

Aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. J. Köhrle

**Spektrofluorimetrische Selenbestimmung in biologischen
Proben:
Entwicklung und Validierung der Methode**

Inaugural - Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Christina Nicole Stober
aus Karlsruhe

Würzburg, Mai 2003

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J. Köhrle
Koreferent: Prof. Dr. med. C. Wanner
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i> _____	1
1.1	Indikationen zur Selenbestimmung _____	1
1.2	Verfahren zur Selenbestimmung _____	3
1.3	Zielsetzung _____	4
2	<i>Material</i> _____	5
2.1	Geräte _____	5
2.2	Chemikalien _____	6
2.3	Lösungen _____	7
2.4	Poolserum _____	9
2.5	Serumproben von Dialysepatienten _____	9
3	<i>Methoden</i> _____	10
3.1	Ausgangsverfahren _____	10
3.2	Optimierungsversuche _____	12
3.2.1	Aufschluss der Proben _____	12
3.2.2	Herstellen der DAN-Lösung _____	13
3.2.3	Optimierung der Verdünnung _____	14
3.2.4	Optimierung des pH-Werts _____	14
3.2.5	Optimierung der Piazselenol-Extraktion _____	15
3.2.6	Lichtempfindlichkeit des Piazselenols _____	16
3.2.7	Integrationszeit bei der spektrofluorimetrischen Bestimmung _____	16
3.3	Die optimierte Methode _____	16
3.3.1	Aufschluss der Proben _____	16
3.3.2	Reduktion von Se(VI) zu Se(IV) _____	17

3.3.3	Bildung des Se-DAN-Piazselenols	17
3.3.4	Extraktion des Piazselenols	18
3.3.5	Spektrofluorimetrische Messung	18
3.4	Validierung der optimierten Methode	19
3.4.1	Wiederfindungsraten	19
3.4.2	Fähigkeit der optimierten Methode, Selen aus organischen Verbindungen frei zu setzten	19
3.4.3	Validierung durch standardisiertes Referenz-Serum	20
3.4.4	Präzisionsprofile	20
3.4.5	Nachweisgrenze	20
3.4.6	Vergleich der optimierten spektrofluorimetrischen Methode zur AAS und NAA	21
4	Ergebnisse und Diskussion	22
4.1	Optimierungsversuche	22
4.1.1	Aufschluss der Proben	22
4.1.2	Herstellen der DAN-Lösung	23
4.1.3	Optimierung der Verdünnung	29
4.1.4	Einfluss des pH-Wertes auf die Piazselenolbildung	30
4.1.5	Optimierung der Piazselenol-Extraktion	32
4.1.6	Lichtempfindlichkeit des Piazselenols	37
4.1.7	Integrationszeit bei der spektrofluorimetrischen Messung	38
4.2	Validierung	39
4.2.1	Wiederfindungsraten	39
4.2.2	Fähigkeit der optimierten Methode, Selen aus organischen Verbindungen frei zu setzten	41
4.2.3	Validierung durch standardisiertes Referenz-Serum	42
4.2.4	Präzisionsprofile	44
4.2.5	Nachweisgrenze	45
4.2.6	Vergleich der optimierten spektrofluorimetrischen Methode zur AAS und NAA	46

5	<i>Zusammenfassung</i>	50
6	<i>Ausblick</i>	52
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	53

1 Einleitung

1.1 Indikationen zur Selenbestimmung

Das Spurenelement Selen, benannt nach der griechischen Göttin des Mondes, wurde 1817 von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius entdeckt. Erst 1957 jedoch, erkannten Schwarz und Foltz [1], dass das bis dahin nur als Gift betrachtete Selen ein lebensnotwendiger Teil unseres Organismus ist. Diese Entdeckung initiierte wachsendes Interesse an der Erforschung der vielfältigen Funktionen des Selens im menschlichen Körper.

Der größte Anteil des mit der Nahrung aufgenommenen Selens wird im Körper in Proteine eingebaut. Dabei unterscheidet man selenocysteinhaltige Proteine, die Selen selektiv einbauen (s.u.) und selenomethioninhaltige Proteine, die nicht selenspezifisch sind. Vielmehr bauen letztere, je nach Angebot, Methionin oder Selenomethionin ein. Für die Selenocystein-Synthese ist eine Seryl-beladene tRNA das Schlüsselement. Der Einbau von Selenocystein in Proteine wird dann von einer Selenocystein-tRNA-Synthase katalysiert. Endprodukte des Selens im Organismus sind Di- und Trimethylselenide, die vom Menschen abgeatmet bzw. mit dem Urin ausgeschieden werden.

Da circa 80 % des Selens selektiv in die selenocysteinhaltigen Proteine eingebaut wird, schenkte ihnen die Selenforschung in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit. Knapp 20 verschiedene selenocysteinhaltige Proteine wurden bereits isoliert und man vermutet, dass im menschlichen Organismus noch bis zu 30 weitere vorhanden sind. Die bis dato bekannten Funktionen dieser Proteine sind äußerst vielfältig:

Gluthationperoxidasen bauen H_2O_2 und andere Lipidperoxide ab und verhindern damit die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, sowie des Hydroxyradikals [2 - 8]. Thioredoxin-Reduktasen regulieren die Funktion von Transkriptionsfaktoren und Zellkernrezeptoren und stellen reduziertes Thioredoxin für die DNA-Synthese zur Verfügung [9 - 12]. Auch die Synthese und der Stoffwechsel von

Schilddrüsenhormonen werden von Selenoproteinen, den Deiodasen, kontrolliert [13 - 18]. Für die männliche Fertilität ist Selen ebenfalls von großer Bedeutung, da ein selenocysteinhaltiges Protein die Struktur der Mitochondrienkapsel von Spermien wesentlich mitbestimmt [19 - 21]. Bei Selenmangel sind Spermien weniger beweglich und abnorm geformt [22]. Besonderes Interesse erlangten die Selenoproteine in neuerer Zeit dadurch, dass ihnen antikarzinogene [4, 12, 23 - 30], immunmodulierende [31, 32] und anti-atherogene [33, 34] Wirkungen zugeschrieben werden. Die aufgeführten Beispiele repräsentieren nur einige der bis heute bekannte Funktionen der Selenoproteine und die Hinweise aus der Forschung für weitere wichtige Funktionen von Selenoproteinen sind vielversprechend.

Selenoproteine können nur synthetisiert werden, wenn dem Körper ausreichend Selen zur Verfügung steht. Ein Erwachsener benötigt täglich etwa eine Menge von 70 µg Selen; eine dauerhafte Selenzufuhr von weniger als 20 µg täglich führt zum Selenmangel. Verschiedene Krankheitsbilder wurden mit Selenmangelzuständen in Verbindung gebracht, wie z.B. dem Keshan-Syndrom (eine Kardiomyopathie) und der Osteoarthropathie Kashin-Beck [35 - 38]. Beide sind in chinesischen Gebieten endemischen Selenmangels weit verbreitet. Signifikant erniedrigte Selen-Plasmaspiegel fanden sich auch bei Patienten mit Morbus Crohn, Phenylketonurie, rheumatoider Arthritis, Sepsis, parenteral ernährten oder chronisch dialysepflichtigen Patienten [39 - 45]. Der genaue Zusammenhang zwischen der Krankheit und einem erniedrigtem Selenspiegel ist in den einzelnen Fällen noch nicht vollständig geklärt. Doch die vielfältigen Funktionen der Selenoproteine und die gesundheitlichen Auswirkungen von Selenmangelzuständen weisen darauf hin, dass der Selenspiegel bei Patienten mit den genannten Erkrankungen überwacht und Selen gegebenenfalls substituiert werden sollte [6, 7, 39, 46 - 51].

Nicht nur für die klinische Selenbestimmung, sondern auch für die weitere Erforschung der Funktion von Selen und Selenoproteinen im menschlichen Organismus bedarf es einer genauen und verlässlichen Methode zum quantitativen Selennachweis im Plasma, Serum, Urin, in Geweben und Nahrungsmitteln. Für die Anwendung im klinischen Alltag sollte eine solche Methode genau, gut reproduzierbar und möglichst

kostengünstig sein. Weitere Anforderungen an die Methode sind ein kleines Probenvolumen zur Selenbestimmung und ein möglichst geringer zeitlicher Aufwand.

1.2 Verfahren zur Selenbestimmung

Die ersten Verfahren zur Selenbestimmung wurden bereits vor 50 Jahren entwickelt, benötigten jedoch große Probenvolumina, da sie auf Titrationsverfahren basierten. Die jüngsten Methoden zur quantitativen Selenbestimmung sind die Neutronenaktivierungs-Analyse (NAA), verschiedene Verfahren der Atomabsorptions-Spektrometrie (AAS), die ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) und die Spektrofluorimetrie.

Die NAA stellt eine präzise Referenzmethode dar, kann jedoch im klinischen Alltag nicht angewendet werden, da zur Analyse eine Neutronenquelle, intensive Bestrahlung der zu bestimmenden Probe und eine entsprechend lange Abklingzeit nötig sind [52].

Die Verfahren der AAS finden derzeit die häufigste Anwendung im klinischen Alltag. Nachteile dieser Verfahren sind allerdings die relativ hohen Kosten und ein großer zeitlicher Aufwand. Außerdem ist die Atomabsorptions-Spektrometrie anscheinend nicht in der Lage, alle Formen des Elementes Selen zu detektieren [53].

Die ICP-MS ist zwar eine sehr sensitive analytische Methode und benötigt nur geringe Probenvolumina [54], doch die zur Analyse notwendigen Instrumente und Materialien sind sehr teuer [55].

Die Spektrofluorimetrie, eines der ältesten Verfahren zur quantitativen Selenbestimmung, wurde 1982 von Koh und Benson [56] beschrieben. Die Methode rückte im Rahmen der Entwicklung der Atomabsorptions-Spektrometrie jedoch etwas in den Hintergrund. 1990 griffen Sheehan und Gao [57] das von Koh und Benson beschriebene Verfahren erneut auf und modifizierten es zur Bestimmung des

Selengehalts pädiatrischer Proben. Dennoch hat die Spektrofluorimetrie bislang keinen nennenswerten Eingang in den klinischen Alltag gefunden.

1.3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die von Koh und Benson [56] beschriebene Vorgehensweise zur quantitativen Selenbestimmung so zu optimieren, zu vereinfachen und zu validieren, dass ein genaues und kostengünstiges standardisiertes Messverfahren für die klinische Routineanalytik resultiert.

2 Material

2.1 Geräte und Materialien:

In Tabelle 1 sind sämtliche für die Versuche eingesetzten Geräte und Materialien, die jeweiligen Hersteller und, wo erforderlich, die entsprechenden deutschen Vertriebe aufgeführt.

Tabelle 1: Alphabetisches Herstellerverzeichnis der eingesetzten Geräte und Materialien.

Gerät / Material	Hersteller und Vertrieb in Deutschland
Reaktionsröhrchen (20 x 150 mm)	Wheaton, Milleville 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)	Carl Roth GmbH & Co. D-76185 Karlsruhe, Art. Nr.: 8126.1
Filter	CS-Chromatographie Service GmbH, D-52379 Langerwehe
Gamma counter Riastar	Canberra Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA.
Röhrchen (4 mL, 75 x 11,5 mm)	Sarstedt AG & Co., D-51588 Nümbrecht
Heizblock VLM 1.0	VLM GmbH, D-33818 Leopoldshöhe, Best. Nr.: V.617.562.220
Heizplatte MR 2002	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer IKA Combimag Reo	Janke & Kunkel, IKA Werk, Staufen
Mixer Vibrofix VF 1 Electronic	Janke & Kunkel, IKA Werk, Staufen
Pasteur Pipetten , 230 mm	Eppendorf Reference

5 ml Pipettor und Combitips plus (50 mL)	Eppendorf Reference
Scale Sartorius Basic	Sartorius AG, Göttingen
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

2.2 Chemikalien:

In Tabelle 2 sind alle eingesetzten Chemikalien mit Reinheitsgrad und die entsprechenden Hersteller bzw. Vertriebe in Deutschland aufgeführt.

Tabelle 2: Qualität und Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Qualität	Hersteller und Vertrieb in Deutschland
2,3-Diaminonaphthalin (=DAN)	Minimum 95 %	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA Deutschland: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim, Art. Nr.: D-2757
6-Methyl- ⁷⁵ Se-Selenomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -ol, <i>Scintadren</i>		Amersham Buchler, Braunschweig, Bestell-Nr.: SC 8 PG
Referenzseren: a.) Standardisiertes Serum, Seronorm	Konzentration: 80 μ g/L	SERO AS, Asker, Norway Deutschland: Synlab diagnostic e.K., D-68161 Mannheim, Art. Nr.: 201 405

b.) Selen ICP Standard	Konzentration: 10 000 µg/L	Radian International, Austin, Texas, USA Deutschland: Promochem GmbH, D-46469, Katalog Nr.: ICS-004H, ICS-004L
Cyclohexan	99 % (HPLC grade)	Sigma-Aldrich Chemie, Katalog Nr.: 27,062-8
Toluol	99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie, Katalog Nr.: 89676
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 %	Fluka Chemical
Selen-DL-Methionin	99 %	Sigma-Aldrich Chemie
Natriumselenit	99 %	Sigma-Aldrich Chemie
Selenharnstoff	99,9 %	Sigma-Aldrich Chemie

2.3 Lösungen:

Säuremischung zum Aufschluss der Proben:

16 M Salpetersäure (HNO₃) und 11,6 M Perchlorsäure (HClO₄) wurden in einem Volumenverhältnis von 4 + 1 gemischt.

EDTA-Lösung:

0,9306 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ wurden unter Verwendung eines Magnetrührers in 1 L vollentsalztem Wasser gelöst.

DAN-Lösung:

In einem 50 mL Kolben wurden 50 mg 2,3-Diaminonaphthalin in 50 mL 0,1 M Salzsäure gelöst. Zur Beschleunigung des Vorgangs wurde der Kolben mit den Chemikalien für 2 Minuten in ein Ultraschallbad und anschließend 5 Minuten lang in ein 60 °C heißes Wasserbad gestellt. Zum Abkühlen der Lösung wurde der Kolben erneut für 5 Minuten in das Ultraschallbad gestellt.

Die abgekühlte DAN-Salzsäure-Lösung wurde in einen Scheidetrichter gegeben, 12 mL Cyclohexan hinzugefügt und 60 Sekunden lang kräftig geschüttelt. In den darauffolgenden 3 Minuten erfolgte die Trennung der beiden Phasen. Anschließend wurde die untere, wässrige Phase (die das protonierte DAN enthält) in einen sauberen Scheidetrichter abgelassen; die obere Cyclohexan-Phase wurde verworfen. Mit der so gewonnenen wässrigen Phase wurde die beschriebene Prozedur erneut zwei Mal durchgeführt. Die nach der dritten Behandlung mit Cyclohexan erhaltene klare Lösung wurde bis zur Verwendung in einem Becherglas aufbewahrt.

Zur Vermeidung von Analysefehlern muss die DAN-Lösung an jedem Versuchstag neu angesetzt werden!

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

10 mg Natriumselenit wurden in 1 L destilliertem H_2O gelöst. Von dieser Stammlösung wurde durch Verdünnen mit destilliertem H_2O Lösungen zu jeweils 5 $\mu\text{g/L}$ (0,063 $\mu\text{mol/L}$), 15 $\mu\text{g/L}$ (0,2 $\mu\text{mol/L}$), 25 $\mu\text{g/L}$ (0,32 $\mu\text{mol/L}$), 50 $\mu\text{g/L}$ (0,63 $\mu\text{mol/L}$), 75 $\mu\text{g/L}$ (0,95 $\mu\text{mol/L}$), und 100 $\mu\text{g/L}$ (1,3 $\mu\text{mol/L}$) hergestellt. Die Lösungen wurden in Glasflaschen mit Schraubverschlüssen aufbewahrt.

b.) Organische Standardlösungen

Lösungen zu jeweils 25 µg (0,32 µmol) - 100 µg (1,3 µmol) Selenharnstoff oder Selenmethionin pro L destilliertem H₂O wurden wie für die Se(IV)-Standardlösungen beschrieben hergestellt.

Um eine Verdünnung der Proben zu vermeiden, wurden für die Experimente zur Wiederfindungsrate zusätzlich konzentrierte Selenmethionin-Lösungen angesetzt. Diese enthielten 800 µg (10,13 µmol), 600 µg (7,6 µmol), 400 µg (5,06 µmol), und 200 µg (2,5 µmol) Selenmethionin pro L destilliertem Wasser.

