

**Analytische Untersuchungen und
chemometrische Modellierungen hinsichtlich
des Transportverhaltens von Selenspezies
in vitro mittels Ussing-Kammer-Technik**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplomchemiker (Umweltchemie) Denis Pick
geboren am 27.08.1983 in Pößneck

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen W. Einax, Jena
2. Prof. Dr. Gerhard Jahreis, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.04.2013

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AFS	Atomfluoreszenzspektrometrie
ANN	Artificial neural network
BG	Bestimmungsgrenze
CCT	Collision cell technology
CE	Kapillarelektrophorese
CNRC	National Research Council Canada
CRI	Collision reaction interface
DBT	Dynamic bandpass tuning
DMDS _e	Dimethyldiselenid
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMSe	Dimethylselenid
DRC	Dynamic reaction cell
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Erfassungsgrenze
FNB	Food and Nutrition Board
GC	Gaschromatografie
GE	Gelelektrophorese
γ -Glu-MeSEC	γ -Glutamyl-Se-Methylselenocystein
GPx	Glutathionperoxidase
GRNN	Generalized regression neural network
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	Haupteffekte
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
IDIO	Iodthyronin-Deiodinase
IEC	Ion exchange chromatography
INMS	Institute for National Measurement Standards

KG	Körpergewicht
LA-ICP-MS	Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry
LD	Letale Dosis
LOH	Fettsäurealkohol
LOOH	Lipidhydroperoxid
MeOH	Methanol
MeSEC	Selen-Methylselenocystein
MeWe	Mediumwechsel
MIP-OES	Mikrowellen-induzierte Plasmaemissionsspektrometrie
MLP	Multilayer perceptron
MLR	Multiple lineare Regression
MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze
NOAEL	No observed adverse effect level
OK	Opossum kidney (Opossum Nierenepithelzellen)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Polycarbonat
PEEK	Polyetheretherketon
PET	Polyethylenterephthalat
PLS	Partial-Least-Squares-Regression
PN	Probennahmezeitpunkt
PP	Polypropylen
PRESS	Predicted residual sum of squares
PTFE	Polytetrafluorethylen
PW	Prüfwert
RBF	Radiale Basisfunktion
RDA	Recommended dietary allowance
RMSEP	Root mean square error of prediction
RPC	Reversed-phase chromatography
RPIPC	Reversed-phase ion-pair chromatography
SCF	Scientific Committee on Food
SDS-PAGE	Natrium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Size exclusion chromatography
SeCys	Selenocystein

SeCys ₂	Selenocystin
SeMet	Selenomethionin
SePP	Selenoprotein P
SPME	Solid phase microextraction
SPS2	Selenophosphat-Synthetase 2
SVP	Statistische Versuchsplanung
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TMSe ⁺	Trimethylselenium-Ion
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TRxR	Thioredoxin-Reduktase
TW	Tabellenwert
VB	Vertrauensbereich
WE	Wechselwirkungseffekte
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organization

Formelverzeichnis

a	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
α	Signifikanzniveau (Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art)
A	Fläche
b	Steigung der Kalibriergeraden
β	Signifikanzniveau (Wahrscheinlichkeit für Fehler 2. Art)
B_i	Regressionskoeffizient
B_0	Absolutglied
B^*	Signifikanzschranke
c	Konzentration
DS^2	Differenz der Abweichungsquadrate
f	Zahl der Freiheitsgrade
G_t	Gewebeleitfähigkeit
I	Stromstärke
k	Faktor der vorgegebenen Messunsicherheit oder Zahl der Variablen
m	Zahl der Messungen oder Zahl der Faktorstufen
n	Zahl der Kalibrierstandards oder Zahl der Wiederholbestimmungen
N	Zahl der Versuche
P	Statistische Sicherheit
P_{app}	Apparent permeability coefficient
PD_t	Transepitheliale Potenzialdifferenz
$P_{serosal}$	Durchlässigkeit in Richtung serosaler Seite
$\Phi_{n, \frac{\alpha}{2}}$	Faktor zur Schnellschätzung bei der Kalibriergeradenmethode
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate
r	Korrelationskoeffizient
r^2	Bestimmtheitsmaß
R	Widerstand
RSD	Relative Standardabweichung
R_t	Gewebewiderstand
s	Standardabweichung
s^2	Varianz
s_B	Fehler des Regressionskoeffizienten
s_k^2	Einzelvarianz

s_R^2	Restvarianz
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
s_y	Mittlerer Messfehler
s_{yx}	Reststandardabweichung
s_{y1}	Reststandardabweichung der linearen Kalibration
s_{y2}	Reststandardabweichung der quadratischen Kalibration
t	Zeit
$t_{f,\alpha}$	Quantil der t -Verteilung
$T_{serosal}$	Transportrate in Richtung serosaler Seite
U	Spannung
V	Volumen
V_{x0}	Verfahrensvariationskoeffizient
y_i	Referenzwert
\hat{y}_i	Vorhergesagter Wert

Inhaltsverzeichnis

Seitenzahl

Abkürzungen

Formelverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Selen und Selenspezies	3
2.1.1	Vorkommen und Anwendung	3
2.1.2	Toxizität und Essenzialität	6
2.1.3	Physiologische Bedeutung und Selenstatus	8
2.1.4	Bioverfügbarkeit und Resorption im Menschen	12
2.1.5	Selenmetabolismus	13
2.2	Humane Adenokarzinomzelllinie Caco-2	15
2.3	Ussing-Kammer-Technik	16
2.4	Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit induktiv-gekoppelter Plasmamassenspektrometrie	18
2.4.1	Chromatografische Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	18
2.4.1.1	Umkehrphasen-Chromatografie (RPC)	19
2.4.1.2	Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatografie (RPIPC)	19
2.4.1.3	Größenausschluss-Chromatografie (SEC)	20
2.4.1.4	Ionenaustausch-Chromatografie (IEC)	21
2.4.2	Detektion mittels induktiv-gekoppelter Plasmamassenspektrometrie mit dynamischer Reaktionszelle (ICP-DRC-MS)	22
2.4.3	Selenspeziesanalytik mit HPLC-ICP-MS	24
2.4.4	Andere Methoden der Selenspeziesanalytik	26
2.5	Chemometrische Methoden	27
2.5.1	Statistische Versuchsplanung (SVP)	28
2.5.2	Multiple lineare Regression (MLR)	31
2.5.3	Partial-Least-Squares-Regression (PLS)	33
2.5.4	Künstliche neuronale Netzwerke (ANN)	34

3	Experimenteller Teil	36
3.1	Standardzellkultivierung	36
3.2	Ussing-Kammer-Experimente	37
3.2.1	Kultivierung der Caco-2-Zellen auf Snapwell®-Einsätzen	37
3.2.2	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	38
3.2.3	Experimentelle Bedingungen	39
3.2.3.1	Ussing-Kammer	39
3.2.3.2	Elektrophysiologische Parameter	40
3.2.3.3	Transportexperimente mittels statistischer Versuchsplanung	41
3.2.3.4	Akkumulationsexperimente	43
3.3	Enzymatische Hydrolyse des zertifizierten Referenzmaterials	43
3.4	Apparative Messbedingungen und Kalibration	44
3.4.1	Bestimmung des Selengesamtgehaltes mittels ICP-DRC-MS	44
3.4.2	Selenspeziesanalytik mittels HPLC-ICP-DRC-MS	45
3.5	Statistische Auswertung	47
4	Methodenentwicklung und Validierung der Selenspeziesanalytik	48
4.1	Kopplung von Umkehrphasen-Chromatografie mit ICP-DRC-MS	48
4.2	Kopplung von Anionenaustausch-Chromatografie mit ICP-DRC-MS	49
4.2.1	Untersuchungen zur Zusammensetzung der mobilen Phase	50
4.2.2	Wahl eines geeigneten Messisotops	51
4.2.3	Optimierung der Messbedingungen	53
4.3	Validierung	54
4.3.1	Linearität	55
4.3.2	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	58
4.3.3	Präzision	60
4.3.4	Richtigkeit	62
4.3.4.1	Analyse des zertifizierten Referenzmaterials	62
4.3.4.2	Wiederfindungsexperimente	63
4.3.5	Selektivität und Robustheit	66

5	Transportverhalten der Selenspezies <i>in vitro</i>	68
5.1	Voruntersuchungen zu den Ussing-Kammer-Experimenten	68
5.1.1	Einfluss des Membranmaterials der Snapwell [®] -Einsätze	68
5.1.2	Überprüfung der Monolayerintegrität	69
5.2	Transportexperimente	71
5.2.1	Einzelapplikation der Selenspezies	71
5.2.2	Applikation von zwei konzentrationsabhängigen Selenspeziesmischungen	76
5.2.3	Vergleich beider Applikationsformen	78
5.3	Akkumulation der Selenspezies durch Caco-2-Zellen	81
6	Bewertung und Interpretation der Zelleexperimente mittels chemometrischer Methoden	83
6.1	Regressionsanalyse mit Wechselwirkungseffekten des 2 ⁴ -Faktorenplans	83
6.2	Regressionsanalyse ohne Wechselwirkungseffekte	87
6.3	Modellierung mit PLS	89
6.4	Modellierung mit ANN	91
6.5	Vergleich der verwendeten chemometrischen Methoden	94
7	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	96

Literaturverzeichnis

Anhang

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

Lebenslauf

1 Einleitung und Problemstellung

Selen wurde seit seiner Entdeckung im Jahre 1817 lange Zeit als rein toxisches Element angesehen. Seitdem Selen 1973 als Bestandteil der Glutathionperoxidase, einem Enzym zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress, identifiziert wurde, gilt es aber als essenzielles Spurenelement für Mensch und Tier. Der Konzentrationsbereich, zwischen dem Selen toxisch bzw. essenziell wirkt, ist sehr schmal. So wird vermutet, dass eine nahrungsbedingte Aufnahme von mehr als 1 mg kg^{-1} Se zu toxischen Erscheinungen führt, wohingegen eine Aufnahme von weniger als $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ Selenmangelercheinungen hervorrufen kann [1].

Die Nahrung ist die mit Abstand wichtigste Aufnahmequelle für den Menschen [2]. In pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln sind die wichtigsten Selenspezies Selenomethionin (SeMet), Selen-Methylselenocystein (MeSEC), Selenocystein (SeCys), γ -Glutamyl-Se-Methylselenocystein (γ -Glu-MeSEC) und Selenat. Darüber hinaus werden Nahrungsergänzungsmittel in unserer Gesellschaft immer populärer, bei denen Selenit häufig Bestandteil ist.

Die Bioverfügbarkeit von Selenspezies wurde bereits in vielen Studien untersucht und liegt zwischen 70-95 % [3]. Häufig werden dafür *In-vitro*-Methoden angewendet, bei denen die simulierte gastrointestinale Verdauung die am weitesten verbreitete Methode darstellt. Mit dieser Methode kann festgestellt werden, welche Selenverbindungen nach der Verdauung für die Resorptionsvorgänge vom Darm ins Blut zur Verfügung stehen. Für die Untersuchungen des transepithelialen Transports ist eine weitere *In-vitro*-Methode etabliert. Es handelt sich dabei um die Caco-2-Zelllinie, mit der intestinale Transportvorgänge simuliert werden können [4].

Die bisherigen wissenschaftlichen Abhandlungen umfassten Transportexperimente der beiden anorganischen Spezies Selenit und Selenat sowie der organischen Formen SeMet, MeSEC, Selenocystin und methylselenige Säure. Weiterhin wurde der Einfluss von Glutathion und Sulfat auf den Transport betrachtet [5, 6]. Allerdings gibt es bisher keine Arbeiten, bei denen das Transportverhalten der Selenspezies bei Vorhandensein mehrerer Selenspezies gleichzeitig untersucht wurde. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesem Sachverhalt, da ein gegenseitiger Einfluss der Spezies auf die Transportvorgänge wahrscheinlich ist. Des Weiteren resultiert der Ansatz aus der Tatsache, dass die konsumierten Nahrungsmittel nicht nur eine, sondern eine Vielzahl an Selenverbindungen enthalten. Eine weitere Neuerung zu bisherigen Arbeiten zum Selenspeziestransport ist die

Anwendung der Ussing-Kammer-Technik. Sie ist eine elektrophysiologische Methode, mit der unter anderem kontinuierlich die Lebensfähigkeit der Caco-2-Zellmonolayer überwacht werden kann.

Für die Modellexperimente zum Transportverhalten *in vitro* wurden die Spezies Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC gewählt. Bei diesen vier Verbindungen handelt es sich um für die menschliche Ernährung relevante Selenspezies, die auch nach einer simulierten gastrointestinalen Verdauung unverändert vorliegen [2]. Vor den eigentlichen Transportexperimenten musste eine analytische Methode zur Bestimmung der Selenspezies entwickelt werden. Hierbei sind die Kopplungstechniken weit verbreitet [7]. Als Methode wurde die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit der induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometrie (HPLC-ICP-MS) gewählt, optimiert und anschließend validiert. Neben einer optimalen Trennleistung sollten auch der zeitliche Aufwand und ökonomische Aspekte bei der Entwicklung der Analysenmethode berücksichtigt werden.

Durch die Anwendung der statistischen Versuchsplanung kann der Versuchsaufwand minimiert werden bei gleichzeitigem maximalen Informationsgewinn. Eine Einsparung von Zeit und Kosten ist somit möglich. Die Auswertung des sich daraus ergebenden 2^4 -Faktorenplans führt zur Identifizierung und Quantifizierung von Haupteinflüssen und Wechselwirkungseffekten hinsichtlich des Transportverhaltens der vier Selenspezies. Eine Aussage über die gegenseitige Beeinflussung der Spezies ist somit möglich. Im abschließenden Schritt sollen verschiedene multivariate Regressionsmethoden zur Auswertung der erhaltenen Daten herangezogen werden, um anhand eines Modellsystems Vorhersagen zum Transport der Selenspezies durch Caco-2-Zellmonolayer treffen zu können.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, eine leistungsfähige Kopplungsmethode der HPLC-ICP-DRS-MS zur Selenspeziesanalytik zu validieren und das Transportverhalten von vier für die Humanernährung relevanten Selenspezies, unter Zuhilfenahme chemometrischer Methoden, zu untersuchen.

2 Grundlagen

2.1 Selen und Selenspezies

2.1.1 Vorkommen und Anwendung

Selen wurde im Jahre 1817 von dem schwedischen Mediziner und Chemiker Jöns Jakob Berzelius im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik entdeckt. Es ist natürlicher Bestandteil der Erdrinde und kommt in Spuren in Form von Seleniden als Begleiter sulfidischer Erze, wie Pyrit (FeS_2), Kupferkies (CuFeS_2) und Zinkblende (ZnS) vor. Der durchschnittliche Selengehalt im Boden beträgt $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ und ist somit um etwa vier Größenordnungen kleiner als der des chemisch verwandten Schwefels [8, 9]. Geogen bedingt unterliegt der Selenbodengehalt allerdings großräumigen Schwankungen (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Selengehalt im Boden verschiedener Länder und Regionen, verändert nach [2]

Land	Selen im Boden in mg kg^{-1}
Belgien	0,11
China (Enshi Region)	10-40
China (Keshan Gebiet)	0,17
Finnland	0,15-0,72
Frankreich	0,18
Spanien	0,07-0,39
Schweden	0,39
Großbritannien	0,18-29,70
USA	0,11-18,36

In Europa finden sich selenarme Böden, beispielsweise in Belgien, Frankreich, den skandinavischen Ländern (Finnland, Schweden) und Spanien. Die Angaben für Deutschland reichen von selenarm bis gesicherte Versorgung. In den Ländern China, Großbritannien und USA werden die großen regionalen Schwankungen der Selengehalte im Boden deutlich, wobei selenreiche Böden in der Region um den Bezirk Enshi in China und in den USA vor allem in Nord-Dakota, Süd-Dakota, Nebraska, Kansas und Colorado vorkommen. Die selenreichsten Böden der Welt, mit bis zu 1250 mg kg^{-1} Selen, wurden in Limerick, Tipperary und der Grafschaft Meath in Irland gefunden [10].

Technische Bedeutung hat Selen bei der Herstellung von elektrischen Gleichrichtern und Photozellen sowie in der Xerographie („elektrostatisches Kopieren“). Des Weiteren wird es als Legierungsbestandteil in der Metallindustrie verwendet und dient als Färbungs- und Entfärbungsmittel in der Glas- und Keramikindustrie [11]. Selenverbindungen finden ebenfalls Verwendung in der Landwirtschaft (als Zusatz in Dünge- und Futtermitteln) und als Nahrungsergänzungsmittel in der Humanernährung.

Selen kommt in verschiedenen chemischen Formen (Selenspezies) vor. Im Allgemeinen wird zwischen anorganischen und organischen Selenspezies unterschieden. Die anorganischen Verbindungen spielen vor allem in der unbelebten Natur eine Rolle, wohingegen die organischen Verbindungen in der belebten Natur überwiegen. Wichtige biologische und technische Selenverbindungen sind in der Tabelle 2.2 und ausgewählte Strukturformeln in Abbildung 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Biologisch und technisch bedeutende Selenspezies, verändert nach [12]

Oxidationsstufe	Bezeichnung	Summenformel	Vorkommen
Se ²⁻	Selenwasserstoff	H ₂ Se	Metabolit
	Methylselenol	CH ₃ SeH	Metabolit
	Dimethylselenid	(CH ₃) ₂ Se	Atemluft
	Trimethylselenium-Ion	(CH ₃) ₃ Se ⁺	Urin
	Selenocystein (SeCys)	H ₇ C ₃ SeNO ₂	In Selenoenzymen
	Se-Methylselenocystein (MeSEC)	H ₉ C ₄ SeNO ₂	Knoblauch, Brokkoli
	γ-Glutamyl-Se-Methylselenocystein (γ-Glu-MeSEC)	H ₁₆ C ₉ SeN ₂ O ₅	Knoblauch, Brokkoli
	Selenomethionin (SeMet)	H ₁₁ C ₅ SeNO ₂	Unspezifische Se-Proteine
Se ⁰	Elementares Selen		Technische Anwendung
Se ⁴⁺	Selendioxid	SeO ₂	Technische Anwendung
	Selenige Säure	H ₂ SeO ₃	
	Natriumselenit	Na ₂ SeO ₃	Metabolit, Supplement
Se ⁶⁺	Selensäure	H ₂ SeO ₄	
	Natriumselenat	Na ₂ SeO ₄	Metabolit, Supplement

Die Nahrung stellt den mit Abstand wichtigsten Aufnahmepfad von Selenspezies für den Menschen dar (Tabelle 2.3). Dabei können die Selengehalte in Abhängigkeit von Herkunft und Entstehung der Nahrungsmittel von den Daten der Tabelle abweichen. Ursache hierfür ist die maßgebliche Abhängigkeit des Selengehaltes der Nahrung, insbesondere der pflanzlichen Nahrungsmittel, vom Selengehalt im Boden.

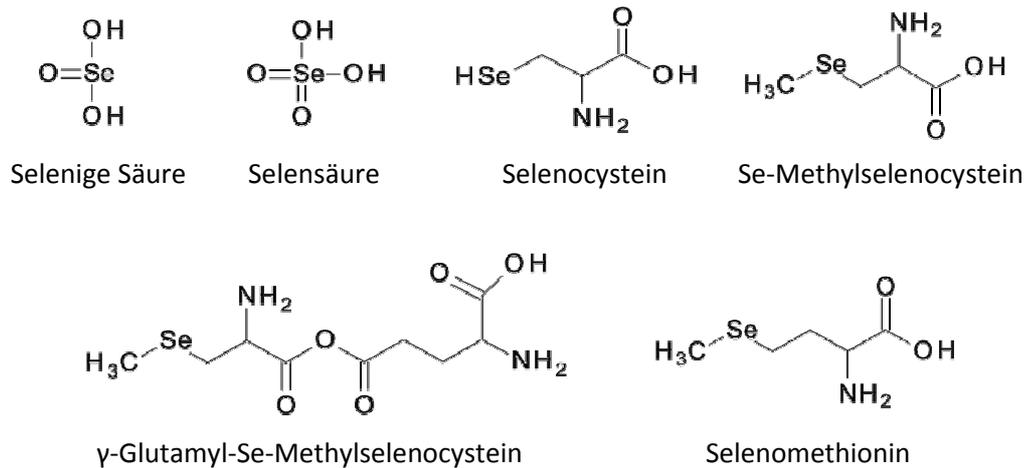


Abbildung 2.1: Strukturformeln ausgewählter Selenspezies

Tabelle 2.3: Selengesamtgehalt und prozentualer Anteil wichtiger Selenspezies in Nahrungsmitteln

Nahrungsmittel	Se _{ges} in mg kg ⁻¹	Selenit in %	Selenat in %	SeMet in %	MeSEC in %	SeCys in %	γ-Glu-MeSEC in %
Selenhefen [16-18]	1180-2000	< 1	< 1	57-85		3-5	
Weizen (USA) [19]	0,1-30		12-19 ¹	56-83	1-4	4-12	
Paranuss ² [20]	8,3			21			
Wallnuss [20]	0,2-0,4			19-23			
Kartoffel [21]	0,12		50	50			
Brokkoli* [22]	62,3		20	12	45		
Zwiebel [23]	< 0,5		100				
Zwiebel* [23]	140		10	5	1		63
Knoblauch [23]	< 0,5		10	28	14		48
Knoblauch* [17]	296		2	13	3		73
Schnittlauch* [24]	222-613		8-50	3-5	22-52		
Dorsch [25, 26]	1,6	12		50			
Thunfisch [27]	2,3			46			
Huhn [28]	0,5			56-67		20-32	
Lamm [28]	0,4			56-60		50	
Lamm (Niere) [28]	4,5			9		88	

¹ inklusive Selenit

² ohne Nussschale

* mit Se angereichert

Neben der Gehaltsabhängigkeit muss auch beachtet werden, mit welcher Selenspezies aus dem Boden die Pflanze exponiert ist [13, 14] und um was für eine Pflanzenart es sich handelt. Bisher wird Selen für Pflanzen als nicht essenziell angesehen [9]. Es gibt aber sogenannte Selen-(Hyper-)Akkumulatorpflanzen, die eine wichtige Quelle für Selen in der Humanernährung darstellen [1]. Vertreter der *Allium*- (Knoblauch, Zwiebel, Lauch) und

Brassica-Gattung (Brokkoli, Weißkohl, Wirsing) sowie die Paranuss zählen hierzu. Die erhöhte Selenakkumulation bestimmter Pflanzen wird ausgenutzt, um Nahrungsmittel künstlich mit Selen anzureichern (s. Abschnitt 2.1.3). Heutzutage gewinnen besonders die Selenhefen an zunehmender Bedeutung als Supplement in Nahrungsergänzungsmitteln [15]. Sie können Selengehalte bis weit über 2000 mg kg^{-1} enthalten, wobei die häufigste Spezies das Selenomethionin (SeMet) ist. In pflanzlichen Lebensmitteln sind die Hauptverbindungen die organischen Spezies SeMet und Selen-Methylselenocystein (MeSEC) sowie die anorganische Spezies Selenat. Die Vertreter der *Allium*-Gattung, die mit Selen angereichert wurden, enthalten als Hauptverbindung das γ -Glutamyl-Se-Methylselenocystein (γ -Glu-MeSEC). Tierische Nahrungsmittel beinhalten im Unterschied zu den pflanzlichen vor allem Selenocystein (SeCys) und SeMet. Innereien wie Herz, Leber und Niere besitzen dabei einen deutlich höheren Selengehalt als Muskelfleisch.

2.1.2 Toxizität und Essenzialität

Nach der Entdeckung durch BERZELIUS wurde Selen lange Zeit als rein toxisches Element angesehen. SCHWARZ und FOLTZ entdeckten 1957, dass Selen vorbeugend gegen Lebernekrose in Ratten wirkt [29]. Diese Erkenntnis deutete bereits auf eine Essenzialität des Elementes hin. Seit ROTRUCK im Jahre 1973 Selen als aktiven Bestandteil der Glutathionperoxidase (GPx) identifizierte [30], gilt Selen als essenzielles Spurenelement. Durch die Aufnahme hoher Selenkonzentrationen oder -gehalte kann eine akute oder chronische Selenintoxikation auftreten, die wiederum von der aufgenommenen Selenspezies abhängig ist. Die LD_{50} beträgt für Natriumselenit $7,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (oral, Maus) [31], für Natriumselenat $1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (oral, Ratte) [32] und für Selenhefen $37,3 \text{ mg kg}^{-1}$ (Ratte) [16]. Für alle anderen in der Nahrung vorkommenden Selenspezies sind keine gesicherten Daten verfügbar [33, 34]. Eine akute Toxizität ist meist bei beruflich bedingten Arbeiten in der Elektro-, Metall-, Glas- und Keramikindustrie zu beobachten. Die Folgen einer toxischen Wirkung äußern sich durch Übelkeit, Diarrhöe und abdominale Schmerzen [35]. Chronische Intoxikationen können nach längerem Verzehr selenhaltiger Nahrungsmittel (auch Trinkwasser) oder durch falsch dosierte Nahrungsergänzungsmittel und Medikamente auftreten.

Typische Symptome einer chronischen Selenvergiftung, der Selenose, sind z. B.:

- gastrointestinale und kardiovaskuläre Beschwerden
- Leberzirrhose
- Schmerzen der Extremitäten
- Haarausfall und Zahnverfall
- Entfärbung der Haut, brüchige Nägel
- knoblauchartiger Geruch der Atemluft.

Unumstritten ist, dass die organischen Selenverbindungen im Vergleich zu den anorganischen Formen eine geringere akute Toxizität aufweisen [16, 36]. Bei einer Aufnahme über einen längeren Zeitraum wird allerdings eine möglicherweise größere Toxizität der organischen gegenüber den anorganischen Selenspezies vermutet [37]. Der Mechanismus einer Selenvergiftung beruht wahrscheinlich auf dem Eingriff des Elements in zelluläre Oxidationsvorgänge oder in der Inhibition der Proteinsynthese [35].

Um Vergiftungen des Menschen zu vermeiden, haben verschiedene wissenschaftliche Organisationen Obergrenzen für die tägliche Gesamtaufnahme an Selen abgeleitet. Die WHO definiert eine sichere Aufnahmemenge von $400 \mu\text{g d}^{-1}$ [38], ausgehend von einem NOAEL (no observed adverse effect level) von $4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}$ [39]. Die Werte des Food and Nutrition Board (FNB) werden ebenfalls mit $400 \mu\text{g d}^{-1}$ und die des Scientific Committee on Food (SCF) mit $300 \mu\text{g d}^{-1}$ angegeben [40].

Aufgrund der Essenzialität des Spurenelements Selen haben verschiedene Institutionen Referenzwerte für die empfohlene tägliche Bedarfsmenge (RDA – recommended dietary allowance) an Selen herausgegeben, um eine ausreichende Selenversorgung sicherzustellen. Die RDA-Werte variieren je nach herausgebender Institution (Tabelle 2.4). Die DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung) empfiehlt eine Selenaufnahme für erwachsene Männer und Frauen von $30\text{-}70 \mu\text{g d}^{-1}$ [41]. Für Kinder und Säuglinge sind die Aufnahmemengen entsprechend niedriger.

Tabelle 2.4: Empfohlene tägliche Aufnahmemenge von Selen für Erwachsene (ausgewählte Beispiele) [16, 42]

Organisation oder Land	Empfohlene Bedarfsmenge in $\mu\text{g d}^{-1}$ Selen	
	Männer	Frauen
DGE	30-70	30-70
WHO	40	30
Australien	85	70
Belgien	70	70
England	75	60
Frankreich	60	50
Skandinavische Länder	50	40
USA	55	55

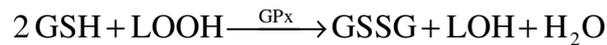
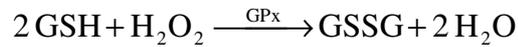
Eine Selenaufnahme von weniger als $20 \mu\text{g d}^{-1}$ führt zu einer Unterversorgung, aus der verschiedene Krankheiten, wie z. B. Arthritis, Sklerose der Herzkranzgefäße, Zirrhose, Diabetes oder auch Krebs, resultieren können [43]. Es sind besonders Menschen, die in Gebieten mit selenarmen Böden leben, von Erkrankungen durch Selenmangel betroffen. Die bekanntesten Selenmangelerkrankungen sind die Keshan-Krankheit und die Kashin-Beck-Krankheit.

Die Keshan-Krankheit ist in einigen Regionen Chinas endemisch und äußert sich in einer Kardiomyopathie. Sie betrifft vor allem Kinder und adoleszente Mädchen. Die Erkrankung äußert sich durch Herzbeschwerden, wie Arrhythmie, Herzinsuffizienz und kardiogenem Schock und führt im schlimmsten Fall zum Tod [44]. Die Kashin-Beck-Krankheit tritt endemisch in Selenmangelgebieten in China, Russland, Korea, Tibet und Sibirien auf. Sie führt zu Minderwuchs und deformierten Gelenken von Armen und Beinen, aufgrund von Störungen des Skelettwachstums (Osteoarthropathie). In China sind etwa 1 bis 3 Millionen Menschen betroffen. Die eigentliche Ursache der Krankheit ist bis heute noch unklar. Allerdings wird Selen- und Iodmangel mit ihr in Zusammenhang gebracht [36].

2.1.3 Physiologische Bedeutung und Selenstatus

Das essenzielle Spurenelement Selen ist in Form der 21. proteinogenen Aminosäure SeCys struktureller Bestandteil zahlreicher Selenoproteine. Hierzu zählen acht Glutathionperoxidasen, drei Thioredoxin-Reduktasen (TRxR), drei Iodthyronin-Deiodinasen (IDIO), Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2), die Selenoproteine P, W, R, N und weitere, wobei nur ein Teil gut charakterisiert ist [45].

Das erste isolierte Enzym, mit Selen als aktivem Bestandteil, war die GPx. Diese kommt in Erythrozyten und Organen verschiedener Tierspezies vor. Die GPxs schützen die Zellen vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies, indem sie die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden (einschließlich Lipidhydroperoxide) zu Wasser und den entsprechenden Alkoholen katalysieren.



Eine ähnliche Funktion bei zellulären Redoxprozessen zeigen auch die TRxRs, die oxidierte Thiolgruppen reduzieren. Die Enzyme sind nicht nur antioxidativ wirksam, sondern haben auch eine Funktion als Strukturproteine, sind beteiligt an der Signaltransduktion und können als Prooxidantien wirken [46].

Für die Metabolisierung der in der Schilddrüse gebildeten Thyroid-Hormone sind die IDIO verantwortlich. Sie katalysieren die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Thyroid-Hormone und spielen somit eine entscheidende physiologische Rolle für das Wachstum und den Stoffwechsel sowie die ungestörte Entwicklung des Gehirns im Fötus. Das Prohormon 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (T_4) wird zum aktiven Schilddrüsenhormon 3,3',5-Triiod-L-thyronin (T_3) durch die Deiodinasen umgesetzt. Weiterhin regulieren die Enzyme die Deiodierung von T_4 und T_3 zum inaktiven Metaboliten 3,3'-Diiod-L-thyronin (T_2) [47, 48]. Das Selenoprotein P (SePP) macht etwa 60 % des Plasma-Selengehaltes aus und ist verantwortlich für den Transport und die Verteilung von Selen aus der Leber in andere Organe, wie Gehirn und Nieren [49, 50]. Neben der Funktion als Transportprotein wirkt es auch extrazellulär antioxidativ [51]. Über die Rolle der anderen bisher nachgewiesenen Selenoproteine ist noch wenig bekannt, da gesicherte Aussagen über funktionale Aufgaben fehlen.

Der Selenstatus gibt Auskunft über die Selenversorgung des Menschen. Bei der Betrachtung können große Unterschiede zwischen der Bevölkerung aus verschiedenen Ländern auftreten, da hierbei wieder der Selenbodgehalt eine entscheidende Rolle spielt. Weitere Faktoren, die beachtet werden müssen, sind die landwirtschaftlichen Praktiken, die konsumierten Lebensmittel, erfolgt die Ernährung vegetarisch oder sogar vegan und die ökonomischen Lebensumstände der Personengruppen.

Um den Selenstatus zu bestimmen, wird die Selenkonzentration im Blutserum/-plasma wie auch im Vollblut analysiert (Human-Biomonitoring), da eine Korrelation zwischen Selen

im Blut und der nahrungsbedingten Aufnahme besteht [12]. Die Selenkonzentration im Serum/Plasma ist ein Indikator für die momentane Versorgung des Menschen (Kurzzeitparameter), während die Analyse von Vollblut einen Langzeitparameter darstellt [9]. Eine andere Möglichkeit, den Selenstatus zu bewerten, ist die Aktivitätsbestimmung der Plasma-GPx.

In den Tabellen 2.5 und 2.6 sind die geschätzte tägliche Selenaufnahme und die Selenkonzentrationen im Serum oder Plasma für verschiedene Länder zusammengestellt. Die Unterscheidung für die geschätzte tägliche Aufnahmemenge und die Plasma-/Serumkonzentration vor und nach 1984 in Finnland hat ernährungsphysiologische und politische Gründe. Aufgrund der Annahme einer suboptimalen Selenversorgung der finnischen Bevölkerung wurde ein Gesetz erlassen, wonach ab dem Frühjahr 1984 Düngemitteln Na_2SeO_4 zugesetzt werden muss [52]. Für den Getreideanbau betrug die Supplementierung der Dünger anfänglich 16 mg kg^{-1} (seit 1990 6 mg kg^{-1}) und für Weideland 6 mg kg^{-1} Na_2SeO_4 . Innerhalb eines Jahres konnte die tägliche Selenaufnahme über die Nahrung um das Zwei- bis Dreifache gesteigert werden.

Tabelle 2.5: Geschätzte tägliche Selenaufnahme in $\mu\text{g d}^{-1}$ in verschiedenen Ländern, verändert nach [53]

Land	Selenaufnahme in $\mu\text{g d}^{-1}$
Österreich	48
China	
Keshan Region	7-11
Selenose Gebiet	750-4990
Dänemark	40
Finnland	
vor 1984	25
nach 1984	67-110
Frankreich	29-43
Deutschland	35
Japan	104-127
USA	60-220

Der Zusatz verschiedener Selenverbindungen (Selenit, Selenat, SeMet) zum Nährmedium von Pflanzen führte zu der Entwicklung der gezielten Selenanreicherung von Nahrungsmitteln, dem sogenannten „functional food“. Von besonderer Bedeutung für die Ernährung sind dabei die Selenakkumulatorpflanzen. Als potenzielle Selenquellen für die Ernährung werden der Gartenrettich (*Raphanus sativus*, z. B. Radieschen), die Frühlingszwiebel (*Allium fistulosum*), die Gartenzwiebel (*Allium cepa*), Knoblauch (*Allium*

sativum) und der Gemüsekohl (*Brassica oleracea*, z. B. Brokkoli) genannt [54-58]. Weiterhin wurden Untersuchungen angestellt, Joghurt bereits vor dem Fermentationsprozess Selenverbindungen zuzusetzen und somit eine neue Selenquelle für die tägliche Ernährung zu schaffen [59].

Tabelle 2.6: Selenkonzentrationen im Serum/Plasma in $\mu\text{g L}^{-1}$ in verschiedenen Ländern, verändert nach [53]

Land	Konzentration* im Plasma/Serum in $\mu\text{g L}^{-1}$ Se
Österreich	67 ± 24
China	
Keshan Region	21 ± 6
Selenose Gebiet	494 ± 140
Dänemark	84 ± 20
Finnland	
vor 1984	70 ± 10
nach 1984	110 ± 8
Frankreich	81 ± 9
Deutschland	79 ± 13
Japan	117 ± 16
USA	
Osten	113 ± 15
Süden	130 ± 30
Westen	125 ± 19
Zentrum	133 ± 15

*MW \pm s

Die Supplementierung von Futtermitteln mit Selenverbindungen bei Nutztieren hat primär die Aufgabe, die Gesundheit der Tiere zu erhalten, da Selen auch für diese ein essenzielles Spurenelement darstellt. Der zulässige Selenhöchstgehalt liegt bei $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ Alleinfutter. Unter dem Aspekt der Herstellung von „functional food“ erfolgt beispielsweise auch die Produktion von selenangereicherten Eiern in mehr als 25 Ländern [51]. Die angereicherten Eier enthalten zwischen 24 und $30 \mu\text{g}$ Selen pro Ei und tragen somit zu über 50 % der Deckung des täglichen Selenbedarfs bei [60].

In den letzten Jahren hat in der Bevölkerung verstärkt die Einnahme von selenhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln zugenommen. Dabei wird zwischen Mineralstoffpräparaten bzw. Multivitaminpräparaten und Nahrungsergänzungsmitteln auf der Grundlage von Selenhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) unterschieden. Im Jahr 2002 wurde die Richtlinie

2002/46/EG über Zusatzstoffe bei der Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln erlassen. Sie sah vor, dass bis 31. Dezember 2009 nur noch Natriumselenit, Natriumhydrogenselenit und Natriumselenat und keine organischen Selenverbindungen (einschließlich Selenhefen) zugesetzt werden dürfen [61]. Anlass für diese Entscheidung waren die kontrovers diskutierten organischen Selenverbindungen in Selenhefen, für die es bis heute noch keine gesicherten Daten hinsichtlich ihrer Toxizität gibt [16].

2.1.4 Bioverfügbarkeit und Resorption im Menschen

Um Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit durchzuführen, gibt es verschiedene *In-vivo*- und *In-vitro*-Methoden. Die *In-vivo*-Methoden umfassen dabei Untersuchungen am Menschen bzw. an Labortieren. Da solche Studien sehr zeitaufwändig, teuer und schwierig durchzuführen sind sowie ethische Bedenken berücksichtigt werden müssen, stellen *In-vitro*-Untersuchungen eine gute Alternative zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit dar.

Im Allgemeinen ist die Bioverfügbarkeit ein Maß für die Menge eines Stoffes, der effektiv vom Organismus genutzt werden kann, um die physiologischen Prozesse aufrecht zu erhalten [11]. Die Resorption der ernährungsphysiologisch relevanten Selenspezies Selenit, Selenat, SeMet, MeSEC, SeCys und γ -Glu-MeSEC (s. Tabelle 2.3) liegt zwischen 70 und 95 %. Hauptresorptionsort ist der Dünndarm (neben Blind- und Dickdarm). Die Vorgänge sind dabei maßgeblich von der vorliegenden Selenspezies abhängig [3]. Für gewöhnlich werden die organischen Verbindungen im Vergleich zu den anorganischen Verbindungen besser resorbiert [62]. Neben der vorliegenden chemischen Form des Selen wird die Bioverfügbarkeit auch von der Matrix des Nahrungsmittels beeinflusst [63]. Sie wird verbessert durch hohe Proteingehalte sowie die Vitamine E und A. Allerdings wird die Bioverfügbarkeit von Selen durch Schwefel, Arsen, Quecksilber und Vitamin C auch verschlechtert [64, 65].

Eine sehr häufig angewendete *In-vitro*-Methode zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit ist die simulierte gastrointestinale Verdauung. Sie beinhaltet die Berücksichtigung verschiedener physiologischer Parameter des menschlichen Organismus, wie Temperatur, pH-Wert, chemische Zusammensetzung (z. B. des zu untersuchenden Nahrungsmittels) und relevante Enzyme. Die Wichtigkeit dieser Experimente ist darin begründet, dass es von enormer Bedeutung ist, welche Selenspezies nach dem Verdau für die Resorptionsvorgänge vom Darm ins Blut vorliegt. Viele *In-vitro*-Studien beschäftigten sich bereits mit der Durchführung von Verdauungsexperimenten verschiedener selenhaltiger Nahrungsmittel (vor allem mit Selen angereicherten Nahrungsmitteln). Dazu gehören

beispielsweise Paranuss [66], Knoblauch [57], Radieschen [54] und Nahrungsergänzungsmittel die Selenhefen enthalten [67]. Die Versuche haben keine signifikanten Veränderungen in der Verteilung der Hauptverbindungen SeMet, MeSEC und Selenocystin (SeCys₂) nach der durchgeführten simulierten gastrointestinalen Verdauung gezeigt. Eine Ausnahme war die Spezies γ -Glu-MeSEC, bei der der Glutamyrest abgespalten wurde.

Die Absorption von Selenat erfolgt höchstwahrscheinlich aktiv über einen Na⁺-abhängigen Transportmechanismus, der auch für die Sulfatabsorption verantwortlich ist [68]. Der Transport von Selenit wird häufig als passiver Vorgang beschrieben [69]. Im Gegensatz dazu fanden ARAIE et al. in der Kalkalge (Haptophyta) *Emiliania huxleyi* und MCDERMOTT et al. in der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* einen spezifischen Selenit-Transporter [70, 71]. Das in der Nahrung am häufigsten vorkommende SeMet verwendet den selben Na⁺-abhängigen Mechanismus wie das Methionin und wird somit ebenfalls aktiv transportiert [72, 73]. Die Absorption von SeMet wird dabei durch das Vorhandensein von Methionin verschlechtert. NICKEL et al. zeigten in ihren Untersuchungen mit intestinalen Caco-2-Zellen (s. Abschnitt 2.2) und renalen OK Zellen (Opossum Nierenepithelzellen), dass die Selenoaminosäuren SeMet, MeSEC und SeCys₂, wie auch deren Schwefelanaloge, über verschiedene Aminosäuretransporter aktiv transportiert werden. Für die beiden Spezies Selenobetain und Selenocystamin konnte kein effektives Transportsystem gefunden werden [74].

Die relativen Selengehalte in den menschlichen Organen sind folgendermaßen verteilt: Niere > Leber > Milz > Hoden > Herz > Lunge > Gehirn [2]. Der Selengehalt in den Nieren variiert zwischen 0,75 und 1,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ und in der Leber zwischen 0,21 und 0,54 $\mu\text{g g}^{-1}$. Geringere Gehalte werden in den Skelettmuskeln (0,06-0,37 $\mu\text{g g}^{-1}$) und im Herzen (0,17-0,28 $\mu\text{g g}^{-1}$) gefunden [75]. Ursache für die höheren Werte in Niere und Leber gegenüber den anderen Organen ist die höhere Enzymaktivität, aufgrund von Detoxifikationsprozessen.

