stechen die drei höchsten Häufigkeitsklassen im Bereich 20 bis $35 \mu\text{g/l}$ Selen hervor. Zusammengefasst machen sie etwa 57% der Messergebnisse aus.

Der Hauptansatz dieser Promotionsarbeit, die Frage, ob die optimierte Methode der Spektrofluorimetrie die Selenkonzentration auch im Urin ausreichend sensitiv erfassen kann, ist aufgrund dieser Ergebnisse positiv beantwortet.

In der Literatur findet man unterschiedliche mittlere Selenkonzentrationen im Urin, abhängig von der regionalen Selenversorgung. Deutschland wird als selenarmes Gebiet beschrieben [12]. Aus den Messungen lässt sich für diese Region (Franken) der Mittelwert (\pm SEM) $29,3 \pm 1,2 \mu\text{g/l}$ mit einem 95%-Konfidenzintervall (CI) von $27,8$ bis $30,8 \mu\text{g/l}$ für die Selenkonzentration in Urin angeben. Um daraus eine epidemiologische Aussage über die Selenversorgung in Franken abzuleiten, ist einerseits dieses Pilotprojekt mit 100 Proben noch zu klein, andererseits ist keine verbindliche untere Grenze für eine ausreichende Selenkonzentration im Urin bekannt. In Deutschland wurde 1997 bei gesunden Kindern bundesweit der mittlere Wert $14,8 \pm 4,2 \mu\text{g}$ Selen pro Liter Urin festgestellt [37,6]. Im Vergleich dazu liegen die hier untersuchten Schulkinder etwas über dem mittleren bundesweiten Durchschnitt. Erst mit einem größeren epidemiologischen Ansatz kann man der Frage nach einer möglichen Selenmangelversorgung in Franken fundiert nachgehen.

4.3.2 Mittelwerte und Perzentilen des Selengehaltes bei Normierung auf Kreatinin

In den Abbildungen 16 und 17 sind auf der Ordinate die Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen der 100 Kinderurinproben in $\mu\text{g/dl}$ eingetragen. Die Selenkonzentrationen sind auf Deziliter bezogen, um mit den Kreatininwerten, die auf der Abszisse in $\mu\text{g/dl}$ abgebildet sind, vergleichbar zu sein.

Bei der Betrachtung der Punktwolke, die sich in Abbildung 16 um eine ansteigende Ausgleichsgerade formiert, fällt ein Ausreißer auf, der bei einem hohen Kreatininwert eine auffallend niedrige Selenkonzentration im Urin aufweist. Diesen Sachverhalt könnte man dahingehend interpretieren, daß dieser Proband im Vergleich zu den anderen Kindern einen Selenmangel besitzt. Diese Vermutung geht von der Annahme aus, dass die Selenkonzentration im Urin auf den gesamten Selenhaushalt im Körper rückschließen lässt (siehe Kapitel 4.2.4). Vielleicht aber sind die Selenpools dieses Probanden noch ausreichend gesättigt und der Proband scheidet nur vergleichsweise wenig Selen aus, ein manifester Selenmangel liegt aber unter dieser Annahme nicht vor [43,59].

Alle anderen Werte verhalten sich unauffällig: je höher der Kreatininwert ist, desto höher ist tendenziell auch die Selenkonzentration.

Mit einem Statistikprogramm wurde für die Kurve in Abbildung 16 der Korrelationskoeffizient inklusive dem Ausreißer ermittelt. Der Korrelationskoeffizient weist hier den Wert 0,668 bei einem hochsignifikanten Wert für die Einflussgröße Selen auf. Die Signifikanz wird durch den Parameter p charakterisiert. Der hier vorliegende Wert $p=0,001$ bedeutet eine sehr hohe Signifikanz.

In Abbildung 17 hingegen ist der Ausreißer aus der Punktwolke entfernt. Hier beträgt der Korrelationskoeffizient sogar 0,819 bei einem hochsignifikanten Zusammenhang mit einem p -Wert von 0,008. Bei einem Korrelationswert über 0,8 geht man allgemein von einer positiven Korrelation aus. Damit ist bei dem vorliegenden Ergebnis eine positive Korrelation von Selen- und Kreatininwerten im Urin nachgewiesen.

In Abbildung 18 sind die Mittelwerte des auf Kreatinin normierten Selengehaltes als Perzentilen dargestellt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen zeigen sich in dieser Darstellung unauffällig. Die Klassen mit dem geringsten und höchsten Mittelwert fallen geringfügig aus der gleichmäßig zunehmenden Tendenz der Perzentilengruppen heraus; dies ist jedoch nicht signifikant und lässt keiner Interpretation Raum.

4.3.3 Perzentilen ohne Kreatininbezug

In Abbildung 19 sind 100 Selen-Mittelwerte der Kinderurinproben als Perzentilen zu vier Gruppen à 25 Probanden zusammengefasst. In diesem Falle werden die Kreatininwerte nicht mitberücksichtigt, da keine Individuen verglichen werden sollen, sondern ein rein epidemiologischer Anspruch besteht. Es fällt auf, dass die höchste Gruppe mehr Selen als erwartet im Urin aufweist. Die Mittelwerte der Perzentilengruppen folgen in Abbildung 19 einem fast gleichmäßig zunehmendem Trend, allein die höchste Histogrammklasse fällt aus diesem Trend heraus. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei dieser Klasse der eingezeichnete Fehlerindikator, der die Standardabweichung der Messung graphisch veranschaulicht, relativ groß ist und daher keine signifikante Aussage für eine Trendabweichung zulässig ist.

Eine Möglichkeit der Interpretation ist, dass unter den untersuchten Kindern eine Gruppe existiert, die eine bessere Selenversorgung als der Rest aufweist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die verschiedenen Perzentilengruppen auf ihren sozialen Status hin zu untersuchen, da Kinder aus besser situierten Familien wahrscheinlich eine qualitativ hochwertigere, selenhaltigere Nahrung bekommen. Vielleicht erhält die Gruppe mit der guten Selenversorgung auch eine Selensupplementation oder verzehrt besonders viel Meeresfisch etc. Es besteht auch die Möglichkeit, dass wenige Ausreißer diese Gruppe überhöhen. Dies sind alles Ideenansätze zur Interpretation der hier dargestellten Ergebnisse von unterschiedlichem Selengehalt in Kinderurinen.

4.3.4. Selen-Jod-Korrelation

In der Folge wird der Frage der Korrelation zwischen Selen- und Jodgehalt im Urin nachgegangen. In Abbildung 20 ist auf der Abszisse die gemessene Selenkonzentration der 100 Probanden gegen die auf der Ordinate dazugehörigen Jodkonzentrationen aufgetragen. Es fällt ein Ausreißer auf, der bei einer mittleren Selenversorgung eine sehr hohe Jodkonzentration aufweist. Es lässt sich vermuten, dass dieser Proband unter einer Jod-Supplementation stand.

Wenn man die Steigung der Trendgeraden einschließlich des Ausreißers bestimmt, ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,268. Es liegt eine geringe Korrelation bei einer hohen Signifikanz ($p=0,007$) für Selen vor.

In Abbildung 21 ist die Selen-Jod-Korrelation ohne den Ausreißer dargestellt. Ohne den Ausreißer erhält man hier einen höheren Korrelationskoeffizienten mit dem Wert 0,47. Die Signifikanz ist in diesem Falle sehr hoch, p geht gegen Null.

In beiden Fällen, mit oder ohne Ausreißer, liegen die Korrelationswerte deutlich unter dem definierten Mindestwert für die Feststellung einer positiven Korrelation. Insgesamt ist also keine valide Interpretation einer positiven Korrelation zwischen Selen- und Jodgehalt herauslesbar.

4.4. Diskussion der Ursachen von Ausreißern

Zu Beginn der Arbeit mussten Messungen oftmals wiederholt werden, um die optimierte Methode fehlerlos anzuwenden. Ausreißer, die dennoch bei späteren Messungen aus dem normalen Messbereich herausfielen, ließen sich meist auf plausible Ursachen zurückführen. Weil solche Ausreißer in der Selenstandardkurve vom Geradenverlauf abwichen oder sich bei Dreifachbestimmungen zu sehr von den anderen beiden Werten unterschieden, wurden sie unzweifelhaft als Ausreißer erkannt.

Im Protokollheft wurde jeder Versuchsdurchlauf dokumentiert und Fehler in der Versuchsdurchführung vermerkt, um gemessene Extremwerte mit diesen Fehlern zu erklären.

Verdächtig waren etwa Proben, die nach der Zugabe von Salzsäure nach der Inkubation im Heizblock noch eine gelbliche Farbe aufwiesen. Es war hier zu vermuten, dass die Selenionen unvollständig aus ihren organischen Verbindungen gelöst waren, da dies mit einer völligen Entfärbung einhergegangen wäre. Solche Proben führten in einigen Fällen zu fehlerhaften Messergebnissen.

Manchmal fielen kleine Partikel des Teflondeckels des Probenröhrchens in die Flüssigkeit. Diese Kunststoffpartikel ließen die Proben ebenfalls gelblich erscheinen und führten regelmäßig zu überhöhten Messergebnissen. Generell war festzustellen, dass die Teflondeckel durch die Säureeinwirkung korrodierten und deshalb nach einer gewissen Zeit ersetzt werden mussten. Fazit: Intakte Deckel sind von immenser Wichtigkeit, da in die Proben fallende Kunststoffpartikel die Messung verfälschen und die Deckel mit den Glasröhrchen verbacken können. Nur unter Gasentweichen sind solche Probenröhrchen noch zu öffnen, oder aber sie sind undicht.

Als weitere Fehlerquelle stellte sich ein versehentliches Verkochen von Proben dar. Bei der Inkubation über Nacht verdampfte Flüssigkeit aus den Probengefäßen aufgrund undichter Deckel und es kam so zum Verkochen. Bei vollständiger Verdampfung der Flüssigkeit lag auskristallisiertes Salz vor und die Proben mussten verworfen werden. War nur ein Teil der Flüssigkeit verdampft, kam man aber erstaunlicherweise zu normalen Messwerten.

Zur Vermeidung von Ausreißern war es ebenfalls wichtig, das zugegebene Cyclohexan genau abzumessen. Eine Ungenauigkeit beim Abmessen ergab begründete Messfehler, da unterschiedlich viel Selen in den differierenden Cyclohexanphasen detektierbar war. Die Menge an Cyclohexan, in der sich eine gewisse Menge Selen löst, ist also fundamental wichtig für fehlerfreie Ergebnisse, Pipettierfehler fallen hier besonders ins Gewicht.

Die Glasröhrchen, die als Probengefäße benutzt wurden, entwickelten nach mehreren Messungen eine weißlich beschlagene Wand. Da zu vermuten war, es könnte sich dabei neben Kalk auch um Selenüberstände handeln, wurden die Glasröhrchen mit Chromschwefelsäure gesäubert und dann nochmals mit Wasser abgewaschen. Einige Ausreißer konnten mit den Niederschlägen an den Glaswänden in Verbindung gebracht werden. Um solche Fehler sicher zu vermeiden, wurden neue Glasröhrchen eingesetzt.

Das Ausschütteln von Selen in die Cyclohexanphase wurde manuell ausgeführt. Hier war es von Wichtigkeit, die Proben gleich lang und gleich intensiv zu schütteln, da sonst das Selen nicht völlig in der oberen Phase gelöst wurde. Da die in der Versuchsanleitung angegebene eine Minute nicht ausreichend für eine vollständige Lösung des Selens in der Cyclohexanphase erschien, wurde diese Zeit auf mindestens zweieinhalb Minuten heraufgesetzt. Bei unvollständigem Vorliegen von Selen in der oberen Phase wird die Messung zwangsläufig verfälscht.

Manchmal konnte man beobachten, dass einige Proben nach der Inkubation über Nacht trübe erschienen. Diese Proben wurden dann als Ausreißer bei der spektrofluorimetrischen Messung erkannt. Eine Erklärung hierfür steht aus.

Als weitere Fehlerquelle zeigte sich das ungenügende Auftauen von Urinproben. Selen, das sich im Sediment befand und bei ungenügendem Auftauen nicht im Urin vollständig erschien, wurde somit bei der Messung als zu niedrig erfasst. Aus gleichem Grund mußten die Urinproben immer vor dem Abpipettieren von 400 µl gut geschüttelt werden. Wenn sich Sediment durch Schütteln im Urin nicht gut auflösen ließ, führte dies zu differierenden Doppelwerten.

4.5. Erfahrungen und Empfehlungen

Es folgen einige Hinweise, die helfen können, zukünftige Messungen mit dieser Methode zeitsparender und verlässlicher durchzuführen. Diese Erfahrungswerte beziehen sich einmal auf eine effektivere Durchführung des Versuches und zum anderen auf das Vermeiden von Fehlern. Letzteres wurde z.T. schon in Kapitel 4.4 angesprochen.

Essentiell ist zunächst das exakte Arbeiten, das genaue Abmessen und Pipettieren im Versuchsdurchlauf. Bei der Herstellung der DAN-Lösung wird besonders viel Aufmerksamkeit verlangt, da die Lösung nicht zu lange im Wasserbad stehen darf und dem Ultraschall länger als 5 Minuten unterzogen werden soll. Die Temperatur im Wasserbad wurde von 60 °C auf 50 °C herabgesetzt, da das DAN sonst, genauso wie bei zu langem Inkubieren, Schlieren entwickelt. Diese flocken dann später beim Abkühlen aus und stellen eine mögliche Fehlerquelle dar. Da sich das DAN nach 5 Minuten noch nicht gänzlich in der Salzsäure auflöst, muss die Lösung entsprechend länger im Ultraschallbad belassen werden.

Um die Kunststoffdeckel der Probenröhrchen zu schonen, sollte die rauchende Salzsäure nicht in die Deckel pipettiert werden. Reste der selenhaltigen Flüssigkeit in den Deckeln können mit einer feinen Pipette den Proben hinzugefügt werden.

Um Zeit zu sparen, sollte man am zweiten Versuchstag gleich zu Beginn das Wasserbad auf 50 °C einstellen und die Urinproben aus dem Kühlschrank nehmen, um sie dann bei Zimmertemperatur auftauen zu lassen.

Im Verlauf des Versuches muss der Heizblock heruntergekühlt werden. Um dies zu beschleunigen, kann man kalte Heizblöcke auflegen. Aus Kostengründen wird empfohlen, anstelle von Einmalküvetten eine hochwertige Quarz-Küvette einzusetzen, da diese nach der Reinigung wiederverwendbar ist. Die Messergebnisse werden davon nicht beeinflusst.

Um möglicherweise eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen, wurde ein Versuch mit 1 ml statt 400 µl Probenansätzen durchgeführt. Da hier aber auch höhere Säuren- und EDTA- Mengen benötigt wurden, reichte hierfür die Größe der Glasröhrchen nicht aus. In einem weiteren Ansatz wurden Proben mit nur

200 μ l angesetzt. Dies führte jedoch ebenfalls zu keiner Verbesserung der Messgenauigkeit.

5 Zusammenfassung, Ausblick

Das Spurenelement Selen ist in den letzten Jahren in den Mittelpunkt klinischen Interesses gerückt. Diverse Krankheiten lassen sich mit einem Selenmangel in Verbindung bringen. In einigen Studien wird durch Selenzufuhr eine Senkung der Tumorinzidenz beobachtet und in der Intensivmedizin wird Natriumselenit zur Senkung der Mortalität bei akuter Pankreatitis oder bei der SIRS/ Sepsis verwendet.