Albuminlösung:

7 g bovines Albumin wurden in 100 mL Pufferlösung (bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ und 1,4 mM KHPO₄) gelöst. Die Albuminlösung wurde in einer Glasflasche mit Schraubverschluss im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4 Poolserum:

Das bei Routine-Blutentnahmen überschüssig gebliebene Serum von 200 Patienten des Institutes für Nuklearmedizin der Universität Würzburg wurde vom 01. bis 10. Mai 1999 gesammelt und die Patientendaten wurden anonymisiert. Das Serum aller Patienten wurde gepoolt und auf Eppendorf vials zu je 1,5 mL verteilt. Während der gesamten Zeit der Studie wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.5 Serumproben von Dialysepatienten:

Die Serumproben von 87 Patienten des Würzburger Dialysezentrums wurden mit dem Einverständnis der Patienten in den Zeiträumen vom 28.09 bis 02.10. 1999 und vom 14.09 bis 20.09. 2000 gesammelt. Wiederum wurden die Daten der Patienten anonymisiert. Die Proben wurden zu je 1,5 mL auf Eppendorf vials verteilt und bei -20 °C aufbewahrt. Der Selenstatus jedes Patienten wurde jeweils mindestens zweifach bestimmt.

3 Methoden

3.1 Ausgangsverfahren:

Die in dieser Studie optimierte und vereinfachte Methode basiert auf einem Verfahren, welches 1982 erstmals von Koh und Benson [56] beschrieben wurde. Es beruht auf der Bildung eines fluoreszierenden Komplexes, dem sogenannten Piazselenol aus seleniger Säure und protoniertem Diamin.

Zunächst wird Selen mit Salpetersäure und Perchlorsäure aus organischen Verbindungen gelöst und mit Salzsäure zu Se(IV) reduziert. Die protonierte Form des 2,3-Diaminonaphthalins (DAN) wird gewonnen, indem unprotoniertes DAN mit einem organischen Lösungsmittel (Cyclohexan) abgefangen wird (Abb. 1).

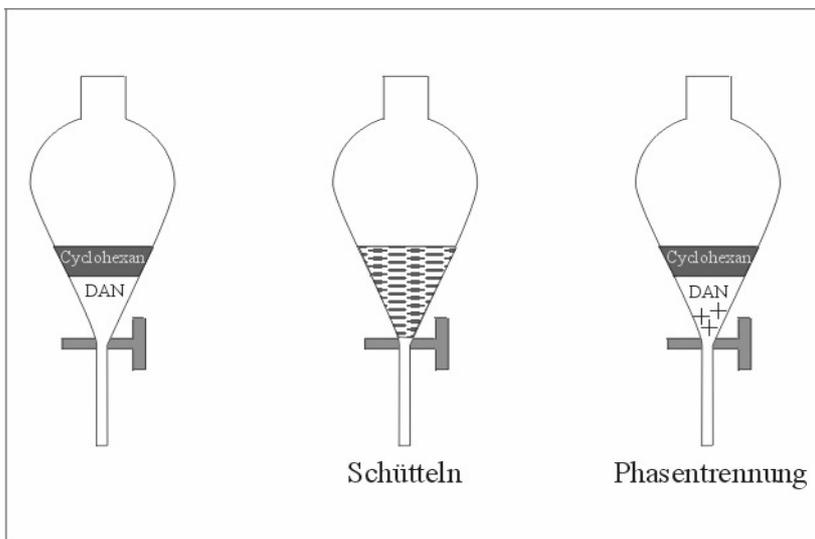
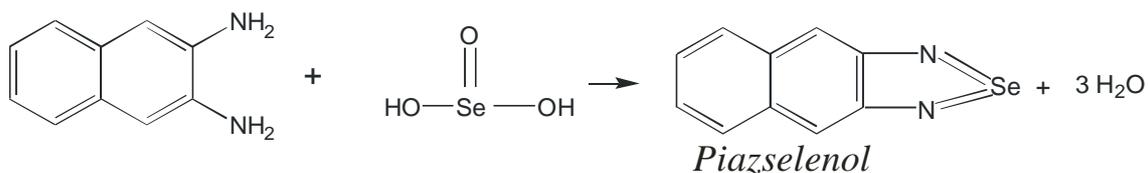


Abbildung 1: Herstellen der DAN-Lösung

Selen(IV) und protoniertes DAN bilden dann das fluoreszierende Piazselenol (Formel 1). Zuvor zugegebenes EDTA fängt möglicherweise interferierende Kationen ab und gewährleistet, dass ausschließlich Selen und DAN eine Bindung eingehen.



Formel 1: Bildung des Piazselenols

Das entstandene unpolare Piazselenol wird dann mit Cyclohexan extrahiert (Abb. 2). Die obere, organische Phase wird schließlich abpipettiert und mittels Spektrofluorimetrie quantifiziert.

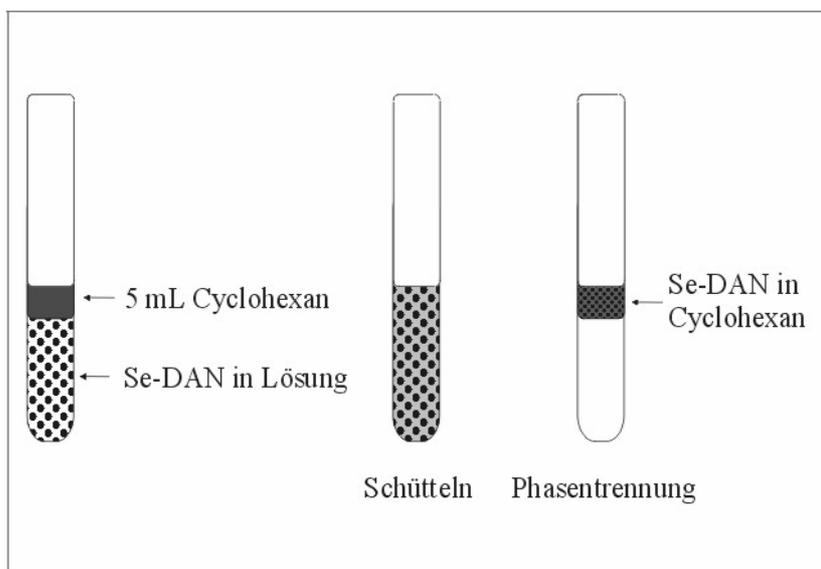


Abbildung 2: Extraktion des Piazselenols

Drei Modifikationen des von Koh und Benson [56] beschriebenen Verfahrens wurden bereits vor den Optimierungsversuchen vorgenommen, um die Handhabung der Proben zu vereinfachen:

Volumina der eingesetzten Serum- und Standardproben:

Während Koh und Benson [56] 2-4 mL einer Probe zur Selenbestimmung einsetzen, wurden in der hier beschriebenen Methode nur 400 μL einer Probe verwendet.

Außerdem wurden für diese Studie dieselben Volumina der Standardproben verwendet, also ebenfalls 400 µL, um Serum- wie auch Standardproben einer möglichst gleichen Behandlung zu unterziehen. Koh und Benson [56] setzten im Gegensatz dazu stets 1 mL der Standardprobe ein, unabhängig vom jeweils verwendeten Probenvolumen eines Serums, Urins o.ä.

Volumen der Säurelösung zum Aufschluss der Proben:

Da in dieser Studie geringere Mengen einer Probe eingesetzt wurden, genügte 1 mL der Säurelösung zum Aufschluss der Proben. In der von Koh und Benson [56] beschriebenen Methode waren 4 mL der Säurelösung notwendig.

Inkubation zur Extraktion des Piazselenols:

Das von zur Extraktion des Piazselenols verwendete 60 °C heiße Wasserbad wurde hier durch den auf 60 °C eingestellten Heizblock ersetzt.

3.2 Optimierungsversuche:

3.2.1 Aufschluss der Proben

Vereinfachung der Inkubation

Koh und Benson [56] heizten ihr Wasserbad vor, ehe die Proben zur Inkubation hineingestellt wurden. Um eine zeitliche Optimierung zu erzielen, wurden die Proben in dieser Studie direkt in den kühlen (nicht vorgeheizten) Heizblock gestellt, die gewünschte Temperatur am Heizblock eingestellt und die Proben über Nacht inkubiert.

Temperatur zum Aufschluss der Proben

Gegenüber der von Koh und Benson [56] beschriebenen Methode wurde in dieser Studie die zur Inkubation verwendete Temperatur von 210 °C auf 190 °C reduziert, um die mit Teflon ausgekleideten Schraubverschlüsse der Probenröhrchen vor Hitzeschäden zu bewahren.

3.2.2 Herstellen der DAN-Lösung

DAN-Rekristallisation

In einem Versuch, die Reinheit des kommerziell erworbenen 2,3-Diaminonaphthalins zu erhöhen, wurde die Substanz einem von Cukor and Lott [58] beschriebenen Reinigungsverfahren unterzogen: 2,3-DAN wurden dazu in 4 M HCl aufgelöst und mit 6 M NaOH präzipitiert. Der weiße Niederschlag wurde filtriert, durch Waschen von alkalischen Resten befreit und schließlich getrocknet.

Dieses gereinigte DAN wurde im folgenden zur Bestimmung der Selenkonzentration eingesetzt.

Standardlösungen und Poolserum wurden jeweils doppelt angesetzt. Die Bestimmung der Selenkonzentration erfolgte nach dem Ausgangsverfahren mit dem einzigen Unterschied, dass der Versuch für die Hälfte der Proben mit gereinigtem DAN, anstelle von unbehandeltem DAN, durchgeführt wurde.

Aufbewahren der DAN-Lösung

In einem Versuch, eine Arbeitersparnis zu erzielen, wurden fertig zubereitete DAN-Lösungen einige Tage lang aufbewahrt und bei einer späteren Selenbestimmung eingesetzt. Dazu wurden die DAN-Lösungen zweier Versuchstage (01.02.2000 und 03.02.2000) in doppelter Menge hergestellt und der überschüssige Anteil der Lösungen bis zum Zeitpunkt des Experiments (08.02.2000) in lichtgeschützten Glasflaschen aufbewahrt. Die Bestimmung der Selenkonzentration von Standardlösungen und Poolserumproben erfolgte dann in drei verschiedenen Gruppen, wobei jeder Gruppe eine der beiden „alten“ DAN-Lösungen oder die am Versuchstag neu angesetzte DAN-Lösung zugeordnet war.

Waschen der DAN-Lösung

In einem weiteren Versuch, Unreinheiten des festen DAN zu eliminieren, wurden DAN-Lösungen in unterschiedlicher Häufigkeit mit Cyclohexan behandelt. Die Anzahl der Waschvorgänge mit Cyclohexan variierte zwischen 1 und 6. Die so erhaltenen DAN-Lösungen wurden dann jeweils eingesetzt, um die Selenkonzentration von Poolserum zu bestimmen.

Filtrieren der DAN-Lösung

Um einerseits den Herstellungsprozess der DAN-Lösung zu vereinfachen und andererseits Lösungsmittel (Cyclohexan) einzusparen, wurde das DAN-HCl-Gemisch filtriert, anstelle mit Cyclohexan gewaschen zu werden. Die Filtration erfolgte zwei Mal durch je einen frischen Trichterfilter.

Diese filtrierte DAN-Lösung wurde im folgenden zur Bestimmung der Selenkonzentration von jeweils 5 Poolserumproben eingesetzt. Die gemessenen Werte für die Selenkonzentration wurden anschließend mit Werten der Poolserum-Selenkonzentration verglichen, die mit einer „normalen“ (dem Ausgangsverfahren entsprechenden) DAN-Lösung behandelt worden waren.

3.2.3 Optimierung der Verdünnung

Durch eine geringere Verdünnung der Proben sollten höhere Werte der spektrofluorimetrischen Intensität abzulesen sein. Um den Verdünnungseffekt durch die EDTA-Lösung zu minimieren, wurden geringere Mengen einer höher konzentrierten EDTA-Lösungen eingesetzt: Außer der im Ausgangsverfahren verwendeten 0,0025 M EDTA-Lösung wurde eine 0,01 M EDTA-Lösung zur Bestimmung des Selengehalts von insgesamt 8 Poolserumproben verwendet.

3.2.4 Optimierung des pH-Werts

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Piazselenolbildung wurde folgendermaßen untersucht: Durch Lösen des EDTAs in NaOH verschiedener Konzentrationen wurde der pH-Wert der Proben zu variiert. Dabei wurden je 4 Poolserumproben mit einer der folgenden Lösungen behandelt:

- 1.) 4 mL 0,01 M EDTA, welche in 2 M NaOH gelöst war
- 2.) 8 mL 0,01 M EDTA, welche in 1 M NaOH gelöst war
- 3.) 4 mL der Lösung 2.)
- 4.) 16 mL 0,0025 M EDTA, welches der ursprünglichen Methode entsprechend in destilliertem Wasser gelöst war.

3.2.5 Optimierung der Piazselenol-Extraktion

Zeitpunkt der Cyclohexan-Zugabe

In diesem Versuch wurde der Einfluss des Zeitpunktes der Cyclohexan-Zugabe auf die Effizienz der Extraktion untersucht. Dazu wurde Cyclohexan zu Standardproben und jeweils 9 Poolserumproben einmal vor und einmal nach der Inkubation bei 60 °C zugegeben.

Vibrofix zur Extraktion

Zur Optimierung des Piazselenol-Extraktionsvorgangs wurde nach manuellem Ausschütteln der Proben mit Cyclohexan und erfolgter Phasentrennung ein Vibrofix eingesetzt: Jedes Röhrchen wurde nach der Phasentrennung nochmals in den Vibrofix gestellt, wobei darauf zu achten war, dass das Röhrchen senkrecht gehalten wurde und die beiden Phasen getrennt blieben. Die seitlich am Glasröhrchen haftenden Cyclohexan-Tropfen konnten dadurch zu der oberen Cyclohexan-Phase aufsteigen.

Effizienz des Extraktionsprozesses

Um die Effizienz der Extraktion mit Cyclohexan zu untersuchen, wurde bei 3 Poolserumproben jeweils ein zweiter Extraktionsprozess durchgeführt: Nach der ersten Extraktion des Piazselenols mit Cyclohexan, wurde die Cyclohexan-Phase gänzlich abpipettiert, so dass nur noch die wässrige Phase im Röhrchen verblieb. Dann wurden erneut 5 mL Cyclohexan zu jedem der Röhrchen dazugegeben, der Extraktionsprozess erneut durchgeführt und schließlich der Piazselenolgehalt der neuen Cyclohexan-Phase spektrofluorimetrisch bestimmt.

Extraktion mit Toluol

Anstelle des Cyclohexans wurden 12 mL Toluol für die Extraktion des Piazselenols verwendet. Der Selengehalt von Standardproben und 4 Poolserumproben sollten auf diese Weise bestimmt und mit den Ergebnissen verglichen werden, die man mit Cyclohexan als Extrahenten erhielt.

3.2.6 Lichtempfindlichkeit des Piazselenols

Um die Lichtempfindlichkeit des Piazselenols zu untersuchen, wurde die Cyclohexan-Phase dreier Poolserumproben über einen Zeitraum von 1 Stunde alle 5 Minuten im Spektrofluorimeter gemessen. Dabei standen die Proben während des gesamten Versuchs bei Raumtemperatur im Tageslicht.

3.2.7 Integrationszeit bei der spektrofluorimetrischen Messung

Die Integrationszeit für die Messung am Spektrofluorimeter wurde auf 1 Sekunde bzw. 5 Sekunden eingestellt. Standardproben und Poolserumproben wurden zunächst mit einer Integrationszeit von 1 Sekunde gemessen, die Integrationszeit dann auf 5 Sekunden eingestellt und die Intensität erneut gemessen. Die für die verschiedenen Integrationszeiten erhaltenen Werte wurden anschließend miteinander verglichen.

3.3 Die optimierte Methode

Aus den oben beschriebenen Optimierungsversuchen resultierte die folgende optimierte spektrofluorimetrische Methode zur Selenbestimmung:

3.3.1 Aufschluss der Proben

400 μL einer Serum- oder Standardprobe wurden in ein 20 x 150 mm Glasröhrchen pipettiert. Für die Standardkurve wurde Standardlösungen der Konzentrationen 0 - 100 μg (1,3 μmol) Se/L H_2O eingesetzt.

Zum Aufschluss wurde 1 mL der unter **2.3** beschriebenen Säuremischung zu jeder Probe dazugegeben, die Röhrchen mit Teflon-beschichteten Schraubverschlüssen fest verschlossen und in den kühlen Heizblock gestellt. Die Temperatur wurde dann auf 190 °C gestellt und die Proben über Nacht inkubiert (mindestens jedoch 6 h).

