

**Entwicklung und Optimierung von analytischen
Methoden zur Bestimmung der Toxikokinetik von Xeno-
und Phytoöstrogenen und Einsatz im biologischen
Monitoring**

#

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium

dem Fachbereich Chemie
der Universität Dortmund

vorgelegt von
Stefan Moors

- Dortmund 2007 -

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. B. Lippert

Tag der mündlichen Prüfung:

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

S. Moors, P. Janning, U. Laudenschach, P. Diel, H. Michna, H. M. Bolt, and G. H. Degen (2002) *Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 1 to Volume 365: R 128, Abstract 496

S. Moors, P. Janning, P. Diel, H.M. Bolt, and G. H. Degen (2003) *Toxicokinetic of bisphenol A and daidzein in pregnant DA/Han rats: A comparison*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 1 to Volume 367: R 129, Abstract 501

S. Moors, S. Selinski, and G. H. Degen (2004) *Toxicokinetics of the xenoestrogen bisphenol A in pregnant and non-pregnant DA/Han rats*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 1 to Volume 369: R 109, Abstract 434

S. Moors and G. H. Degen (2005) *Analysis of the xenoestrogen bisphenol A in different biological matrices: method development and validation*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 1 to Volume 371: R 100, Abstract 420

S. Moors, H.M. Bolt, G.H. Degen (2006) *Assessing Exposure to Phytoestrogens and Bisphenol A by Analysis of Human Urine*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 1 to Volume 372: pp 106, Abstract 402

Originalarbeiten:

G. Kuhn, U. Hennig, C. Kalbe, C. Rehfeldt, M. Q. Ren, S. Moors and G. H. Degen (2004) *Growth performance, carcass characteristics and bioavailability of isoflavones in pigs fed soybean based diets*. Arch.Anim Nutr. 58, 265-276.

S. Moors, P. Diel and G. H. Degen (2006) *Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application*. Archives of Toxicology 80, 647-655. (published online DOI: 10.1007/s00204-006-0097-x)

U. Schönhusen, S. Kuhla, R. Zitnan, K.D. Wutzke, K. Huber, S. Moors, and J. Voigt (2007) *Effect of a soy protein-based diet on the ribonucleic acid metabolism in the small intestinal mucosa of goat kids*. Journal of Dairy Science 90 (5), 2404-2412.

S. Moors, M. Blaszkewicz, H. M. Bolt, and G. H. Degen *Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in humane urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS*. (in Press, Molecular Nutrition and Food Research 2007, 51, DOI 101002/mnfr.200600289)

„Es gibt nur einfache Lösungen. Einziges Problem: Man muss sie finden.“

(Robert M. Pirsig (* 1928), amerik. Schriftsteller)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2001 bis September 2006 am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bolt explizit danken. Ebenso wie für die stete Betreuung und Förderung der Teilnahme an Kongressen und Toxikologie-kursen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Degen für die unmittelbare Betreuung. Ihre ständige Bereitschaft, offene Fragen zu erläutern oder biologische und toxikologische Aspekte der Thematik zu diskutieren werden mir immer positiv in Erinnerung bleiben.

Frau Dr. P. Janning danke ich für die Einweisung in die HPLC-Technik und wertvolle Hinweise für die Fehleranalyse.

Für die Durchführung der Tierversuche und die Isolation des Probenmaterials der BPA-Versuche danke ich Dr. Patrick Diel und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe an der Deutschen Sporthochschule in Köln.

Bei Frau D. Dannappel möchte ich mich für die Aufarbeitung der Gewebeprobe bedanken. Ohne ihre Hilfe hätte diese umfangreiche Analyse doppelt so viel Zeit in Anspruch genommen.

Frau B. Aust danke ich für die Entwicklung der ersten Schritte der Plasmaanalytik von BPA.

Frau Dr. Kuhn und Frau Dr. Schönhusen vom FBN in Dummerstorf danke ich für die Überlassung der Proben zur Futtermittel- und Plasmaanalytik auf Isoflavone.

Weiterhin danke ich den vielen zur Urinspende bereiten Doktoranden, Probanden und Angestellten. Hier sei besonders auf die hilfreichen Kommentare und unterstützenden Gespräche mit Dr. Daniela Bonacker, Susanne Dorn, Christina Köhler, Sabine Plöttner und Sebastian Tschirbs hingewiesen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. M. Blaszkewicz für seine ständige Diskussionsbereitschaft zu analytischen Fragestellungen. Aber auch die schnelle Integration in seine Arbeitsgruppe (ZE Analytische Chemie) sowie die Einbeziehung in Entscheidungen wird mir immer in positiver Erinnerung bleiben.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen Mitarbeitern der Abteilung ZE Analytische Chemie und der Abteilung Toxikologie für das freundliche Arbeitsklima, die kollegiale Zusammenarbeit sowie die ständige Auskunftsbereitschaft danken.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern im ganz besonderen danken. Ohne ihre Unterstützung wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Hormonelle Regulation und Interaktion.....	14
1.2	Toxikokinetik.....	16
1.3	Bisphenol A (CAS 80-05-7).....	18
1.3.1	Herstellung, Eigenschaften und Verwendung	19
1.3.2	Exposition, Metabolismus und Toxizität.....	20
1.4	Genistein (CAS 446-72-0) und Daidzein (CAS 486-66-8).....	25
1.4.1	Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung.....	27
1.4.2	Exposition, Metabolismus und Toxizität.....	29
1.5	Aufgabenstellung.....	34
2	Material und Methoden	37
2.1	Geräte.....	37
2.2	Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	39
2.3	Chemikalien.....	40
2.3.1	Analyten und interne Standards.....	40
2.3.2	Derivatisierungsreagenzien.....	40
2.3.3	Allgemeine Reagenzien.....	41
2.3.4	Biologische Materialien.....	42
2.3.5	Pufferlösungen und Enzyme.....	42
2.4	Verwendete analytische Trennverfahren.....	43
2.4.1	Gaschromatographie, Kaltaufgabe und massenspektrometrische Detektion.....	44
2.4.2	Mikro-HPLC und UV-Detektion.....	46
2.5	BPA-Analysen.....	48
2.5.1	Tierversuch	48
2.5.2	Gewebeprobenvorbereitung.....	49
2.5.3	BPA-Analysen in Plasmen (Aglycon und Aglycon plus Konjugate).....	50
2.5.3.1	Probenvorbereitung	52
2.5.4	BPA-Analysen in Geweben (Aglycon plus Konjugate).....	52

2.5.4.1	Probenvorbereitung	53
2.5.4.2	Stammlösungen, Verdünnungen und Kalibrierreihen	54
2.6	Isoflavon (Daidzein und Genistein)-Analysen	56
2.6.1	Isoflavone in Futtermitteln	56
2.6.1.1	Probenvorbereitung	56
2.6.1.2	Stammlösungen, Verdünnungen und Additionsreihen	58
2.6.1.3	Mikro-HPLC Bedingungen	58
2.6.2	Isoflavone in Schweineplasmen	59
2.6.2.1	Probenvorbereitung	59
2.6.2.2	Stammlösungen, Verdünnungen und Kalibrierreihen	60
2.6.2.3	GC-MS Bedingungen 2	61
2.7	Kombinierte BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analysen	62
2.7.1	BPA, Daidzein, Equol und Genistein in Urinen	62
2.7.1.1	Probenvorbereitung	62
2.7.1.2	Herstellung von Stammlösung, Verdünnungen und Kalibrierreihen	63
2.7.1.3	GC-MS Bedingungen 3	65
2.8	Statistische und analytische Kenngrößen	66
2.8.1	Mittelwert, Regression und Korrelation	66
2.8.2	Messpräzision, Methodenpräzision (V_K) und Richtigkeit	67
2.8.3	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	68
3	Ergebnisse	73
3.1	Methodenentwicklung und Optimierung	73
3.1.1	BPA in Plasmen	73
3.1.2	BPA in Geweben	80
3.1.3	Isoflavone in Schweineplasmen	87
3.1.4	BPA und Isoflavone in Urinen	90
3.2	Methodenanwendung	100
3.2.1	Toxikokinetik von BPA in trächtigen Ratten	100
3.2.1.1	BPA-Aglycon und Gesamt-BPA in Blut-Plasma von DA/Han Ratten ..	101
3.2.1.2	Gesamt-BPA in mütterlichen Rattengeweben	105
3.2.1.3	Gesamt-BPA in fötalen Rattengeweben	107
3.2.1.4	Überblick toxikokinetischer Parameter für BPA in Rattengeweben	108

3.2.2	Daidzein und Genistein in Futtermitteln und Schweineplasmen	109
3.2.2.1	Futtermittel	109
3.2.2.2	Isoflavon-Blutspiegel in Schweinen.....	112
3.2.3	Isoflavon-Gehalte und BPA in humanen Urinproben	114
4	Diskussion	119
4.1	Vergleich und Bewertung der analytischen Methoden	120
4.1.1	Analyse von BPA in Plasma und Gewebe.....	120
4.1.2	Daidzein und Genistein Analyse in Futtermitteln	124
4.1.3	Daidzein und Genistein Analyse in Plasma aus Schweineblut	125
4.1.4	BPA, Daidzein, Equol und Genistein Analyse in Urinen.....	126
4.2	Analysenbefunde im toxikologischen Kontext	131
4.2.1	Toxikokinetik und transplazentarer Transfer von BPA bei DA/Han Ratten [Moors et al. 2006].....	131
4.2.2	Phytoöstrogenexposition bei Schweinen [Kuhn et al. 2004].....	138
4.2.3	Biomonitoring zur Ermittlung der Human-Exposition gegen Isoflavone (Daidzein, Genistein) und Bisphenol A [Moors et al., submitted].....	140
4.2.3.1	Daidzein, Equol und Genistein Ausscheidung.....	141
4.2.3.2	BPA Ausscheidung	143
4.3	Beiträge zur toxikologischen Bewertung von BPA und Isoflavonen .	145
5	Ausblick	147
6	Zusammenfassung	149
7	Summary	152
8	Literatur	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen des Hormonsystem	15
Abbildung 2: Absorption (A), Distribution (D), Metabolismus (M) und Elimination (E) von Fremdstoffen.....	17
Abbildung 3: Strukturformel und physikalische Daten von Bisphenol A	19
Abbildung 4: Reaktionsgleichung zur Herstellung von Polycarbonat.	19
Abbildung 5: Beispiele für BPA-Metaboliten.....	21
Abbildung 6: Grundstruktur der Flavanone, Flavone und Isoflavone.....	26
Abbildung 7: Strukturformeln und physikalische Daten von Genistein und Daidzein.	27
Abbildung 8: Metabolismus der Isoflavone	31
Abbildung 9: Einsatz analytischer Methoden zur Ermittlung der Exposition, Biotransformation und Elimination	35
Abbildung 10: Schematische Abbildung des Trennvorgangs bei der Chromatographie.....	43
Abbildung 11: Schematische Darstellung der GC-Injektion mit Lösungsmittelausblendung.....	45
Abbildung 12: Schematische Abbildung einer Ionenquelle, eines Quadrupol-Massenfilters und eines Multiplizierhörchens.	45
Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf zur Untersuchung des transplazentaren Transfers von BPA.	49
Abbildung 14: Ablauf der Gewebeaufarbeitung	50
Abbildung 15: Flussschema zur Analyse von BPA in Plasma	51
Abbildung 16: Flussschema zur Analyse von Gewebeproben auf „Gesamt“-BPA (Aglycon und Konjugate).....	54
Abbildung 17: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung zur Analyse von Isoflavonen in Futtermitteln. ...	57
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Analyse von Daidzein und Genistein in Schweineplasmaproben.	59
Abbildung 19: Flussschema für die BPA, Daidzein, Equol, und Genistein Analysen von Urinproben.....	63
Abbildung 20: Acetylierung von BPA zum BPA(ac) ₂	73
Abbildung 21: Relative Extraktionseffizienz der beiden Extraktionsstufen bei der BPA Probenvorbereitung	74
Abbildung 22: Totalionenchromatogramm und errechneter Quantifier zur Messung von BPA in Plasma	75
Abbildung 23: BPA-Kalibrierfunktion in Schweineplasma.....	79
Abbildung 24: Totalionenchromatogramme und errechnete Quantifier/Qualifier von Lebergeweben.....	82
Abbildung 25: BPA-Kalibrierfunktion in Kalbsleber.	86
Abbildung 26: Chromatogramm einer Schweineplasmaproben mit normalem Hintergrund.....	88
Abbildung 27: Kalibrierfunktion für Isoflavone in Schweineplasma.....	89
Abbildung 28: Derivatisierungsreaktion von Genistein zum tBDMS-ether.....	91
Abbildung 29: Ermittlung der Volumina für den Spül- und Elutionsschritt bei der Festphasenextraktion von BPA und Isoflavonen aus Urin.....	92
Abbildung 30: Flächenwerte für die Analyten BPA, Equol, Daidzein und Genistein in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit und die Derivatisierungstemperaturen	93
Abbildung 31: Chromatogramme für unterschiedliche Injektionsvolumina bei der Isoflavonanalytik mit dem Kaltaufgabesystem.	94
Abbildung 32: Kalibrierfunktionen für die BPA, Equol, Daidzein und Genistein Analyse von Urinen.....	99
Abbildung 33: Konzentrations-Zeit-Verlauf für BPA-Aglycon und BPA-Aglycon plus Konjugat in Plasma von trächtigen (Tag 18) DA/Han-Ratten	102

Abbildung 34: Prozentualer Anteil BPA-Aglycon am "gesamten" zirkulierenden BPA im Rattenplasma.	103
Abbildung 35: Plasmakonzentrationen nach paravenöse Injektion bzw. venöse Injektion.....	104
Abbildung 36: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in Leber und Niere der Muttertiere (DA/Han Ratten)...	105
Abbildung 37: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in Plazenta und Uterus der Muttertiere	106
Abbildung 38: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in fötaler Leber und Fötenhomogenat.	107
Abbildung 39: Chromatogramme der Standardadditionen zur Daidzein und Genistein Analyse des Futtermittels "Kontrollration 2" mit Mikrobore-HPLC-UV	110
Abbildung 40: Standardadditionsfunktionen der Analyse von "Kontrollration 2".....	110
Abbildung 41: Konzentrationen von Daidzein und Genistein in Schweineplasma nach Fütterung mit isoflavonreichen bzw. isoflavonarmen Futtermitteln	113
Abbildung 42: BPA, Daidzein, Equol und Genistein Analysen von 24h-Urinen von 8 Probanden.....	114
Abbildung 43: BPA, Daidzein, Equol und Genistein Urin-Ausscheidung innerhalb von 24h.....	115
Abbildung 44: BPA- und Isoflavongehalte in Spoturinen von 7 Probanden.....	116
Abbildung 45: Isoflavongehalte in Spoturinen eines Probanden, nach „normaler“, nach „isoflavonarmer“ (IA) und isoflavonreicher Ernährung.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expositionsquellen für Bisphenol A.	20
Tabelle 2: Östrogene Potenz von BPA und BPA-Metaboliten in verschiedenen Testsystemen.	24
Tabelle 3: Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A Gehalte verschiedener Lebensmittel	28
Tabelle 4: Isoflavonaufnahme in verschiedenen Populationen.	30
Tabelle 5: Östrogene "Potenzen" von Isoflavonen in verschiedenen in vitro Testsystemen.	33
Tabelle 6: Übersicht über die Größen verschiedener HPLC Techniken.	47
Tabelle 7: Herstellung der Kalibrierstandards für die Analyse von BPA mit GC-MS.	55
Tabelle 8: Standardadditonsproben zur Analyse von Futtermitteln auf Genistein und Daidzein.	58
Tabelle 9: Ansatz für fünf Kalibrierreihen zur Analyse von Genistein und Daidzein in Schweineplasma.	61
Tabelle 10: Zusammensetzung der Kalibrierproben für die Analyse von Urinen auf Isoflavone, Isoflavon- Metabolite und BPA.	64
Tabelle 11: Definition unterschiedlicher Präzisionen.	68
Tabelle 12: Messpräzision der Saturn GC-MS bei der BPA-Analyse in Schweineplasma.	76
Tabelle 13: Bestimmung der Verfahrenspräzision der BPA-Analyse in Schweineplasma.	77
Tabelle 14: Wiederfindungsraten für BPA-Analyse in Schweineplasma.	77
Tabelle 15: Sollwert t-Test für die BPA-Analysen in Schweineplasma.	78
Tabelle 16: Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenzen für BPA-Analysen in Schweineplasma	80
Tabelle 17: Messpräzision Agilent GC-MS mit Gerstel MPS2 für BPA-Analysen in Kalbsleber.	83
Tabelle 18: Bestimmung der Verfahrenspräzision für BPA in Kalbsleberproben.	84
Tabelle 19: Wiederfindungsraten in und zwischen den Serien bei der BPA-Analyse in Kalbsleber.	85
Tabelle 20: Sollwert t-Test für die BPA-Analyse in Kalbsleber.	86
Tabelle 21: Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenzen für die BPA-Analyse in Kalbsleber.	87
Tabelle 22: Wiederfindungsrate in und zwischen den Serien für die Daidzein- und Genistein-Analyse in Schweineplasma	88
Tabelle 23: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen nach DIN für die Daidzein- und Genistein- Analyse in Schweineplasma	90
Tabelle 24: Getestete Derivatisierungsmethoden für die GC-MS Bestimmung von Isoflavonen.	91
Tabelle 25: Messpräzision für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analysen in Humanurin.	95
Tabelle 26: Wiederfindungsraten in und zwischen den Serien für die BPA-, Daidzein, Equol- und Genistein- Analysen in Humanurin.	96
Tabelle 27: Verfahrenspräzisionen für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analyse in Humanurin.	97
Tabelle 28: Sollwert t-Test für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analyse in Humanurin.	98
Tabelle 29: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein- Analysen in Urin.	100
Tabelle 30: Halbwertszeiten für BPA in Plasma. (A) nach biexponentiellem Modell berechnet, (B) mittels Zwei- Punkte-Steigung berechnet.	103
Tabelle 31: Zusammenfassung der toxikokinetischen Parameter für BPA in DA/Han Ratten.	108
Tabelle 32: Isoflavongehalte in Futtermitteln für Schweine	111
Tabelle 33: Gehalte von Isoflavonen in Sojamehlen und kommerziellen Sojaprotein.	112

Tabelle 34: Vergleich ausgewählter Methoden zur BPA-Analyse in verschiedenen Matrices.	122
Tabelle 35: Beispiele für Isoflavon-Analysen in Nahrungsmittel mit unterschiedlichen Aufschlüssen und Analysenverfahren.	125
Tabelle 36: Vergleich von Methoden zur Analyse von Isoflavonen in komplexen Matrices anhand von Qualitätsparametern.	127
Tabelle 37: Vergleich von Studien zur Verteilung von BPA in trächtigen Ratten verschiedener Stämme nach <i>i.v.</i> und <i>per os</i> Applikation unterschiedlicher BPA-Dosen.	132
Tabelle 38: Vergleich der toxikokinetischen Parameter von BPA in nicht trächtigen Ratten verschiedener Stämme und für unterschiedliche Applikationsarten und Dosen.	134
Tabelle 39: Vergleich toxikokinetischer Parameter von BPA in trächtigen und nicht trächtigen Ratten.	135
Tabelle 40: Toxikokinetische Parameter für BPA in verschiedenen Spezies.	137
Tabelle 41: Mittlere Daidzein und Genistein Plasmakonzentrationen nach Fütterung isoflavonarmer und isoflavonreicher Futtermittel.	139
Tabelle 42: Daidzein- und Genistein-Konzentrationen in Plasma verschiedener Personengruppen.	139
Tabelle 43: Isoflavonausscheidung verschiedener Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlicher Ernährungsweise und nach „Soja-Challenge“.	141
Tabelle 44: Wiederfindungsraten von BPA, Daidzein und Genistein in Urin.	143

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ac	Acetat
BG	Bestimmungsgrenze
Bio	Biochanin
BPA	Bisphenol A
BPAQ	Bisphenol A Chinon
KG	Körpergewicht
CAS	Chemical Abstract Service
CIS	Cooled Injection System (Kaltaufgabesystem)
CPI	Casein-Isolat (Milch-Protein-Isolat)
CYP	Cytochrom P450
DA/Han Ratten	Dark Agouti Hannover Ratten
DAD	Diodenarraydetektor
Dai	Daidzein
DDD	Dichlor-diphenyl-dichlorethan bzw. 1,1-Dichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan
DDE	Dichlor-diphenyl-dichlorethen bzw. 1,1-Dichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethen
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan bzw. 1,1,1-Trichlor-2,2[4]-bis(4-chlorphenyl)ethan
DES	Diethylstilbestrol
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)anthracen
EAC	Endokrin aktive Chemikalie bzw. auch ‚Endocrine active chemical/compound‘
EC50	Effective Concentration 50 (Konzentration, die zu 50% der maximalen Aktivität führt)
EG	Erfassungsgrenze
EGF	Epidermal Growth Factor
EI	Elektronenstoßionisation
EQ	Equol
ER	Estrogen Receptor bzw. Östrogenrezeptor
ERE	Estrogen Responsive Element
F.E.	Flächeneinheiten (je nach Detektor mit unterschiedlichen Dimensionen)
FDA	Federal Drug Administration
FLD	Fluoreszenzdetektor
For	Formononetin
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie
Gen	Genistein
GLY	Glycitein
GSH	Glutathion
HD	High Density (Hohe Dichte)
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRT	Hormone Replacement Therapy (Hormon-Ersatz-Therapie)
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC50	Inhibitory Concentration 50 (Konzentration, welche die Aktivität zu 50% inhibiert)
Kal.	Kalibrierung
KG	Körpergewicht

LD50	Lethale Dosis (50% Gewichtungsfaktor)
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MBP	4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-en
MCF 7	Mammary Carcinoma Fibroblasts (Brustkrebszelllinie)
min	Minute
MPS	Multi Purpose Sampler (Spezieller Autosampler, von Gerstel)
MS	Massenspektrometrie
NCI	Negative chemische Ionisation
NG	Nachweisgrenze
NOEL	No Observed Effect Level (kleinster Wert ohne Befund)
o.E.	ohne Einheit
OR	Odds Ratio
p.o.	per os; peroral
PC	Polycarbonat
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
POP	Persistent Organic Pollutant
ROS	Radical Oxygen Species (radikalische Sauerstoffspezies)
PTV	Programmable Temperatur Vaporizing (identisch zu CIS)
s.c.	subcutan
S/N	Signal zu Rausch Verhältnis
S/SL	Split- bzw. splitlose Aufgabetechnik
SA	Standardabweichung
SBM	Soy Bean Meal
SCF	Scientific Committee on Food
SD	Standard Density (Standard Dichte)
SD Ratten	Sprague Dawley Ratten
SIM	Single Ion Monitoring
SPC	Soy Protein Concentrate
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPI	Soja-Protein-Isolat
SULT	Sulfotransferasen
tBDMCS	tert-Butyl-dimethylchlorsilan
tBDMS	tert-Butyl-dimethylsilyl-
TD	Thermodesorption
TDI	Tolerable Daily Intake (tolerierbare tägliche Aufnahme)
TIC	Total Ion Chromatogram
TMS	Trimethylsilyl-
UGT	Uridindiphosphoglucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
WR	Wiederfindungsrate

Glossar

Agonist: Substanz, die an einen Rezeptor bindet und so eine (biologische) Antwort auslöst.