Um den Selenstatus von Patienten zu erfassen, wird in der Klinik die Routine-methodik der Atomabsorptionsspektrometrie mit Serumproben durchgeführt. In den Untersuchungen von Christina N. Stober [29] wird allerdings gezeigt, dass die Methode der Spektrofluorimetrie sehr gut mit diesem Verfahren konkurrieren kann und in einer optimierten Durchführung sogar einfacher und kostengünstiger ist.

Diese optimierte Methode der Spektrofluorimetrie, die auf der Grundlage der Arbeit von Koh und Benson [27] entstand, wurde in der hier vorliegenden Promotionsarbeit auf die Anwendbarkeit mit Urinproben untersucht; In Ausführung eines Pilotprojektes wurde in dieser Arbeit der Selengehalt von 100 Kinderurinproben in Dreifachbestimmung untersucht.

Einer der ersten Schritte war die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für Selenwerte in Urinproben. Mittels des sogenannten Inter-Assays, bei dem die Selenkonzentration derselben Urinproben an mehreren Tagen gemessen wurden, wurde als untere Nachweisgrenze ein Wert der Selenkonzentration von 7,5 µg/l festgestellt. Selenkonzentrationen, die unter dieser Nachweisgrenze lagen, konnten mit der optimierten Analyse-methode der Spektrofluorimetrie nicht präzise und reproduzierbar ermittelt werden. Bei der Mehrzahl der untersuchten Urine lag der Selengehalt über dieser unteren Nachweisgrenze von 7,5 µg/l, bewegte sich also in einem gut detektierbaren Messbereich. Nur bei drei Urinproben lag die Selenkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze, bei allen restlichen Urinproben konnte der Selengehalt präzise und reproduzierbar mit der optimierten Methode erfasst werden. In 57 Prozent dieser Fälle bewegten sich die Messergebnisse im Wertebereich von 20 bis 35 µg/l.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die optimierte Methode der Spektrofluorimetrie zur genauen Selenbestimmung in Urinproben geeignet ist.

Der Hauptaspekt der Arbeit, die Anwendbarkeit des optimierten Analyseverfahrens auf Urinproben, wurde durch entsprechende Versuchsansätze auch statistisch untersucht. Um die optimierte Analysemethode für die Anwendung auf Urinproben zu validieren, wurden zunächst standardisierte externe Referenz-Urine gemessen, dann verschiedene organische Verbindungen auf ihren Selengehalt untersucht und schließlich überprüft, ob Störsubstanzen im Urin die Messergebnisse verfälschen.

Im 1. Schritt wurden standardisierte Referenzsubstanzen reproduzierbar und mit statistisch definierter Richtigkeit vermessen. Damit wurden immanente systemische Fehler bei der Methodik ausgeschlossen.

Aus den organischen Verbindungen Selenocystein und Selenomethionin konnte das Selen spektrofluorimetrisch zu beinahe 100% wiedergefunden werden. Da im Urin selenhaltige Aminosäuren wie Selenomethionin ausgeschieden werden, ist es von großer Wichtigkeit, dass das Messverfahren dieses in Bindung vorliegende Selen richtig erfasst.

Die Richtigkeit der optimierten Methode der Spektrofluorimetrie bei der Messung der Selenkonzentration in Urinproben konnte somit nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die häufigsten Ionen im Urin, nämlich Kalium, Natrium und Phosphat, auf ihren möglichen Störeinfluss auf die Selenmessung hin untersucht. Albumin, das ebenfalls im Urin erscheint, wurde ebenfalls dieser Fragestellung unterzogen. In den mit den diversen Salzen versetzten Urinproben konnten bei der Selenmessung kein Störeinfluss beobachtet werden. Die Selenkonzentration der Urinproben mit dem zugesetzten Protein nahm entsprechend der Albuminmengen linear zu. Diese Beobachtung ließ sich direkt auf den im Albumin vorhandenen Selengehalt zurückführen. Damit war ein Störeinfluss des Albumins bei der Selenmessung ebenfalls ausgeschlossen.

Neben der Untersuchung der Anwendbarkeit der optimierten Methode der Spektrofluorimetrie auf Urinproben, der Hauptaufgabenstellung dieser Promotionsarbeit, wurde auch - als Nebenaspekt - ein epidemiologischer Ansatz verfolgt: Um die regionale Selenversorgung in Franken zu untersuchen, wurden 100 Kinder-Urine aus einem Würzburger Gymnasium herangezogen. Aus den Messungen ließ sich für die Region Franken der Mittelwert 29,3 und die Standardabweichung $\pm 1,2 \mu\text{g/l}$ bei einem 95% Konfidenzintervall von 27,8 bis 30,8 $\mu\text{g/l}$ für die Selenkonzentration in Urin angeben. Um aus diesem Mittelwert eine epidemiologisch fundierte Aussage über die Selenversorgung in Franken abzuleiten, war einerseits dieses Pilotprojekt mit 100 Proben noch zu klein, andererseits ist keine verbindliche untere Grenze für eine ausreichende Selenkonzentration im Urin bekannt.

Über einen Selenmangel läßt sich bei fehlenden Vergleichsdaten kaum eine Aussage treffen. Standardwerte für den Selengehalt im Urin, die einen Selenmangel anzeigen würden, sind nicht bekannt. Nimmt man die Daten einer Untersuchung mit gesunden Kindern in Deutschland aus dem Jahre 1997 zum Vergleich, liegen die Messergebnisse dieser Arbeit im Durchschnitt etwas höher. Damit ist für die Region Franken eine bessere Selenversorgung zumindest im bundesweiten Vergleich gegeben.

Eine Gruppe der Kinder wies eine auffällig höhere Selenversorgung auf. Dies könnte auf eine bessere Selenversorgung aufgrund hochwertigerer und ausgewogener Ernährung hinweisen. Vielleicht hatten diese Probanden aber nur unmittelbar vor der Urinabgabe selenhaltige Nahrung zu sich genommen.

Die Jodkonzentrationen aus den vorliegenden pädiatrischen Urinproben waren aus einer früheren Studie bekannt. Beim Vergleich der Selen- mit den Jod-Daten war eine Korrelation erkennbar, jedoch lag der Wert des Korrelationskoeffizienten unter 0,8 und war damit für eine fundierte Aussage statistisch unzureichend. Nur ein einziger Proband fiel bei einer mittleren Selenkonzentration durch eine auffällig hohe Jodkonzentration auf. Dies könnte man durch eine Jod-Supplementation dieses Schülers erklären.

Die Frage, ob Selen im Urin aussagekräftig für den gesamten Selenhaushalt des Körpers ist, muss weitergehend untersucht werden. In der Fachliteratur

wird der Selengesamtstatus oft mit den Serumwerten veranschaulicht. Unklar ist, ob Selen entsprechend der Höhe im Blut auch im Urin erscheint. Hierzu wurde ein Versuchsansatz in beschränktem Umfang mit 13 Probanden durchgeführt; es wurden die Selenkonzentrationen im Urin und im Serum der Probanden miteinander verglichen. Ein signifikanter Zusammenhang war jedoch nicht ersichtlich. Diese Schlussfolgerung ist aufgrund der geringen Probenzahl allerdings nicht ausreichend fundiert und bedarf eines umfangreicheren Experimentes.

In einer groß angelegten Untersuchung wird bei Combs et al. [60] eine positive Korrelation zwischen der Selenzufuhr und der Ausscheidung im Urin beschrieben. Allerdings wurden nicht die Selenwerte im Blut und Urin miteinander verglichen. So könnte das aufgenommene Selen auch zunächst in die organischen Selenpeicher gelangen und demzufolge nur das überflüssige Selen im Harn erscheinen.

Für weitere Experimente in diese Richtung ist die Selenmessung im 24-Stunden-Urin und in mehreren, über den Tag hinweg gewonnenen Blutproben zu empfehlen, da Messungen im Blut und Urin sonst nur Momentanaufnahmen darstellen.

Die Hauptmotivation dieser Promotionsarbeit war der Nachweis, dass die optimierte Methode der Spektrofluorimetrie zur genauen Messung des Selengehaltes in Urinproben geeignet ist. Da von Kindern leichter Urin als Blut abgenommen werden kann, ist eine solche Selenmessung in Urin generell von Vorteil. Mit diesem Nachweis ist die Voraussetzung geschaffen, weitergehende epidemiologische Untersuchungen durchzuführen. Im Ausblick auf zukünftige epidemiologische Untersuchungen könnten die Proben mit wenig Aufwand gewonnen werden und es wären auch mehr Probanden zur Teilnahme bereit. Da die wichtige Frage nach der Aussagefähigkeit der Selenkonzentration im Urin in Bezug zum Selen-Gesamtkörperstatus in dieser Arbeit nicht hinreichend geklärt werden konnte, müssen zunächst weitergehende einschlägige Untersuchungen zu dieser wichtigen Fragestellung durchgeführt werden.

6 Anhang

6.1 Kurven und Tabellen

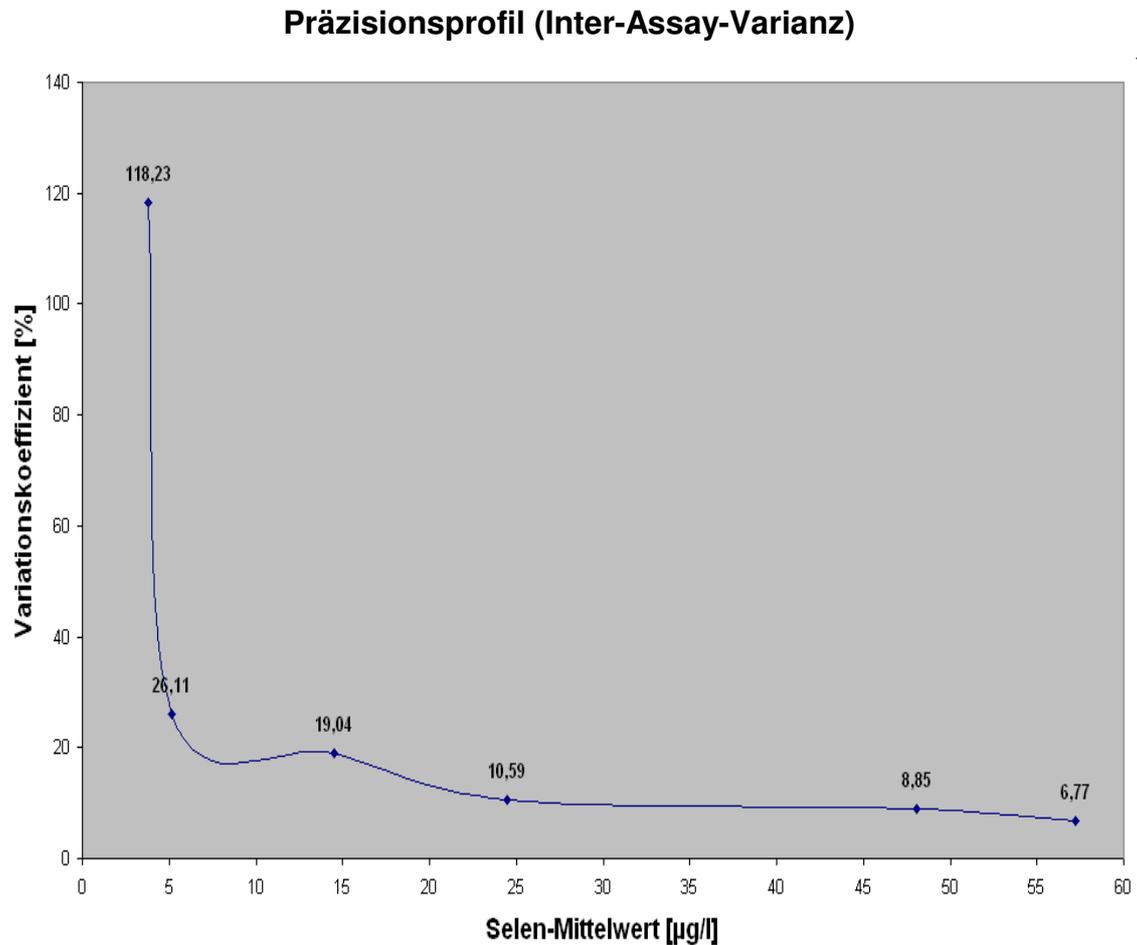


Abbildung 1: Präzisionsprofil zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz ohne Ausreißertest nach Grubbs [33].

Variationskoeffizient [%] in Abhängigkeit von Selen-Mittelwerten [$\mu\text{g/l}$] der Urinproben A bis F.

Präzisionsprofil (Inter-Assay-Varianz)

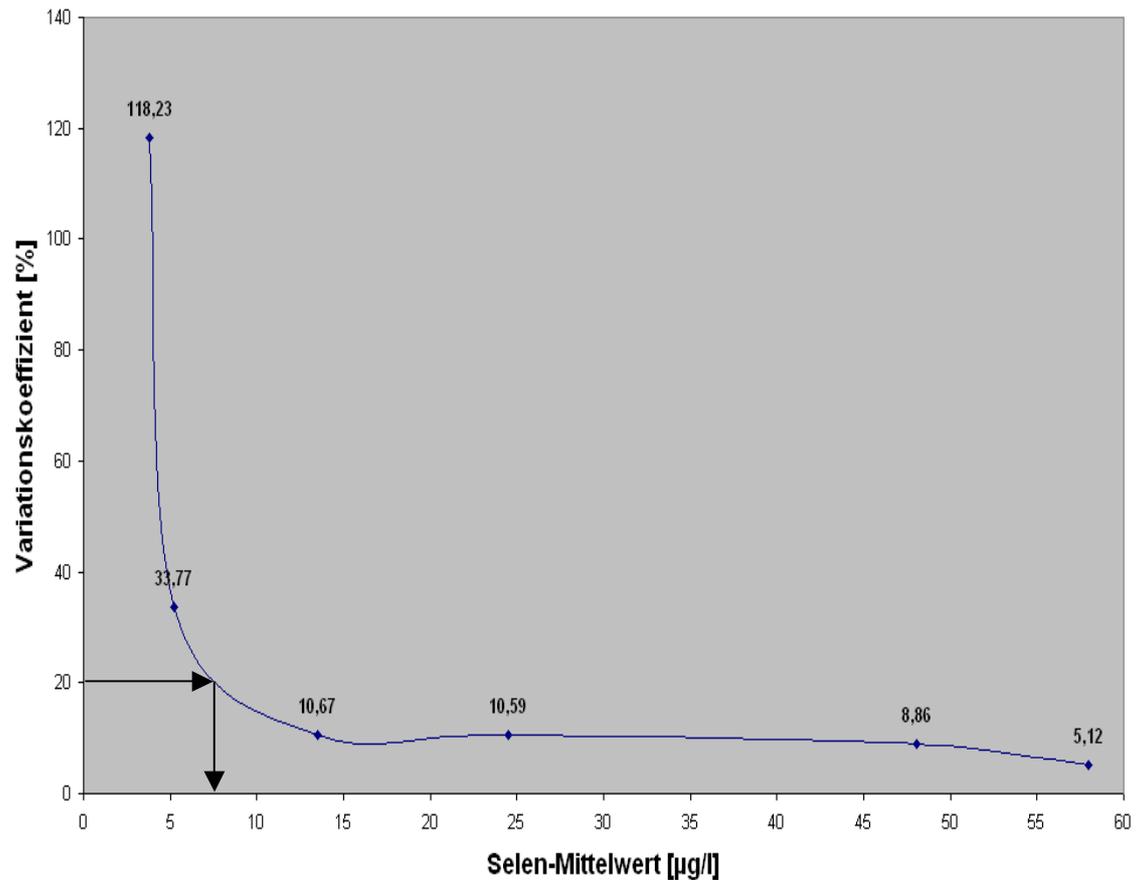


Abbildung 2: Präzisionsprofil zur Beschreibung der Inter-Assay-Varianz mit Ausreißertest nach Grubbs [33].