3.3.2 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 unterdessen auf 150 °C eingestellt. Nachdem die Proben Raumtemperatur erreicht hatten, wurden die Schraubverschlüsse der Röhren vorsichtig unter einem Abzug geöffnet. Dabei muss ein Entweichen kleiner Tröpfchen und somit ein potentieller Selenverlust vermieden werden.

Dann wurden 0,5 mL 11,6 M HCl mit einer Eppendorfpipette zu jeder Probe dazugegeben: Um einen eventuellen Verlust von Selen, welches im Deckel zurückbleiben könnte, zu vermeiden, wurde das HCl erst in den Deckel und von dort in das Röhren pipettiert. Die Deckel wurden anschließend zur Reinigung gegeben. Die offenen Probenröhren wurden für 60 Minuten in den 150 °C heißen Heizblock gestellt und nach 20 bzw. 40 Minuten erneut jeweils 0,5 mL 11,6 M HCl zu jeder Probe dazugegeben. Während dieser Inkubationszeit wurde auch die DAN-Lösung vorbereitet.

Außer der in diesem Schritt stattfindenden Reduktion von Se(VI) zu Se(IV), wird durch das offene Abrauchen gleichzeitig die überschüssige Salpetersäure eliminiert: Bei der dritten Zugabe von HCl zu den Proben ist deshalb eine deutliche Minderung der sich entwickelnden nitrosen Gase (gelber Rauch) erkennbar.

3.3.3 Bildung des Se-DAN-Piazselenols

Die Proben wurden erneut auf Raumtemperatur heruntergekühlt und der Heizblock auf 60 °C eingestellt. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 16 mL 0,0025 M Na₂H₂EDTA. Dadurch werden Metallionen abgefangen, die an Stelle des Selen die Bindung mit DAN eingehen könnten.

Dann wurde 1 mL der DAN-Lösung zu jeder Probe pipettiert und die Röhren mit einem neuen Schraubverschluss fest verschlossen. Die Proben wurden kurz geschüttelt und für 40 Minuten in den 60 °C heißen Heizblock gestellt. Während dieser Zeit sollten die Proben fluoreszierendem Licht nicht direkt ausgesetzt sein; Dunkelkammer-Bedingungen sind jedoch nicht nötig.

3.3.4 Extraktion des Se-DAN- Piazselenols

Die Proben wurden erneut auf Raumtemperatur abgekühlt und die Schraubverschlüsse von den Röhrchen entfernt. Unter dem Abzug erfolgte die Zugabe von je 5 mL Cyclohexan zu jeder Probe. Die Röhrchen wurden mit denselben Schraubverschlüssen wieder verschlossen und jeweils 60 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Während dieser Zeit findet die Lösung des unpolaren Se-DAN-Komplexes in der Cyclohexan-Phase statt.

Dann erfolgte die Trennung dieser unpolaren von der wässrigen Phase, indem die Röhrchen 5 Minuten lang in einem Metallständer verweilten. Jedes Röhrchen wurde anschließend mittels eines Vibrofix kurz durchgerührt, um alle an der Glaswand des Röhrchens haftenden Cyclohexantropfen ebenfalls der oberen, unpolaren Phase zuzuführen.

Aus jedem der Probenröhrchen wurden 2 mL der Cyclohexanphase (in der das Piazselenol gelöst ist) in eine Plastikkuvette pipettiert. Dieser Schritt sollte ebenfalls unter einem Abzug erfolgen, um vor Einatmung der Cyclohexan-Dämpfe geschützt zu sein.

3.3.5 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 gemessen, um die Standardkurve zu erstellen. Dann wurde die Selenkonzentration der einzelnen unbekannt Proben ermittelt.

3.4 Validierung der optimierten Methode:

3.4.1 Wiederfindungsrate von radioaktiv markiertem Selen

1 μL des radioaktiven [^{75}Se]Selen-Sterolderivats wurde zu jeweils 1 mL der Standardlösungen und des Poolserums zugegeben. Je 400 μL (wie für die optimierte Methode beschrieben) dieser Proben wurden für den Versuch vorbereitet, wobei jede der Standardlösungen doppelt und die Poolserumproben in zehnfacher Ausführung angesetzt wurden. Nachdem alle Proben der optimierten Methode entsprechend verarbeitet worden waren, wurde zusätzlich zur spektrofluorimetrischen Messung eine Messung der Radioaktivität mittels Gamma-Counter vorgenommen.

3.4.2 Fähigkeit der optimierten Methode, Selen aus organischen Verbindungen frei zu setzen

Um zu zeigen, dass die optimierte Methode vollständigen Freisetzung von Selen aus organischen Verbindungen führt, wurden Standardlösungen verschiedener Konzentrationen von DL-Selenomethionin oder Selenharnstoff benutzt. Eine Doppelbestimmung dieser organischen und aller Se(IV)- Standardlösungen erfolgte nach der optimierten Methode.

Zusätzlich wurde konzentriertes DL-Selenomethionin zu 4 Serumproben mit unterschiedlichem Selengehalt gegeben, um die Selen-Wiederfindungsrate aus organischen Selenverbindungen in einem Matrix enthaltenden Medium (also z.B. Serum) zu erhalten. Folgende Seren wurden dafür eingesetzt: Poolserum, zwei Seren unterschiedlichen Selengehalts von chronischen Dialysepatienten und fetales Kälberserum. Acht Exemplare aller Serumproben wurden vorbereitet, so dass eine Doppelbestimmung jeder zugesetzten Konzentration erfolgen konnte. Je 50 μL der folgenden DL-Selenomethionin-Lösung wurde zu den Serumproben hinzugefügt: Lösungen mit 2,5 μmol , 5,06 μmol , 10,13 μmol DL-Selenomethionin oder 50 μL destilliertes Wasser. Die zu erwartenden Selenkonzentrationen der unterschiedlichen Proben sind somit:

- 1.) Selengehalt der Serumprobe [$\mu\text{g/L}$] + 25 $\mu\text{g/L}$
- 2.) Selengehalt der Serumprobe [$\mu\text{g/L}$] + 50 $\mu\text{g/L}$
- 3.) Selengehalt der Serumprobe [$\mu\text{g/L}$] + 100 $\mu\text{g/L}$
- 4.) Selengehalt der Serumprobe [$\mu\text{g/L}$] + 0.

Alle Proben wurden der optimierten Methode entsprechend verarbeitet.

3.4.3 Validierung durch standardisiertes Referenz-Serum

Serum, welches nach Vorgabe 80 μg (1,01 μmol) Selen/L enthielt, wurde der optimierten Methode entsprechend verarbeitet und der Selengehalt spektrofluorimetrisch bestimmt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe dieses Serums angefertigt, so dass Seren mit folgenden Selenkonzentrationen resultierten: 80 μg (1 μmol), 60 μg (0,75 μmol), 40 μg (0,5 μmol), 30 μg (0,38 μmol), 20 μg (0,25 μmol), 10 μg (0,13 μmol), 5 μg (0,063 μmol), und 2 μg (0,025 μmol)/L. Die Selenbestimmung aller Seren erfolgte doppelt.

Außerdem wurden Doppelbestimmungen des Poolserums und aller Se(IV)-Standardlösungen in diesem Versuchsansatz durchgeführt.

3.4.4 Präzisionsprofile

Die Intra- und Inter-Assay-Varianzen wurden mittels Poolserum und Standardlösungen bestimmt. Für die Intra-Assay-Varianz erfolgte jeweils eine 10-fache Bestimmung von Poolserumproben und aller Standardlösungen. Dieses Prozedere wurde an 7 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, um die Inter-Assay-Varianz zu erhalten.

3.4.5 Nachweisgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgte aus der Ausgleichkurve der Inter-Assay-Varianzen: Als Nachweisgrenze wird dabei diejenige Konzentration bezeichnet, bei der eine Inter-Assay-Varianz von 20 % erreicht wird.

3.4.6 Vergleich der optimierten spektrofluorimetrischen Methode mit der AAS und der NAA

Die Selenkonzentrationen von 30 verschiedenen Proben (Selen-Standardlösungen, standardisiertes Referenz-Serum, Poolserum, Seren chronischer Dialysepatienten, fetales Kälberserum, Maus-Leberproteine) wurden sowohl mit der optimierten spektrofluorimetrischen Methode, als auch mittels Atomabsorptionsspektrometrie und Neutronenaktivierungsanalyse bestimmt. Für die Selenbestimmungen mittels AAS und NAA wurde jeweils 1 mL der aufgeführten Proben in Eppendorf-caps auf Trockeneis verschickt.

Die AAS wurde von der Arzneimittel-GmbH GN Pharm in Fellbach bei Stuttgart durchgeführt. Zur Messung wurden ein Atomabsorptions-Spektrometer (Z 8100) und ein Autosampler (SSC 200) der Firma Hitachi benutzt. Als Kalibrierverfahren wurde die einfache externe Standardaddition gewählt [59]. Die NAA wurde nach einer von Behne et. al. [60] beschriebenen Methode durchgeführt.

Die mit den 3 verschiedenen Methoden erhaltenen Werte für die Selenkonzentrationen wurden schließlich miteinander verglichen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Optimierungsversuche

4.1.1 Aufschluss der Proben

Vereinfachung der Inkubation

Zum Aufschluss der Proben ließen sowohl Koh und Benson [56] wie auch Cukor, Walczyk und Lott [61] die Röhrchen mit den Proben und der Säuremischung zunächst 1-2 h lang bei Raumtemperatur stehen. Die Proben wurden dann in den vorgeheizten Heizblock gestellt. Um diesen Zeitaufwand zu minimieren, wurden die Proben bei der optimierten Methode sofort in den Heizblock gestellt, ohne diesen vorzuheizen. Da mindestens eine Stunde vergeht bis der Heizblock mit den enthaltenen Proben die gewünschte Temperatur (190 °C) erreicht, kann bei der optimierten Methode auf die Wartezeit von 1-2 h verzichtet werden. Die Modifikation der ursprünglichen Methode hatte keinen Einfluss auf die spektrofluorimetrisch gemessenen Intensitäten.

Temperatur

Koh und Benson [56] setzten zum Aufschluss der Proben eine Temperatur von 210 °C ein. Da die für die optimierte Methode eingesetzten Teflon-beschichteten Schraubverschlüsse einer Temperatur von 210 °C nicht Stand hielten, wurde bei der optimierten Methode eine Temperatur von 190 °C eingesetzt. Die Zerstörung der Verschlüsse bei höheren Temperaturen verursacht nicht nur höhere Kosten, sondern auch ein Verdunsten von Probenmaterial.

Ähnliche Beobachtungen machten Sheehan und Halls [53]: Sie berichteten, dass längeres Erhitzen der Proben über Temperaturen von 200 °C einen Selenverlust verursacht und einzelne Proben sogar gänzlich verkochten. Sowohl Sheehan und Gao [57], als auch Bach, Haas und Mathieu [62] setzten ebenfalls eine Temperatur von 190 °C zum Aufschluss der Proben ein.

4.1.2 Herstellen der DAN-Lösung

DAN-Rekristallisation

Die Ergebnisse für die spektrofluorimetrisch gemessene Intensität bei Verwendung eines gereinigten DAN im Vergleich zu unbehandeltem DAN sind in Abbildung 3 dargestellt. Der Einsatz von gereinigtem DAN führt gegenüber der ursprünglichen Methode tatsächlich zu einer geringen Erhöhung der gemessenen Intensität. Die höheren Messwerte für die Intensitäten entsprechen umgerechnet einer Zunahme der Selenkonzentration um 3-4 $\mu\text{g/L}$.

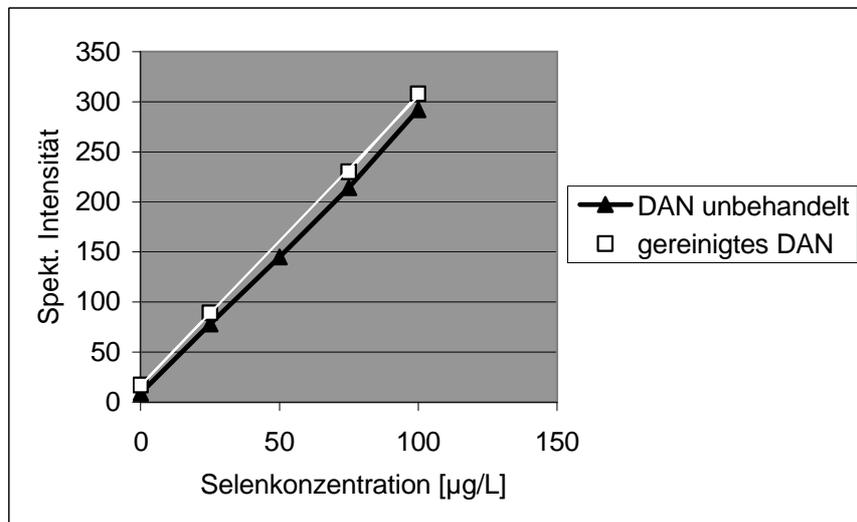


Abbildung 3: Standardkurve unter Einsatz von unbehandeltem oder gereinigtem DAN.

Die nur gering erhöhten Werte der Intensitäten unter Einsatz von gereinigtem DAN lassen sich vermutlich durch den in den letzten Jahrzehnten zunehmenden Reinheitsgrad des kommerziell zu erwerbenden DAN erklären. Diese Vermutung wird durch die Literatur folgendermaßen belegt:

Nachdem Lott, Cukor, Moriber und Solga [63] im August 1963 den Einsatz von unbehandeltem DAN beschrieben, veröffentlichten Cukor, Walczyk, und Lott [61] einen Monat später eine Studie, in der sie die Reinigung des DAN als äußerst wichtige Maßnahme beschreiben, um die für den Leerwert gemessenen Intensitäten zu

minimieren. Auch in einer späteren Studie von Cukor und Lott [58] wurde DAN gereinigt. Für alle 3 Studien war DAN von Aldrich Chemicals eingesetzt worden.

Auch Koh und Benson [56] verwendeten 1982 das DAN von Aldrich Chemicals. Sie beschrieben den Reinigungsprozess des DAN jedoch als überflüssig, sofern die „DAN-Purifikation adäquat ausgeführt wurde.“ Was die Autoren unter der „DAN-Purifikation“ genau verstanden, bleibt unklar, doch es ist anzunehmen, dass damit die Reinheit des kommerziell erworbenen DAN gemeint ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Reinheit des kommerziell zu erwerbenden DAN im Jahre 1963/64 nicht so hoch war wie in späteren Jahren.

Gestützt wird diese These erstens durch die Tatsache, dass die Rekristallisation oder eine andere Form der Reinigung des DAN in neueren Studien immer als unnötig beschrieben wird. Zweitens, wird der Reinheitsgrad des kommerziell erworbenen DAN erstmals in neueren Studien angegeben: Sheehan und Gao [57], zum Beispiel, verwendeten DAN mit einer Reinheit von 99 % von Aldrich Chemical Co. und bezeichneten die DAN-Purifikation als überflüssig.

Im Gegensatz zu den mangelnden Angaben zur Reinheit des erworbenen DAN in früheren Jahren, macht der hohe Reinheitsgrad des heute kommerziell erhältlichen DAN eine weitere Reinigung überflüssig. Da für diese Studie DAN hoher Reinheit (min. 95 %) von Sigma-Aldrich Chemie bezogen wurde und der Aufwand der Reinigung eine so geringe Zunahme der Intensitäten nicht rechtfertigt, wurde die Reinigung des DAN in allen weiteren Experimenten nicht mehr durchgeführt.

Aufbewahren der DAN-Lösung

In Abbildung 4 sind die Selenkonzentrationen für Poolserumproben angegeben, welche mit unterschiedlich lang gelagerten DAN-Lösungen behandelt worden waren. Die Selenkonzentrationen, welche mittels 5 bzw. 7 Tage lang aufbewahrter DAN-Lösung gemessen wurden liegen beide niedriger, als die mit einer am Versuchstag frisch angesetzten DAN-Lösung.