2.1.5 Selenmetabolismus

Der Metabolismus von Selenverbindungen aus der Nahrung im Menschen ist in einer vereinfachten Darstellung in Abbildung 2.2 gezeigt. Die Spezies SeMet wird nach der Resorption unspezifisch anstelle von Methionin in Proteine, wie Albumin oder Hämoglobin, eingebaut. Es besteht auch die Möglichkeit, dass SeMet durch Transselenierung zu SeCys metabolisiert wird [76]. Das SeCys (entweder direkt aus der

Nahrung oder aus der Metabolisierung von SeMet) wird durch die SeCys- β -Lyase zu Selenwasserstoff H_2Se (Selenid, Se^{2-}) und Serin abgebaut. Selenwasserstoff bzw. Selenid stellen die zentrale metabolische Selenpezies dar, von der alle weiteren Stoffwechselfvorgänge ausgehen.

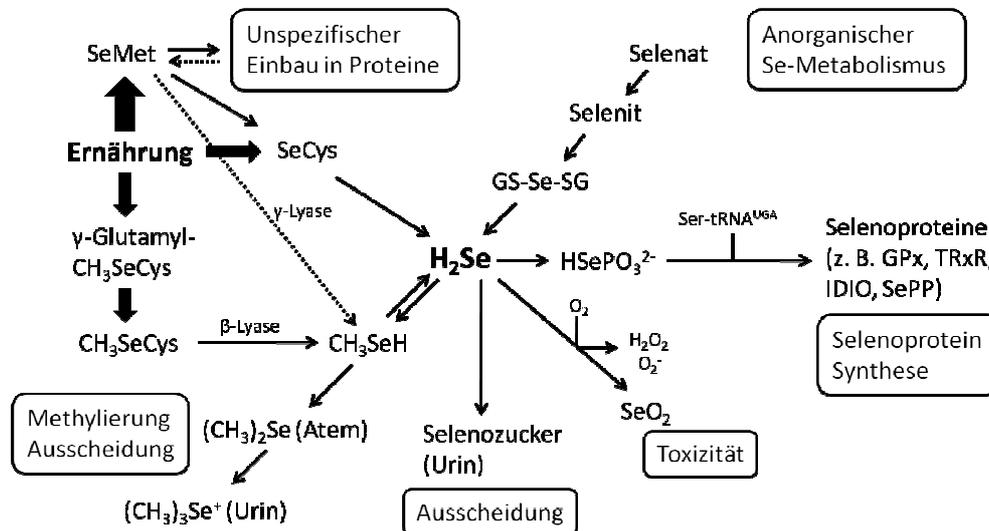


Abbildung 2.2: Selenmetabolismus im Menschen, verändert nach [37]

Der Abbau der beiden Spezies γ -Glu-MeSEC und MeSEC erfolgt durch eine β -Lyase zu Methylselenol (CH_3SeH). Methylselenol kann wiederum durch eine Demethylierungsreaktion in H_2Se überführt und somit als Quelle für die Selenoproteinsynthese verwendet werden. Überschüssige Selenverbindungen werden in (mehrfach) methylierte Metabolite überführt und anschließend abgeatmet (Dimethylselenid, DMSe) oder über den Urin (Trimethylselenium-Ion, $TMSe^+$ und Selenozucker) ausgeschieden. Weiterhin können auch durch Oxidationsvorgänge reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die wiederum für das toxische Potenzial von Selen und dessen Verbindungen verantwortlich sind. Die anorganischen Verbindungen Selenit und Selenat werden ebenfalls zu dem zentralen Metaboliten H_2Se reduziert und durchlaufen im Folgenden die weiteren Metabolisierungsreaktionen.

Für die Selenoproteinsynthese wird H_2Se durch die Selenophosphat-Synthetase zu Selenophosphat ($HSePO_3^{2-}$) transformiert. Anschließend reagiert $HSePO_3^{2-}$ mit dem Serinrest einer tRNA zu in tRNA gebundenem SeCys, das letztendlich für die Synthese von Selenoproteinen bereit steht [16, 76].

2.2 Humane Adenokarzinomzelllinie Caco-2

Im Jahr 1974 isolierten FOGH et al. die Caco-2-Zelllinie aus einem Adenokarzinom des Dickdarms eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Herkunft [77]. In den nachfolgenden Jahren wurde die Zelllinie intensiv untersucht und charakterisiert. Unter Zellkulturbedingungen erreichen diese adhärenen Zellen nach 5-7 Tagen die Konfluenz, an die sich der Prozess der Differenzierung anschließt. Nach 15 Tagen weisen die Zellen morphologische und funktionelle Charakteristiken von Dünndarmepithelzellen (Enterozyten) auf [78, 79].

Die Ähnlichkeit der Caco-2-Zellen gegenüber Enterozyten zeigt sich in der Ausbildung von polarisierten Zellen, einer apikalen Bürstensaummembran (Mikrovilli) und Schlussleisten (tight junctions) zwischen den Zellen (s. Abbildung 2.3).

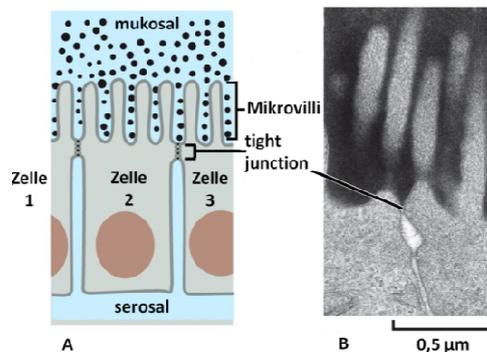


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme (B) der Mikrovilli und der Zell-Zell-Verbindung (tight junction) in Epithelzellen, verändert nach [80]

Neben den morphologischen Eigenschaften wurden in den ausdifferenzierten Caco-2-Zellen verschiedene Enzyme der intestinalen Bürstensaummembran und eine Vielzahl an Transportsystemen identifiziert (s. Tabelle 2.7). Spezifische Transporter konnten z. B. für Zuckermoleküle, Aminosäuren, Proteine, Vitamine und andere Mikronährstoffe nachgewiesen werden [81, 82].

Erfolgt die Kultivierung der Caco-2-Zellen auf mikroporösen Filtereinsätzen (Nitrocellulose-, Polycarbonatmembran), bildet sich ein konfluent Monolayer aus, der oben genannte Eigenschaften aufweist [79, 83]. Im Gegensatz zur Kultivierung in Zellkulturflaschen haben chemische Verbindungen dadurch Zugang zur mukosalen und auch serosalen Seite der Zellmembran. Daraus ergab sich die Möglichkeit, funktionale Untersuchungen des Transportverhaltens bzw. der Resorption verschiedener chemischer Verbindungen durchzuführen. RUBAS et al. zeigten in vergleichenden

Permeabilitätsuntersuchungen zwischen Caco-2-Zellen und dem Darmgewebe von Kaninchen, Affe und Hund, dass das Caco-2-Zellmodell innerhalb gewisser Grenzen zur Abschätzung von humanen Resorptionsvorgängen geeignet ist [84]. Heutzutage gehört die Caco-2-Zelllinie zu einer anerkannten und weit verbreiteten *In-vitro*-Methode [85, 4], um intestinale Transportvorgänge von Nährstoffen/Mikronährstoffen sowie Medikamenten und Drogen zu untersuchen [86-88].

Tabelle 2.7: Verschiedene in Caco-2-Zellen vorkommende Enzyme und Transporter [81, 82]

Enzyme der Bürstensaummembran	Aminopeptidase, Lactase, γ -Glutamyltranspeptidase, Dipeptidylaminopeptidase, Sucrase-Isomaltase
Enzyme der metabolischen Phasen I und II	Cytochrom P450, Glutathion-S-Transferase, Phenol-Sulfotransferase
Intestinale Transportsysteme	Zuckertransporter (GLUT1-3, GLUT5, SGLT1) Di- und Tripeptidtransporter (PepT1, HPT1) Na^+/H^+ -Transporter (NHE3) Aminosäuretransporter (B^0 , $\text{X}^{\text{A,G-}}$, b^0 , B^{0+}) Vitamin C-Transporter (SVCT1)

2.3 Ussing-Kammer-Technik

Die Entwicklung der Ussing-Kammer-Technik geht auf den dänischen Physiologen Hans H. Ussing zurück. Er untersuchte 1951 aufgrund vorheriger Studien den Na^+ -Ionen-Transport durch Froschhaut. Der Versuchsaufbau umfasste dabei zwei mit Ringerlösung gefüllte (Halb-)Kammern, zwischen die das isolierte Froschhautpräparat eingespannt werden konnte und eine elektronische Einheit zur Messung der Potenzialdifferenz. Diese Apparatur wurde fortan als Ussing-Kammer bezeichnet und ermöglichte es, den Ionentransport durch epitheliales Gewebe zu untersuchen [89]. Eine Darstellung der ursprünglichen Ussing-Apparatur ist in Abbildung 2.4 zu finden.

Mit Hilfe dieser Technik haben KOEFOED-JOHNSON und USSING im Jahr 1958 grundlegend zum Verständnis der Na^+ -Resorption durch die Na^+/K^+ -ATPase (Natrium-Kalium-Pumpe) beigetragen [90]. Durch diesen Mechanismus kommt es zu Ladungsverschiebungen über dem Epithel, dem sogenannten elektrogenen Transport, der mit der elektrophysiologischen Methode Ussing-Kammer untersucht werden kann [91].

Wenige Jahre später wurde die Ussing-Kammer-Technik auch für Untersuchungen mit tierischem Darmgewebe eingesetzt [92]. Dieses unterliegt dabei gewissen Einschränkungen. Das Gewebe ist beispielsweise nicht menschlichen Ursprungs, die

Funktions- bzw. Lebensfähigkeit isolierter Gewebe ist begrenzt und die Experimente sowie die präparativen Methoden sind relativ schwierig durchzuführen [93]. Aus diesem Grund etablierten sich die menschlichen Adenokarzinomzelllinien, wie Caco-2 (s. Abschnitt 2.2), HT-29 [94] und T84 [95, 96] als *In-vitro*-Methode für Transportuntersuchungen im Darmgewebe.

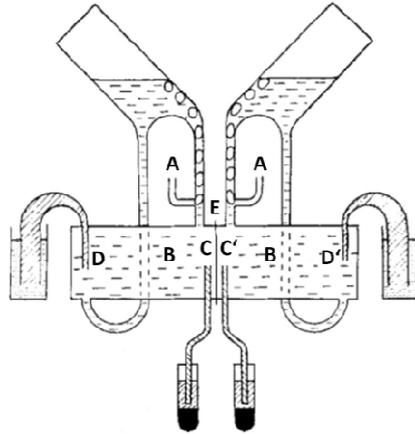


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der ursprünglichen Ussing-Apparatur. A: Gaseinlass, B: Halbkammer, C, C': membran nahe Kalomelektrode, D, D': membranferne Kalomelektrode, E: Froschhaut, verändert nach [89]

Die ursprüngliche Ussing-Apparatur wurde weiterentwickelt und entspricht in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen dem Aufbau von GRASS und SWEETANA [97]. Viele Transportuntersuchungen werden in mikroporösen Filtereinsätzen unter stagnierenden Bedingungen durchgeführt [87, 98]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich unter diesen Bedingungen eine dünne Wasserschicht bildet, die das transepitheliale Transportverhalten verschiedener Substanzen (vor allem lipophiler Stoffe) beeinflusst und einschränkt [99]. Deshalb können Ussing-Apparaturen mit synthetischer Luft, Sauerstoff, Kohlendioxid oder auch Stickstoff begast werden, um eine ausreichende Durchmischung in den Kammern zu gewährleisten.

Anwendung fand die Ussing-Kammer-Technik in Verbindung mit der Caco-2-Zelllinie bei Untersuchungen des Transportverhaltens *in vitro* von Cadmium oder auch von verschiedenen Anthocyanen aus der schwarzen Johannisbeere [100, 101].

2.4 Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit induktiv-gekoppelter Plasmamassenspektrometrie

Die Methoden der Elementspeziation sind Kopplungsverfahren, die aus eigenständigen, hintereinander geschalteten, analytischen Geräten bestehen. Sie sind von enormer Bedeutung, da die Gesamtgehaltsbestimmung eines Elementes nicht ausreicht, um biochemische Prozesse zu untersuchen. Der Grund hierfür liegt darin, dass Eigenschaften wie Toxizität, umweltchemisches Verhalten, biologische/biochemische Wirkung, Absorptions- und Resorptionsverhalten von der chemischen Zustands- und Bindungsform (Oxidationsstufe, organische Reste und Liganden) eines Elementes abhängig sind.

Zur Bestimmung von Elementspezies hat sich die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) mit der induktiv-gekoppelten Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) als elementselektivem Detektor etabliert [102]. Diese Technik kann allerdings nicht für die Aufklärung von Molekülstrukturen unbekannter Elementspezies verwendet werden, da die HPLC-ICP-MS auf dem Vergleich von Retentionszeiten mit Speziesstandards beruht. Für die Identifizierung der Molekülstruktur unbekannter Elementspezies wird häufig die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation eingesetzt [103]. Die beiden analytischen Methoden HPLC und ICP-MS werden im Folgenden genauer vorgestellt.

2.4.1 Chromatografische Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Der Prozess der chromatografischen Trennung in der HPLC beruht auf der Verteilung eines Analyten zwischen einer stationären Phase und einer flüssigen mobilen Phase (Eluent). Der Analyt durchströmt in der mobilen Phase die stationäre Phase und geht mit dieser Wechselwirkungen ein, die auf reversiblen Gleichgewichtsprozessen beruhen. Je nach dem wie stark diese Wechselwirkungen sind, verweilen die Substanzen unterschiedlich lange in der Säule und können dadurch getrennt werden. Auf die allgemeinen theoretischen Grundlagen des chromatografischen Prozesses soll an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen werden [104-106].

Im Gegensatz zur Gaschromatografie (GC) sind mit der HPLC Trennungen unter schonenden physikalischen und chemischen Bedingungen möglich. Vor allem für bioanalytische Untersuchungen und die Bestimmung thermisch labiler Substanzen ist die HPLC von großer Wichtigkeit [107]. HPLC-Geräte bestehen prinzipiell aus: Vorratsgefäß

für den Eluenten, Entgaser, Hochdruckpumpe, Injektor (ggf. mit Autosampler), analytische Trennsäule, Detektor und Computer zur Datenerfassung und -verarbeitung.

Für die Analyse von Elementspezies können je nach Trennproblem unterschiedliche chromatografische Methoden eingesetzt werden. Für die Kopplung der HPLC mit der ICP-MS sind die Umkehrphasen- (RP), Umkehrphasen-Ionenpaar- (RPIP), Größenausschluss- (SE) und Ionenaustausch-Chromatografie (IEC) von Bedeutung und am weitesten verbreitet. Die genannten Trennmethode sollen folgend unter dem Gesichtspunkt der Kopplung mit der ICP-MS kurz beschrieben werden.

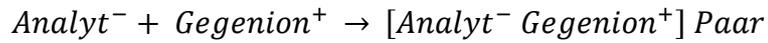
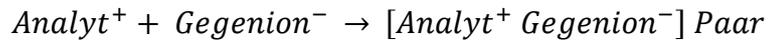
2.4.1.1 Umkehrphasen-Chromatografie (RPC)

In der Umkehrphasen-Chromatografie (reversed-phase chromatography, RPC) werden eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase verwendet. Die stationäre Phase besteht dabei meist aus chemisch modifiziertem Silikagel mit Octadecyl- (C_{18}) oder Octylketten (C_8). Als mobile Phase wird Wasser eingesetzt. Dem Eluenten können verschiedene organische Modifizier, wie Methanol (MeOH), Ethanol oder Acetonitril zugesetzt werden, um die Selektivität der Trennung zu verbessern [108]. Der Prozess der Retardierung ist auch vom pH-Wert abhängig, weshalb verschiedene Puffer zugegeben werden. Der größte Nachteil bei der Kopplung der RPC mit ICP-MS ist die geringe Kompatibilität des ICP gegenüber organischen Lösungsmitteln [109]. Aus diesem Grund spielt die Normalphasen-Chromatografie mit unpolaren organischen Lösungsmitteln (Hexan, Heptan, Toluol, Dichlormethan u. a.) als mobiler Phase und Kieselgel (Aluminiumoxid) als polarer stationärer Phase keine Rolle für die Kopplungstechnik der HPLC-ICP-MS. Die Eluenten für die RP-Chromatografie beinhalten deshalb nur etwa 5 Vol.-% an organischen Modifiern.

2.4.1.2 Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatografie (RPIP)

Diese Methode der chromatografischen Trennung stellt einen Spezialfall der RPC dar. Mit Hilfe der RPIP-Chromatografie (reversed-phase ion-pair chromatography, RPIP) können kationische, anionische und neutrale Verbindungen getrennt werden. Ein organischer, ionischer Stoff (Ionenpaar-Reagenz) wird der mobilen Phase, die der aus der RP-Chromatografie entspricht, zugesetzt. Das Ionenpaar-Reagenz bildet mit dem entsprechend entgegengesetzt geladenen Analyten ein neutrales Ionenpaar [105], das letztendlich von der Umkehrphase retardiert wird. Häufig verwendete Ionenpaar-Reagenzien sind Alkylsulfonate (Methan-, Heptansulfonat) für kationische Analyten und quartäre

Alkylammonium-Verbindungen (Tetramethyl-, Tetrabutylammonium) für anionische Analyten [110]:



Durch geeignete Wahl des Gegenions und der Konzentration (normalerweise im Bereich von 1 bis 10 μM) des Ionenpaar-Reagenzes im Eluenten kann die Methode hinsichtlich der Selektivität optimiert werden [111].

2.4.1.3 Größenausschluss-Chromatografie (SEC)

Die Größenausschluss-Chromatografie (size exclusion chromatography, SEC) trennt die Analyten nach der Molekülgröße (Molekülstruktur). Ein entscheidender Unterschied zu den anderen chromatografischen Methoden besteht im Trennprozess, da dieser nicht von Wechselwirkungseffekten bewirkt wird. Er beruht auf der Verteilung und der unterschiedlichen Eindringtiefe der Moleküle in die Poren der stationären Phase. Große Moleküle, die nicht in die Poren diffundieren können, werden ausgeschlossen und am schnellsten durch die Säule transportiert. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen und werden entsprechend ihrer Größe eluiert.

Die stationäre Phase besteht häufig aus einem total-sulfoziierten Kationenaustauscherharz auf Basis von vernetztem Polystyrol (Styrol-Divinylbenzol) mit wohldefinierten Poren. Es werden vereinzelt auch Kationenaustauscher auf der Basis von Silicagel verwendet. Allerdings ist die pH-Beständigkeit auf den Bereich von pH 1 bis 8 gegenüber den Styrol-Divinylbenzol-Harzen von pH 1 bis 13 eingeschränkt. Als Eluenten werden für gewöhnlich gepufferte wässrige Lösungen verwendet [104]. Wasser als mobile Phase hat den Vorteil, dass es Strukturveränderungen der Analyten, die Denaturierung von Proteinen und die Zerstörung von Protein-Metall-Komplexen verhindert [112].

Mit Hilfe der SEC ist es möglich, Molekülmassen zu bestimmen, da eine Korrelation zwischen Retentionszeit und Molekülmasse besteht. Diese Möglichkeit wird vor allem bei der Identifizierung unbekannter Metalloproteine angewendet [102]. Für eine ausreichende Trennung sollten sich die molaren Massen der Analyten um mindestens 10 % unterscheiden [105]. Unerwünschte Nebeneffekte, die auftreten können, sind Adsorptionserscheinungen, die zu Tailing und verspäteter Elution führen.

2.4.1.4 Ionenaustausch-Chromatografie (IEC)

In der Ionenaustausch-Chromatografie (ion exchange chromatography, IEC) wird zwischen Kationen- und Anionenaustausch unterschieden. Der chromatografische Trennprozess beruht bei beiden auf dem Austausch ionischer Analyten mit geladenen funktionellen Gruppen der stationären Phase. Aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen der Analytionen mit der stationären Phase eluieren sie zu unterschiedlichen Zeiten. Als Trägermaterial dienen überwiegend organische Polymere aus Styrol/Divinylbenzol- und Ethylvinylbenzol/Divinylbenzol-Copolymeren. Die Funktionalisierung geschieht bei Kationenaustauschern über Sulfonsäure- (starke Kationenaustauscher) oder Carbonsäure-Gruppen (schwache Kationenaustauscher) und bei Anionenaustauschern über quartäre Alkylammonium- (starke Anionenaustauscher) oder Diethylaminoethyl-Gruppen (schwache Anionenaustauscher).

Beide Mechanismen sind stark vom pH-Wert der mobilen Phase abhängig, weil dadurch die Dissoziation der Analytionen und auch der verwendeten stationären Phase gesteuert wird. Weitere Voraussetzungen für die Trennung sind die Ionenstärke und die Art der Gegenionen in der mobilen Phase [113]. Die IEC ist aber nicht nur von dem reinen Ionenaustausch-Prozess geprägt, sondern wird auch von weiteren Prozessen beeinflusst. Dazu gehören die Mechanismen von Ionenausschluss, Verteilung in der Umkehrphase, Ligandenaustausch und Größenausschluss. Den gemischten Retentionsmechanismus bezeichnet man dann als „ion-moderated partition“ [105].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Latex-Anionenaustauscher verwendet, weshalb an dieser Stelle auf diese spezielle Art der pellicularen Anionenaustauscher eingegangen wird. Die Latex-Anionenaustauscher bestehen aus drei chemisch verschiedenen Regionen. Im Inneren befindet sich zunächst ein chemisch inertes Substrat aus Polystyrol/Divinylbenzol oder Ethylvinylbenzol/Divinylbenzol. Die Oberfläche der Substratteilchen ist mit einem Film von Sulfonsäure-Gruppen überzogen. Der Teilchendurchmesser beträgt 5 bis 25 μm . Als Drittes sind über elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen poröse, total-aminierte Teilchen (Latex-Teilchen [113]) aus Polyvinylbenzylchlorid oder Polymethacrylat (Teilchendurchmesser ca. 0,1 μm) an das oberflächensulfonierte Substrat agglomeriert (siehe Abbildung 2.5).

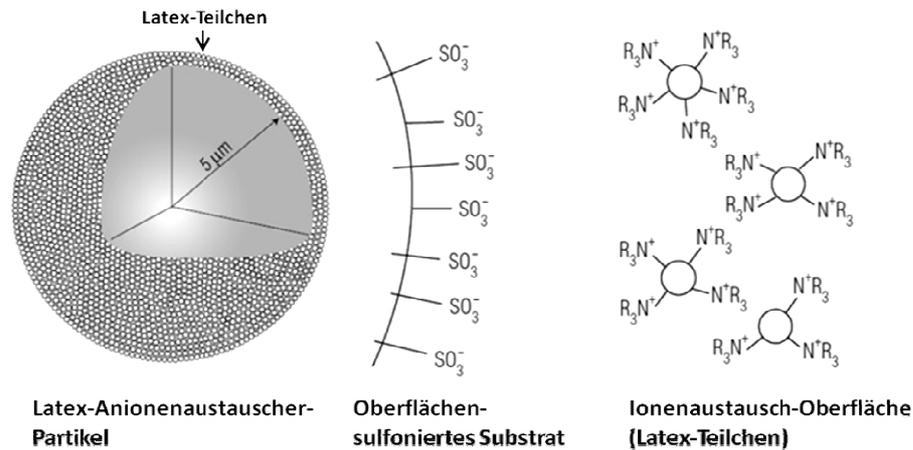


Abbildung 2.5: Aufbau eines Latex-Anionenaustauschers, verändert nach [114]

Der Vorteil der Latex-Anionenaustauscher gegenüber denen auf Kieselgel-Basis liegt in der mechanischen und chemischen Inertheit. Die pH-Stabilität der mobilen Phase liegt zwischen pH 0 bis 14. Weiterhin sind aufgrund der geringen Latex-Teilchengröße schnelle Austauschprozesse bei den chromatografischen Trennmechanismen gegeben. Eine Besonderheit dieses Packungsmaterials ist die Möglichkeit, Anionen und Kationen zu retardieren [114].

2.4.2 Detektion mittels induktiv-gekoppelter Plasmamassenspektrometrie mit dynamischer Reaktionszelle (ICP-DRC-MS)

Die induktiv gekoppelte Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) ist eine leistungsfähige Multielementmethode mit einem großen dynamischen Arbeitsbereich von etwa acht Größenordnungen. Sie wird überwiegend für die Analyse von flüssigen Proben eingesetzt und bietet weiterhin die Vorteile der hohen Empfindlichkeit und der Bestimmung von Isotopenverhältnissen. Aus diesem Grund ist die Technik der ICP-MS als elementselektiver Detektor in Verbindung mit der HPLC für die Elementspeziesanalytik sehr gut geeignet. Weitere elementselektive Detektoren sind die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), Atomfluoreszenzspektrometrie (AFS) und die induktiv-gekoppelte optische Plasmaemissionsspektrometrie (ICP-OES). Aufgrund des Nachteils der geringen Empfindlichkeit spielen die genannten Verfahren für die Elementspeziesanalytik im Spuren- und Ultraspurenbereich keine Rolle [108].

Das ICP-MS besteht aus Probeneinführungssystem, ICP-Fackel, Interface-Bereich, Massenanalysator und Detektor. Das Probeneinführungssystem, bestehend aus Zerstäuber und Zerstäuberkammer, hat die Aufgabe, die flüssige Probe in ein feines Probenaerosol zu

überführen. Aufgrund des Zerstäubungsprozesses gelangen nur etwa 1 bis 2 % der Probe in die Plasmaquelle [115].

Die ICP-Fackel ist aus drei konzentrischen Rohren aufgebaut, die in der Regel aus Quarz bestehen. Durch die Rohre strömt Argon als Zerstäuber-, Hilfs- und Plasmagas. Das obere Rohrende ist von einer Induktionsspule (aus Kupfer) umgeben und koppelt ein oszillierendes Hochfrequenzfeld ein. Durch Initialzündung mittels Hochspannungsfunken werden die Ar-Atome in ein Plasma überführt. Durch das elektromagnetische Wechselfeld wird dieses aufrechterhalten. Die Temperatur des Plasmas beträgt 6000 bis 10000 K. Das Probenaerosol wird getrocknet, verdampft, atomisiert und ionisiert.

Das Interface ist der kritische Bereich eines ICP-MS-Gerätes. Es stellt die Verbindung zwischen dem Plasma und dem analytischen Bereich her. Die Ionen gelangen aus dem bei Atmosphärendruck (760 Torr) betriebenen Plasma über zwei Konen (Sampler- und Skimmer-Konus) und das Ionenfokussierungssystem in das Hochvakuum (ca. 10^{-6} Torr) des Massenanalysators.

Im Massenanalysator werden die Ionen nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Der am häufigsten, auch in der Elementspeziesanalytik, eingesetzte Massenanalysator ist das Quadrupol. Die Trennung kann aber auch in Magnetfeld-Sektorfeld- oder Flugzeit-Massenspektrometern erfolgen. Die Intensitäten bzw. Zählraten (counts) der aus dem Quadrupol kommenden Ionen werden mit einem Elektronenvervielfacher detektiert.

Der größte Nachteil bei Messungen mit der ICP-MS sind spektrale Interferenzeffekte. Sie führen zu einer fälschlichen Signalerhöhung und erschweren somit die Auswertung von Massenspektren. Die spektralen Interferenzen werden unterteilt in isobare Überlagerungen, doppelt geladene Ionen und Molekülioneninterferenzen. Letztere werden durch Reaktionen der Probenmatrix, des verwendeten Lösungsmittels, des Plasmagases, der Umgebungsluft und der Analyten miteinander gebildet. Die daraus resultierenden Molekülionen können das gleiche m/z wie die Analyten besitzen, weshalb eine genaue Zuordnung nicht möglich ist. Aufgrund des verwendeten Plasmagases Argon ergibt sich eine Vielzahl von Ar-Verbindungen. Beispiele hierfür sind Überlagerungen von $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ mit $^{52}\text{Cr}^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ mit $^{75}\text{As}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ mit $^{56}\text{Fe}^+$ und $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ mit $^{80}\text{Se}^+$. Die Molekülioneninterferenzen beeinflussen dadurch besonders stark Messungen im Massenbereich von 40-80 amu. Eine Übersicht zu potenziellen Überlagerungen von Molekülioneninterferenzen mit Analytionen/-isotopen ist in [116] zu finden.

Da das verwendete Quadrupol nur ein geringes Auflösungsvermögen besitzt (es können Massen mit einer Differenz von 0,7 bis 1 amu getrennt werden), ist eine Trennung der Interferenzen vom eigentlichen Analyten nicht möglich. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden und Technologien entwickelt, Molekülioneninterferenzen zu minimieren. Hierzu zählen mathematische Korrekturverfahren [117], Kaltplasmamethode [118], Kollisionzellen-Technologie (CCT) [119], Kollisions-Reaktions-Interface (CRI) [120] und dynamische Reaktionszelle (DRC).

Die DRC besteht aus einem weiteren, kleineren Quadrupol und befindet sich zwischen der Ionenoptik und dem analysierenden Quadrupol. Indem die DRC mit einem Zellgas, wie Methan [121, 122], Sauerstoff [123], Wasserstoff [124] oder auch Ammoniak [125] gefüllt wird, kommt es zu chemischen Reaktionen und Kollisionen zwischen Zellgas und interferierenden Molekülionen [126]. Zusätzlich kann mit Hilfe des Quadrupols ein dynamischer Bandpass-Filter (dynamic bandpass tuning, DBT) eingestellt werden. Dadurch wird eine gezielte Abtrennung unerwünschter Neben- und Folgeprodukte erreicht. Durch Anwendung der DRC in der ICP-MS ist es möglich, eine störungsfreie Analyse bzw. eine Senkung der Nachweisgrenzen von spektral gestörten Elementen zu erzielen [127]. Im Fall von ^{80}Se ist durch die DRC überhaupt erst eine Bestimmung dieses Isotops möglich.

2.4.3 Selenspeziesanalytik mit HPLC-ICP-MS

In der vorliegenden Arbeit wird für die Analyse der Selenspezies eine „on-line“-Kopplung verwendet, das heißt die HPLC wird direkt mit der ICP-MS verbunden. Die Verbindung beider Geräte geschieht über einen dünnen und kurzen Schlauch aus PEEK (Polyetheretherketon). Da die Flussraten von HPLC und dem verwendeten Cross-Flow-Zerstäuber der ICP-MS kompatibel sind, ist die Kopplung relativ einfach zu realisieren. Der schematische Aufbau der verwendeten HPLC-ICP-MS-Kopplung ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

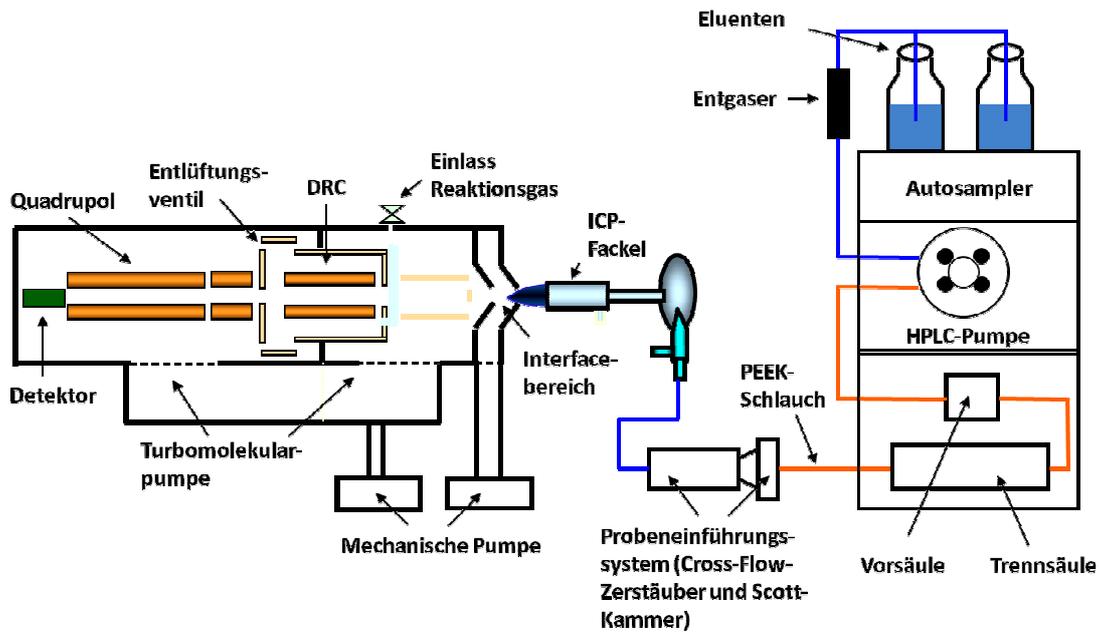


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau der Kopplung von HPLC mit ICP-DRC-MS

Selen und seine Spezies haben überwiegend Bedeutung in biologischen und biochemischen Prozessen. Aus diesem Grund erstrecken sich die Anwendungen der HPLC-ICP-MS vor allem auf die Analyse biologischer Proben, Nahrungs- und Futtermittel. Die eingesetzten Trenntechniken sind die in den Abschnitten 2.4.1.1 bis 2.4.1.4 beschriebenen.

Die Größenausschluss-Chromatografie wird für die Analyse von selenhaltigen Biomolekülen der Molekülmassen 10 bis 1000 kDa eingesetzt. Mit der SEC konnten z. B. selenhaltige Verbindungen großer Molekülmassen in Muttermilch bestimmt werden [128]. Untersuchungen an Muskelfleisch von Geflügel (Huhn, Pute, Ente, Strauß), Wiederkäuern (Lamm, Rind) und Schwein zeigten, dass die vier identifizierten Selenverbindungen unterschiedliche Verteilungsmuster je nach Tierart aufweisen [129]. Selenhaltige Proteine wurden auch in Pflanzen von *Brassica juncea* gefunden [130]. Als mobile Phase werden häufig Pufferlösungen von TRIS-Acetat oder TRIS-Hydrochlorid verwendet.

BIRD et al. nutzten die Umkehrphasen-Ionenpaar-Chromatografie für die Analyse verschiedener Selenoamino-säuren und weiterer organischer Selenverbindungen in Hefen [131]. Als stationäre Phase diente eine C₈-Säule. Der Eluent bestand aus einer Mischung von 98 Vol.-% Wasser und 2 Vol.-% MeOH mit 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure (TFA) als Ionenpaar-Reagenz. Es wurden über 20 Selenspezies in den Hefe-Extrakten gefunden, wobei nur SeCys₂, SeMet und MeSEC aufgrund ihrer Retentionszeiten identifiziert werden konnten. Eine andere Forschergruppe nutzte eine etwas veränderte mobile Phase (99 Vol.-% Wasser, 1 Vol.-% MeOH) mit TFA (0,1 Vol.-%) oder Heptafluorbuttersäure

(0,1 Vol.-%, HFBA) zur Bestimmung von mehr als 20 Selenspezies in 23 biologischen Proben, wie Knoblauch, Hefen, Lauch oder Zwiebeln [23]. Weiterhin wurden auch C₁₈-Säulen verwendet mit Eluenten unterschiedlicher Zusammensetzung, wie 2,5 mM 1-Butansulfonsäure, 8 mM Tetramethylammoniumhydroxid, 4 mM Malonsäure und 0,05 Vol.-% MeOH [132] oder 30 mM Ammoniumformiat, 10 mM Tetrabutylammoniumacetat und 5 Vol.-% MeOH [133].

Eine ebenfalls weit verbreitete Methode für die Selenspeziesanalytik ist die Ionenaustausch-Chromatografie. Mit Hilfe einer Kationenaustauschersäule konnten LARSEN et al. mit Pyridiniumformiat als mobiler Phase und Gradientenelution über 30 Selenspezies innerhalb von 60 min in Hefe nachweisen [134]. Für die elementselektive Detektion nutzten sie ein ICP-MS mit DRC. MICHALKE et al. entwickelten eine HPLC-ICP-MS-Methode mit einer Anionenaustauschersäule und einem Eluenten aus Natronlauge und Tetramethylammoniumhydroxid [135]. Dadurch konnten innerhalb von 8 min sechs Selenspeziesstandards gemessen werden. Die erzielten Nachweisgrenzen liegen bei etwa 0,1 µg L⁻¹ Selen. Die Anionenaustausch-Chromatografie wurde auch zur Identifizierung von selenhaltigen Proteinen (Selenoprotein P, Glutathionperoxidase, Selenalbumin) im menschlichen Plasma verwendet [136]. Die Quantifizierung der Selenverbindungen erfolgte hierbei durch Kopplung mit der ICP-DRC-MS.

Weitere Anwendungen der SEC, RPC, RPIPC und IEC sind in [1, 7, 112, 137, 138] zu finden. In den letzten Jahren wurden verstärkt Methoden der HPLC-ICP-MS-Kopplung entwickelt, die die gleichzeitige Bestimmung von mehr als einem Element zulassen [139, 140]. Daraus wird ersichtlich, dass die ICP-MS nicht nur wegen der hohen Empfindlichkeit, sondern auch wegen des Multielementcharakters sehr gut als elementselektiver Detektor geeignet ist.

2.4.4 Andere Methoden der Selenspeziesanalytik

Neben der weit verbreiteten Kopplung von HPLC und ICP-MS gibt es auch noch andere mögliche Kopplungsmethoden zur Selenspeziesanalytik. In Verbindung mit der HPLC können auch die ICP-OES und die AAS-Techniken als elementselektiver Detektor genutzt werden. Die ICP-OES fand erfolgreich Anwendung bei der Kopplung mit der IEC zur gleichzeitigen Bestimmung von Arsenspezies sowie Selenit und Selenat [141]. Mit der RPIPC und der Flammen-AAS (F-AAS) als Detektor konnten die Selenspezies Selenit, Selenat, TMS⁺, SeCys₂, SeMet, Selenoethionin und Selenocystamin innerhalb von 12 min analysiert werden [142]. Die Graphitrohr-AAS (GF-AAS) ist zwar deutlich

nachweisstärker als die F-AAS, allerdings kann die HPLC nicht direkt mit ihr verbunden werden. Es handelt sich demnach um eine „off-line“-Kopplung, bei der zuvor Fraktionen während der chromatografischen Trennung gesammelt werden müssen. Anwendungen der HPLC-GF-AAS sind in [143, 144] zu finden. Ein Vorteil der AAS-Methoden im Vergleich mit den ICP-Techniken ist die größere Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, die vor allem bei der RP(IP)-Chromatografie verwendet werden.

Für die Analyse von flüchtigen Selenverbindungen, wie Methylselenol, DMSe und Dimethyldiselenid (DMDSe) werden gaschromatografische Kopplungsmethoden angewendet. Als Detektoren werden die ICP-MS, die Mikrowellen-induzierte Plasma OES (MIP-OES) und die Atomfluoreszenzspektrometrie (AFS) verwendet [145]. Häufig ist den GC-Kopplungen eine Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction, SPME) vorgeschaltet, mit deren Hilfe die Analyten aufkonzentriert werden. Dadurch wurden verschiedene flüchtige Selenverbindungen in Hefen, Lupinen, Indischem Senf und Knoblauch nachgewiesen [146-148]. DUAN et al. entwickelten eine neue, verbesserte Methode zur Bestimmung von DMSe und DMDSe in biologischen Proben (Zwiebel, Knoblauch und deren Säfte), indem sie die Headspace-GC mit der ICP-MS koppelten [149].

Weitere Trenntechniken sind die elektrophoretischen Verfahren. Die Kapillarelektrophorese (CE) zeichnet sich durch eine hohe Auflösung aus und wurde für die Analyse verschiedener Selenpezies und -metabolite in Urin, Hefen und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet [150]. Die Kopplung der CE erfolgte überwiegend mit der ICP-MS oder auch mit UV-Detektoren. Die Gelelektrophorese (GE) ist eine sehr leistungsfähige Methode zur Trennung von Selenoproteinen und selenhaltigen Proteinen [1]. Die Natrium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-GE (SDS-PAGE) ist dabei die am häufigsten verwendete Trenntechnik. Sie wurde beispielsweise mit der Laserablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) als Detektor zur Untersuchung von selenhaltigen Proteinen in Katzenfisch (Seewolf) benutzt [151].

2.5 Chemometrische Methoden

Heutzutage führen immer leistungsfähigere, überwiegend computergestützte Analysemethoden in der Chemie, Pharmazie oder auch Bioanalytik zu enormen Datenmengen. Der Anwender ist somit kaum mehr in der Lage, die Daten mit einfachen statistischen Mitteln auszuwerten. Hierfür stehen verschiedene chemometrische Methoden zur Wahl.

Beispielsweise führt die statistische Versuchsplanung zu einem optimierten Experimentdesign oder multivariate Regressionsverfahren ermöglichen es, einen funktionalen Zusammenhang einer oder mehrerer Zielvariablen durch eine oder mehrere unabhängige Variablen zu bestimmen. Im Folgenden werden die angewendeten chemometrischen Verfahren näher beschrieben.

2.5.1 Statistische Versuchsplanung (SVP)

Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (SVP) können Versuche geplant und statistisch ausgewertet werden. Das Wesen der SVP ist durch die gleichzeitige Variation aller Einflussvariablen (Faktoren) gegenüber Ein-Faktor-Experimenten geprägt. Ziel ist es, die erforderliche Zahl der Versuche so gering wie möglich zu halten, aber dennoch einen maximalen Informationsgehalt über das Zusammenwirken der Faktoren zu gewinnen. Dadurch werden Zeit, Kosten und Verbrauchsmaterial gesenkt. Weiterhin kann die SVP zur Modellierung und Optimierung einer vorgegebenen Aufgabenstellung herangezogen werden. Um dies zu gewährleisten, haben sich folgende Prinzipien bewährt [152]:

- *Wiederholung von Versuchsplänen* (Versuchsstreuung kann ermittelt werden)
- *Randomisierung* (Auswirkungen von Störeffekten und Trends können verringert werden)
- *Blockbildung* (Auswirkungen von Chargenunterschieden und Trends werden minimiert)
- *Symmetrie* (vereinfachte Auswertung durch symmetrische Anordnung der Versuchspunkte)
- *Nutzung des Raums der unabhängigen Variablen* (gleichzeitige Variation mehrerer Variablen verringert Versuchszahl und verbessert die Aussage)
- *Vermengen* (Verringerung der Versuchszahl durch Überlagerung von Effekten)
- *Sequenzielles Experimentieren* (verbesserte Aussagen durch stufenweises Planen, Experimentieren und Analysieren)

Neben der Verringerung des Versuchsumfangs ist es außerdem möglich, zwischen Haupteffekten und Nebeneffekten (Wechselwirkungen zwischen den Variablen) zu unterscheiden und diese auch zu quantifizieren. Vor Versuchsbeginn werden die interessierenden Faktoren und die unteren und oberen Faktorstufen festgelegt. Die Zahl der

Versuche N , die notwendig sind um das System zu optimieren wird mit Gleichung 1 beschrieben. Dabei ist k die Zahl der Variablen und m die entsprechend gewählten Faktorstufen.

$$N = m^k \quad (1)$$

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Faktoren mit je zwei Faktorstufen gewählt, woraus sich ein vollständiger 2^4 -Faktorenplan ergibt. Die Versuchszahl beträgt $N = 16$. Der Vorteil von vollständigen 2^k -Faktorenplänen ist die geringe Zahl an Versuchen (bis $k = 4$) die benötigt wird, um Informationen über das System zu erhalten. Nachteilig ist allerdings, dass nur lineare Abhängigkeiten zwischen Einfluss- und Zielgrößen beschrieben werden können.