Variationskoeffizient [%] in Abhängigkeit von Selen-Mittelwerten [µg/l] der Urinproben A bis F.

Die Pfeile markieren die untere Nachweisgrenze bei dem Variationskoeffizienten „20%“.

Präzisionsprofil (Intra-Assay-Varianz)

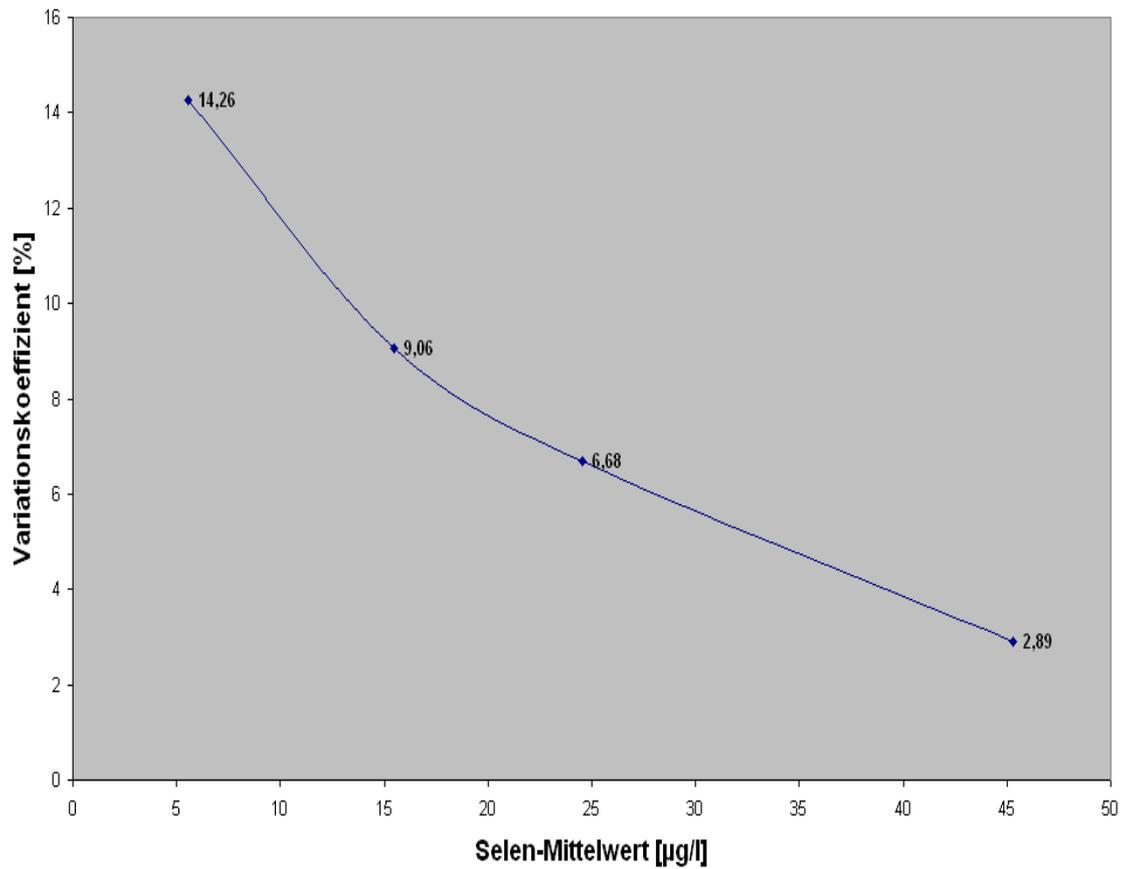


Abbildung 3: Präzisionsprofil zur Beschreibung der Intra-Assay-Varianz.

Variationskoeffizient [%] in Abhängigkeit von Selen-Mittelwerten [µg/l] der Urinproben A bis D.

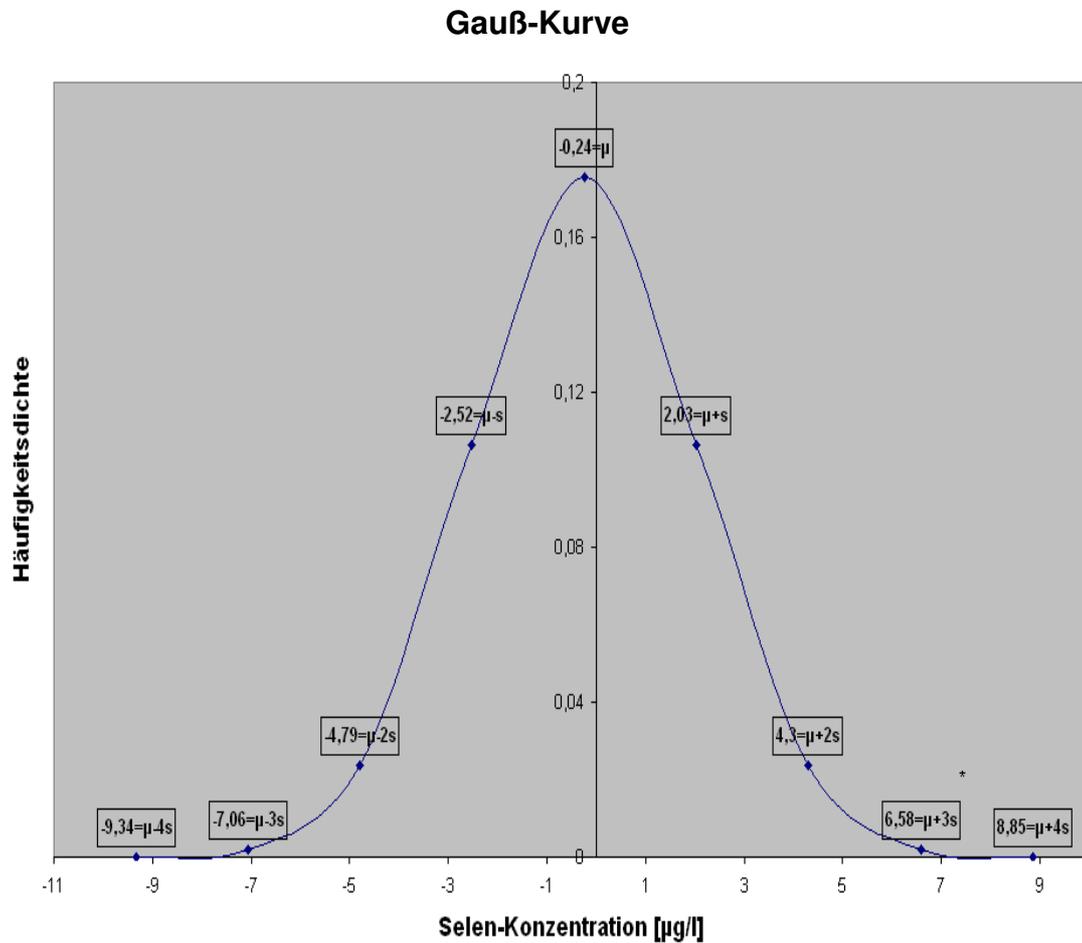


Abbildung 4: Gauß-Kurve der Blindwerte.

Häufigkeitsdichte in Abhängigkeit von der Se- Konzentration [µg/l].

Die umrahmten Werte in der Kurve stellen die Abszissenwerte der eingetragenen Punkte dar.

Untere Nachweisgrenze definiert bei dem Schwellenwert $3 \cdot s$, also $+6,58 \mu\text{g/l}$ Selen (siehe Sternchen).

μ entspricht dem Mittelwert, um den die Standardabweichung als Maß für die Streuung dargestellt ist.

Aufstockproben

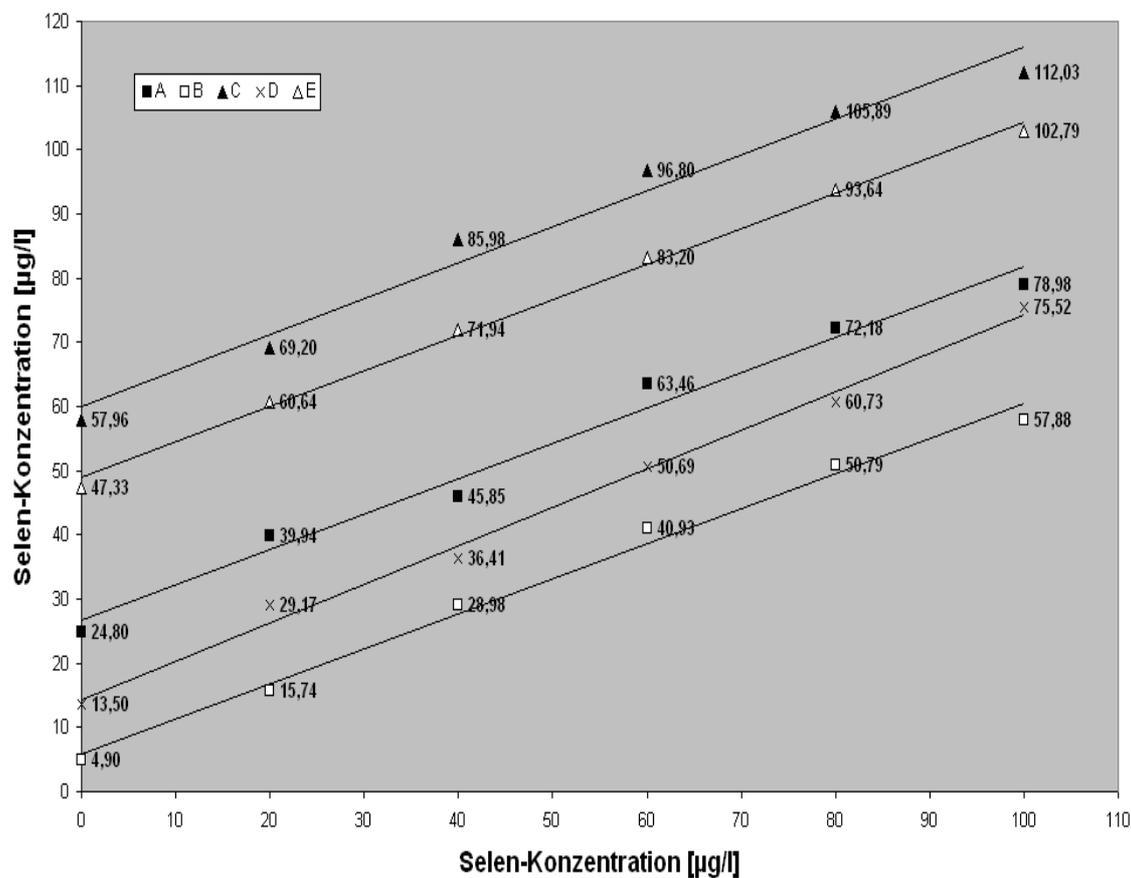


Abbildung 5: Standardadditionsverfahren.

Gemessenes Signal Y an Selenkonzentration [$\mu\text{g/l}$] in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Selenlösungen [$\mu\text{g/l}$] zu den Urinproben A bis E.

Aufschluss von organischen Selenstandards

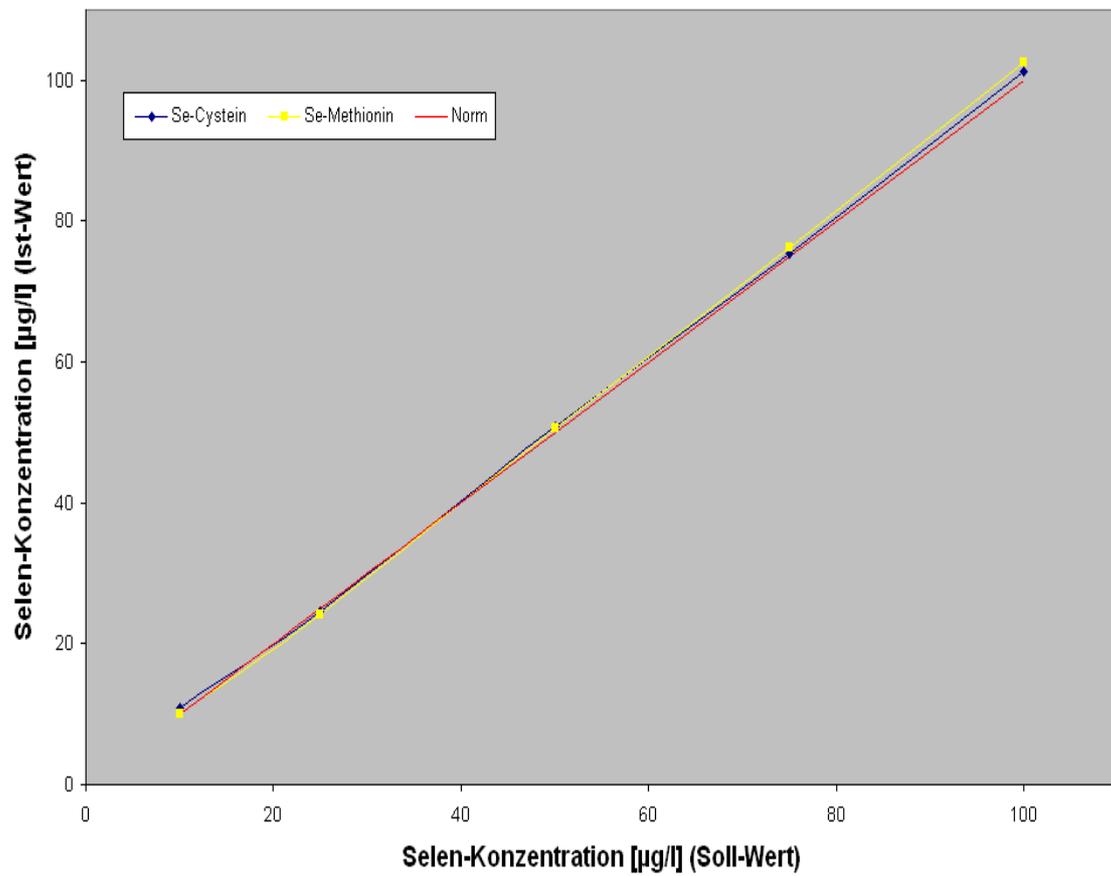


Abbildung 6: Selen-Wiederfindungsrate.

Ist-Werte der Selen-Konzentrationen [µg/l] in Abhängigkeit der Soll-Werte der Selen-Konzentrationen [µg/l].