Dieses Ergebnis bestätigt die in der Literatur häufig beschriebene Instabilität der DAN-Lösung [56, 58, 63 - 65], weshalb die Lösung immer am Versuchstag frisch angesetzt

werden sollte. Die Instabilität der DAN-Lösung hat zwei Ursachen: Erstens verursacht eine Lichtexposition den Verlust des für die Piazselenol-Reaktion zur Verfügung stehenden DAN (siehe unten). Diese Ursache wurde bei diesem Experiment jedoch dadurch vermieden, dass die fertig zubereiteten DAN-Lösungen in dunklen Glasflaschen aufbewahrt wurden und sie somit vor Lichteinfluss geschützt waren. Die zweite Ursache für die Instabilität des DAN ist dessen Oxidation, welche hier ursächlich für die geringeren Werte der Selenkonzentration zu sein scheint. Die Oxidation des DAN wird in wässriger Lösung gefördert, so dass die DAN-Lösung eine wesentlich höhere Oxidationsrate besitzt als der Feststoff [58].

Lott, Cukor, Moriber, und Solga [63] postulierten zwar, dass die fertig zubereitete DAN-Lösung 3 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt werden kann, ohne dass eine die Messung grob beeinflussende Oxidation des DAN stattfindet. Doch die Ergebnisse dieses Versuchs sprechen gegen dieses Vorgehen und bestätigen die von einigen anderen Autoren beobachtete Instabilität der DAN-Lösung.

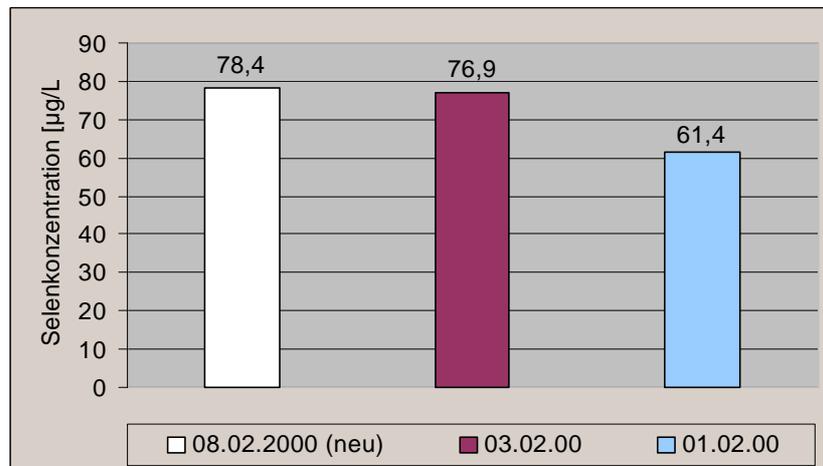


Abbildung 4: Selenkonzentrationen von Poolserumproben unter Verwendung von aufbewahrten oder am Versuchstag neu angesetzten DAN-Lösungen.

Folglich wurde die DAN-Lösung in der optimierten Methode weiterhin an jedem Versuchstag frisch angesetzt, um eine Ungenauigkeit zwischen verschiedenen Versuchstagen zu vermeiden und somit eine geringe Inter-Assay-Varianz (siehe unten) zu gewährleisten.

Waschen der DAN-Lösung

Bei der spektrofluorimetrischen Bestimmung der Intensitäten von Poolserumproben, die mit unterschiedlich häufig gewaschenen DAN-Lösungen behandelt worden waren, zeigte sich, dass bei mehr als 3 Waschvorgängen die Intensität mit zunehmender Anzahl der Waschvorgänge abnimmt. In Abbildung 5 sind exemplarisch die Intensitäten aufgezeichnet, die mittels 3-malig und mittels 6-malig gewaschenen DAN-Lösungen für Poolserumproben gemessen wurden.



Abbildung 5: Spektrofluorimetrische Intensitäten für Poolserumproben nach Behandlung mit DAN-Lösungen, welche entweder 3 oder 6 Mal mit Cyclohexan gewaschen wurden.

Die Beobachtung der Intensitätsabnahme mit zunehmender Waschungs-Anzahl kann durch das Lösungsgleichgewicht des DAN erklärt werden. Das Lösungsgleichgewicht von DAN in einer wässrigen Lösung ist in Formel 2 dargestellt.



Formel 2: DAN-Lösungsgleichgewicht in wässriger Lösung.

Durch den Waschvorgang mit Cyclohexan geht ein Anteil des nicht-protonierten DAN mit der organischen Phase in Lösung. Einerseits werden durch diesen Schritt Unreinheiten und störende DAN-Polymere aus der wässrigen DAN-Lösung eliminiert und so die Lösung für die Piazselenol-Bildung optimiert. Doch andererseits verursacht die Extraktion von nicht-protoniertem DAN eine Neueinstellung des in Formel 2 dargestellten Gleichgewichts, so dass sich mit zunehmender Anzahl der Cyclohexan-Waschvorgänge auch der Anteil an protoniertem DAN reduziert. Da aber nur die mono- und diprotonierten Formen von 2,3-DAN mit seleniger Säure und Biselenit-Ionen reagieren können, muss ein unnötiger Verlust von protoniertem DAN vermieden werden. Deshalb sollte die DAN-Lösung nur 3 mal mit Cyclohexan extrahiert werden. Um Verunreinigungen zu entfernen, darf die Behandlung der DAN-Lösung mit Cyclohexan diese Anzahl aber auch nicht unterschreiten. Denn 2-maliges Waschen der DAN-Lösung führte zu groben Ungenauigkeiten der spektrofluorimetrisch für Standardlösungen gemessenen Werte für verschiedene Versuche.

Koh und Benson [56] setzten jeweils 4 Waschvorgänge mit Cyclohexan zur Reinigung der DAN-Lösung ein. In diesem Experiment unterschieden sich die für Poolserumproben gemessenen Intensitäten, welche mit 3- oder 4-malig gewaschenem DAN erhalten wurden, nur minimal, wobei die 4-fach gewaschene DAN-Lösung minimal geringere spektrofluorimetrische Intensitäten ergab als die 3-fach gewaschene. Aus diesem Grund - und um den Arbeitsaufwand so gering wie möglich zu halten - wurde die Anzahl der Waschvorgänge für die optimierte Methode auf 3 festgelegt.

Filtrieren der DAN-Lösung

Nach zweimaligem Filtrieren der DAN-Lösung wurde diese klarer, behielt jedoch ihre ursprünglich gelbe Farbe bei. Dagegen führte dreifaches Waschen der DAN-Lösung mit Cyclohexan (wie oben beschrieben) nicht nur zum Klären der Lösung, sondern auch zum weitgehenden Verlust der gelben Farbe.

In Abbildung 6 werden die Intensitäten für Poolserumproben, welche mittels filtrierten oder gewaschenen DAN-Lösungen behandelt wurden, miteinander verglichen. Aus den dargestellten Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Intensitäten, welche man mittels gewaschener DAN-Lösungen erhielt, reproduzierbar sind: Die am 11.3.2000 und

am 13.3.2000 gemessenen Intensitäten sind nahezu identisch, obwohl für beide Versuche eine DAN-Lösung jeweils am Versuchstag frisch hergestellt worden war. Dagegen scheinen aus der Filtermethode keine reproduzierbaren DAN-Lösungen hervorzugehen: Die Intensitäten für Poolserum, welche an den beiden Versuchstagen mit filtrierten DAN-Lösungen behandelt wurden, unterschieden sich erheblich.

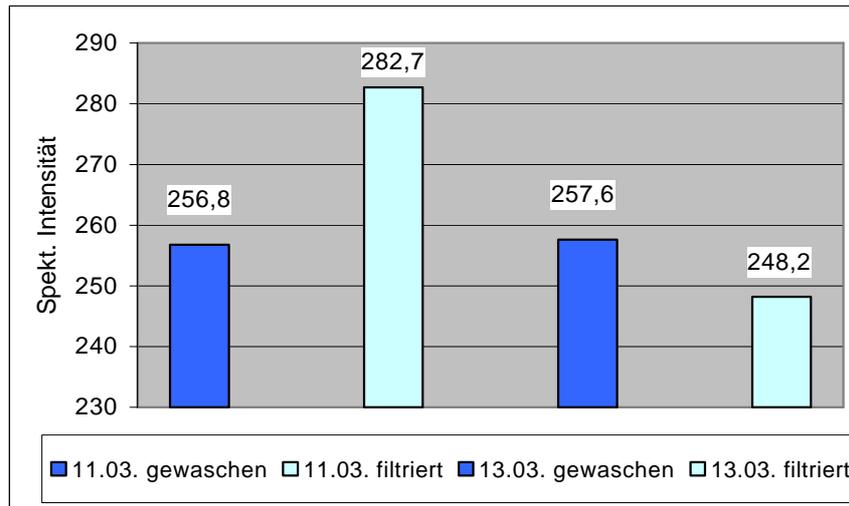


Abbildung 6: Spektrofluorimetrische Intensitäten für Poolserumproben, die mit filtriertem oder gewaschenem DAN behandelt wurden.

Die Intensitäten für Poolserumproben, welche mit filtrierten DAN-Lösungen behandelt wurden, liegen zwar an beiden Versuchstagen jeweils höher als die mittels gewaschener DAN-Lösungen erhaltenen Werte, doch diese höheren Intensitätswerte spiegeln nicht etwa eine höhere Selen-Detektion wider, sondern werden vermutlich durch nicht herausgefilterte Störsubstanzen in der DAN-Lösung verursacht.

Der Ansatz, die DAN-Lösung zu filtrieren, wurde diesen Ergebnissen zufolge fallengelassen und die DAN-Lösung wurde in der optimierten Methode weiterhin mit Cyclohexan gewaschen.

4.1.3 Optimierung der Verdünnung

Durch die Zugabe der gleichen Menge an EDTA bei gleichzeitig verringertem Volumen sollten höhere Messergebnisse für die Selenkonzentration erzielt werden. Da in 16 mL einer 0,0025 M EDTA-Lösung ebensoviel EDTA enthalten ist wie in 4 mL einer 0,01 M EDTA-Lösung, wurden höhere oder zumindest identische Ergebnisse für die Selenkonzentration bei Zugabe von 4 mL 0,01 M EDTA-Lösung erwartet.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Selenkonzentration für Poolserum, welches entweder mit 16 mL einer 0,0025 M EDTA-Lösung oder 4 mL einer 0,01 M EDTA-Lösung behandelt wurde. Entgegen den Erwartungen lag die Selenkonzentration für Poolserum, welches nach der ursprünglichen Methode mit 16 mL 0,0025 M EDTA-Lösung behandelt wurde, jedoch höher als nach Zugabe von 4 mL 0,01 M EDTA.

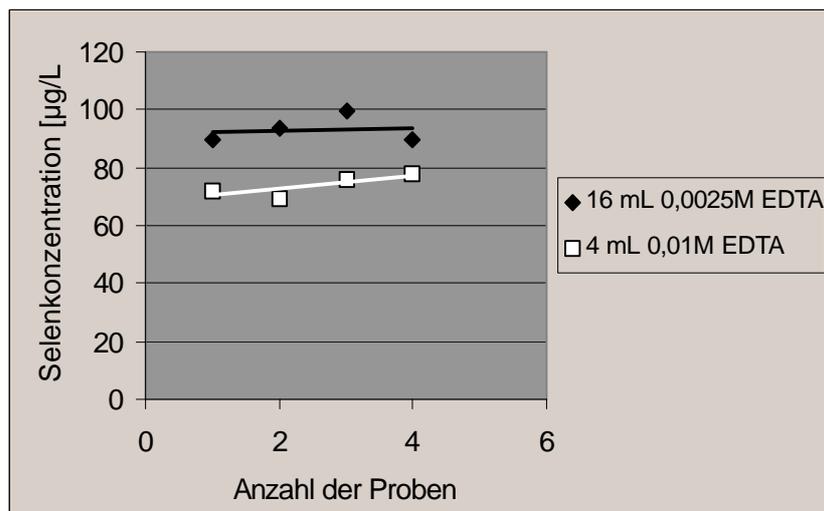


Abbildung 7: Selenkonzentration von je 4 Poolserumproben, welche entweder mit 4 mL 0,01 M oder der ursprünglichen Methode entsprechend mit 16 mL 0,0025 M EDTA-Lösung behandelt wurden.

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse bietet der vielbeschriebene Einfluss des pH-Wertes auf die Piazselenolbildung. Möglicherweise hat die Zugabe von 16 mL einer 0,0025 M EDTA-Lösung zweierlei Aufgaben: Einerseits dient eine bestimmte Menge des zu einer Probe gegebenen EDTA dem Abfangen interferierender Ionen.

Andererseits fungiert die EDTA-Lösung möglicherweise als Pufferlösung, so dass ein optimales Milieu für die Piazselenolbildung geschaffen wird. Unterstützt wird diese These durch Bach, Haas und Mathieu [62], die von einer Verdünnung der Proben mit destilliertem Wasser (anstelle einer EDTA-Lösung) berichten. Auch Koh und Benson [56] verdünnten ihre Proben ursprünglich mit 15 mL destilliertem Wasser und gaben höher konzentriertes EDTA zu den Proben (leider gehen keine genauen Zahlen aus ihren Angaben hervor). Um die Methode um einen Arbeitsschritt zu verkürzen, beschreiben die Autoren, dass sie schließlich eine 0,0025 M EDTA-Lösung zur Verdünnung der Proben einsetzten.

Den Ergebnissen dieses Versuchs zufolge wurde die Menge und Konzentration der EDTA-Lösung auch für die optimierte Methode beibehalten und der Einfluss des pH-Werts auf die Piazselenolbildung im folgenden Experiment weiter untersucht.

4.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Piazselenolbildung

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse für Selenkonzentrationen von Serumproben dargestellt, deren pH-Wert vor Zugabe der DAN-Lösung für die Piazselenolbildung eingestellt wurde. Ein Anheben des pH-Wertes wirkt sich scheinbar positiv auf die Piazselenolbildung aus: Für Serum, das mit 8 mL einer in 1 M NaOH gelösten oder mit 4 mL einer in 2 M NaOH gelösten 0,01 M EDTA-Lösung vor der DAN-Zugabe behandelt wurde, erhält man höhere Messwerte für die Selenkonzentration als mit der ursprünglichen Methode. Es ist jedoch zu beachten, dass die so behandelten Proben eine Gelbfärbung aufweisen und die Leerwertmessungen dieser beiden Verfahren ebenfalls höhere Intensitäten aufwiesen als die herkömmlich behandelten Proben.

Die höheren Werte, die man für die Selenkonzentration nach Anheben des pH-Wertes erhält, sind also weniger Ausdruck einer besseren Effizienz der Piazselenolbildung, als vielmehr einer verstärkten Interferenz.

In den meisten veröffentlichten Verfahren zur Selenbestimmung wird auf den essentiellen Schritt der pH-Einstellung hingewiesen: Lott, Cukor, Moriber und Solga [63] postulierten, dass das pH-Optimum zur Piazselenolbildung bei pH 2 liegt und

fürten folglich eine pH-Einstellung durch. Auch Bach, Haas, und Mathieu [62] titrierten die Proben bis zum Farbumschlag.

Koh und Benson [56] bezeichneten diesen Schritt erstmals als überflüssig. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen, berichten Koh und Benson [56] ebenfalls von höheren Leerwerten bei Versuchen, den pH-Wert der Proben zu optimieren. Auch Sheehan und Gao [57] beobachteten höhere Hintergrund-Interferenzen bei der Spektrofluorimetrie, wenn pH-Werte der Proben angehoben wurden.

In einer Studie über die Kinetik der Reaktion zwischen DAN und Selen befassen sich Cukor, Walzcyk und Lott [61] ebenfalls mit dem Problem des pH-Werts. Die Piazselenolbildung ist laut den Autoren von zwei Faktoren abhängig: Einerseits muss das Amin in protonierter Form vorliegen, was durch einen niedrigen pH-Wert begünstigt wird. Andererseits erhöht sich die Konzentration des als Biselenit-Ion vorliegenden Selens bei hohem pH-Wert. In einer weiteren Studie beschreiben Cukor und Lott [58] einen steilen Abfall der Reaktionsrate bei pH-Werten über 1,5, wohingegen der Verlust an Fluoreszenz-Intensität bei pH-Werten unter 1 geringer ist. Das bedeutet, dass ein Anheben des pH-Wertes die Piazselenolbildung stärker hemmt, als Bedingungen bei einem pH-Wert unter 1.