Die Gesamtmatrix für den Versuchsplan besteht aus verschiedenen Teilmatrizen. Im Anhang 1 ist der verwendete vollständige 2^4 -Faktorenplan dargestellt. Zur Verallgemeinerung erfolgt bei Faktorenplänen mit zwei Stufen eine Transformation der natürlichen Werte der Faktorstufen in -1 und +1, die vereinfacht mit „-“ für die untere Stufe und „+“ für die obere Stufe gekennzeichnet werden. Die Planmatrix stellt eine Anweisung für die Durchführung der Versuche dar, wobei auf zufällige Reihenfolge geachtet werden muss. Die (Mess-)Ergebnisse y_i der Experimente werden in der Antwortmatrix zusammengefasst. Dabei können nicht nur eine Antwortgröße, sondern auch mehrere gemessen werden. Die Einflussgrößen x_i , wie auch die Antwortgrößen y_i , können qualitativ oder quantitativ sein.

In der Matrix der unabhängigen Variablen sind die Effekte der Faktoren und die Effekte der Faktorwechselwirkungen zusammengefasst. Die Vorzeichen der Faktoren werden direkt aus der Planmatrix übernommen. Die Vorzeichen der Wechselwirkungen der Variablen x_i ergeben sich aus der Multiplikation der Vorzeichen der einzelnen Faktoren miteinander. Vor der Spalte des ersten Haupteinflusses (Faktor 1) wird ein Spaltenvektor +1 mit der Bezeichnung I (Identität) oder 0 eingefügt. Er gibt in der Effektmatrix den Mittelwert aus und ist das erste Glied im Regressionspolynom. Aus der berechneten Effektmatrix lassen sich Haupteffekte (HE) und Wechselwirkungseffekte (WE) bestimmen, die durch die Auswirkungen der einzelnen Faktoren aufeinander hervorgerufen werden. HE unterliegen dabei dem Einfluss von nur einer Variablen. WE können nur entstehen, wenn mindestens zwei HE auf die Antwortgröße wirken und die HE nicht additiv sind [152]. Es ergeben sich für k Variablen:

m^k	Einflüsse
k	Haupteinflüsse
$\frac{k(k-1)(k-2)\dots(k-h+1)}{h!}$	h -Faktor-Wechselwirkungen

Für einen 2^4 -Faktorenplan werden demnach vier Haupteinflüsse (Haupteffekte), sechs 2-Faktor-Wechselwirkungen, vier 3-Faktor-Wechselwirkungen und eine 4-Faktor-Wechselwirkung erhalten. Die Effektmatrix berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$Effekt = \frac{\sum x_i \cdot y_i}{\frac{N}{2}} \quad (2)$$

Die berechneten Effekte können positive oder auch negative Werte annehmen. Es ergibt sich ein positiver Effekt, wenn die Antwortgröße beim Übergang von der niedrigeren zur höheren Stufe der betreffenden Variable größer wird. Um stochastische Abhängigkeiten zwischen quantitativen Faktoren und Antwortgrößen zu untersuchen, werden Regressionskoeffizienten B_i entsprechend Gleichung 3 berechnet.

$$B_i = \frac{\sum x_i \cdot y_i}{N} = \frac{Effekt}{2} \quad (3)$$

Daraus ergibt sich ein Regressionsmodell, das den quantitativen Zusammenhang zwischen den Regressoren und den Regressanden ausdrückt. In Gleichung 4 ist das Regressionspolynom für einen 2^4 -Faktorenplan gezeigt. Das Absolutglied B_0 ergibt sich aus der Identitäts-Spalte.

$$Y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 + B_4x_4 + B_5x_1x_2 + B_6x_1x_3 + B_7x_1x_4 + B_8x_2x_3 + B_9x_2x_4 + B_{10}x_3x_4 + B_{11}x_1x_2x_3 + B_{12}x_1x_2x_4 + B_{13}x_1x_3x_4 + B_{14}x_2x_3x_4 + B_{15}x_1x_2x_3x_4 \quad (4)$$

Um gesicherte Aussagen über die Relevanz der HE und WE treffen zu können, müssen die berechneten Regressionskoeffizienten auf Signifikanz geprüft werden [153, 154]. Dazu wird der mittlere Messfehler s_y mit Gleichung 5 bestimmt, wobei N die Versuchszahl und s_k^2 die Einzelvarianzen darstellen.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N s_k^2}{N}} \quad (5)$$

Im weiteren Verlauf wird der Fehler der Regressionskoeffizienten s_B unter Berücksichtigung der Zahl der Wiederholbestimmungen n berechnet (Gleichung 6).

$$s_B = \frac{s_y}{\sqrt{N \cdot n}} \quad (6)$$

Die Signifikanzprüfung der Regressionskoeffizienten erfolgt mit Hilfe des Studentschen t -Test und den dazu nötigen Freiheitsgraden f sowie dem Signifikanzniveau α (Gleichung 7).

$$B^* = t(\alpha; f) \cdot s_B \text{ mit } f = N(n-1) \quad (7)$$

Ein signifikanter Einfluss wird nachgewiesen, wenn die Regressionskoeffizienten B_i größer sind als die Prüfgröße B^* . Alle anderen können für die weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden.

Bei Penetrationsstudien mit liposomaler Superoxiddismutase konnten mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung Haupteinflussgrößen und auch 2-Faktor-Wechselwirkungen identifiziert werden, die die Penetrationseffizienz signifikant verbessern. Die *In-vitro*-Untersuchungen erfolgten in einer statischen Diffusionszelle mit Schweinehaut [155]. In einer anderen Studie wurde mittels SVP der Einfluss von sieben verschiedenen Zytokinen auf die *In-vitro*-Erythropoese menschlicher Blutzellen aus Nabelschnurblut untersucht [156].

2.5.2 Multiple lineare Regression (MLR)

Auch die multiple lineare Regression (MLR) hat als Ziel einen funktionalen Zusammenhang zwischen einer abhängigen Variablen y (Regressand) und mehreren unabhängigen Variablen x (Regressor) darzustellen. Allerdings werden bei der MLR keine WE berechnet. Das Modell lautet wie folgt [157]:

$$y_i = B_0 + B_1 x_{1i} + B_2 x_{2i} + \dots + B_n x_{ni} + e_i \quad (8)$$

Jeder Messwert y_i kann somit durch einen linearen Zusammenhang zwischen den Regressoren x_{ni} und einem vom Modell nicht beschriebenen zufälligen Fehler e_i beschrieben werden. Damit die Berechnung der Regressionskoeffizienten B_0 bis B_n erfolgen kann, muss ein (über-)bestimmtes lösbares Gleichungssystem vorliegen. Dies ist der Fall, wenn für n Regressionskoeffizienten mindestens n unabhängige Gleichungen vorliegen [158]. In Matrixschreibweise können die Einzelgleichungen wie folgt zusammengefasst werden:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (9)$$

Es werden meistens mehr Messungen der Zielgröße y durchgeführt, als Regressionskoeffizienten zu bestimmen sind. In diesem Fall erfolgt die Berechnung der Regressionskoeffizienten über ein Least-Squares-Verfahren durch Minimierung der Fehlerquadratsummen analog zur eindimensionalen linearen Regression.

Das berechnete Kalibriermodell wird anschließend validiert, um eine Aussage über die Güte des gefundenen Zusammenhangs zwischen den x - und y -Variablen zu treffen. Dafür stehen die beiden Möglichkeiten der internen und externen Validierung zur Wahl.

Die Kreuzvalidierung gehört zu der internen Methode und ist das am häufigsten angewendete Verfahren [158]. Bei der Kreuzvalidierung wird ein und derselbe Datensatz für die Kalibrierung und Validierung verwendet. Von dem Datensatz werden Objekte weggelassen und ohne diese das Kalibriermodell erstellt. Danach werden die weggelassenen Objekte mit diesem vorhergesagt und die Residuen berechnet [159]. Wenn genau jedes Objekt einmal weggelassen und dieses dann vorhergesagt wird, spricht man von einer vollständigen Kreuzvalidierung.

Da bei der internen Validierung jedes Objekt an der Kalibrierung und auch an der Validierung beteiligt ist, sollte dem internen Verfahren die externe Validierung vorgezogen werden. Für die externe Validierung wird ein separater Kalibrier- und Validierdatensatz benötigt. Folglich ist die externe Methode aufwändiger, stellt aber die beste Möglichkeit dar, den Vorhersagefehler abzuschätzen. Es muss besonders darauf geachtet werden, dass die Repräsentativität der untersuchten Daten für die Validierung gegenüber den Kalibrierdaten gegeben ist. Für beide Validierverfahren können zur Beurteilung der Vorhersagegüte des Modells die Restvarianz s_R^2 und der RMSEP-Wert (root mean square error of prediction) herangezogen werden. Zur Berechnung von s_R^2 bzw. des RMSEP-Wertes wird die Fehlerquadratsumme PRESS (predicted residual sum of squares) benötigt.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (10)$$

y_i – Referenzwert, \hat{y}_i – vorhergesagter Wert

$$s_R^2 = \frac{PRESS}{n} \quad (11)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (12)$$

Die MLR wurde erfolgreich als Vorhersagemodell bei Permeabilitätsuntersuchungen von 241 strukturell verschiedenen Pharmaka im Caco-2-Zellmodell angewendet. Durch das Regressionsmodell konnten etwa 72 % der Gesamtvarianz beschrieben werden [160]. Weitere Beispiele für *In-vitro*-Permeabilitäts- und Absorptionsuntersuchungen verschiedener Substanzen, bei denen die MLR als Vorhersagemodell genutzt wurde, sind in [161-163] zu finden.

2.5.3 Partial-Least-Squares-Regression (PLS)

Eine sehr weit verbreitete Methode der multivariaten Regression ist die Partial-Least-Squares-Regression (PLS). Für die Berechnungen mit der PLS werden wiederum eine **X**-Matrix und eine **Y**-Matrix benötigt. Zur Anwendung kommen die Modelle der PLS1 oder PLS2. Bei der PLS1 wird ein Modell entwickelt, das nur eine Zielgröße y vorhersagen kann. Mit Hilfe der PLS2 wird aber auch die gleichzeitige Vorhersage von mehreren y -Werten möglich.

Die beiden **X**- und **Y**-Matrizen werden so in zwei kleinere Matrizen zerlegt, dass die Kovarianzen zwischen den Matrizen der latenten Variablen **T** und **U** maximiert werden [164]. Die Berechnung der latenten Variablen erfolgt dabei mittels eines iterativen Algorithmus. In der Abbildung 2.7 ist das Vorgehen bei der PLS mit den beteiligten Matrizen schematisch dargestellt.

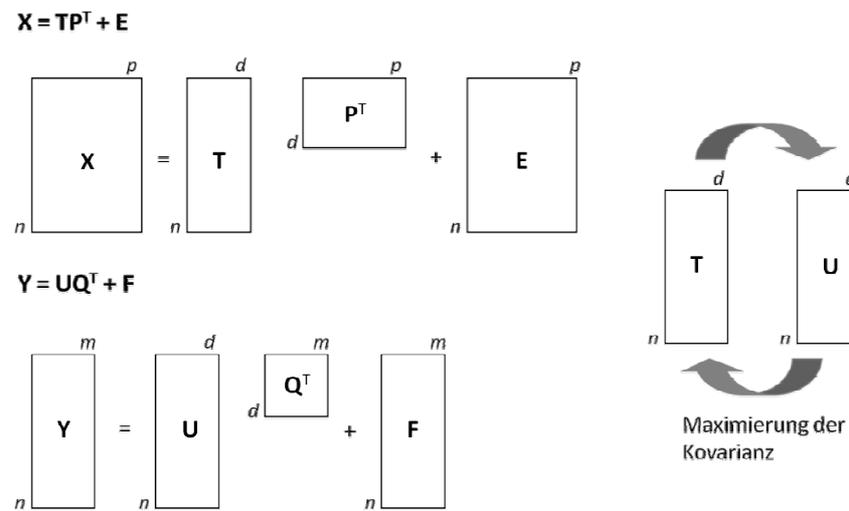


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der PLS: \mathbf{X} – Matrix der unabhängigen Variablen; \mathbf{Y} – Matrix der abhängigen Variablen; \mathbf{T} , \mathbf{U} – Matrizen der latenten Variablen; \mathbf{P} , \mathbf{Q} – Ladungen der \mathbf{X} - bzw. \mathbf{Y} -Matrix; \mathbf{E} , \mathbf{F} – Matrix der Residuen der \mathbf{X} - bzw. \mathbf{Y} -Matrix

Das PLS-Modell muss ebenfalls durch die Verwendung der Kreuzvalidierung oder eines Testdatensatzes validiert werden [165]. Als Gütemaß dient auch hier der RMSEP-Wert.

Wie auch mit der MLR, können mit der PLS Modelle für die Vorhersage der Permeabilität verschiedener Pharmaka im Caco-2-Zellmodell erstellt werden [166, 167].

2.5.4 Künstliche neuronale Netzwerke (ANN)

Informationsverarbeitende Systeme, die sich am Vorbild des Gehirns orientieren, nennt man künstliche neuronale Netzwerke (artificial neural networks, ANN). In ihrem Aufbau und der Funktionsweise sind sie den biologischen neuronalen Netzen, allerdings als stark idealisiertes Modell, nachempfunden [165]. Nervenzellen (Neuronen) sind in drei Hauptstrukturen gegliedert und zwar Dendriten, Zellkörper und Axon. Das Axon ist wiederum mit Dendriten anderer Nervenzellen verbunden. Über die Synapsen werden Informationen in Form elektrischer Signale weitergeleitet, aber nur dann, wenn ein bestimmter Schwellenwert erreicht wird.

Die ANN bestehen ebenfalls aus Neuronen, wobei die Topologie der Netze durch die Zahl der Neuronen, die sich auf einer oder mehreren Schichten befinden, beschrieben wird. In mehrschichtigen Perceptrons (multilayer perceptrons, MLP) sind die Neuronen in mehreren Schichten angeordnet und es entstehen so genannte verdeckte Schichten. Durch die Mehrschichtigkeit kann die Leistungsfähigkeit gesteigert werden [165].

Ein künstliches Neuron ist durch die Gewichte, die Übertragungs- und Aktivierungsfunktion sowie den Schwellenwert charakterisiert (siehe Abbildung 2.8). In

den Neuronen wird schließlich entschieden, wohin und mit welcher Wichtung eingehende Informationen weitergeleitet werden [159]. Das Neuron wird aber erst aktiviert, wenn ein bestimmter Schwellenwert überschritten wurde.

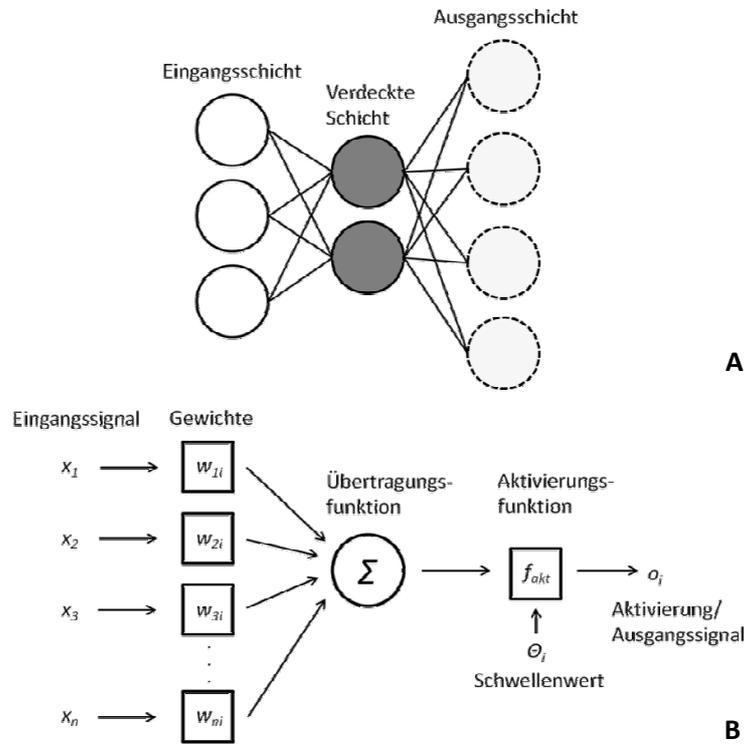


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung (A) eines mehrschichtigen Perceptrons und (B) eines künstlichen Neurons

Für die Berechnung der ANN müssen ausreichend große Datensätze vorhanden sein. Der Aufbau und die Verbesserung der ANN wird über verschiedene Lernregeln gewährleistet. Ziel der Lernregel ist es, für Netzeingaben adäquate Netzausgaben zu erzeugen. Häufig wird das durch die Veränderung der Wichtung zwischen den Neuronen erreicht. Die Netze können aber auch durch das Hinzufügen oder Weglassen von Neuronen oder durch Änderung der Aktivierungsfunktion optimiert werden.

Die ANN lernen in der Trainingsphase aus repräsentativen Daten, auf deren Grundlage ein Modell erzeugt wird. Anschließend wird das Modell in der Testphase auf bekannte Daten angewendet. Die Testdaten dürfen aber nicht bei der Modellbildung verwendet worden sein. Erfolgt die richtige Interpretation der Daten, dann ist das Modell valide. Ist das nicht der Fall, müssen weitere Daten für die Trainingsphase bereitgestellt werden.

In unterschiedlichen Forschungsarbeiten wurden die ANN zur Vorhersage der Permeabilität verschiedener Verbindungen durch Caco-2-Zellmonolayern erfolgreich angewendet [168, 169]

3 Experimenteller Teil

3.1 Standardzellkultur

Die im Rahmen der Arbeit verwendete humane Kolonadenokarzinomzelllinie Caco-2 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Alle Arbeitsschritte in Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank (Heraeus Hera Safe, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland) mit sterilen Einwegpipetten (Greiner, Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Weiterhin wurden alle unter der Sterilwerkbank verwendeten Geräte und Kultivierungsmaterialien mit 70 % (v/v) Isopropanol desinfiziert.

Die routinemäßige Subkultivierung der Caco-2-Zellen erfolgte in 75-cm²-Zellkulturflaschen (Greiner, Bio-One) in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxidatmosphäre. Als Zellkulturmedium wurde Quantum 286 mit L-Glutamin (PAA, Cölbe, Deutschland) ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Bei diesem Medium war kein Zusatz von fetalem Kälberserum erforderlich, da bereits alle notwendigen Wachstumsfaktoren enthalten sind. Das Passagieren der Zellen erfolgte jede Woche nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz und alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wurden vor Beginn des Passagierens sämtliche Medien im Wasserbad (Julabo ED-13, Seelbach, Deutschland) auf 37°C temperiert. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette mittels einer Absaugeinrichtung entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 mL Dulbecco's PBS (ohne Ca und Mg, PAA), um den Zellrasen zu waschen. Nach 2 min Inkubationszeit wurde PBS abgesaugt und 2 mL 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA (PAA) zugegeben. Nach 2 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde vollständig abgesaugt, erneut 2 mL 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA zugesetzt und 8 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die adhärennten Zellen vom Flaschenboden vollständig gelöst hatten (ggf. Zellkulturflasche auf Handballen schlagen), wurde die Enzymaktivität von Trypsin mit 4,5 mL Zellkulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-mL-PP-Röhrchen (steril, Greiner Bio-One) überführt und bei 1350 rpm für 5 min bei 22°C zentrifugiert (Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet mit 6 mL Zellkulturmedium resuspendiert

und entsprechend der nach einer Woche zu erreichenden Konfluenz von 70-80 % ausgesät (Split 1:75).

3.2 Ussing-Kammer-Experimente

3.2.1 Kultivierung der Zellen auf Snapwell®-Einsätzen

Für die Ussing-Kammer-Experimente wurden die Caco-2-Zellen (Passage 32-47) auf Snapwell®-Einsätzen kultiviert, die in 6-well-Platten implementiert waren. Dabei wurden zwei verschiedene mikroporöse Membranmaterialien verwendet – zum einen Snapwell®-Einsätze mit einer Membran aus Polycarbonat (PC) (12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, Corning, Amsterdam, Niederlande) und zum anderen mit einer Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) (12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, Corning).

Die Zellen wurden, wie von HIDALGO et al. [79] beschrieben, mit einer Zellzahl von 63.000 Zellen pro cm² auf die Membranfläche von 1,13 cm² (entspricht 71.000 Zellen) ausgesät. Oberhalb der Membran (mukosal/apikal) wurden 0,5 mL Zellkulturmedium zugegeben und unterhalb der Membran (serosal/basolateral) 5 mL. Die Kultivierung der Caco-2-Zellen auf den Snapwell®-Einsätzen erfolgte, wie auch die Standardzellkultur, im Brutschrank unter den in Abschnitt 3.1 angegebenen Bedingungen. Ein Unterschied zur Standardzellkultur ist der Zusatz von Antibiotika. Hierzu wurde das Zellkulturmedium mit Penicillin/Streptomycin (100x, PAA) versetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 100 µg mL⁻¹ Streptomycin und 100 U mL⁻¹ Penicillin ergab. Das Medium wurde alle 2-3 Tage auf der apikalen Seite und alle 7 Tage auf der serosalen Seite ausgetauscht. Das Zellkultivierungs-Protokoll ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Nach 19-21 Tagen waren die Zellen ausdifferenziert und konnten für die Ussing-Kammer-Versuche verwendet werden.

Mit Hilfe eines Häemocytometers (Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim, Deutschland) und eines Lichtmikroskops (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Deutschland) wurde die Zellzahl für die Kultivierung auf den Snapwell®-Einsätzen bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit einer 1:20 (v/v) Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurden 10 µL der verdünnten Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Eine optimale Verdünnung liegt vor, wenn 30-40 Zellen pro Quadrant zu finden sind. Die Zellzahl pro mL errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl (Zellen/mL)} = \frac{\text{Anzahl}_{\text{ges}}(\text{lebende Zellen})}{\text{Anzahl}_{\text{Quadranten}}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 \quad (13)$$

Tabelle 3.1: Protokoll der Zellkultivierung auf Snapwell®-Einsätzen

Tag	Wochentag	Aktion	Tag	Wochentag	Aktion
0	Mi	Aussaat	11	So	
1	Do		12	Mo	MeWe o
2	Fr	MeWe o	13	Di	
3	Sa		14	Mi	MeWe o/ MeWe u
4	So		15	Do	
5	Mo	MeWe o	16	Fr	MeWe o
6	Di		17	Sa	
7	Mi	MeWe o/MeWe u	18	So	
8	Do		19	Mo	MeWe o /Versuch
9	Fr	MeWe o	20	Di	alternativ: Versuch
10	Sa		21	Mi	alternativ: Versuch

MeWe o – Mediumwechsel oberhalb der Membran

MeWe u – Mediumwechsel unterhalb der Membran

3.2.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Das Wachstum der Zellen bzw. das Ausbilden eines geschlossenen Zellmonolayers hat zur Folge, dass sich eine Barriere zwischen der mukosalen und der serosalen Seite der Snapwell®-Einsätze ausbildet. Die Barrierefunktion des Epithels kann durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (transepithelial electric resistance, TEER) bestimmt werden und dient dadurch der Überwachung des Zellwachstums bzw. der Integrität des Zellmonolayers, während der Kultivierung der Caco-2-Zellen auf den Snapwell®-Einsätzen [81]. Weiterhin lassen hohe Werte auf einen dichten und intakten Zellmonolayer schließen. Der TEER setzt sich aus dem zellulären Widerstand (mukosale und serosale Membran) und dem parazellulären Widerstand (tight junction) zusammen. Mit Hilfe des Volt-Ohm-Meters Millicell-ERS (Millipore Corporation, Bedford, USA) wurde der TEER in regelmäßigen Abständen gemessen. Vor den eigentlichen Messungen musste die Doppelelektrode für 30 min in 70 % (v/v) Isopropanol sterilisiert und danach für 20 min in Quantum 286 equilibriert werden. Anschließend wurden die 6-well-Platten aus dem Brutschrank genommen und unmittelbar mit den Messungen begonnen. Die Doppelelektrode wird in den 6-well-Platten so positioniert, dass das kürzere Ende in das obere Kompartiment und das längere Ende in das untere Kompartiment eintaucht (Abbildung 3.1).

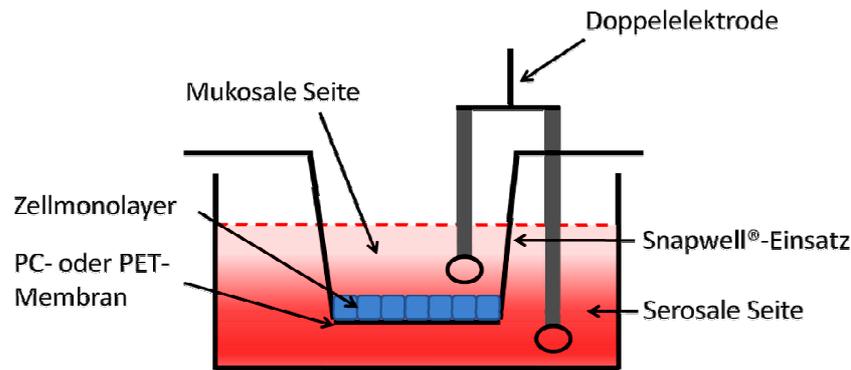


Abbildung 3.1: Snapwell®-Einsatz mit Caco-2-Zellmonolayer

Durch die Elektroden werden Stromimpulse ausgesendet, die zu einer Spannungsänderung führen und der TEER schließlich über das Ohmsche Gesetz (Gleichung 14) berechnet werden kann.

$$R = \frac{U}{I} \quad (14)$$

Als Blindwert wurde der TEER eines Snapwell®-Einsatzes ohne Zellen im Kulturmedium gemessen. Dadurch berechnet sich der TEER des Zellmonolayers wie folgt:

$$\text{TEER} (\Omega \text{ cm}^2) = (\text{TEER}_{\text{gesamt}} - \text{TEER}_{\text{Blindwert}}) \cdot \text{Membranoberfläche} \quad (15)$$

Es wurden nur Zellmonolayer für die Ussing-Kammer-Versuche verwendet, die einen TEER von $> 200 \Omega \text{ cm}^2$ zeigten [101].

3.2.3 Experimentelle Bedingungen

3.2.3.1 Ussing-Kammer

Die Ussing-Apparatur (Scientific Instruments, K. Mussler, Aachen, Deutschland) besteht aus einem metallischen Heizblock, der an ein externes Wasserbad mit Thermostat (Julabo ED-13) angeschlossen ist. Die Snapwell®-Einsätze können zwischen die beiden Halbzellen der Diffusions-Kammern (Ussing-Kammern) eingebaut werden, wodurch eine räumliche Trennung in einen mukosalen und einen serosalen Bereich erzielt wird. In den Heizblock können bis zu sechs vertikale Diffusions-Kammern eingebaut werden. Demzufolge wird die Durchführung von sechs simultan ablaufenden Transportexperimenten ermöglicht. Die

Ussing-Kammern werden auf 37°C temperiert und über einen Gasflussregler mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂, Linde, Pullach, Deutschland) begast. Der Gasflussregler sollte so eingestellt werden, dass ca. 20 Blasen pro 10 s aufsteigen. Der schematische Aufbau der Ussing-Apparatur sowie der Diffusions-Kammern ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

Mit der Ussing-Kammer-Technik können elektrophysiologische Parameter kontinuierlich während der Versuche gemessen werden (s. Abschnitt 3.2.3.2). Aus diesem Grund sind je Halbkammer zwei Elektroden (0,8 mm Durchmesser, Ag/AgCl) angebracht. Die Elektroden sind an einen Mikrocomputer (Voltage/Current-Clamp-Interface) angeschlossen, der mit einem Arbeitsplatzcomputer verbunden ist.

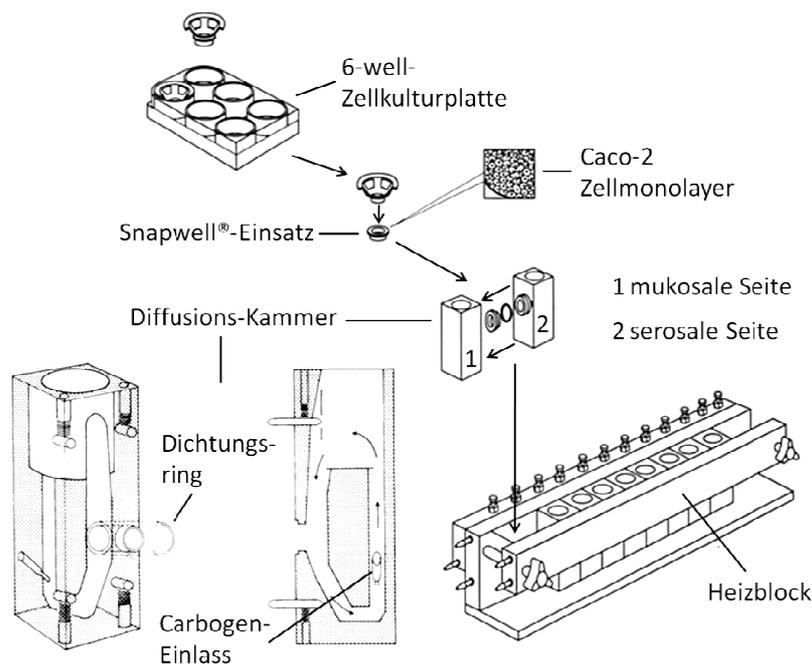


Abbildung 3.2: Darstellung der Ussing-Apparatur und der vertikalen Diffusions-Kammer, verändert nach [99, 170]

3.2.3.2 Elektrophysiologische Parameter

Während der Ussing-Kammer-Versuche können verschiedene elektrophysiologische Parameter kontinuierlich bestimmt werden. Eine membrannahe Elektrode dient der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD_t) und über eine membranferne Elektrode können externe Stromimpulse ausgesendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die „open circuit“-Methode zur Bestimmung der elektrophysiologischen Parameter verwendet. Mit dieser Methode wird die PD_t nicht beeinflusst [171]. Es werden Stromimpulse (ΔI) von 50 μA mit einer Impulsdauer von 200 ms alle 60 s ausgesendet.

Dadurch wird eine kurzzeitige Änderung der Potenzialdifferenz (ΔPD_t) induziert und über das Ohmsche Gesetz kann daraus der Gewebewiderstand (R_t) berechnet werden.

$$R_t = \frac{\Delta PD_t}{\Delta I} \quad (16)$$

Der Gewebewiderstand ist vergleichbar mit dem in 3.2.2 beschriebenen TEER und kann auch als Gewebeleitfähigkeit (G_t) ausgedrückt werden.

$$G_t = \frac{1}{R_t} \quad (17)$$

Vor Beginn der eigentlichen Ussing-Kammer-Messungen müssen der Flüssigkeitswiderstand des verwendeten Transportpuffers und die Elektroden-Eigenpotenzial-Differenz ermittelt werden. Dazu wird ein Snapwell[®]-Einsatz ohne Zellen in die Kammern eingebaut und mit Hilfe der Software „Clamp“ (Version 2.10, Scientific Instruments, K. Mussler) die erforderlichen Werte bestimmt. Durch diese Blindwertmessungen wird sichergestellt, dass PD_t und R_t allein vom Caco-2-Zellmonolayer verursacht werden.

3.2.3.3 Transportexperimente mittels statistischer Versuchsplanung

Für die Durchführung der Transportexperimente wurden vier, aus ernährungsphysiologischer Sicht, relevante Selenspezies ausgewählt. Dabei handelte es sich um die beiden anorganischen Formen Natriumselenit und Natriumselenat sowie die organischen Spezies SeMet und MeSEC. Die zwei Faktorstufen wurden in Vorversuchen bestimmt und zu $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (-) und $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (+) je Spezies festgelegt. Die untere Faktorstufe wurde so gewählt, dass auch nach der für die Analyse notwendigen Verdünnung der Proben ein Messsignal quantitativ detektierbar war. Somit stellt dieser Wert den unteren analytisch messbaren Bereich des entwickelten Kopplungsverfahrens dar. Demgegenüber erfolgte die Festlegung der oberen Stufe hinsichtlich eines gut messbaren und von der unteren Stufe deutlich zu unterscheidendem Messsignals sowie unter Berücksichtigung von Literaturangaben [5, 6]. Daraus ergibt sich ein 2^4 -Faktorenplan, wie er in Tabelle 2.8 (Abschnitt 2.5.1) zu finden ist.

Die Selenspezies-Stammlösungen mit 1000 mg L^{-1} Selen wurden aus den Einzelverbindungen Natriumselenit (99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und

Natriumselenat (Sigma-Aldrich) hergestellt. Die Stammlösungen von SeMet ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) und MeSEC (Sigma-Aldrich) hatten eine Konzentration von 500 mg L^{-1} Selen. Für die Herstellung der Stammlösungen und aller anderen Verdünnungen wurde Reinstwasser verwendet. Alle Selenspezies-Lösungen wurden bei 4°C in der Dunkelheit gelagert. Als Transportpuffer diente eine „Hank’s balanced salt solution“ (HBSS), um physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Diese ist aus den Einzelverbindungen in Tabelle 3.2 zusammensetzt. Die Einwaage der Einzelverbindungen wurde mit der Laborwaage LP620S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der „Hank’s balanced salt solution“ (HBSS)

Substanz	Konzentration in g L^{-1}	Substanz	Konzentration in g L^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,185	NaHCO_3	0,350
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,100	NaCl	8,000
MgSO_4	0,049	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,060
KCl	0,400	Glukose	4,500
KH_2PO_4	0,060		

Für den Ussing-Versuch wurde der Snapwell[®]-Einsatz mit einer Pinzette aus der 6-well-Platte entnommen und mit vorgewärmter HBSS (37°C) gespült. Anschließend wurde der Einsatz in die Diffusions-Kammer vorsichtig eingebaut. Die beiden Kammerhälften wurden mit $4,5 \text{ mL}$ vorgewärmter HBSS (37°C) simultan befüllt, um einen hydrostatischen Überdruck zu vermeiden. Dieser könnte zu einem ungewollten Ablösen des Zellmonolayers von der mikroporösen Membran führen. Die Messung von R_t wurde gestartet, sobald die Elektroden in die Kammerhälften eingebaut waren. Nach 15 min Äquilibrationszeit der Caco-2-Zellen startete die Begasung mit Carbogen. Die Transportversuche begannen nach weiteren 5 min durch Zugabe von $0,5 \text{ mL}$ HBSS in die beiden Halbkammern. Im Unterschied zur serosalen Seite enthielt die zugegebene HBSS der mukosalen Seite alle vier Selenspezies zu je $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ oder $4000 \mu\text{g L}^{-1}$ entsprechend des 2^4 -Faktorenplans. Es wurden zu definierten Probennahmezeitpunkten ($40, 80$ und 120 min nach der Selenspezieszugabe) Aliquote von $50 \mu\text{L}$ jeweils aus der mukosalen und serosalen Seite entnommen. Bis zur Messung mit der HPLC-ICP-MS lagerten die Proben bei 4°C im Kühlschrank. Die Analyse erfolgte innerhalb eines Tages nach Versuchsdurchführung.

Neben den Versuchen nach dem 2^4 -Faktorenplan und der daraus folgenden simultanen Applikation der vier Selenspezies wurden auch Einzelversuche durchgeführt. Der einzige

Unterschied liegt dabei in der Applikation von nur einer Selenspezies je Versuch. Bei diesen Versuchen wurden ebenfalls die Konzentrationen $100 \mu\text{g L}^{-1}$ und $400 \mu\text{g L}^{-1}$ gewählt. Alle Transportversuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, um Aussagen über die Versuchsstreuung treffen zu können.

3.2.3.4 Akkumulationsexperimente

Der Versuchsablauf der Akkumulationsexperimente war im Wesentlichen der gleiche, wie er für die Transportexperimente in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben ist. Im Gegensatz dazu wurden aber nur die vier Selenspezies bei Einzelapplikation in der hohen Konzentrationsstufe ($400 \mu\text{g L}^{-1}$) untersucht. Jeder der vier Versuche wurde sechsmal durchgeführt, wobei die Snapwell[®]-Einsätze mit den Caco-2-Zellmonolayern nach 120 min ausgebaut und dreimal mit vorgewärmter PBS gespült wurden. Die Aufbewahrung der Einsätze erfolgte in 50 mL PP-Röhrchen (Greiner Bio-One). Weiterhin wurden Proben aus der mukosalen und serosalen Seite entnommen. Die Probenlösungen sowie die Snapwell[®]-Einsätze lagerten bei 4°C im Kühlschrank. Die Messungen mit der ICP-DRC-MS erfolgten immer am Tag der Versuchsdurchführung. Vor den Messungen wurden auf die Snapwell[®]-Einsätze mit den Caco-2-Zellen wenige μL konzentrierte HNO_3 gegeben. Nach 90 min Einwirkzeit waren die Zellen vollständig aufgelöst und die erhaltenen Lösungen konnten analysiert werden.

3.3 Enzymatische Hydrolyse des zertifizierten Referenzmaterials

Bei dem zertifizierten Referenzmaterial handelt es sich um eine selenangereicherte Hefe (SELM-1, National Research Council Canada, CNRC).

Als Extraktionsmethode wurde die enzymatische Hydrolyse verwendet, die in der Selenspeziesanalytik weit verbreitet ist [1]. Allerdings zeigten CUDERMAN et al., dass die verwendeten Enzyme selbst Selen bzw. Selenspezies enthalten können [172]. Aus diesem Grund wurde auch das verwendete Enzym hinsichtlich des Gehaltes an Selen(-spezies) untersucht.

Für die enzymatische Hydrolyse wurden 0,2 g SELM-1 und 0,05 g Protease XIV (Sigma-Aldrich) in ein 15-mL-PP-Röhrchen eingewogen und mit 2,5 mL Reinstwasser versetzt. Die Probe wurde bei 37°C für 20 h in einem Wasserbad (SW 20C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) geschüttelt. Danach wurde bei 3000 rpm für 20 min

zentrifugiert (Universal 16 A, Hettich Zentrifugen) und der Überstand mittels 0,45 µm Spritzenfilter (FP 30/0,45 CA-S, Whatman® GmbH, Dassel, Deutschland) filtriert.

3.4 Apparative Messbedingungen und Kalibration

3.4.1 Bestimmung des Selengesamtgehaltes mittels ICP-DRC-MS

Alle Untersuchungen zur quantitativen Analyse des Selengesamtgehaltes erfolgten mit dem ELAN DRCE ICP-MS (Perkin Elmer SCIEX Instruments, Concord, Ontario, USA). Das Gerät wurde im DRC-Modus betrieben, um die auftretenden Molekülioneninterferenzen zu verringern. Die Hauptstörungen bei der Selenanalytik werden durch Molekülionen der Ar-Isotope hervorgerufen.

Die konstanten Messparameter des ICP-MS-Gerätes und der DRC wurden zu Beginn der Arbeiten optimiert und eingestellt (Tabelle 3.3). Hierbei handelt es sich z. B. um die Plasma-RF-Leistung, verschiedene Spannungseinstellungen des analysierenden Quadrupols sowie des DRC-Quadrupols, Zellgasfluss des Reaktionsgases Methan (99,9995 %, Riessner-Gase GmbH & Co. KG, Lichtenfels, Deutschland) und die Einstellung der Parameter q (RPq – Rejection parameter) und RPa.

Neben den konstanten Parametern gibt es auch variable Parameter, die einer messtäglichen Optimierung unterliegen. Hierzu zählen die Einstellung des Zerstäubergasflusses oder auch die AutoLens™-Kalibration. Zur Überprüfung der Gerätespezifikation wird ein täglicher Eignungstest (daily performance test) durchgeführt. Dieser beinhaltet die Kontrolle der Intensitäten von Mg, Rh und Pb (je 10 µg L⁻¹). Weiterhin erfolgt die Überprüfung der Oxidbildungsrate. Die Mittelwerte der Elementintensitäten und die Oxidrate müssen folgende Spezifikationsgrenzen einhalten:

$$^{24}\text{Mg} \geq 20.000 \text{ cps}$$

$$^{103}\text{Rh} \geq 150.000 \text{ cps}$$

$$^{208}\text{Pb} \geq 50.000 \text{ cps}$$

$$\text{CeO}^+/\text{Ce}^+ \leq 3 \%$$

Tabelle 3.3: Messparameter für die Bestimmung des Selengesamtgehaltes mittels ICP-DRC-MS

ICP-MS	ELAN DRCE (Perkin Elmer)
ICP RF-Leistung	1100 W
Plasmagasstrom	15 L min ⁻¹
Hilfsgasstrom	1,1 L min ⁻¹
Zerstäubergasfluss	0,88 bis 0,92 L min ⁻¹
Interface	Ni-Konen
AutoLens™	6,7 bis 10,5 V (für Rh)
CPV	-15 V
CRO	-9 V
QRO	0 V
DRC CPV	-18 V
DRC CRO	-1,5 V
DRC QRO	-7,5 V
Zellgasfluss	1,1 mL min ⁻¹ Methan
RPq	0,8
RPa	0,25
Messisotop	⁸⁰ Se
Scan Modus	Peak Hopping
Sweeps	30
Replicates	3
Dwell time	35 ms

Für die Herstellung der Kalibrationsstandards wurde ein 1000 mg L⁻¹ Selen-ICP-Standard (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Kalibrationsbereiche wurden an die zu analysierenden Proben der Akkumulationsversuche sowie an die Messungen des Referenzmaterials SELM-1 und des Enzyms Protease XIV angepasst. Weiterhin erfolgte eine spezifische Matrixanpassung (durch HNO₃ oder HBSS) der Kalibrationslösungen, um Matrixeffekte zu vermeiden. Die Kalibrationsstandards wurden an jedem Messtag frisch hergestellt.