Vergleich der wiedergefundenen Selenkonzentrationen mit den erwarteten Werten

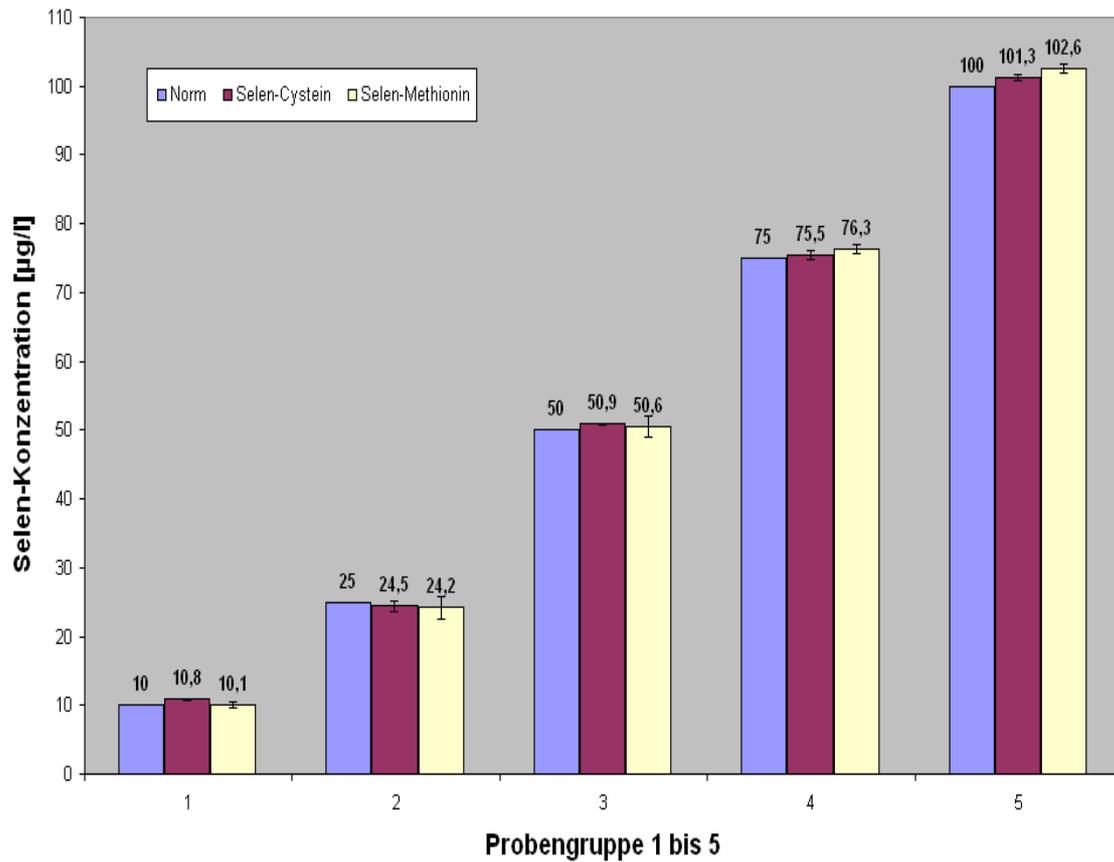


Abbildung 7: Selen-Wiederfindungsrate.

Mittelwerte der „wiedergefundenen“ Selenkonzentrationen [µg/l]
der Probengruppen 1 bis 5.

Aufschluss von organischen Selenstandards

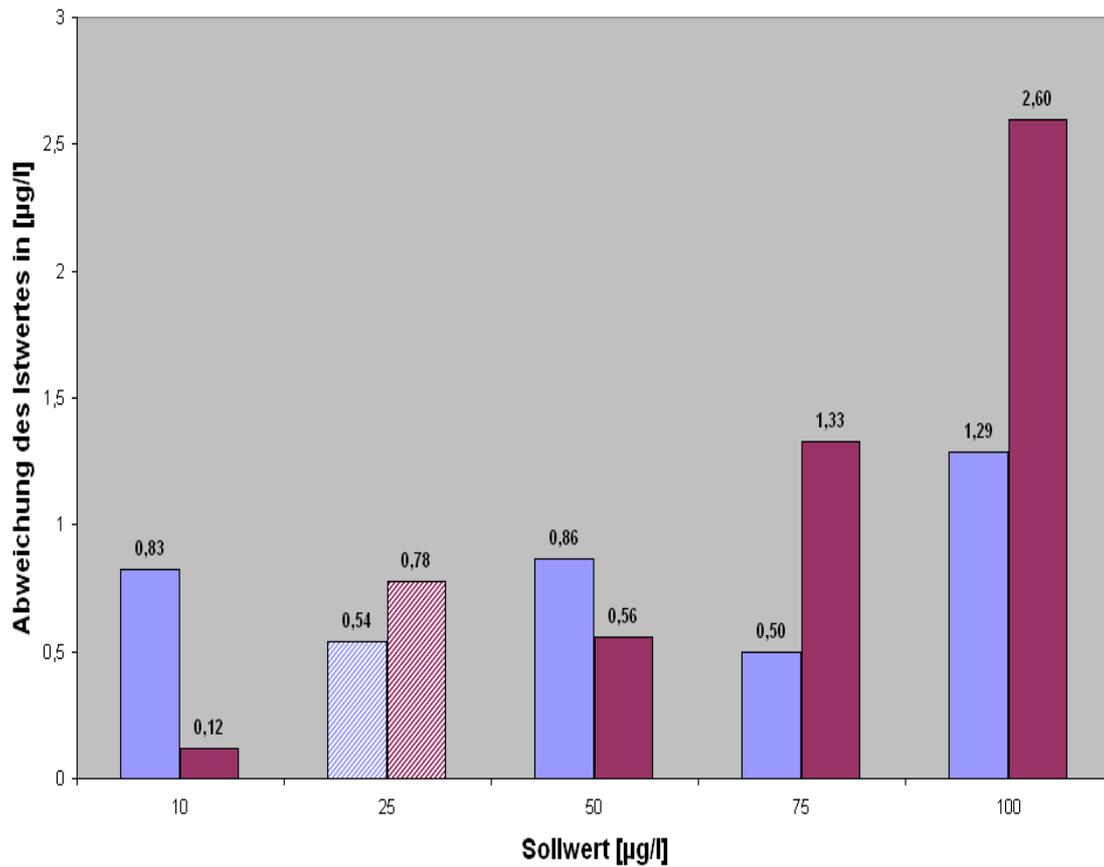


Abbildung 8: Abweichung des Istwertes vom Sollwert der Selenkonzentrationen als Differenzwert in µg/l.

Die schraffierten Flächen zeigen negative Werte an, die gefüllten Flächen positive Werte.

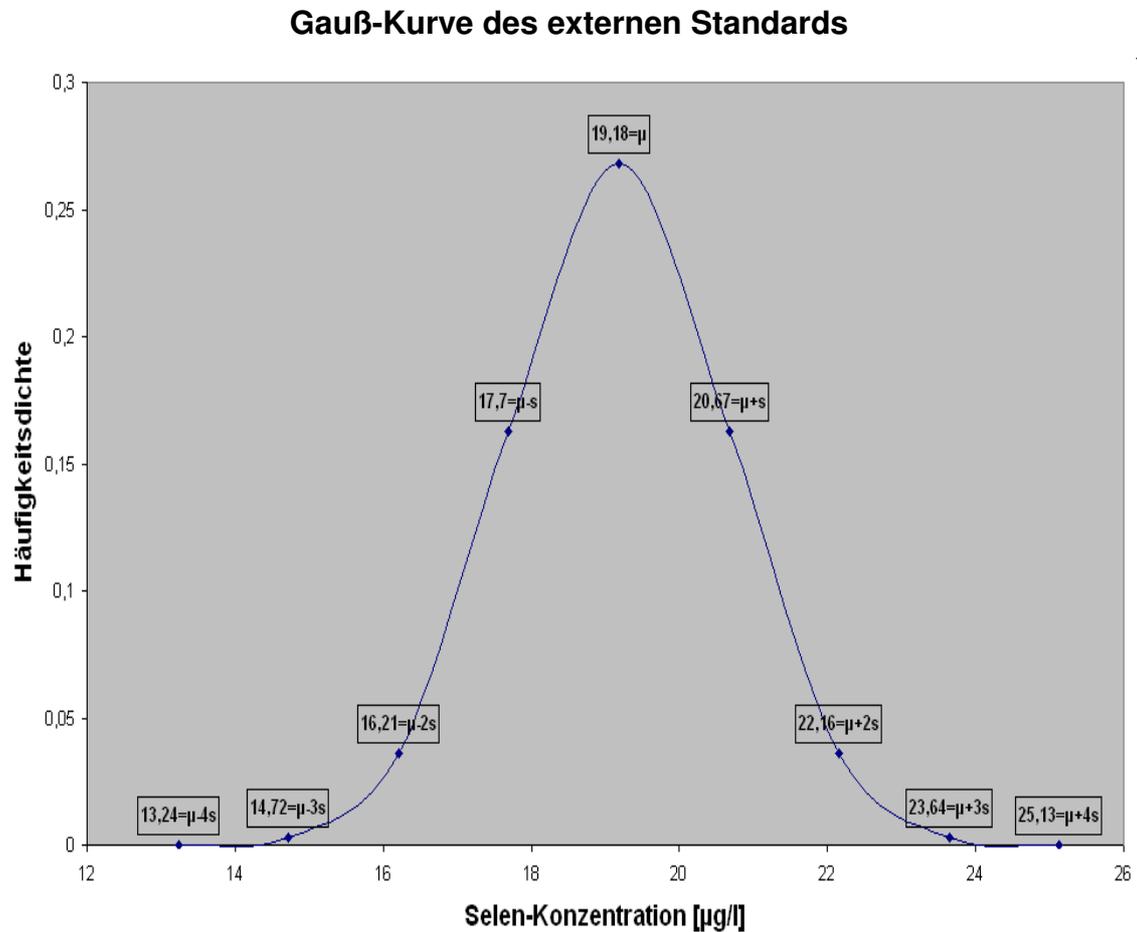


Abbildung 9: Gauß-Kurve der Messungen des externen Standardurins.

Häufigkeitsdichte in Abhängigkeit von der Se-Konzentration [µg/l].

Wie in Abbildung 4 sind die ausgewiesenen Messkurvenpunkte mit den zugehörigen Abszissenwerten herausgehoben; μ entspricht dem Mittelwert, um den die Standardabweichung als Maß für die Streuung dargestellt ist.

Störsubstanzen

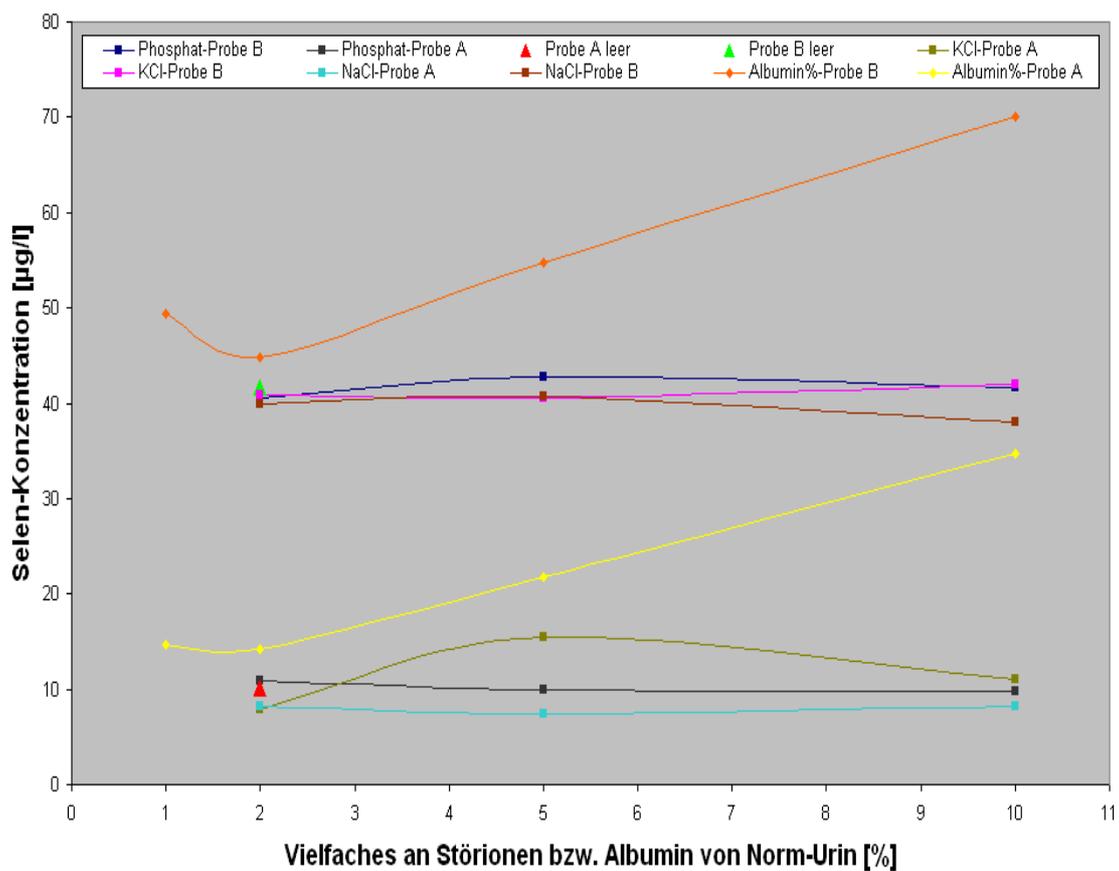


Abbildung 10: Einfluss von Störionen/ Proteinen.

Selen-Konzentration [µg/l] in Abhängigkeit vom Vielfachen an Störionen/ Albumin von Norm-Urin (Vol%).

Serum-Urin/Kreatinin-Selenkonzentrations-Vergleich

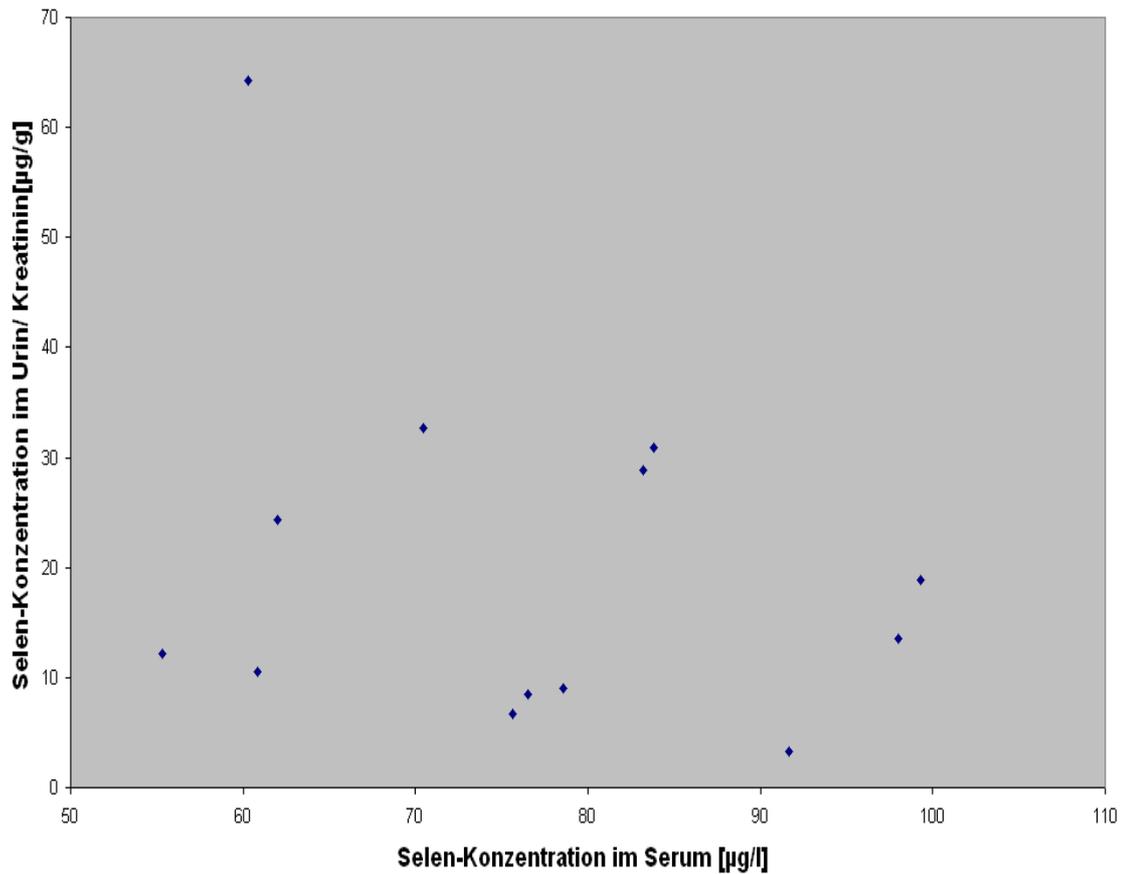


Abbildung 11: Vergleich der Selenkonzentrationen im Serum und Urin, bezogen auf Kreatinin.