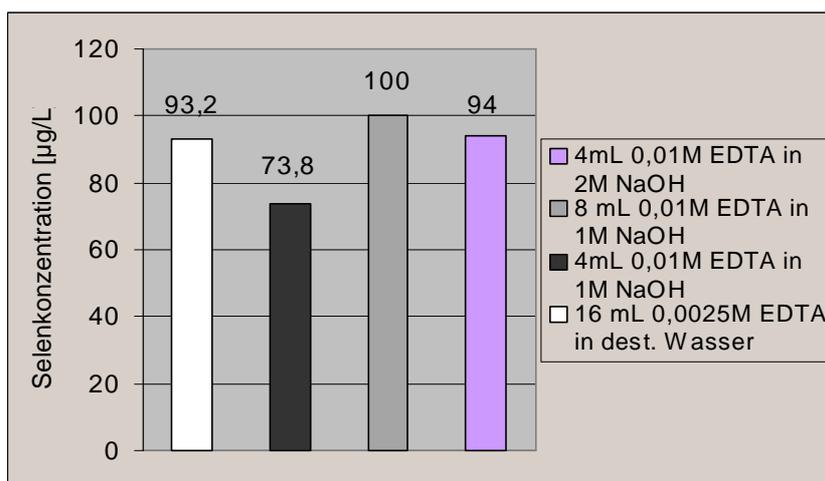


Abbildung 8: Selenkonzentrationen von Poolserumproben, die mit EDTA-Lösungen unterschiedlicher pH-Werte behandelt wurden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs und die Hinweise in der Literatur ergaben die Schlussfolgerung, dass eine Anpassung des pH-Werts nicht nur zeitaufwendig ist, sondern sich sogar negativ auf die Piazselenolbildung auswirkt. Folglich wurde in der optimierten Methode keine pH-Einstellung vorgenommen.

4.1.5 Optimierung der Piazselenol-Extraktion

Zeitpunkt der Cyclohexan-Zugabe

In der von Koh und Benson [56] beschriebenen Methode wurde Cyclohexan unmittelbar nach Zugabe der DAN-Lösung zu den Proben gegeben und war somit der zur Piazselenol-Bildung angewendeten Inkubation bei 60 °C ausgesetzt. Im Gegensatz dazu wurde Cyclohexan in diesem Optimierungsversuch *nach* Inkubation der Proben bei 60 °C und bereits erfolgter Piazselenolbildung zu den Proben gegeben. Abbildung 9 zeigt die für beide Methoden gemessenen Selenkonzentrationen von jeweils 9 Poolserumproben im Vergleich zueinander.

Mit der Zugabe des Cyclohexans *vor* Inkubation der Proben wurden in 8 von 9 Fällen höhere Werte für die Selenkonzentration gemessen, als bei Zugabe des Cyclohexans *nach* Inkubation der Proben. Doch die Selenkonzentrationen der Proben, bei denen Cyclohexan bereits vor der Inkubation zugegeben wurde, zeigen erhebliche Schwankungen: Für Poolserumproben, die alle die gleiche Selenkonzentration enthalten lag die Standardabweichung bei 25,8. Dagegen führt eine Cyclohexan-Zugabe nach Inkubation der Proben zu relativ gleichbleibenden Werten für die gemessene Selenkonzentration mit einer Standardabweichung von 6,1.

Eine mögliche Erklärung für die meist höher liegenden Messwerte bei Zugabe des Cyclohexan unmittelbar nach Zugabe der DAN-Lösung ist, dass die sich während der Inkubation bildenden Piazselenole teilweise direkt in der Cyclohexan-Phase in Lösung gehen, anstelle erst später aus der wässrigen Phase extrahiert zu werden. Um bei der modifizierten Version (Zugabe des Cyclohexans nach Inkubation) zu gewährleisten, dass sich die gebildeten Piazselenol-Komplexe vollständig in Cyclohexan lösen, wurden spezielle Techniken zum Ausschütteln angewendet (siehe unten).

Die großen Schwankungen für die gemessenen Selenkonzentrationen, die bei Anwendung der ursprünglichen Methode beobachtet wurden, beruhen sehr wahrscheinlich auf der hohen Verdunstungseigenschaft des Cyclohexans. Ein Verdunsten des Cyclohexans wird einerseits durch den Wärmeeinfluss während der Inkubation gefördert und andererseits steht bei dieser Methode eine größere Zeitspanne zur Verfügung, in der eine Verdunstung des Cyclohexans erfolgen kann. Ein dadurch bedingter Verlust an Cyclohexan ist für die spektrofluorimetrische Methode fatal, da die Messung auf der Konzentration gelöster Piazselenole in der Cyclohexan-Phase beruht. Eine Cyclohexan-Zugabe zu einem späteren Zeitpunkt (nach der Inkubation) und nach Abkühlen der Proben verringert die Wahrscheinlichkeit des Verlusts von Cyclohexan durch Verdunstung.

Außerdem wurde eine Gelbfärbung der Cyclohexan-Phase beobachtet, wenn Cyclohexan mit den Proben inkubiert wurde. Die organische Phase bleibt hingegen klar, wenn Cyclohexan erst nach Inkubation der Proben zur Extraktion des Piazselenols eingesetzt wurde.

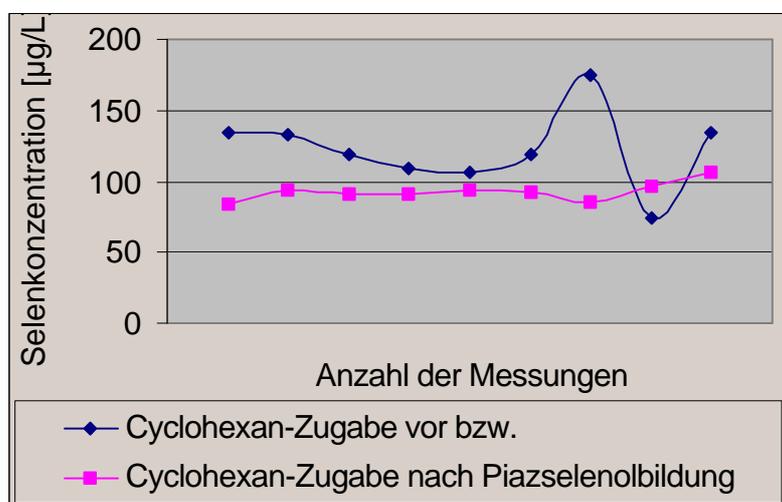


Abbildung 9: Selenkonzentrationen bei Cyclohexan-Zugabe entweder vor oder nach Piazselenolbildung.

Auch wenn mit der von Koh und Benson [56] beschriebenen Zugabe des Cyclohexans vor der Inkubation meist höhere Selenkonzentrationen für die Proben gemessen wurden, spricht die wesentlich geringere Standardabweichung bei Cyclohexan-Zugabe nach

Inkubation der Proben für eine größere Verlässlichkeit dieser Vorgehensweise. Bei der optimierten Methode wurde Cyclohexan deshalb nur nach Inkubation zu den Proben gegeben.

Extraktion mittels Vibrofix

Nach erfolgter Piazselenolbildung beschrieben Koh und Benson [56] den Einsatz eines Mixers zur Extraktion des Piazselenols in die Cyclohexan-Phase. Der Metallständer mit den Proben wurden dabei in den Mixer gestellt und 1 Minute lang im Uhrzeigersinn und gegen den Uhrzeigersinn durchmischt. Diesem von Koh und Benson [56] verwendeten Verfahren zur Piazselenol-Extraktion wurde ein modifiziertes Verfahren gegenübergestellt, bei dem manuelles Ausschütteln durch den Einsatz eines Vibrofix ergänzt wurde.

Der Mittelwert für die Selenkonzentration von Poolserumproben, die nach der Methode von Koh und Benson [56] verarbeitet wurden, betrug 82,7 µg/L. Der nach der optimierten Methode erhaltene Mittelwert für Poolserumproben betrug hingegen 91,81 µg/L. Außerdem zeigt das modifizierte Verfahren mit 3,14 eine geringere Standardabweichung als die ursprüngliche Methode (SD = 4,17).

Die Beobachtungen können folgendermaßen erklärt werden: Einerseits führt das kräftige manuelle Ausschütteln der Proben zu einer größeren Austauschfläche zwischen wässriger und Cyclohexan-Phase. Dadurch können gebildete Piazselenole einfacher in die Cyclohexan-Phase übergehen. Außerdem werden die an der Glaswand der Probenröhrchen haftenden Cyclohexan-Perlen durch Einsatz des Vibrofix ebenfalls der Cyclohexan-Phase zugeführt. Das in solchen Perlen enthaltene Piazselenol entgeht der spektrofluorimetrischen Messung bei Anwendung der Methode nach Koh und Benson [56].

Da die Konzentration der Piazselenole in der Cyclohexan-Phase ausschlaggebend für die spektrofluorimetrische Messung ist, müssen sowohl alle gebildeten Piazselenol-Moleküle wie auch sämtliche Cyclohexan-Rückstände (die ihrerseits unterschiedliche Mengen Piazselenol enthalten können) der oberen Phase der Proben zugeführt werden.

Dies gelang durch manuelles Ausschütteln und dem zusätzlichen Einsatz eines Vibrofix in der modifizierten Methode.

Effizienz des Extraktionsprozesses

Um herauszufinden, ob mit der Extraktion nach optimiertem Verfahren (siehe oben) sämtliche Piazselenol-Moleküle erfasst werden, wurde der Extraktionsprozess mit der wässrigen Phase ein zweites Mal ausgeführt. Abbildung 10 zeigt die Standardkurve der Selenkonzentrationen und die für die erste bzw. zweite Extraktion gemessenen Intensitäten.

Die spektrofluorimetrisch gemessene Intensität bei der zweiten Extraktion (weißer Kreis in Abbildung 10) beträgt 30,07, was einer Selenkonzentration von 3,9 $\mu\text{g/L}$ entspricht. Bei einer Selenkonzentration von 90,5 $\mu\text{g/L}$, die für die erste Extraktion gemessen wurde (weißes Quadrat in Abbildung 9), entspricht dieser Wert einem Verlust von 4 % des Selens. Das heißt, dass ca. 4 % des Selens nach der ersten Extraktion noch in der wässrigen Phase verbleiben. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine Selenkonzentration von 3,9 $\mu\text{g/L}$ nur knapp über der Nachweisgrenze für die spektrofluorimetrische Methode liegt (siehe unten).

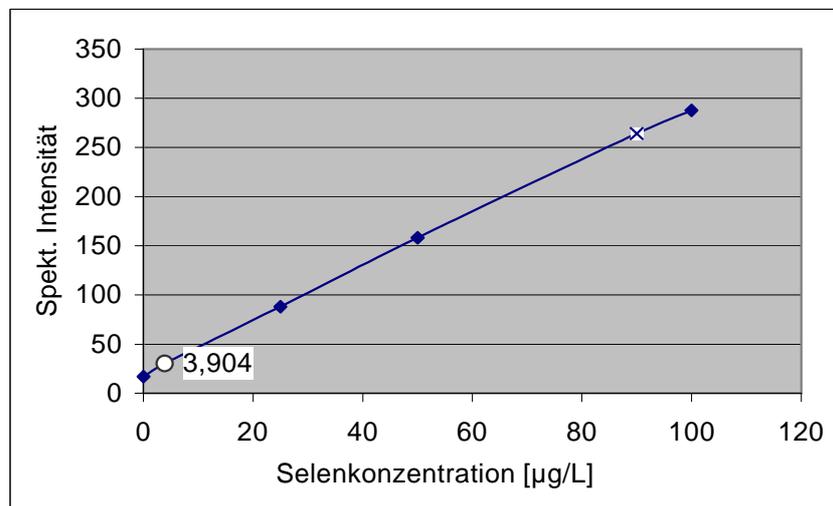


Abbildung 10: Standardkurve und nach erster Extraktion (weißes Quadrat) bzw. nach zweiter Extraktion (weißer Kreis) gemessene Selenkonzentrationen.

Bei der Extraktion des Piazselenols mit Cyclohexan findet anscheinend ein geringer Selenverlust statt. Da jedoch mit einmaliger Anwendung des Prozesses über 95 % des Piazselenols extrahiert werden und die Werte bei einer zweiten Extraktion im Bereich der Nachweisgrenze der Methode liegen, ist der Aufwand eines zweiten Extraktionsprozesses nicht gerechtfertigt.

Extraktion mit Toluol

Die Fähigkeit von Toluol, Piazselenol aus der wässrigen Phase zu extrahieren, sollte untersucht und der Extraktionsfähigkeit des Cyclohexans gegenübergestellt werden. Doch bereits beim Übertragen der Toluol-Phase in die Plastikküvetten, die zur spektrofluorimetrischen Messung eingesetzt werden, wurden die Plastikwände der Küvetten durch Toluol zerstört und konnten folglich nicht im Spektrofluorimeter gemessen werden.

Einige Autoren berichten über die Verwendung von Toluol zur Piazselenol-Extraktion: In einer Studie über die Selenbestimmung mittels 2,3-DAN, verwendeten Lott, Cukor, Moriber und Solga [63] Toluol zur Piazselenol-Extraktion. In einer jüngeren Studie, in der verschiedene Extraktionsmittel verglichen werden, berichten dieselben Autoren jedoch von der Überlegenheit des Cyclohexan zur Piazselenol-Extraktion gegenüber Toluol. Auch Parker and Harvey [65] berichteten von höheren Selen-Wiederfindungsraten mit Cyclohexan als Extraktionsmittel.

Um die Extraktionsfähigkeit von Toluol weiter untersuchen zu können, hätten die Glasküvetten anstelle der Plastikküvetten in die optimierte Methode eingeführt werden müssen. Da Glasküvetten jedoch wesentlich teurer sind als Plastikküvetten und die Kosten einer optimierten Methode so gering wie möglich gehalten werden sollten, wurde die Extraktionsfähigkeit von Toluol nicht weiter verfolgt.

4.1.6 Lichtempfindlichkeit des Piazselenols

In Abbildung 11 ist die Stabilität des Piazselenol-Komplexes unter Einfluss von fluoreszierendem Licht (Labor) in Abhängigkeit von der Zeit der Lichtexposition dargestellt. Mit zunehmender Zeit der Lichtexposition nehmen die spektrofluorimetrisch gemessenen Intensitäten rapide ab: Innerhalb einer Stunde fiel die gemessene Intensität um mehr als 50 %. Die abnehmenden Werte für die Intensitäten während der Lichtexposition entstehen entweder durch Oxidation des Se-DAN-Komplexes mit Luftsauerstoff oder entsprechen einem Zerfall der Piazselenol-Komplexe.

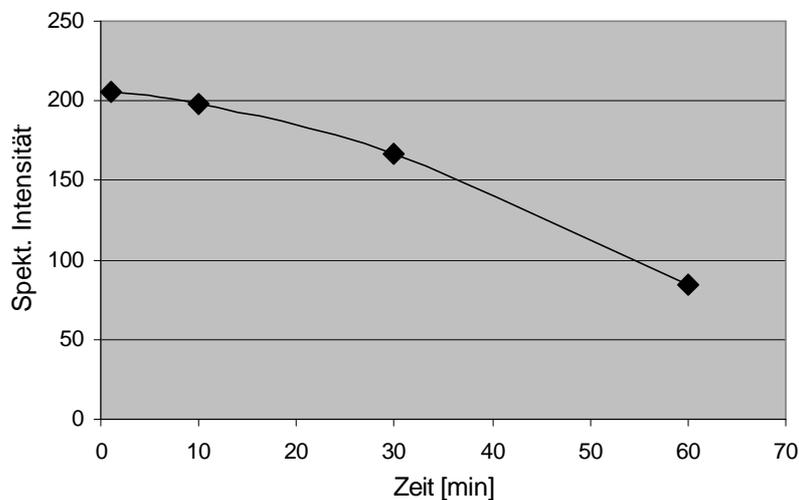


Abbildung 11: Für die Cyclohexan-Phase (welche Piazselenol enthält) gemessene Intensitäten in Abhängigkeit von der Zeit bis zur spektrofluorimetrischen Bestimmung.

Den Beobachtungen aus diesem Versuch steht die Aussage von Koh und Benson [56] gegenüber, die postulierten, dass die Piazselenol enthaltende Lösungsmittel-Phase eine Woche lang fluoreszierendem Licht ausgesetzt werden kann, ohne die analytischen Ergebnisse zu beeinträchtigen. Bei genauerer Überprüfung dieser Aussage stellt sich aber heraus, dass die Autoren (nach 16 h Lichtexposition) eine „vernachlässigbare Änderung der ^{75}Se -Aktivität“ [30] beobachteten. Die ^{75}Se -Aktivität entspricht jedoch unter diesen Umständen nicht mehr der Menge des vorhandenen Piazselenols, da auch

der Anteil des ^{75}Se , welcher nicht mehr an DAN gebunden ist (also nicht mehr als Piazselenol vorliegt), bei Bestimmung der Aktivität mitgemessen wird.