3.4.2 Selenspeziesanalytik mittels HPLC-ICP-DRC-MS

Für die chromatografische Trennung wurde ein Series 200 HPLC System (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA) verwendet. Das System besteht aus einer quaternären HPLC-Pumpe, einem Autosampler, einem Säulenofen und einem Vakuum-Entgaser. Das HPLC-System wurde über einen kurzen Schlauch aus PEEK an das ICP-DRC-MS (s. Abschnitt 3.4.1) als elementselektiven Detektor gekoppelt. Die Injektion erfolgte über eine 200-µL-Probenschleife.

Im Verlauf der Methodenentwicklung und -validierung wurde der Einsatz der RPIP-Chromatografie als auch der IE-Chromatografie getestet. Dafür wurde die LiChrosorb RP18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) für die RPIPC und die Anionenaustauschersäule IonPac AS 7 (4 mm x 250 mm, 10 μ m, Dionex, Sunnyvale, Connecticut, USA) für die IEC gewählt. Bei der IEC wurde zusätzlich noch eine Vorsäule IonPac AG 7 (4 mm x 50 mm, 10 μ m, Dionex) verwendet.

Als mobile Phasen wurden Mischungen aus Wasser, Methanol (gradient grade, Merck), Tetramethylammoniumhydroxid (25 % in H₂O, Sigma-Aldrich), Tetraethylammoniumhydroxid (40 % in H₂O, Sigma-Aldrich), Natrium-1-Butansulfonat (\geq 99 %, Sigma-Aldrich), Malonsäure (Reagentplus, 99 %, Sigma-Aldrich), Zitronensäure (puriss. p. a., \geq 99,5 %, Sigma-Aldrich) und Salpetersäure (TraceSelect, 69 %, Sigma-Aldrich) eingesetzt.

In der folgenden Tabelle 3.4 sind die chromatografischen Bedingungen zusammengefasst, die sich nach der Methodenentwicklung (Abschnitt 4.1 und 4.2) ergeben haben. Alle weiteren Messungen bezüglich der Methodvalidierung und der Transportversuche wurden nach den in diesem Abschnitt und Abschnitt 3.4.1 (Tabelle 3.3) genannten optimierten Parametern durchgeführt.

Tabelle 3.4: Optimierte Messbedingungen der chromatografischen Trennung mit der HPLC-ICP-DRC-MS

HPLC	Series 200 HPLC System (Perkin Elmer)
Trennsäule	IonPac AS 7 (4 mm x 250 mm, 10 μ m, Dionex)
Vorsäule	IonPac AG 7 (4 mm x 50 mm, 10 μ m, Dionex)
Arbeitsweise	Isokratisch
Mobile Phase	50 mM HNO ₃ , 1 % (v/v) Methanol, pH = 1,2
Injektionsvolumen	20 und 50 μ L
Flussrate	1,3 mL min ⁻¹
Analysenzeit	7 min

Die Konzentrationen der Selenspezies-Stammlösungen (s. Abschnitt 3.2.3.3) wurden mit der ICP-DRC-MS überprüft. Für die Messungen wurden die vier Stammlösungen auf 100 μ g L⁻¹ verdünnt. Die erhaltenen Selenspezies-Konzentrationen sind in Tabelle 3.5 gezeigt.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Messungen zur Überprüfung der Selenspeziesstandards. Die vier Stammlösungen wurden auf $100 \mu\text{g L}^{-1}$ verdünnt ($MW \pm VB, \alpha = 0,01, n = 3$)

Selenspezies	^{80}Se -Konzentration in $\mu\text{g L}^{-1}$
Selenit	$99,5 \pm 2,2$
Selenat	$98,2 \pm 3,6$
SeMet	$97,8 \pm 3,9$
MeSEC	$97,8 \pm 3,3$

Da die Konzentrationen der vier Selenspezies-Stammlösungen abgesichert worden sind, konnten diese zur Herstellung der Kalibrationsstandards verwendet werden. Dazu wurde eine Ausgangslösung mit allen vier Selenspezies Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC erstellt und für die einzelnen Kalibrationsstandards entsprechend verdünnt. Die Kalibrationsbereiche wurden an die Konzentrationen der Proben der serosalen und der mukosalen Seiten aus den Transportversuchen angepasst. Die Analyse des zertifizierten Referenzmaterials SELM-1 erfolgte mit einer gesonderten Kalibration. Wie auch bei den ICP-DRC-MS-Messungen wurde eine Matrixanpassung (durch HBSS oder den Eluenten) der Kalibrationsproben gegenüber den Versuchsproben durchgeführt. Um Veränderungen der Spezies zu vermeiden, wurden die Kalibrationslösungen messtätlich aus den Selenspezies-Stammlösungen hergestellt.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der einfachen ANOVA [173] und Tukey's *Post-hoc*-Test [174] wurde die Software SPSS® (IBM®, SPSS® Statistics Version 20) verwendet. Die Berechnungen zur multiplen linearen Regression (MLR) und Partial-Least-Squares-Regression (PLS) erfolgten mit dem Computerprogramm UNSCRAMBLER (Version 10.2, CAMO Software AS). Für die Modellierung der künstlichen neuronalen Netze (ANN) wurde die Software STATISTICA (Version 6.1, StatSoft Inc.) genutzt.

4 Methodenentwicklung und Validierung der Selenspeziesanalytik

4.1 Kopplung von Umkehrphasen-Chromatografie mit ICP-DRC-MS

In der vorliegenden Arbeit sollten die vier Spezies Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC mittels HPLC-ICP-DRS-MS analysiert werden. Aus diesem Grund wurde eine LiChrosorb RP18 Säule verwendet. Bei der Wahl der Eluentzusammensetzung dienten die Arbeiten von ZHENG et al. als Orientierung [175]. Eine Besonderheit der mobilen Phase lag in der Verwendung von gemischten Ionenpaar-Reagenzien. Die mobile Phase hatte demnach folgende Zusammensetzung: 8 mM Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH), 2,5 mM Na-1-Butansulfonat und 4 mM Malonsäure bei einem pH-Wert von 5,3. Mit diesem Eluenten konnten aber die beiden anorganischen Spezies nicht getrennt werden (Abbildung 4.1).

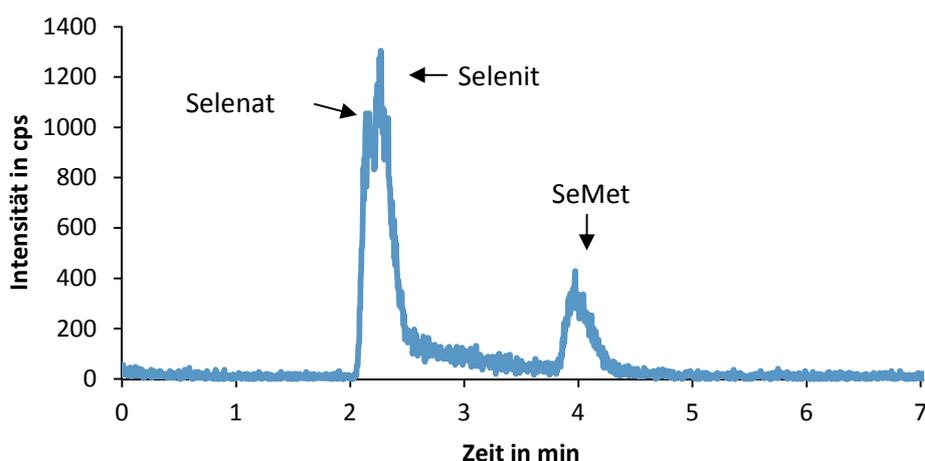


Abbildung 4.1: Chromatogramm eines Standards der Selenit, Selenat und SeMet zu je $100 \mu\text{g L}^{-1}$ enthält. Mobile Phase: 8 mM TMAH, 2,5 mM Na-1-Butansulfonat und 4 mM Malonsäure, pH = 5,3. Stationäre Phase: LiChrosorb RP18. Flussrate: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

Die erfolgreiche Trennung von Selenit und Selenat konnte durch den Austausch von TMAH durch Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH), d. h. durch eine längere Alkylkette des Ionenpaar-Reagenz erreicht werden. TEAH führte zudem zur Umkehr der Elutionsreihenfolge von Selenit und Selenat. Im weiteren Verlauf der Optimierung des Eluenten wurden verschiedene Konzentrationen an TEAH und Malonsäure sowie unterschiedliche pH-Werte getestet. Die beste Trennung konnte durch eine mobile Phase

mit 15 mM TEAH, 4,5 mM Malonsäure bei einem pH-Wert von 5,8 erzielt werden (Abbildung 4.2).

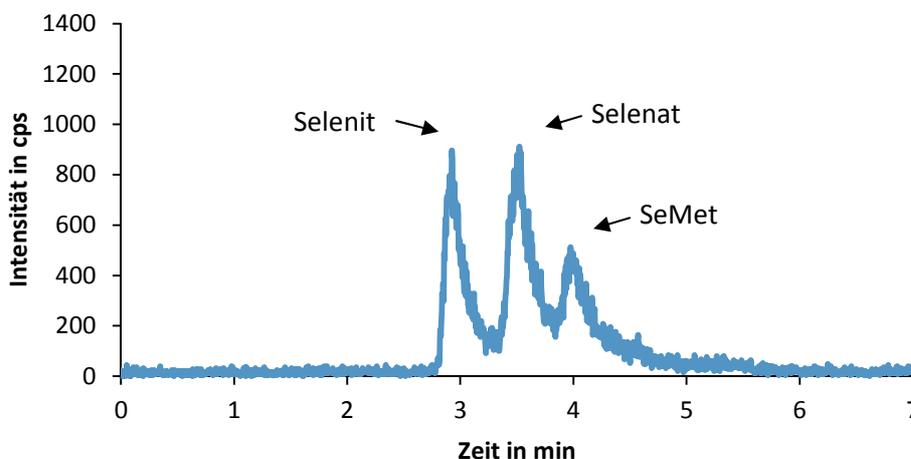


Abbildung 4.2: Chromatogramm eines Standards der Selenit, Selenat und SeMet zu je $100 \mu\text{g L}^{-1}$ enthält. Mobile Phase: 15 mM TEAH und 4,5 mM Malonsäure, pH = 5,8. Stationäre Phase: LiChrosorb RP18. Flussrate: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

Allerdings war mit der RPIPC eine Basislinientrennung der Peaks nicht möglich, die aber für eine quantitative Auswertung notwendig ist. Weiterhin erschienen die erreichten Intensitäten der Selenpeziespeaks bereits bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ zu gering. Da aber bei den Transportexperimenten von deutlich niedrigeren zu analysierenden Konzentrationen ausgegangen werden musste, ist die Empfindlichkeit der verwendeten Methode nicht ausreichend. Versuche mit Standardlösungen in verdünnter HBSS zeigten, dass die Trennung in der RPIPC stark von der Matrix beeinflusst wird und es zu Peakverzerrungen und Signalsuppressionen kommt. Aus diesen genannten Gründen wurde die RPIPC als ungeeignet erachtet und im weiteren Verlauf der Einsatz einer Anionenaustauschersäule untersucht.

4.2 Kopplung von Anionenaustausch-Chromatografie mit ICP-DRC-MS

Für die Ionenaustausch-Chromatografie wurde die Anionenaustauschersäule IonPac AS 7 ausgewählt. Um eine Verlängerung der Lebensdauer der analytischen Trennsäule zu gewährleisten, wurde zusätzlich eine Vorsäule IonPac AG 7 eingebaut. Die Säulenummantelung der IonPac AS 7 besteht aus PEEK. Dadurch können bei der Berührung der mobilen Phase mit der Ummantelung, Kontaminationen durch Metallionen

vermieden werden (LiChrosorb RP18 besteht aus einer metallischen Säulenummantelung). Ein weiterer Vorteil gegenüber der in Abschnitt 4.1 verwendeten RP18-Säule ist die höhere pH-Stabilität. Sie liegt im pH-Bereich von 0-14 im Vergleich zum pH-Bereich von 2-8. Somit können auch stark saure bzw. stark alkalische Eluenten für die chromatografische Trennung genutzt werden.

4.2.1 Untersuchungen zur Zusammensetzung der mobilen Phase

Die Zusammensetzung der mobilen Phase hat entscheidenden Einfluss auf die Trennung der Selenspezies und die Analysenzeit. Wie auch bei den Untersuchungen zur RPIPC diente anfänglich eine bereits in der Literatur beschriebene chromatografische Methode zur Orientierung. Die Trennung erfolgte mittels Gradientenelution und einer mobilen Phase aus 3 mM bzw. 10 mM Zitronensäure und 2 % (v/v) MeOH [176]. In Versuchen mit beiden Eluenten in isokratischer Arbeitsweise wurde gezeigt, dass Selenat auch nicht nach 60 min Analysenzeit detektiert werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür kann die in der vorliegenden Arbeit abweichend verwendete Anionenaustauschersäule sein.

Eine Basislinientrennung der vier Selenspezies wurde durch eine relativ einfach zusammengesetzte mobile Phase aus 50 mM HNO₃ (pH = 1,2) erzielt. Die Analysenzeit beträgt 7 min. Untersuchungen mit verschiedenen Gradienten (0,5 mM bzw. 50 mM HNO₃) führten zu keiner Verbesserung der chromatografischen Trennung. Der Zusatz verschiedener Volumina an MeOH zur mobilen Phase hatte Einfluss auf die Intensitäten der untersuchten Spezies. Mit 1 % (v/v) MeOH im Eluenten wurde im Vergleich zur methanolfreien mobilen Phase eine Intensitätssteigerung (bezogen auf die Peakhöhen) von 62 % für Selenit, 70 % für MeSEC, 63 % für Selenat und 78 % für SeMet erreicht (Abbildung 4.3). Eine Erhöhung von 1 % (v/v) auf 3 % (v/v) MeOH hatte keine weiteren Auswirkungen bezüglich einer Verbesserung der chromatografischen Methode. Für die Ermittlung der Validierungsparameter sowie für die Probenmessungen der *In-vitro*-Versuche wurde der optimierte Eluent (50 mM HNO₃, 1 % (v/v) MeOH, pH-Wert = 1,2) verwendet.

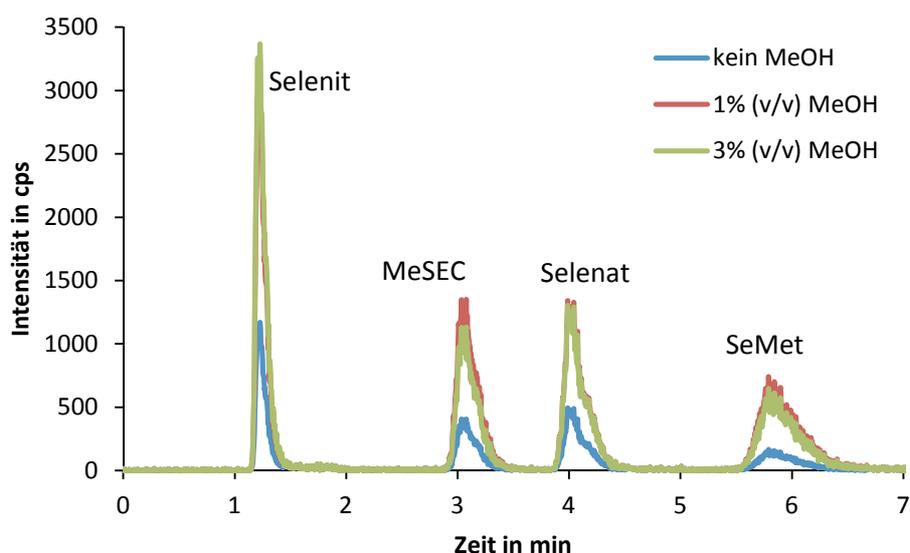


Abbildung 4.3: Einfluss verschiedener Methanolkonzentrationen auf das Messsignal ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ je Selenpezies). Mobile Phase: 50 mM HNO_3 , 1 (v/v) MeOH , $\text{pH} = 1,2$; isokratisch

4.2.2 Wahl eines geeigneten Messisotops

Für die Wahl eines geeigneten Messisotops wurde im Standard- sowie im DRC-Modus des ICP-MS gemessen, um den Einfluss der Molekülioneninterferenzen auf die Messung der unterschiedlichen Selenisotope (Tabelle 4.1) zu überprüfen. Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit dem HPLC-Gradientenprogramm, das auch bei den Optimierungsschritten in Abschnitt 4.2.3 verwendet wurde. Die eingesetzte Modelllösung bestand aus Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC (je $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in Reinstwasser). Im Standard-Modus wurden die Isotope ^{76}Se , ^{78}Se und ^{82}Se gemessen. Die Analyse im DRC-Modus umfasste die Bestimmung von ^{76}Se , ^{78}Se , ^{80}Se und ^{82}Se (Abbildung 4.4).

Tabelle 4.1: Zusammenstellung relevanter Selenisotope für ICP-MS-Messungen und mögliche Molekülionenstörungen

Isotop	Häufigkeit in %	Molekülioneninterferenz
^{76}Se	9,02	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$
^{78}Se	23,52	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$
^{80}Se	49,82	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
^{82}Se	9,19	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}^1\text{H}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$

Im Standard-Modus (Abbildung 4.4 A) ist ersichtlich, dass ^{76}Se und ^{78}Se einen stark erhöhten Untergrund (für ^{76}Se ca. 12.000 cps bzw. für ^{78}Se ca. 2.200 cps) aufweisen, was durch Molekülioneninterferenzen bedingt ist. Die Störungen sollten in Reinstwasser hauptsächlich durch Ar-Isotope verursacht werden. Das Grundrauschen der Basislinie liegt

für ^{76}Se bei etwa 1000 cps und für ^{78}Se bei etwa 500 cps. Für beide Messisotope stellt somit das hohe Grundrauschen den limitierenden Faktor für Messungen von niedrigen Konzentrationen dar. Aus diesem Grund sind diese beiden Selenisotope für die Analyse der zu untersuchenden Selenpezies in den zu erwartenden niedrigen Konzentrationen nicht geeignet. Das Isotop ^{82}Se wird kaum von Molekülen überlagert (vgl. Tabelle 4.1). Deswegen kann es für Messungen im Standard-Modus gewählt werden.

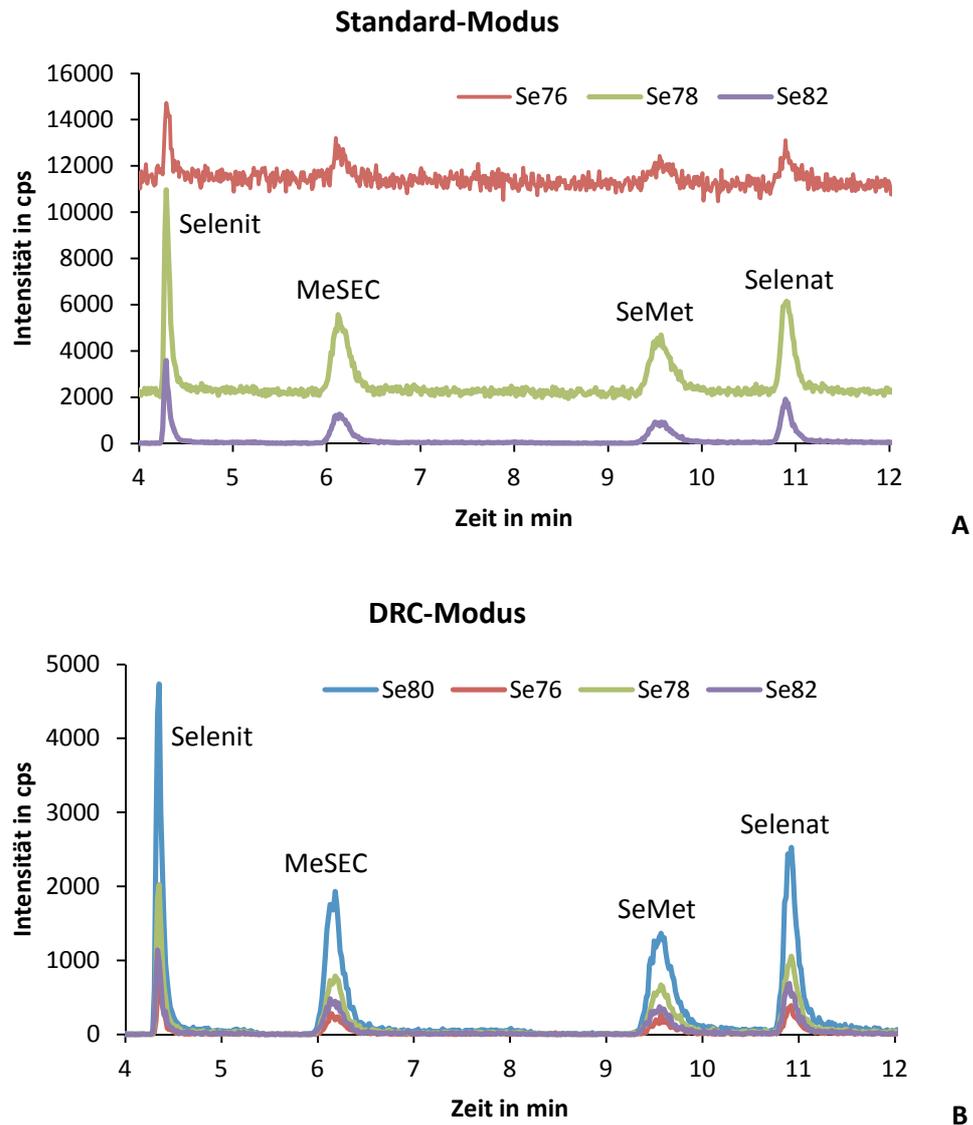


Abbildung 4.4: Chromatogramme für Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC. Die Messungen erfolgten für verschiedene Selenisotope (A) im Standard-Modus und (B) im DRC-Modus. Mobile Phase A: 0,5 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 3,2; Mobile Phase B: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2. Gradient: 0,5 min 100 % A, 7 min (linear) 100 % B, 2,5 min 100 % B, 1 min (linear) 100 % A, 4 min 100 % A.

Durch die Verwendung von Methan als Reaktionsgas im DRC-Modus resultiert für die Isotope ^{76}Se und ^{78}Se eine enorme Reduzierung des Untergrundsignals (Abbildung 4.4 B). Die Messung des Hauptisotops ^{80}Se wird durch die Verwendung der DRC überhaupt erst möglich. Das Grundrauschen der Basislinie im DRC-Modus liegt bei nur ca. 10 cps. Entsprechend der natürlichen Häufigkeit der Selenisotope sind die Intensitäten unterschiedlich stark ausgeprägt.

Aufgrund der größten natürlichen Häufigkeit und den daraus resultierenden höchsten Intensitäten sowie dem niedrigen Grundrauschen ist das Isotop ^{80}Se für die Selenspeziesanalytik besonders geeignet. So zeigt ^{80}Se im DRC-Modus im Vergleich zu ^{82}Se im Standard-Modus höhere Intensitäten für Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC.

4.2.3 Optimierung der Messbedingungen

Da der Volumenstrom bzw. die Fließgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Trennung der einzelnen Spezies hat, wurden verschiedene Pumpgeschwindigkeiten (0,8 bis $1,4 \text{ mL min}^{-1}$) ausprobiert. Mit einem Fluss von $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ (Säulendruck von 147 bar) ergaben sich die schmalsten chromatografischen Signale und größten Peakhöhen. Zudem gelang damit eine zusätzliche Verringerung der Analysenzeit.

Hinsichtlich des Einflusses der Temperatur auf die chromatografische Trennung wurden keine Optimierungsexperimente durchgeführt. Der Säulenofen wurde für alle Analysen auf eine Temperatur von 25°C eingestellt.

Einen wichtigen Aspekt für die Messungen mit der HPLC-ICP-DRC-MS stellt die Zusammensetzung der zu untersuchenden Proben dar. Da alle *In-vitro*-Versuche mit HBSS als Transportpuffer durchgeführt wurden, musste der Einfluss dieser Elektrolytlösung auf die chromatografische Trennung untersucht werden. Hauptaugenmerk lag hierbei vor allem auf der Konzentration von NaCl, die in der HBSS 8 g L^{-1} beträgt (Zusammensetzung der HBSS s. Tabelle 3.2). Das Chromatogramm der unverdünnten HBSS zeigt eine Verzerrung der Selenspezies-Peaks mit Fronting oder Tailing. Daraus folgt, dass eine Verdünnung der Proben unerlässlich ist. Zu diesem Zweck ist eine HBSS-Lösung mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ je Selenspezies in unterschiedlichen Verdünnungen (v/v) mit Reinstwasser (1:2, 1:4, 1:5 und 1:10) in das HPLC-System injiziert worden. Die Messungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen, wie bei der Bestimmung des geeigneten Messisotops (Abschnitt 4.2.2). Die Chromatogramme sind in der Abbildung 4.5 dargestellt.

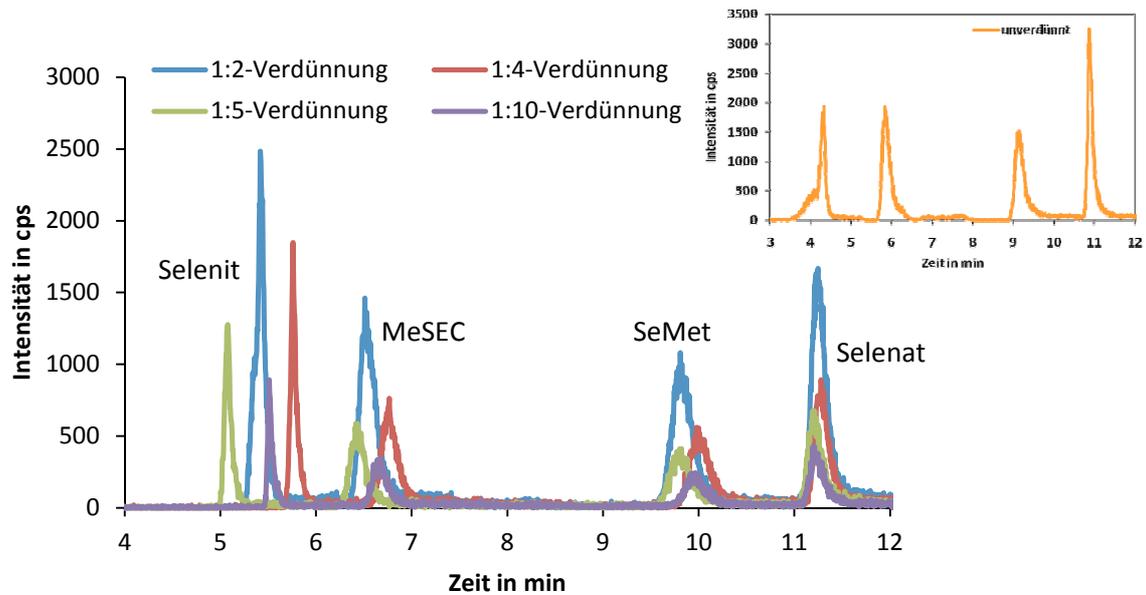


Abbildung 4.5: Einfluss verschiedener HBSS-Verdünnungen und der unverdünnten HBSS auf das Messsignal. Mobile Phase A: 0,5 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 3,2; Mobile Phase B: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2. Gradient: 0,5 min 100 % A, 7 min (linear) 100 % B, 2,5 min 100 % B, 1 min (linear) 100 % A, 4 min 100 % A.

Die durch die HBSS veränderte Probenmatrix hat Einfluss auf das Retentionsverhalten der Selenspezies und verschiebt diese zu höheren Retentionszeiten (vgl. Retentionszeiten aus Abbildung 4.4). Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen führen vor allem bei den früh eluierenden Spezies Selenit und MeSEC zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Eine Korrelation der HBSS-Konzentration mit der Retentionszeitverschiebung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Bereits durch die 1:2-Verdünnung wird die Peakform nicht mehr verändert (kein Tailing oder Fronting). Um die chromatografische Säule und auch den Detektor der ICP-DRC-MS zu schonen, wurde eine 1:4-Verdünnung gewählt.

4.3 Validierung

Die Validierung ist in der instrumentellen Analytik eine sehr wichtige Maßnahme der Qualitätssicherung. Die (Methoden-)Validierung umfasst die Prüfung und Bestätigung, ob ein Analyseverfahren für eine vorgegebene Aufgabenstellung geeignet ist und die gestellten Forderungen erfüllt [177]. Zu den wesentlichen Validierungsparametern gehören: Präzision, Richtigkeit, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Robustheit und Empfindlichkeit [178, 179]. Diese Kenndaten

bilden die Grundlage, um das Verfahren zu charakterisieren und hinsichtlich festgelegter Forderungen zu überprüfen.

4.3.1 Linearität

Bei der verwendeten Analysenmethode handelt es sich um ein relatives Verfahren, weshalb im Vorfeld eine Kalibration durchgeführt werden muss. Aus praktischen Gründen wurden Kalibrationslösungen hergestellt, die alle vier Selenspezies enthielten. Für die Auswertung der Zellversuchsproben wurde je eine Kalibration für die mukosalen und die serosalen Proben erstellt. Demnach umfasste der Arbeitsbereich der Kalibrierung für den Linearitätstest die Konzentrationen von 5 bis 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ mit elf Kalibrationsstandards. Mit dem Anpassungstest nach Mandel und in Verbindung mit der DIN 38402 Teil 51 erfolgte die rechnerische Überprüfung auf Linearität der Kalibriergeraden [180]. Vor dem Mandel-Test müssen die Werte auf Normalverteilung (nach David) getestet und die Varianzhomogenität des niedrigsten und höchsten Standards überprüft werden. Dazu wurden der 5- $\mu\text{g-L}^{-1}$ -Standard und der 100- $\mu\text{g-L}^{-1}$ -Standard sechsmal gemessen. Nach Berechnung der Varianzen s_1^2 und s_2^2 für den unteren und oberen Arbeitsbereich erfolgte die Homogenitätsprüfung mittels F-Test (Gleichung 23).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ mit } s_1^2 > s_2^2 \quad (18)$$

Ist $F >$ Tabellenwert TW ($f_1 = n_1 - 1$; $f_2 = n_2 - 1$, α) liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen vor. Tritt dieser Fall ein, muss der Arbeitsbereich der Kalibration verkleinert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für den niedrigsten und höchsten Kalibrierstandard für Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet Varianzhomogenität ($\alpha = 0,01$) nachgewiesen.

Der Mandel-Test beinhaltet die Berechnung der linearen Kalibrierfunktion und der quadratischen Kalibrierfunktion. Aus den Modellen ergeben sich die Reststandardabweichungen s_{y1} (lineare Regression) und s_{y2} (quadratische Regression), die für die Bestimmung der Differenz der Abweichungsquadrate DS^2 verwendet werden (Gleichung 24).

$$DS^2 = (n - 2) \cdot s_{y1}^2 - (n - 3) \cdot s_{y2}^2 \quad (19)$$

Aus DS^2 und s_{y2}^2 wird der Prüfwert PW nach Gleichung 25 berechnet. Dieser wird dann mit dem TW aus der F-Tabelle ($f_1 = 1, f_2 = n - 3, \alpha = 0,01$) verglichen. Wird $PW < TW$ erhalten, kann das lineare Kalibriermodell angewendet werden.

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (20)$$

Der Mandel-Test zeigte für die Spezies Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet keinen signifikanten Unterschied zwischen PW und TW , weshalb das lineare Modell angewendet werden darf. In Abbildung 4.6 sind die Kalibrationsgeraden der vier Selenspezies und in Abbildung 4.7 ein exemplarisches Chromatogramm mit dem niedrigsten und höchsten Kalibrierstandard zu finden. Die Messungen erfolgten mit der optimierten HPLC-ICP-DRC-MS-Methode (s. Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4).

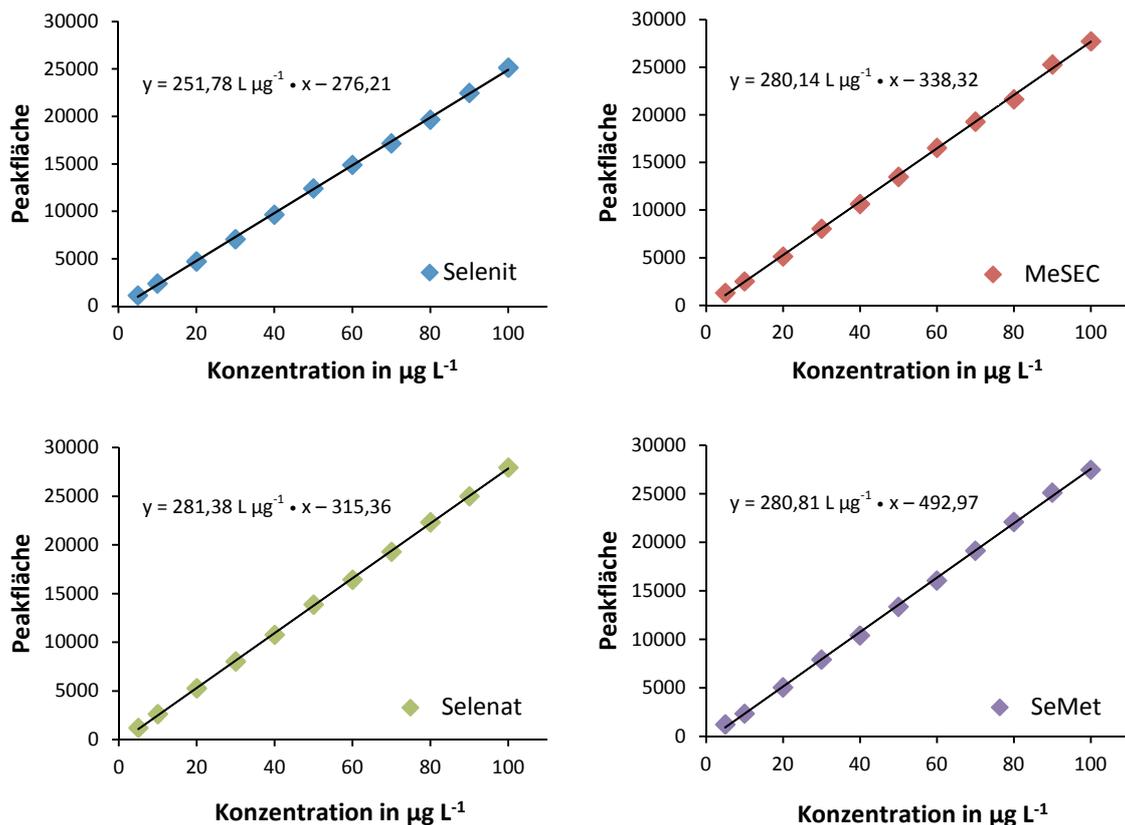


Abbildung 4.6: Kalibriergeraden von Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet mittels HPLC-ICP-DRC-MS. Mobile Phase: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2; isokratisch

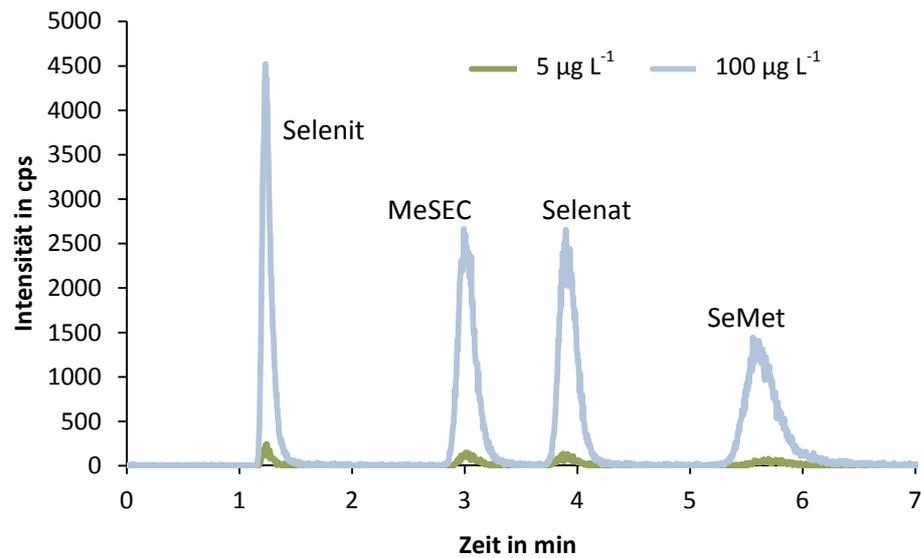


Abbildung 4.7: Chromatogramm des niedrigsten ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) und höchsten ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) Kalibrierstandards. Mobile Phase: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2; isokratisch

Die sich aus der linearen Regression ergebenden Kalibrierkenndaten Steigung b , Achsenabschnitt a , Reststandardabweichung s_{yx} , Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und der Verfahrensvariationskoeffizient V_{x0} sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Kenndaten der Kalibrierung von Selenit, MeSEC, Selenat und SeMet mittels HPLC-ICP-DRS-MS

Kenngröße	Selenit	MeSEC	Selenat	SeMet
Steigung in $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$	251,78	280,14	281,38	280,81
Achsenabschnitt	-276,21	-338,32	-315,36	-492,97
Reststandardabweichung	172,43	240,71	127,18	232,07
Verfahrensstandardabweichung in $\mu\text{g L}^{-1}$	0,685	0,859	0,452	0,826
Verfahrensvariationskoeffizient in %	1,4	1,7	0,9	1,6

Die Empfindlichkeit der Kalibriergeraden (Anstieg) für die vier Selenspezies ist fast identisch. Lediglich die Steigung von Selenit weicht um ca. 10 % gegenüber den anderen drei Spezies ab. Die Reststandardabweichungen der beiden anorganischen Spezies zeigen geringere Werte gegenüber denen der organischen Formen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Messwerte von Selenit und Selenat um die Regressionsgerade weniger streuen. Der Verfahrensvariationskoeffizient kann für den Vergleich verschiedener Analyseverfahren (im gleichen Konzentrationsbereich) eingesetzt werden. Er liegt für die untersuchten Selenspezies zwischen 0,9 und 1,7 %.

4.3.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Zur Beurteilung von Messwerten mit sehr geringen Konzentrationen werden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze als Verfahrenkenndaten herangezogen.

Die Nachweisgrenze (NG) ist eine qualitative Größe und stellt den kleinsten Messwert dar, der mit einer festgelegten statistischen Sicherheit vom Signal eines Blindwertes unterschieden werden kann. Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei Gehalten an der Nachweisgrenze liegt bei 50 %. Der Mindestgehalt, der mit hoher vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann, wird als Erfassungsgrenze (EG) bezeichnet [181]. Im Gegensatz zur NG und EG ist die Bestimmungsgrenze (BG) eine quantitative Größe. Sie ist der kleinste mit einer vorgegebenen relativen Messunsicherheit bestimmbare Gehalt eines Analyten.

Die Ermittlung der NG, EG und BG erfolgte nach DIN 32645 mittels der Kalibriergeradenmethode (indirekte Methode). Hier wird über eine Extrapolation von Regressionsdaten einer Kalibriergerade die Unsicherheit des Leerwertes bestimmt. Grundvoraussetzungen sind, dass die Kalibrierproben voneinander unabhängig und normal verteilt sind. Weiterhin muss die Kalibrierfunktion linear sein. Als Grundlage für die Berechnung der NG dient Gleichung 18:

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad f = n - 2 \quad (21)$$

Wenn gilt α (Fehler 1. Art) = β (Fehler 2. Art), vereinfacht sich die Formel zur Berechnung der EG zu Gleichung 19 [181].

$$x_{EG} = 2 \cdot x_{NG}, \text{ wenn } \alpha = \beta \quad (22)$$

Die BG wird nach der Gleichung 20 ermittelt:

$$x_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f,\frac{\alpha}{2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{((k \cdot x_{NG}) - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (23)$$

In der DIN 32645 wird auch ein Verfahren zur Schnellschätzung der BG angegeben (Voraussetzung $m = 1$):

$$x_{BG} \approx 1,2 \cdot k \cdot \Phi_{n, \frac{\alpha}{2}} \cdot s_{x0} \quad (24)$$

mit dem Faktor $\Phi_{n, \frac{\alpha}{2}}$ zur Schnellschätzung:

$$\Phi_{n, \frac{\alpha}{2}} = t_{f, \frac{\alpha}{2}} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad (25)$$

Die Verwendung der indirekten Methode ist an zwei Bedingungen geknüpft. Zum einen darf der höchste Kalibrierstandard nicht mehr als das 15-fache der ermittelten NG betragen. Ist das erfüllt, kann von Varianzenhomogenität in dem gewählten Kalibrationsbereich ausgegangen werden. Zum anderen muss auch die BG im gewählten Kalibrationsbereich liegen. Werden die beiden Bedingungen nicht erfüllt, muss der Arbeitsbereich verkleinert werden.

Für die Berechnung der NG, EG und BG wurde eine 10-Punkt-Kalibration mit äquidistanten Abständen in der Nähe der Bestimmungsgrenze für jede der vier Selenspezies gewählt. Da alle Proben der Zellversuche HBSS als Matrix aufweisen, wurden die Kalibrationsstandards in 1:4 (v/v) verdünnter HBSS erstellt. Der gewählte Konzentrationsbereich umfasste die Konzentrationen von 0,3 bis 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. In Tabelle 4.3 sind die berechneten NG, EG und BG für Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der Spezies Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet nach der Kalibriergeradenmethode ($\alpha = 0,01$; $k = 3$)

Parameter in $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenit	MeSEC	Selenat	SeMet
NG	0,16	0,16	0,15	0,15
EG	0,32	0,31	0,31	0,30
BG	0,47	0,47	0,47	0,46

Die experimentell ermittelten Werte sind für alle vier Selenspezies sehr ähnlich. Durch Multiplikation der NG bzw. BG mit dem Injektionsvolumen von 50 μL werden die absoluten NG bzw. BG von 8 pg bzw. 24 pg je Spezies erhalten. Im Vergleich mit

Angaben aus der Literatur liegen diese experimentell ermittelten Nachweisgrenzen im unteren Konzentrationsbereich. CUDERMAN et al. geben für die Anionenaustausch-Chromatografie gekoppelt mit ICP-MS, unter Verwendung eines Zitronensäure-Gradienten, Nachweisgrenzen für Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC im Bereich von 1 bis $15 \mu\text{g L}^{-1}$ an [176]. Mit der gleichen Säule erhielten KUO et al. unter Verwendung eines Ammoniumcitrat-Gradienten und mit der ICP-DRC-MS für o. g. Selenspezies Nachweisgrenzen von 0,01 bis $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ [140]. Daraus wird ersichtlich, dass die Anwendung der DRC zur Steigerung der Leistungsfähigkeit der verwendeten Analysenmethode beiträgt. Weil bei den Messungen der Proben aus den *In-vitro*-Experimenten von geringen Selenspezies-Konzentrationen in den serosalen Kompartimenten ausgegangen werden muss, sind die erzielten niedrigen Bestimmungsgrenzen eine Grundvoraussetzung für die durchzuführenden Experimente.