Se-Konzentration im Urin/Kreatinin [µg/g] in Abhängigkeit von der Se-Konzentration im Serum [µg/l].

Serum-Urin/Kreatinin-Selenkonzentrations-Vergleich

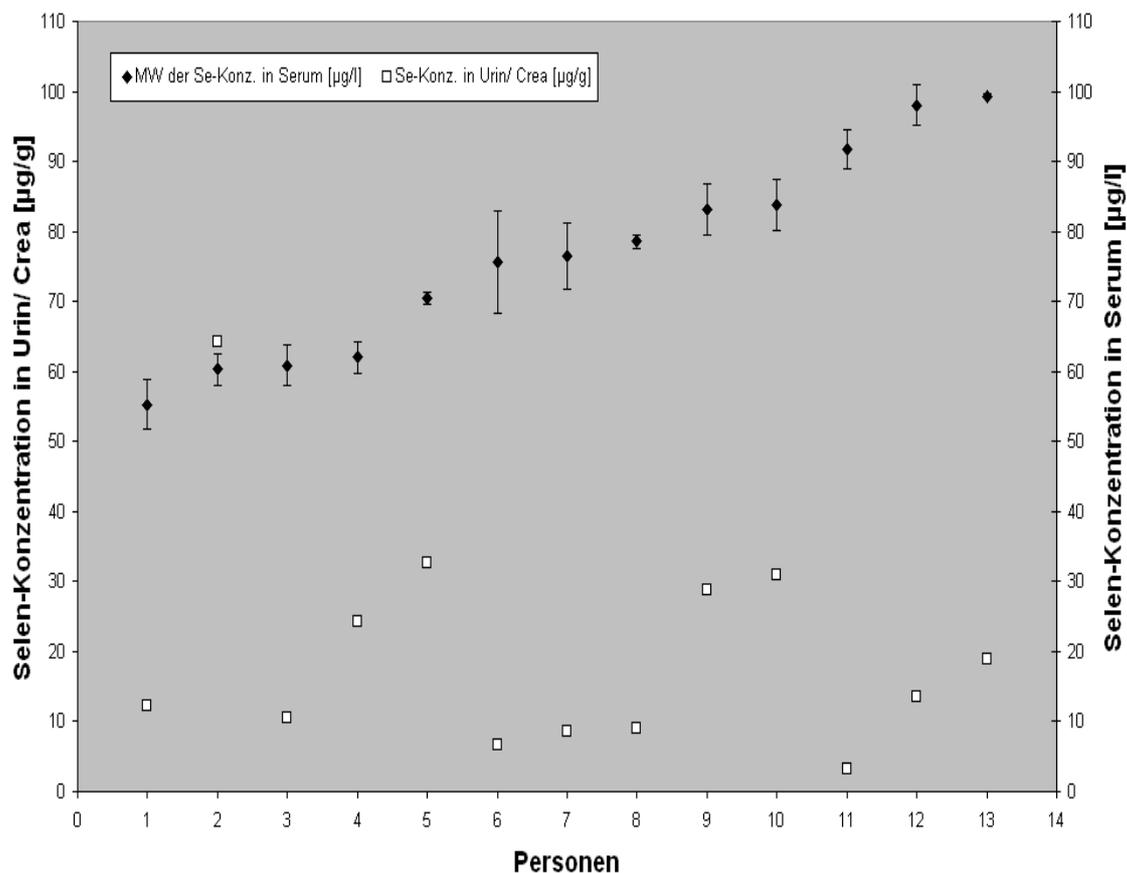


Abbildung 12: Vergleich der Selenkonzentrationen im Serum und Urin, bezogen auf Kreatinin.

Auf der Y-Achse (links) sind bei 13 Personen (durchnummeriert auf der X-Achse) die Se-Konzentrationen im Urin bezogen auf den Kreatiningehalt [$\mu\text{g/g}$] aufgetragen, auf der sekundären Y-Achse (rechts) ist die Se-Konzentration im Serum [$\mu\text{g/l}$] dargestellt.

Serum-Urin-Selenkonzentrations-Vergleich

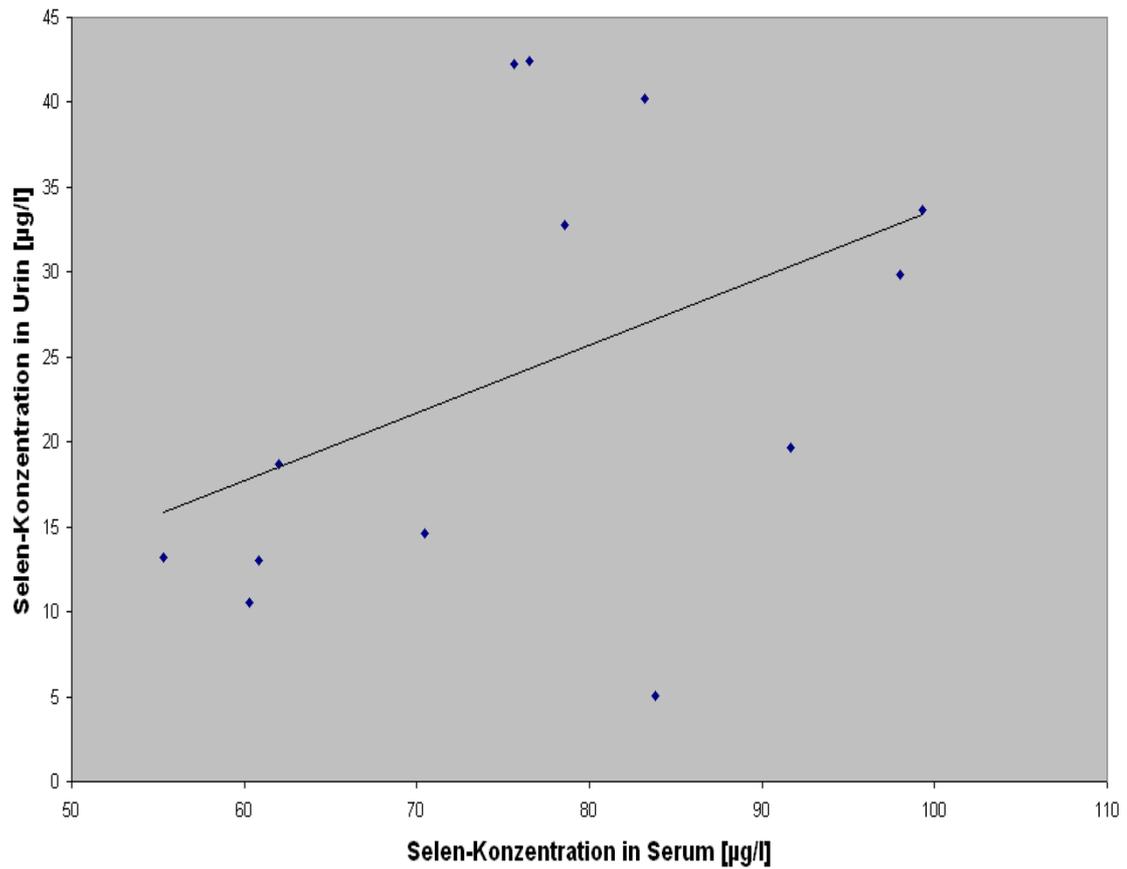


Abbildung 13: Vergleich der Selenkonzentrationen im Serum und Urin.

Se-Konzentration im Urin [µg/l] in Abhängigkeit von der Se-Konzentration im Serum[µg/l].

Serum-Urin-Vergleich

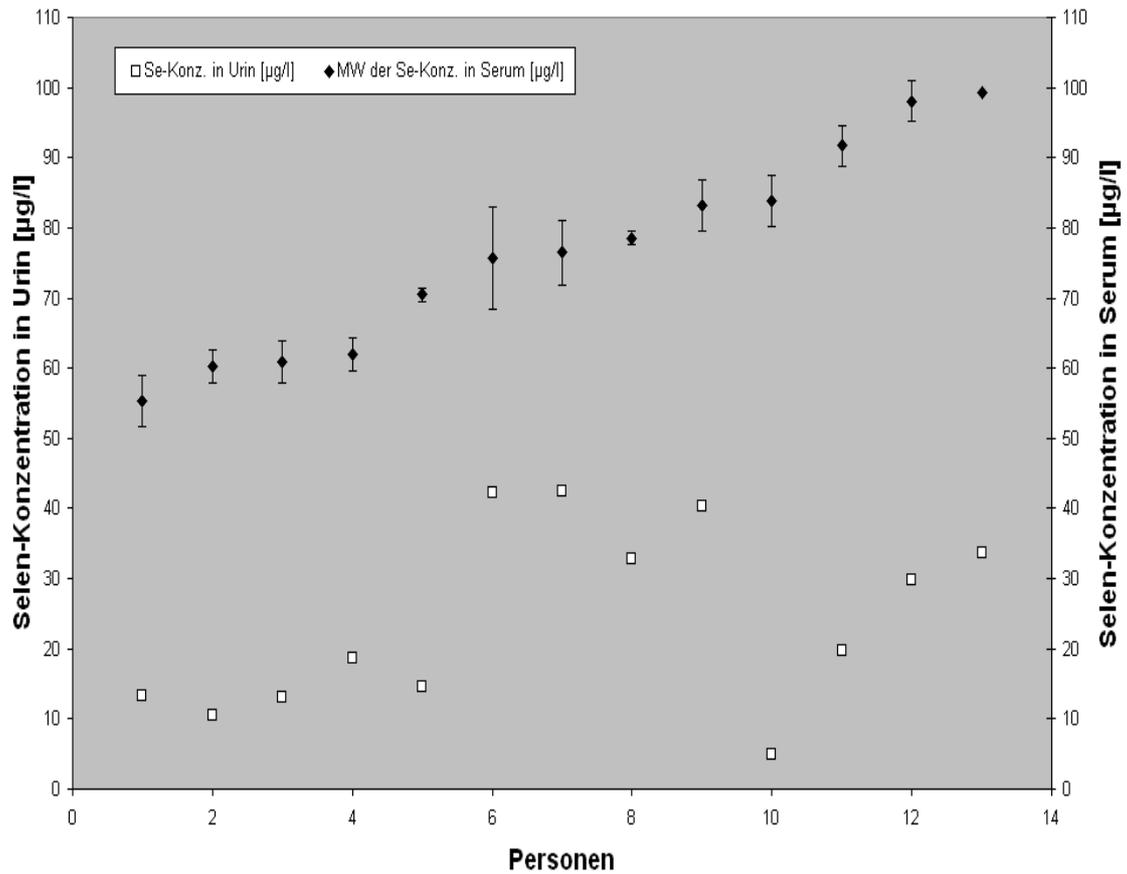


Abbildung 14: Vergleich der Selenkonzentrationen im Serum und Urin.

Auf der Y-Achse (links) sind bei 13 Personen (durchnummeriert auf der X-Achse) die Se-Konzentrationen im Urin [µg/l] aufgetragen, auf der sekundären Y-Achse (rechts) ist die Se-Konzentration im Serum [µg/l] dargestellt.

Die Fehlerindikatoren (1 s) sind nicht bei den Urinwerten sichtbar, da sie unter dem Wert „1“ liegen.

Häufigkeitsverteilung

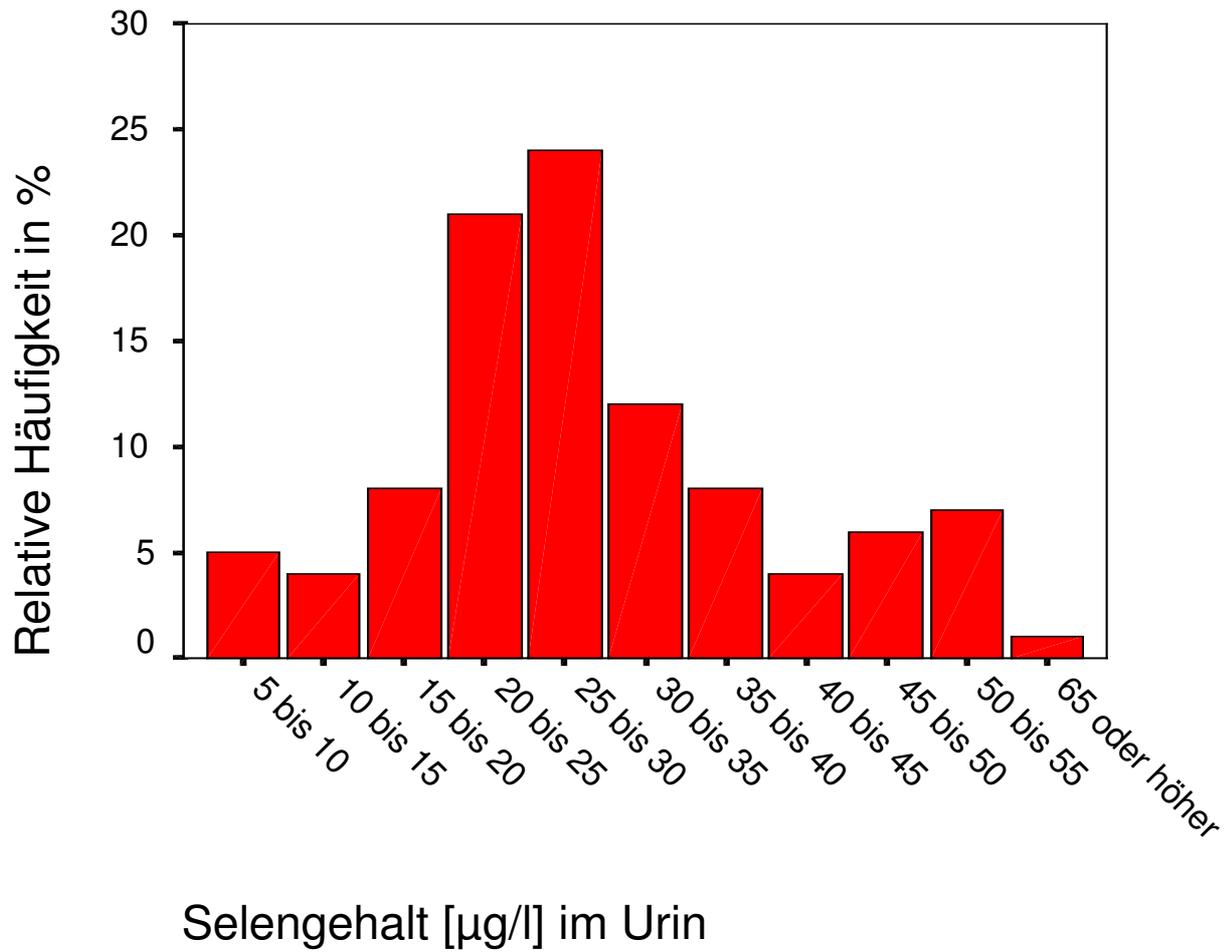


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Selen-Urinkonzentrationen von 100 Probanden.