Entsprechend der durch diesen Versuch geäußerten Theorie wiesen Sheehan und Gao [57] darauf hin, dass das Piazselenol potenziell photolabil ist. Cukor and Lott [58] zogen es sogar vor, ihre Analysen in der Dunkelkammer durchzuführen. Bach, Haas und Mathieu [62] gingen auf ähnliche Weise vor: Die Inkubation zur Piazselenolbildung erfolgte im Dunkeln und alle darauffolgenden Schritte erfolgten unter Vermeidung direkter Neonlicht-Exposition.

Der hier durchgeführte Versuch weist darauf hin, dass die Messung der Proben möglichst unverzüglich erfolgen sollte, um sowohl eine direkte Fluoreszenz-Exposition wie auch einen unnötig langen Kontakt mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Auf mehrmalige Wiederholung der Messung sollte ebenfalls verzichtet werden, da diese zu Intensitätsverlusten führt. Dunkelkammer-Bedingungen sind jedoch für die in dieser Arbeit vorgestellte optimierte Methode nicht notwendig, wie die Wiederfindungsraten bestätigen (s.u.).

4.1.7 Integrationszeit bei der spektrofluorimetrischen Messung

Die für eine Probe gemessene Intensität bei einer Integrationszeit von 1 Sekunde unterschied sich in der Regel nicht von der für dieselbe Probe gemessene Intensität bei einer Integrationszeit von 5 Sekunden, wie in der Methode nach Koh und Benson [56] beschrieben. Bei einigen wenigen Proben wurde bei einer Integrationszeit von 5 Sekunden ein Verlust von 3-5 spektrofluorimetrischen Fluoreszenz-Einheiten gegenüber einer Integrationszeit von 1 Sekunde verzeichnet. Allerdings muss bei der Interpretation dieses Intensitätsverlusts beachtet werden, dass die Messung bei einer Integrationszeit von 5 Sekunden *nach* der Messung bei der Integrationszeit von 1 Sekunde erfolgte. In diesem Zusammenhang sei auf den bereits zuvor beschriebenen Intensitätsverlust bei mehrmaliger Messung verwiesen (siehe oben).

Da die Integrationszeit keinen entscheidenden Einfluss auf die für eine Probe gemessene Intensität übt, erfolgte die spektrofluorimetrische Messung der optimierten Methode bei einer Integrationszeit von 1 Sekunde.

4.2 Validierung

4.2.1 Wiederfindungsrate von 6-Methyl-⁷⁵Se-Selenomethyl-19-norcholest-5(10)-en-3 β -ol

Tabelle 3 zeigt für jede Probe die mittels Gamma-Counter ermittelte Wiederfindungsrate des [⁷⁵Se]Selen-Sterolderivats und die spektrofluorimetrisch gemessene Intensität. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von radioaktivem [⁷⁵Se]Selen-Sterolderivat beträgt 86,4 % für die optimierte Methode. Koh und Benson [56] fanden eine durchschnittliche [⁷⁵Se]Selen-Wiederfindungsrate von 85 %.

Die gute Korrelation zwischen der mittels Gamma-Counter ermittelten Wiederfindungsrate des [⁷⁵Se]Selen-Sterolderivats und der für diese Proben gemessenen spektrofluorimetrischen Intensitäten sind ebenfalls in Tabelle 3 veranschaulicht. Selbst die Wiederfindungsraten, welche am stärksten vom Mittelwert abweichen, entsprechen spektrofluorimetrischen Intensitäten, die in gleicher Richtung vom Mittelwert der Intensitäten abweichen (siehe *-Markierungen).

Der Verlust an radioaktivem [⁷⁵Se]Selen von ca. 13,6 % kann durch die folgenden Effekte erklärt werden:

- 1.) Da lediglich Tracer-Mengen des [⁷⁵Se]Selens verwendet wurden, die unter der Nachweisgrenze für die optimierte Methode liegen, ist mit Messungenauigkeiten zu rechnen.
- 2.) Die Instabilität des radioaktiven [⁷⁵Se]Selens führt zu einem zeitabhängigen Verlust des zu den Proben zugegebenen [⁷⁵Se]Selens.
- 3.) Das verwendete [⁷⁵Se]Selen ist ein Sterolderivat und wird als lipophile Substanz auch an der Glasröhrchenwand und den Pipettenspitzen adsorbiert und geht somit nicht vollständig in die Cyclohexanphase über.

Die dritte Theorie wurde dadurch bestätigt, dass Pipettenspitzen in Plastikröhrchen gelegt und im Gammacounter die Aktivität gemessen wurde. Ungefähr 4 % der Aktivität konnte tatsächlich in den verbliebenen Pipettenspitzen nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Wiederfindungsraten (in Prozent) von radioaktiv markiertem ^{75}Se , welches Poolserumproben zugesetzt wurde und Vergleich zu spektrofluorimetrisch gemessenen Intensitäten derselben Proben.

Probe	Spektrofluorimetrisch gemessene Intensität	^{75}Se -Wiederfindungsrate (mittels Gamma-Counter)
1	263,137	86,1 %
2	280,671	88,5 %
3	265,439	84,8 %
4	269,569	86,5 %
5	270,873	85,8 %
6	270,736	86,5 %
7	267,417	85,5 %
8	268,198	86,2 %
9	242,799 *	79,1 % *
10	266,94	84,9 %
11	268,361	83,2 %
12	326,836 *	104,1 % *
13	267,401	82,4 %
	Mittelwert: 271,414	Mittelwert: 86,4 %

Bei den Ergebnissen für die Wiederfindungsrate von ^{75}Se Selens ist zu beachten, dass es sich hierbei um ein für die Nebennierenzintigraphie verwendetes Sterolderivat handelt und nicht als natürliche Komponente in organischen Proben vorkommt, die im klinischen Alltag untersucht werden, wie zum Beispiel Serum. Im Gegensatz zu den im klinischen Alltag verwendeten Serumproben enthält das ^{75}Se Selen-Sterolderivat auch keine Selenoprotein-Verbindungen. Da es mit der optimierten Methode jedoch vor allem möglich sein soll, Selen in organischen Materialien zu messen, wurde im folgenden untersucht, in wie weit die optimierte Methode in der Lage ist, Selen aus Selenoprotein-Verbindungen zu lösen und zu detektieren.

4.2.2 Fähigkeit der optimierten Methode, Selen aus organischen Verbindungen frei zu setzen

Wie in Tabelle 4 aufgeführt, wurde 100 % des Selens aus Selenoprotein-Standardlösungen mit der optimierten Methode spektrofluorimetrisch nachgewiesen. Nur das aus den DL-Selenmethionin- und Selenharnstoff- Standardlösungen freigesetzte Selen konnte an DAN binden und wurde dadurch spektrofluorimetrisch messbar. Das bedeutet, dass die optimierte Methode in der Lage ist, Selen vollständig aus den genannten organischen Verbindungen frei zu setzen.

Diese Ergebnis macht die optimierte Methode gegenüber neu entwickelten Methoden zur vollständigen Selenfreisetzung aus organischen Verbindungen konkurrenzfähig, wie z. B. dem Aufschlussverfahren nach D'Ulivo, Lampugnani, Sfetsios und Zamboni [66, 67].

Tabelle 4: Wiederfindungsraten von Se-DL-Methionin und Selenharnstoff, welches jeweils Poolserumproben zugesetzt worden war. Als Referenz dienten Se(IV)-Standardlösungen. Gegenübergestellt ist die durchschnittliche Wiederfindungsrate für standardisiertes Referenz-Serum.

Se(VI) = Referenz	Se-DL-Met	Konz. Se-DL-Met	Se-Harnstoff	Referenz- Serum
100 %	101,2 %	98,7 %	100,5 %	98,8 %

Weiterhin wurde untersucht, ob dieses Ergebnis auch dann zutrifft, wenn die Selenoproteine nicht in einer Standardlösung ohne Interferenzsubstanzen, sondern im Serum enthalten sind. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung angeben.

Die zu Serumproben mit vier verschiedenen Selen-Ausgangskonzentrationen zugesetzten Mengen an DL-Selenmethionin wurden zu jeweils gleichen Anteilen freigesetzt und detektiert, was durch den parallelen Verlauf der vier Geraden veranschaulicht ist. Außerdem sind die mittleren Wiederfindungsraten von zugegebenem DL-Selenmethionin für jede der vier Serumproben aufgeführt: Sie liegen

zwischen 98 % für Poolserum und 105 % für fetales Kälberserum. Durchschnittlich wurde mit Hilfe der optimierten Methode 100,5 % des zu den Serumproben zugegebenen DL-Selenmethionins wiedergefunden. Da heißt, dass die Fähigkeit der optimierten Methode zur vollständigen Freisetzung von Selen aus Selenoprotein-Verbindungen auch im Serum gewährleistet ist.

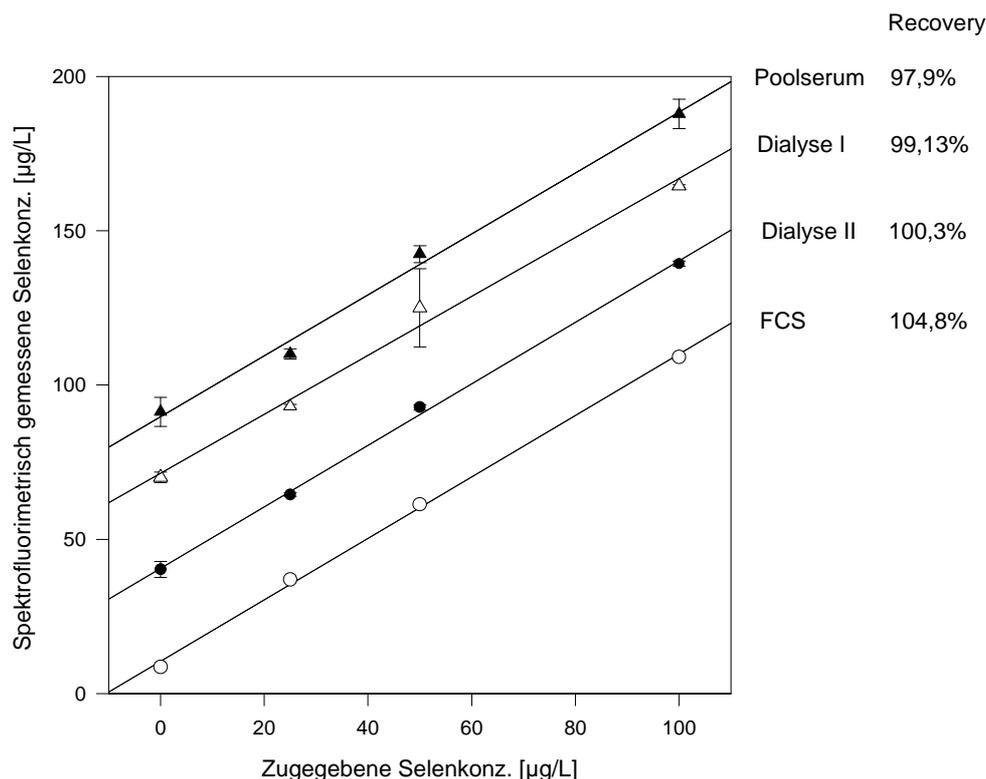


Abbildung 12: Spektrofluorimetrisch gemessene Selenkonzentrationen bei Zugabe ansteigender Selenmengen zu Poolserumproben, Seren chronischer Dialysepatienten oder fetalem Kälberserum.

4.2.3 Validierung durch standardisiertes Referenz-Serum

Abbildung 13 zeigt die mit der optimierten Methode doppelt bestimmten Selenkonzentrationen für standardisiertes Referenz-Serum. Für unverdünntes Standardserum, welches nach Herstellerangaben 80 µg/L Selen enthält, wurde einmal 81,3 µg/L und einmal genau 80 µg/L gemessen.

Für 6 verschiedene Verdünnungen dieses Standardserums wurden ebenfalls nahezu 100 % (98,8 %) des Selen wiedergefunden. Geringe Abweichungen lassen sich darauf zurückführen, dass der Prozess der Verdünnung selbst bereits geringe Fehler mit sich bringen kann.

Für die in diesem Versuch höchste Verdünnung des Referenz-Serums sollte die Selenkonzentration 2 µg/L betragen. Bei der spektrofluorimetrischen Messung wurde eine Abweichung von 3,5 µg/L vom erwarteten Wert bei einer der beiden Proben verzeichnet. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Nachweisgrenze für die spektrofluorimetrische Methode bei 3 µg/L liegt und somit eine genaue Messung im Konzentrationsbereich von 2 µg/L nicht erwartet werden kann.

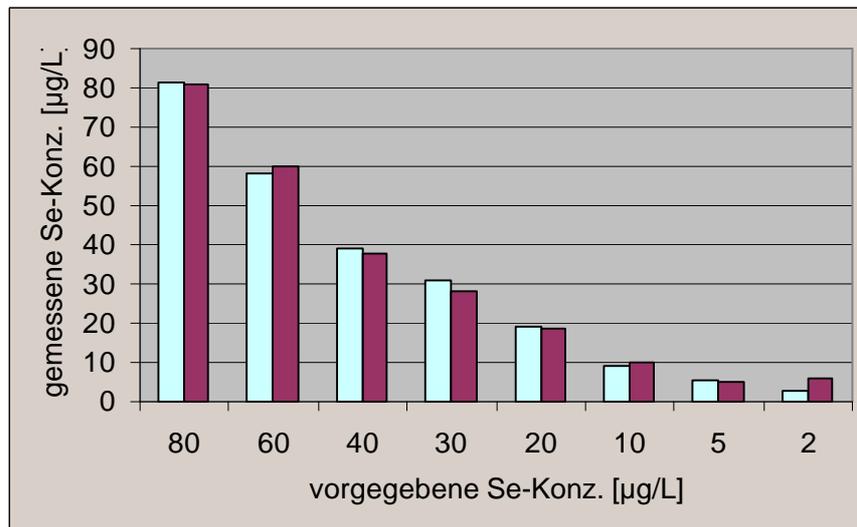


Abbildung 13: Mittels der optimierten Methode gemessene Selenkonzentrationen von standardisiertem Referenzserum, für welches die auf der x-Achse angegebenen Selenkonzentrationen vorgegeben waren.

Abbildung 14 verdeutlicht die Genauigkeit der optimierten Methode. Für alle Werte, die über der Nachweisgrenze liegen, wurden die mit der optimierten Methode ermittelten Selenkonzentrationen gegen die vorgegebenen Selenkonzentrationen des Standardserums aufgetragen. Die Ausgleichsgerade durch die so erhaltenen Punkte ist definiert als $y = 1,01 x - 1,06$. Der Schnittpunkt mit der x-Achse liegt bei 1,04. Die Standardabweichung für Werte über der Nachweisgrenze beträgt 26,83.

Aus der Geradengleichung lassen sich mehrere Dinge ablesen: Erstens, beträgt die Steigung der Ausgleichsgerade nahezu 1, was für die gute Korrelation der optimierten Methode mit den vorgegebenen Werten spricht. Der Gleichung lässt sich weiterhin entnehmen, dass die Genauigkeit der optimierten Methode mit zunehmenden Selenkonzentrationen ansteigt. Doch hier muss wiederum beachtet werden, dass die Ungenauigkeit der immer höheren Verdünnungsstufen auch allein auf den Vorgang der Verdünnung zurück zu führen sein kann.

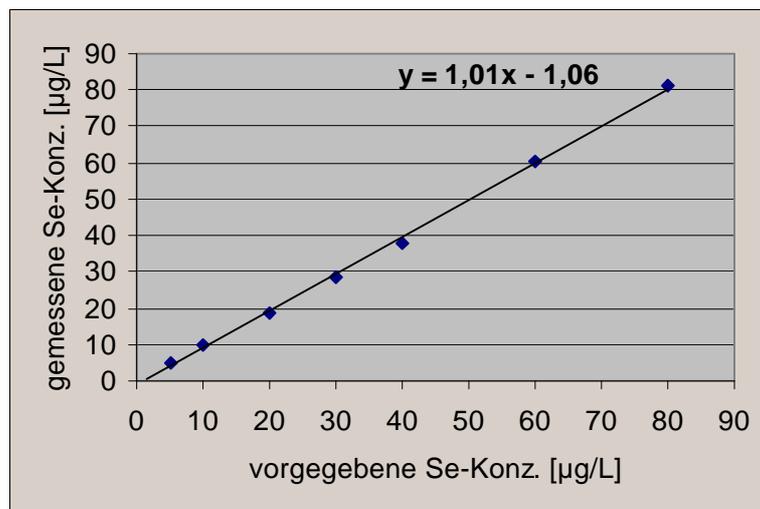


Abbildung 14: Gegeneinander aufgetragene Werte für gemessene bzw. vorgegebene Selenkonzentrationen, die über der Nachweisgrenze liegen, mit Ausgleichsgerade.