Androgene: Männliche Geschlechtshormone mit Steroidstruktur, die u.a. Vorgänge der Reproduktion steuern. Die Bildung erfolgt hauptsächlich in den Hoden und in der Nebenniere (Androgenquelle bei der Frau).

Angiogenese: Bezeichnung für das Wachstum von kleinen Blutgefäßen

Antagonist: Substanz, die an einen Rezeptor bindet, selbst keine (biologische) Antwort auslöst aber die Rezeptor vermittelte Wirkung eines endogenen Liganden (Hormon) unterdrückt (antagonisiert).

Antiandrogene: Substanzen, die die Wirkung von Androgenen unterdrücken.

Antiöstrogene: Substanzen, die die Wirkung von Östrogenen unterdrücken.

Endokrine Modulatoren oder Disruptoren: Allgemeiner Begriff für Substanzen, die in das Hormonsystem eingreifen können (engl. Endocrine disruptors or modulators).

Hyperplasie: Bezeichnet eine reizabhängige und reversible Gewebsneubildung (Gewebsvermehrung)

Hypertrophie: Bezeichnet die Vergrößerung eines Organs oder eines Gewebes durch Zellvergrößerung.

Klimakterium („Wechseljahre“): Übergangsphase von der Geschlechtsreife zum Alter. Das Klimakterium der Frau beginnt mit der Prämenopause (Jahre vor dem Aufhören der Regelblutungen) und geht über die Menopause (letzte Menstruation) in die Postmenopause (sehr geringe Östrogenproduktion) über.

NOEL und NOAEL: Der **No Observed Effekt Level** bezeichnet die Dosis bis zu der kein Effekt durch die Substanz eintritt. Die **No Observed Adverse Effekt Level-Dosis**, bis zu der sicher noch kein adverser Effekt am Versuchstier eintritt. Mit einem Sicherheitsfaktor für den Speziesübertrag zum Menschen werden diese Werte z.B. zur Berechnung von unbedenklichen täglichen Expositionen wie dem TDI verwendet.

Open-Field-Test: Verhaltensanalyse, bei der das Erkundungsverhalten von Tieren ermittelt wird.

Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit): Verdickung der Knochenstruktur aufgrund verringerter Aktivität der Osteoklasten.

Östrogene: Weibliche Geschlechtshormone aus der Klasse der Steroide, welche bei der Frau u.a. die Vorgänge der Reproduktion steuern. Die Bildung erfolgt hauptsächlich in den Ovarien.

Östrogen aktive Chemikalie (EAC): Untergruppe endokrin aktiver Substanzen mit östrogenartiger Wirkung.

Ovarektomie: Bezeichnet die Entfernung der Eierstöcke zur Ausschaltung der endogenen Hormonproduktion. Dadurch sinken die 17 β -Östradiolspiegel auf einen nur geringen Restwert.

Phytoöstrogene: Substanzen pflanzlichen Ursprungs mit östrogenen Wirkung.

S9-Mix: Der S9-Mix ist eine Mischung aus Leberenzymen, die bei *in vitro* Versuchen zur metabolischen Umsetzung von Fremdstoffen eingesetzt wird. Die Enzyminduktion wird durch die Gabe von Aroclor (eine Mischung von Polychlorierten Biphenylen) an Versuchstiere erreicht. Anschließend wird die Leber gewonnen, homogenisiert und bei 9000g zentrifugiert. Der Überstand wird als S9 Mix bezeichnet.

Sex hormone-binding globulin (SHBG): In der Leber gebildeter Eiweißkörper, der im Blutplasma Androgene und Östrogene bindet und transportiert.

Topoisomerasen: Sind Moleküle, welche die räumliche Orientierung der DNA verändern. Hemmstoffe der Topoisomerase führen in Zellen zu DNA Strangbrüchen und leiten die Apoptose (programmierten Zelltod) ein.

Telomerase: Enzym des Zellkerns, das die Endstücke von Chromosomen (sog. Telomere) wieder herstellt und so einer Verkürzung der Chromosomen durch die Zellteilung entgegenwirkt (und so den Zelltod verhindert).

Transfektion: Bezeichnet das Einbringen/Einbauen von Fremd-DNA in das Erbgut einer Zelle, z.B. zum Zweck einer bestimmten Funktion.

Xenoöstrogene: Nicht natürlich vorkommende Substanzen, die eine östrogene Wirkung aufweisen.

Zellproliferation: Vermehrung von Zellen durch Zellteilung. In Hormon-abhängigen Geweben (Zielzellen) wie Uterus und Mamdrüse findet man beispielsweise eine erhöhte Zellproliferation (Zellteilung) unter Einfluss von Östrogenen.

1 Einleitung

In den vergangenen zwei Jahrzehnten sind Substanzen mit endokriner Wirkung in den Mittelpunkt öffentlicher, wissenschaftlicher und regulatorischer Interessen gerückt. Es besteht Besorgnis, dass sogenannte endokrine Disruptoren die Fortpflanzung gefährden und für eine Zunahme von Tumoren in Brust, Hoden und Prostata verantwortlich sind [Carlsen *et al.* 1992, Colborn *et al.* 1996, McLachlan 1993, Toppari *et al.* 1996].

Im Zentrum der Diskussionen stehen eine Reihe von Substanzen anthropogenen Ursprungs wie beispielsweise DDT, Bisphenol A, Nonylphenol, Phthalate und Tributylzinn, aber auch natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe wie Genistein, Daidzein, Coumestrol und weitere Phytoöstrogene [Degen and Bolt 2000, Degen 2004], die in hinreichend hohen Dosen sexualhormonartige Wirkungen zeigen.

Die gezielte Synthese östrogen aktiver Chemikalien beginnt in den 30er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts. Zu diesem Zeitpunkt wurden Anstrengungen unternommen, um Substanzen mit hormoneller Wirkung zum oralen therapeutischen Einsatz zu entwickeln. Zu diesen Substanzen gehörten unter anderem Bisphenol A (BPA) und Diethylstilbestrol (DES) [Dodds and Lawson 1936].

DES wurde in den 60er Jahren zur Behandlung des *Abortus imminens* benutzt. Es wird geschätzt, dass jährlich über 10000 Mädchen *in utero* gegenüber DES exponiert wurden. Nach einer Latenzzeit von 20 Jahren hatte eine gewisse Anzahl von ihnen ein Adenokarzinom an Scheide und Cervix entwickelt [Giusti *et al.* 1995, Newbold 1995, Martino *et al.* 2002]. Erst im Jahr 1971, als der Zusammenhang zwischen dem normalerweise seltenen Scheidenkarzinom und der vorgeburtlichen DES Exposition aufgedeckt wurde [Herbst *et al.* 1971], verbot die Food and Drug Administration (FDA) daraufhin den Einsatz von DES. DES wurde so zum traurigen ersten Beispiel einer Substanz-induzierten transplazentaren Kanzerogenese beim Menschen.

Die Diskussion über einen Zusammenhang von Umweltkontaminationen durch hormonartig wirkende Chemikalien und Reproduktionsstörungen bei Wildtieren begann bereits in den 60er Jahren [Carson 1962, Vos *et al.* 2000].

Im Zeitraum von 1940-1972 wurde DDT, ein nichtsystemisches Kontaktgift, sehr häufig und in großen Mengen als Pestizid eingesetzt, insbesondere bei der Malariabekämpfung [Beard 2006, BUA Stoffbericht 216 für DDT 1999]. Ein Bestandteil der technischen DDT Mischung, das o,p'-DDT Isomer, zeigt eine schwach östrogene Wirkung. Hauptsächlich ist eine

reproduktionstoxische Wirkung der technischen DDT Mischung (zu 70-80% p,p'-DDT) aber auf die Bildung des antiandrogenen Metaboliten p,p'-DDE zurückzuführen. DDT und seine Metaboliten haben sehr lange biologische Halbwertszeiten ($t_{1/2}$ =10 Jahre, gemessen in Serum) [Jaga and Dharmani 2003]. Bereits in den 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich DDT über die Nahrungskette im Weißkopfseeadler (*Haliaeetus leucocephalus*) anreichert und einen Populationsrückgang verursacht, der hauptsächlich auf eine Verringerung der Eierschalendicke zurückzuführen ist. DDT und seine Metaboliten DDE und DDD wirken dabei auf den Calcium- und Prostaglandin-Metabolismus der Eierschalendrüse [Bowerman *et al.* 2000, Lundholm 1997]. Aufgrund dieser Effekte wurde 1972 der Einsatz und 1978 die Produktion von DDT in westlichen Industrienationen verboten. Besonders schwerwiegend sind Einträge von großen Mengen hormonell aktiver Chemikalien in die Natur, wie in Florida, wo durch einen Unfall große Mengen DDT in den Lake Apopka gerieten, und es in der Folge zu einem dramatischen Abfall der Alligator-Population kam [Guillette *et al.* 1994, Vos *et al.* 2000].

Eine möglicherweise durch hormonell aktive Chemikalien bedingte verringerte Samenqualität löste in den 90er Jahren einige Besorgnis über die Fortpflanzungsfähigkeit der Menschheit aus [Colborn *et al.* 1996]. Carlsen *et al.* (1992) beschrieben eine signifikante Abnahme der Spermienkonzentration zwischen 1938 und 1991, und Sharpe und Skakkebaek (1993) stellten die Hypothese auf, dafür seien zunehmende Expositionen gegenüber östrogen wirkenden Chemikalien verantwortlich. Sie führen verringerte Spermienzahlen und häufiger auftretende Hypospadien (eine Missbildung der Harnröhre) sowie Hodenkrebs auf eine Hodendysfunktion (sog. TDS: Testicular Dysfunction Syndrome) zurück infolge einer endokrinen Disruption während der Embryonal- bzw. Keimdrüsenentwicklung [Skakkebaek *et al.* 2001]. Eine Reihe weiterer Untersuchungen zur Samenqualität fand zwar deutliche regionale Unterschiede, zeigte aber keine Korrelation zwischen Spermiedichte und einer Exposition gegen hormonell aktive Chemikalien [Auger *et al.* 1995, Bujan *et al.* 1996, Fisch *et al.* 1996, Jorgensen 2001].

Östrogen aktive Substanzen werden aber nicht nur als möglicherweise bedenklich, sondern auch als nützlich angesehen. Phytoöstrogene wie Daidzein, Genistein und eine Reihe weiterer Verbindungen werden wegen verschiedener Eigenschaften auch im Hinblick auf klinische Anwendungen untersucht [Duncan *et al.* 2003, Russell *et al.* 2002]. So lindern beispielsweise Traubensilberkerzenextrakte die klimakterischen Beschwerden in den Wechseljahren [Wuttke *et al.* 2002, Wuttke *et al.* 2003]. Ferner besteht Interesse, Phytoöstrogene bei der Krebsprävention und in der Therapie von Tumoren einzusetzen, denn Genistein zeigt beispielsweise antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen und hemmt offenbar auch die Angiogenese [Fotsis

1993, Jagadeesh *et al.* 2006]. Geringere Tumorraten in Ländern mit hohem Verzehr an Soja deuten zwar auf einen möglichen Zusammenhang mit Phytoöstrogenen in der Nahrung hin, sind aber kein schlüssiger Beweis für den Nutzen von Phytoöstrogenen, denn weitere Faktoren können ebenfalls eine Rolle spielen [Wu 1998, Yamamoto *et al.* 2003].

Xenoöstrogene wie Bisphenol A oder die Phytoöstrogene Daidzein und Genistein werden primär über die Nahrung aufgenommen; sie könnten aufgrund ihrer östrogenen Eigenschaften in hohen Dosen in endokrine Regelkreise eingreifen und entwicklungs- oder reproduktionsbiologische Fehlbläufe verursachen. Bisphenol A verursacht Bedenken, weil es aus Polycarbonat-Kunststoffen austritt, die u.a. zur Herstellung von Babyflaschen verwendet werden (s.u., Abschnitt 1.3). Die Phytoöstrogene Daidzein und Genistein werden allerdings in viel höherer Menge als BPA über die Nahrung aufgenommen [Degen 2004]. Die beiden Isoflavone sind auch Bestandteil der Ernährung von Kleinkindern, die wegen einer Kuhmilchallergie auf Sojamilch umgestellt werden.

Durch die Ermittlung der Exposition gegen Xeno- und Phytoöstrogen sowie durch die Ermittlung toxikokinetischer Parameter versucht die vorliegende Arbeit, eine mögliche Gefährdung am Beispiel der östrogenen Industriechemikalie BPA und der Phytoöstrogene Daidzein und Genistein einzuschätzen. Die Entwicklung geeigneter analytischer Methoden zur Erfassung dieser Substanzen und ihrer Metabolite im biologischen Material ist dabei eine Hauptaufgabe und Anwendung der chemischen Analytik in der Toxikologie.

1.1 Hormonelle Regulation und Interaktion

Sexualhormone steuern die Ausbildung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale. Während die Östrogene (17 β -Östradiol, Östron, Östriol) die weibliche Entwicklung bestimmen, steuern die Androgene (Testosteron, Dihydrotestosteron) die männliche Entwicklung.

Die Östrogenproduktion unterliegt einem komplexen Regelmechanismus. Hauptort der Östrogenproduktion ist die Theka interna im Follikel. Die Follikelreifung und somit die Produktion von Östrogen wird durch das Follikel stimulierende Hormon (FSH) gefördert. Das FSH wird im Hypophysenvorderlappen im Gehirn in Abhängigkeit vom Östrogenspiegel im Organismus produziert (sog. negative Rückkopplung). Somit variiert die Konzentration der Östrogene im weiblichen Organismus erheblich während des Zyklus.

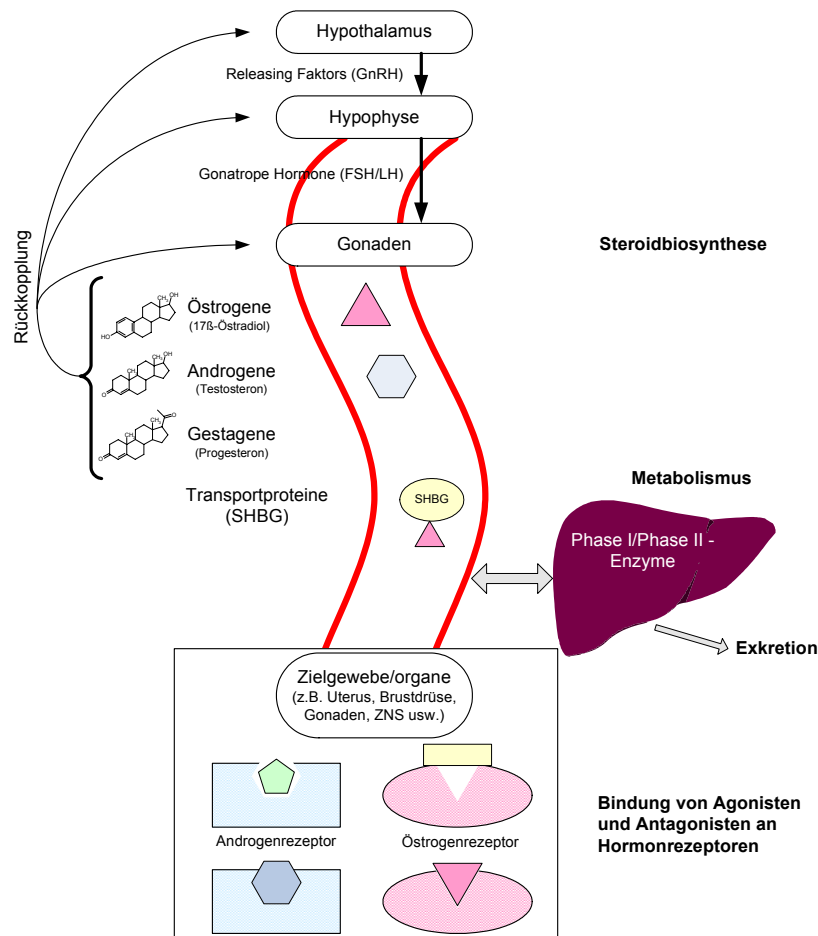


Abbildung 1: Strukturen des Hormonsystems: Ort der Steroidbiosynthese, Regelkreise (Rückkopplung), Transporter-, Metabolismus- und Rezeptorinteraktionen für Östrogene und Androgene. Modifiziert nach Abbildung aus Nachrichten aus der Chemie [Hock *et al.* 2000].

Abbildung 1 zeigt schematisch wie Geschlechtshormone gebildet, reguliert, metabolisiert und transportiert werden, sowie deren Wechselwirkung mit den Hormonrezeptoren im Zielgewebe.

Die östrogenartige Wirkung eines Fremdstoffs kann direkt am Östrogenrezeptor im Zielgewebe und/oder auch über die Östrogenrezeptoren im Gehirn erfolgen. An den Rezeptoren selber kann eine Substanz „agonistisch“ also östrogenartig wirken oder auch „antagonistisch“ (antiöstrogen) wirken. Das heißt, die Substanz kann an den Rezeptor binden und so ein Östrogen imitieren oder den Rezeptor besetzen, ohne selbst eine östrogene Wirkung auszulösen. Unterschiedliche Wirkungen entstehen aufgrund von Konformationsänderungen des Rezeptors, bedingt durch Struktur und Affinität der Liganden zum Rezeptor. Zudem ist die Wirkung noch davon abhängig, wieviel Östrogen bzw. Östrogen-imitierende Substanz im Organismus zirkulieren.