Selen-Konzentrationen in Urin bezogen auf Kreatinin

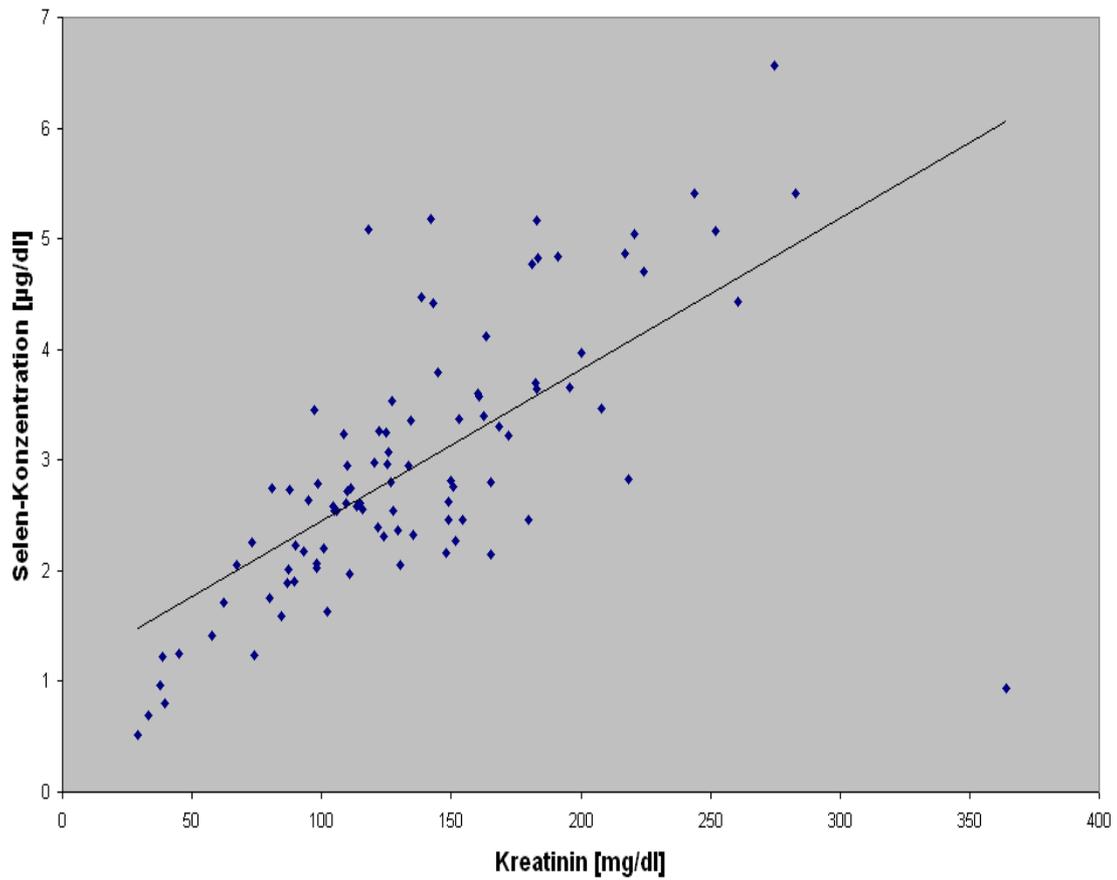


Abbildung 16: Kinderurin-Selenmittelwerte normiert auf Kreatinin, mit Ausreißer.

Mittelwerte der Se-Konzentrationen in Urin [µg/dl] in Abhängigkeit von Kreatinin [mg/dl].

Selen-Konzentrationen in Urin bezogen auf Kreatinin

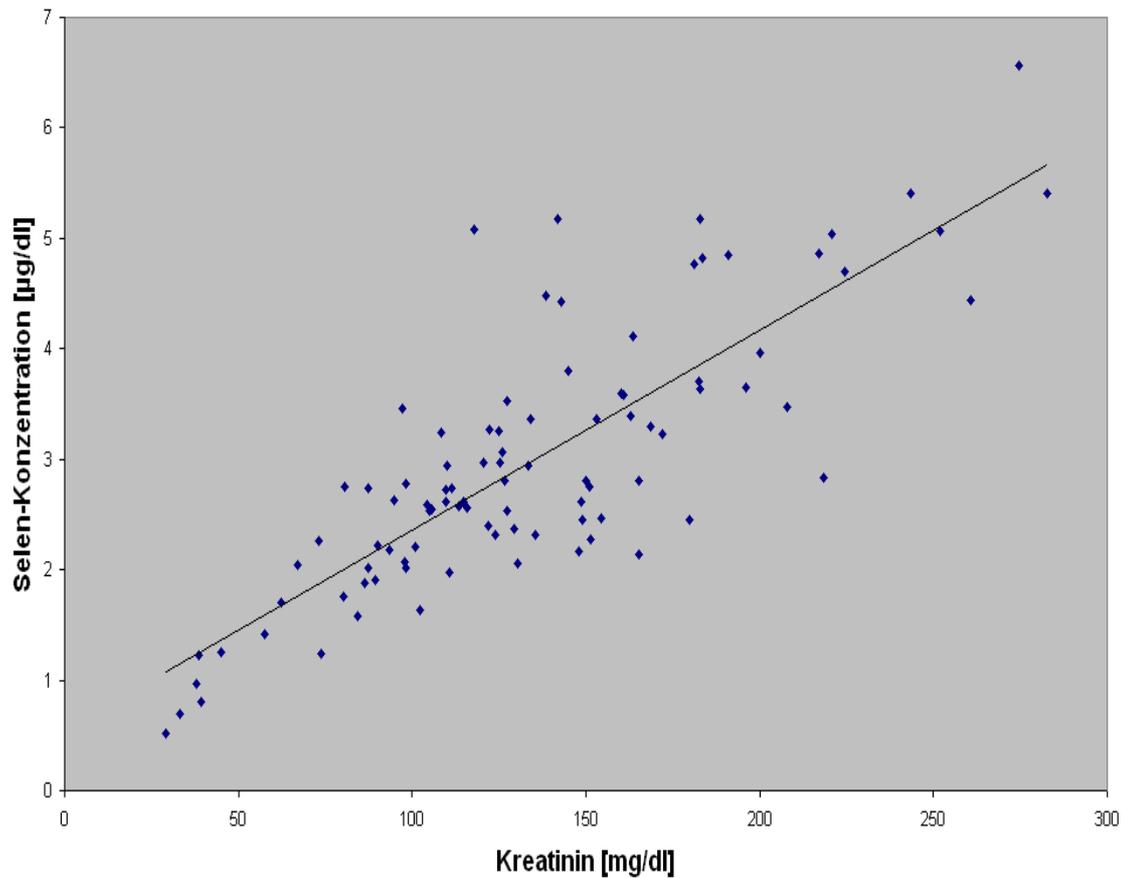


Abbildung 17: Kinderurin-Selenmittelwerte normiert auf Kreatinin, ohne Ausreißer.

Mittelwerte der Se-Konzentrationen in Urin [µg/dl] in Abhängigkeit von Kreatinin [mg/dl].

95 Selen-Messwerte aus Kinderurinen als Perzentilen geordnet

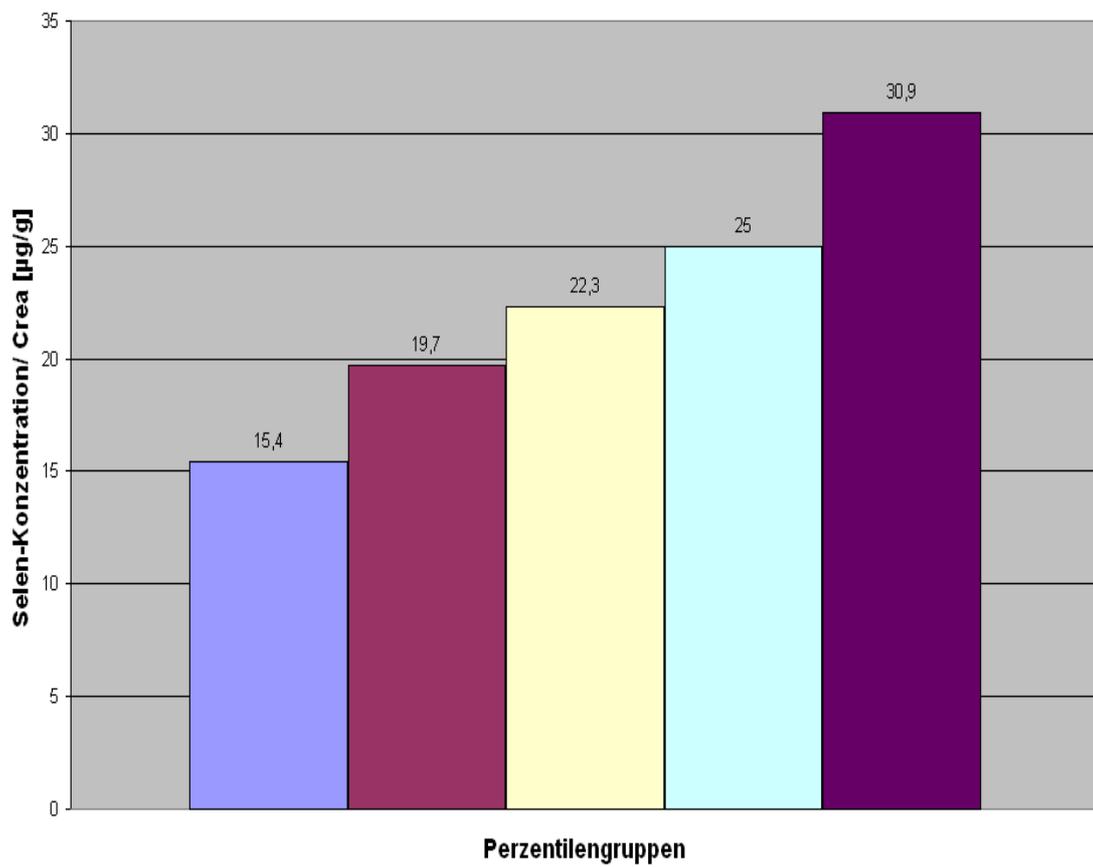


Abbildung 18: Perzentilengruppen unter Berücksichtigung der Kreatininwerte.

Selenkonzentration/ Kreatinin [$\mu\text{g/g}$] bei 5 Perzentilengruppen.

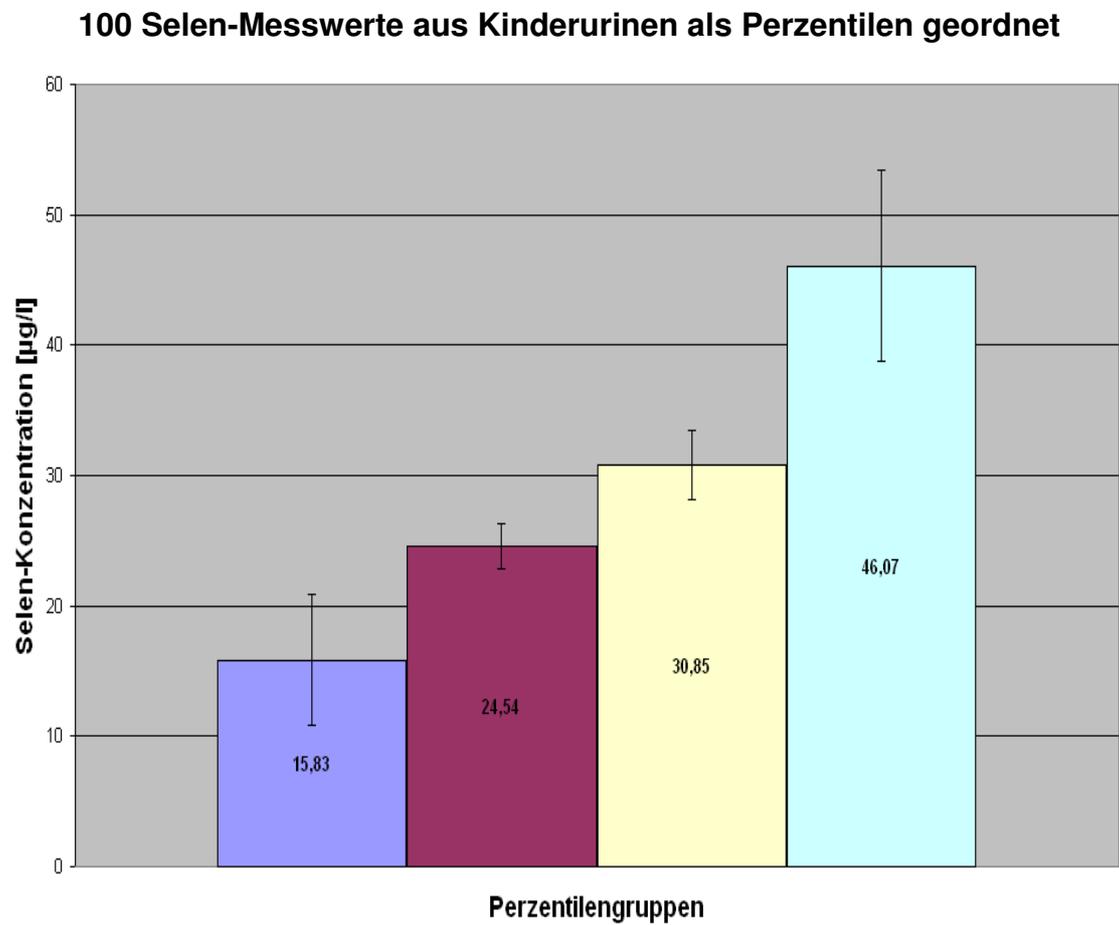


Abbildung 19: Perzentilengruppen mit Fehlerindikator ohne Berücksichtigung der Kreatininwerte.

Mittelwerte der Selenkonzentrationen [µg/l] bei 4 Perzentilengruppen.

Selen-Jod-Konzentrationsvergleich im Kinderurin

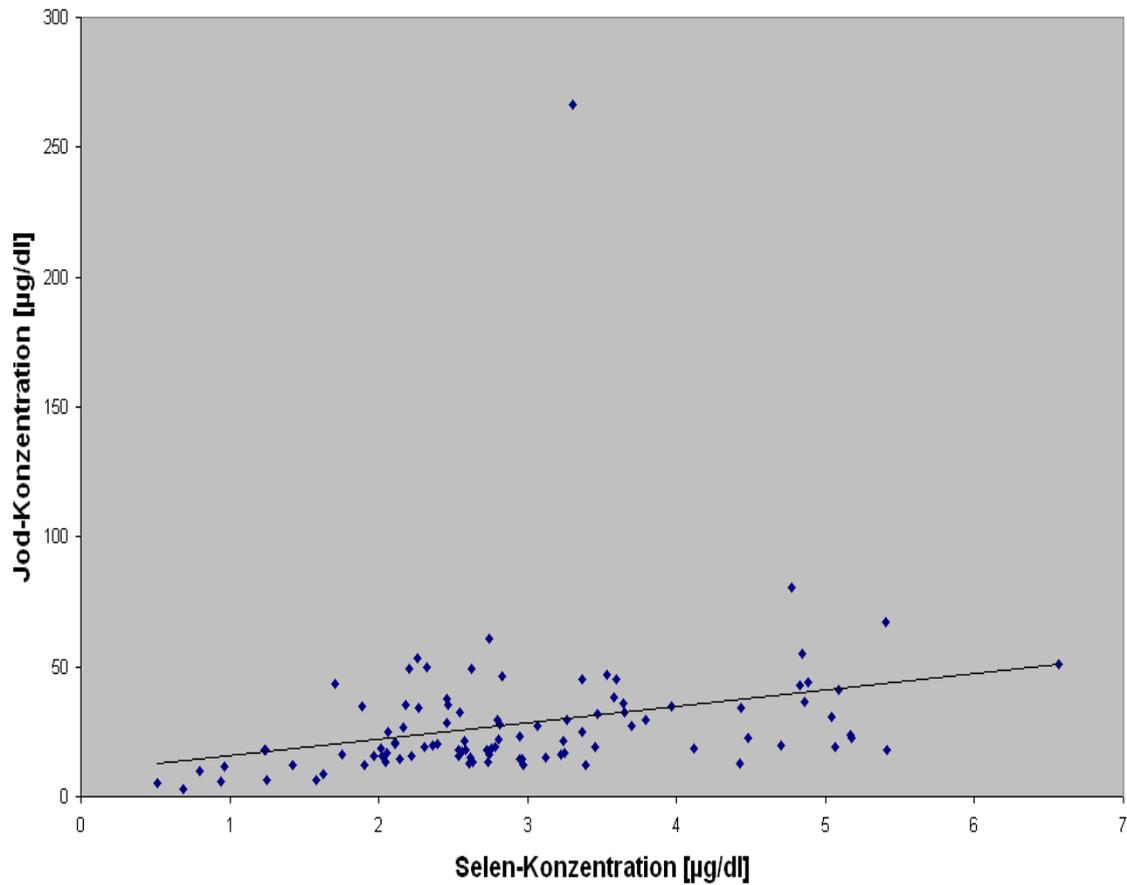


Abbildung 20: Selen- Jod- Korrelation mit Ausreißer.