4.2.4 Präzisionsprofile

Abbildung 15 zeigt die Varianzen in Abhängigkeit von der Selenkonzentration. Bei Selenkonzentrationen, die oberhalb der Nachweisgrenze liegen, beträgt die Intra-Assay Varianz für die optimierte Methode 3,27 %. Die Inter-Assay Varianz beträgt 1,8 %.

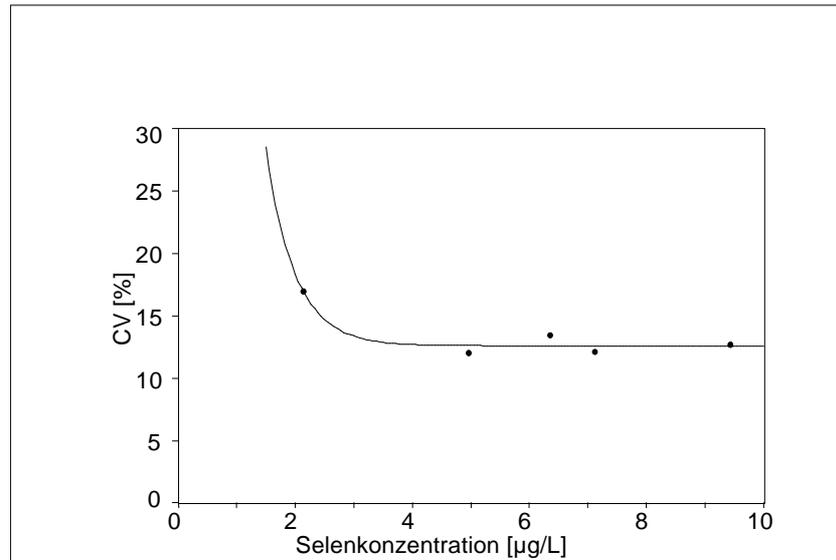


Abbildung 15: Intra- und Inter-Assay Varianzen (CV [%]) in Abhängigkeit von der Selenkonzentration der Proben. Die Darstellung der Ausgleichskurve erfolgte nach der Formel: $y = a + b/x$.

4.2.5 Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze einer analytischen Methode wird diejenige Selenkonzentration definiert, bei der eine Inter-Assay Varianz von 20 % erreicht wird.

Da selbst mit Serumproben von Dialysepatienten der niedrigsten Selenkonzentration (22 µg/L) diese Grenze nicht erreicht wird, wurden verdünnte Serumproben zur Bestimmung der Nachweisgrenze eingesetzt. Die auf diese Weise bestimmte Nachweisgrenze für humanes Serum kann aus Abbildung 15 abgelesen werden: Die Nachweisgrenze für die optimierte Methode beträgt 3 µg Selen/L Serum.

In der von Koh und Benson [56] publizierte Methode finden sich keine Angaben zur Nachweisgrenze. Der von Sheehan und Gao [57] angegebene Wert für die Nachweisgrenze ihrer vereinfachten spektrofluorimetrischen Methode liegt mit 10 µg/L noch immer höher, als die Nachweisgrenze für die hier beschriebene optimierte Methode.

Betrachtet man diese Werte für die Nachweisgrenzen unter klinischen Aspekten, so erfüllt die spektrofluorimetrischen Methode eine wichtige Anforderung für eine

Methode zur Selenbestimmung im klinischen Alltag: Die klinisch kritische Plasma-Selenkonzentration, ab der eine Selen-Supplementation erfolgen sollte, beträgt $23,7 \mu\text{g/L}$ ($0,3 \mu\text{mol/L}$) für Erwachsene [53]. Proben, welche diese Grenze unterschreiten, können also mit der beschriebenen Methode ohne Probleme erfasst werden. Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze ist die Methode sogar für die Überwachung des Selenstatus von Kindern und Neugeborenen geeignet.

4.2.6 Vergleich der spektrofluorimetrischen Methode zur AAS und NAA

Die optimierte spektrofluorimetrische Methode wurde mit anderen zur quantitativen Selenbestimmung gebräuchlichen Verfahren verglichen, wobei die NAA als 'Goldstandard' [53] gilt.

Der Korrelationskoeffizient für spektrofluorimetrisch oder mittels Atomabsorptionsspektrometrie ermittelten Selenkonzentrationen für 30 verschiedene Proben beträgt 0,89.

Beim Vergleich der optimierten spektrofluorimetrischen Methode mit dem 'Goldstandard' Neutronenaktivierungsanalyse (dargestellt in Abbildung 16) ergibt sich für diese 30 Proben ein Korrelationskoeffizient von 0,96.

Beim Vergleich der Neutronenaktivierungsanalyse und der Atomabsorptionsspektrometrie (Abb. 17) ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,76.

Die enge Korrelation zwischen der optimierten spektrofluorimetrischen Methode und der NAA beweist die hohe Genauigkeit der optimierten Methode. Die Korrelation der optimierten Methode zur AAS, dem momentan am häufigsten routinemäßig angewendetem Verfahren [53], ist niedriger. Auffällig ist jedoch die relativ schlechte Korrelation der AAS mit dem 'Goldstandard' NAA. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die optimierte spektrofluorimetrische Methode der bislang gebräuchlichsten Methode AAS in puncto Genauigkeit überlegen ist.

Die Wiederfindungsrate für standardisiertes Referenz-Serum mittels NAA betrug 98,4 %. Auch hier schnitt die optimierte Methode exzellent ab: Die Wiederfindungsrate liegt bei 98,8 % (siehe oben). Im Vergleich dazu betrug die Wiederfindungsrate für die

AAS nur 81,25 %. Andere Studien, in welchen die AAS eingesetzt wurde, berichten jedoch auch von höheren Wiederfindungsraten: Für die GFAAS (graphite furnace atomic absorption spectrometry) wurden Werte von 95 % [53] bzw. von 93-98 % [68] dokumentiert. Laut Literatur besteht das Hauptproblem der AAS in einem Präatomisierungs-Verlust von Selen, wodurch die in dieser Studie gefundenen Abweichung für die AAS verursacht sein könnten.

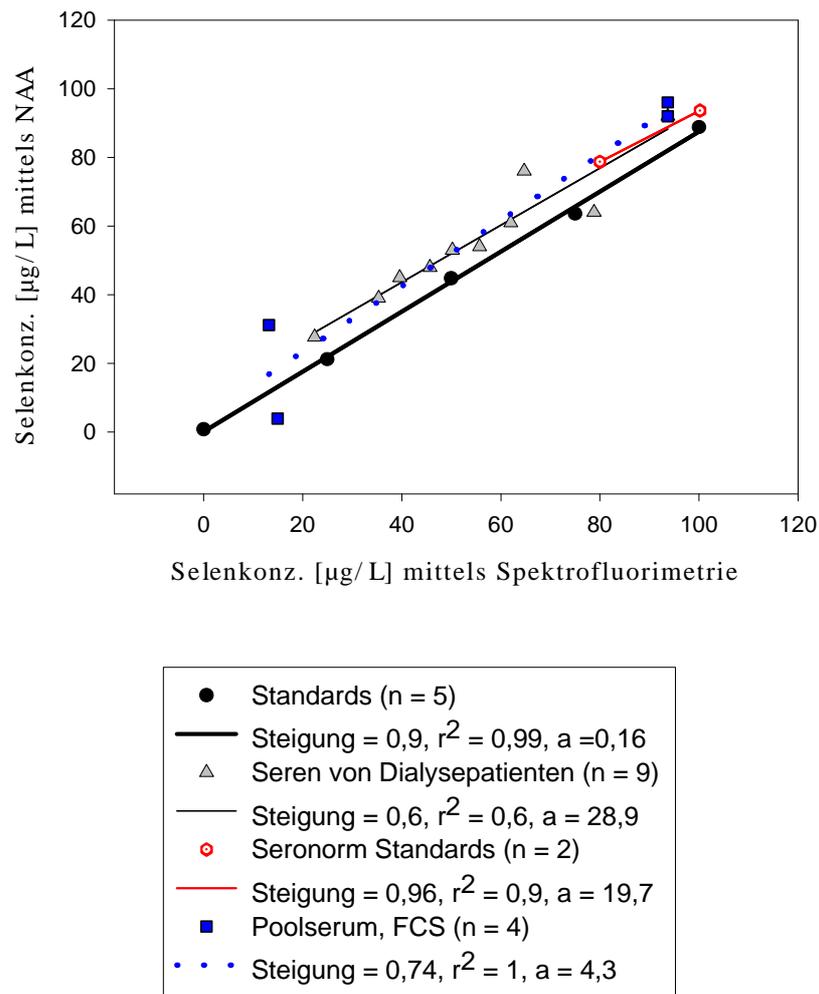


Abbildung 16: Korrelation der Selenkonzentrationen gleicher Proben, jeweils gemessen mit Spektrofluorimetrie und NAA.

Die aus der Literatur entnommenen Werte für die Nachweisgrenze für Selen im menschlichen Serum mittels AAS sind nicht konkordant: Laut Harrison, Littlejohn und Fells [68] liegt die Nachweisgrenze bei $0,8 \mu\text{g/L}$, doch Gardiner, Littlejohn, Halls und

Fell [69] dokumentieren eine Nachweisgrenze von 6 $\mu\text{g/L}$. Für die in dieser Arbeit beschriebene spektrofluorimetrischen Methode liegt die Nachweisgrenze für Selen im Humanserum mit 3 $\mu\text{g/L}$ deutlich niedriger. Doch weder AAS noch Spektrofluorimetrie können mit der Nachweisgrenze der NAA konkurrieren: Die Nachweisgrenze des Goldstandards liegt bei 10^{-5} $\mu\text{g/L}$ [70].

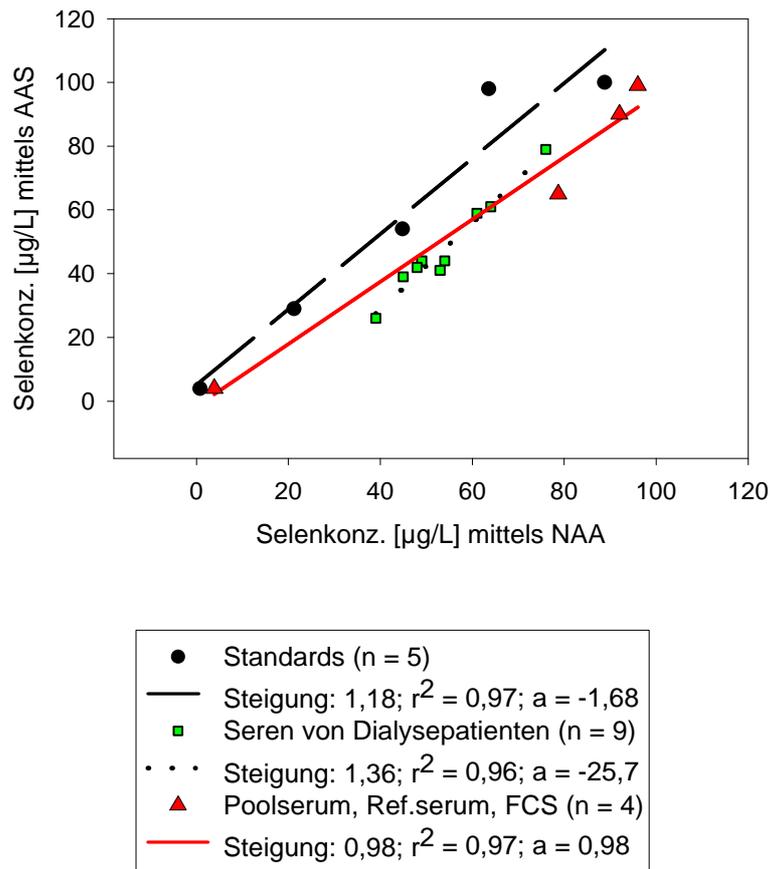


Abbildung 17: Korrelation der Selenkonzentrationen gleicher Proben, jeweils gemessen mit AAS und NAA.

Bei Betrachtung der drei diskutierten Verfahren unter wissenschaftlichen als auch klinisch praktischen Aspekten, kann die NAA wegen des apparativen und zeitlichen Aufwandes nicht als Routinemethode mit der AAS oder der Spektrofluorimetrie konkurrieren. Bei vergleichbarem zeitlichen Aufwand der AAS und der Spektrofluorimetrie schneidet die Spektrofluorimetrie aufgrund der geringeren

Anschaffungskosten und höherer Präzision besser ab und ist somit für eine genaue und kostengünstige Routinebestimmung klinischer Proben besser geeignet.

5 Zusammenfassung

Das Spurenelement Selen hat in den vergangenen Jahren zunehmend an klinischer Relevanz gewonnen, da einige Krankheiten mit einem Selenmangel in Verbindung gebracht werden konnten. Um den Selenstatus eines Individuums erfassen zu können und gegebenenfalls eine Selen-Substitution einzuleiten, bedarf es einer Methode, die genau, einfach und im klinischen Alltag einsetzbar ist.

Die bislang üblichen Verfahren der AAS sind relativ teuer bei der Geräteanschaffung und im Vergleich zu der hier vorgestellten optimierten spektrofluorimetrischen Methode ungenauer. Das derzeit genaueste Verfahren zur quantitativen Selenbestimmung, die NAA, ist aufgrund des immensen zeitlichen Aufwands und hoher Kosten für die klinische Routine ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde die erstmals von Koh und Benson [56] beschriebene spektrofluorimetrische Methode zur Selenbestimmung so modifiziert und optimiert, dass eine für die klinische Selenbestimmung biologischer Proben geeignete, genaue Methode resultierte.

Das zur Bestimmung eingesetzte Volumen an Serum konnte gegenüber dem von Koh und Benson [56] beschriebenen Verfahren um mehr als die Hälfte reduziert werden. Außerdem wurden in dieser Arbeit nur 400 μL einer Selen-Standardprobe im Gegensatz zu dem von Koh und Benson [56] eingesetzten 1 mL verwendet. Durch das geringere Probenvolumen war 1 mL der Säuremischung zum Aufschluss der Proben ausreichend.

Die Schritte der Inkubation wurden verkürzt und mittels eines Heizblocks dahingehend vereinfacht, dass Inkubationen im Wasserbad überflüssig waren. Unnötige Wartezeiten durch Vorheizen des Heizblocks wurden ausgelassen. Außerdem wurde die Temperatur auf 190 °C reduziert, weil sie für den Probenaufschluss ausreichend war. Da bei dieser Temperatur die Teflon-beschichteten Deckel der Probenröhrchen geschont wurden, konnten sie für mehrere Versuchsreihen eingesetzt werden. Dies führte zu einer weiteren Kosteneinsparung.

Bei der Zugabe von rauchender Salzsäure zu den Proben wurden potenzielle Selenverluste durch Ausspülen der Deckel vermieden. Die Reduktion erfolgte mit offenen Probenröhrchen, was zusätzlich das Abrauchen von überschüssiger Salpetersäure bewirkte.

Die Waschvorgänge der DAN-Lösung konnten auf 3 Durchgänge reduziert werden, da sich die Ergebnisse gut mit den Resultaten decken, die man mit den von Koh und Benson [56] verwendeten 4 Waschvorgängen erhielt.

Die in der Literatur widersprüchlich diskutierte Frage eines pH-Wert-Einflusses auf die Piazselenolbildung wurde auch für die hier beschriebene Methode erörtert. In Übereinstimmung mit Koh und Benson [56] wurde auch bei der optimierten Methode keine Einstellung des pH-Wertes vorgenommen.

Im Gegensatz zu der von Koh und Benson [56] beschriebenen Methode erfolgte in dem hier beschriebenen Verfahren die Zugabe von Cyclohexan zur Extraktion erst *nach* der Piazselenolbildung, da dadurch die Werte der Standardabweichung erheblich gesenkt werden konnten. Die weitere Optimierung des Extraktionsprozesses beinhaltete den zusätzlichen Gebrauch eines Vibrofix.

Entgegen der von Koh und Benson [56] postulierten Unabhängigkeit des Piazselenols gegenüber Lichteinwirkung, ergaben die Untersuchungen zur Lichtempfindlichkeit in dieser Arbeit, dass das Piazselenol direkter Lichteinwirkung nicht ausgesetzt werden sollte. Aus diesem Grund empfiehlt es sich auch, die spektrofluorimetrische Messung derselben Probe nur ein Mal durchzuführen.