In der Mitte der 80er Jahre gelang es erstmalig, den Östrogenrezeptor zu klonieren [Green *et al.* 1986]. In den 90er Jahren wurde ein weiterer Östrogenrezeptor in Prostatagewebe von Ratten identifiziert [Kuiper *et al.* 1996]. Nachfolgend erfolgte die Einteilung in die beiden Östrogenrezeptorsubtypen α und β , die unterschiedlich stark in den verschiedenen Geweben exprimiert sind. ER α und ER β gehören zu den Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Nach Bindung einer östrogenen Substanz an den Östrogenrezeptor führt eine Ereigniskaskade zur Auslösung unterschiedlicher Funktionen u.a. zur Proliferation (siehe Lehrbücher der Zellbiologie).

1.2 Toxikokinetik

Gegenstand der Toxikokinetik ist die quantitative Untersuchung der Absorption (A), Verteilung oder Distribution (D), Metabolisierung (M) und Elimination (E) eines Stoffes sowie toxikologisch relevanter Metabolite im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit [Greim and Deml 1996]. Bei toxikokinetischen Studien werden Konzentrations-Zeit-Verläufe einer Substanz und/oder ihrer relevanten Metabolite in verschiedenen Körperkompartimenten ermittelt.

Die Aufnahme (Absorption) kann parenteral über die Kompartimente Haut, Atemorgane oder auch durch direkte Injektion (*i.v.*, *s.c.*, *i.m.*) erfolgen. Bei dieser Form der Aufnahme steht die Substanz meist unverändert im System zur Verfügung. Bei enteraler Aufnahme (*p.o.*) über den Gastrointestinaltrakt (GIT) hingegen kann bereits eine chemische Veränderung stattfinden. Einige Verbindungen werden auch erst durch den GIT bzw. darin enthaltene Enzyme aus einer „inaktiven“ Form freigesetzt (Liberation). Daher wird der Absorption manchmal noch die Liberation (L) vorangestellt. Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Begriff bei der Aufnahme von Fremdstoffen ist die Bioverfügbarkeit. Sie beschreibt den Dosisanteil, der die systemische Zirkulation erreicht. *Per os* verabreichte Substanzen sind meist geringer bioverfügbar als injizierte, weshalb auch die Wirkung bei *p.o.* Aufnahme geringer ist.

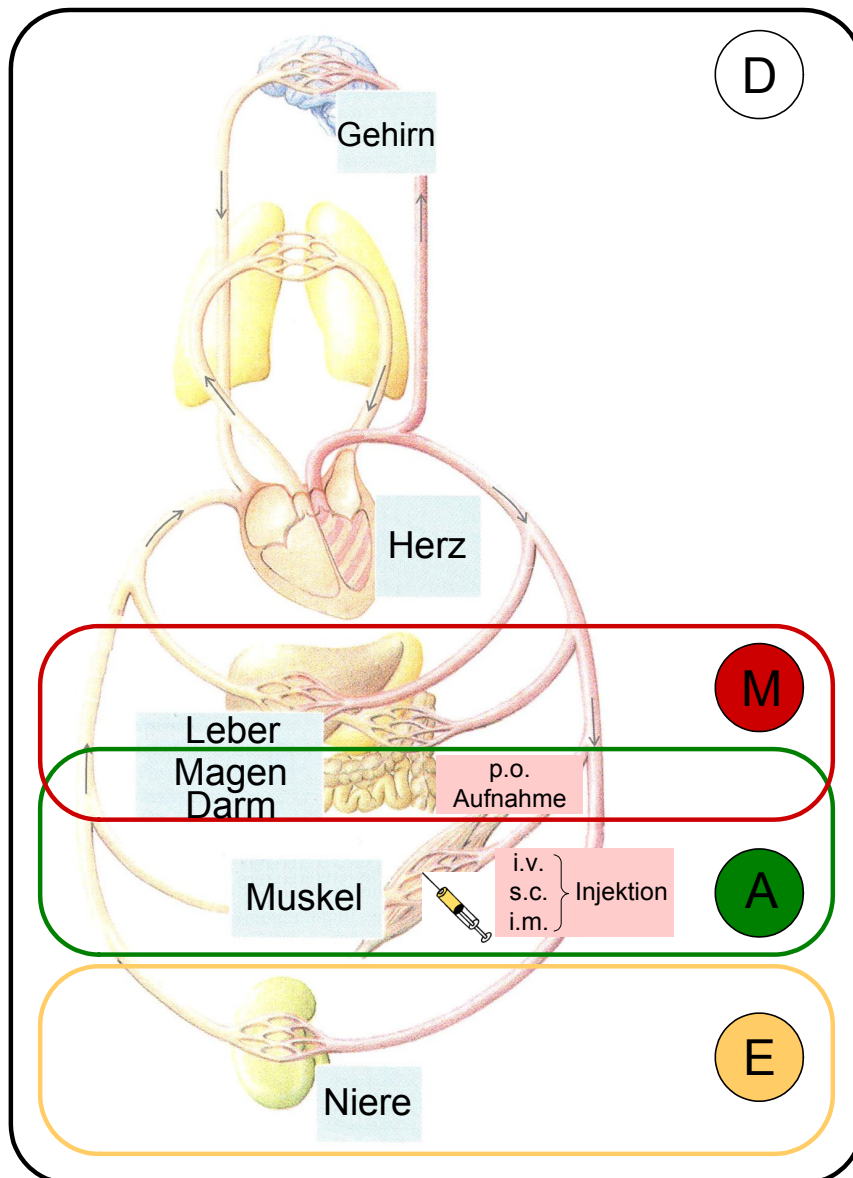


Abbildung 2: Absorption (A), Distribution (D), Metabolismus (M) und Elimination (E) von Fremdstoffen (Kreislaufskizze aus Taschenatlas der Pathophysiologie [Silbernagel and Lang 1998]).

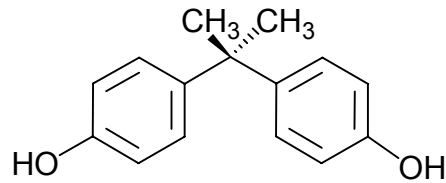
Die Verteilung (Distribution) einer Substanz erfolgt über den Blutkreislauf, wobei Sexualhormone meist an Transportmoleküle gebunden sind (z. B. *sex hormone binding globulin* SHBG). Eine Aufnahme in die Zelle kann durch passive Diffusion, konvektiven Transport mit Ionengradienten oder aktive Transporter erfolgen. Steroide sind lipophil und gelangen durch Diffusion in die Zellen. Bei der Diffusion durch Membranen spielt der Verteilungskoeffizient (z. B. $K_{\text{Octanol/Wasser}}$) eine bedeutende Rolle. So können lipophile Substanzen in den fetthaltigen Kompartimenten des Organismus akkumulieren.

Hauptort der Metabolisierung ist die Leber. Bei der Metabolisierung werden Umsetzungen durch Phase I - und Phase II - Enzyme unterschieden. Phase I - Enzyme katalysieren Funktionalisierungsreaktionen (z. B. Oxidationsreaktionen durch Cytochrom P450), während Phase II – Enzyme die Konjugationsreaktionen (z. B. Einführung eines Glucuronsäurerestes durch UDP-Glucuronosyltransferasen oder eines Sulfatrestes durch Sulfotransferasen) katalysieren. Diese Reaktionen dienen der Detoxifizierung bzw. der Verbesserung der Wasserlöslichkeit von Fremdstoffen.

Bei der oralen Aufnahme einer Substanz kann diese z. B. bereits in der Darmwand metabolisiert werden oder nachdem sie aus dem Magen-Darmtrakt durch die Pfortader zur Leber gelangt ist. Die meisten Substanzen unterliegen in der Leber einer ausgeprägten Biotransformation. Man spricht auch vom so genannten „first pass“ Effekt, wenn die Substanzen nicht mehr unverändert in den großen Kreislauf gelangen und damit im Körper nicht mehr zur Verfügung stehen. Einer der Ausscheidungswege der Leber ist die Galle. Es werden Moleküle ab einem gewissen Molekulargewicht und/oder einer gewissen Polarität über die Galle ausgeschieden: Je nach Spezies sind dies beim Menschen Substanzen mit einem Molekulargewicht über ~475 g/mol bzw. bei der Ratte über ~300 g/mol; kleinere Moleküle werden vorwiegend renal ausgeschieden [Nau 1994]. Substanzen mit „Glucuronidgewichten“ zwischen 300 und 475 g/mol können bei der Ratte über die Galle in den Darm ausgeschieden, dort durch bakterielle Enzyme gespalten und so, wieder lipophiler geworden, erneut resorbiert werden (enterohepatische Rezirkulation), während sie beim Menschen primär über die Niere eliminiert werden. Die Elimination einer Substanz über den Urin und den Stuhl kann daher trotz vergleichbarer Umwandlung in Metabolite Spezies-spezifische Unterschiede aufweisen.

1.3 Bisphenol A (CAS 80-05-7)

Bisphenol A (kurz BPA) ist eine Substanz anthropogenen Ursprungs mit östrogener Wirkung (sog. Xenoöstrogen). Die folgende Abbildung zeigt die Strukturformel und einige physikalische Daten.



Sys. Name (Synonyme):	2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan (4,4'-Dihydroxydiphenylpropan / 4,4'- Isopropylidendiphenol)
Molmasse	228,3 g/mol
Schmelzpunkt	153-156°C
Siedepunkt	360°C
log $K_{\text{Octanol/Wasser}}$	3,4
log $K_{\text{Fett/Blut}}$	3,3 [Csanady <i>et al.</i> 2002]

Abbildung 3: Strukturformel und physikalische Daten von Bisphenol A [Fluka 2006, O'Neil *et al.* 2004].

1.3.1 Herstellung, Eigenschaften und Verwendung

Bisphenol A wird durch säurekatalysierte Reaktion von Phenol mit Aceton hergestellt. Die weltweite Jahresproduktion von BPA lag im Jahr 2000 bei 1,6 Mio. Tonnen und sollte bis zum Jahr 2005 um 50 % erhöht werden [Bühning J. 2000]

Der farblose, kristalline Feststoff mit phenolischem Geruch dient hauptsächlich als Kopolymer bei der Herstellung von Epoxid-, Polycarbonat- und Styrol-Polyester-Harzen. Weiter finden Produkte auf der Basis von BPA Anwendung als Fungizide, Antioxidantien, PVC-Stabilisatoren und Flammschutzmitteln. Für letztere Anwendung wird tetrabromiertes BPA verwendet [Kitamura *et al.* 2002]. Hauptprodukte aus BPA sind aber Polycarbonate (PC), die durch Reaktion von Phosgen mit BPA hergestellt werden.

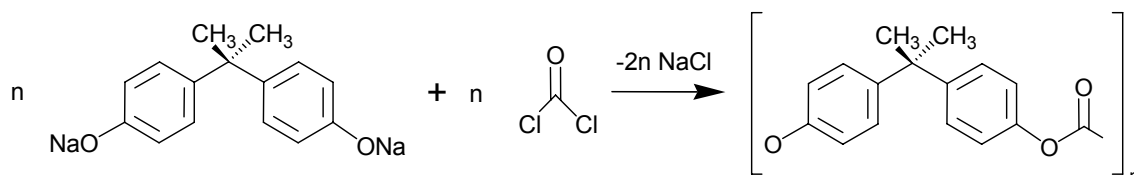


Abbildung 4: Reaktionsgleichung zur Herstellung von Polycarbonat.

Wegen der guten optischen Eigenschaften findet dieser Kunststoff vielfältige Anwendung. So werden z. B. Schutzbrillen und Compact Disks aus PC gefertigt. Aber auch die Schlagfestigkeit dieses Polymers hat ihn für viele Anwendungen wie z. B. Babyflaschen,

Trinkbecher oder Kunststoffgeschirr geradezu prädestiniert. In der Form des Epoxidharzes findet BPA als Beschichtung von Konservendosen und als Methacrylat in der Zahnmedizin für Füllungen Verwendung [Atkinson *et al.* 2002, European Union 2003, Scientific Committee on Food 2002].

1.3.2 Exposition, Metabolismus und Toxizität

Die Exposition der Normalbevölkerung erfolgt hauptsächlich durch Verpackungsmaterialien aus BPA-haltigen Kunststoffen oder durch Zahnfüllungen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über mögliche Expositionsquellen.

Tabelle 1: Expositionsquellen für Bisphenol A.

Bisphenol A aus	Ermittelte Menge	Literatur
Beschichtungen von Weinfässern	9 µg/kg (Wein)	Lambert and Larroque 1997
Frischhaltefolie	40-500 mg/kg Folie bzw. 3-31 µg/dm ²	Lopez-Cervantes and Paseiro-Losada 2003
Kaffeeautomatenbehälter	0-42 µg/Becher (im Mittel 6 µg/Becher)	Matsumoto <i>et al.</i> 2003
Konservendose (Innenbeschichtung)	33 µg/Behälter	Brotos <i>et al.</i> 1995
Babyflaschen	neu: 0,23 µg/l, gebraucht: 8,4 µg/l, sehr alt: 6,7µg/l (alle 1 h bei 100 °C inkubiert)	Brede <i>et al.</i> 2003
Babyflaschen	gebraucht: 3,4 ng/cm ² (80 °C) bzw. 0,7 ng/cm ² (25 °C)	Tan and Mustafa 2003
Zahnfüllung/ Kunststoffkronen	n.d.-1,16µg/mg Zahnfüllung je nach Material und pH-Wert	Pulgar <i>et al.</i> 2000
Zahnfüllung/ Kunststoffkronen	3,3-30 µg/mL Speichel 1 h nach Einsatz einer 50 mg Füllung	Olea <i>et al.</i> 1996*
Babynahrung	45-113 µg/kg	Kuo and Ding 2004
Nahrungsmittel (verschiedene)	7 µg/kg bis 380 µg/kg (in einer Fleischprobe)	Goodson <i>et al.</i> 2002

* mehrere Kritiken zur Methode und zu den sehr hohen ermittelten Werten (z. B. von Ashby)

Im Mittel lässt sich daraus eine Exposition von ~0,5 µg/kg KG (28,8 µg/Tag bei 60 kg KG) für einen Erwachsenen abschätzen [Scientific Committee on Food 2002]. Je nach Ernährung kann diese jedoch stark variieren.

Nach oraler Aufnahme von BPA wird es im Dünndarm resorbiert, gelangt über den Blutstrom zur Leber und wird dort metabolisiert (erreicht also grösstenteils nicht mehr unverändert den systemischen Blutkreislauf). Viele der möglichen gebildeten Metabolite wurden bereits identifiziert und sind in Abbildung 5 dargestellt [Atkinson and Roy 1995a,

Atkinson and Roy 1995b, Edmonds *et al.* 2004, Elsby *et al.* 2001, Nakagawa and Suzuki 2001].

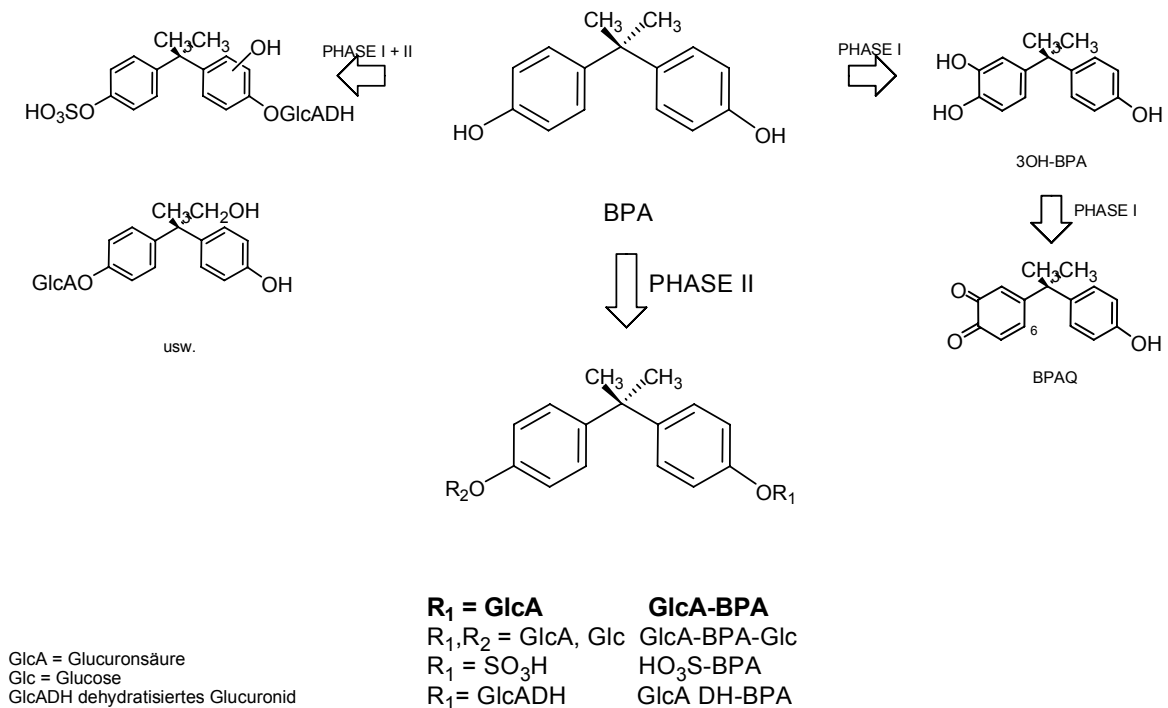


Abbildung 5: Beispiele für BPA-Metaboliten

Der Hauptmetabolit von BPA ist das Monoglucuronid [Pritchett *et al.* 2002]. Je nach Tierart erfolgt nach der Metabolisierung dann die weitere Ausscheidung über die Galle in den Darm (Ratten) oder über die Nieren (Affen). Bei der Ratte wird der Hauptmetabolit zunächst über die Galle ausgeschieden und nach enzymatischer Spaltung im Darm erneut aufgenommen [Kurebayashi *et al.* 2003]. Diese enterohepatische Rezirkulation spielt dagegen beim Affen und beim Menschen keine grosse Rolle [Kurebayashi *et al.* 2002, Negishi *et al.* 2004b]; vielmehr ist gezeigt worden, dass BPA beim Menschen mit über 95 % als Glucuronid im Urin ausgeschieden wird [Völkel *et al.* 2002].

Weitere BPA Metabolite von untergeordneter Bedeutung sind das Sulfat und das 3-OH-BPA, das zum Chinon (BPAQ) weiter oxidiert werden kann [Domoradzki *et al.* 2003, Nakagawa and Suzuki 2001, Sakamoto *et al.* 2002, Zalko *et al.* 2003]. Aber auch Methoxylate und gemischte Formen aus Phase I- und Phase II-Metabolismus treten auf. Ein hier nicht abgebildeter vor kurzem identifizierter Metabolit ist das 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxy-phenyl)pent-1-en (MBP). Es wird über eine Isopropylidenradikal-Zwischenstufe von Rattenleber S9 Mix gebildet und zeigt im Hefezellenassay eine deutlicher ausgeprägte östrogene Potenz als BPA [Yoshihara *et al.* 2004] (s.u.).

Die Elimination von BPA aus Rattenplasma erfolgt in mehreren Phasen: Die terminalen Halbwertszeiten liegen bei ~40 h [Kurebayashi *et al.* 2003, Upmeier *et al.* 2000] und die initialen Halbwertszeiten bei 30-60 min [Shin *et al.* 2002, Yoo *et al.* 2000]. Beim Menschen konnte eine schnelle Ausscheidung belegt werden, die Halbwertszeit für den Menschen liegt bei ungefähr 3 h [Colnot 2001, Völkel *et al.* 2002].

Die akute orale Toxizität von BPA ist gering. So traten bei oraler Applikation von 2000 mg/kg KG an SD-Ratten erste Vergiftungserscheinungen (Lethargie usw.) auf, während bei 5000 mg/kg KG alle weiblichen und teilweise auch die männlichen Tiere verstarben. Diese und weitere Studien an Fischer Ratten ergaben eine LD₅₀ von 3,2 –5,0 g/kg KG (Ratte) [NTP 1982, European Union 2003b].

Die Inhalation von 5 mg BPA/m³ Luft verursachte bei Ratten lokale reversible Effekte (Reizungen) im Nasen- und Rachenraum. Die höchstmögliche Exposition gegen 170 mg/m³ ergab keine Zunahme der Todesfälle [Dow Chemical Co 1988, European Union 2003a]. Daher wurde die maximale Arbeitsplatzkonzentration auf 5 mg/m³ festgelegt.

In einem 2 Jahre Lebenszeitversuch zur Kanzerogenität fanden sich bei den mit täglich mit 74 mg/kg KG und 148 mg/kg KG BPA gefütterten Ratten keine signifikant erhöhten Tumor-Inzidenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich verringerte Körpergewichte und eine verringerte Futteraufnahme wurden festgestellt [NTP 1982].