Jod- Konz. [µg/dl] in Abhängigkeit der Se- Konz. [µg/dl].

Selen-Jod-Konzentrationsvergleich im Kinderurin

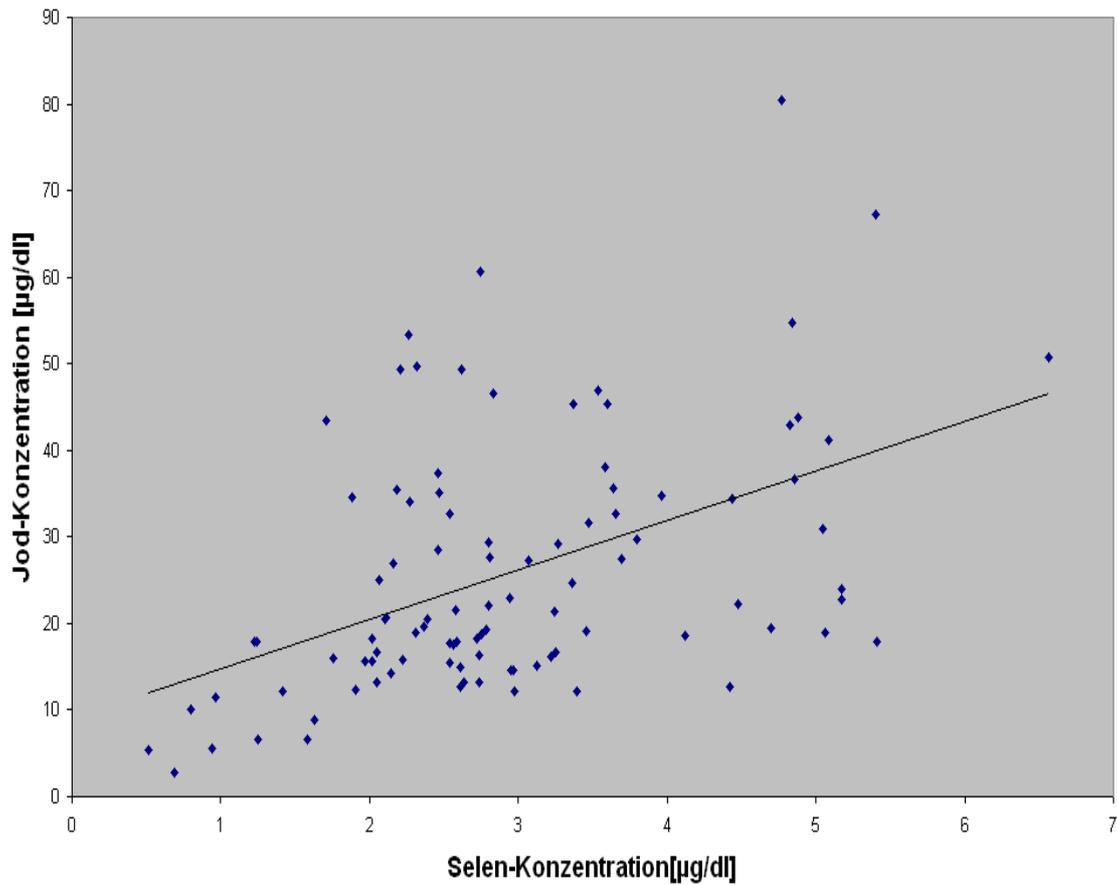


Abbildung 21: Selen- Jod- Korrelation ohne Ausreißer.

Jod- Konz. [µg/dl] in Abhängigkeit der Se- Konz. [µg/dl].

Man beachte die unterschiedliche Abszissen-Skalierung im Vergleich zu Abbildung 20.

Se (VI) in [$\mu\text{g/l}$] = Referenz	Wiederfindungsrate Selenocystein	Wiederfindungsrate Selenomethionin
10	108,3 %	101,2 %
25	97,8 %	96,9 %
50	101,7 %	101,1 %
75	100,7 %	101,8 %
100	101,3 %	102,6 %
	Mittelwert: 102 %	Mittelwert: 100,7 %

Tabelle 3: Wiederfindungsrate von Selenocystein und Selenomethionin. Als Referenz dienten Selen (VI) - Standardlösungen.

Nr.	Probe vom	Se-Best. am	Se (µg/l)	Se (µg/l)	Se (µg/l)	Jod (µg/l)	Crea (mg/dl)	Se-MW (µg/dl)
1	12.07.99	26.04.02	19,6	19,8	19,8	15,6	110,6	1,97
2	19.07.99	29.11.01	28,7	27,1	32,6	23	110	2,95
3	13.07.99	28.11.01	23,6	21,4	22,8	53,4	73,2	2,26
4	19.07.99	27.04.02	47,6	50	47,2	43	183,4	4,83
5	14.07.99	01.06.02	24	22	23,6	49,7	135,3	2,32
6	23.07.99	27.04.02	31,5	29,9	32,2	15,1	-	3,12
7	16.07.99	27.04.02	21,9	17,2	18,1	12,3	89,3	1,91
8	14.07.99	28.11.01	22,6	21,2	20,5	14,3	165,1	2,14
9	12.07.99	01.06.02	39,7	40,9	38,4	34,7	200,1	3,97
10	14.07.99	30.11.01	22,1	24	24,8	19,6	129,2	2,36
11	12.07.99	29.11.01	28,9	29,8	26,2	46,5	218,3	2,83
12	20.07.99	07.12.01	28,2	25,8	25	13,2	94,7	2,63
13	13.07.99	27.04.02	26,6	25,5	26,2	12,7	114,8	2,61
14	14.07.99	07.12.01	34,9	37,9	38,2	27,4	182,5	3,7
15	14.07.99	07.12.01	49,6	53	52,7	22,8	141,9	5,17
16	12.07.99	25.04.02	22,7	28,3	26,4	21,5	113,5	2,58
17	14.07.99	29.11.01	35,5	32,6	28,7	16,1	172,1	3,22
18	15.07.99	28.11.01	37,4	34,2	35,8	38,1	160,8	3,58
19	-	26.04.02	12,3	12,5	12,6	6,6	44,9	1,25
20	19.07.99	30.11.01	47,9	50,3	53,2	30,9	220,8	5,04
21	12.07.99	25.04.02	65,8	63,9	67,2	50,8	274,7	6,56
22	14.07.99	09.02.02	14,4	15,1	16,1	-	-	1,52
23	20.07.99	09.02.02	35,4	37,5	41	29,7	145	3,8
24	16.07.99	09.02.02	33,2	28,6	30,2	27,3	125,8	3,07
25	20.07.99	09.02.02	28,4	25,7	28,3	60,7	80,7	2,74
26	19.07.99	25.04.02	46,9	48	48,2	80,4	181,2	4,77
27	14.07.99	09.02.02	23,6	20,1	22,4	49,4	100,9	2,2
28	12.07.99	25.04.02	19,3	24,4	25,6	18,9	123,9	2,31

29	12.07.99	25.04.02	51,1	53,6	47,9	41,2	118	5,09
30	14.07.99	13.02.02	14,1	15,3	19,5	8,9	102,1	1,63
31	13.07.99	13.02.02	24,5	24,9	27,5	17,5	115,9	2,56
32	12.07.99	25.04.02	22,3	20,3	22,3	26,9	147,9	2,16
33	12.07.99	15.02.02	9,5	10,5	9	11,4	37,8	0,97
34	-	27.04.02	35,4	29,6	34	266,6	168,5	3,3
35	13.07.99	25.04.02	47,8	45,8	47,4	19,5	224,5	4,7
36	19.07.99	14.02.02	25,6	26,6	26,2	15	109,6	2,61
37	23.07.99	14.02.02	21,6	21,3	20,3	20,5	-	2,11
38	14.07.99	14.02.02	31,7	34,1	31,7	16,7	124,9	3,25
39	12.07.99	14.02.02	77,3	73,5	76,4	17,9	282,8	5,41
40	14.07.99	14.02.02	37,2	34,8	35,9	45,4	160,2	3,6
41	13.07.99	14.02.02	42,2	47,3	43,2	12,8	142,8	4,42
42	16.07.99	15.02.02	34,6	32,9	33,6	45,3	153	3,37
43	16.07.99	15.02.02	25,3	22,1	24,3	20,5	121,9	2,39
44	15.07.99	15.02.02	28,3	27,2	27,9	19,2	98,3	2,78
45	12.07.99	15.02.02	8,8	7,9	7,4	10,1	39,3	0,8
46	12.07.99	15.02.02	45	44,7	43,4	34,4	260,6	4,43
47	16.07.99	15.02.02	33,3	34,7	32,9	24,8	134,2	3,36
48	12.07.99	15.02.02	19,5	18,2	18,9	34,6	86,5	1,88
49	15.07.99	16.02.02	23,9	20,9	21,9	15,7	90,1	2,22
50	13.07.99	16.02.02	43	39,6	40	18,7	163,4	4,12
51	13.07.99	16.02.02	20,6	19,6	21,8	25,1	97,9	2,07
52	20.07.99	16.02.02	22,6	22,6	23	34	151,5	2,27
53	14.07.99	16.02.02	23,8	27,1	25,4	32,3	105,8	2,54
54	13.07.99	25.04.02	33,1	34,4	38,5	46,9	127,3	3,53
55	13.07.99	16.02.02	26,1	25,7	25,8	17,9	104,4	2,59
56	15.07.99	16.02.02	21,1	20,1	20,3	16,8	130,3	2,05
57	19.07.99	17.02.02	14,1	15,2	13,3	12,2	57,5	1,42
58	14.07.99	17.02.02	53,7	51,9	49,6	24	182,9	5,17
59	13.07.99	17.02.02	52,1	47,9	51,9	18,9	251,8	5,06

60	19.07.99	17.02.02	50,2	50,9	44,7	36,58	217	4,86
61	19.07.99	17.02.02	37	36,2	36,1	35,65	182,8	3,64
62	12.07.99	26.04.02	29,1	24,6	24,9	49,36	148,8	2,62
63	15.07.99	17.02.02	35,4	38	36,2	32,68	195,9	3,65
64	12.07.99	18.02.02	52,7	55,1	54,4	67,18	243,6	5,41
65	19.07.99	18.02.02	47,2	42,2	44,9	22,31	138,6	4,48
66	12.07.99	18.02.02	26,4	27,3	30,4	22,15	126,7	2,8
67	14.07.99	18.02.02	12,2	11,9	13,2	17,94	73,8	1,24
68	15.07.99	18.02.02	50,1	48,6	47,7	43,83	-	4,88
69	16.07.99	18.02.02	15,5	17,7	19,5	16,02	80,1	1,76
70	16.07.99	18.02.02	27,6	23	25,6	17,74	105	2,54
71	19.07.99	03.04.02	22,2	18,8	19,6	18,31	87,2	2,02
72	12.07.99	03.04.02	6,2	4,5	4,8	5,38	29	0,52
73	16.07.99	03.04.02	28	29,3	24,8	13,27	87,5	2,74
74	19.07.99	03.04.02	27,6	28,3	25,8	18,24	109,8	2,72
75	16.07.99	03.04.02	20,1	23,2	22,2	35,41	93,3	2,18
76	16.07.99	26.04.02	15,2	16,3	16,1	6,55	84,4	1,58
77	13.07.99	03.04.02	28,8	28,6	26,6	29,43	165,1	2,8
78	12.07.99	26.04.02	20	20	20,6	15,72	98,2	2,02
79	16.07.99	04.04.02	5,8	7,3	7,6	2,86	33,2	0,69
80	13.07.99	04.04.02	28,1	29,5	26,7	27,54	150	2,81
81	16.07.99	04.04.02	34,9	33,4	33,5	12,23	162,7	3,39
82	19.07.99	25.04.02	44,5	50	50,9	54,73	191,1	4,84
83	16.07.99	26.04.02	9,4	9,6	9,2	5,64	364	0,94
84	13.07.99	04.04.02	24,2	25,1	26,9	15,41	127,4	2,54
85	23.07.99	04.04.02	19,6	20,4	23,4	20,70	-	2,11
86	20.07.99	05.04.02	31,6	31,2	34,5	21,39	108,4	3,24
87	15.07.99	05.04.02	12,2	12,1	12,5	17,85	38,5	1,23
88	16.07.99	05.04.02	27,4	27,5	27,3	16,36	111,3	2,74
89	19.07.99	05.04.02	28,6	28,5	31,4	14,67	133,3	2,95
90	16.07.99	05.04.02	24,3	25,3	24,2	37,4	179,9	2,46

91	13.07.99	05.04.02	33	29,3	26,7	14,7	125,3	2,96
92	15.07.99	05.04.02	15,9	17,6	17,7	43,4	62,4	1,71
93	19.07.99	05.04.02	27,2	26,6	28,8	18,8	150,9	2,75
94	19.07.99	06.04.02	35,2	35,7	32,7	19,1	97,3	3,45
95	16.07.99	06.04.02	20,4	20,7	20,3	13,3	67,2	2,05
96	13.07.99	06.04.02	27,7	27,1	34,4	12,2	120,4	2,97
97	20.07.99	06.04.02	32,8	31,5	33,6	29,3	122,1	3,26
98	12.07.99	06.04.02	25,6	25,1	23,3	35,1	154,5	2,47
99	20.07.99	26.04.02	24,9	24,8	24	28,4	148,9	2,46
100	20.07.99	06.04.02	38,9	30,2	35	31,6	208	3,47

Tabelle 4: Kinderurindaten.

Meßergebnisse (µg/l) Selen	Mittelwerte (µg/l) Selen	Standardabweichung s (µg/l)
21,8 18,3	20	2,5
18,6 17,4	18	0,9
21,7 19	20,3	1,9
18,3 18,1	18,2	0,1
19,9 18,9	19,4	0,7

Tabelle 5: Standardabweichungen der Doppelmessungen des externen Referenzurins.

Salze/ Vielfaches der Selen-Normmittelwerte im Urin	2x	5x	10x	
KCl (g/l)	2,6	10,43	23,48	
KCl (mmol/l)	70	175	350	
NaCl (g/l)	4,39	17,53	39,44	
NaCl (mmol/l)	150	375	750	
KH ₂ PO ₄ (g/l)	1,42	5,68	12,77	
KH ₂ PO ₄ (mmol/l)	20	50	100	
Vol% von 5g Albumin	1%	2%	5%	10%
	50 mg	100 mg	250 mg	500 mg

Tabelle 6: Störionen und Albumin.

6.2 Abkürzungsverzeichnis, Definitionen

s:

Standardabweichung

Die Standardabweichung s läßt sich über die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert $(x_i - \bar{x})$ berechnen:

$$s = \sqrt{\frac{1}{(n-1)}} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Kenngröße s ist nur dann ein zuverlässiger Schätzwert für die Streuung der Einzelwerte, wenn diejenigen Einzelwerte, die durch systematische Abweichungen bedingt sind („Ausreißer“), entfernt wurden. Die Einzelwerte dürfen keinem Trend folgen.