Die Einstellungen des Perkin-Elmer Modells zur spektrofluorimetrischen Messung erwiesen sich als optimal bei einer Spaltbreite für die Excitation von 2,5 nm, einer Spaltbreite für die Emission von 10 nm, 364 nm für die Excitation, 520 nm für die Emission und einer Integrationszeit von 1 Sekunde.

Die Versuche zur Validierung zeigten, dass die hier beschriebene Methode eine zuverlässige und gut reproduzierbare Bestimmung der Selenkonzentration ermöglicht, deren Ergebnisse gut mit denen von standardisierten Referenzsubstanzen übereinstimmen. Ein Selenverlust tritt nicht auf; zu den Proben zugesetztes Selen wird vollständig nachgewiesen. Auch in organischen Verbindungen gebundenes Selen kann gänzlich aus den Verbindungen gelöst und nachgewiesen werden.

6 Ausblick

Die niedrige Nachweisgrenze dieser optimierten Methode erweitert deren Anwendungsbereich: Selenkonzentrationen von Gewebeproben, Urin [71] oder anderen biologische Materialien mit niedrigem Selengehalt können mit dieser Methode zuverlässig und genau bestimmt werden.

Somit kann die Methode auch für weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt werden und zur Aufklärung der wichtigen Rolle des Spurenelements Selen beitragen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Schwarz, K., Foltz, C.:
Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.
J of American Chem Soc (1957); 79: 3292-3293.
- 2 Flohé, L., Günzler, W., Schock, H.:
Glutathione peroxidase: a selenoenzyme.
FEBS Letters 1973; 32: 132-134.
- 3 Rotruck, J., Pope, A., Ganther, H., Swanson, A., Hafeman, D., Hoekstra, W.:
Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase.
Science 1973; 179: 588-590.
- 4 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.
- 5 Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., Elger, W.:
Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins.
Biochim Biophys Acta 1988; 966: 12-21.
- 6 Winnefeld, K.:
Selen, Antioxidanzienstatus und Radikale/ reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin.
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 8-10.

- 7 Flohé, L.:
Selen im Peroxidstoffwechsel.
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 5-7.
- 8 Arthur, J., Beckett, G.:
Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium.
Proceedings of the Nutrition Society 1994; 53: 615-625.
- 9 Hayashi, T., Ueno, Y., Okamoto, T.:
Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin.
J of Biol Chem (1993); 268: 11380-11388.
- 10 Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., Tanaka, H.:
Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function.
J of Biol Chem (1999); 274: 3182-3188.
- 11 Holmgren, A.:
Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin reductase.
BioFactors (2000); 11: 63-64.
- 12 Schütze, N., Dreher, I., Jakob, F., Köhrle, J.:
Neue menschliche Selenoproteine: Selenoprotein P und Thioredoxin-Reduktase.
J Lab Med 1998; 22: 539-544.
- 13 Köhrle, J.:
The trace element selenium and the thyroid gland.
Biochimie 1999; 81: 527-533.

- 14 Köhrle, J.:
Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family.
Molecular Cellular Endocrinology (1999); 151: 103-119.
- 15 Köhrle, J.:
The selenoenzyme family of deiodinase isoenzymes controls local thyroid availability.
Review of Endocrine Metabolic Dis (2000); 1: 49-58.
- 16 Arthur, J., Beckett, G.:
Roles of selenium in type 1 iodothyronine 5`-deiodinase and in thyroid and iodine metabolism.
Selenium in Biology and Medicine (1994), Springer, New York; 93-115.
- 17 Berry, M., Banu, L., Larsen, P.:
Type 1 iodothyronine deiodinase is a selenocystein-containing enzyme.
Nature (1991); 349: 438-440.
- 18 Arthur, J., Nicol, F., Gill, B.:
Selenium, type 1 iodothyronine 5`-deiodinase activity and thyroid hormone metabolism in the rat.
Trace Elements in Man and Animals – TEMA 8 (1993), Verlag Media Touristik, Gersdorf; 613-618.
- 19 Schieferstein, G., Voß, A.:
Selen im menschlichen Ejakulat.
Fertilität 1994; 10: 22-25.
- 20 Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L.:
Dual function of the selenoproteine PHGPx during sperm maturation.
Science 1999; 285: 1393-1396.

- 21 Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., Behne, D.:
Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation.
FASEB J 2001; 10: 1096.
- 22 Calvin, H., Grosshans, K., Musicant-Shikora, S., Turner, S.:
A developmental study of rat sperm and testis selenoproteins.
J of Reproduction and Fertility (1987); 81: 1-11.
- 23 Seo, Y., Kelly, M., Smith, M.:
Selenomethionine regulation of p53 by a ref1 dependent redox mechanism.
Proc Natl Acad Sci USA (2002); 22:14548-14553.
- 24 Sinha, R., Bansal, M., Ganther, H., Medina, D.:
Significance of selenium-labelled proteins for selenium`s chemoprotective functions.
Carcinogenesis 1993; 14: 1895-1900.
- 25 Ganther, H.:
Selenium metabolism, selenoproteins, and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase.
Carcinogenesis 1999; 20: 1657-1666.
- 26 Mörk, H., Al-Taie, O., Dreher, I., Karvar, S., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.:
Expression von Selenoproteinen im Gastrointestinaltrakt – Implikationen für die Karzinogenese.
InFoOnkologie 1999; 2: 2-20.

- 27 Ip, C.:
Lessons from basic research in selenium and cancer prevention.
American Society for Nutritional Sciences 1998; 1845-1854.
- 28 Willet, W., Morris, J., Pressel, S., Taylor, J., Polk, B., Stampfer, M., Rosner, B.,
Schneider, K., Hames, C.:
Prediagnostic serum selenium and risk of cancer.
The Lancet 1983; July (II): 130-134.
- 29 Burk, R.:
Selenium and cancer: meaning of serum selenium levels.
J Nutrition 1986; 116: 1584-1586.
- 30 Brandt, P., Goldbohm, R., Veer, P., Bode, P., Dorant, E., Hermus, R., Sturmans,
F.:
A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer.
Cancer Research 1993; 53: 4860-4865.
- 31 Schnurr, K., Belkner, J., Ursini, F., Schewe, T., Kühn, H.:
The selenoenzyme hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity
of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of
the oxygenation products.
J of Biol Chem (1996); 271: 4653-4658.
- 32 Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., Nakagawa, Y.:
Suppression of leucotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.
J of Biol Chem (1998); 273: 1990-1997.
- 33 Steinberg, D.:
Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance.
J of Biol Chem (1997); 272: 20963-20966.

- 34 Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M., Parthasarathy, S., Sigal, E., Sarkioja, T., Witztum, J., Steinberg, D.:
Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation-specific lipid-protein adducts.
J of Clinical Investigation (1991); 87: 1146-1152.
- 35 Yang, F., Lin, Z., Li, S., Guo, B., Yin, Y.:
Keshan disease – an endemic mitochondrial coardiomyopathy in China.
J Trace Elements 1988; 2: 157-163.
- 36 Li, F.-S., Guan, J.-Y., Duan, Y.-J., Zou, L.-M., Yan, X.-J., Ma, P., Su, Q., Li, L., Li, S.-Y.:
The selenium and phospholipid (phosphatidylcholine) deficiency and low temperature of environment may be the pathogenetic basis of Kashin-Beck disease.
Selenium in Biology and Medicine, Springer-Verlag 1989; S. 270-276.
- 37 Lin, T., Tseng, W., Cheng, S.:
Direct determination of selenium in human blood plasma and seminal plasma by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry and clinical application.
Biological Trace Element Research 1998; 64: 133-149.
- 38 Thomson, C., Smith, T., Butler, K., Packer, M.:
An evaluation of urinary measures of iodine and selenium status.
J Trace Elements Med Biol 1996; 10: 214-222.

- 39 Heinle, K., Adam, A., Gradl, M., Wiseman, M., Adam, O.:
Selenkonzentration in den Erythrozyten bei Patienten mit rheumatoider
Arthritis. Klinische und laborchemische Entzündungszeichen unter
Supplementierung mit Selen.
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 29-31.
- 40 Kallistratos, G., Evangelou, A., Seferiadis, K., Vezyraki, P., Barboutis, K.:
Selenium an heamodialysis : serum selenium levels in healthy persons, non-
cancer and cancer patients with chronic renal failure.
Nephron 1985; 41: 217-222.
- 41 Dworkin, B., Wesely, S., Rosenthal, W., Schwartz, E., Weiss, L.:
Diminished blood selenium levels in renal failure patients on dialysis:
correlation with nutritional status.
Am J Med Sci 1987; 293 (1): 6-12.
- 42 Saint Georges, M., d'Auzac, C., Bonnefont, D., Bourely, B., Jaudon, M., Galli,
A.:
Implication of selenium and glutathione peroxidase deficiency in the
pathology of hemodialyzed patients.
Nève, J., Favier, A.: Selenium in Medicine and Biology, de Gruyter Verlag
1988, S. 289-292.
- 43 Richard, M., Arnaud, J., Jurkowitz, C., Hachache, T., Meftahi, H., Laporte, F.,
Forêt, M., Favier, A., Cordonnier, D.:
Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic
renal failure.
Nephron 1991; 57: 10-15.
- 44 Bonomini, M. Albertazzi, A.:
Selenium and chronic renal failure.
Italian J Mineral & Electrolyte Metabolism 1997; 11 (1): 9-17.

- 45 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.
- 46 Gramm, H.-J., Kopf, A., Brätter, P.:
Bedeutung des Spurenelements Selen im Rahmen der parenteralen Ernährung (TPN).
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 20-22.
- 47 Zimmermann, T., Albrecht, S., Kühne, H., Vogelsang, U., Grützmann, R., Kopprasch, S.:
Selensubstitution bei Sepsispatienten – Eine prospektive randomisierte Studie.
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 3-4.
- 48 Gärtner, R., Angstwurm, M., Schottdorf, J.:
Selensubstitution bei Sepsispatienten.
Medizinische Klinik (1997); Suppl. III: 12-14.
- 49 Siegers, C., Richter, B., Pentz, R.:
Selensubstitution bei Selenmangel und Folgeerkrankungen.
Deutsches Ärzteblatt 1994; 91 (44): 2233-2237.
- 50 Richard, M. J., Ducros, V., Forêt, M., Arnaud, J., Coudray, C., Fusselier, M., Favier, A.:
Reversal of selenium and zinc deficiencies in chronic hemodialysis patients by intravenous sodium selenite and zinc gluconate supplementation.
Biol Trace Element Research 1993; 39: 149-157.
- 51 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.

- 52 World Health Organization:
Environmental health criteria 58: Selenium.
World Health Organization (1987), Geneva.
- 53 Sheehan, T., Halls, D.:
Measurement of selenium in clinical specimens.
Ann Clin Biochem 1999; 36: 301-315.
- 54 Hieftje, G., Vickers, G.:
Developments in plasma source / mass spectrometry.
Analytica Chimica Acta (1989); 216: 1-24.
- 55 Vanhoe, H.:
A review of the capabilities of ICP-MS for trace element analysis in body fluids and tissues.
Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease (1993); 7: 131-139.
- 56 Koh, T., Benson, T.:
Critical re-appraisal of fluorometric method for determination of selenium in biological materials:
Assoc Off Anal Chem 1982; 66: 918-926.
- 57 Sheehan, T., Gao, M.:
Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine.
Clin Chem 1990; 36: 2124-2126.
- 58 Cukor, P., Lott, P.:
The kinetics of the reaction of selenium (IV) with 2,3-diaminonaphthalene.
J Phys Chem 1965; 69 (10): 3232-3239.

- 59 Salonen, J., Salonen, R., Lappeteläinen, R., Mäenpää, P., Alfthan, G., Puska, P.:
Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A
and E: matched case-control analysis of prospective data.
British Medical Journal 1985; 290: 417-420.
- 60 Behne, D., Weiss-Nowak, C., Kalcklösch, M., Westphal, C., Gessner, H.,
Kyriakopoulos, A.:
Application of nuclear analytical methods in the investigation and
identification of new selenoproteins.
Biol Trace Elem Res 1994; 43-45: 287-297.
- 61 Cukor, P., Walzcyk, J., Lott, P.:
The application of isotopic dilution analysis to the fluorometric determination
of selenium in plant material.
Analytical Chimica Acta 1964; 30: 473-482.
- 62 Bach, K., Haas, H., Mathieu, A.:
Die Bestimmung des Selens in Nahrungsmitteln.
Vita Min Spur 1990; 5: 161-166.
- 63 Lott, P., Cukor, P., Moriber, G., Solga, J.:
2,3-Diaminonaphthalene as a reagent for the determination of milligram to
submicrogram amounts of selenium.
Analytical Chemistry 1963; 35 (9): 1159-1163.
- 64 Bayfield, R., Romalis, L.:
pH control in the fluorimetric assay for selenium with 2,3-
diaminonaphthalene.
Anal Biochem 1985; 144: 569-576.

- 65 Parker, C., Harvey, L.:
First description of fluorescent Se-DAN piaszelenol.
Analyst 1962; 87: 558–565.
- 66 D’Ulivo, A., Lampugnani, L., Sfetsios, I., Zamboni, R.:
Studies on total selenium determination in biological samples by hydride
generation non-dispersive atomic fluorescence spectrometry after
hydrobromic acid/bromine wet digestion.
Spectrochimica Acta 1993; 488 (3): 387-396.
- 67 D’Ulivo, A., Lampugnani, L., Sfetsios, I., Zamboni, R., Forte, C.:
Studies on the breakdown of organoselenium compounds in a hydrobromic
acid-bromine digestion system.
Analyst 1994; 119: 633-640.
- 68 Harrison, I., Littlejohn, D., Fells, G.:
Distribution of selenium in human blood plasma and serum.
Analyst 1996; 121: 189-194.
- 69 Gardiner, P., Littlejohn, D., Halls, D., Fell, G.:
Direct determination of selenium in human blood serum and plasma by
electrothermal atomic absorption spectrometry.
J Trace Elements Med Biol 1995; 9: 74-81.
- 70 Dauchy, X., Potin-Gautier, M., Astruc, A., Astruc, M. :
Analytical methods for the speciation of selenium compounds : a review.
Fresenius J Anal Chem 1994; 348: 792-805.
- 71 Janghorbani, M., Xia, Y., Whanger, P., 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.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Stober, C.N., Schiller, D., Schirbel, A., Rendl, J., Behne, D., Koehrle, J.:
An Optimized Spectrofluorimetric Method for Selenium Detection in Human Plasma, Serum and Tissue.
The Analyst

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich besonders

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Josef Köhrle

für die Überlassung des Dissertationsthemas, die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in seinen Labors, die nette Betreuung und die Übernahme des Referats danken.

Für die Betreuung dieser Arbeit danke ich außerdem

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Johann Rendl

Herrn Dr. rer. nat. Dirk Schiller

und **Herrn Dr. rer. nat. Andreas Schirbl.**

Des Weiteren bedanke ich mich bei

Herrn Prof. Dr. med. Wanner

für die Übernahme des Koreferats.

Dank gebührt auch

Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Behne

für die Durchführung der NAA

und der

biosyn Arzneimittel GmbH

für die Messungen mit dem Atomabsorptions-Spektrometer.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe, die mich in technischen Fragen unterstützten.

Lebenslauf

Geburtsdatum 06. November 1975
Geburtsort Karlsruhe

Schulbildung

Sept. 1982 – Aug. 1984 1./2. Grundschulklasse [Englewood Cliffs, New York, USA]
Aug. 1983 – Aug. 1984 Deutscher Samstagsunterricht [UNO-Schule, N.Y., USA]
Sept. 1984 – Juli 1986 3./4. Grundschulklasse [Hasselroth]
Sept. 1986 – Juli 1993 Grimmelshausen Gymnasium [Gelnhausen]
Sept. 1993 – Juni 1995 Deutsche Schule New York [New York, USA]
Abschluss: Reifeprüfung

Hochschulbildung

Sept. 1995 – Aug. 1996 Wesleyan University [Connecticut, USA]
Nov. 1996 – April 2003 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität
[Würzburg]
Sept. 1998 Ärztliche Vorprüfung
Sept. 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April – Aug. 2002 1. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie und
Aug. – Dez. 2002 2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin
[Juliusspital, Würzburg]
Dez. – März 2002 3. Tertial des Praktischen Jahres, Gynäkologie
[Universitätsklinik Würzburg]
April 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2003 Erhalt der vorläufigen Approbation
August 2003 Beginn der ärztlichen Tätigkeit auf dem Gebiet der Inneren
Medizin [Bern, Schweiz]

Würzburg, Mai 2003

C. N. Steber