In Studien zur Reproduktionstoxizität bei der Ratte wurde zwar eine Reduktion der Gewichtszunahme der Muttertiere bei Applikation via Schlundsonde von 160-640 mg/kg KG gefunden, aber kein erhöhtes Absterben der Föten [Morrissey *et al.* 1987]. Kim *et al.* (2001) fanden in der höchsten Dosisgruppe (1000 mg/kg KG *p.o.*) neben akut toxischen Effekten am Muttertier auch Schwangerschaftsprobleme wie reduzierte Wurfgröße, Fehlbildungen und reduziertes Fötengewicht. Bei 300 mg/kg KG fanden sie noch ein reduziertes Fötengewicht, während die Tiere der 100 mg/kg KG Gruppe keine Zeichen von maternaler oder fötaler Toxizität aufwiesen. Ema *et al.* (2001) und Tyl *et al.* (2002) stellten in Mehrgenerationen Studien an Ratten keine systemische Toxizität (z. B. Veränderung des Körpergewichtes) unterhalb von 50 mg/kg KG fest. Die hohe Dosis von 500 mg/kg KG führte jedoch zu einer signifikanten Verringerung der lebenden Nachkommen im Wurf.

Trotz der schwachen östrogenen Aktivität von BPA werden von einigen Autoren Einflüsse auch geringer Mengen BPA auf die neuronale Entwicklung und damit das Sexualverhalten der Nachkommen diskutiert [Kubo *et al.* 2003, Porrini *et al.* 2005]. Andere Studien wie die von Negishi *et al.* (2004a) zeigte keine Verhaltensveränderung im Open-Field-Test; andererseits stellte Negishi *et al.* eine Beeinflussung des Verhaltens bei Angst auslösenden Stimuli

fest. Insgesamt lässt sich das Gebiet der Verhaltensbeeinflussung aber nur schwer fassen und ist ebenso umstritten wie andere Befunde zu Wirkungen geringerer BPA Dosen [Gray *et al.* 2004, Goodman *et al.* 2006].

Die östrogene Aktivität von BPA ist schon seit seiner Synthese bekannt (s.u.). Spätere Bedenken löste dann das Austreten von BPA aus verschiedenen Kunststoffen aus: So fand Krishnan *et al.* (1993) eine an den ER bindende Substanz (BPA), die aus Polycarbonat Zellkulturflaschen in das autoklavierten Medium austrat. Daraufhin wurden in den 90er Jahren verstärkt *in vitro* Testverfahren zur Prüfung auf östrogene Aktivität für viele verschiedene Stoffe eingesetzt [Gaido *et al.* 1997, Kuiper *et al.* 1998, Han *et al.* 2002]. Die Ergebnisse der einzelnen Tests variieren teils deutlich und zeigen auch eine gewisse Abhängigkeit vom Testsystem. Auch BPA und seine Metabolite sind hinsichtlich östrogenen „Potenz“ untersucht worden (siehe Tabelle 2).

Als schwach, aber noch vergleichsweise gut an den Östrogenrezeptor bindend erwies sich das unveränderte BPA [Kuiper *et al.* 1998]; wobei es schwächer an den Subtyp α als an den Subtyp β des Rezeptors bindet [Matthews *et al.* 2001]. Die übrigen BPA-Metabolite zeigten noch deutlich geringe Affinität für den ER als das BPA. BPA-Glucuronid hatte eine drei bis achtfach geringere östrogene Wirkung (je nachdem, ob mit humanen- oder Ratten-Lebermikrosomen zur Glucuronidierung inkubiert wurde) und 5-OH-BPA zeigte im Hefezellen-Östrogenitätstest eine achtfach geringere Wirkung als BPA selbst [Elsby *et al.* 2001].

Tabelle 2: Östrogene Potenz von BPA und BPA-Metaboliten in verschiedenen Testsystemen.

Substanz	Hefezellenassay ¹ EC50, nM [Elsby <i>et al.</i> 2001]	Hefezellenassay ¹ EC50, nM [Yoshihara <i>et al.</i> 2004]	Rezeptor Bindungsassay ² EC50, nM [Snyder <i>et al.</i> 2000]	kompetitiver Bindungsassay ³ IC50, nM [Nakagawa and Suzuki 2001]	Proliferationsassay ⁴ , nM [Shimizu <i>et al.</i> 2002]
DES				25 (ER α)	
17 β Östradiol	0,043	1,1	1,9 (ER α) 10 (ER β)		0,03
BPA	780	160000	640 (ER α) 890 (ER β)	10000 (ER α)	3
5OH-BPA	6100				
3OH-BPA				5000 (ER α)	
BPA +humane Leber- mikrosomen -UGT	2700				
BPA +humane Leber- mikrosomen +UGT	6500				
BPA Glucuronid			> 10000		
BPA Sulfat					>100
MBP		710			

- (1) Hefezellenassay: ermittelt wird die EC50, d.h. die Konzentration, welche zu 50% der maximalen Aktivität führt. Basierend auf Routledge und Sumpter (1996).
- (2) Rezeptor Bindungsassay: HepG2 Zellen sind transfiziert mit C3 Luciferase und ER α oder ER β . Die EC50 wird bestimmt für die Aktivierung des Rezeptors und indirekt ermittelt über die Luciferaseaktivität.
- (3) Kompetitiver Rezeptor Bindungsassay: Ermittelt die IC50 aus der Competition um die Bindung mit dem ER α zwischen fluorescein gelabeltem 17 β Östradiol und der jeweiligen Testsubstanz.
- (4) Proliferationsassay mit MCF7 (Brustkrebszelllinie): Ermittelt wird die Konzentration, ab der die Proliferation signifikant ansteigt.

Insgesamt bleiben die BPA-Metabolite bezüglich ihrer östrogenen Potenz weit unter der ohnehin geringen östrogenen Potenz der Ausgangsverbindung. Eine Ausnahme bildet MBP, das eine stärkere östrogene Wirkung als BPA aufweist. Allerdings spielt dieser Metabolit hinsichtlich der gebildeten Mengen nur eine untergeordnete Rolle [Yoshihara *et al.* 2004].

Zusammenfassend bleibt also das unverstoffwechselte BPA(Aglycon) der interessanteste Dosis-Anteil für eine toxikologische Bewertung.

In vivo zeigt BPA je nach Applikationspfad unterschiedlich ausgeprägte östrogene Effekte. So fanden bereits Dodds and Lawson (1936) bei zweimaliger *s.c.* Injektion von 100 mg BPA an ovariektomierten Ratten eine verstärkte vaginale Kornifikation. Bornmann and Loeser (1959) zeigten mit 2,4 g/kg KG BPA *s.c.* die Auslösung des Östrus an ovariektomierten Ratten. Ashby and Tinwell (1998) fanden bei nicht geschlechtreifen Ratten östrogene

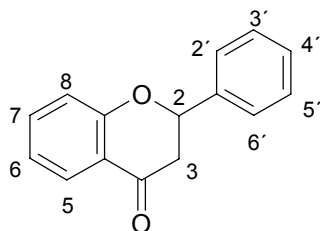
Wikungen (Vaginalöffnung) nach *s.c.* Injektion von 600 mg/kg/Tag, während *p.o.* Gabe von bis zu 800 mg/kg/Tag diesen Effekt (Vaginalöffnung) nicht zeigte. In allen Dosisgruppen d.h. 400-800 mg/kg /Tag fanden sich jedoch signifikant erhöhte Uterusgewichte, stärker ausgeprägt bei *s.c.* als bei *p.o.* Gabe. Diel *et al.* (2000) fanden eine signifikante Erhöhung der Uterusgewichte nach *p.o.* Applikation von 200 mg/kg KG BPA an ovariectomierte DA/Han Ratten während 50 mg/kg KG zu keiner messbaren Erhöhung führte. Yamasaki *et al.* (2000) fand in einem anderen Rattenstamm erhöhte Uterusgewichte nach der *p.o.* Gabe von 160 mg/kg KG und bei *s.c.* Applikation noch bei 40 mg/kg KG.

Ein sehr wichtiger Einflussfaktor ist also der Applikationspfad (oral oder parenteral). Ferner kann auch das gewählte Tiermodell gewisse Unterschiede in der Sensitivität aufweisen [Diel *et al.* 2004, Kurebayashi *et al.* 2002, Kurebayashi *et al.* 2003, Negishi *et al.* 2004b, Pottenger *et al.* 2000, Takahashi and Oishi 2003]. Dies muss bei der Übertragung von Ergebnissen von Tierstudien auf den Menschen berücksichtigt werden.

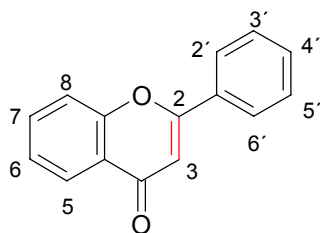
Wesentlich für die Wirkung einer Substanz sind Konzentrationen in Zielgeweben sowie mögliche Anreicherungen. *In vitro* Studien zur Verteilung von BPA zwischen Blut und verschiedenen Geweben zeigten erwartungsgemäss eine Anreicherung in lipidreichen Geweben [Csanady *et al.* 2002].

1.4 Genistein (CAS 446-72-0) und Daidzein (CAS 486-66-8)

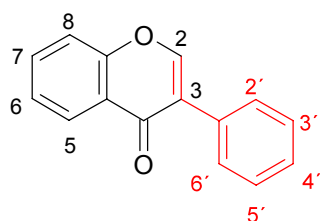
Die Isoflavone Genistein und Daidzein sind Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogener Wirkung (Phytoöstrogene). Sie gehören zu den Polyphenolen und lassen sich in die Gruppe der Flavonoide einordnen. Die Gruppe der Flavonoide wird aufgrund von Strukturmerkmalen in die Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und die Isoflavonoide unterteilt. Zu letzteren zählen Genistein, Daidzein, Biochanin A und Formononetin [Head 1998, Watzl and Rechkemmer 2001]. Abbildung 6 zeigt die Grundstruktur der Flavanone, Flavone und Isoflavone.

Flavanone

Flavanon
Naringenin: 4', 5, 7-Trihydroxyflavanon

Flavone

Flavon
3-Hydroxyflavon
5-Hydroxyflavon
7-Hydroxyflavon
3, 7-Dihydroxyflavon
Chrysin: 5, 7-Dihydroxyflavon
Kaempferol: 3, 4', 5, 7-Tetrahydroxyflavon

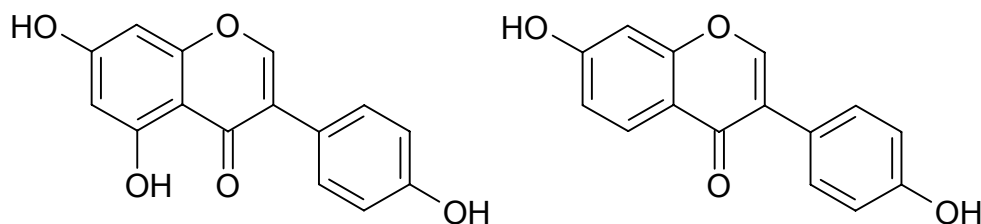
Isoflavone

4', 7-Dihydroxyisoflavone
(Daidzein)
7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone
(Formononetin)
4', 5, 7-Trihydroxyisoflavone
(Genistein)
5, 7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone
(Biochanin A)

Abbildung 6: Grundstruktur der Flavanone, Flavone und Isoflavone.

Die Funktionen der Flavonoide in den Pflanzen sind vielfältig und sehr unterschiedlich. So werden unter anderem Funktionen als Signalsubstanzen [Rolfe 1988] diskutiert oder insbesondere für die östrogenartig wirkenden Pflanzeninhaltsstoffe eine Funktion zur Populationskontrolle von Frassfeinden [Bennetts *et al.* 1946] also quasi „orale Kontrazeption“ für Weidetiere.

Die Isoflavone Genistein und Daidzein sind aufgrund ihrer östrogenen Wirkung von besonderem Interesse. Die folgende Abbildung zeigt die Strukturformeln sowie einige physikalischen Daten der beiden östrogen aktiven Substanzen.



	Genistein	Daidzein
Sys. Name	4',5,7-Trihydroxyisoflavon	4',7-Dihydroxyisoflavon
Molmasse	270,2 g/mol	254,2 g/mol
Schmelzpunkt	297-308°C	290-300°C
Siedepunkt	n.d.	n.d.
log $K_{\text{Octanol/Wasser}}$	2,84 *	2,55 *
log $K_{\text{Fett/Blut}}$		0,3 [Csanady <i>et al.</i> 2002]

Abbildung 7: Strukturformeln und physikalische Daten von Genistein und Daidzein [Fluka Chemikalienkatalog, O'Neil *et al.* 2004].

(*Die log $K_{o/w}$ Werte wurden auf URL http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm berechnet.)

1.4.1 Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung

Genistein zählt ebenso wie Daidzein zu den natürlich vorkommenden Stoffen mit östrogener Wirkung. Beide Verbindungen kommen in einer Vielzahl von Pflanzen vor. Die Sojabohne enthält die größten Mengen und ist somit die Hauptquelle der Isoflavonaufnahme, aber auch andere pflanzliche Produkte enthalten Isoflavone, allerdings in geringeren Mengen.

In der Pflanze kommen Daidzein und Genistein hauptsächlich als Malonylglucosid, aber auch als Acetylglucosid, Glucosid (Daidzin und Genistin) und in geringen Mengen als Aglycon vor [Franke *et al.* 1998]. Die Anteile der verschiedenen Zuckerkonjugate variieren je nach pflanzlichem Produkt [Song *et al.* 1998]. Eine weitere Quelle für Daidzein und Genistein sind die pflanzlichen Verbindungen Biochanin A und Formononetin; sie werden im Darm und in der Leber demethyliert [Hur and Rafii 2000, Tolleson *et al.* 2002]. Eine umfassende Datenbank zu Nahrungsmittelgehalten findet man unter dem „Venus Projekt“ (Vegetal Estrogens in NUtrition and Skeleton) (URL:<http://dascmx.omnihost02.omnibit.it/yoa/venus/framedeliv.htm>). Danach enthalten fast alle pflanzlichen Lebensmittel Isoflavone; eine Ausnahme bilden Bananen, Äpfel, Kartoffeln und Citrusfrüchte mit nicht nachweisbaren Mengen an Isoflavonen.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Isoflavongehalte verschiedener Lebensmittel.

Tabelle 3: Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A Gehalte verschiedener Lebensmittel
(Auszug aus Reinli and Block 1996 und Venus Datenbank in µg/g Feuchtgewicht).

Lebensmittel	Daidzein [µg/g]	Genistein [µg/g]	Formononetin [µg/g]	Biochanin A [µg/g]	Literatur
Alfalfa Sprossen	n.d.	n.d.	Spuren	Spuren	Saloniemi <i>et al.</i> 1995
Bananen	n.d.	n.d.	-	-	Mazur 1998
Erbsen grün	73	n.d.	Spuren	n.d.	Franke <i>et al.</i> 1994
Erdbeeren frisch	0,045	0,457	-	-	Liggins <i>et al.</i> 2000
Erdnüsse geröstet	0,037	0,172	-	-	Liggins <i>et al.</i> 2000
Klee Sprossen	n.d.	4	22,8	4,4	Franke <i>et al.</i> 1994
Kidney Bohnen	n.d.	n.d.	n.d.	4,1	Franke <i>et al.</i> 1994
Orangen	n.d.	n.d.	-	-	Liggins <i>et al.</i> 2000
Pilsener Urquell	0,0006	0,0018	0,0040	0,0013	Lapcik <i>et al.</i> 1998
Sojabohnen	676-1007	612-1382	n.d.	n.d.	Franke <i>et al.</i> 1994
Soja Isolat	215-271	374-557	-	-	Coward <i>et al.</i> 1993
Sojamilch	130	92	-	-	Wang <i>et al.</i> 1990
Soja Sprossen	75	330	-	-	Murphy 1982
Tofu	113	166	n.d.	n.d.	Franke <i>et al.</i> 1994

n.d. not detected

In der Aglycon-Form handelt es sich bei den Isoflavonen um einen weiß-gelblichen kristallinen Feststoff ohne Geruch, der gut in Alkoholen sowie organischen Lösungsmitteln, in Wasser aber nur gering löslich ist.

Die Verwendung von Soja ist vielfältig: Sojasprossen, Tofu und Miso sind beliebte Bestandteile asiatischer und vegetarischer Kost. Soja liefert einen hohen Proteinanteil bei niedrigem Fettgehalt und findet beispielsweise als Sojaproteinisolat (SPI) bei Sportlern zum Muskelaufbau Verwendung. Auf Sojaprodukte (Sojamilch als Säuglingsnahrung) wird zurückgegriffen, wenn wegen einer Kuhmilch-Allergie auf tierische Milchprodukte verzichtet werden muss.

Immer häufiger werden Isoflavon-Präparate (aus Soja und andere) aufgrund ihrer östrogenen Eigenschaften auch als sogenannte „alternative Hormonersatztherapie“ eingesetzt. Diese Anwendung und eine Wirksamkeit sind jedoch nicht unumstritten [Wuttke *et al.* 2003]. Interesse besteht auch an einem Einsatz von Daidzein und Genistein zur Tumorprävention und Tumortherapie [Barrett 2006]. Hier werden sowohl Hormonrezeptor-abhängige wie auch Rezeptor-unabhängige Mechanismen diskutiert. So zeigten *in vitro* Studien mit Genistein z.B. eine Inhibition der Topoisomerase II, Hemmwirkungen auf die Angiogenese und antioxidative Effekte [Polkowski and Mazurek 2000, Fotsis *et al.* 1993, Wei *et al.* 1996]. In Versuchen mit Brustkrebs-Zellkulturen (MCF-7 Zellen) findet man konzentrationsabhängig sowohl pro-

liferationsfördernde als auch proliferationshemmende Wirkungen von Daidzein und Genistein, mit Zellzyklusarrest bei hohen Konzentrationen [Cappelletti *et al.* 2000, Ju *et al.* 2006; Matsukawa *et al.* 1993, Miodini *et al.* 1999, Zava and Duwe 1997, Zhou *et al.* 1998]. Allerdings ist fraglich, ob *in vitro* wirksame Konzentrationen (oft im μM Bereich) selbst bei Isoflavon-reicher Ernährung *in vivo* erreicht werden [Mathey *et al.* 2006]. In epidemiologischen Studien sind u.a. geringere Brustkrebsraten in asiatischen Ländern wiederholt in Zusammenhang mit dem dort üblichen, höheren Sojaverzehr gebracht worden [Knekt *et al.* 1997, Wu *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2004]. Doch eine grosse Metaanalyse aus jüngster Zeit findet nur eine moderate Assoziation zwischen Sojaaufnahme und reduziertem Brustkrebsrisiko [Trock *et al.* 2006]; die Autoren halten daher (und angesichts einiger adverser Wirkungen in tierexperimentellen Studien) den Einsatz von Isoflavon-Nahrungsupplementen zur Prävention für verfrüht.

1.4.2 Exposition, Metabolismus und Toxizität

Die Aufnahme von Isoflavonen ist stark von der Art der Ernährung abhängig. Tabelle 4 zeigt die durch Erhebung der Nahrungsgewohnheiten in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ermittelten Isoflavonaufnahmen. Dabei wird deutlich, dass die Isoflavonaufnahme bei Japanern (Asiaten) etwa 50-fach höher ist als bei der „westlichen“ Bevölkerung. So liegt die tägliche Isoflavon-Aufnahme bei typisch westlichen Ernährungsgewohnheiten im unteren einstelligen mg Bereich, bei Asiaten dagegen im mittleren zweistelligen mg Bereich. Sehr hohe Aufnahmen haben Kleinkinder mit Kuhmilchallergie, die Babynahrung auf Sojabasis erhalten [Setchell *et al.* 1997, Setchell *et al.* 1998a]. Hier können die Isoflavon-Dosen, bezogen auf das Körpergewicht, sogar über denen der asiatischen Bevölkerung liegen.

Tabelle 4: Isoflavonaufnahme in verschiedenen Populationen.