Variationskoeffizient:

Als Maß für die relative zufällige Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert wird der Variationskoeffizient v angegeben. Dieser ist definiert als die Standardabweichung s bezogen auf den arithmetischen Mittelwert \bar{x} :

$$v = \frac{s}{\bar{x}}$$

Die Angabe von v bei verschiedenen Mess- bzw. Analyseverfahren gestattet einen Vergleich der „Güte“, was durch bloße Angabe der Standardabweichung s nicht möglich ist. [33]

CI:

confidence interval for the mean,
Konfidenzintervall des Mittelwertes

SEM:

standard error of the mean,
Standardabweichung des Mittelwertes

$$\frac{s}{\sqrt{x}}$$

 μ :

Mittelwert als Lageparameter in einer Gauß-Kurve, um den die Standardabweichung als Parameter für die Charakterisierung der Streuung dargestellt wird.

MW:

Mittelwert

SIRS:

systemic inflammatory response syndrome,
Systemisches Inflammationssyndrom

AAS:

Atomabsorptionsspektrometrie

NAA:

Neutronenaktivierungsanalyse

7 Literaturverzeichnis

- 1 Köhrle, J.:
The trace element selenium and the thyroid gland.
Biochimie 1999; 81: 527-533.
- 2 Köhrle, J., Brigelius-Flohé, R., Böck, A., Gärtner, R., Meyer, O., Flohé, L.:
Selenium in biology: facts and medical perspectives.
Biol. Chem. 2000; 381: 849-864.
- 3 Schwartz, K., Foltz, C. M.:
Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.
J. Am. Chem. Soc. 1957; 79: 3292-3293.
- 4 Mörk, H., Al-Taie, O., Dreher, I., Karvar, S., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.:
Expression von Selenoproteinen im Gastrointestinaltrakt-Implikationen für die Karzinogenese.
InFo Onkologie 1999; 2: 12-20
- 5 Shiobara, Y., Tamami, Y., Kazuo, T. S.:
Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, & urine.
Toxicology and applied pharmacology 1998; 152: 302-314.
- 6 Sabé, R., Rubio, R., García-Beltrán, L.:
Study of preanalytical conditions for selenium determination in urine.
Clinical Biochemistry 2001; 34: 551-555.
- 7 Sanz-Alegos, M., Díaz Romero C.:
Urinary selenium concentrations.
Clin. Chem. 1993; 39: 2040-52.

- 8 Dauchy, X., Potin-Gautier, M., Astruc, A., Astruc, M.:
Analytical methods for the speciation of selenium compounds: a review.
Fresenius J, Anal. Chem. 1994; 384: 792-805.
- 9 Thomson, C. D., Smith, T. E., Butler, K. A., Packer, M. A.:
An evaluation of urinary measures of iodine and selenium status.
J. Trace Elements med. Biol. 1996; 10: 214-222.
- 10 Yang, F. Y., Lin, Z. H., Li, S. G., Guo, B. Q., Yin, Y. S.:
Keshan disease-an endemic mitochondrial cardiomyopathy in China.
J. Trace Elements 1988; 2: 157-163.
- 11 Moreno-Reyes, R., Suetens, C., Mathieu, F., Begaux, F., Zhu, D., Rivera, M. T., Boelaert, M., Nève, J., Perlmutter, N., Vanderpas, J.:
Kashin-Beck Osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status.
The New England Journal of Medicine 1998; 339: 1112-1120.
- 12 Bach, von K., Haas, H. J., Mathieu, A.:
Die Bestimmung des Selens in Nahrungsmitteln.
VitaMinSpur 1990; 5: 161-166.
- 13 Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N.:
How selenium has altered our understanding of the genetic code.
Molecular And Cellular Biology 2002; 22: 3565-3576.
- 14 Mörk, H., Lex, B., Scheurlen, M., Dreher, I., Schütze, N., Köhrle, J., Jakob, F.:
Expression pattern of gastrointestinal selenoprotein-targets for selenium supplementation.
Nutrition And Cancer 1998; 32(2): 64-70
- 15 Burk, R. F., Hill, K. E.:
Orphan selenoproteins.
Bio Essays 1999; 21: 231-237

- 16 Schütze, N., Dreher, J, Jakob, F., Köhrle, J.:
Neue menschliche Selenoproteine: Selenoprotein P und Thioredoxin-Reduktase.
J Lab Med 1998; 22(10): 539-544.
- 17 Rayman, M. P.:
Dietary selenium: time to act.
BMJ 1997; 314(7078): 387.
- 18 Menkes, M., S., Comstock, G., W., Vuilleumier, J., P., Helsing, K., J., Rider, A., A., Brookmeyer, R.:
Serum beta-carotene, vitamins A and E, selenium, and the risk of lung cancer.
The New England Journal of Medicine 1986; 315:1250-1254.
- 19 Zimmermann, T., Albrecht, S., Hanke, S., von Gagern, G.:
Selen in der Intensivmedizin.
Chir Gastroenterol 2000; 16: 54-57.
- 20 Litov, R., E., Combs, G., F., jr.:
Selenium in pediatric nutrition.
Pediatrics 1991; 87: 339-351.
- 21 Kvicala, J., Zamrazil, V., Soutorová, M., Tomiska, F.:
Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region.
Analyst 1995; 120: 959-965.
- 22 Winnefeld, K., Dawczynski, H., Bosseckert, H., Kauf, E., Thiele, R., Peiker, G., Weiland, G.:
Serum- and whole blood selenium in certain diseases.
Trace Elements in Medicine 1993; 10(2): 90-92.

- 23 Siegers, C.-P., Richter, B., Pentz, R.:
Selensubstitution bei Selenmangel und Folgeerkrankungen.
Deutsches Ärzteblatt 1994; 91(44):3032-3036.
- 24 Gebhardt, A., Mauch, E., Kornhuber, H.:
Bestimmung von Cu, Zn, Se und Hg in Vollblut von Patienten mit MS.
GIT Labor-Medizin 1994; 17: 155-161.
- 25 Sheehan, T., M., T., Halls, D., J.:
Measurement of selenium in clinical specimens.
Ann Clin Biochem 1999; 36: 301-315.
- 26 Harrison, I., Littlejohn, D., Fell, G., S.:
Distribution of selenium in human blood plasma and serum.
Analyst 1996; 121: 189-194.
- 27 Koh, T., S., Benson, T., H.:
Critical re-appraisal of fluorimetric method for determination of selenium
in biological materials.
Assoc off Anal Chem 1982; 66: 918-926.
- 28 Sheehan, T., M., T., Gao, M.:
Simplified fluorimetric assay of total selenium in plasma and urine.
Clin. Chem. 1990; 36: 2124-2126.
- 29 Stober, C., N.:
Spektrofluorimetrische Selenbestimmung in biologischen Proben:
Entwicklung und Validierung der Methode.
Inaugural-Dissertation 2003, Bayerische Julius-Maximilians-Universität
Würzburg.
- 30 Combs, G., F., Gray, W., P.:
Chemopreventive agents: Selenium.
Pharmacol. Ther. 1998; 79: 179-192.

- 31 Combs, G., F., Clark, L., C., Turubull, B., W.:
Reduction of cancer risk with an oral supplement of selenium.
Biomed. Environ. Sci 1997; 10: 227-234.
- 32 Knekt, P., Marniemi, J., Teppo, L., Heliövaara, M., Aromaa, A.:
Is low selenium status a risk factor for lung cancer?
Am. J. Epidemiol. 1998; 148: 975-982.
- 33 Küster, Thiel:
Rechentafeln für die Chemische Analytik.
Walter de Gruyter; 1993.
- 34 Otto, M.:
Analytische Chemie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim; 1995.
- 35 Lentner, C.:
Wissenschaftliche Tabellen Geigy.
CIBA-GEIGY AG, Basel; 1977, 8. Auflage.
- 36 Tsukahara, H., Deguchi, Y., Miura, M., Hata, K., Hori, C., Hiraoka, M.,
Kusaka, Y., Sudo, M.:
Selenium status and skeletal tissue metabolism in young infants.
Eur. J. Pediatr. 1996; 155: 148-9.
- 37 Jochum, F., Terwolbeck, K., Meinhold, H., Behne, D., Menzel, H.,
Lombeck, I.:
Effects of a low selenium state in patients with phenylketonuria.
Acta Paediatr 1997; 86: 775-7.
- 38 Konno, K., Miura, K., Kumagai, M., Murakami, S.:
Clinical evaluation of the iodide/ creatinine ratio of casual urine samples
as an index of daily iodide excretion in a population study.
Endocrine J., 1993; 40: 163-169.

- 39 Gibson, R. S.:
Principles of nutritional assessment.
Oxford University Press. Inc. New York 1990.
- 40 Tinggi, U.:
Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review.
ScienceDirect, Toxicology letters 2003, 137: 103-110.
- 41 Barceloux, D., G.:
Selenium.
J Toxicol Clin Toxicol 1999; 37(2): 145-72.
- 42 Schrauzer, G., N.:
Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety.
J. Am. Coll. Nutr. 2001; 20(1): 1-4.
- 43 Janghorbani, M., Xia, Y., Ha, P., Whanger, P., D., Butler, J., Olesik, J., Daniels, L.:
Metabolism of selenite in men with widely varying selenium status.
J. American College of Nutrition 1999; 18(5): 462-469.
- 44 Robinson, M., F., Thomson, C., D., Jenkinson, C., P., Luzhen, G., Whanger, P., D.:
Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: urinary excretion by New Zealand women.
The New England Journal of Medicine 1997; 77(4): 551-63.
- 45 Thayer, J., S.:
Review: Biological methylation of less-studied elements.
Applied Organometallic Chemistry 2002; 16(12): 677-691.
- 46 Jiang, C., Jiang, W., Ip, C, Ganther, H., Lu, J.:
Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake.
Molecular Carcinogenesis 1999; 26(4): 213-225.

- 47 Hadrzynski, C.:
Diabetes and trace elements.
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 1999; 12(4):
367-374.
- 48 Burk, R., F.:
Commentary: Selenium.
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2001; 14:
241-243.
- 49 National Research Council:
Recommended Dietary Allowances.
Washington DC: National Academy of Sciences 1980; 137-178.
- 50 Güvenç, H., Karatas, F., Güvenç, M., Kunç, S., Aygün A., D., Bektas, S.:
Low levels of selenium in mothers and their newborns in pregnancies
with a neural tube defect.
Pediatrics 1995; 95: 879-882.
- 51 Güvenç, M., Güvenç, H., Karatas, F., Aygün, A., D., Bektas, S.:
Low levels of selenium in miscarriage.
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2002; 15:
97-101.
- 52 Whanger, P.:
Commentary: Selenium
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2001; 14: 221-
226.
- 53 van Rij, A., M., Thomson, C., D., McKenzie, J., M., Robinson, M., F.:
Selenium deficiency in total parenteral nutrition.
Am J Clin Nutr 1979; 32: 2076-2085.

- 54 Dworkin B., M.:
Selenium deficiency in HIV infection and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).
Chem Biol Interact 1994; 91: 181-186.
- 55 Mony, M.-C., Larras-Regard, E.:
Renal bioavailability of selenium after supplementation with different forms of selenium: ion probe and mass spectrometry study.
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2000; 13: 367-380.
- 56 Edmonds, J., S., Morita, M.:
Review: The identification of selenium species in biological samples.
Appl. Organometal. Chem. 2000; 14: 133-145.
- 57 Bartfay, W., Hou, D., Lehotay, D., C., Bartfay, E., Luo, X., Liu, P.:
Cardioprotective effects of selenium and morin hydrate in a murine model of chronic iron overload.
The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 2000; 13: 285-297.
- 58 Rayman, M., P.:
Review: The importance of selenium to human health.
Lancet 2000; 356: 233-241.
- 59 Janghorbani, M., Xia, Y., Ha, P., Whanger, P. D., Butler, J. A., Olesik, J. W., Daniels, L.:
Quantitative significance of measuring trimethylselenonium in urine for assessing chronically high intakes of selenium in human subjects.
British Journal of Nutrition 1999; 82(4): 291-297.
- 60 Combs, G., F., Jr., Combs, S., B.:
The role of selenium in nutrition.
Academic Press, Inc., Orlando, Florida 32887, 1986, S. 187 ff.
ISBN 0-12-183405-6.

- 61 Dickson, R. C., Tomlinson, R. H.:
Selenium in blood and human tissues.
Clin. Chim. Acta 1967; 16(2): 311-321.
- 62 Rendl, J., Juhran, N., Reiners, C.:
Thyroid volumes and the urinary iodine in German school children.
Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109(1): 8-12.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Josef Köhrle** für die Überlassung des Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und die schnelle Durchsicht der Arbeit danken.

Ich bin sehr froh, dass Herr Prof. Köhrle mich nach seiner Berufung nach Berlin weiterhin so gut unterstützt hat, immer umgehend auf meine E-Mails antwortete und mir das Gefühl gab, trotz der weiten Entfernung nicht vergessen zu sein.

Nachdem der Lehrauftrag von Herrn Prof. Köhrle Ende 2004 in Würzburg auslief, war ich für das Promotionsverfahren auf einen neuen Doktorvater angewiesen. Ich möchte Herrn **Prof. Dr. F. Jakob** danken, der mich wie selbstverständlich als Doktorandin adoptierte.

Für die Übernahme des Koreferats und die Korrekturvorschläge möchte ich Herrn **Prof. Dr. C. Reiners**, Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin danken.

Ich möchte mich bei Frau **Dr. rer. nat. B. Mentrup** für die Unterstützung bei den Anfangsschwierigkeiten im Labor ganz herzlich bedanken.

Besonderer Dank gebührt Herrn **Dirk Schiller** aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Einführung in die Methodik danke ich Frau **C. Stober** und den **medizinisch-technischen Assistentinnen**.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Name: Ute Sieprath
Geburtsdatum: 13.11.1978
Geburtsort: Aachen

Schulbildung: 09/1985 – 08/1989
Grundschule Neu-Ulm
09/1989 – 08/1998
Bertha-von-Suttner-Gymnasium Neu-Ulm
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (1,2)

Hochschulbildung: 10/1998 - 05/2005
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08-09/2000
Ärztliche Vorprüfung (1,6)
08/2001
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)
03/2004
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)
05/2005
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)

Praktisches Jahr:
04-08/2004
Schwabinger Krankenhaus, Nephrologie München
08-11/2004
Universitätsspital, Chirurgie Zürich, Schweiz
11/04-03/05
Universitätsklinikum, Neurologie Würzburg

Pflegepraktika: 08/1998
Universitätsklinikum, Chirurgische Wachstation Ulm
03/1999
Universitätsklinikum, Kinderchirurgie Ulm

Famulaturen:	04/2001 Donauklinik , Innere Medizin	Neu-Ulm
	03/2002 Krankenhaus der Barmherzigen Brüder , Anästhesie	München
	08/2002 Prof. Dr.med. Dr.dent. Feifel , Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie	Aachen
	09/2002 Dr. med. Strunz , Pädiatrie	Neu-Ulm
	02-03/2003 Royal Children´s Hospital , Pädiatrie	Brisbane, Australien
	Berufliche Nebentätigkeit:	09/2000-12/2003 Universitätsklinikum , Schlaflabor, Nachtwache
Promotion:	12/2001 Vortrag auf der 17. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsen-Forschung	Lübeck
	11/2002 Postervorstellung, Promomed-Kongress	Würzburg

Würzburg, Juni 2005

Ute Sieprath