4.3.3 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenergebnisse. Als Streuungsmaß dient die Standardabweichung s . Eine weitere wichtige und aussagekräftige Größe in der Analytik ist die relative Standardabweichung RSD , die als Vergleichsmaß dient [182].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (26)$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (27)$$

Für das entwickelte und optimierte HPLC-ICP-DRC-MS-Verfahren wurde die Messpräzision unter Wiederholbedingungen ermittelt. Die Bestimmung erfolgte durch zehnmahlige Messung einer Probe mit der Konzentration von $50 \mu\text{g L}^{-1}$ je Selenspezies in 1:4 (v/v) verdünnter HBSS. Es wurden die RSD -Werte für die Auswertung nach Peakhöhen und nach Peakflächen, mit vorheriger Prüfung der Messwerte auf Normalverteilung und Ausreißer, berechnet (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: *RSD*-Werte der Peakhöhen und Peakflächen ($n = 10$)

	<i>RSD</i> in %			
	Selenit	MeSEC	Selenat	SeMet
Peakhöhe	2,9	3,8	2,8	3,0
Peakfläche	2,7	2,3	2,6	2,7

Die Messpräzision der Peakhöhen liegt zwischen 2,8 und 3,8 %. Im Gegensatz dazu werden für die Peakflächen etwas kleinere *RSD*-Werte im Bereich von 2,3 bis 2,7 % erhalten. Daher wird die quantitative Auswertung der Spezieskonzentration über die Peakflächen erfolgen, weil somit geringere Schwankungen der Messwerte zu erwarten sind. Aufgrund der niedrigen *RSD*-Werte ist zu vermuten, dass der Anteil der Messungen am Gesamtfehler relativ gering ist. Weiterhin wurden die zehn aufeinander folgenden Messwerte dem Trendtest nach Neumann unterzogen, um zeitliche Veränderungen der Messbedingungen festzustellen. Dabei wird ein statistisch gesicherter Trend für Selenat bei der Auswertung über die Peakhöhen erhalten. Für die anderen Spezies konnte kein Trend nachgewiesen werden. Ein Vergleich der *RSD*-Werte der Peakflächen und der Peakhöhen von Selenit, Selenat und SeMet mit einer anderen Arbeit, in der ebenfalls eine HPLC-ICP-MS-Methode entwickelt wurde [183], zeigt eine Verbesserung der Wiederholpräzision um 60 bis 70 %.

Neben den Berechnungen zur Präzision der Peakhöhe bzw. -fläche wurde auch die Streuung der Retentionszeiten untersucht. Die Messung von sechs Proben mit einer Konzentration von $5 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies nacheinander stellt einen Parameter für die Kurzzeitstabilität dar (Tabelle 4.5). Aussagen zur Langzeitstabilität wurden durch den Vergleich der Retentionszeiten von vier $5\text{-}\mu\text{g-L}^{-1}$ -Kalibrierstandards (Messungen im Abstand von jeweils sieben Tagen) getroffen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: *RSD*-Werte der Retentionszeiten für die Untersuchungen zur Kurzzeit- (RT_{kurz}) und Langzeitstabilität (RT_{lang})

	<i>RSD</i> in %			
	Selenit	MeSEC	Selenat	SeMet
RT_{kurz}^+	0,99	0,66	0,38	0,76
RT_{lang}^*	1,17	2,02	0,94	2,52

⁺ $n = 6$ ^{*} $n = 4$

Durch die sehr geringen *RSD*-Werte ($RT_{\text{kurz}} < 1 \%$, $RT_{\text{lang}} \leq 2,5 \%$) kann von stabilen Retentionszeiten der Selenspezies ausgegangen werden. Die Untersuchungen zur

Kurzzeitstabilität umfassten dabei einen Zeitraum von etwa 70 min, die Messungen der Langzeitstabilität einen Zeitraum von vier Wochen.

4.3.4 Richtigkeit

4.3.4.1 Analyse des zertifizierten Referenzmaterials

Die Prüfung auf Richtigkeit des entwickelten HPLC-ICP-DRC-MS-Verfahrens kann durch den Vergleich mit einem zertifizierten Referenzmaterial erfolgen. Bei dem zertifizierten Referenzmaterial für die Selenspeziesanalytik handelt es sich um eine mit Selen angereicherte Hefe (SELM-1). In einem Ringversuch, der vom Institute for National Measurement Standards (INMS) of the National Research Council of Canada (NRC) im Jahr 2004 initiiert wurde, sind die Gehalte an Methionin und SeMet sowie der Gesamtgehalt an Selen in der Hefe bestimmt worden. Die Durchführung der Analysen in den teilnehmenden Laboratorien geschah mit verschiedenen Extraktions- und Analyseverfahren [184]. In der Entwicklung weiterer Referenzmaterialien besteht noch enormer Forschungsbedarf, da selbst in SELM-1 nur eine Selenspezies (SeMet) zertifiziert ist.

Als Extraktionsmethode wurde die enzymatische Hydrolyse mit Protease XIV gewählt. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei den enzymatischen Extraktionsverfahren zu Blindwertproblemen hinsichtlich Selen oder verschiedener Selenspezies kommen kann. Je nach dem welches Enzym (Protease, Lipase, Cellulase, β -Amylase oder α -Amylase) verwendet wird, können die Selengehalte zwischen $< 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NG) und etwa $3000 \mu\text{g kg}^{-1}$ schwanken [172].

Aus diesem Grund wurde vorab die in der vorliegenden Arbeit verwendete Protease XIV ohne Probenmaterial dem Extraktionsprozess unterzogen (s. Abschnitt 3.3). Weder mit der HPLC-ICP-DRC-MS noch mit der ICP-DRC-MS wurden Selenspezies bzw. Selen detektiert. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch das verwendete Enzym Protease XIV bei der Analyse von SELM-1 ist somit ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse des zertifizierten Referenzmaterials sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Bei der Analyse von SELM-1 wurde neben SeMet keine weitere Spezies mit der HPLC-ICP-DRC-MS detektiert (Abbildung 4.8). Trotzdem werden mit der chromatografischen Methode nur $(69 \pm 1) \%$ des zertifizierten Gehaltes in den Extrakten gefunden. Zur Überprüfung ist der Selengesamtgehalt in den Extrakten mit der ICP-DRC-MS bestimmt worden. Dabei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung von $(98 \pm 3) \%$ mit dem angegebenen Gehalt des Referenzmaterials. Ein Matrixeinfluss kann

die Ursache für die niedrige Wiederfindungsrate von ca. 70 % bei der chromatografischen Messung sein. Um das Auftreten der Minderbefunde bei der HPLC-ICP-DRC-MS-Analyse weiter zu untersuchen, wurden Wiederfindungsexperimente durchgeführt (s. Abschnitt 4.3.4.2).

Tabelle 4.6: Gehalt von SeMet in den Extrakten von SELM-1 nach der enzymatischen Hydrolyse und Messung mit der HPLC-ICP-DRC-MS und ICP-DRC-MS (MW \pm VB, $\alpha = 0,05$)

	SeMet als Se in mg kg ⁻¹	Wiederfindung in %
HPLC-ICP-DRC-MS	962 \pm 17 ^a	69 \pm 1
ICP-MS	1364 \pm 46 ^b	98 \pm 3
Zertifizierter Wert [169]	1388 \pm 59	

^an = 5 ^bn = 6

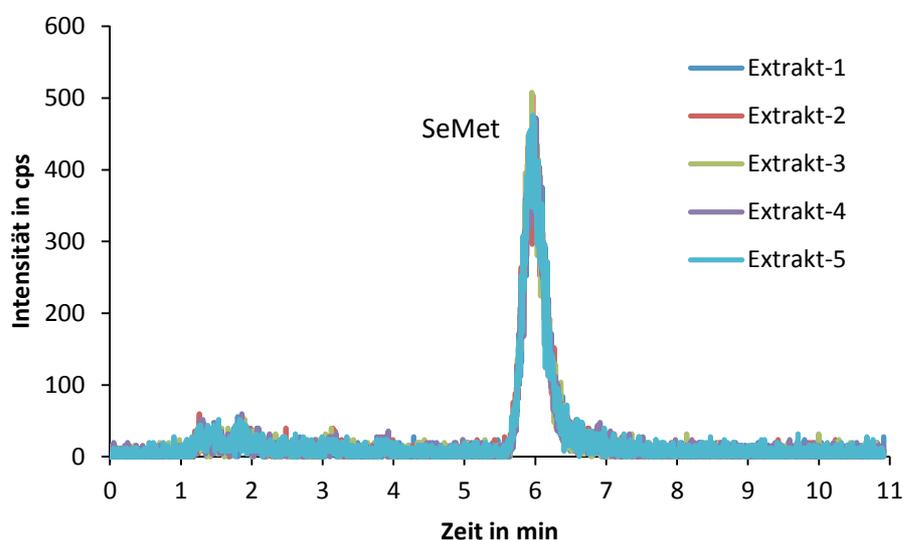


Abbildung 4.8: Chromatogramm der fünf gemessenen SELM-1-Extrakte mittels HPLC-ICP-DRC-MS. Mobile Phase: 50 mM HNO₃, 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2; isokratisch

Die Überprüfung der Richtigkeit bei den Messungen des Selengesamtgehaltes mit der ICP-DRC-MS erfolgte zusätzlich mit Hilfe des Referenzmaterials 1643e (Spurenelemente in Wasser, LGC Standards, Wesel, Deutschland). Die gemessene Selenkonzentration beträgt (12,0 \pm 0,6) $\mu\text{g L}^{-1}$ und ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem zertifizierten Wert von (11,97 \pm 0,14) $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.4.2 Wiederfindungsexperimente

Die Richtigkeit der Messmethode kann auch durch die Bestimmung der Wiederfindungsrate aus Zudosierungs- bzw. Aufstockungsexperimenten überprüft werden.

Hierfür wurde das Selenhefe-Referenzmaterial mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an SeMet aufgestockt. Die Messungen erfolgten in einer 1:5000 (v/v) verdünnten Extraktlösung von SELM-1. Bei den Aufstockungen diente die zu erwartende SeMet-Konzentration im undotierten Extrakt als Orientierung. Für die erste Aufstockung wurden $15 \mu\text{g L}^{-1}$ und für die zweite Aufstockung $30 \mu\text{g L}^{-1}$ an SeMet-Standardlösung gewählt. Die Wiederfindungsrate WFR wird schließlich nach Gleichung 28 berechnet.

$$\text{WFR} = \frac{c_{\text{gemessen}}(\text{Probe}_{\text{dotiert}}) - c_{\text{gemessen}}(\text{Probe}_{\text{undotiert}})}{c_{\text{zugesezt}}} \cdot 100 \% \quad (28)$$

Die Ergebnisse der Aufstockungsexperimente sind in Tabelle 4.7 gezeigt. In der Abbildung 4.9 sind die Chromatogramme des undotierten Extraktes und der beiden Aufstockungen dargestellt. Die WFR für die erste Aufstockung beträgt $(97,0 \pm 6,2) \%$ und für die zweite Aufstockung $(97,5 \pm 3,2) \%$. Da durch die berechneten Vertrauensbereiche die WFR von 100 % eingeschlossen wird, kann eine Beeinflussung der Messung durch Matrixeffekte ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.7: Konzentration von SeMet in $\mu\text{g L}^{-1}$ und Wiederfindungsraten in % nach den Aufstockungsexperimenten der SELM-1-Extrakte (MW \pm VB, $\alpha = 0,05$, $n = 3$)

	SeMet in $\mu\text{g L}^{-1}$	Wiederfindungsrate in %
Probe _{undotiert}	$15,6 \pm 1,1$	
Aufstockung 1	$30,1 \pm 0,9$	$97,0 \pm 6,2$
Aufstockung 2	$44,8 \pm 1,0$	$97,5 \pm 3,2$

Aufgrund der erhaltenen Resultate können andere Selenspezies, die allerdings nicht mit der in dieser Arbeit entwickelten Kopplungsmethode (Wahl der Trennsäule und des Eluenten) detektiert werden können, für die niedrigen SeMet-Messwerte in SELM-1 (s. Tabelle 4.6) verantwortlich sein. Beispielsweise ist eine Veränderung der Selenspezies während der Durchführung der enzymatischen Extraktion nicht ausgeschlossen. Da bei der Bestimmung des Selengesamtgehalts mit der ICP-DRC-MS nicht zwischen den einzelnen Spezies unterschieden werden kann, führten diese Messungen zu richtigen Ergebnissen.

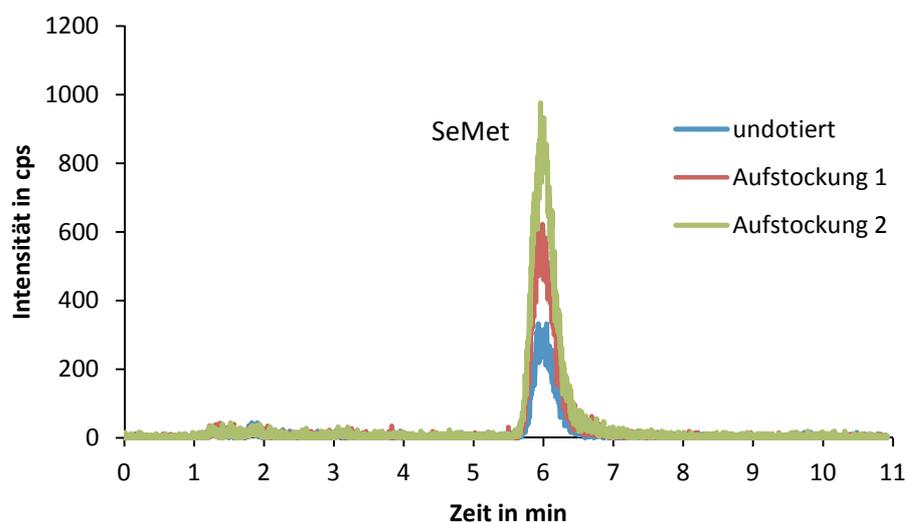


Abbildung 4.9: Chromatogramme des undotierten Probenextraktes (SELM-1) und der beiden gewählten Aufstockungen (15 bzw. 30 $\mu\text{g L}^{-1}$). Mobile Phase: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2; isokratisch

Ein weiteres Aufstockungsexperiment wurde durchgeführt, um die Wiederfindungsraten der Spezies Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet in HBSS zu bestimmen und somit die Richtigkeit der Messungen für alle vier untersuchten Spezies abzusichern. Dazu wurde eine Standardlösung, die 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies enthielt mit 15 und 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies aufgestockt. Die berechneten WFR für die Aufstockung 1 und 2 sind in der Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.8: Wiederfindungsraten in % von Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC in HBSS nach der Aufstockung mit 15 und 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies einer 15- $\mu\text{g L}^{-1}$ -Standardlösung (MW \pm VB, $\alpha = 0,05$, $n = 2$)

	Selenit	Selenat	SeMet	MeSEC
Aufstockung 1	97,6 \pm 7,9	96,8 \pm 6,1	92,3 \pm 11,4	97,5 \pm 4,8
Aufstockung 2	95,9 \pm 4,4	96,8 \pm 3,4	94,1 \pm 6,3	97,7 \pm 2,7

Wie auch bei den Aufstockungsversuchen mit dem zertifizierten Referenzmaterial schließen die Vertrauensbereiche der WFR 100 % ein. Somit ist die Richtigkeit bei den Messungen der Proben aus den *In-vitro*-Versuchen in HBSS bewiesen. Da die Konzentrationen der Selenspeziesstandards zuvor mit der ICP-DRC-MS unter Verwendung eines unabhängigen Selenstandards bestimmt wurden, ist die Durchführung der Wiederfindungsexperimente in HBSS zulässig.

4.3.5 Selektivität und Robustheit

Mit Selektivität wird die Fähigkeit eines analytischen Verfahrens beschrieben, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störung zu identifizieren. Auf die Überprüfung der Selektivität kann aber verzichtet werden, wenn vorweg die Richtigkeit (keine systematischen Fehler) bereits bewiesen wurde [178].

Ein weiterer Validierungsparameter ist die Robustheit. Sie beschreibt die Unanfälligkeit des Verfahrens gegenüber Veränderungen relevanter Einflussgrößen. Bei der HPLC-ICP-MS-Kopplung müssen das chromatografische System, wie auch der elementselektive Detektor bei den Betrachtungen zur Robustheit berücksichtigt werden. So muss bei der HPLC exakt auf die Zusammensetzung der mobilen Phase geachtet werden, da z. B. bereits geringe Unterschiede im pH-Wert zu Veränderungen der Trennleistung bzw. zur Verschiebung der Retentionszeiten führen können. Weiterhin hat mitunter die Temperatur eine große Auswirkung auf die Trennung der Analyten, weshalb konstante Temperaturbedingungen erforderlich sind. Aus diesem Grund wurde die verwendete Trennsäule im Säulenofen auf 25°C temperiert.

Für das ICP-DRC-MS-Gerät sind vom Hersteller Spezifikationen vorgegeben, die eingehalten werden müssen, um eine optimale Leistung zu erzielen [185]. Die Raumtemperatur darf zwischen 15 und 30°C betragen, wobei Temperaturschwankungen 2,8°C pro Stunde nicht überschreiten sollten. Das Labor, in dem sich das HPLC-ICP-DRC-MS-Gerät befand, war klimatisiert und auf 23°C temperiert. Weiterhin muss darauf geachtet werden, dass das Gerät vor direkter Sonneneinstrahlung und starken Vibrationen geschützt ist.

Die Überprüfung der Robustheit beinhaltet auch Untersuchungen zur Stabilität der Selenspezies. Da sich die Selenspezies im Laufe der Zeit durch Reaktion mit Luftsauerstoff verändern können, wurden Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt. Ein Standard (10 µg L⁻¹ je Spezies), der den Umgebungsbedingungen ausgesetzt war, wurde in unregelmäßigen Zeitabständen gemessen. Es zeigte sich, dass nach etwa 70 min keine Veränderungen der Selenspeziespeaks festzustellen waren. Nach 4,5 h wurde aber eine deutliche Abnahme des MeSEC-Peaks beobachtet, bei gleichzeitiger Vergrößerung der Selenit- und Selenat-Peaks (Abbildung 4.10). Ein unbekannter Peak wurde bei einer Retentionszeit von ca. 7,2 min erhalten. Nach 24 Stunden war MeSEC nicht mehr detektierbar. Bei der unbekanntem Spezies handelt es sich wahrscheinlich um Selenomethioninoxid (SeMetO), welches durch die Reaktion mit Luftsauerstoff gebildet

wird. Deshalb wurden die Proben zeitnah gemessen und sollten sicherheitshalber bis kurz vor der Messung in abgeschlossenen Probengefäßen im Kühlschrank verbleiben.

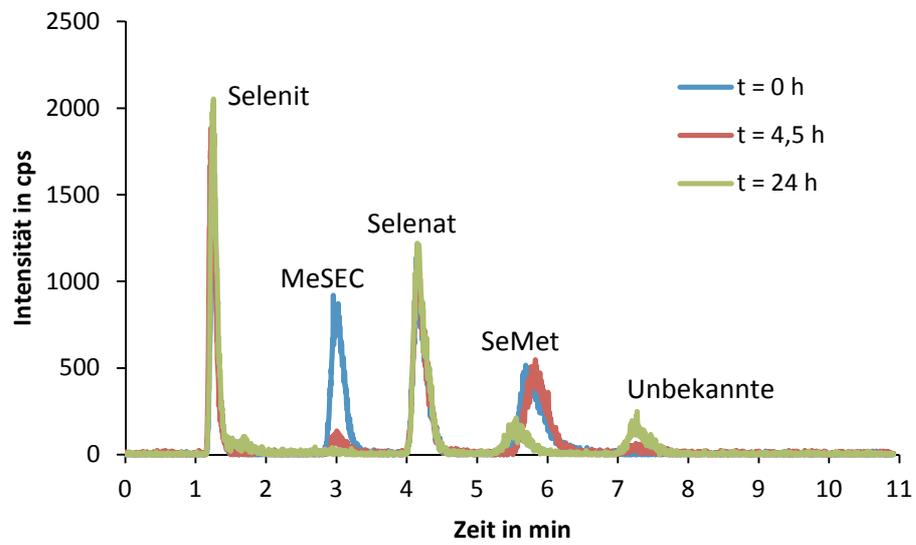


Abbildung 4.10: Chromatogramme der Messung eines Standards ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies) nach 0, 4,5 und 24 h Verbleib im Autosampler. Mobile Phase: 50 mM HNO_3 , 1 % (v/v) MeOH, pH = 1,2; isokratisch

5 Transportverhalten der Selenspezies *in vitro*

5.1 Voruntersuchungen zu den Ussing-Kammer-Experimenten

5.1.1 Einfluss des Membranmaterials der Snapwell®-Einsätze

Für die Kultivierung von Zellen auf Snapwell®-Einsätzen stehen verschiedene kommerziell verfügbare Membranmaterialien zur Auswahl. Das sind PC-Membranen, PET-Membranen und PTFE-Membranen, die zusätzlich mit Collagen beschichtet sind. Die Voruntersuchungen beschränkten sich auf die beiden am häufigsten eingesetzten Membranmaterialien für *In-vitro*-Transportversuche mit Zellmonolayern: Polycarbonat und Polyethylenterephthalat (s. Abschnitt 3.2.1).

Um die Durchlässigkeiten der zwei Materialien zu testen, wurden die entsprechenden Snapwell®-Einsätze ohne Zellmonolayer in die Ussing-Kammer eingebaut. Die Versuchsdurchführung war analog der in Abschnitt 3.2.3.3 beschriebenen, mit dem Unterschied, dass in der mukosalen Kammerhälfte die anfängliche Selenspezieskonzentration $400 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies betrug. Es wurden über einen Zeitraum von 180 min alle 30 min Proben entnommen. Die Porengröße der untersuchten Membranen beträgt $0,4 \mu\text{m}$, weshalb die Membranen für die vier Selenspezies (und auch für alle Bestandteile der HBSS) permeabel sind. Daher wird zur besseren Vergleichbarkeit die prozentuale Durchlässigkeit P bezüglich eines Konzentrationsausgleichs in beiden Kammerhälften nach Gleichung 29 berechnet (Abbildung 5.1):

$$P_{\text{serosal}} = \frac{c_{\text{serosal}}}{\left(\frac{c_{\text{Anfang}}}{2} \right)} \cdot 100 \% \quad (29)$$

Aus den Ergebnissen lässt sich ein deutlicher zeitabhängiger Unterschied der Durchlässigkeit von PC- und PET-Membran erkennen. Am Ende des untersuchten Zeitraums (nach 180 min) beträgt P_{serosal} , abhängig von der Selenspezies, für die PET-Membran zwischen 30 und 42 % und für die PC-Membran zwischen 66 und 80 %. Das entspricht einer um etwa doppelt so hohen Durchlässigkeit von PC gegenüber PET bezüglich aller Probennahmezeitpunkte. Die Ergebnisse führten zur Verwendung von PC-Membranen für die Transportversuche, da diese somit keinen limitierenden Faktor für den Transport der Selenspezies durch die Zellmonolayer darstellen.

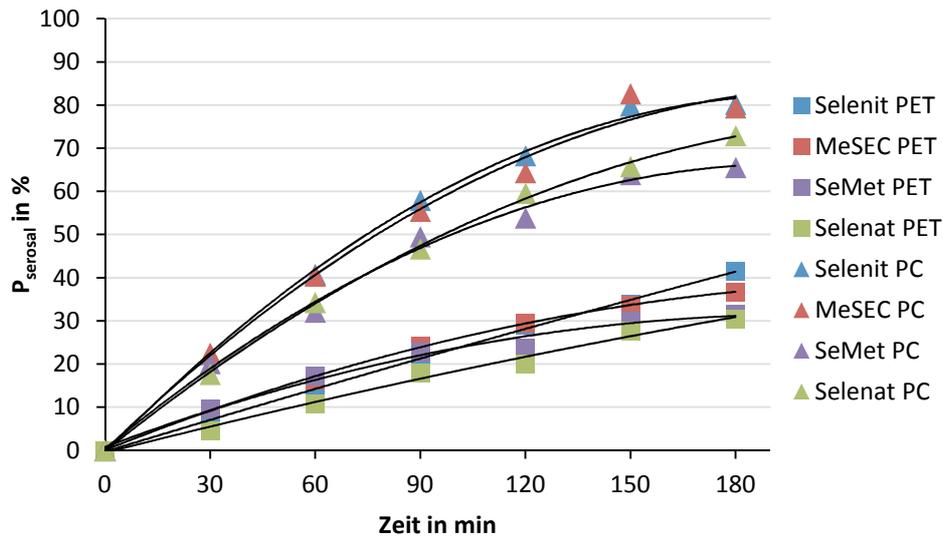


Abbildung 5.1: Vergleich der Durchlässigkeit von Polycarbonat (PC)- und Polyethylenterephthalat (PET)-Membran ohne Zellmonolayer bei einer Konzentration von $400 \mu\text{g L}^{-1}$ je Selenpezies in der mukosalen Seite. Zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit wurden die Vertrauensbereiche der Messergebnisse in der Abbildung nicht dargestellt

Die Permeabilitätsuntersuchungen der PC-Membran erfolgten zusätzlich mit den Konzentrationen 100 und $250 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies, um den Konzentrationsbereich der *In-vitro*-Versuche abzudecken (s. Anhang 2). Es wurden vergleichbare Ergebnisse wie für die hohe Konzentrationsstufe ($400 \mu\text{g L}^{-1}$) erhalten. Die Werte für P_{serosal} liegen zwischen 65 und 82% ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) bzw. 82 und 86% ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).

5.1.2 Überprüfung der Monolayerintegrität

Die Entwicklung des TEER während der Kultivierung der Caco-2-Monolayer auf den PC-Membranen ist in Abbildung 5.2 gezeigt. Hierfür wurden in regelmäßigen Zeitabständen mittels Volt-Ohm-Meter die Widerstände gemessen. Nach der Aussaat steigt der TEER bis zum fünften Tag nur leicht auf $(43,2 \pm 23,7) \Omega \text{ cm}^2$ an. In den darauf folgenden elf Tagen wird eine deutliche Erhöhung des TEER beobachtet, der ein Maximum bei $(371,5 \pm 55,6) \Omega \text{ cm}^2$ erreicht. Schließlich sinkt der TEER wieder auf $(282,7 \pm 51,8) \Omega \text{ cm}^2$ ab.

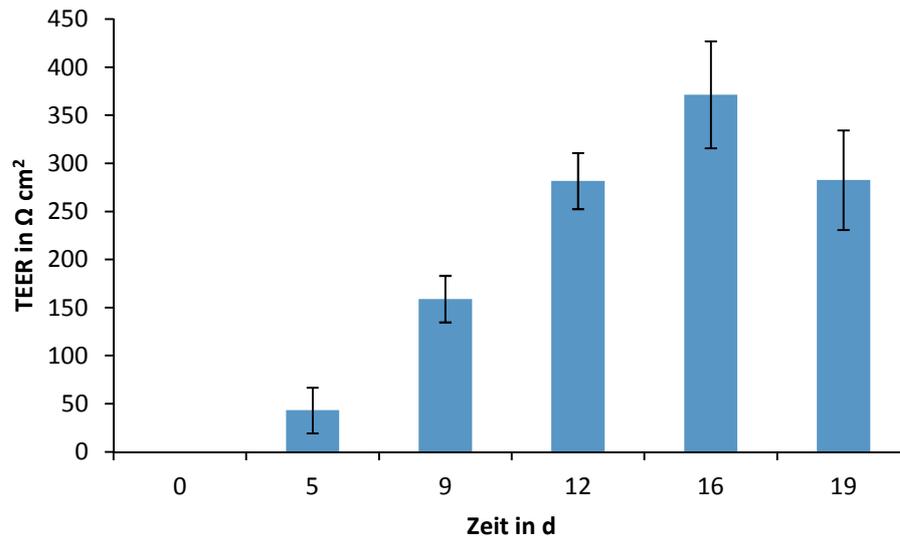


Abbildung 5.2: Zeitlicher Verlauf des transepithelialen elektrischen Widerstandes der Caco-2-Zellmonolayer während der Kultivierung auf den Snapwell®-Einsätzen ($MW \pm s$, $n = 24$)

In der Literatur wird der TEER für Caco-2-Zellen, die auf PC-Membranen kultiviert wurden, zwischen 220 und 380 $\Omega \text{ cm}^2$ angegeben [186]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen TEER-Werte sind mit den Literaturangaben vergleichbar und es kann somit von einem ausdifferenzierten und funktionstüchtigen Caco-2-Monolayer ausgegangen werden. In Abbildung 5.3 ist ein Beispiel für den zeitlichen Verlauf des Gewebewiderstandes während eines *In-vitro*-Versuches gegeben. Nach 15 min Äquilibrationszeit erreicht R_t einen Wert von etwa 450 $\Omega \text{ cm}^2$. Der Anschluss von Carbogen führt zu einem kurzen Absinken des R_t , der dann aber auf ein Maximum von ca. 475 $\Omega \text{ cm}^2$ anwächst. Nach der Zugabe der Selenspezies ($t = 0 \text{ min}$) sinkt der Gewebewiderstand innerhalb der folgenden 25-30 min nur leicht ab. Danach fällt R_t bis zum dritten Probenahmezeitpunkt (PN) nach 120 min deutlich. Das Absinken des Gewebewiderstandes mit der Zeit wird durch eine erhöhte Permeabilität des Zellmonolayers bzw. durch Störung der tight junctions verursacht. Da die Mediumkontrolle einen sehr ähnlichen zeitlichen Verlauf des R_t aufweist (s. Anhang 3), ist eine Intoxikation durch die Einzelapplikation von Selenit, Selenat, MeSEC oder SeMet mit einer Konzentration von 100 bzw. 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ nicht wahrscheinlich. Dieser Sachverhalt geht aus Untersuchungen von LEBLONDEL et al. hervor, die Transportversuche mit ca. 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies durchführten. Dabei wurde keine toxische Wirkung auf die Caco-2-Zellen festgestellt [5]. Weiterhin wurden auch die Verläufe der Gewebewiderstände der beiden Versuche aus dem statistischen Versuchsplan mit 100 und 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies verglichen (s. Abschnitt 3.2.3.3). Daraus ergibt sich eine Gesamtselenkonzentration aus den vier untersuchten Selenspezies von 400 bzw.

1600 $\mu\text{g L}^{-1}$. Der Vergleich zeigt aber keine wesentlichen Unterschiede im Verlauf des R_t während der Ussing-Kammer-Versuche. Dieses Ergebnis deutet ebenfalls auf ein nicht toxisches Potenzial der verwendeten Konzentrationen an Selen hin.

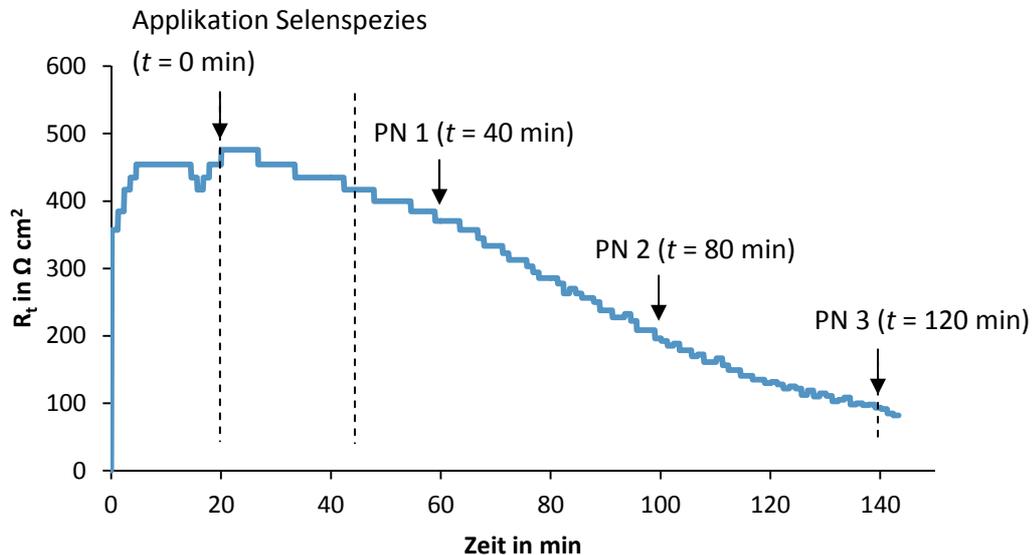


Abbildung 5.3: Zeitlicher Verlauf des Gewebewiderstandes R_t während eines Ussing-Kammer-Versuches. Die Applikation der Selenspezies stellt den Beginn des Experimentes dar ($t=0 \text{ min}$). Die Probennahmen (PN) erfolgten nach 40, 80 und 120 min.

Trotz des Absinkens von R_t ist der Widerstand bei der letzten Probennahme bei etwa $100 \Omega \text{ cm}^2$, weshalb die Barrierefunktion des Zellmonolayers weiterhin gegeben ist. Eine mögliche Ursache für den Verlauf von R_t kann die Umwälzbewegung des Transportpuffers durch die Begasung mit Carbogen sein. Dadurch wäre eine mechanische Beanspruchung der Caco-2-Zellmembran möglich, was zu einer negativen Veränderung bzw. Schädigung des intakten Monolayers führt. Des weiteren können das Absinken des pH-Wertes in der Pufferlösung oder ein mangelndes Nährstoffangebot (aufgrund der Stoffwechselfvorgänge der Zellen) Ursachen sein.

5.2 Transportexperimente

5.2.1 Einzelapplikation der Selenspezies

Die *In-vitro*-Versuche zum Transportverhalten von Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC bei Einzelapplikation zu den mukosalen Kammerhälften umfassten die Untersuchungen der Konzentrationen 100 und $400 \mu\text{g L}^{-1}$ je Selenspezies. Es wurden nach 40, 80 und

120 min Probenaliquote aus der mukosalen und der serosalen Seite der Ussing-Kammer entnommen. In der Abbildung 5.4 sind für die mukosalen Seiten beispielhaft die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von Selenit und SeMet für die $100\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -Versuche sowie für die $400\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -Versuche dargestellt.

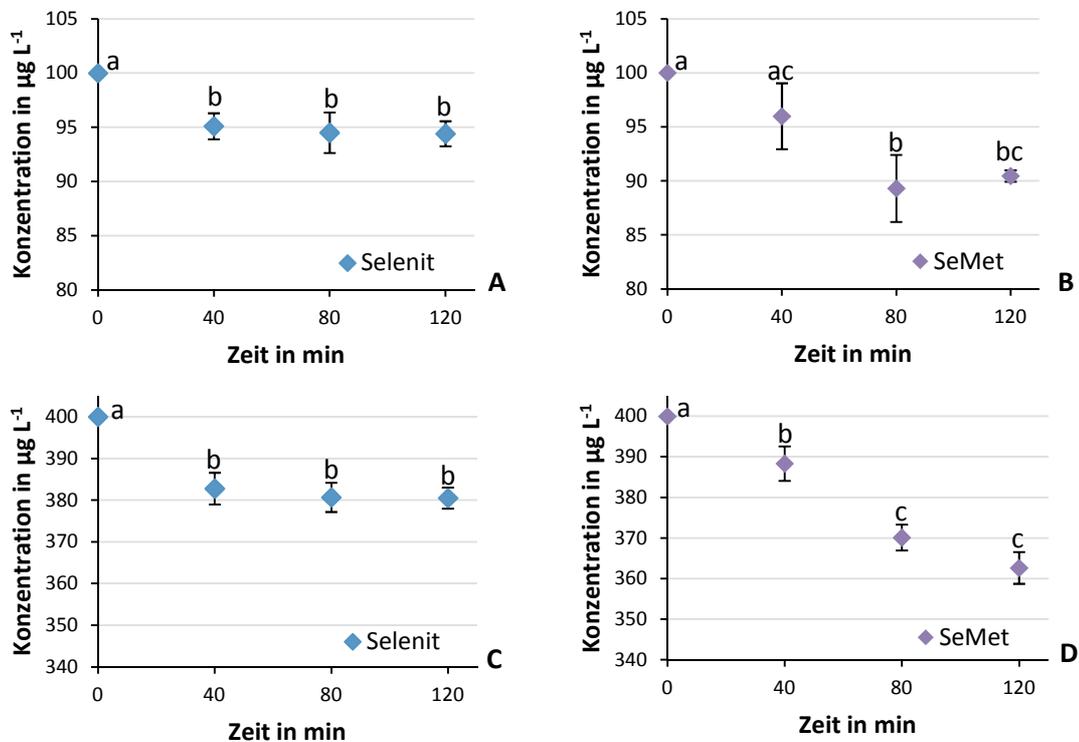


Abbildung 5.4: Zeitlicher Verlauf der Selenspezieskonzentrationen in den mukosalen Kammerhälften. Messergebnisse in $\mu\text{g L}^{-1}$ von Selenit (A) und SeMet (B) für die Versuche mit einer Anfangskonzentration von $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ sowie von Selenit (C) und SeMet (D) für die Versuche mit einer Anfangskonzentration von $400\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Die Messwerte sind als $\text{MW} \pm s$ angegeben ($n = 3$). Mittelwerte, die nicht mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test)

Die Messungen der Proben mittels HPLC-ICP-DRC-MS zeigen für Selenit nach 40 min eine signifikante Abnahme der Anfangskonzentration um etwa 5 %. Danach werden keine weiteren signifikanten Änderungen der Selenitkonzentration beobachtet. Dies gilt sowohl für die Versuche mit 100 und $400\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Selenit. Im Gegensatz dazu kommt es bei SeMet auch nach 80 min zu einem weiteren signifikanten Absinken der entsprechenden Selenspezieskonzentration. Die Abbildungen zum zeitlichen Verlauf der Konzentrationen von Selenat und MeSEC sind Anhang 4 zu entnehmen. Die zeitabhängige Abnahme der Anfangskonzentration liegt für die drei Spezies Selenat, SeMet und MeSEC nach 120 min

zwischen 9-12 % für die $100\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -Versuche und zwischen 5-14 % für die $400\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -Versuche.

In den Einzelversuchen, wie auch in allen anderen durchgeführten Versuchen (Selenspeziesmischungen), konnte festgestellt werden, dass Selenit auch nach 120 min Versuchszeit auf der serosalen Seite mit der HPLC-ICP-DRC-MS nicht detektierbar war. Somit ist der Transport durch die Caco-2-Zellen von der apikalen zur serosalen Seite für Selenit unwahrscheinlich. Die Beobachtung wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass es nach 40 min zu keinen weiteren signifikanten Änderungen der Selenitkonzentration in den mukosalen Kammerhälften kam. Allerdings kann auch ein besonders langsamer Transport dieser anorganischen Spezies nicht ausgeschlossen werden, der in dem Versuchszeitraum von 120 min nicht erkannt wurde.

Die erhaltenen Resultate stimmen näherungsweise mit den Ergebnissen zweier anderer Forschungsgruppen überein, die sich ebenfalls mit dem Transport von Selenspezies durch Caco-2-Zellmonolayer beschäftigten. LEBLONDEL et al. konnten eine um zehn- bis fünfzehnfach niedrigere Permeabilität von Selenit gegenüber Selenat und SeMet, bei einer Versuchsdauer von 120 min und einer Anfangskonzentration von ca. $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, nachweisen [5]. Außerdem schlagen sie aufgrund ihrer Ergebnisse einen parazellulären Transportvorgang für Selenit vor und bestätigen somit die Annahme eines passiven Vorgangs. Die Gruppe um ZENG konnte ebenfalls nur einen geringen Transport von Selenit durch Caco-2-Zellmonolayer zeigen. Die von ihnen gewählte Anfangskonzentration der Selenspezies lag bei etwa $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ und einer Versuchsdauer von 72 h. Verglichen mit MeSEC, SeMet und einem Selenhefeextrakt (künstliche simulierte gastrointestinale Verdauung) war die Durchlässigkeit um den Faktor 3 verringert [187]. Beide Arbeiten kommen demnach zu dem Schluss, dass die Bioverfügbarkeit (Transport) von Selenit durch Caco-2-Monolayer stark eingeschränkt ist. Eine mögliche Ursache für den nach 120 min nicht messbaren Transporteffekt kann die verwendete Caco-2-Zelllinie sein, da sie in mehrere Subtypen unterschieden werden kann. Die Subtypen besitzen wiederum verschiedene Charakteristiken, die den Transport, die Morphologie usw. beeinflussen können. Weiterhin sind auch die Kultivierungsbedingungen von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung funktioneller Eigenschaften der Caco-2-Zellen [82].