Studie / Publikation	[Horn-Ross <i>et al.</i> 2000]	[De Kleijn <i>et al.</i> 2001]	[Boker <i>et al.</i> 2002]	[Arai <i>et al.</i> 2000]
Ethnische Gruppe	Amerikaner (Weiße, Latinos und Afro-Amerikaner)	Amerikaner (weiße Frauen)	Niederländer (weiße Frauen)	Japanerinnen
Personenzahl n=	447	964	17140	106
Alter [Jahre]	50-79	35-81	50-69	-
	mg/Tag	mg/Tag	mg/Tag	mg/Tag
Daidzein	1,48	0,29	0,37	16,42
Genistein	1,28	0,34	0,42	30,15
Formononetin	0,08	0,12	0,09	-
Biochanin A	0,03	0,01	0,001	-
Summe	2,9	0,8	0,9	46,6

Nach Aufnahme der Phytoöstrogene (Konjugate und Aglycone) erfolgt nur in geringem Umfang eine säurekatalysierte Spaltung der Konjugate im Magen, aber eine enzymatische Hydrolyse durch β -Glucosidasen im Dünndarm, wo ein Teil der Isoflavone dann auch resorbiert wird. Die Aglycone können bereits nach 15 min im Plasma nachgewiesen werden [Day *et al.* 1998, Rowland *et al.* 1999, Slavin *et al.* 1998]. Meist zeigt sich ein biphasischer Plasma-verlauf, der von einigen Autoren auf eine enterohepatische Rezirkulation zurückgeführt wird [King and Bursill 1998, Setchell *et al.* 2001, Sfakianos *et al.* 1997]. Andere vermuten jedoch, dass zunächst in geringerem Umfang eine Isoflavonaufnahme über den Dünndarm erfolgt und anschließend der größere Teil im Colon resorbiert wird [Franke *et al.* 2004, Rüfer 2006]. Im Dickdarm erfolgt auch die von Darmbakterien katalysierte Umwandlung von Daidzein und Genistein zu reduktiven Metaboliten [Bowey *et al.* 2003].

Die Isoflavone gelangen zunächst als Aglycone in die Blutzirkulation. Die in pflanzlicher Nahrung vorliegenden Glucoside sind im Plasma nicht nachweisbar [Setchell *et al.* 2002]. Die Isoflavon-Aglycone können teilweise bereits in den Darmzellen metabolisiert werden [Day *et al.* 1999, Sfakianos *et al.* 1997] oder sie gelangen über den Blutkreislauf in die Leber, wo UDP-Glucuronosyltransferasen und/oder Sulfotransferasen die Isoflavone mit Glucuronsäure- und/oder Sulfonatresten verknüpfen [Doerge *et al.* 2000]. Reine Sulfatkonjugate werden nur in sehr geringem Maße gebildet [Pritchett *et al.* 2002]. Die Hauptmetabolite sind gemischt

konjugierte Isoflavone, die anschließend ausgeschieden werden [Adlercreutz *et al.* 1995b, Heinonen *et al.* 2003].

Neben den Konjugaten werden über Phase I Reaktionen auch reduzierte oder oxidierte Produkte gebildet. Dabei führt der reduktive Metabolismus (zumeist durch Darmbakterien) zum Um- bzw. Abbau des Isoflavons, das zum Dihydroisoflavon und anschließend weiter zum Equol (beim Daidzein) oder p-Ethylphenol (beim Genistein) reduziert wird [Chang and Nair 1995, Coldham *et al.* 2002]. Abbildung 8 zeigt die gebildeten Hauptmetabolite.

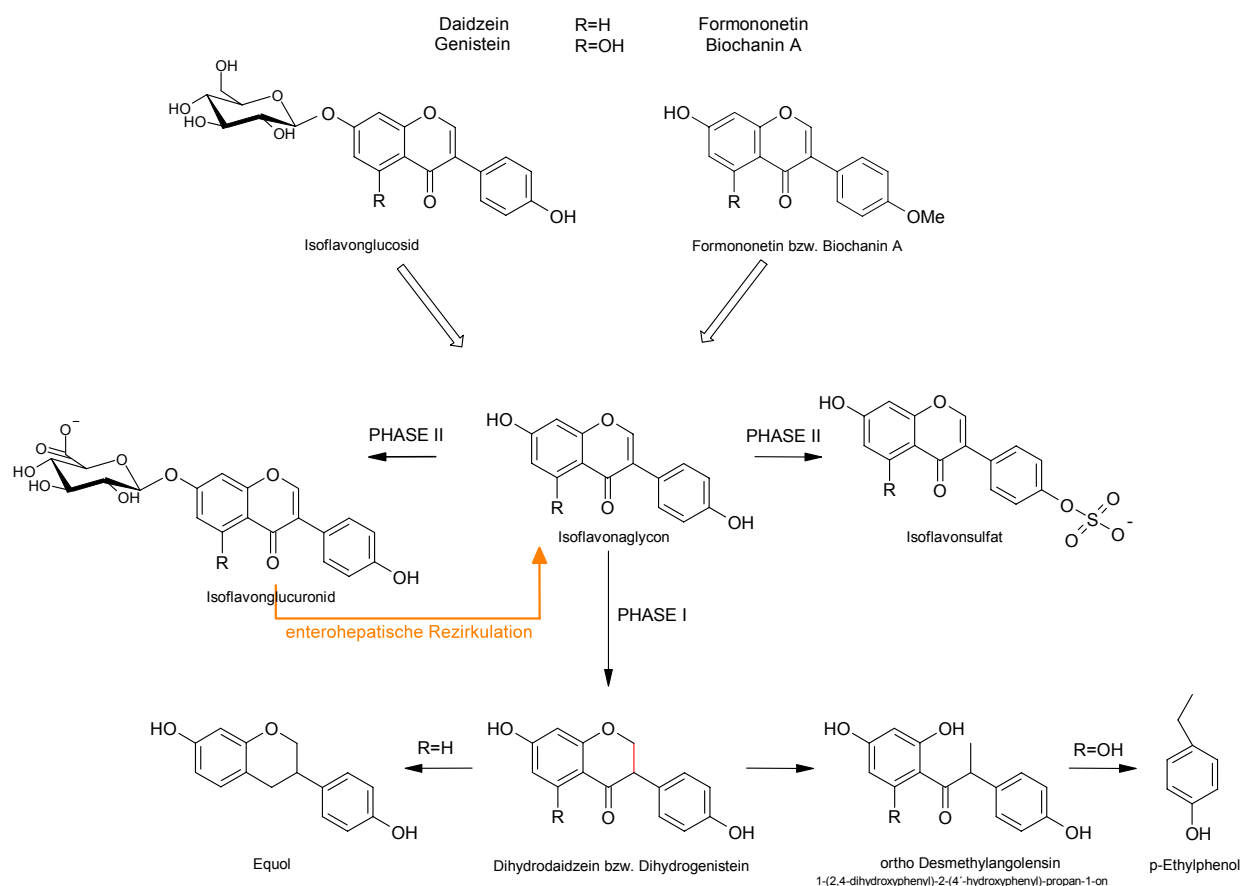


Abbildung 8: Metabolismus der Isoflavone (gezeigt sind Hauptmetabolite).

Durch oxidative Phase I Reaktionen können noch weitere Metabolite gebildet werden. Dabei findet eine Oxidation vorwiegend an den aromatischen Systemen statt, wobei sich mono-, di- und trihydroxylierte Isoflavone bilden [Heinonen *et al.* 2003, Kulling *et al.* 2002, Rüfer 2006]. Aufgrund der geringen Bildungsrate und ihrer geringeren östrogenen Potenz spielen diese Metabolite jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

Bei der Ratte erfolgt die Ausscheidung der Isoflavon-Konjugate (hauptsächlich Glucuronide) vor allem über die Galle in den Darm, wo die Spaltung durch Darmbakterien in Aglykone und

eine erneute Aufnahme erfolgen kann; daneben ist auch eine renale Ausscheidung möglich. Beim Menschen werden die Konjugate aufgrund ihrer molaren Masse hingegen stärker renal eliminiert: Der Anteil der mit dem Urin ausgeschiedenen Isoflavone variiert und liegt für Daidzein bei 25-51 % und für Genistein bei 7-20 % [Bayer *et al.* 2001, Rüfer 2006]. In humanen Faezes wurden nach Verabreichung einer Einmal-Dosis maximal 5 % Isoflavone wiedergefunden [Watanabe *et al.* 1998]. Die Eliminations-Halbwertszeiten von 5-9 h sind bei Ratte und Mensch recht ähnlich [Degen *et al.* 2002c, King and Bursill 1998; Setchell *et al.* 2003, Xu *et al.* 1994, Zhang *et al.* 1999b].

Die akute Toxizität der Isoflavone ist gering. So liegt die LD50 bei >2 g/kg KG und wurde, da es sich um einen Nahrungsmittelinhaltsstoff, der mit weniger als 2 g/kg Nahrungsmittel vorkommt, zunächst nicht genauer charakterisiert [Kazakov 1979]. Eine neue Studie an Wistar-Ratten bestätigt die geringe akute Toxizität von Genistein: So überlebten alle Tiere die *p.o.* Gabe von 2000 mg/kg KG [McClain *et al.* 2006]. Weitere Versuche zur subchronischen und chronischen Toxizität zeigten bei 50 mg/kg KG/Tag die Ausbildung einer Osteopetrose (reversibel) und bei 500 mg/kg KG/Tag hepatozelluläre Hypertrophie. Der NOEL wurde mit 5 mg/kg KG/Tag und NOAEL mit 50 mg/kg KG/Tag festgelegt [McClain *et al.* 2006].

In einem 2 Jahres Fütterungsversuch (5, 50 und 500 mg/kg Futter) zur Kanzerogenität von Genistein wurden bei den männlichen SD Ratten in keiner Dosisgruppe Hinweise auf kanzerogene Aktivität gefunden. Die weiblichen Tiere der höchsten Dosisgruppe wiesen aber erhöhte Inzidenzen für Brustdrüsenadenome, Adenokarzinome und Hirnanhangdrüsen-geschwülste auf, während die Inzidenz für gutartige Brustdrüsenfibroadenome signifikant abnahm [NTP 2006]. Zu Daidzein liegen noch keine Lebenszeitversuche vor.

In einer Studie zur Entwicklungstoxizität von Genistein fanden Delclos *et al.* (2001) deutliche Effekte in den höchsten Dosisgruppen (650 und 1250 ppm = mg/kg Futter). Bereits in der 25 ppm Dosisgruppe (Aufnahme: Muttertiere 1,3-4,3 mg/kg KG/Tag; Jungtiere 2,4-3,5 mg/kg KG/Tag) traten vermehrt ductal/alveolare Hyperplasien und Hypertrophien der Milchdrüsen bei den Nachkommen auf. Lamartiniere *et al.* (2002a) fanden in ähnlichen Studien für Daidzein bei einer Gabe von 1000 mg/kg Futter an SD-Ratten keine signifikanten Veränderungen bzgl. Fertilität, Pubertätseintritt oder Anogenitalabstand der Nachkommen.

Weitere Studien mit Genistein zeigten bei entsprechend hoher Dosierung Effekte, die auch von anderen, potenteren Östrogenen wie DES bereits in niedrigerer Dosierung bekannt sind [Nagao *et al.* 2001, Newbold *et al.* 2001].

Die meisten der o.g. Effekte von Daidzein und Genistein können also auf deren hormonelle Aktivität zurückgeführt werden. Die relative östrogene Potenz der Isoflavone und Metabolite

ist in verschiedenen *in vitro* Tests ermittelt worden. Tabelle 5 fasst einige Ergebnisse zusammen.

Tabelle 5: Östrogene "Potenzen" von Isoflavonen in verschiedenen *in vitro* Testsystemen.

Substanz	Ishikawa Bioassay ⁽²⁾ EC50, nM	Bindungsassay am ER der Maus B6D2F2 ⁽¹⁾ IC50, nM	Ishikawa Bioassay ⁽²⁾ EC50, nM
	[Markiewicz <i>et al.</i> 1993]	[Zhang <i>et al.</i> 1999a]	[Federici <i>et al.</i> 2003]
DES		1,46	
17 β Östradiol	0,067	1,34	0,089
Genistein	80	154	134
Daidzein	515	1600	676
Equol	111		
Biochanin A	>1000		
Formononetin	>10000		
Daidzein Glucuronid		14700	
Genistein Glucuronid		7270	
Daidzin			630
Malonyl Daidzin			1880
Genistin			110
Malonyl Genistin			350

(1) Kompetitiver Rezeptor Bindungsassay: Ermittelt die IC50 aus der Konkurrenzreaktion um die Bindung an den zytosolischen ER der B6D2F1 Maus anhand der Verdrängung von Tritium markiertem Östradiol durch die jeweilige Testsubstanz.

(2) Estrogenitätstest mit endometrialen Ishikawa Zellen. Die EC50 der Testsubstanzen wird ermittelt über den Umsatz an p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenyl durch die östrogeninduzierte alkalische Phosphatase.

Eine relativ hohe Affinität zum Östrogenrezeptor im Vergleich zu den meisten anderen Verbindungen zeigen die Aglykone Genistein und Daidzein; deren Zuckerkonjugate (Glycoside, Glucuronide) sind bis um den Faktor 50 weniger potent. Equol, der reduktive Metabolit von Daidzein, ist östrogener als die Muttersubstanz. Etwa 1/3 der Bevölkerung bildet diesen Metaboliten, offenbar in Abhängigkeit von der Kohlenhydrat- und Ballaststoffaufnahme und der Darmflora [Slavin *et al.* 1998, Hoey *et al.* 2004]. Methylierte Isoflavone wie Biochanin A und Formononetin zeigen kaum messbare Östrogenität. Somit sind hinsichtlich der hormonellen Aktivität die Phytoöstrogen Aglycone und der Daidzein Metabolit Equol am interessantesten, auch wenn sie eine deutlich geringere „Potenz“ aufweisen als DES oder das Steroidöstrogen 17 β -Östradiol.

Zur Charakterisierung der hormonellen Aktivität *in vivo* wurden auch etliche Nagerstudien durchgeführt, in denen typische Endpunkte für Östrogenität erfasst wurden [Übersicht in COT Report 2003]. Beispielsweise zeigte sich eine signifikante Zunahme des Uterusfeucht-

gewichtetes bei DA/Han-, Wistar- und SD-Ratten nach *p.o.* Applikation von 50 mg/kg KG Genistein (3 Tage Behandlung) und bei 25 mg/kg KG eine signifikante Zunahme der Höhe des Vaginalepithels [Diel *et al.* 2004]. Für Daidzein zeigte sich erst nach *p.o.* Gabe von 500 mg/kg KG an DA/Han Ratten eine signifikante Uterusgewichtszunahme, während der empfindliche Parameter der Komplement C3 Genexpression schon bei 100 mg/kg signifikant zunahm [Diel *et al.* 2000]. In einer älteren Studie an juvenilen Ratten waren 5 mg Equol bei subkutaner Injektion ähnlich wirksam wie 5 µg Östradiol [Tang and Adams 1980]. Die wiederholte i.v. Injektion von Equol 12 mg/kg KG/Tag an C57BL/6 Mäuse für 12 Tage führte zu einer signifikanten Zunahme des Uterusgewichtes, und eine deutliche Zunahme der Höhe des Vaginalepithel war schon bei 8 mg/kg KG/Tag feststellbar [Selvaraj 2004]. In Einklang mit *in vitro* Testbefunden (siehe Tabelle 5) zeigten Biochanin A und Formononetin auch im uterotrophen Bioassay an der Maus nur eine sehr geringe östrogene „Potenz“ [Stob 1983; Tab. 2 in Degen *et al.* 1999]. Allerdings können die Verbindungen im Organismus demethyliert werden (s.o. Abbildung 8) und so in stärker östrogen wirksame Isoflavone und in das Isoflavan Equol umgewandelt werden [Hur and Rafii 2000, Tolleson *et al.* 2002]. Trotz der geringen östrogenen Potenz hat die hohe Aufnahme von Biochanin A und Formononetin mit bestimmten Kleesorten bei australischen Schafen zu Reproduktionsstörungen bzw. Unfruchtbarkeit geführt [Bennetts *et al.* 1946], und es wird vermutet, dass die Tiere die hohen Isoflavondosen demethyliert und in das hormonell potentere Equol metabolisiert haben.

1.5 Aufgabenstellung

Um die über hormonelle Wirkungen vermittelte Toxizität von Chemikalien bewerten zu können, sind neben stoffspezifischen toxikodynamischen Daten (aus experimentellen *in vivo* Studien) auch Daten zur Toxikokinetik (Biotransformation, Verteilung, Elimination der Substanz im Versuchstier bzw. im Menschen) und zur Expositionshöhe notwendig [Degen *et al.* 2002c]. Auf der Basis dieser Kenntnisse kann dann eine Risikoabschätzung erfolgen und eine Substanz in Hinblick auf ihre toxikologische Bedeutung für den Menschen besser eingeordnet werden. Für die Bearbeitung der beiden o.g. Aufgabenstellungen, nämlich die Expositionsermittlung und die Ermittlung toxikokinetischer Daten, werden geeignete analytische Methoden benötigt, die eine Messung der Substanzen und ihrer wichtigsten Metabolite in komplexen biologischen Matrices ermöglichen. Wie in Abbildung 9 skizziert, können dies im Fall von Expositionsanalysen die Nahrungsmittel selber oder auch Urinproben

sein, in denen die Gehalte der Phyto- und/oder Xeno-östrogene ermittelt werden. Bei toxikokinetischen Untersuchungen sind es die zu bestimmten Zeitpunkten nach Gabe der Testsubstanz (Bisphenol A oder Daidzein und Genistein) in Blut und in verschiedenen Organen auftretenden Konzentrationen der Ausgangsverbindung und deren wichtigster Metabolite. Anders als bei Urinproben werden dabei Blut- und Gewebeprobe invasiv gewonnen. Die Analysen im biologischen Material erfordern auch eine für die jeweilige Matrix adäquate Probenvorbereitung.

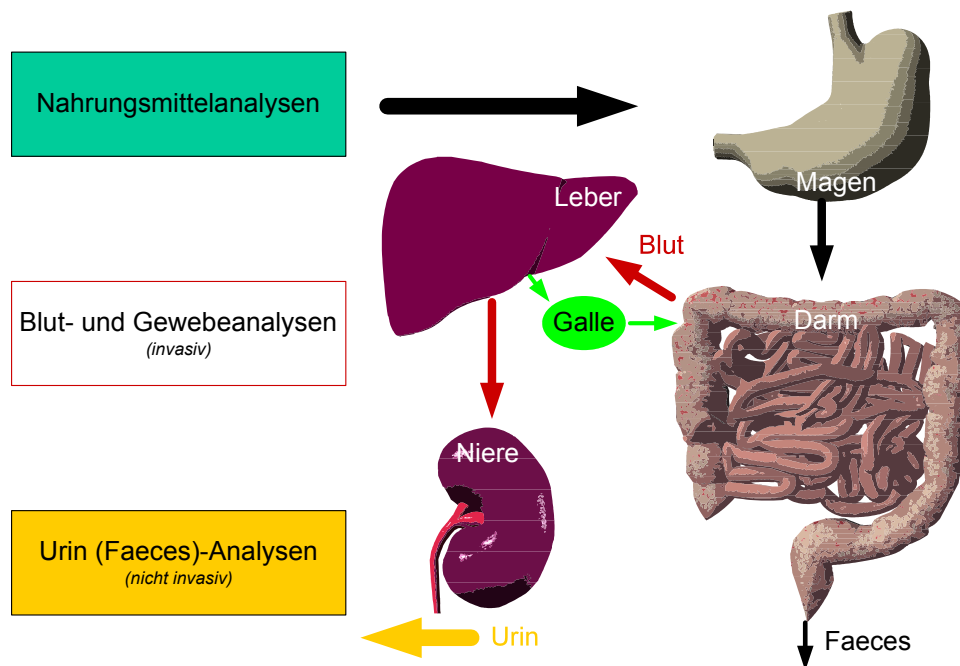


Abbildung 9: Einsatz analytischer Methoden zur Ermittlung der Exposition, Biotransformation und Elimination.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in biologischem Material aus zwei Tierversuchen, die bei Kooperationspartnern durchgeführt wurden, die Gehalte an BPA in Blut- und in Geweben zu bestimmen bzw. die nach Fütterung Phytoöstrogen-armer und Phytoöstrogen-reicher Nahrung resultierenden Isoflavon-Blutspiegel zu ermitteln. Das zweite Ziel war es, geeignete Verfahren zur simultanen Analyse des Xenoöstrogens BPA und östrogenen Isoflavone in Humanurin zu etablieren und eine Pilotstudie zur Exposition in einem kleinen Kollektiv vor Ort durchzuführen. Der erste Teil der Aufgabenstellung lag daher in der Entwicklung von leistungsfähigen Methoden zur Analytik der Substanzen in diesen Matrices. Die Ergebnisse hierzu sind im Kapitel 3.1. dargestellt. Besonderes Augenmerk galt dabei der Optimierung und Prüfung der Methoden mit dem Ziel, möglichst robuste und für den Durchsatz grosser Probenzahlen geeignete Methoden zu erhalten.

Die Anwendung der Methoden für die verschiedenen toxikologischen Aufgabenstellungen ist im Kapitel 3.2. des Ergebnisteils dargestellt: Für das Xenoöstrogens BPA wurde die Gewebeverteilung der Substanz in trächtigen DA/Han Ratten und der Übergang vom Muttertier zu den Föten untersucht (Abschnitt 3.2.1.). In dieser Studie zum transplazentaren Transfer sind auch grundlegende toxikokinetische Parameter für BPA ermittelt worden, die einen Vergleich zu einer Studie mit Daidzein ermöglichen, die bereits früher im Verbundprojekt „*Vergleich der östrogenen Potenz ausgewählter synthetischer Chemikalien und natürlicher Östrogene - Bewertung einzelner Verbindungen*“ durchgeführt worden ist. Im Abschnitt 3.2.2. werden Ergebnisse zur Isoflavon-Analyse in Futtermitteln und in Blutproben von Schweinen dargestellt; diese Proben stammen aus einer ernährungsphysiologischen Studie am Forschungsinstitut für die Biologie der Nutztiere (FBN). Im Abschnitt 3.2.3. werden schliesslich die Ergebnisse zur den Gehalten an BPA und Isoflavonen in Urinproben von Probanden dargestellt, die illustrieren, wie solche Befunde zur Ermittlung der Exposition gegen Xeno- und Phytoöstrogene bei normaler westlicher Ernährung und nach Sojaaufnahme genutzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Lieferant
GC-MS-Anlage I	
GC 6890N	Agilent
Quadrupol MS 5973N	Agilent
Autosampler 7683	Agilent
Software: Chemstation	
Zusätzlich:	
Kaltaufgabesystem KAS4 Plus mit Controller 505	Gerstel
Software: Gerstel-Master-Software V1.8x	Gerstel
GC-MS-Anlage II	
GC Varian Star 3400 CX	Varian
Ionenfalle MS/MS-System Saturn 4D	Varian
Autosampler 8200 CX	Varian
Software: Saturn GC-MS Version 5.0, 8200/SPME PC Control Software Version 4.5	Varian
Verwendete Trennsäulen	
DB-5-MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
DB-1-MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
DB-1-MS (15 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
HPLC-Anlage	
2 Pumpen LC-10 AD	Shimadzu
System-Controller SCL-10 A <i>VP</i>	Shimadzu
UV-VIS-Detektor SPD-10 AV <i>VP</i>	Shimadzu
Splitter Acurate AC 200 VAR	LC Packings
Degasser Degasys DG-1210	VDS optilab
Software: CLASS VP Chromatography Data System Version 4.2	Shimadzu
Verwendete Trennsäulen	
Luna 3 µm C18(2), 150 x 1 mm	Phenomenex
Luna 3 µm C18(2), 30 x 1 mm (Vorsäule)	Phenomenex
Eis-Automat	
Gefrierschrank (-20 °C) Profiline	Liebherr
Homogenisator (Potter)	B. Braun
Kühlschrank 365	Privileg
Kühlschrank KV	Siemens
Labormixer VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik

Magnetrührer	Ikamag	IKA Labortechnik
	Minishaker MS2	IKA Labortechnik
pH-Meter		
	pH-Meter E 532	Metrohm
	pH-Meter MP 225	Mettler
Thermoschüttler		
	Thermomixer Comfort	Eppendorf
	Thermomixer 5436	Eppendorf
SPE-Vakuum-Mehrfachverteiler		
	Merck Lichrolut (12 Positionen)	Merck
	Phenomenex (24 Positionen)	Phenomenex
	Trocknungsaufsatz für 24 Positionen	Phenomenex
Speedvac Konzentratoren System		
	SPD 111V Speedvac	Thermo Electron
	RVT 400 gekühlte Unterdruckfalle	Thermo Electron
	VN 100 Vakuum Kontroller	Thermo Electron
	Membran Vakuumpumpe MZ2C	Vaccubrand
Spülautomat	Miele Professional 7883	Miele
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H und Sonorex Rk 102H	Bandelin
Vortexer	Reax 1	Heidolph
Waagen		
	Analysenwaage AE 163 & AE 160	Mettler
	Präzisionswaage 1574 MP 1	Sartorius
Wasser-Anlage		
	prima reverse osmosis	Elga
	maxima ultra pure water	Elga
Zentrifugen		
	Eppendorfszentrifuge 5415 C	Eppendorf
	Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
	Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech

2.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Eppendorf-Gefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Eppendorf
Filter Spartan 3/30	Schleicher & Schuell
Glasgefäße, diverse	Brand, Schott
Lichrolut RP18-Säulen	Merck
Empore Extraction Cartridge 4115 SD&HD C18	3M
Messkolben (10, 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 mL)	Brand
Milliliter- u. Mikroliter-Pipetten mit variablen Volumina	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Präparierbesteck (Skalpell, Pinzetten...)	Roth
Pobengefäße (Kurzgewindeflasche) aus Borosilikatglas mit Borosilikatglaseinsätzen 0,2mL, Polymerfuß und Schraubkappe mit Silicon/PTFE Septum	VWR
Spritzen (2 µl, 5 µl, 10 µl)	Hamilton, SGE Vials
Wägeschiffchen 609	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf, Sarstedt

2.3 Chemikalien

2.3.1 Analyten und interne Standards

Substanz	Lieferant
Bisphenol A, 99,94 %	Bayer
Bisphenol A (Ring- ¹³ C ₁₂), 99 %	Cambridge Isotope Laboratories (CIL)
Biochanin A	Fluka
Daidzein	Fluka
Daidzein (3',5',8-D3), 97 %	CIL
Equol	Fluka
Formononetin	Fluka
Genistein	Fluka
Genistein (3', 5', 6, 8-D4) 95 %	CIL

2.3.2 Derivatisierungsreagenzien

Substanz	Lieferant
BSTFA (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid)	Fluka
BSTFA 1 % TMCS (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mit 1 % Trimethylchlorsilan)	Fluka
BSTFA 10 % TMCS (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mit 10 % Trimethylchlorsilan)	Fluka
DMF Silprep (Dimethylforamid:Hexamethyldisilazane 1:1 mit 1 % TMCS)	Alltech
MBHFBA (N-Methyl-bis-(heptafluorbutramid)	Macherey-Nagel
MBDSTFA (N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyl-trifluoracetamid)	Macherey-Nagel
MtBSTFA (N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyltrifluoracetamid)	Alltech
MtBSTFA 1 % tBDMCS (N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyltrifluoracetamid mit 1 % tert-Butyldimethylchlorsilan)	Alltech
Powersilprep (N-Trimethylsilyl-imidazol:N,O-bis-Trimethylsilylacetamid: Trimethylchlorsilan 3:3:2)	Alltech
Silprep Kit (Hexamethyldisilazan:Trimethylchlorsilan:Pyridin 3:1:9)	Alltech
TSIM (N-Trimethylsilyl-Imidazol)	Macherey-Nagel

2.3.3 Allgemeine Reagenzien

Substanz	Lieferant
Aceton	VWR
Acetonitril, HPLC gradient-grade und suprasolv	VWR
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumsulfat	VWR
Ascorbinsäure	Merck
Dichlormethan	VWR
Diethylether	Merck
Diisopropylether, suprasolv	VWR
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethylacetat, suprasolv	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck
Helium (99,996%)	Messer Griesheim
n-Hexan, suprasolv	VWR
Methanol, p. a., HPLC gradient-grade und suprasolv	VWR
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natrium-dihydrogenphosphat Monophosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
1,2-Propandiol, > 99,5 %	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Riedel de Haën
Schwefelsäure, konz.	Merck
Stickstoff (99,996%)	Messer Griesheim
Toluol, suprasolv	VWR

2.3.4 *Biologische Materialien*

Substanz	Lieferant
β -Glucuronidase (<i>Escherichia coli</i> K12; Aktivität 10 U/mg)	Roche
Proteinase K (<i>Triticharium album</i>)	Sigma-Aldrich
Sulfatase (<i>Abalone entrails</i> , Type VIII)	Sigma-Aldrich
Schweine-, Rinder-, Hühner und Kalbsleber	Rewe Handels AG
Schweine- und Rinderplasma	Fibig Nährstofftechnik

2.3.5 *Pufferlösungen und Enzyme*

Lysepuffer

0,438 g Natriumchlorid, 0,931 g EDTA und 1,0 g SDS werden mit entionisierten (Umkehrosiose) Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

10fach Hydrolysepuffer

13,6 g Natriumacetattrihydrat, 1,0 g Ascorbinsäure und 0,1 g EDTA Na-Salz werden eingewogen und mit 60-70 mL entionisierten Wasser aufgelöst. Anschließend wird die Lösung mit Eisessig auf pH=5 eingestellt und auf 100 mL mit entionisierten Wasser aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Proteinase K

100 mg Proteinase K (Aktivität 41 U/mg) werden in 5,6 mL entionisierten Wasser gelöst und als Aliquots zu je 500 μ L bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Glucuronidase

Die in Glycerin gelöste Glucuronidase (140 U/mL) wird direkt verwendet. Um eine Reinigung von eventuell vorhandenen Isoflavonen durchzuführen, wird die Glucuronidase über eine mit Methanol und Wasser konditionierte Lichrolut RP18 (nur für die Isoflavonanalytik) gegeben.

Sulfatase

500 U Sulfatase werden in 5 mL dest. Wasser gelöst und als 100 μ L Aliquots bei -20 °C gelagert (100 U/mL).

2.4 Verwendete analytische Trennverfahren

Zur Auftrennung und Bestimmung von Substanzen wie BPA, Daidzein oder Genistein kommen chromatographische Verfahren zum Einsatz. Das Grundprinzip der chromatographischen Trennung beruht dabei auf dem Übergang der zu trennenden Komponenten zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen und der unterschiedlichen Wechselwirkungen mit diesen [Otto 2000, Schwedt 1995]. Im einfachsten Fall wird dies durch den Verteilungskoeffizienten K über das Verteilungsgleichgewicht

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (1)$$

beschrieben. Dabei ist c_S die Konzentration der Komponente in der stationären Phase und c_M die Konzentration der Komponente in der mobilen Phase. Abbildung 10 zeigt beispielhaft den Trennvorgang und die Gaußförmige Analytenverteilung durch die Verschiebung des Gleichgewichtes am Anfang und Ende des Analyt“profens“ bei dem Transport durch die Trennstrecke. Am Ende des Trennvorgangs erfolgt die Detektion, bei der die Komponentenmengen in ein proportionales elektrisches Signal gewandelt und über die Zeit aufgezeichnet werden.

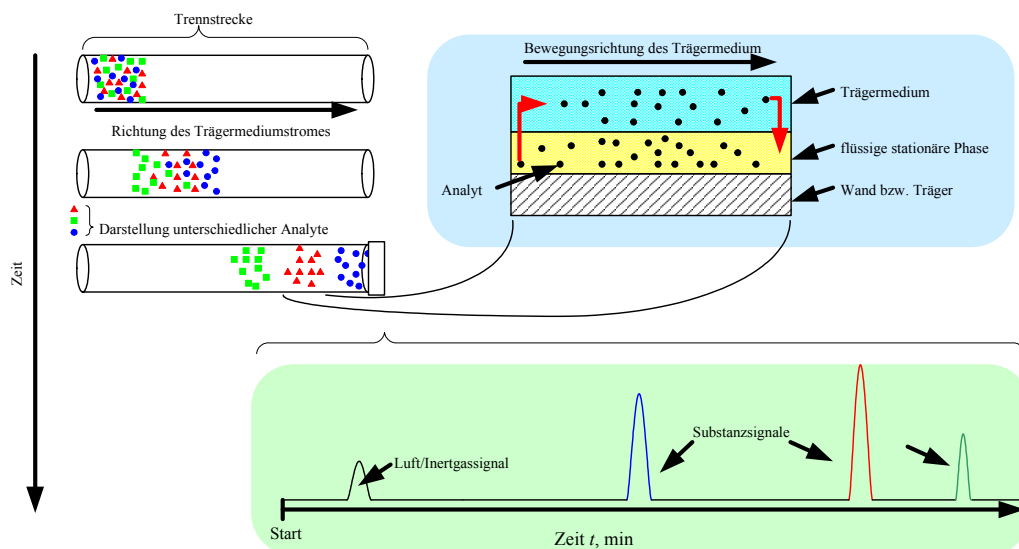


Abbildung 10: Schematische Abbildung des Trennvorgangs bei der Chromatographie.

Die Unterteilung der Chromatographie erfolgt aufgrund der Art der physikalischen Vorgänge in Verteilungschromatographie (fl./fl.; bei HPLC erfolgt die Betrachtung der Säulen-Phase als

flüssig) und Adsorptionschromatographie (g./fl.) sowie zusätzlich noch aufgrund der Art der mobilen Phasen in Flüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie.

2.4.1 *Gaschromatographie, Kaltaufgabe und massenspektrometrische Detektion*

Hauptsächlich wurde in dieser Arbeit mit der Gaschromatographie, gekoppelt mit massenspektrometrischen Detektoren (MSD) gearbeitet. Dabei erfolgt die Verteilung des Analyten-Gemisches zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase. Von erheblicher Bedeutung ist dabei neben der Detektion die Aufgabetechnik. Ziel der Probenaufgabe ist es, am Kopf der Kapillartrennsäule eine möglichst enge Probenzone zu schaffen. In der Spurenanalytik wird zudem eine möglichst verlustfreie Überführung in das Trennsystem gefordert. Dies kann durch die so genannte splitlose („splitless“, SL) Aufgabe der Probe erreicht werden, wobei die gesamte Probenmenge vom heißen Injektor auf die Trennsäule überführt wird. Man verwendet hier Liner mit Volumen von 1 mL für flüssige Injektionsvolumina von 1-2 µl. Im Gegensatz zur Splitlesstechnik ist die Splittechnik (S) gewollt verlustbehaftet. Um die Kapazität des Detektors oder der Säule nicht durch hochkonzentrierte Proben zu belasten, wird ein variabler (1:10 bis 1:100) Teil des Probengases über einen Splitausgang abgeleitet und gelangt so nicht auf die Säule. Ein wesentlicher Vorteil ist, dass ohne größere Umbauarbeiten weiterhin im linearen Bereich gemessen werden kann [Hübschmann 1996].

Ein besonderes Probenaufgabesystem, das die Applikation größerer Probenvolumina möglich macht, ist das sogenannte Kaltaufgabesystem (PTV oder CIS). Am CIS lassen sich alle oben genannten Betriebsarten durchführen sowie zusätzlich die temperaturprogrammierte Aufgabe (durch schnelles Aufheizen) sowie die Hochvolumenaufgabe im sogenannten „Solvent Vent Modus“. In letzterem Aufgabemodus besteht die Möglichkeit, ein großes Probenvolumen aufzugeben und das Lösungsmittel selektiv zu verdampfen, bevor die Analytenmenge durch einen schnellen Aufheissschritt auf die Trennsäule gebracht wird. Abbildung 11 verdeutlicht den Vorgang.

Der auf weit unter Siedetemperatur des Lösungsmittels eingestellte und mit silanisierter Watte gefüllte Liner wird zunächst in Richtung des geöffneten Splitausgangs mit Trägergas gespült (A). Überschüssiges Lösungsmittel wird in diesem Schritt verdampft. Anschließend wird der Split geschlossen und die höher siedenden Komponenten werden durch Erhitzen auf die Säule transferiert (B). In einem nachgeschalteten Schritt wird der Split wieder geöffnet und der Liner gespült (C).

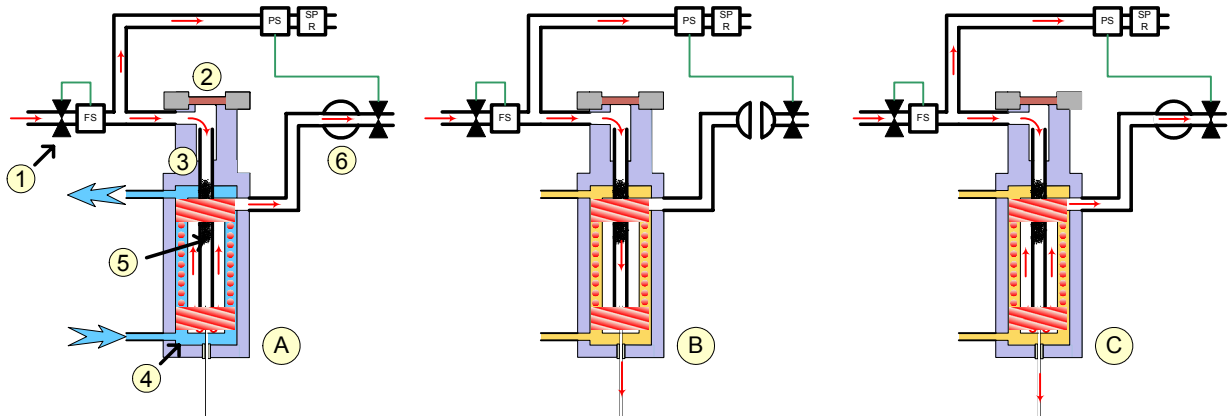


Abbildung 11: Schematische Darstellung der GC-Injektion mit Lösungsmittelausblendung. ① Proportionalventil (regelt den Gesamtfluss); ② Septum; ③ Injektorkörper; ④ Heiz/Kühlmantel mit Kühlflüssigkeit und Heizspirale; ⑤ Silanisierte Glaswolle im Liner; ⑥ Splitventil. Die roten Pfeile symbolisieren den Trägergasfluss; FS, PS und SPR sind Fluss und Druckregelungen.

Diese Technik ist insofern von besonderer Bedeutung, da sie die Nachweisgrenzen maßgeblich verbessern kann. Zunehmend halten Detektionssysteme mit der zusätzlichen Möglichkeit zur Qualifizierung neben der Quantifizierung des Analyten in die Labore Einzug. Dabei haben sich vor allen MS-Systeme durchgesetzt. Diese erlauben die zusätzliche Ermittlung von Strukturinformationen neben der reinen Quantifizierung der Substanz, was die Identifizierung des Analyten ungemein erleichtert und so zu sicheren Ergebnissen führt.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten MS-Systemen handelt es sich ausschließlich GC-MS-Systeme mit Single-Quadrupol-Technik. Abbildung 12 zeigt schematisch die Hauptkomponenten eines solchen MS-Detektors.

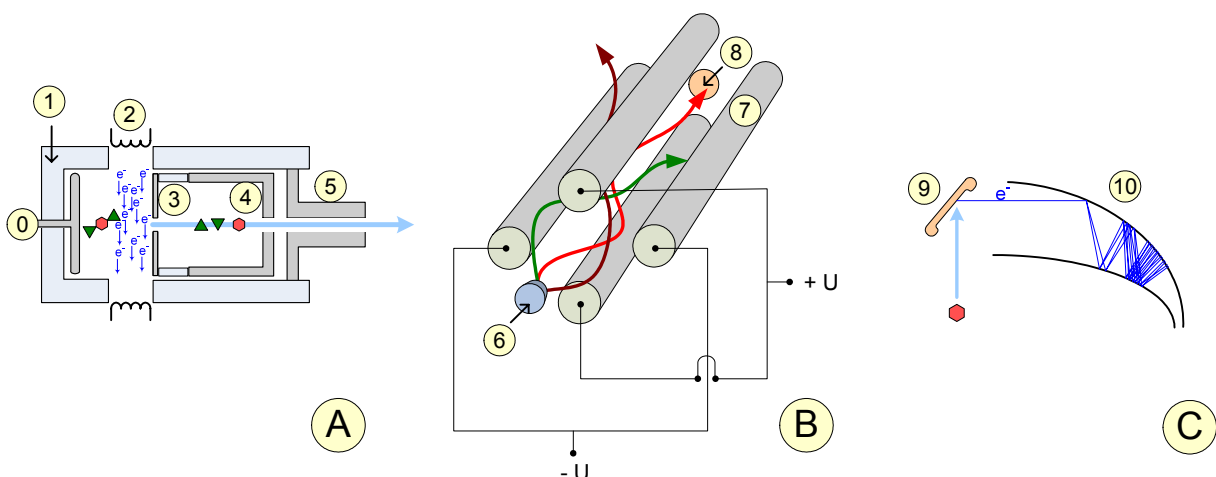


Abbildung 12: Schematische Abbildung einer (A) Ionenquelle, eines (B) Quadrupol-Massenfilters und (C) eines Multiplihörchens. ① Quellengehäuse, ② Filament, ③ Draw-Out-Plate, ④ Ion Focus, ⑤ Entrance Lens, ⑥ Ionenquelle, ⑦ Quadrupolstäbe, ⑧ Detektoreinlass, ⑨ Konversionsdynode, ⑩ Dynodenhörnchen“.