Da für Selenit kein messbarer Transport festgestellt werden konnte, ist in Abbildung 5.5 nur der Transport von der apikalen zur serosalen Seite für Selenat, MeSEC und SeMet über einen Zeitraum von 120 min abgebildet. Die Grafik beinhaltet die Ergebnisse der Experimente mit einer Anfangskonzentration von 100 und $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

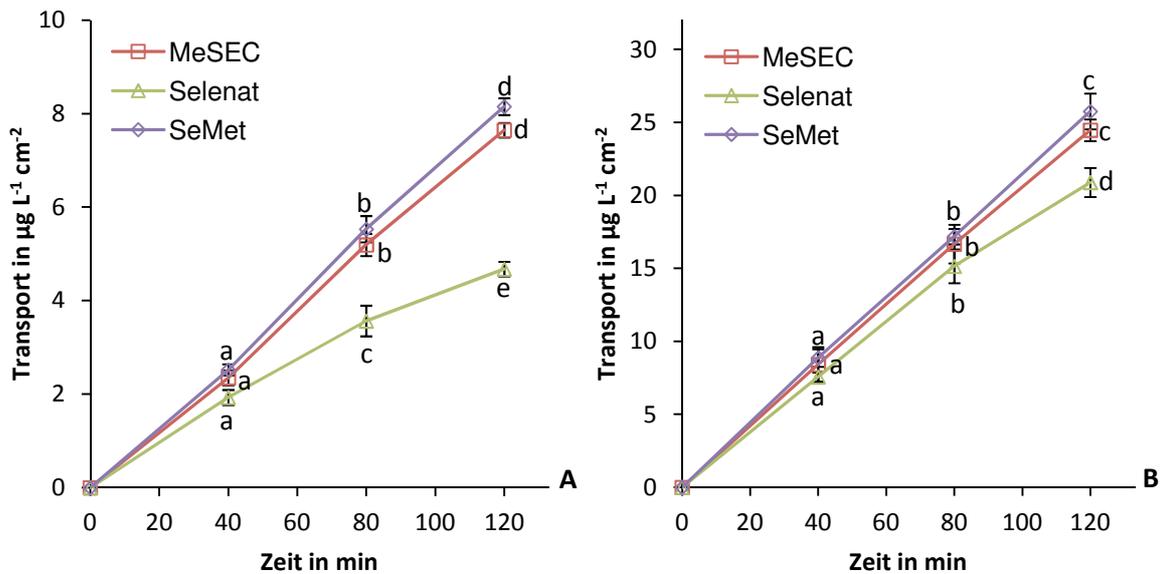


Abbildung 5.5: Zeitliche Veränderung des Transports von der apikalen zur serosalen Seite von Selenat, MeSEC und SeMet. Die Ausgangskonzentrationen in der apikalen Kammerhälfte sind 100 (A) und 400 (B) $\mu\text{g L}^{-1}$. Die Messwerte sind als $\text{MW} \pm s$ angegeben ($n = 3$). Alle Mittelwerte der drei Selenpezies unterscheiden sich zwischen den Probenahmezeitpunkten signifikant voneinander, weshalb diese nicht gesondert gekennzeichnet sind ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test). Mittelwerte, die nicht mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich innerhalb der Probenahmezeitpunkte signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test)

Für Selenat, MeSEC und SeMet nehmen die Konzentrationen auf der serosalen Seite nach jeder Probennahme signifikant zu. Folglich tritt ein transepithelialer Transport der drei Selenpezies durch die Caco-2-Zellmonolayer auf. Darüber hinaus ist die Zunahme der Spezieskonzentration in der serosalen Seite normalerweise mit der damit korrespondierenden Abnahme der entsprechenden Spezieskonzentration in der mukosalen Seite verbunden. Jedoch lässt der zu erwartende größere Messfehler auf der mukosalen Seite dies nicht immer beobachten. Werden die Verbindungen miteinander verglichen, ergibt sich ein zeit- und speziesabhängiger Verlauf. Bei den Versuchen mit einer Anfangskonzentration von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ kann eine Einteilung in organische und anorganische Spezies erfolgen. Die beiden organischen Spezies SeMet und MeSEC unterscheiden sich während des Versuchszeitraums nicht signifikant voneinander. Sie zeigen eine vergleichbare Transporteffizienz. Die Selenatkonzentration ist hingegen nach 120 min nur etwa halb so groß wie die Konzentration für SeMet und MeSEC. Ein signifikanter Unterschied im Transportverlauf wird für Selenat nach 40 min beobachtet.

Die Versuche mit der Anfangskonzentration von $400 \mu\text{g L}^{-1}$ führen bis 80 min zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den beiden organischen Spezies und Selenat. Erst

nach 120 min Versuchsdauer ist ein signifikant geringerer Transport von Selenat gegenüber SeMet und MeSEC festzustellen. Dessen ungeachtet ist die Erhöhung der anfänglichen Konzentration um das Vierfache nicht mit einem entsprechend vielfach höheren Durchgang durch die Caco-2-Monolayer verbunden. Insbesondere ist der Transport von SeMet und MeSEC um etwa 20 % verringert, aber der von Selenat um 11 % erhöht. Durch die erhaltenen Ergebnisse kann neben dem zeit- und speziesabhängigen, auch ein konzentrationsabhängiger Transport von der apikalen zur serosalen Seite angenommen werden.

Aus den erhobenen Daten kann der so genannte „scheinbare“ Permeabilitätskoeffizient (apparent permeability coefficient, P_{app}) berechnet werden (Tabelle 5.1). Der P_{app} ist ein gebräuchlicher Parameter zur Beurteilung von Transportprozessen bzw. der Durchlässigkeit eines Zellmonolayers für eine ausgewählte Verbindung. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 30:

$$P_{app} = \frac{V}{A \cdot c_0} \cdot \frac{dc}{dt} \quad (30)$$

Dabei entspricht $\frac{dc}{dt}$ der Konzentrationsänderung in der serosalen Seite, V ist das Volumen der Halbkammer, A die Fläche des verwendeten Snapwell[®]-Einsatzes und c_0 ist die Anfangskonzentration in der mukosalen Seite.

Tabelle 5.1: Berechnete P_{app} für Selenat, SeMet und MeSEC nach dem Durchgang durch Caco-2-Zellmonolayer. Die Experimente mit der Anfangskonzentration von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ werden mit E100 und die mit einer Anfangskonzentration von $400 \mu\text{g L}^{-1}$ werden mit E400 bezeichnet (MW \pm s, $n = 3$)

	P_{app} in $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$		
	Selenat	SeMet	MeSEC
E100	$32,66 \pm 0,04$	$57,23 \pm 1,96$	$53,73 \pm 0,81$
E400	$36,60 \pm 1,93$	$44,58 \pm 1,88$	$42,54 \pm 1,23$

Die erhöhte Durchlässigkeit von Selenat bei einer Konzentrationserhöhung von 100 auf $400 \mu\text{g L}^{-1}$ wird auch durch den P_{app} bestätigt. Es ergibt sich zwischen P_{app} (E100) von $(32,66 \pm 0,04) \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ und P_{app} (E400) von $(36,60 \pm 1,93) \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ ein signifikanter Unterschied (t -Test, $\alpha = 0,05$). Gleiches gilt auch für die beiden organischen Spezies, die allerdings bei der höheren Konzentrationsstufe eine schlechtere Permeabilität durch den Caco-2-Zellmonolayer aufweisen.

Im Vergleich mit zwei ähnlichen Arbeiten zum Transport von Selenspezies sind die P_{app} , je nach betrachteter Selenverbindung, um den Faktor zwei bis fünf größer. Beide Vergleichsstudien wurden über einen Versuchszeitraum von 2 h durchgeführt und verwendeten die Caco-2-Zelllinie als *In-vitro*-Modell sowie eine Konzentration von etwa $800 \mu\text{g L}^{-1}$ ($10 \mu\text{M}$) je Spezies. Die Permeabilitätsangaben von LEBLONDEL et al. waren für Selenat $15,60 \cdot 10^{-6}$ und für SeMet $10,62 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ [5]. GAMMELGAARD et al. berechneten folgende P_{app} : Selenat $9,5 \cdot 10^{-6}$, SeMet $28,1 \cdot 10^{-6}$ und MeSEC $21,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ [6]. Eine wichtige Erkenntnis beider Gruppen war, dass ein passiver Transportvorgang (und kein Na^+ -abhängiger Transportmechanismus, vgl. Abschnitt 2.1.4) von Selenat durch Caco-2-Zellmonolayer sehr wahrscheinlich ist.

Die Konzentrationsabhängigkeit aktiver Transportmechanismen (wie bei SeMet und MeSEC) kann Ursache für die signifikant größeren P_{app} (E100) für die beiden organischen Spezies sein [6]. Werden die Angaben von GAMMELGAARD et al. berücksichtigt, zeichnet sich mit zunehmender Spezieskonzentration eine Beeinträchtigung des Transports – und somit eine direkte Beeinflussung der verantwortlichen Transportproteine – durch die Caco-2-Zellmonolayer ab. Für den beschriebenen passiven Transport von Selenat kann eine solche Konzentrationsabhängigkeit nicht nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der HPLC-ICP-DRC-MS konnte außerdem gezeigt werden, dass die applizierten Selenspezies, auch nach dem Durchgang durch die Zellmonolayer, unverändert in den serosalen Seiten vorlagen. Eine Metabolisierung der untersuchten Selenspezies während des Transportvorgangs in den Caco-2-Zellen findet vermutlich nicht statt.

5.2.2 Applikation von zwei konzentrationsabhängigen Selenspeziesmischungen

In der Humanernährung ist die Aufnahme von nur einer bestimmten Selenspezies unwahrscheinlich, da eine Vielzahl an Selenverbindungen in Lebensmitteln vorkommen. Daher wurden Mischungen der vier relevanten Spezies Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC zu den mukosalen Seiten der Ussing-Kammer appliziert. Die Konzentrationsstufen wurden wie bei der Einzelapplikation zu 100 und $400 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies gewählt. Daraus resultiert eine Selengesamtkonzentration von 400 bzw. $1600 \mu\text{g L}^{-1}$. Aus der Literatur sind bisher keine *In-vitro*-Versuche zum Selenspeziestransport bei simultaner Verabreichung mehrerer Spezies bekannt.

Wie auch bei den Einzelversuchen wird unter den angewendeten Versuchsbedingungen kein Selenit auf der serosalen Seite detektiert. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den serosalen Konzentrationen bei den Probennahmezeitpunkten 40 , 80 und 120 min für

Selenat, SeMet und MeSEC festgestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse für die Konzentrationsstufen von 100 und 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ sind in der Abbildung 5.6 grafisch dargestellt.

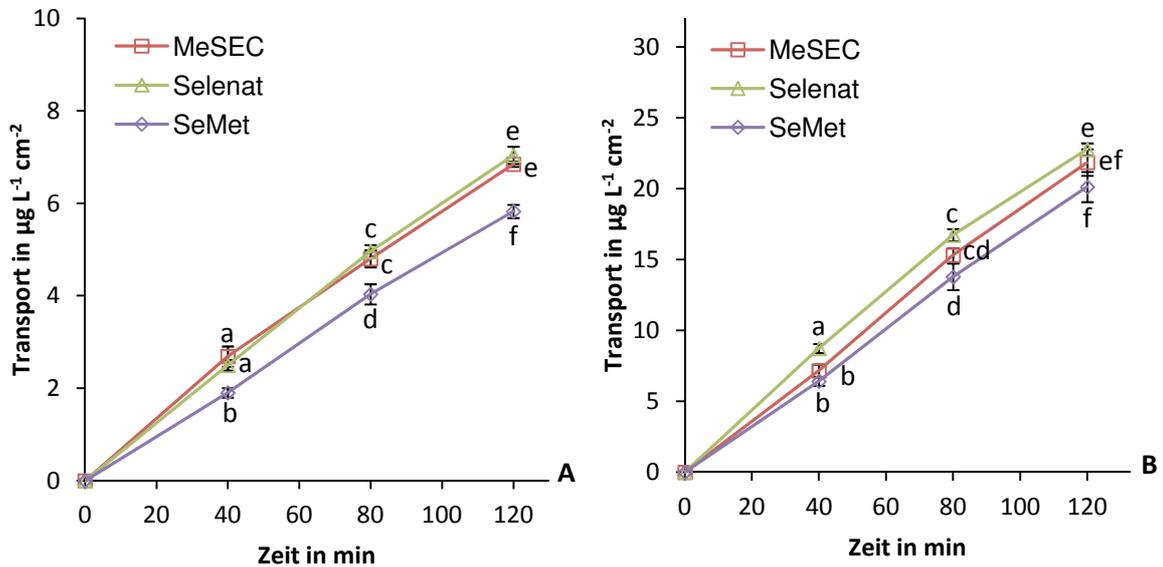


Abbildung 5.6: Zeitliche Veränderung des Transports von der apikalen zur serosalen Seite von Selenat, MeSEC und SeMet bei Applikation von Selenspeziesmischungen. Die Ausgangskonzentrationen in der apikalen Kammerhälfte sind 100 (A) und 400 (B) $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies (inklusive Selenit) in der Mischung. Die Messwerte sind als MW \pm s angegeben ($n = 3$). Alle Mittelwerte der drei Selenspezies unterscheiden sich zwischen den Probenahmezeitpunkten signifikant voneinander, weshalb diese nicht gesondert gekennzeichnet sind ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test). Mittelwerte, die nicht mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich innerhalb der Probenahmezeitpunkte signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test)

Der Transport von SeMet bei der niedrigen Konzentrationsstufe unterscheidet sich signifikant von dem für Selenat und MeSEC über den betrachteten Versuchszeitraum von 120 min. Andererseits zeigen die beiden letztgenannten Spezies einen nahezu identischen Verlauf. Die Experimente mit der hohen Konzentrationsstufe führen nur zu einem signifikanten Unterschied zwischen Selenat und SeMet über den gesamten Versuchszeitraum sowie zwischen Selenat und MeSEC bei 40 min. Die Vervielfachung der Anfangskonzentration hat wiederum keine vierfach höhere Konzentration auf der serosalen Kammerseite zur Folge. Vielmehr wird der Transport für Selenat bzw. MeSEC um etwa 20 % und für SeMet um 14 % gehemmt. Daraus resultiert erwartungsgemäß neben dem zeit- und speziesabhängigen Transport auch eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Applikation von Selenspeziesmischungen.

Durch die Erhöhung der Konzentration von 100 auf 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ werden die P_{app} für alle drei Selenspezies signifikant kleiner (t -Test, $\alpha = 0,05$). Die berechneten P_{app} für die simultane Applikation der Selenspezies sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Demzufolge hat die Konzentrationserhöhung beim gleichzeitigen Vorhandensein aller vier Spezies eine hemmende Wirkung auf die Permeabilität von SeMet, MeSEC und Selenat.

Tabelle 5.2: Berechnete P_{app} für Selenat, SeMet und MeSEC nach dem Durchgang durch Caco-2-Zellmonolayer. Die Experimente mit der Anfangskonzentration von 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies (inklusive Selenit) in der Mischung werden mit M100 und die mit einer Anfangskonzentration von 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies in der Mischung werden mit M400 bezeichnet (MW \pm s, $n = 3$)

	P_{app} in $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$		
	Selenat	SeMet	MeSEC
M100	49,14 \pm 1,18	40,86 \pm 1,35	47,21 \pm 0,45
M400	39,76 \pm 0,80	35,29 \pm 2,07	38,39 \pm 1,64

5.2.3 Vergleich beider Applikationsformen

Im Vergleich zur Einzelapplikation kommt es bei der Applikation von Selenspeziesmischungen zu Veränderungen im Transport von Selenat, SeMet und MeSEC. Selenat erfährt einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Einzelapplikation. SeMet verhält sich gegensätzlich. Es kommt zu einem langsameren Transport (vgl. Abbildung 5.5 A und 5.6 A). Die Beobachtungen gelten sowohl für die niedrige als auch die hohe Konzentrationsstufe. Eine Gruppierung in organische und anorganische Spezies oder in Selenspezies, die einem passiven oder aktiven Transport folgen, ist bei den Versuchen mit Selenspeziesmischungen nicht mehr möglich. Um die Unterschiede zwischen den Spezies, den Applikationsformen und Konzentrationsstufen deutlicher zu gestalten, wurde die Transportrate $T_{serosal}$ nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_{serosal} = \frac{C_{serosal}}{C_{Anfang}} \cdot 100 \% \quad (31)$$

Die Werte für $T_{serosal}$ der Ergebnisse nach 120 min sind in der Abbildung 5.7 zu sehen. Generell verringert sich der Transport der organischen und anorganischen Spezies bei einer Erhöhung der Anfangskonzentration auf der mukosalen Seite. Hierbei ist es nicht entscheidend, ob die Spezies einzeln oder in Mischung zugegeben wurden. Eine Ausnahme ist Selenat bei den Einzelapplikationsversuchen, die bei der hohen Konzentrationsstufe zu

einer höheren Transportrate führen. Da für MeSEC und SeMet durchweg ein geringerer Transport bei der hohen Konzentrationsstufe beobachtet wird, bestätigt sich die Konzentrationsabhängigkeit für aktive Transportmechanismen auch bei der Zugabe der Speziesmischungen.

Der Einfluss anderer Selenspezies auf den Transport einer einzelnen Spezies zur serosalen Seite ist ebenfalls deutlich sichtbar (Abbildung 5.7). Bei der Applikation von Selenspeziesmischungen kommt es zu einem signifikanten Absinken der Transportrate für SeMet. Sie sinkt für die Versuche mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ um 28 % und für die Versuche mit $400 \mu\text{g L}^{-1}$ um 22 %. Das MeSEC weist einen ähnlichen Verlauf auf. Die Abnahme des Transports bei Vorhandensein mehrerer Spezies beträgt für beide Konzentrationsstufen etwa 10 % und ist somit weniger stark ausgeprägt als für SeMet.

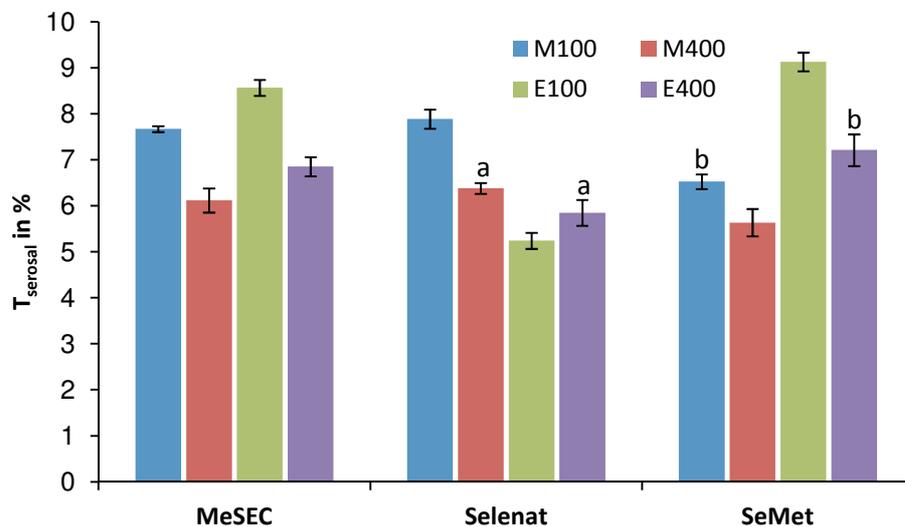


Abbildung 5.7: Transportraten in % von der apikalen zur serosalen Seite für Selenat, MeSEC und SeMet nach 120 min. Die Experimente, bei denen die Selenspezies einzeln zu je 100 bzw. $400 \mu\text{g L}^{-1}$ appliziert wurden, sind mit E100 bzw. E400 bezeichnet. Entsprechend wurden die Versuche mit den Speziesmischungen (inklusive Selenit) M100 bzw. M400 genannt. Die Messwerte sind als $\text{MW} \pm s$ angegeben ($n = 3$). Mittelwerte, die nicht mit einem Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich innerhalb der betrachteten Selenspezies signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA gefolgt von Tukey's *Post-hoc*-Test)

Völlig gegensätzlich verhält sich Selenat. Es wird ein signifikanter Anstieg des Transports um ca. 34 % bei den Versuchen mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ erhalten. Die Ergebnisse der $400\text{-}\mu\text{g-L}^{-1}$ -Versuche lassen keine gesicherte Aussage zu. Es deutet sich aber ebenfalls ein erhöhter Transport an. Die höchsten Transportraten werden für SeMet mit $(9,1 \pm 0,2) \%$ und für

MeSEC mit $(8,6 \pm 0,2) \%$ bei der Einzelapplikation von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ erzielt. Hingegen führt die Applikation einer Selenspeziesmischung mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies zur größten Transportrate von Selenat mit $(7,9 \pm 0,2) \%$.

Mit dem P_{app} ist es möglich, die Absorbierbarkeit verschiedener Verbindungen in einer ersten Näherung abzuschätzen. Verbindungen mit einem $P_{app} > 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ werden als vollständig absorbierbar nach oraler Aufnahme eingestuft [188]. YEE et al. gehen noch weiter und differenzieren zwischen drei Gruppen zur Einteilung verschiedener Substanzen hinsichtlich ihrer P_{app} . Ein $P_{app} < 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ entspricht einer geringen Absorption (0-20 %), $P_{app} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ entspricht einer Absorption im Bereich von 20-70 % und $P_{app} > 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ deuten auf eine hohe Absorption (70-100 %) hin [189]. Folgt man der Klassifizierung sind die drei Spezies Selenat, SeMet und MeSEC als Verbindungen mit einem hohen Absorptionspotenzial einzustufen (siehe Tabelle 5.1 und 5.2).

Die erzielten *In-vitro*-Ergebnisse können darauf hinweisen, dass es auch bei physiologischen Vorgängen *in vivo* zu Veränderungen des Transportverhaltens durch das Vorhandensein mehrerer Selenspezies gleichzeitig kommen kann. Die Übertragbarkeit muss allerdings immer unter dem Gesichtspunkt einer Approximation der *In-vivo*-Bedingungen gesehen werden. Beispielsweise ist die Größe der vorhandenen Oberfläche, die zur Resorption genutzt wird, ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Caco-2-Modell und dem menschlichen Dünndarm. Das Einwirken einer gewählten Stoffkonzentration auf eine viel kleinere Fläche kann demnach zu Unterschieden im Transportverhalten führen. Dennoch ist das Caco-2-Modell als *In-vitro*-Methode zur Abschätzung epithelialer Vorgänge *in vivo* anwendbar, da eine Korrelation zwischen dem Caco-2-Zellmodell und den menschlichen Absorptionsvorgängen gefunden wurde [84, 189]. Unter bestimmten Bedingungen sind somit erste Näherungen zum humanen Absorptions- bzw. Transportverhalten möglich.

Hinsichtlich des Transports lässt sich zusammenfassend aus den Ergebnissen eine Gruppierung in organische und anorganische Spezies vornehmen. Weiterhin ist der Transport durch die Caco-2-Zellmonolayer abhängig von der betrachteten Selenspezies, der Konzentration, der Zeit und der Applikationsform (d. h. dem Vorhandensein einer oder mehrerer Spezies). Letztere lässt darauf schließen, dass das Transportverhalten durch Wechselwirkungen der Selenspezies untereinander beeinflusst wird (siehe Abschnitt 6).

5.3 Akkumulation der Selenspezies durch Caco-2-Zellen

Eine Abschätzung der intrazellulären Aufnahme der vier untersuchten Selenspezies erfolgte durch Akkumulationsversuche. Für eine Aussage über die prozentuale Verteilung in dem gesamten *In-vitro*-Modell mussten die drei Kompartimente – mukosale und serosale Seite sowie Caco-2-Zellen – beprobt werden. Die Probennahme wurde nach 120 min Inkubationszeit durchgeführt, wobei die Spezies nur bei Einzelapplikation mit einer Konzentration von $400 \mu\text{g L}^{-1}$ untersucht wurden. Da die Zellen in konzentrierter HNO_3 gelöst wurden und der pH-Wert der injizierten Messlösung einen entscheidenden Einfluss auf den chromatografischen Trennprozess hat, wurden alle Probenlösungen mit der ICP-DRC-MS analysiert. Die BG der verwendeten ICP-DRC-MS-Methode beträgt $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ [127]. Um die Gehalte von Selenit und Selenat in den Zellen zu bestimmen, wurden drei Snapwell[®]-Einsätze (mit Zellen) vereinigt und mit konzentrierter HNO_3 versetzt.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit in absolute Massen umgerechnet, aus denen auch die prozentuale Verteilung der Selenspezies in den drei Kompartimenten bestimmt wurde (Tabelle 5.3). Die Berechnung der prozentualen Verteilung bezieht sich in diesem Fall nicht auf die Anfangskonzentration, sondern auf die Summe der detektierten Konzentrationen der einzelnen Kompartimente (Gleichung 32).

$$\text{Anteil}_{\text{Kompartiment}} = \frac{MW_{\text{Kompartiment}}}{MW_{\text{mukosal}} + MW_{\text{serosal}} + MW_{\text{Zellen}}} \cdot 100 \% \quad (32)$$

Tabelle 5.3: Messergebnisse der mukosalen und serosalen Seite sowie des Zellkompartiments für Selenit, Selenat, MeSEC und SeMet nach 120 min (MW \pm VB, $\alpha = 0,05$, $n = 6$)

Absolutwerte in ng	Selenit	Selenat	MeSEC	SeMet
Mukosal	1930 \pm 20	1890 \pm 21	1780 \pm 34	1790 \pm 64
Serosal	6,6 \pm 1,9	82,6 \pm 6,3	124 \pm 18,2	133 \pm 5,6
Zellen*	1,0 \pm 0,4	0,5 \pm 0,3	6,7 \pm 0,6	20,8 \pm 3,4
Anteil in %	Selenit	Selenat	MeSEC	SeMet
Mukosal	99,6 \pm 1,0	95,8 \pm 1,1	93,2 \pm 1,8	92,1 \pm 3,3
Serosal	0,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3	6,5 \pm 1,0	6,8 \pm 0,3
Zellen*	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,35 \pm 0,03	1,1 \pm 0,2

* $n = 2$

Durch die ICP-DRC-MS-Messungen konnte eine geringe Selenitkonzentration in der serosalen Seite detektiert werden. Die Ergebnisse für Selenat, SeMet und MeSEC der mukosalen und serosalen Seiten stimmen mit den Resultaten der Selenspeziesanalytik in den Transportexperimenten (Abschnitt 5.2.1) überein.

Neben den Unterschieden im Transportverhalten der Selenspezies von der mukosalen zur serosalen Seite zeigen sich auch signifikante Unterschiede zwischen den Selenspezies bei der Aufnahme durch die Caco-2-Zellen. SeMet wird nach 120 min Inkubationszeit deutlich stärker von den Zellen akkumuliert, als die anderen Verbindungen. Der Anteil des Zellkompartiments am gesamten *In-vitro*-Modell beträgt für SeMet 1,1 %, für MeSEC 0,3 %, für Selenit 0,05 % und für Selenat 0,03 %. Von LEBLONDEL et al. und GAMMELGAARD et al. wird eine ähnliche Abstufung beschrieben [5, 6].

Die Zellen akkumulieren im Vergleich zu MeSEC etwa dreimal so viel SeMet – verglichen mit Selenat ist es sogar das 40-fache. Auf Grundlage der Ergebnisse lassen sich die Spezies auch hinsichtlich ihres Akkumulationsverhaltens in anorganische und organische Verbindungen gruppieren. Obwohl SeMet und MeSEC für die Versuche mit $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (siehe Abschnitt 5.2.1) gleiche P_{app} aufweisen, also gleich gut transportiert werden, ist die Akkumulation unterschiedlich. Das kann auf verschiedene Aminosäuretransporter zurückgeführt werden, da für SeMet das System $b^{0,+}rBAT$ und für MeSEC der Transporter B^0 verantwortlich ist [74]. Des Weiteren ist der direkte, unspezifische Einbau von SeMet in Proteine eine mögliche Ursache für die hohen Konzentrationen in den Zellen. Der in der Literatur vermutete parazelluläre passive Transport von Selenit und Selenat durch Caco-2-Zellen, bekräftigt die Tatsache der sehr geringen Akkumulation der anorganischen gegenüber den organischen Spezies [6]. Die akkumulierte Menge beträgt jedoch für alle Selenspezies weniger als 1,1 % und beeinflusst damit die experimentellen Ergebnisse des gesamten *In-vitro*-Modells nicht signifikant.

6 Bewertung und Interpretation der Zellexperimente mittels chemometrischer Methoden

6.1 Regressionsanalyse mit Wechselwirkungseffekten des 2^4 -Faktorenplans

In Abschnitt 5.2.3 konnte eine Abhängigkeit des Transportverhaltens der vier Selenspezies (Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC) voneinander bei gleichzeitigem Vorhandensein aller vier Spezies in der mukosalen Seite festgestellt werden. Das führt weiterhin zu der Annahme einer gegenseitigen Beeinflussung der untersuchten Verbindungen beim Transport durch die Caco-2-Zellmonolayer. Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der Wechselwirkungen der Selenspezies auf den Transport wurde ein 2^4 -Faktorenplan mit den Faktorstufen 100 und 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Selenspezies erstellt (Planmatrix).

Die Mittelwerte der mittels HPLC-ICP-DRC-MS gemessenen Konzentrationen von Selenat, SeMet und MeSEC der serosalen Proben (Antwortgröße y_i) bilden die Antwortmatrix. Es konnte zwar kein Selenit auf der serosalen Seite quantitativ bestimmt werden, dennoch wurde diese Spezies immer mukosal appliziert. Ein möglicher Einfluss von Selenit auf das Transportverhalten der anderen Spezies kann dadurch geprüft werden. In der Tabelle 6.1 ist die Plan- und Antwortmatrix des 2^4 -Faktorenplans für die Probennahme nach 120 min zusammengefasst. Die Ergebnisse der serosalen Seiten wurden vor der Auswertung mittels COCHRAN-Test auf Varianzenhomogenität geprüft.

Die Effektmatrix wird nach Gleichung 2 (s. Abschnitt 2.5.1) berechnet, aus der sich Haupt- (HE) und Wechselwirkungseffekte (WE) bestimmen lassen. Anschließend werden die Regressionskoeffizienten (Gleichung 3) berechnet und auf Signifikanz getestet (Gleichung 7). Daraus ergibt sich je ein Regressionsmodell für Selenat, SeMet und MeSEC, mit dem ein funktioneller Zusammenhang zwischen den x - und y -Variablen hergestellt werden kann. Die berechneten Regressionskoeffizienten für Selenat, SeMet und MeSEC sind in der Tabelle 6.2 zu finden.

Tabelle 6.1: Plan- und Antwortmatrix des 2⁴-Faktorenplans. Dargestellt sind die Messergebnisse der dritten Probenahme in den serosalen Kammerhälften nach 120 min (MW ± s, n = 3)

Planmatrix					Antwortmatrix		
Versuchsnr.	Konzentration (mukosal) in µg L ⁻¹				Konzentration (serosal) in µg L ⁻¹		
	x _{Selenit}	x _{MeSEC}	x _{Selenat}	x _{SeMet}	y _{MeSEC}	y _{Selenat}	y _{SeMet}
1	100	100	100	100	7,67 ± 0,07	7,89 ± 0,21	6,53 ± 0,16
2	400	100	100	100	8,93 ± 0,67	6,79 ± 0,22	7,61 ± 0,47
3	100	400	100	100	20,7 ± 1,7	6,42 ± 0,44	4,41 ± 0,61
4	400	400	100	100	35,6 ± 1,6	6,16 ± 0,69	8,54 ± 0,45
5	100	100	400	100	7,70 ± 0,33	26,7 ± 2,0	7,05 ± 0,97
6	400	100	400	100	7,73 ± 0,70	24,6 ± 2,0	6,99 ± 0,30
7	100	400	400	100	43,8 ± 2,1	26,3 ± 0,6	9,97 ± 0,61
8	400	400	400	100	26,8 ± 2,1	24,8 ± 1,7	6,62 ± 1,37
9	100	100	100	400	6,06 ± 0,38	6,28 ± 0,20	20,0 ± 0,7
10	400	100	100	400	6,71 ± 0,32	7,41 ± 0,67	22,2 ± 1,2
11	100	400	100	400	36,5 ± 1,5	6,61 ± 0,32	36,4 ± 2,2
12	400	400	100	400	22,1 ± 2,4	7,31 ± 0,39	19,3 ± 1,4
13	100	100	400	400	6,93 ± 1,59	22,4 ± 1,4	23,2 ± 0,7
14	400	100	400	400	5,56 ± 0,36	25,1 ± 1,0	21,2 ± 1,6
15	100	400	400	400	24,1 ± 2,3	25,4 ± 1,9	23,0 ± 1,7
16	400	400	400	400	24,5 ± 1,1	25,5 ± 0,5	22,5 ± 1,2

Es wird deutlich, dass neben den HE auch WE signifikant sind und eine wichtige Rolle bei den Transportprozessen spielen. In besonderem Maße ist die Konzentration von MeSEC und SeMet auf der serosalen Seite und somit auch der Transport der beiden Spezies durch die Caco-2-Monolayer von vielen WE geprägt. Hierbei sind nicht nur 2-Faktor-WE, sondern auch die 3- und 4-Faktor-WE beteiligt. Dieses Ergebnis lässt auf einen komplexen Transportvorgang schließen, der schon allein durch das Vorhandensein von nur vier untersuchten Selenspezies beeinflusst wird. Die Haupteinflussgröße auf den Transport bildet erwartungsgemäß die Konzentration der betreffenden Spezies. Eine Erhöhung der mukosalen Konzentration resultiert demnach auch in einer Konzentrationserhöhung auf der serosalen Seite der Ussing-Kammer. Jedoch wird der Transport von MeSEC und SeMet durch eine hohe Selenit-Konzentration negativ beeinflusst. Gegensätzlich ist der Einfluss von SeMet auf die serosale MeSEC-Konzentration bzw. von MeSEC auf die serosale SeMet-Konzentration. Erstgenannter führt zu einem eingeschränkten Transport von MeSEC und letztgenannter zu einem gesteigerten SeMet-Transport. Außerdem scheinen die drei anderen Selenspezies den Transport von MeSEC durch den Caco-2-Monolayer zu beeinträchtigen, da alle signifikanten HE und 2-Faktor-WE negativ sind. Eine

Interpretation der anderen WE ist schwierig und zu komplex, um gesicherte Aussagen hinsichtlich des Transportverhaltens der beiden untersuchten organischen Selenpezies zu treffen. Hierzu wären gesonderte Versuchsreihen nötig, die sich direkt mit den verschiedenen Transportsystemen der Selenoamino-säuren beschäftigen.

Tabelle 6.2: Regressionskoeffizienten für MeSEC, Selenat und SeMet. Farblich hervorgehobene Zahlenwerte sind signifikant ($\alpha = 0,001, f = 32$)

Einfluss	Variable	Regressionskoeffizient B_i		
		MeSEC	Selenat	SeMet
Konstante		18,2	16,0	15,4
HE	1 (Selenit)	-0,97	-0,01	-0,97
	2 (MeSEC)	11,1	0,09	1,00
	3 (Selenat)	0,17	9,11	-0,27
	4 (SeMet)	-1,67	-0,23	8,13
2-Faktor-WE	12	-1,04	-0,10	-1,13
	13	-1,27	-0,07	0,24
	14	-0,88	0,60	-1,20
	23	0,36	0,32	-0,53
	24	-0,82	0,37	0,83
	34	-1,47	-0,27	-0,72
3-Faktor-WE	123	-0,87	-0,15	0,91
	124	-0,62	-0,28	-1,10
	134	2,87	0,20	1,32
	234	-1,58	0,08	-1,00
4-Faktor-WE	1234	2,97	-0,12	1,70
$ B^* $		0,75	0,58	0,59

Eine deutliche Abgrenzung von den organischen Spezies ist für das Transportverhalten des Selenats möglich. Hierbei wird nur ein signifikanter HE und ein signifikanter 2-Faktor-WE erhalten. Wie auch bei MeSEC und SeMet ist eine starke Konzentrationsabhängigkeit für den Transport durch die Caco-2-Zellmonolayer erkennbar. Einen geringen positiven, aber dennoch signifikanten Einfluss hat der WE der beiden Faktoren Selenit und SeMet. Der Transport von Selenat wird somit nicht so stark von den anderen Selenpezies beeinflusst. Neben dem Auffinden von HE und WE kann mit Hilfe des ermittelten Regressionspolynoms auch ein Modell für zukünftige Vorhersagen der serosalen Konzentrationen erstellt werden. Um das Kalibriermodell zu überprüfen, können die aus dem Regressionspolynom berechneten Werte (\hat{y}) gegen die gemessenen Werte

(Referenzwert, y_i) aufgetragen werden. Die grafische Darstellung für Selenat, MeSEC und SeMet ist in Abbildung 6.1 zu sehen.

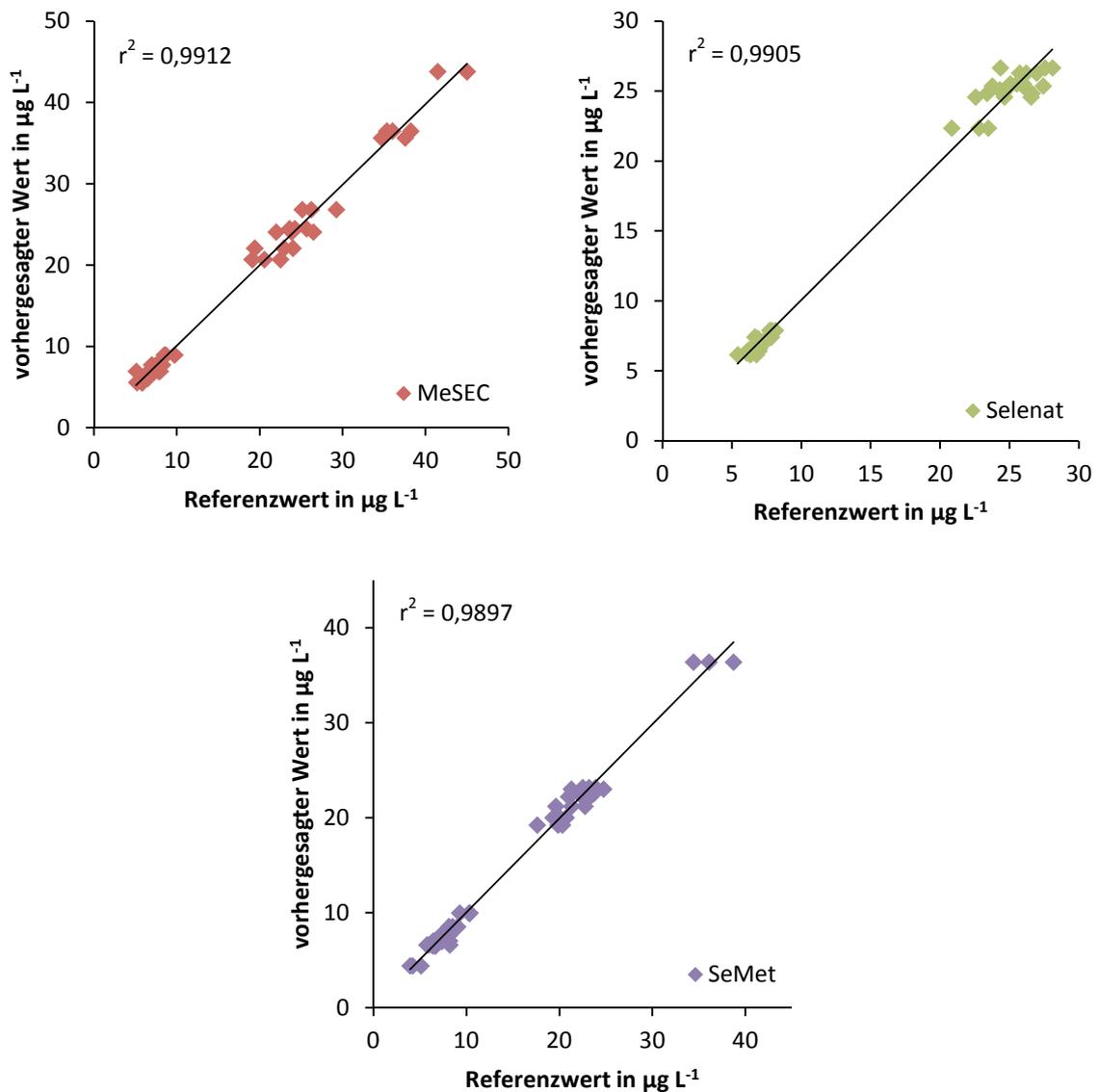


Abbildung 6.1: Überprüfung der Kalibriermodelle von MeSEC, Selenat und SeMet durch Auftragen der Vorhersagewerte gegen die Referenzwerte

Zur Beurteilung der Vorhersagegüte können weiterhin der Korrelationskoeffizient r , das Bestimmtheitsmaß r^2 und der RMSEP (s. Abschnitt 2.5.2, Gleichung 12) angegeben werden (s. Tabelle 6.3). Da der RMSEP auch von der Größe der eingesetzten Konzentration abhängig ist, wird ein relativer RMSEP berechnet, um unterschiedliche Konzentrationsniveaus besser miteinander vergleichen zu können [159].

$$RMSEP_{rel} = \frac{RMSEP}{\bar{y}_{Ref}} \quad (33)$$

Tabelle 6.3: Maßzahlen zur Beurteilung der Vorhersagegüte der Regressionsmodelle für MeSEC, Selenat und SeMet

Spezies	r	r ²	RMSEP in µg L ⁻¹	RMSEP _{rel} in %
MeSEC	0,996	0,991	1,17	6,4
MeSEC*	0,994	0,988	1,38	7,6
Selenat	0,995	0,991	0,90	5,6
Selenat*	0,992	0,984	1,17	7,3
SeMet	0,995	0,990	0,92	6,0
SeMet*	0,992	0,985	1,12	7,3

*Berechnungen nur mit signifikanten Regressionskoeffizienten

Aufgrund der Korrelationskoeffizienten von > 0,99 kann von einem offensichtlich gut angepassten Modell ausgegangen werden. Weiterhin beträgt das Bestimmtheitsmaß für MeSEC und Selenat 0,991, d. h. 99,1 % der Gesamtvarianz werden durch das Modell beschrieben. Es verbleibt eine Restvarianz von 0,9 %. Für SeMet ist das Bestimmtheitsmaß nur geringfügig schlechter. Der kleinste RMSEP_{rel} von 5,6 % wird für Selenat erhalten. Die RMSEP_{rel}-Werte für die organischen Spezies liegen bei 6,0 % (SeMet) und 6,4 % (MeSEC).

6.2 Regressionsanalyse ohne Wechselwirkungseffekte

In diesem Abschnitt erfolgt die Auswertung der Daten mit Hilfe der multiplen linearen Regression (MLR). Mit dieser Methode kann ein Vorhersagemodell für eine abhängige Variable aus mehreren unabhängigen Variablen erstellt werden. Das Regressionspolynom besteht aber in diesem Fall nur aus den vier Einstellgrößen der mukosalen Konzentrationen von Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC und nicht aus weiteren Wechselwirkungstermen. Als Ergebnis werden die Regressionskoeffizienten erhalten, die in Tabelle 6.4 für die drei Selenspezies zusammengefasst sind.

Tabelle 6.4: Regressionskoeffizienten der MLR für MeSEC, Selenat und SeMet. Farblich hervorgehobene Zahlenwerte sind signifikant ($\alpha = 0,05$)

	Regressionskoeffizient B_i		
	MeSEC	Selenat	SeMet
B_0	18,2	16,0	15,4
Selenit	-0,97	-0,01	-0,97
MeSEC	11,1	0,09	1,00
Selenat	0,18	9,11	-0,27
SeMet	-1,66	-0,23	8,13

Die Maßzahlen zur Beurteilung der Vorhersagegüte sind in Tabelle 6.5 zu finden.

Tabelle 6.5: Maßzahlen zur Beurteilung der Regressionsmodelle der MLR für MeSEC, Selenat und SeMet

Spezies	r	r^2	RMSEP in $\mu\text{g L}^{-1}$	RMSEP _{rel} in %
MeSEC	0,903	0,816	5,33	29,3
Selenat	0,990	0,980	1,29	8,1
SeMet	0,918	0,842	3,57	23,3

Der Korrelationskoeffizient von Selenat unterscheidet sich deutlich von denen der beiden organischen Spezies. Wird durch das Regressionsmodell von Selenat eine Gesamtvarianz von 98,0 % beschrieben, sind es für MeSEC und SeMet nur 81,6 bzw. 84,2 %. Der große Anteil an Restvarianz (für MeSEC 18,4 % und für SeMet 15,8 %), wird sicherlich durch das Auftreten der WE hervorgerufen, wie in Abschnitt 6.1 gezeigt. Die damit verbundenen größeren Abweichungen der Werte von der Regressionsgeraden sind auch deutlich in Abbildung 6.2 erkennbar. Hierbei sind die von den Regressionsmodellen im Rahmen der Kreuzvalidierung prognostizierten Konzentrationen von MeSEC, Selenat und SeMet gegen die gemessenen Werte aufgetragen. Da Selenat kaum durch solche Wechselwirkungen beeinflusst wird, ist das Regressionsmodell aus der MLR für eine Vorhersage gut geeignet. Im Gegensatz dazu ist die MLR für die beiden organischen Verbindungen ungeeignet. Das wird auch durch die sehr hohen RMSEP-Werte für MeSEC und SeMet, im Vergleich mit Selenat, deutlich. Für zukünftige Prognosen resultiert somit ein großer mittlerer Fehler. Die Berechnungen zur MLR haben gezeigt, dass WE, vor allem bei dem Transport der organischen Selenspezies sowie bei der Erstellung von Vorhersagemodellen, berücksichtigt werden müssen.

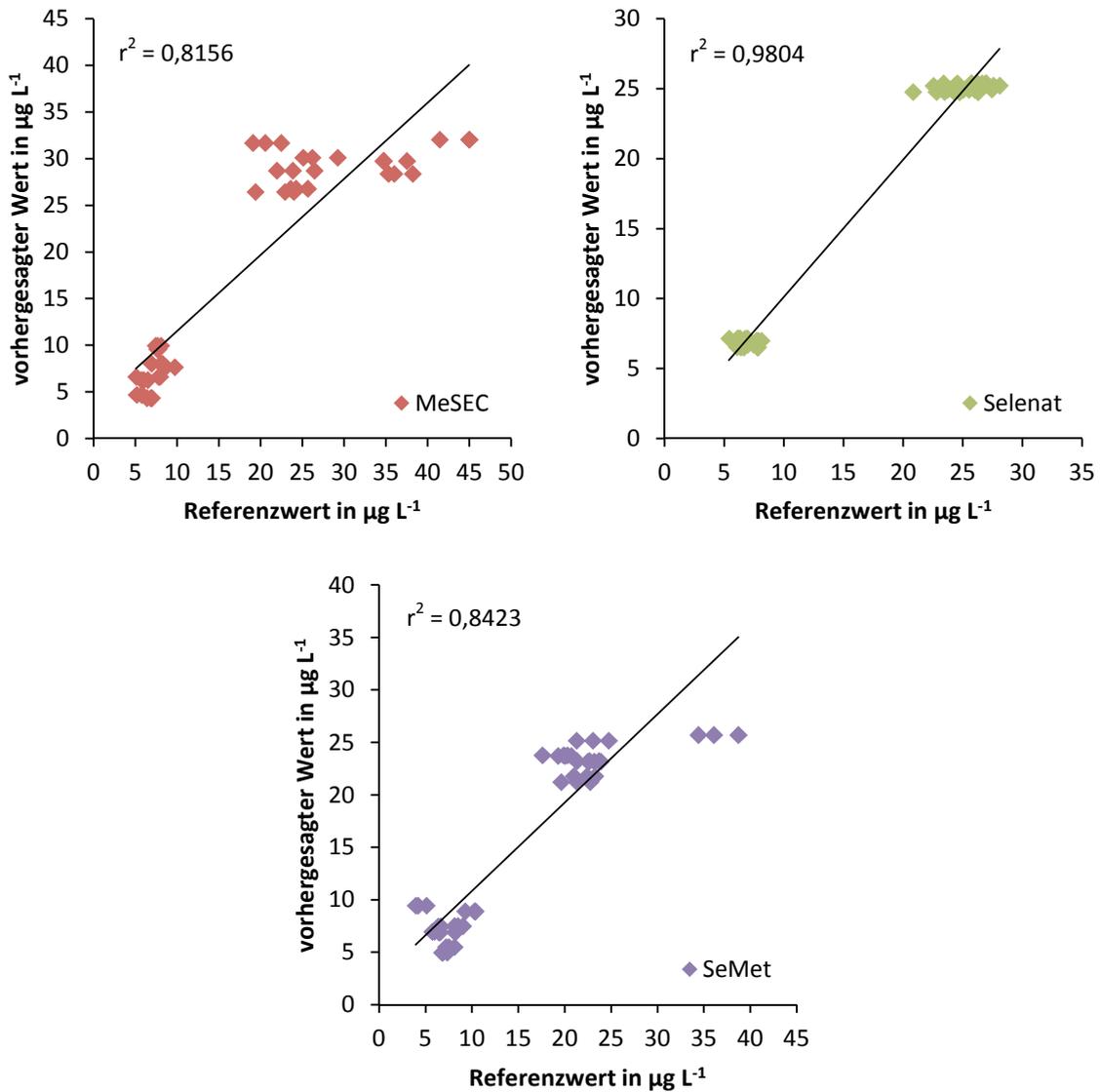


Abbildung 6.2: Darstellung der mit Hilfe des Regressionsmodells der MLR vorhergesagten Werte gegen die gemessenen Werte

6.3 Modellierung mit PLS

Der Datensatz des Faktorenplans wurde außerdem mit der PLS-Regression ausgewertet. Analog zur MLR kann eine abhängige Variable aus mehreren unabhängigen Variablen vorhergesagt werden. Dieses Modell wird PLS1 genannt. Im Unterschied zur MLR ist es mit dem PLS2-Modell möglich, mehrere abhängige Variablen aus mehreren unabhängigen Variablen zu prognostizieren. Als Erstes wird die PLS1 angewendet, um Vorhersagemodelle für MeSEC, Selenat und SeMet zu erstellen. In der Abbildung 6.3 sind wichtige Ergebnisse der PLS1-Regression dargestellt.

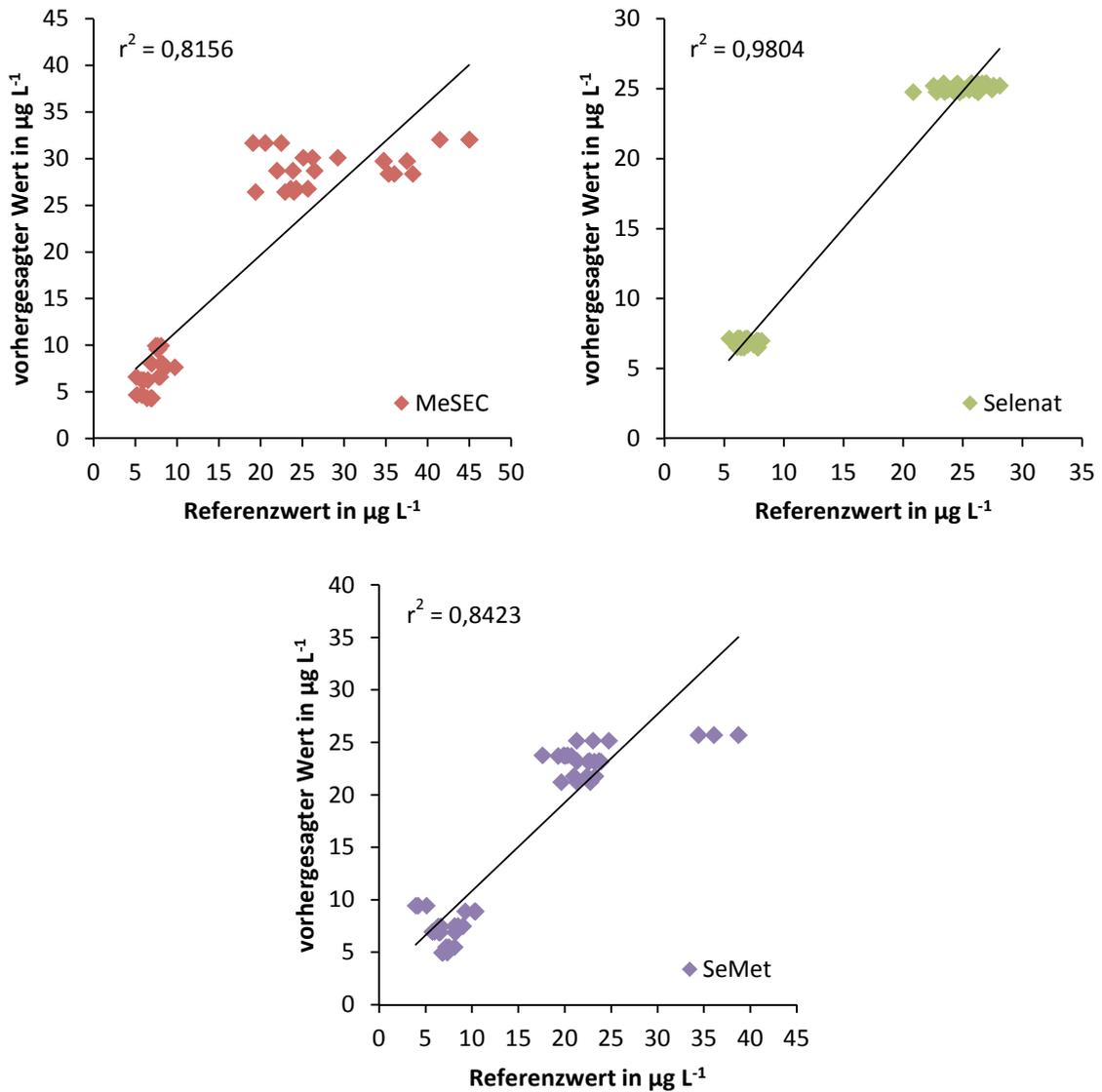


Abbildung 6.3: Darstellung der mit Hilfe des Regressionsmodells der PLS1 vorhergesagten Werte gegen die gemessenen Werte

Wie auch bei der MLR wurden die Spezieskonzentrationen im Rahmen der Kreuzvalidierung prognostiziert. Das Auftragen der vorhergesagten Werte gegen die gemessenen Werte führt zu den gleichen Ergebnissen wie denen der MLR. Alle Gütekriterien zur Beurteilung des Regressionsmodells sind nahezu identisch.

Ergänzend wurde die PLS2-Regression angewendet. Diese liefert keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur PLS1. Die RMSEP-Werte unterscheiden sich erst ab der sechsten Nachkommastelle, was auf Rechenungenauigkeiten zurückgeführt werden kann.

Die PLS-Regression ist, wie die MLR, ungeeignet für zukünftige Vorhersagen von MeSEC und SeMet. Allerdings ist das Regressionsmodell für die Prognose von Selenat gut geeignet.

6.4 Modellierung mit ANN

In der vorliegenden Arbeit sollen auch künstliche neuronale Netzwerke (ANN) zur Kalibration bzw. zur Modellbildung herangezogen werden. Für die Modellierung wurde eine Vielzahl verschiedener ANN berechnet, die sich hinsichtlich ihrer Topografie und der Aktivierungsfunktion unterscheiden. Es wurden die folgenden häufig verwendeten Netztypen ausgewählt.

- Linear
- Multilayer Perceptron (MLP)
- Radiale Basisfunktion (RBF)
- Generalized regression neural network (GRNN)

In der Summe wurden mit Hilfe des Softwareprogramms STATISTICA eine Zahl von 200 ANN getestet. Nach einer softwaregestützten Vorauswahl ist anhand des kleinsten angegebenen Testfehlers (Test Error) je ein Beispiel für die vier Netztypen ausgewählt worden. Es handelt sich dabei um die in Abbildung 6.4 dargestellten ANN.

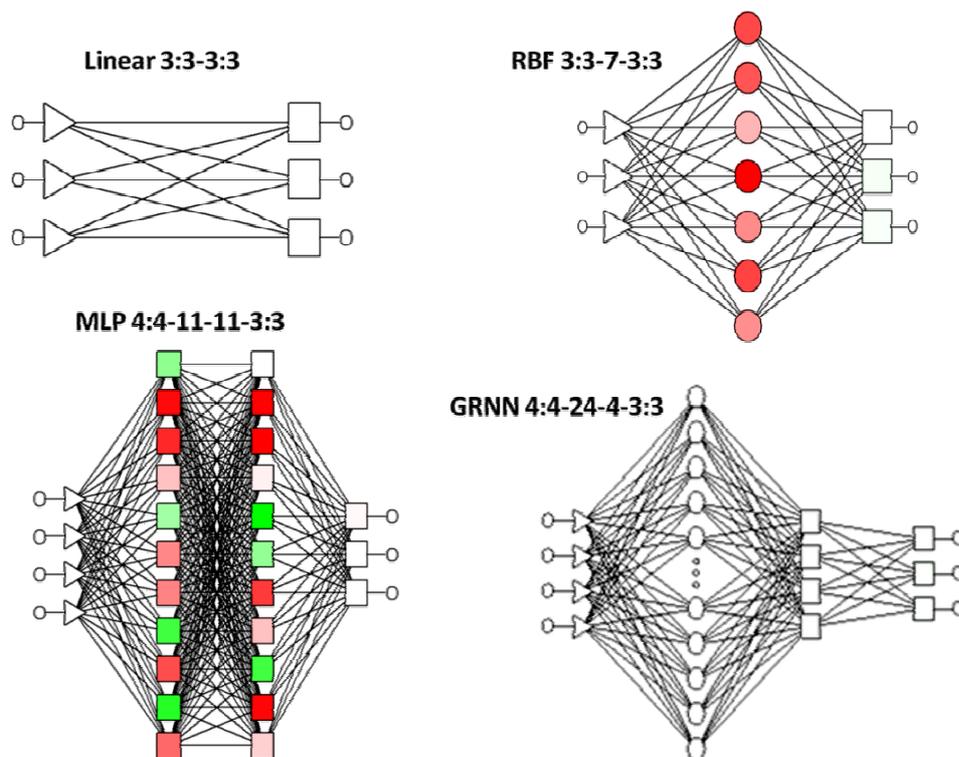


Abbildung 6.4: Illustration der verwendeten ANN

Die Modellkennung (Netzprofil) sei anhand eines Beispiels erläutert:

MLP 4:4-11-11-3:3

Es handelt sich dabei um ein mehrschichtiges Perceptron mit vier Eingangsvariablen, vier Eingangsneuronen, der ersten verdeckten Schicht mit elf Neuronen, einer zweiten verdeckten Schicht mit ebenfalls elf Neuronen, drei Ausgangsneuronen und drei Ausgangsvariablen.

Die Ergebnisse der Regressionsmodelle für die vier Netze sind in Tabelle 6.6 und Abbildung 6.5 zusammengefasst. Für die beiden organischen Selenspezies sind das lineare Netz und RBF ungeeignet, da hierbei die schlechtesten Korrelationskoeffizienten und RMSEP-Werte berechnet werden. Das am besten angepasste Modell wird mit dem Netztyp MLP erzielt. Die Korrelationskoeffizienten sind $> 0,99$ und die RMSEP-Werte sind um ein Vielfaches kleiner, verglichen mit dem linearen Netz und RBF. Das GRNN führt zu etwas schlechteren Ergebnissen als MLP.

Tabelle 6.6: Maßzahlen zur Beurteilung der Regressionsmodelle der vier ausgewählten ANN für MeSEC, Selenat und SeMet

	r	r ²	RMSEP in $\mu\text{g L}^{-1}$	RMSEP _{rel} in %
MeSEC				
Linear 3:3-3:3	0,897	0,805	5,55	30,5
MLP 4:4-11-11-3:3	0,992	0,984	1,60	8,8
RBF 3:3-7-3:3	0,913	0,834	5,10	28,0
GRNN 4:4-24-4-3:3	0,989	0,978	1,88	10,3
Selenat				
Linear 3:3-3:3	0,987	0,974	1,50	9,4
MLP 4:4-11-11-3:3	0,990	0,981	1,30	8,1
RBF 3:3-7-3:3	0,989	0,978	1,36	8,5
GRNN 4:4-24-4-3:3	0,990	0,979	1,32	8,3
SeMet				
Linear 3:3-3:3	0,910	0,828	3,76	24,5
MLP 4:4-11-11-3:3	0,990	0,980	1,34	8,7
RBF 3:3-7-3:3	0,927	0,860	3,39	22,1
GRNN 4:4-24-4-3:3	0,988	0,975	1,47	9,6

Für die Prognose der serosalen Selenatkonzentration ist MLP ebenfalls das zu bevorzugende ANN. Allerdings können auch RBF und GRNN angewendet werden,

wodurch geringfügig schlechtere Ergebnisse erzielt werden. Das lineare Netz ist das am wenigsten gut geeignete Vorhersagemodell für die serosale Selenatkonzentration. Im Vergleich zu MeSEC und SeMet lässt sich für Selenat wiederum ein deutlich anderes Transportverhalten ableiten. Dieses scheint weniger komplexen Vorgängen unterworfen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass der Testfehler (für die Auswahl geeigneter ANN) allein, noch kein Maß für die Vorhersagegüte eines ANN ist. Obwohl der Testfehler für MLP größer als für RBF oder GRNN war, konnte mit MLP das beste Vorhersagemodell berechnet werden.

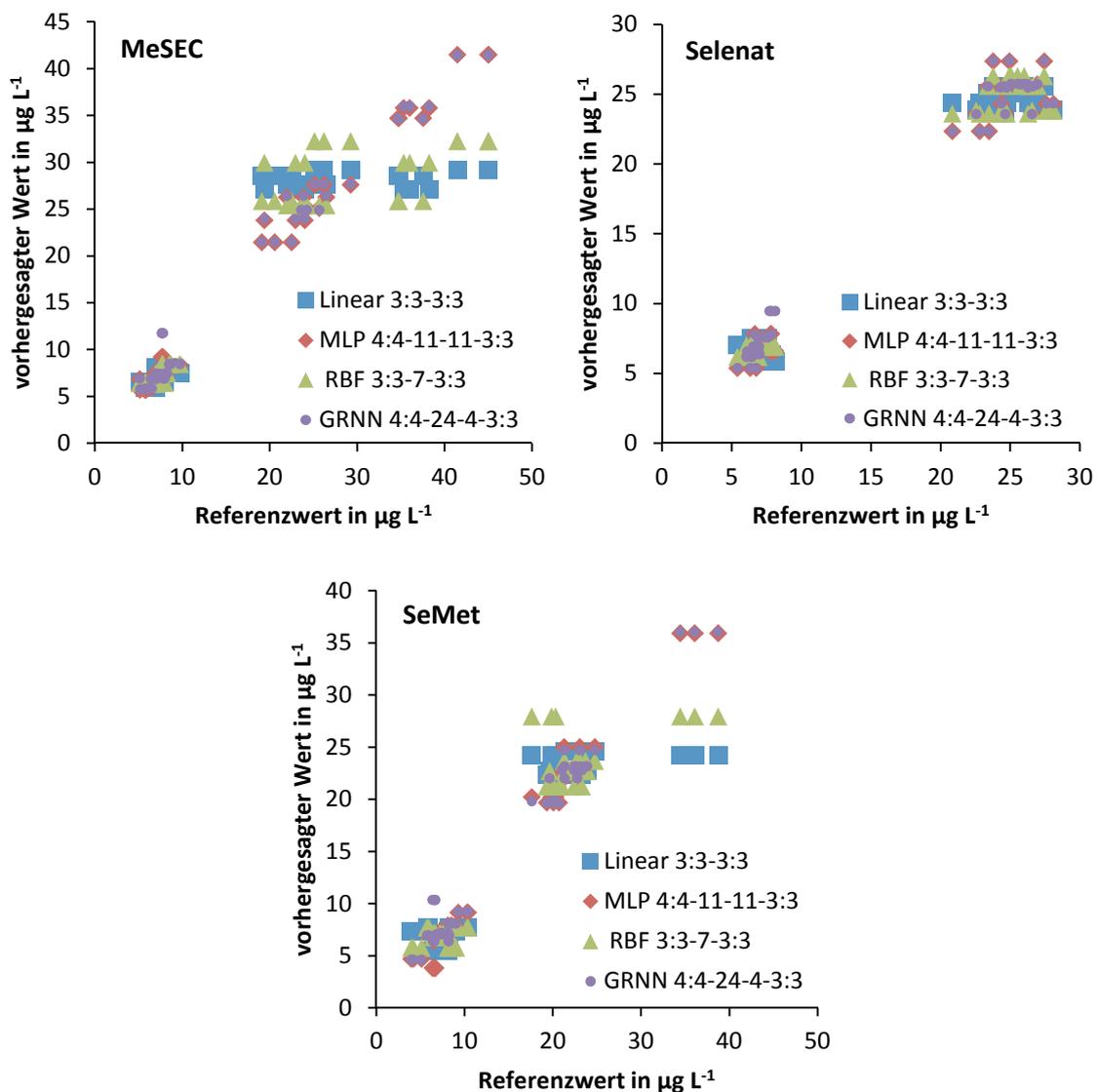


Abbildung 6.5: Darstellung der mit Hilfe der vier ANN vorhergesagten Werte gegen die gemessenen Werte

6.5 Vergleich der verwendeten chemometrischen Methoden

Mit Hilfe chemometrischer Auswerteverfahren konnte gezeigt werden, dass eine Modellierung des Transports der Selenspezies (MeSEC, SeMet und Selenat) und der dabei auftretenden Wechselwirkungen der Selenspezies untereinander möglich ist. Erwartungsgemäß gibt es Methoden, die mehr oder weniger gut geeignet sind. Eine zusammenfassende Darstellung der wesentlichen Ergebnisse aller angewendeten Methoden ist in Tabelle 6.7 zu finden.

Tabelle 6.7: Übersicht der Maßzahlen zur Vorhersagegüte der angewendeten chemometrischen Methoden

	r	r ²	RMSEP in µg L ⁻¹	RMSEP _{rel} in %
MeSEC				
Regression mit WE	0,996	0,991	1,17	6,4
Regression ohne WE	0,903	0,816	5,33	29,3
PLS*	0,903	0,816	5,33	29,3
ANN [†]	0,992	0,984	1,60	8,8
Selenat				
Regression mit WE	0,995	0,991	0,90	5,6
Regression ohne WE	0,990	0,980	1,29	8,1
PLS*	0,990	0,980	1,29	8,1
ANN [†]	0,990	0,981	1,30	8,1
SeMet				
Regression mit WE	0,995	0,990	0,92	6,0
Regression ohne WE	0,918	0,842	3,57	23,3
PLS*	0,918	0,842	3,57	23,3
ANN [†]	0,990	0,980	1,34	8,7

*zwischen PLS1 und PLS2 keine signifikanten Unterschiede

[†]MLP 4:4-11-11-3:3

Die multiple lineare Regression unter Berücksichtigung von WE stellt die geeignetste Methode dar, um ein Vorhersagemodell zur Bestimmung der serosalen Selenspezieskonzentrationen zu ermitteln. Im Vergleich mit der MLR bzw. PLS werden deutlich bessere Korrelationskoeffizienten für MeSEC und SeMet erzielt. Die Anwendung der ANN, insbesondere des Netztyps MLP, führt ebenfalls zu besseren Ergebnissen für MeSEC und SeMet. Ursache hierfür ist die problembezogene Lernfähigkeit und auch das Auffinden nichtlinearer Zusammenhänge durch die entsprechenden neuronalen Netze. MLR und PLS sind nicht in der Lage, WE separat zu beschreiben. Die RMSEP-Werte als Maß für zukünftige Prognosen bestätigen diese Beobachtungen. Die Unterschiede

zwischen den Methoden lassen darauf schließen, dass der Transport der beiden organischen Spezies durch WE der Spezies untereinander beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu unterliegen die Maßzahlen für die Vorhersage der serosalen Selenatkonzentrationen nicht so großen Schwankungen. Das deutet wiederum auf einen Transport hin, der kaum von den anderen Selenspezies beeinflusst wird.

Die wahrscheinlichste Ursache, weshalb nahezu identische Ergebnisse von MLR und PLS1 bzw. PLS2 erhalten werden, ist das Nichtvorhandensein von Kollinearitäten zwischen den x - und y -Variablen. Die PLS wird eben gerade dann verwendet, wenn vermutlich kollineare Variablen vorliegen.

Eine weitergehende Überprüfung der angewendeten Regressionsmodelle ist mit einer externen Validierung möglich. Vor allem für die ANN sind weitere Daten für die Testphase zu empfehlen. Entsprechende Anwendungen waren aufgrund des begrenzten Zeitraumes und der begrenzten finanziellen Mittel im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Daten der zweiten und dritten Probennahme entsprechen den Ergebnissen der ersten Probennahme. Auf eine separate Darstellung wird deshalb verzichtet.

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Transportverhalten von vier für die Humanernährung relevanten Selenspezies – Selenit, Selenat, Selenomethionin (SeMet) und Methylselenocystein (MeSEC) – untersucht. Der Fokus lag dabei auf der möglichen gegenseitigen Beeinflussung der Selenspezies untereinander bei Transportvorgängen in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie Caco-2. Es handelt sich dabei um eine weit verbreitete und anerkannte Zelllinie zur Untersuchung intestinaler Transportvorgänge.

Für die Messung der Selenspezies wurde auf Basis der HPLC-ICP-DRC-MS eine analytische Methode entwickelt und validiert. Als chromatografisches Trennprinzip für die Aufgabenstellung erwies sich die Anionenaustausch-Chromatografie am geeignetsten. Die beste Trennleistung konnte mit einem salpetersauren Eluenten (50 mM HNO₃, 1 Vol.-% MeOH, pH = 1,2) und isokratischer Arbeitsweise erzielt werden. Die Analysenzeit für Selenit, Selenat, SeMet und MeSEC beträgt nur 7 min. Durch die Verwendung der dynamischen Reaktionszelle (DRC) konnte das Grundrauschen, das im Standardmodus durch die ArAr-Interferenz hervorgerufen wird, um ein Vielfaches gesenkt werden. Die Messung des häufigsten Isotops ⁸⁰Se wird dadurch erst möglich. Aus der damit erzielten Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses resultieren Nachweisgrenzen von 0,16 µg L⁻¹ je Spezies und Bestimmungsgrenzen von 0,47 µg L⁻¹ je Spezies. Dadurch wird bereits eine wichtige Voraussetzung erreicht, auch geringe Selenspezieskonzentrationen bei den Zellexperimenten zu detektieren.

Das HPLC-ICP-DRC-MS-Verfahren wurde zusätzlich hinsichtlich der Verfahrenskenn-daten Linearität, Präzision, Richtigkeit und Robustheit validiert. Der Linearitätstest umfasste den Arbeitsbereich der Kalibration von 5 bis 100 µg L⁻¹ und als Ergebnis die Anwendung des linearen Kalibriermodells. Die Präzision unter Wiederholbedingungen wurde für die Peakhöhen und Peakflächen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine Auswertung über die Peakflächen aufgrund der geringeren Schwankungen von 2,3 bis 2,7 % vorteilhaft ist. Untersuchungen zur Variation der Retentionszeiten geben Auskunft über die Kurzzeit- und Langzeitstabilität des entwickelten Verfahrens. Die *RSD*-Werte der Kurzzeitstabilität mit < 1 % sowie die *RSD*-Werte der Retentionszeiten über einen Zeitraum von vier Wochen mit ≤ 2,5 % belegen die sehr gute Stabilität des optimierten Analysenverfahrens. Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde das einzige kommerziell verfügbare zertifizierte Referenzmaterial SELM-1 (selenangereicherte Hefe) mittels enzymatischer Hydrolyse extrahiert und anschließend gemessen. Mit der Methode der

HPLC-ICP-DRC-MS konnten nur etwa 70 % des zertifizierten SeMet-Gehaltes wieder gefunden werden. Die Bestimmung des Gesamtselengehaltes im gleichen Extrakt mit der ICP-DRC-MS bestätigte den zertifizierten Wert. Die Ursache für den Minderbefund kann ein Matrixeinfluss sein. Durch Dotierungsexperimente konnte allerdings ein Matrixeinfluss ausgeschlossen werden. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Robustheit des Analysenverfahrens wurde ein unbekannter Peak sowie eine zeitabhängige Konzentrationsabnahme von MeSEC festgestellt. Daraus resultiert die Notwendigkeit einer möglichst zeitnahen Messung der Proben.

Die entwickelte HPLC-ICP-DRC-MS-Methode ist ein einfaches, leistungsfähiges und ökonomisches Analysenverfahren zur Bestimmung von vier ernährungsphysiologisch wichtigen Selenspezies. Die kurze Analysenzeit von 7 min ermöglicht einen hohen Probendurchsatz und lässt einen perspektivischen Einsatz dieser Methode der Selenspeziation auch für Fragestellungen der Routineanalytik möglich erscheinen.

Vor den Modellexperimenten zum Transport der Selenspezies erfolgte die Untersuchung von zwei unterschiedlichen Membranmaterialien der verwendeten Snapwell®-Einsätze. Dabei erwiesen sich die Polycarbonat-Membranen mit einer etwa doppelt so hohen Durchlässigkeit der Selenspezies gegenüber den Polyethylenterephthalat-Membranen als besser geeignet. Durch die Verwendung der Ussing-Kammer-Technik war eine kontinuierliche Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) als Maß für die Zellmonolayerintegrität möglich. Weiterhin war eine Durchmischung beider Kammerhälften während des gesamten Versuches durch die Begasung mit Carbogen gegeben.

Die Transportexperimente umfassten die Applikation von Einzelspeziesstandards und Selenspeziesmischungen in den Konzentrationsstufen 100 und 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies. Es konnte bei allen durchgeführten Versuchsreihen nach 120 min kein messbarer Selenit-Transport von der apikalen zur serosalen Seite festgestellt werden. Auf Grundlage der Einzelversuche ist eine Unterscheidung zwischen den beiden organischen Spezies und Selenat möglich, wobei letztgenannte Spezies signifikant schlechter transportiert wird. Darüber hinaus wird der Transport von MeSEC und SeMet durch die Caco-2-Zellmonolayer mit zunehmender Spezieskonzentration beeinträchtigt. Die Applikation von Selenspeziesmischungen führt zu einem veränderten Transportverhalten der untersuchten Verbindungen im Vergleich zu den Einzelapplikationen. Die Transportrate von SeMet verringerte sich in Gegenwart der anderen Spezies um 28 % (Versuch mit 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) bzw. um 22 % (Versuch mit 400 $\mu\text{g L}^{-1}$). Ein ähnlicher, aber weniger stark ausgeprägter Verlauf

wurde für MeSEC erhalten. Das Transportverhalten von Selenat unterscheidet sich deutlich von den organischen Spezies, da die Mischungsversuche mit $100 \mu\text{g L}^{-1}$ je Spezies zu einem Anstieg der Transportrate um 34 % führten. Die Einordnung der für Selenat, SeMet und MeSEC berechneten P_{app} deutet auf ein hohes Absorptionspotenzial im Bereich von 70-100 % hin. Eine Speziesabhängigkeit wird ebenfalls für die Akkumulation der vier untersuchten Selenverbindungen durch die Caco-2-Zellen beobachtet. Dabei werden die Spezies in der Reihenfolge SeMet > MeSEC > Selenit > Selenat unterschiedlich stark aufgenommen. Durch die Akkumulationsversuche konnte ein geringer Selenit-Transport festgestellt werden.

Auf der Grundlage des erstellten 2^4 -Faktorenplans konnten mit Hilfe der Regressionsanalyse Haupteffekte (HE) und Wechselwirkungseffekte (WE) bestimmt werden. Die größten HE sind dabei durch die betrachtete Spezies selbst begründet und führten, wie erwartet, bei einer Konzentrationserhöhung auf der mukosalen Seite auch zu einer Konzentrationserhöhung auf der serosalen Seite. Weiterhin beeinflussen sich die beiden organischen Formen MeSEC und SeMet gegenseitig, aber gegensätzlich. So wirkt SeMet negativ auf den MeSEC-Transport und MeSEC positiv auf den SeMet-Transport. Das Selenit beeinträchtigt nur den Transport der beiden organischen Spezies, aber nicht den des Selenats. Die beiden organischen Verbindungen sind durch eine Vielzahl von signifikanten WE gekennzeichnet. Der Transport von MeSEC und SeMet wird somit sehr stark von den entsprechenden drei anderen Selenspezies beeinflusst. Das Transportverhalten von Selenat ist hingegen nur durch einen signifikanten HE und WE gekennzeichnet. Somit hat das Vorhandensein der anderen Selenspezies kaum Auswirkungen auf den Transport von Selenat.

Es wurden Vorhersagemodelle berechnet, mit denen die serosalen Selenspezieskonzentrationen bestimmt werden können. Dabei zeigte sich die Regressionsanalyse unter Berücksichtigung von WE als das am besten geeignete Modell gegenüber der MLR, PLS und ANN. Die relativen RMSEP-Werte, als Maß zukünftiger Prognosen, liegen für MeSEC bei 6,4 %, für Selenat bei 5,6 % und für SeMet bei 6,0 %. Die Anwendung des künstlichen neuronalen Netzes MLP 4:4-11-11-3:3 führte ebenfalls zu guten Ergebnissen.

Die Experimente zum Transportverhalten der Spezies mit Einzelspeziesstandards und Selenspeziesmischungen lieferten eine erste Aussage über die gegenseitige Beeinflussung der vier untersuchten Selenspezies. Durch die Auswertung eines vollständigen 2^4 -Faktorenplans konnten diese Wechselwirkungen bestätigt und auch spezifiziert werden. Zukünftige Untersuchungen, die sich mit dem Transport bzw. der Bioverfügbarkeit von

Selenspezies beschäftigen, sollten mögliche Wechselwirkungseffekte der Spezies untereinander berücksichtigen.

Literaturverzeichnis

- [1] Pedrero, Z., Madrid, Y.: Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review, *Anal. Chim. Acta* 634, 135-152, 2009
- [2] Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R.: Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304-1323, 2006
- [3] Finley, J. W.: Bioavailability of selenium from foods, *Nutr. Rev.* 64, 146-151, 2006
- [4] Moreda-Pineiro, J., Moreda-Pineiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P., Prada-Rodríguez, D.: *In-vivo* and *in-vitro* testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples, *Trends Anal. Chem.* 30, 324-345, 2011
- [5] Leblondel, G., Mauras, Y., Cailleux, A., Allain, P.: Transport measurements across Caco-2 monolayers of different organic and inorganic selenium, *Biol. Trace Elem. Res.* 83, 191-206, 2001
- [6] Gammelgaard, B., Rasmussen, L. H., Gabel-Jensen, C., Steffansen, B.: Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by *in vitro* flux and biotransformation studies in Caco-2 cells and ICP-MS detection, *Biol. Trace Elem. Res.* 145, 248-256, 2012
- [7] Harrington, C. F., Clough, R., Drennan-Harris, L. R., Hill, S. J., Tyson, J. F.: Atomic spectrometry update. Elemental speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 1561-1595, 2011
- [8] Hollemann, A. F., Wiberg, E.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101., verbesserte und stark erweiterte Auflage, de Gruyter, Berlin, New York, 1995
- [9] Reilly, C.: *Selenium in Food and Health*, Second edition, Springer, New York, 2006
- [10] Fleming, G. A.: Selenium in Irish soils and plants, *Soil Sci.* 94, 28-35, 1962
- [11] Schloske, L.: Untersuchungen über die Art und Höhe des Seleneintrages in Milch- und Getreideprodukten durch Selen-Flüssig-Blattapplikation, Dissertation, Bonn, 2005

-
- [12] Heinzow, B., Schwenk, M.: Selen in der Umweltmedizin, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 12, 225-240, 2007
- [13] Li, H.-F., McGrath, S. P., Zhao, F.-J.: Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite, *New Phytol.* 178, 92-102, 2008
- [14] Ximenez-Embun, P., Alonso, I., Madrid-Albarran, Y., Camara, C.: Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants, *J. Agric. Food Chem.* 52, 832-838, 2004
- [15] Schrauzer, G. N.: Nutritional selenium supplements: Product types, quality, and safety, *J. Am. Coll. Nutr.* 20. 1-4, 2001
- [16] Rayman, M. P.: The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?, *Br. J. Nutr.* 92, 557-573, 2004
- [17] Ip, C., Birringer, M., Block, E., Kotrebai, M., Tyson, J. F., Uden, P. C.: Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention, *J. Agric. Food Chem.* 48, 2062-2070, 2000
- [18] Moreno, P., Quijano, M. A., Gutierrez, A. M., Perez-Conde, M. C., Camara, C.: Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 524, 315-327, 2004
- [19] Whanger, P.D.: Selenocompounds in plants and animals and their biological significance, *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 223-232, 2002
- [20] Kannamkumarath, S. S., Wróbel, K., Wróbel, K., Vonderheide, A., Caruso, J. A.: HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut, *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 454-460, 2002
- [21] Cuderman, P., Kreft, I., Germ, M., Kovacevic, M, Stibilj, V: Selenium species in selenium-enriched and drought-exposed potatoes, *J. Agric. Food Chem.* 56, 9114-9120, 2008
- [22] Finley, J. W., Ip, C., Lisk, D. J., Davis, C. D., Hintze, K. J., Whanger, P. D.: Cancer-protective properties of high-selenium broccoli, *J. Agric. Food Chem.* 49, 2679-2683, 2001

-
- [23] Kotrebai, M., Birringer, M., Tyson, J. F., Block, E., Uden, P. C.: Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents, *Analyst* 125, 71-78, 2000
- [24] Kápolna, E., Shah, M., Caruso, J. A., Fodor, P.: Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS, *Food Chem.* 101, 1398-1406, 2007
- [25] Diaz Huerta, V., Fernández Sánchez, M. L., Sanz-Medel, A.: Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 644-648, 2004
- [26] Crews, H. M., Clarke, P. A., Lewis, D. J., Owen, L. M., Strutt, P. R., Izquierdo, A., Investigation of selenium speciation in *in vitro* gastrointestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 1177-1182, 1996
- [27] Cabanero, A. I., Carvalho, C., Madrid, Y., Batoreu, C., Camara, C.: Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal, *Biol. Trace Elem. Res.* 103, 17-35, 2005
- [28] Bierla, K., Dernovics, M., Vacchina, V., Szpunar, J., Bertin, G., Lobinski, R.: Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP-MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1789-1798, 2008
- [29] Schwarz, K., Foltz, C. M.: Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration, *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 3292-3293, 1957
- [30] Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G.: Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 179, 588-590, 1973
- [31] Sicherheitsdatenblatt Natriumselenit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, überarbeitet am 29.03.2012
- [32] Sicherheitsdatenblatt Natriumselenat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, überarbeitet am 23.12.2011

- [33] Sicherheitsdatenblatt Se-(Methyl)selenocysteine hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, überarbeitet am 23.12.2011
- [34] Sicherheitsdatenblatt Seleno-L-methionine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, überarbeitet am 09.05.2011
- [35] Elmadfa, I., Leitzmann, C.: Ernährung des Menschen, 3. Auflage, UTB für Wissenschaft, Stuttgart, 1998
- [36] Barceloux, D. G.: Selenium, Clin. Toxicol. 37, 145-172, 1999
- [37] Rayman, M. P., Goenaga Infante, H., Sargent, M.: Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation, Br. J. Nutr. 100, 238-253, 2008
- [38] WHO: Chapter 12 Chemical fact sheets, Guidelines for drinking-water quality, 413-415, http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_ch12.pdf (abgerufen am 08.06.2012)
- [39] WHO: Guidelines for drinking-water quality, third edition incorporating the first and second addenda, Volume 1 Recommendations, Geneva, 2008, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf (abgerufen am 08.06.12)
- [40] Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte der Verwendung von Mineralstoffen und Vitaminen in Lebensmitteln, Teil I: Mineralstoffe (einschließlich Spurenelemente), Berlin, 2002, http://www.bfr.bund.de/cm/343/verwendung_von_mineralstoffen_und_vitaminen_in_lebensmitteln.pdf (abgerufen am 08.06.12)
- [41] Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Selen, <http://www.dge.de/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=4&page=9> (abgerufen am 08.06.12)
- [42] European Commission – Scientific Committee of Food: Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of selenium, Brüssel, 2000, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80g_en.pdf (abgerufen am 08.06.12)
- [43] Navarro-Alarcón, M., López-Martínez, M. C.: Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases, Sci. Total Environ. 249, 347-371, 2000

-
- [44] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological profile for selenium, 2003, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.pdf> (abgerufen am 08.06.12)
- [45] Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., Hurst, R.: Selenium bioavailability: Current knowledge and future research requirements, *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1484S-1491S, 2012
- [46] Brielmeier, M., Schmidt, J.: Analyse der Funktion von Selenoproteinen, *Jahresbericht der GSF*, 57-62, 2003
- [47] Behne, D., Kyriakopoulos, A.: Mammalian selenium-containing proteins, *Annu. Rev. Nutr.* 21, 453-473, 2001
- [48] Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D.: The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomed. Pharmacother.* 57, 134-144, 2003
- [49] Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohé, L., Sendtner, M., Köhrle, J.: Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem. J.* 370, 397-402, 2003
- [50] Hill, K. E., Zhou, J., Austin, L. M., Motley, A. K., Ham, A.-J., Olson, G. E., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., Burk, R. F.: The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium, *J. Biol. Chem.* 282, 10972-10980, 2007
- [51] Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C.: Selenium in food and the human body: A review, *Sci. Total Environ.* 400, 115-141, 2008
- [52] Varo, P., Alfthan, G., Ekholm, P., Aro, A., Koivistoinen, P.: Selenium intake and serum selenium in Finland: effects of soil fertilization with selenium, *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 324-329, 1988
- [53] Combs, G. F.: Selenium in global food systems, *Br. J. Nutr.* 85, 517-547, 2001
- [54] Pedrero, Z., Madrid, Y., Cámara, C.: Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium, *J. Agric. Food Chem.* 54, 2412-2417, 2006
- [55] Kápolna, E., Fodor, P.: Speciation analysis of selenium enriched green onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS, *Microchem. J.* 84, 56-62, 2006