Bei der Massenspektrometrie wird das aufgetrennte Analytgemisch in einen Elektronenstrom gebracht (sog. EI = electron impact ionisation), der durch eine Glühkathode (sog. Filament) erzeugt wird. Der Analyt wird ionisiert und fragmentiert und durch eine Beschleunigungsspannung, die zwischen Repeller, Draw-Out-Plate, Ion Focus und Entrance Lens steigend anliegt, zwischen die Quadrupolstäbe gebracht. Dort erfolgt durch wechselnde elektromagnetische Felder die „Filterung“ von Molekülonen und Fragmenten nach Masse und Ladung. Nach dem „Durchfliegen“ der Quadrupole kollidiert das Ion mit der Konversionsdynode und setzt Elektronen frei. Diese Elektronen werden im Multiplierhörnchen vervielfacht und anschließend detektiert. So erhält man nach digitaler Datenerfassung Chromatogramme, die neben der Retentionszeit und Quantität der Probe weitere Informationen über spezifische Fragmente und Molekülonenmasse enthalten [Otto 2000].

Das jeweils stärkste Molekülfragment wird in dieser Arbeit als Quantifier verwendet, d.h. die Fläche oder die Höhe dieses Signal werden zur Berechnung der Analytkonzentration benutzt. Um die Identität dieses Signals zu bestätigen, wurden noch zusätzliche Fragmentsignale aufgezeichnet. Diese Qualifier liegen im Chromatogramm an exakt dergleichen Position wie der Quantifier und bestätigen so dessen Zugehörigkeit zu einer Substanz mit diesem Fragmentierungsmuster.

Die Massenspektroskopie ermöglicht den Einsatz von deuterierten oder ^{13}C enthaltenden internen Standards. Diese Isotopenstandards unterscheiden sich im chemischen Verhalten nicht von den eigentlichen Analyten, lassen jedoch eine separate Quantifizierung aufgrund der Molekül- oder/und Fragmentationensignale (die schwerer sind als die der unveränderten Analyten) zu. In dieser Arbeit wurden durch die Zugabe einer definierten Menge des Isotopenstandards vor der Aufarbeitung Verluste des Analyten während der Aufarbeitung korrigiert. Dazu wurden alle erhaltenen Flächenwerte durch Division mit dem Flächenwert des Isotopenstandards (Quantifiersignal) korrigiert (die zudotierte Menge an Isotopenstandard lag dabei im mittleren Bereich der linearen Kalibrierfunktion). Diese IS Korrektur wird sowohl für die Kalibrierungen als auch für die unbekanntes Proben durchgeführt.

2.4.2 Mikro-HPLC und UV-Detektion

Zur Analyse von Nahrungs-/Futtermittelproben kam in dieser Arbeit die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Mikroflusstechnik gekoppelt mit einem UV-spektroskopischen Detektor zum Einsatz. Bei der HPLC erfolgt die Analytenauftrennung durch die Verteilung zwischen flüssigem Trägermedium und stationärer Säulenphase. Aufgrund moderner Säulenmaterialien, die eine feine Körnung und somit eine hohe Oberfläche auf-

weisen, erreichen Mikro-Techniken trotz der geringen Flüsse sehr gute Trennleistungen. Durch die Mikro-Technik wird zum einen Lösungsmittel eingespart, zum anderen ermöglicht der geringe Anteil an mobiler Phase im Detektor ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Günstig ist eine Mikro-Technik auch dann, wenn nur geringe Mengen Probenmaterial vorliegen, wie beispielsweise im Biomonitoring. Man unterteilt die HPLC Techniken anhand der Größe der Trennsäule mit den in Tabelle 6 aufgeführten Bezeichnungen.

Tabelle 6: Übersicht über die Größen verschiedener HPLC Techniken.

HPLC-Technik	Säulen Ø	Fluss (typisch)
Konventionelle	5 mm	1 mL/min
Narrow Bore	2 mm	200µL/min
Mikro	1 mm	40 µL/min
Capillary	300 µm	4 µL/min
Nano	75 µm	200 nL/min

In dieser Arbeit kam eine Mikrotechnik mit 1mm Säulen und 40 µL/min Fluss zum Einsatz. Eine spezielle Technik, die sogenannte High Volume Injection (hochvolumige Probenaufnahme), wird ebenfalls in der Mikro-HPLC genutzt und bietet den Vorteil, dass eine große Menge Probe, die in einem „schlechteren“ Laufmittel gelöst ist, auf die Säule aufgebracht wird und sich zunächst am Kopf der Säule anreichert. Anschließend wird der Analyt mit einer besseren Laufmittelzusammensetzung vom Säulenkopf eluiert, was zu einer Aufkonzentration in einem schmalen Eluationspeak führt. Allerdings führt diese Aufgabetechnik durch die Störung des Säulengleichgewichts auch zu höheren Schwankungen der Basislinie.

Als Detektor kam bei der Mikro-HPLC der UV-Detektor zum Einsatz. Der Vorteil dieses Detektors sind neben der Robustheit die geringen Anschaffungskosten. Dabei wird der Flüssigkeitsstrom der HPLC durch eine mit UV-Licht definierter Wellenlänge durchstrahlte Zelle geleitet. Aufgrund der Zusammensetzung der Flüssigkeit bzw. der darin enthaltenen Verbindungen kommt es zu einer Schwächung der Strahlungsintensität. Diese Absorption wird in Abhängigkeit von der Analysenzeit aufgezeichnet [Schwedt 1995]. Das UV-Chromatogramm enthält Informationen über die Menge des Analyten im Flüssigkeitsstrom zu einer bestimmten Zeit. Ein großer Vorteil dieser Analysentechnik ist das zerstörungsfreie Arbeiten, was beispielsweise eine fraktionierte Sammlung der Analyten möglich macht. Ein großer Nachteil ist, dass UV-Strahlung (auch bei einer bestimmten Wellenlänge) von vielen Substanzen absorbiert wird, was zu Störungen führt. Dadurch können sich Unterschiede im Matrixmaterial z.B. zwischen Proben und Kalibrierreihe unterschiedlich stark auswirken. In dieser Arbeit

wurde daher im Zusammenhang mit der UV-Detektion immer die Standardadditionstechnik zur Ermittlung der Analytkonzentration verwendet. Dabei wird die unbekannte Probe mit unterschiedlichen Konzentrationen an Analyt aufgestockt, die Fläche des UV-Signal gegen die jeweils zudotierte Menge an Analyt aufgetragen und anschließend der Analytgehalt über den Achsenabschnitt berechnet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie das Matrixmaterial mit berücksichtigt, während die Kalibriermethode auf einer vergleichbaren Matrix basiert.

2.5 BPA-Analysen

2.5.1 Tierversuch

Die Tierversuche zur Kinetik von BPA wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. P. Diel an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Die verwendeten weiblichen DA/Han Ratten stammen von der Firma Møllegaard (Ry, Dänemark) und wurden an Trächtigkeitstag 9 geliefert. Die rechtlichen Genehmigungen zur Durchführung der Tierversuche wurden bei der Bezirksregierung Köln (Abteilung Tierschutz) als verantwortliche Behörde eingeholt.

Die Haltung und Fütterung der Tiere erfolgte analog zu den zuvor durchgeführten Studien zur Toxikokinetik von BPA in nicht trächtigen DA/Han Ratten [Upmeyer *et al.* 2000] und zur Kinetik von Daidzein in DA/Han Ratten [Janning *et al.* 2000, Degen *et al.* 2002b]. Dabei wurden die Tiere jeweils in Fünfergruppen in Macrolon-Käfigen des Typs IV gehalten. Die Käfige waren mit Einstreu des Typs HW, 300/500 W der Firma JELU-WERK Ludwigsmühle (Rosenberg, Deutschland) versehen. Als äußere Bedingungen wurden eine Raumtemperatur von 22 ± 3 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 30 - 70 % und ein 12 h-Tag-Nacht-Zyklus gewährleistet. Den Tieren stand Standard-Rattenfutter (Ssniff R/M-Haltung, Ssniff Spezialfutter GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Allen Tieren wurde eine Akklimatisierungsphase von mindestens 5 Tagen gewährt.

Am 18. Tag der Trächtigkeit erfolgte die Applikation der Testsubstanz intravenös in die Schwanzvene der Ratte (10 mg BPA pro kg Körpergewicht gelöst in Propylenglykol (Gewicht der Tiere 160 g bis 230 g)).

Zur Kontrolle der Injektion wurde einigen Tieren unmittelbar nach der Injektion durch Venenpunktion des Retro-Orbital-Plexus jeweils mindestens 100 µl Blut entnommen. Dadurch konnten paravenös injizierte Tiere (bedingt durch die starke Pigmentierung der DA/Han

Ratte) identifiziert und aus der Auswertung gestrichen werden (siehe auch Kapitel 3.2.1). Diese Form der Kontrolluntersuchung wurde aufgrund von zeitlichen Problemen (bei den Tieren der 5 und 10 min Gruppen) und um zusätzlichen Stress bei den Versuchstieren zu vermeiden, nur stichprobenartig durchgeführt.

Zu definierten Zeitpunkten (5, 10, 20, 30, 40, 120 und 360 min) nach Applikation der Testsubstanz wurden die Tiere getötet (n=4) und (zusätzlich zu den Blutproben) die folgenden Gewebe entnommen: Leber, Niere, Uterus, Plazenta sowie die Föten. Die Gewebe wurden bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Abbildung 13 zeigt den Versuchsablauf beispielhaft für einige Tiere.

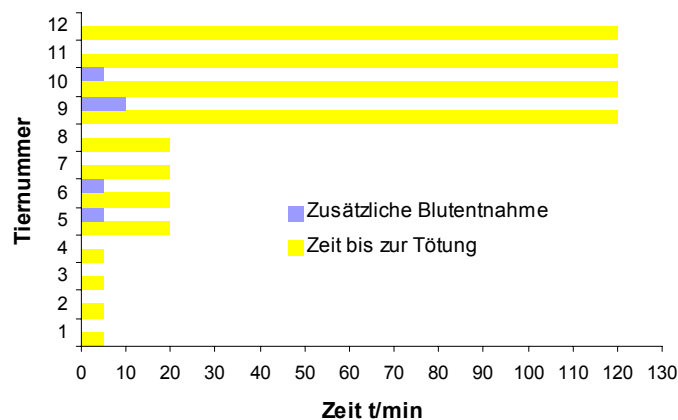


Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf zur Untersuchung der Toxikokinetik von BPA.

Aus den Blutproben wurde durch Zentrifugation das Plasma gewonnen und dieses bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Die Asservierung aller Proben erfolgte an der Sporthochschule Köln; die weitere Aufarbeitung (siehe unten) sowie die Analyse der Proben erfolgte am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo).

2.5.2 Gewebeprobenvorbereitung

Die Gewebeprobenvorbereitung erfolgte analog zu der Methode, die bereits für vergleichbare Studien mit trächtigen/nicht-trächtigen DA/Han Ratten eingesetzt worden ist [Janning *et al.* 2000, Upmeier *et al.* 2000]. Die bei -20 °C eingefrorenen Gewebeproben wurden aufgetaut und unter Kühlung in kleine Stücke geschnitten. Die Föten wurden nach Muttertier gruppiert. Die fötalen Lebern wurden entfernt und vereinigt. Ebenso wurde das restliche Fötengewebe gepoolt (Fötengewebe genannt). Beide Gewebearten wurden ebenfalls unter Kühlung zerkleinert.

Alle Gewebe wurden jeweils unter Eiskühlung in einem motorbetriebenen Homogenisator der Firma Braun ohne Zusatz von Pufferlösung homogenisiert. Abbildung 14 zeigt den Ablauf der Aufarbeitung bildlich.

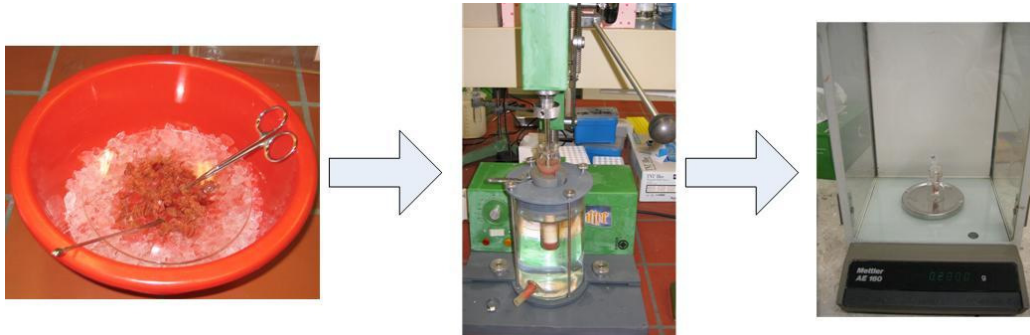


Abbildung 14: Ablauf der Gewebeaufarbeitung (Bildlich). Gewebezerkleinerung mit Sektionsschere, Homogenisation unter Kühlung mit einem Teflonstempel und anschließende Einwaage.

Eine besondere Schwierigkeit stellte das Uterusgewebe dar. Wegen des großen Bindegewebeanteils lässt sich dieses Gewebe nicht im Homogenisator zerkleinern. Deshalb wurde das Gewebe in einem aufwendigen Prozess mit der Sektionsschere zerschnitten, bis keine sichtbaren Stücke mehr vorhanden waren. Für jedes Gewebe wurden Aliquots von 200 ± 2 mg, bzw. für maternale Leber 100 ± 1 mg eingewogen und bis zur Analyse eingefroren.

2.5.3 BPA-Analysen in Plasmen (*Aglycon und Aglycon plus Konjugate*)

Im Folgenden wird die Analysemethode für Plasmaproben vorgestellt. Dabei handelt es sich um die endgültige Methode, welche einige Optimierungen und Prüfungen durchlaufen und bestanden hat (siehe Kapitel 3).

Abbildung 15 zeigt schematisch den Ablauf der Analyse der Plasmaproben. Wenn nur das unkonjugierte BPA (Aglykon) zu bestimmen ist, wird keine Konjugat-Spaltung vor der ersten Extraktion durchgeführt. Soll zusätzlich zum Aglykon noch der Anteil von Glucuronid- und Sulfatkonjugaten bestimmt werden, ist dagegen eine enzymatische Hydrolyse (Konjugat-spaltung) erforderlich.

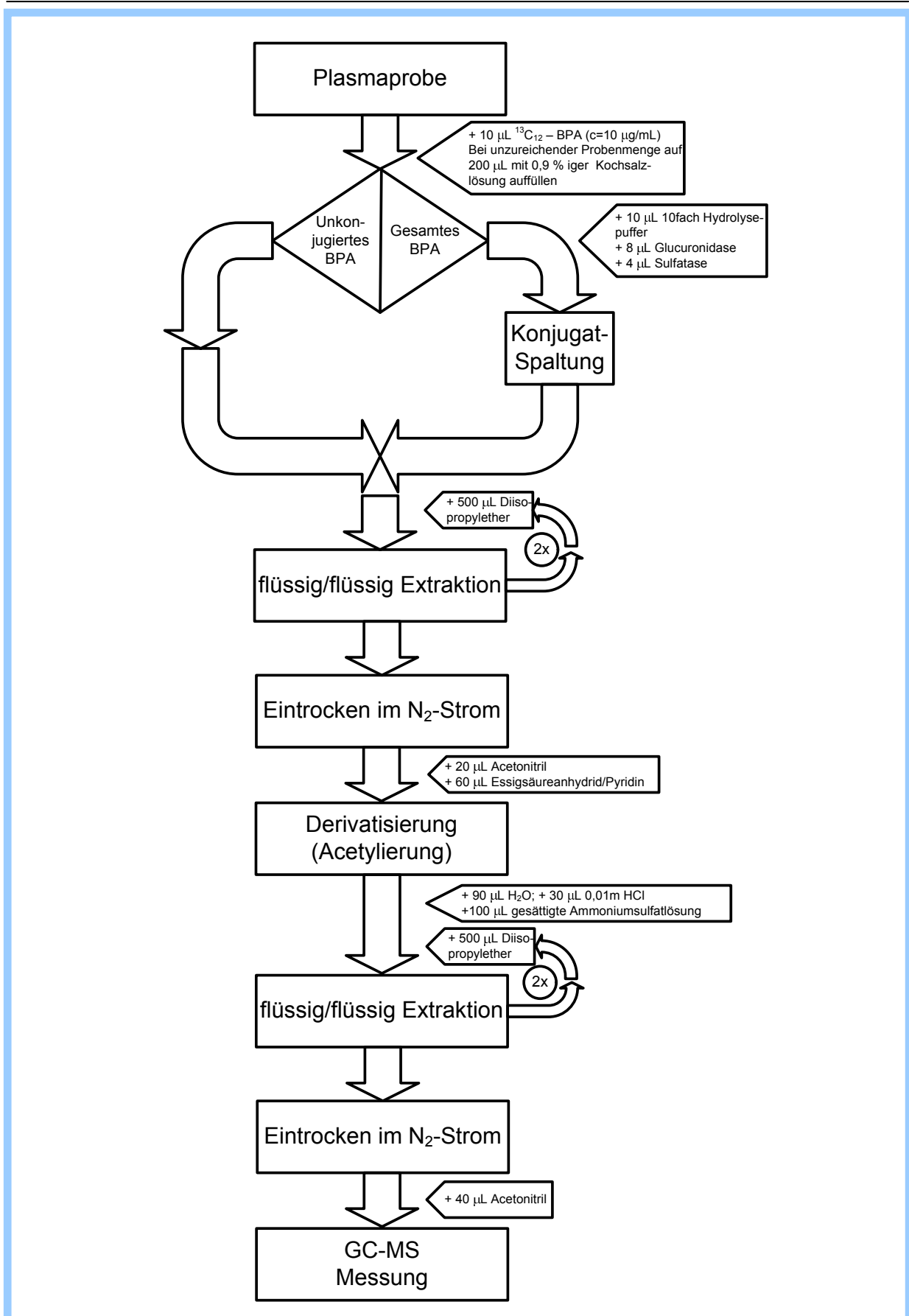


Abbildung 15: Flussschema zur Analyse von BPA in Plasma.

2.5.3.1 Probenvorbereitung

100-200 µL der Plasmaprobe wurden aufgetaut und ggf. mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl in H₂O) auf 200 µL aufgefüllt. Nach der Zugabe von 10 µL (c=10 µg/mL) ¹³C₁₂-BPA in Acetonitril (interner Standard) wurden die Proben hydrolysiert; die parallelen Aliquots, in denen nur das BPA-Aglycon bestimmt werden sollte, wurden sofort der ersten Extraktion zugeführt.

Zur Hydrolyse wurden die Plasmaproben mit 10 µL 10fach Hydrolysepuffer, 8 µL Glucuronidase und 4 µL Sulfatase versetzt und kurz gevortext. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler geschüttelt (max. Stufe).

Zur Extraktion wurde 500 µL Diisopropylether (DIPE) zu den Proben gegeben und mindestens 1 min gevortext. Nach dem Zentrifugieren bei max. Stufe (13200 UpM) für 1 min wurde die obere Etherphase abgehoben und in 1,5 mL Eppendorf-Vials überführt. Zum Rückstand wurden erneut 500 µL DIPE gegeben. Anschließend wurde nochmals für mindestens 1 min geschüttelt (Mehrfachschüttelaufsatz) und zentrifugiert (s. o.). Dann wurden die vereinigten Etherextrakte im Thermoschüttler bei 40 °C im Stickstoffstrom eingetrocknet.

Die nach der ersten Extraktion eingetrockneten Proben wurden mit 20 µL Acetonitril versetzt 1 min geschüttelt und 30 µL Pyridin sowie 30 µL Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 20 min Schütteln bei 70 °C im Thermoschüttler (höchste Schüttelstufe) wurden die Proben mit 90 µL H₂O (entionisierten) und 30 µL 0,01m HCl versetzt und kurz geschüttelt. 100 µL gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurden zugegeben und die Proben erneut extrahiert. Dazu wurden sie wie bereits oben beschrieben zweimal mit 500 µL DIPE versetzt, jeweils mindestens 1 min geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurden die vereinigten Extrakte bei 40 °C im Stickstoffstrom eingetrocknet.