- [56] Wróbel, K., Wróbel, K., Kannamkumarath, S. S., Caruso, J. A., Wysocka, I. A., Bulska, E., Swiatek, J., Wierzbicka, M.: HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves – a potential dietary source of Se-methylselenocysteine, *Food Chem.* 86, 617-623, 2004
- [57] Dumont, E., Ogra, Y., Vanhaecke, F., Suzuki, K. T., Cornelis, R.: Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS): a powerful combination for selenium speciation in garlic (*Allium sativum*), *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1196-1206, 2006
- [58] Roberge, M. T., Borgerding, A. J., Finley, J. W.: Speciation of selenium compounds from high selenium broccoli is affected by the extracting solution, *J. Agric. Food Chem.* 51, 4191-4197, 2003
- [59] Alzate, A., Canas, B., Pérez-Munguía, S., Hernández-Mendoza, H., Pérez-Conde, C., Gutiérrez, A. M., Cámara, C.: Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS, *J. Agric. Food Chem.* 55, 9776-9783, 2007
- [60] Brade, W., Flachowsky, G., Schrader, L.: Legehuhnzucht und Eierzeugung – Empfehlungen für die Praxis, *Landbauforschung, Sonderheft 322*, 2008
- [61] Richtlinie 2002/46/EG, vom 10. Juni 2002
- [62] Thomson, C. D.: Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 391-402, 2004
- [63] Fox, T. E., van den Heuvel, E. G. H. M., Atherton, C. A., Dainty, J. R., Lewis, D. J., Langford, N. J., Crews, H. M., Luten, J. B., Lorentzen, M., Sieling, F. W., van Aken-Schneyder, P., Hoek, M., Kotterman, M. J. J., van Dael, P., Fairweather-Tait, S. J.: Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in human using stable isotopes, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 343-349, 2004
- [64] Thiry, C., Ruttens, A., de Temmerman, L., Schneider, Y.-J., Pussemier, L.: Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food, *Food. Chem.* 130, 767-784, 2012
- [65] Basu, T. K., Donaldson, D.: Intestinal absorption in health and disease: micronutrients, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17, 957-979, 2003

-
- [66] Dumont, E., de Pauw, L., Vanhaecke, F., Cornelis, R.: Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack?, *Food Chem.* 95, 684-692, 2006
- [67] Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R.: Hyphenated techniques for speciation of Se in in vitro gastrointestinal digests of *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 504-511, 2004
- [68] Wolfram, S., Anliker, E., Scharrer, E.: Uptake of selenate and selenite by isolated intestinal brush border membrane vesicles from pig, sheep, and rat, *Biol. Trace Elem. Res.* 10, 293-306, 1986
- [69] Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F. J., Polidori, M. C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Vina-Ribes, J., Williamson, G., Astley, S. B.: Bioavailability and metabolism, *Mol. Aspects Med.* 23, 39-100, 2002
- [70] Araie, H., Sakamoto, K., Suzuki, I., Shiraiwa, Y.: Characterization of the selenite uptake mechanism in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* (haptophyta), *Plant Cell Physiol.* 52, 1204-1210, 2011
- [71] Mc Dermott, J. R., Rosen, B. P., Liu, Z.: Jen1p: A high affinity selenite transporter in yeast, *Mol. Biol. Cell* 21, 3934-3941, 2010
- [72] Schrauzer, G. N.: Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity, *J. Nutr.* 130, 1653-1656, 2000
- [73] Wolfram, S., Berger, B., Grenacher, B., Scharrer, E.: Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs, *J. Nutr.* 119, 706-712, 1989
- [74] Nickel, A., Kottra, G., Schmidt, G., Danier, J., Hofmann, T., Daniel, H.: Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters, *Chem.-Biol. Interact.* 177, 234-241, 2009
- [75] Oster, O., Schmiedel, G., Prellwitz, W.: The organ distribution of selenium in German adults, *Biol. Trace Elem. Res.* 15, 23-45, 1988
- [76] Schuchardt, J. P., Hahn, A.: Die Bedeutung von Eisen, Zink und Selen in der Ernährung des Menschen, *Ernährungs Umschau* 57, 538-549, 2010

-
- [77] Fogh, J., Fogh, J. M., Orfeo, T.: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing in nude mice, *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221-226, 1977
- [78] Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Desjeux, J.-F.: Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters, *Am. J. Physiol.* 247, C260-C267, 1984
- [79] Hidalgo, I. J., Raub, T. J., Borchardt, T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology* 96, 736-749, 1989
- [80] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Molecular Biology of the Cell*, Fifth edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, 2008
- [81] Delie, F., Rubas, W.: A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 14, 221-286, 1997
- [82] Sambuy, Y., de Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., Zucco, F.: The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, *Cell. Biol. Toxicol.* 21, 1-26, 2005
- [83] Artursson, P.: Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells, *J. Pharm. Sci.* 79, 476-482, 1990
- [84] Rubas, W., Jezyk, N., Grass, G. M.: Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption, *Pharm. Res.* 10, 113-118, 1993
- [85] Ekmekcioglu, C.: A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems, *Food Chem.* 76, 225-230, 2002
- [86] Tallkvist, J., Bowlus, C. L., Lönnerdal, B.: Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cell to iron treatment, *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 770-775, 2000
- [87] Blais, A., Aymard, P., Lacour, B.: Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers, *Pflügers Arch. – Eur J. Physiol.* 434, 300-305, 1997

-
- [88] Vaidyanathan, J., Walle, T.: Transport and Metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2, *Pharm. Res.* 18, 1420-1425, 2001
- [89] Hamilton, K. L.: Ussings's "little chamber": 60 years+ old and counting, *Front Physiol.* 2, 1-3, 2011, DOI: 10.3389/fphys.2011.00006
- [90] Palmer, L. G., Andersen, O. S.: The two-membrane model of epithelial transport: Koefoed-Johnsen and Ussing (1958), *J. Gen. Physiol.* 132, 607-612, 2008
- [91] Li, H., Sheppard, D. N., Hug, M. J.: Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber, *J. Cyst. Fibros* 3, 123-126, 2004
- [92] Schultz, S. G., Zalusky, R.: Ion transport in isolated rabbit ileum: I. Short-circuit current and Na fluxes, *J. Gen. Physiol.* 47, 567-584, 1964
- [93] Gardner, C. R.: Potential and limitations of drug targeting: An overview, *Biomaterials* 6, 153-160, 1985
- [94] Rousset, M.: The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* 68, 1035-1040, 1986
- [95] Hassan, H. A., Cheng, M., Aronson, P. S.: Cholinergic signaling inhibits oxalate transport by human intestinal T84 cell, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C46-C58, 2012
- [96] Bergmann, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Melcher, R., Richling, E.: The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line, *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1211-1225, 2009
- [97] Grass, G. M., Sweetana, S. A.: *In vitro* measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell, *Pharm. Res.* 5, 372-376, 1988
- [98] Hidalgo, I. J., Borchardt, R. T.: Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1028, 25-30, 1990
- [99] Hidalgo, I. J., Hillgren, K. M., Grass, G. M., Borchardt, R. T.: Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus, *Pharm. Res.* 8, 222-227, 1991

-
- [100] Schaar, S., Schubert, R., Hänel, I., Leiterer, M., Jahreis, G.: Caco-2 cells on Snapwell[®] membranes and the Ussing chamber system as a model for cadmium transport *in vitro*, *Instrum. Sci. Technol.* 32, 627-639, 2004
- [101] Steinert, R. E., Ditscheid, B., Netzel, M., Jahreis, G.: Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in Ussing type chambers, *J. Agric. Food Chem.* 56, 4995-5001, 2008
- [102] Ponce de León, C. A., Montes-Bayón, M., Caruso, J. A.: Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 974, 1-21, 2002
- [103] Feldmann, J.: What can the different current-detection methods offer for element speciation?, *Trend Anal. Chem.* 24, 228-242, 2005
- [104] Skoog, D. A., Leary, J. J.: *Instrumentelle Analytik: Grundlagen – Geräte – Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996
- [105] Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 10. Vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009
- [106] Otto, M.: *Analytische Chemie*, Vierte, überarbeitete und ergänzte Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011
- [107] Camman, K.: *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2001
- [108] Montes-Bayón, M., DeNicola, K., Caruso, J. A.: Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1000, 457-476, 2003
- [109] Boorn, A. W., Browner, R. F.: Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Chem.* 54, 1402-1410, 1982
- [110] Sutton, K. L., Caruso, J. A.: Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 856, 243-258, 1999
- [111] Hearn, M. T. W., Hancock, W. S.: Ion pair partition reversed phase HPLC, *Trends Biochem. Sci.* 4, N58-N62, 1979
- [112] Szpunar, J.: Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques, *Analyst* 125, 963-988, 2000

-
- [113] Weiß, J.: Ionenchromatographie, Dritte, völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2001
- [114] Dionex, IonPac[®] AS7 Anion-Exchange Column Data Sheet, 2006, <http://www.dionex.com/en-us/products/columns/ic-rfic/specialty-packed/ionpac-as7/lp-73274.html> (abgerufen am 04.07.2012)
- [115] Browner, R. F., Born, A. W.: The Achilles' heel of atomic spectroscopy?, *Anal. Chem.* 56, 786A-798A, 1984
- [116] May, T. W., Wiedmeyer, R. H.: A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.* 19, 150-155, 1998
- [117] Leiterer, M., Einax, J.W., Löser, C., Vetter, A.: Trace analysis of metals in plant samples with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 359, 423-426, 1997
- [118] Tanner, S. D.: Characterization of ionization and matrix suppression in inductively coupled "cold" plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 905-921, 1995
- [119] Dufailly, V., Noel, L., Guerin, T.: Determination of chromium, iron and selenium in foodstuffs of animal origin by collision cell technology, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after closed vessel microwave digestion, *Anal. Chim. Acta* 565, 214-221, 2006
- [120] Kalinitchenko, I., Wan, X. D., Sturman, B.: Simple and effective control of spectral overlap interferences in ICP-MS, *Spectroscopy special issue*, 38-46, 2008
- [121] Sloth, J. J., Larsen, E. H., Bügel, S. H., Moesgaard, S.: Determination of total selenium and ⁷⁷Se in isotopically enriched human samples by ICP-dynamic reaction cell-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 317-322, 2003
- [122] Chen, K. L., Jiang, S. H.: Determination of calcium, iron and zinc in milk powder by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 470, 223-228, 2002
- [123] D'Illo, S., Violante, N., Di Gregorio, M., Senofonte, O., Petrucci, F.: Simultaneous quantification of 17 trace elements in blood by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system, *Anal. Chim. Acta* 579, 202-208, 2006

-
- [124] D'Illo, S., Violante, S., Di Gregorio, M., Petrucci, F., Senofonte, O.: Determination of trace elements in serum by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. Developing of a method with a desolvating system nebulizer, *Anal. Chim. Acta* 573-574, 432-438, 2006
- [125] Neubauer, K., Völlkopf, U.: The benefits of a dynamic reaction cell to remove carbon and chloride-based spectral interferences by ICP-MS, *Atom. Spectrosc.* 20, 64-68, 1999
- [126] Hattendorf, G., Günther, D.: Strategies for method development for an inductively coupled plasma mass spectrometer with bandpass reaction cell. Approaches with different reaction gases for the determination of selenium, *Spectrochim. Acta Part B* 58, 1-13, 2003
- [127] Pick, D., Leiterer, M., Einax J. W.: Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS, *Microchim. J.* 95, 315-319, 2010
- [128] Brätter, P., Navarro Blasco, I., Negretti de Brätter, V. E., Raab, A.: Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition, *Analyst* 123, 821-826, 1998
- [129] Daun, C., Lundh, T., Önning, G., Akesson, B.: Separation of soluble selenium compounds in muscle from seven animal species using size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 129-134, 2004
- [130] Mounicou, S., Meija, J., Caruso, J.: Preliminary studies on selenium-containing proteins in *Brassica juncea* by size exclusion chromatography and fast protein liquid chromatography coupled to ICP-MS, *Analyst* 129, 116-123, 2004
- [131] Bird, S. M., Uden, P. C., Tyson, J. F., Block, E., Denoyer, E.: Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 785-788, 1997
- [132] Zheng, J., Shibata, Y., Furuta, N.: Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pairing reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 59, 27-36, 2003

- [133] Marchante-Gayón, J. M., Thomas, C., Feldmann, I., Jakubowski, N.: Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 1093-1102, 2000
- [134] Larsen, E. H., Sloth, J., Hansen, M., Moesgaard, S.: Selenium speciation and isotope composition in ⁷⁷Se-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 310-316, 2008
- [135] Michalke, B., Witte, H., Schramel, P.: Developments of a rugged method for selenium speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 593-597, 2001
- [136] Xu, M., Yang, L., Wang, Q.: Quantification of selenium-tagged proteins in human plasma using species-unspecific isotope dilution ICP-DRC-qMS coupled on-line with anion exchange chromatography, *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 1545-1549, 2008
- [137] Michalke, B.: Element speciation definition, analytical methodology, and some examples, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 122-139, 2003
- [138] Michalke, B.: The coupling of LC to ICP-MS in element speciation – Part II: recent trends in application, *Trends Anal. Chem.* 21, 154-165, 2002
- [139] Wang, R.-Y., Hsu, Y.-L., Chang, L.-F., Jiang, S.-J.: Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 590, 239-244, 2007
- [140] Kuo, C.-Y., Jiang, S.-J.: Determination of selenium and tellurium compounds in biological samples by ion chromatography dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1181, 60-66, 2008
- [141] Schlegel, D., Mattusch, J., Dittrich, K.: Speciation of arsenic and selenium compounds by ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry detection using the hydride technique, *J. Chromatogr. A* 683, 261-267, 1994
- [142] Zheng, J., Kosmus, W.: Retention study of inorganic and organic selenium compounds on a silica-based reversed phase column with mixed ion-pairing reagents, *Chromatographia* 51, 338-344, 2000

-
- [143] Das, A. K., Chakraborty, R.: Electrothermal atomic absorption spectrometry in the study of metal ion speciation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 1-17, 1997
- [144] Kölbl, G., Kalcher, K., Irgolic, K. J.: Ion chromatographic determination of selenite and selenate with selenium-specific detection by flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 284, 301-310, 1993
- [145] Dietz, C., Sanz Landaluze, J., Ximénez-Embún, P., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C.: SPME-multicapillary GC coupled to different detection systems and applied to volatile organo-selenium speciation in yeast, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 260-266, 2004
- [146] Dietz, C., Sanz Landaluze, J., Ximénez-Embún, P., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C.: Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction-moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta* 501, 157-167, 2004
- [147] Meija, J., Montes-Bayón, M., Le Duc, D. L., Terry, N., Caruso, J. A.: Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction, *Anal. Chem.* 74, 5837-5844, 2002
- [148] Sanz Landaluze, J., Dietz, C., Madrid, Y., Cámara, C.: Volatile organoselenium monitoring in production and gastric digestion processes of selenized yeast by solid-phase microextraction-multicapillary gas chromatography coupled microwave-induced plasma atomic emission spectrometry, *Appl. Organometal. Chem.* 18, 606-613, 2004
- [149] Duan, J., Li, X., Yu, C., Hu, B.: Headspace stir bar sorptive extraction combined with GC-ICP-MS for the speciation of dimethylselenide and dimethyldiselenide in biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 297-303, 2009
- [150] Morales, R., López-Sánchez, J. F., Rubio, R.: Selenium speciation by capillary electrophoresis, *Trends Anal. Chem.* 27, 183-189, 2008

-
- [151] Pedrero, Z., Madrid, Y., Cámara, C., Schram, E., Luten, J. B., Feldmann, I., Waentig, L., Hayen, H., Jakubowski, N.: Screening of selenium containing proteins in the Tris-buffer soluble fraction of African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets by laser ablation-ICP-MS after SDS-PAGE and electroblotting onto membranes, J. Anal. At. Spectrom. 24, 775-784, 2009
- [152] Scheffler, E., Statistische Versuchsplanung und –auswertung, Eine Einführung für Praktiker, 3. Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Stuttgart, 1997
- [153] Einax, J., Baltes, U., Koscielniak, P.: Empirische Modellierung von Interferenzeffekten bei der flammenphotometrischen Kalium- und Natriumbestimmung in der Wasseranalytik, Z. ges. Hyg. 35, 211-214, 1989
- [154] Kleppmann, W.: Taschenbuch Versuchsplanung, Produkte und Prozesse optimieren, 5. überarbeitete Auflage, Carl Hanser Verlag, München, Wien, 2008
- [155] Braun, E., Wagner, A., Fürnschliel, E., Katinger, H., Vorauer-Uhl, K.: Experimental design for *in vitro* skin penetration study of liposomal superoxide dismutase, J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 1187-1197, 2006
- [156] Lim, M., Panoskaltis, N., Ye, H., Mantalaris, A.: Optimization of *in vitro* erythropoiesis from CD34⁺ cord blood cells using design of experiments (DOE), Biochem. Eng. J. 55, 154-161, 2011
- [157] Rudolf, M, Kuhlisch, W.: Biostatistik – Eine Einführung für Biowissenschaftler, Pearson Studium, München, 2008
- [158] Kessler, W.: Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007
- [159] Prikler, S.: Vergleich chemometrischer und chemischer Verfahren zur Signalbehandlung bei elektrochemischen Mehrkomponentenanalysen, Diplomarbeit, Jena, 2007
- [160] Castillo-Garit, J. A., Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., García-Domenech, R.: Estimation of ADME properties in drug discovery: Predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices, J. Pharm. Sci. 97, 1946-1976, 2008

- [161] Sutton, S. C., Rinaldi, M. T. S., McCarthy, J. M., Vukovinsky, K. E.: A statistical method for the determination of absorption rate constant estimated using the rat single pass intestinal perfusion model and multiple linear regression, *J. Pharm. Sci.* 91, 1046-1053, 2002
- [162] Lee, K.-R., Maeng, H.-J., Chae, J.-B., Chong, S., Kim, D.-D., Shim, C.-K., Chung, S.-J.: Lack of primary physicochemical determinant in the direct transport of drugs to the brain after nasal administration in rats: Potential involvement of transporters in the pathway, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 430-441, 2010
- [163] Kokate, A., Li, X., Williams, P. J., Singh, P., Jasti, B. R.: *In silico* prediction of drug permeability across buccal mucosa, *Pharm. Res.* 26, 1130-1139, 2009
- [164] Otto, M.: *Chemometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997
- [165] Danzer, K., Hobert, H., Fischbacher, C., Jagemann, K.-U.: *Chemometrik*, Springer-Verlag, Berlin, 2001
- [166] Nordqvist, A., Nilsson, J., Lindmark, T., Eriksson, A., Garberg, P., Kihlén, M.: A general model for prediction of Caco-2 cell permeability, *QSAR Comb. Sci.* 23, 303-310, 2004
- [167] Seo Jeong Jung, Sun Ok Choi, So Young Um, Joo Il Kim, Hae Young Park Choo, Su Young Choi, Soo Youn Chung: Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure-permeability relationship, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 469-475, 2006
- [168] Degim, Z.: Prediction of permeability coefficients of compounds through Caco-2 cell monolayer using artificial neural network analysis, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31, 935-942, 2005
- [169] Paixao, P., Gouveia, L. F., Morais, J. A. G.: Prediction of the *in vitro* permeability determined in Caco-2 cells by using artificial neural networks, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 107-117, 2010
- [170] Warner Instruments, Guide to Ussing Chamber Systems, Hamden, Connecticut, USA, http://www.harvardapparatus.com/Ussing_Chamber_Systems.pdf (abgerufen am 15.07.2012)

-
- [171] Leclercq, S.: Transportphysiologische Untersuchungen am isolierten Pansenepithel des Schafes unter Berücksichtigung verschiedener osmotischer Gradienten, Dissertation, Berlin, 1999
- [172] Cuderman, P., Stibilj, V.: How critical is the use of commercially available enzymes for selenium speciation?, *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1007-1013, 2009
- [173] Reichenbacher, R., Einax, J. W.: *Challenges in Analytical Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011
- [174] Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H.: *Statistik, Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*, 15. Überarbeitete und wesentlich erweiterte Auflage, Oldenbourg Verlag München, München, 2009
- [175] Zheng, J., Ohata, M., Furuta, N., Kosmus, W.: Speciation of selenium compounds with ion-pair reversed-phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection, *J. Chromatogr. A* 874, 55-64, 2000
- [176] Cuderman, P., Stibilj, V.: Stability of Se species in plant extracts rich in phenolic substances, *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1433-1439, 2010
- [177] Leiterer, M.: *Validierung von Untersuchungsmethoden in der analytischen Praxis*, 2. Auflage, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena, 2007
- [178] Kromidas, S.: *Validierung in der Analytik*, Zweite, überarbeitete Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2011
- [179] Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G.: *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, Zweit, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, WILEY-VCH, Weinheim, 2005
- [180] DIN 38402 Teil51: *Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*, Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, 1986
- [181] DIN 32645: *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze*, Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, 2008
- [182] Gottwald, W.: *Statistik für Anwender*, WILEY-VCH, Weinheim, 2000

-
- [183] Lindemann, T.: Simultane Bestimmung von Arsen-, Selen-, Antimon- und Tellur-Spezies mit einer neu entwickelten HPLC/ICP-MS-Kopplung sowie vergleichende Untersuchungen mittels CE/ICP-MS, Dissertation, Hamburg, 2000
- [184] Mester, Z., Willie, S., Yang, L., Sturgeon, R., Caruso, J. A., Fernández, M. L., Fodor, P., Goldschmidt, R. J., Goenaga-Infante, H., Lobinski, R., Maxwell, P., McSheehy, S., Polatajko, A., Sadi, B. B. M., Sanz-Medel, A., Scriver, C., Szpunar, J., Wahlen, R., Wolf, W.: Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 168-180, 2006
- [185] Perkin Elmer SCIEX: ELAN DRC-e Gerätehandbuch, Ausgabe 2005
- [186] Rubas, W., Cromwell, M. E. M., Shahrokh, Z., Villagran, J., Nguyen, T.-N., Wellton, M., Nguyen, T.-H., Mrsny, R. J.: Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue, *J. Pharm. Sci.* 85, 165-169, 1996
- [187] Zeng, H., Jackson, M. I., Cheng, W.-H., Combs Jr., G. F.: Chemical form of selenium affects its uptake, transport, and glutathione peroxidase activity in the human intestinal Caco-2 cell model, *Biol. Trace Elem. Res.* 143, 1209-1218, 2011
- [188] Artursson, P., Karlsson, J.: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Co.* 175, 880-885, 1991
- [189] Yee, S.: *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – fact or myth, *Pharm. Res.* 14, 763-766, 1997

Anhang 2

Durchlässigkeit der Polycarbonat-Membran ohne Zellmonolayer

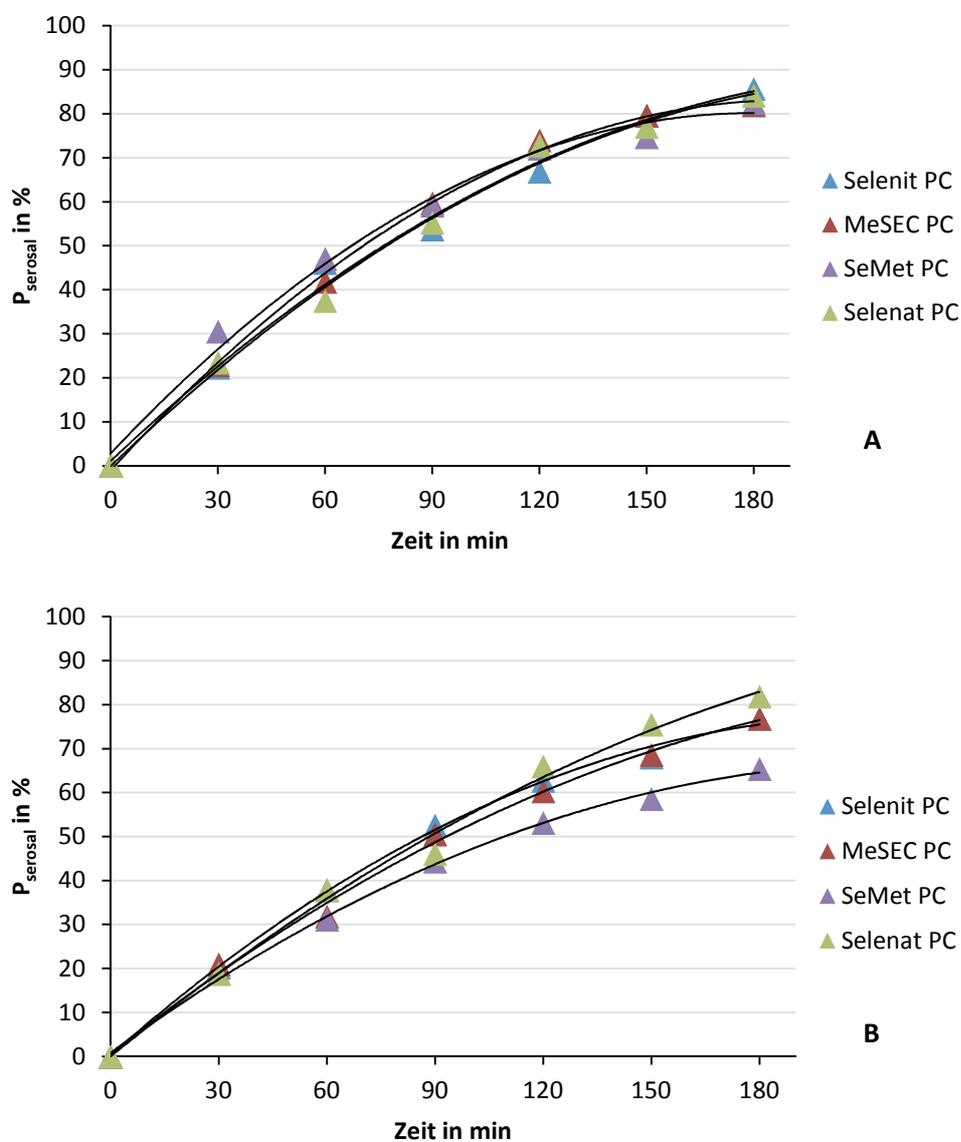


Abbildung A.1: Durchlässigkeit der Polycarbonat-Membran ohne Zellmonolayer bei einer Konzentration von 100 (A) und 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B) je Selenspezies in der mukosalen Seite

Anhang 3

Zeitlicher Verlauf des Gewebewiderstandes R_t der Mediumkontrolle für Kammer 1 und 2

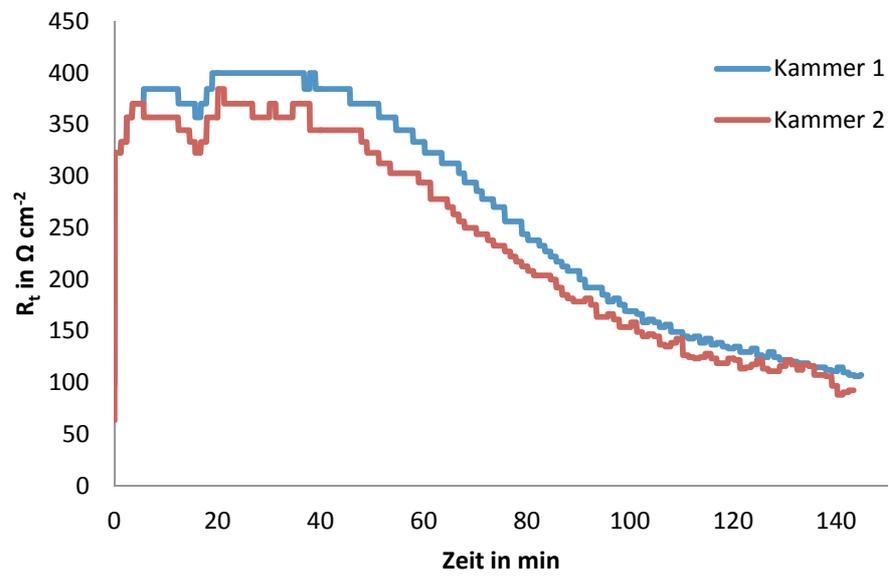


Abbildung A.2: Zeitlicher Verlauf des Gewebewiderstandes R_t während der Ussing-Kammer-Versuche der Mediumkontrolle (Beispiel)

Anhang 4

Zeitlicher Verlauf der Selenpezieskonzentrationen in den mukosalen Kammerhälften

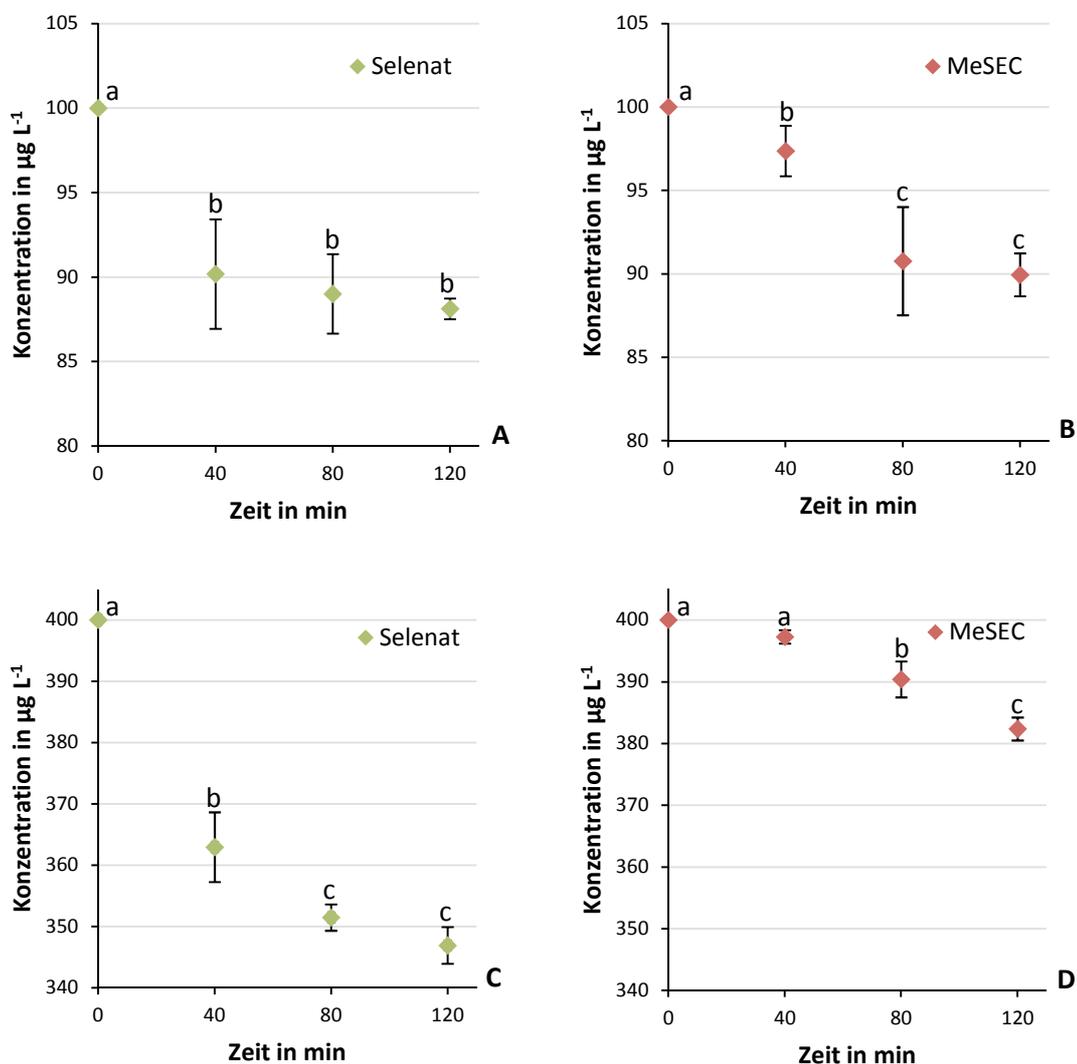


Abbildung A.3: Zeitlicher Verlauf der Selenpezieskonzentrationen in den mukosalen Kammerhälften. Messergebnisse in $\mu\text{g L}^{-1}$ von Selenat (A) und MeSEC (B) für die Versuche mit einer Anfangskonzentration von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ sowie von Selenat (C) und MeSEC (D) für die Versuche mit einer Anfangskonzentration von $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Die Messwerte sind als $\text{MW} \pm s$ angegeben ($n = 3$). Mittelwerte, die nicht mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, einfache ANOVA und Tukey's *Post-hoc*-Test)

Anhang 5

Einzelmesswerte der ersten Probennahme (serosale Seite)

Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$	Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$
1-1	2,93	2,94	2,25	9-1	2,23	2,42	6,44
1-2	2,82	2,70	2,02	9-2	2,13	2,35	5,60
1-3	3,29	2,74	2,12	9-3	2,27	2,27	5,14
2-1	2,19	2,53	2,53	10-1	1,96	2,54	6,29
2-2	2,43	2,87	2,92	10-2	2,48	2,92	7,23
2-3	2,78	3,13	3,17	10-3	2,27	2,82	6,92
3-1	6,42	2,45	1,26	11-1	11,6	2,35	12,4
3-2	6,16	2,48	0,75	11-2	12,3	2,71	12,4
3-3	5,83	2,38	0,78	11-3	12,4	2,82	13,9
4-1	12,0	2,94	3,25	12-1	7,18	2,69	6,22
4-2	12,7	2,76	3,21	12-2	9,18	2,55	5,40
4-3	11,9	2,56	2,91	12-3	6,97	2,47	6,68
5-1	2,03	8,73	2,40	13-1	2,55	8,81	8,27
5-2	2,44	10,4	2,28	13-2	1,84	8,92	8,08
5-3	2,41	10,1	3,03	13-3	2,29	8,97	7,90
6-1	2,18	8,64	1,94	14-1	1,76	9,43	6,25
6-2	2,49	10,0	2,21	14-2	1,29	9,02	5,15
6-3	2,30	9,65	2,27	14-3	1,83	9,84	6,45
7-1	12,2	9,06	2,73	15-1	8,06	10,1	8,32
7-2	14,5	10,1	3,23	15-2	7,34	10,1	7,90
7-3	13,9	10,3	3,43	15-3	7,03	9,22	6,85
8-1	8,9	10,1	2,59	16-1	8,57	9,39	7,42
8-2	7,64	9,62	2,55	16-2	7,60	10,1	7,38
8-3	7,95	9,42	2,50	16-3	7,89	9,94	6,78

Anhang 6

Einzelmesswerte der zweiten Probennahme (serosale Seite)

Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$	Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$
1-1	5,59	5,63	4,49	9-1	4,59	4,86	13,6
1-2	5,38	5,66	4,78	9-2	4,47	5,06	13,6
1-3	5,17	5,38	4,29	9-3	4,26	4,38	11,9
2-1	5,31	4,89	5,62	10-1	4,11	4,91	14,3
2-2	5,93	5,21	5,87	10-2	4,52	5,48	15,1
2-3	6,48	5,33	6,03	10-3	4,44	5,56	14,7
3-1	14,4	4,43	3,21	11-1	26,7	4,92	26,3
3-2	13,8	4,61	3,00	11-2	26,9	6,08	26,3
3-3	12,7	4,39	2,69	11-3	25,8	4,70	27,6
4-1	24,8	4,48	5,91	12-1	15,1	5,64	14,2
4-2	26,7	4,79	6,33	12-2	12,4	5,12	11,8
4-3	25,1	4,85	6,29	12-3	15,3	5,27	14,3
5-1	4,67	17,6	3,90	13-1	5,56	17,1	16,5
5-2	4,92	20,1	4,86	13-2	3,67	15,9	16,0
5-3	5,01	20,5	5,42	13-3	4,95	17,2	15,5
6-1	4,70	16,1	4,51	14-1	3,63	18,0	13,5
6-2	5,25	18,4	4,79	14-2	3,69	18,4	12,1
6-3	5,30	17,6	5,06	14-3	3,61	19,1	14,0
7-1	28,2	17,8	6,43	15-1	17,8	19,8	16,8
7-2	31,7	19,5	7,47	15-2	15,8	18,6	15,2
7-3	31,9	19,5	7,73	15-3	15,1	17,5	16,5
8-1	20,4	19,6	5,36	16-1	17,5	19,3	16,5
8-2	17,5	18,0	4,00	16-2	16,5	18,4	14,5
8-3	17,1	18,6	3,86	16-3	17,5	18,5	15,3

Anhang 7

Einzelmesswerte der dritten Probennahme (serosale Seite)

Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$	Versuchsnr.	MeSEC $\mu\text{g L}^{-1}$	Selenat $\mu\text{g L}^{-1}$	SeMet $\mu\text{g L}^{-1}$
1-1	7,65	8,11	6,35	9-1	6,47	6,43	20,7
1-2	7,62	7,85	6,65	9-2	5,72	6,34	20,0
1-3	7,74	7,70	6,58	9-3	6,00	6,05	19,3
2-1	8,63	6,54	7,52	10-1	6,35	6,64	21,0
2-2	8,46	6,93	7,19	10-2	6,96	7,77	23,3
2-3	9,70	6,91	8,11	10-3	6,81	7,83	22,4
3-1	22,5	6,93	5,09	11-1	36,0	6,37	36,1
3-2	20,5	6,24	4,19	11-2	38,2	6,98	38,7
3-3	19,1	6,11	3,93	11-3	35,3	6,49	34,4
4-1	34,7	5,40	8,11	12-1	22,9	7,47	20,3
4-2	37,5	6,75	8,49	12-2	19,4	6,87	17,6
4-3	34,7	6,31	9,02	12-3	24,0	7,59	19,8
5-1	7,41	24,3	6,41	13-1	7,94	22,8	23,9
5-2	8,05	27,6	6,56	13-2	5,09	20,8	23,2
5-3	7,64	28,1	8,17	13-3	7,75	23,5	22,5
6-1	6,94	22,5	7,34	14-1	5,82	24,7	22,7
6-2	8,23	26,5	6,86	14-2	5,14	24,3	19,6
6-3	8,04	24,6	6,77	14-3	5,71	26,3	21,3
7-1	41,4	25,7	9,27	15-1	26,4	27,4	24,7
7-2	45,0	26,2	10,4	15-2	23,8	24,9	23,0
7-3	45,0	26,9	10,3	15-3	21,9	23,8	21,3
8-1	29,2	26,6	8,20	16-1	24,2	25,5	22,7
8-2	25,1	23,4	5,93	16-2	23,6	25,0	21,3
8-3	26,2	24,5	5,72	16-3	25,6	26,0	23,7

Anhang 8Einzelwerte der berechneten Permeabilitätskoeffizienten P_{app}

Versuchsnr.	MeSEC $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$	Selenat $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$	SeMet $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$	Versuchsnr.	MeSEC $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$	Selenat $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$	SeMet $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$
1-1	47,62	50,26	39,57	9-1	40,50	40,45	32,19
1-2	47,29	49,28	42,26	9-2	36,25	40,45	31,67
1-3	46,72	47,89	40,74	9-3	37,16	37,68	30,04
2-1	53,94	40,89	47,71	10-1	39,47	41,50	32,99
2-2	53,71	43,05	45,59	10-2	42,65	48,14	36,12
2-3	60,99	42,63	50,59	10-3	42,04	48,78	34,88
3-1	35,04	42,35	32,06	11-1	57,19	40,32	56,77
3-2	32,20	38,76	27,57	11-2	60,10	45,20	60,51
3-3	29,79	37,85	25,49	11-3	55,46	39,72	54,41
4-1	54,30	33,03	50,22	12-1	35,66	47,17	32,03
4-2	58,83	41,46	53,15	12-2	28,48	43,09	27,52
4-3	54,56	39,48	56,60	12-3	37,31	47,56	31,24
5-1	46,27	38,08	38,58	13-1	49,91	35,66	37,13
5-2	49,54	42,99	41,39	13-2	49,06	32,29	36,02
5-3	47,46	44,03	50,02	13-3	48,20	36,55	34,90
6-1	43,39	34,90	45,72	14-1	35,97	38,47	35,10
6-2	51,06	40,93	43,04	14-2	33,16	38,22	30,58
6-3	50,45	38,05	42,99	14-3	35,17	40,97	33,26
7-1	65,27	39,93	58,62	15-1	41,40	42,78	38,44
7-2	70,78	40,94	65,76	15-2	37,21	38,72	35,54
7-3	71,07	41,85	65,28	15-3	34,37	36,98	34,17
8-1	46,12	41,56	35,14	16-1	37,92	40,20	35,86
8-2	39,59	36,52	35,81	16-2	37,04	38,84	32,99
8-3	40,74	38,49	34,46	16-3	40,22	40,24	37,00

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Jürgen W. Einax für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Promotionsarbeit. Ich danke ihm weiterhin für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, wertvollen Anregungen und Hinweise, die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Jahreis danke ich für die fachliche Betreuung im Bereich der zellbiologischen Untersuchungen und für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Leiterer für die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionsrunden und dafür, Fragen und Probleme jederzeit mit ihm besprechen zu können. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit, dass ich alle analytischen Messungen in den Laboren der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (Jena) durchführen konnte.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Christian Degen, der mir mit Rat und Tat bei der Zellkultur, der Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche und bei fachlichen Fragestellungen zur Seite stand.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Simon Prikler für die vielen Gespräche und dem Gedankenaustausch auf den Gebieten der Statistik und Chemometrik.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Frau Kathrin Spörl für die freundliche Zusammenarbeit am ELAN DRCE ICP-MS und allen Mitarbeitern des Referats 230 der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (Jena) für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Lehrbereichs Umweltanalytik für die immerzu freundliche Arbeitsatmosphäre.

Abschließend gilt natürlich mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 19.12.2012

Denis Pick