Der so erhaltene Rückstand wurde mit 40 µL Acetonitril aufgenommen, 1 min geschüttelt, 2 min bei max. Stufe (13200 UpM) zentrifugiert und dann in spezielle Mikrovials für den GC-MS-Autosampler überführt.

2.5.4 BPA-Analysen in Geweben (*Aglycon plus Konjugate*)

Im Folgenden wird die Methode zur Analyse von Gewebeproben auf BPA dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Optimierung und Validierung befindet sich in Kapitel 3.1. Anders als bei der Analyse in Plasma wurde bei den Gewebeproben keine Unterscheidung zwischen konjugierten oder unkonjugierten Formen angestrebt, denn es muss davon ausgegangen werden, dass bei der Aufarbeitung aus Gewebehomogenaten zelluläre Hydrolasen freigesetzt werden, die bereits zur partiellen Konjugatspaltung führen. Daher wurde entschie-

den, in Geweben immer nur „Gesamt“ BPA (nach enzymatischer Hydrolyse) zu bestimmen. Da in den mütterlichen Geweben hohe Gehalte an BPA erwartet wurden, galten für diese Gewebe andere Einwaagen und Verdünnungen als beispielsweise für Föten. Diese und weitere Abweichungen vom Standardvorgehen werden im Folgenden in Klammern angegeben.

2.5.4.1 Probenvorbereitung

Abbildung 16 zeigt schematisch die Aufarbeitung von Gewebematerial.

200 mg (bzw. 100 mg mütterliche Leber) der aufgearbeiteten Gewebeproben (Kapitel 2.5.2) wurden aufgetaut und mit 10 µL ($c=10 \mu\text{g/mL}$) $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA in Acetonitril (20 µL IS für mütterliche Leber) versetzt. Nach Zugabe von 500 µL Lysepuffer wurden die Proben gut durchmischt, mehrfach geschüttelt und 90-120 min im Kühlraum bei 4 °C im Thermoschüttler geschüttelt (max. Stufe). Zum Proteinabbau wurden die Proben nach Zugabe von 20 µL Proteinase K für 90 min bei 50 °C geschüttelt und anschließend zur Konjugatspaltung hydrolysiert. Dazu wurden die Proben mit 10 µL 10fach Hydrolysepuffer, 8 µL Glucuronidase und 4 µL Sulfatase versetzt und kurz gevortext. Nach dem Schütteln über Nacht bei 37 °C wurden die Proben auf Homogenität überprüft. Wenn die Probe nicht komplett homogen war wurde dies notiert und bei der Auswertung berücksichtigt (ggf. durch erneute Messung). Alle nicht homogenen Proben wurden durch eine zusätzliche Behandlung mit 10 µL Proteinase K und 1 h schütteln bei 50 °C homogenisiert.

Die Proben wurden mit 100 µL gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und wie unter Abschnitt 2.5.3. beschrieben, zweimal mit jeweils 500 µL DIPE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bei 40 °C im Stickstoffstrom eingetrocknet. Die Proben wurden mit 80 µL einer frischen Acetonitril:Pyridin:Essigsäureanhydrid-(2:3:3)-Mischung 20 min bei 70 °C unter Schütteln derivatisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 90 µL H₂O und 30 µL 0,01 m HCl gestoppt. Nach Zugabe von 100 µl gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde zweimal mit 500 µL DIPE extrahiert, die Extrakte wurden vereinigt und bei 40 °C im Stickstoffstrom eingetrocknet. Die erhaltenen Rückstände wurden in 40 µL Acetonitril (bzw. 100 µL für mütterliche Leber) aufgenommen und in Mikrovials überführt.

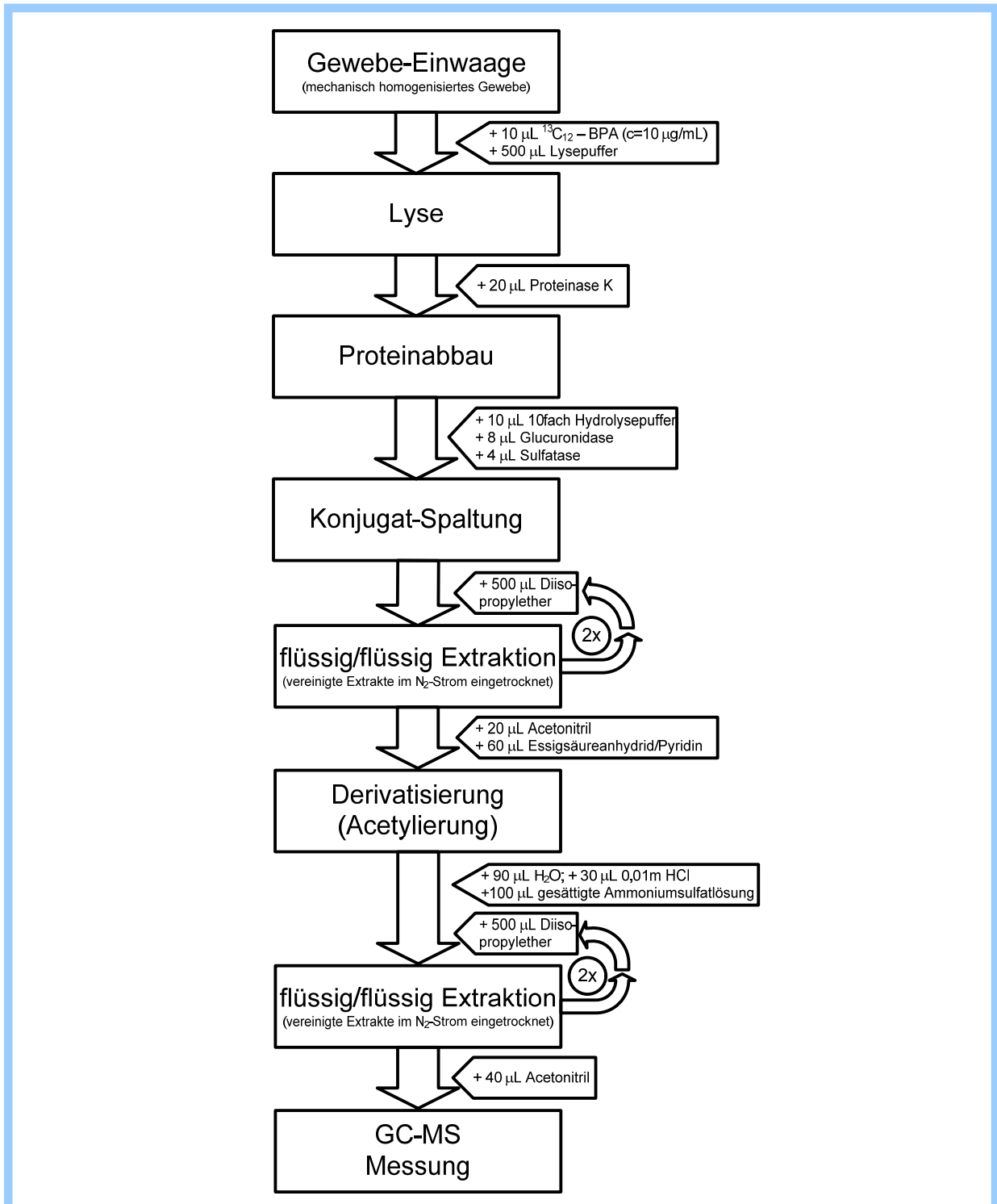


Abbildung 16: Flussschema zur Analyse von Gewebeproben auf „Gesamt“-BPA (Summe Aglycon und Konjugate).

2.5.4.2 Stammlösungen, Verdünnungen und Kalibrierreihen

Als Berechnungsgrundlage diente eine jeweils vor und nach den Proben gemessene Kalibrierreihe. Die Basis dieser Kalibrierreihe waren die folgenden Stammlösungen und Verdünnungen, welche mehrfach innerhalb des Messzeitraums neu angesetzt wurden, obwohl

sich bei den alten Lösungen keine Instabilitäten zeigten. Die Stammlösungen wurden sowohl für die Plasmaanalysen als auch für die Gewebeanalysen genutzt.

Zur Herstellung der Stammlösung V0 ($c=2,2 \text{ mg/mL}$) wurden 110 mg Bisphenol A in einem 50 mL Kolben bis zur Marke mit Acetonitril (Suprasolv) aufgefüllt und geschüttelt.

Zur Herstellung der Verdünnung V1 ($c=22 \text{ } \mu\text{g/mL}$) wurden 100 μL der Stammlösung V0 in einem 10 mL Kolben mit Acetonitril (Suprasolv) bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt. Die Verdünnung V2 ($c=2,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$) wurde aus 1 mL Verdünnung V1 in einem 10 mL Kolben mit Acetonitril (Suprasolv) hergestellt.

Zur Herstellung einer weiteren Verdünnung V3 ($c=0,22 \text{ } \mu\text{g/mL}$) wurde 1 mL der Verdünnung V2 in einem 10 mL Kolben vorgelegt, mit Acetonitril (Suprasolv) bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt.

Die drei Verdünnungen wurden verwendet, um eine Kalibrierreihe entsprechend Tabelle 7 in Plasma oder Gewebeproben herzustellen. Dabei wurde jeweils das Gewebe verwendet, welches der Probenmatrix am nächsten kommt, den Analyten aber nicht enthält, d. h. zunächst Rattenplasma und Rattengewebeproben der Kontrolltiere. Da diese Matrices nicht immer in ausreichender Menge zur Verfügung standen, besonders nicht für die aufwändigen Validierungsuntersuchungen, wurde auf vergleichbare Matrices wie Schweineplasma und Kalbsleber zurückgegriffen. Die Auswahl von geeigneten Vergleichsmaterialien machte eine Reihe von Testmessungen nötig (siehe Kapitel 3.1.2).

Tabelle 7: Herstellung der Kalibrierstandards für die Analyse von BPA mit GC-MS.

Kalibrierstandard	Schweineplasma bzw. Kalbsleber, μL bzw. mg	$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA (IS) $c=10 \text{ } \mu\text{g/mL}$	BPA, μL
S _{Bl}	200	0	0
S ₀	200	10	0
S ₁	200	10	20 V3 $c=0,22 \text{ } \mu\text{g/mL}$
S ₂	200	10	10 V2 $c=2,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$
S ₃	200	10	40 V2 $c=2,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$
S ₄	200	10	8 V1 $c=22 \text{ } \mu\text{g/mL}$
S ₅	200	10	15 V1 $c=22 \text{ } \mu\text{g/mL}$
S ₆	200	10	30 V1 $c=22 \text{ } \mu\text{g/mL}$

GC-MS Bedingungen 1

Die Analyse der extrahierten und derivatisierten Proben erfolgte hauptsächlich mit dem Agilent-GC-MS (GC 6890 mit Quadrupol MS 5973N und 7683 Autosampler) und nur zu

Kontrollzwecken auf der GC Varian Star mit Saturn 4D. Im Folgenden sind alle wichtigen Parameter für die Agilent Anlage aufgelistet.

Trägergas:	Helium 4.6, konstanter Fluss, 1,7 mL/min
Injektor:	S/SL Injektor
Injektionsmethode:	1 µL splitlose Injektion
Injektortemperatur:	250 °C (2 mL Standardliner unwattiert)
Trennsäule:	J&W, DB-5ms, 30 m * 0,25 mm * 0,25 mm
Temperaturprogramm: (Schweineplasma, Rattenplasma)	1 min 40 °C, 10 °C/min->300 °C, 7 min 300 °C
Temperaturprogramm: (Kalbsleber, Rattengewebe)	5 min 200 °C, 20 °C/min->300 °C, 8 min 300 °C
Transferlinetemperatur:	280 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI)
MSD Temperatur:	230 °C Quelle, 150 °C Quadrupol
Detektierte Ionen:	Total Ion Chromatogram (TIC) von m/z = 50-550
Ionen zur Identifikation:	m/z = 119, 213, 270, 312 (BPA) m/z = 131, 225, 282, 324 (¹³ C ₁₂ -BPA)
Ionen zur Quantifizierung:	m/z = 213 (BPA) m/z = 225 (¹³ C ₁₂ -BPA)

2.6 Isoflavon (Daidzein und Genistein)-Analysen

2.6.1 Isoflavone in Futtermitteln

Die Ermittlung der Isoflavon-Gehalte von Futtermittelproben erfolgte nach saurer Hydrolyse und ethanolischer Extraktion der Aglykone durch Analyse mittels Mikro-HPLC (s.u.). Dabei kam die Standardadditionstechnik zur Anwendung. Der verwendete saure ethanolische Aufschluss der Futtermittel bei der Analysemethode stellt eine effiziente Extraktion der Isoflavone sicher. Dies zeigen eine Vielzahl anderer von Arbeiten [Barnes *et al.* 1998, Coward *et al.* 1998, Murphy *et al.* 2002, Rostagno *et al.* 2003].

2.6.1.1 Probenvorbereitung

Das Flussschema in Abbildung 17 zeigt schematisch die Vorgehensweise.

1 g einer fein gemörserten Futterprobe wurde mit 10 mL 10 M HCl und 40 mL Ethanol suspendiert. Nach 10 min Behandlung im Ultraschallbad wurde die Probe dann unter Rückfluss bei 80°C für 3 h gerührt. Nach dem Abkühlen und Absetzen wurden zweimal 5 mL Überstand dekantiert und bei 4000 UpM für 10 min zentrifugiert. Ein Aliquot bildet das Rückstellmuster, das Zweite wird für die HPLC-Analyse verwendet. 100 µL des Überstands wurden mit unterschiedlichen Mengen an Stammlösung aufgestockt (Standardaddition siehe Tabelle 8) und mit der mobilen Phase verdünnt.

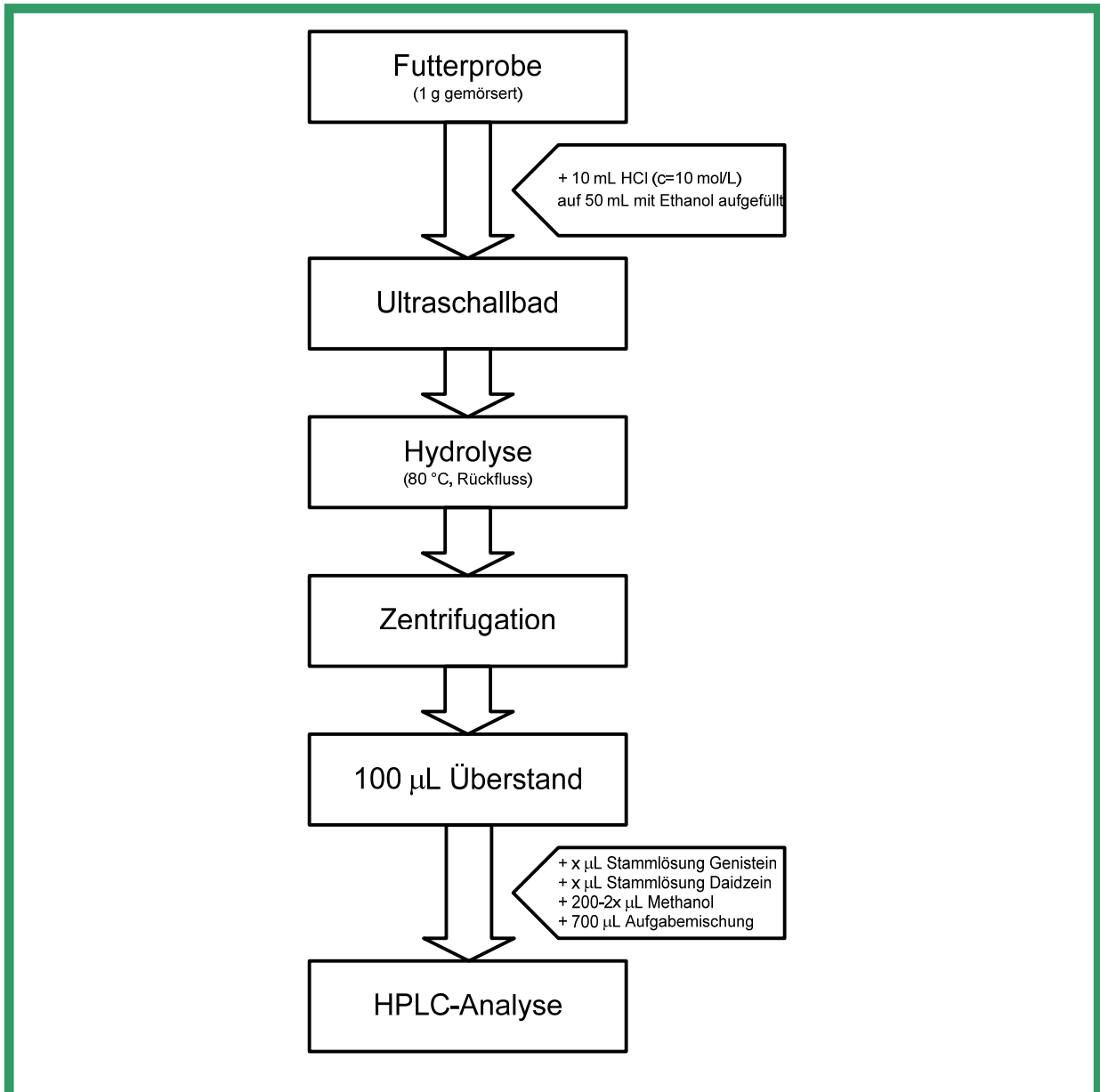


Abbildung 17: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung zur Analyse von Isoflavonen in Futtermitteln mittels saurer Hydrolyse, ethanolischer Extraktion und HPLC-Trennung/Detektion.

2.6.1.2 Stammlösungen, Verdünnungen und Additionsreihen.

Zur Herstellung der Genistein und Daidzein Stammlösungen wurden jeweils 5 mg Daidzein bzw. Genistein eingewogen, in einen 100 mL Kolben vorgelegt, mit Methanol (Suprasolv) bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt. 1 mL der Stammlösung ($c=50 \mu\text{g/mL}$) wurde mit Methanol (Suprasolv) auf 10 mL verdünnt ($c=5 \mu\text{g/mL}$).

Die Messung der unbekanntenen Proben erfolgte bei dieser Methode nach dem Standardadditionsverfahren. Dazu wurden jeweils 100 μL des zu untersuchenden Futtermittelextraktes mit unterschiedlichen Mengen an Daidzein- bzw. Genisteinverdünnungen aufgestockt (auch Aufstockmethode genannt) und mit der Aufgabemischung (10 % MeOH in 1 %iger Essigsäure) sowie Methanol auf jeweils 1 mL verdünnt. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der Standardadditionsproben.

Tabelle 8: Standardadditionsproben zur Analyse von Futtermitteln auf Genistein und Daidzein.

Kalibrierstandard	Extrakt, μL	Genistein x, μL $c=5 \mu\text{g/mL}$ (in MeOH)	Daidzein x, μL $c=5 \mu\text{g/mL}$ (in MeOH)	MeOH, μL	Aufgabemischung, μL
E0	100	0	0	200	700
E1	100	10	10	180	700
E2	100	20	20	160	700
E3	100	30	30	140	700
E4	100	40	40	120	700
E5	100	50	50	100	700
E6	100	60	60	80	700
E7	100	70	70	60	700

2.6.1.3 Mikro-HPLC Bedingungen

- Hauptsäule: Luna 3 μm C18(2) 150 mm*1 mm (Phenomenex)
 Vorsäule: Luna 3 μm C18(2) 30 mm*1 mm (Phenomenex)
 Laufmittel A: 10 %ige Essigsäure:Laufmittel B 9:1 v/v
 Laufmittel B: Methanol:Acetonitril:Dichlormethan 10:5:1 v/v/v
 Gradient:
 0-5 min 25 % Laufmittel B in A
 5-25 min 25-50 % Laufmittel B in A
 25-40 min 50-100 % Laufmittel B in A
 40-41 min 100-25 % Laufmittel B in A
 41-50 min 25 % Laufmittel B in A

Flussrate: 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ nach Splitter (manuell bestimmt; Pumpenfluss durch Splitter reduziert) 260 $\mu\text{L}/\text{min}$ vor Splitter
Injektionsvolumen: 10 μL
UV-Detektion: 250 nm
Retentionszeiten: 16,0 min für Daidzein und 22,6 min für Genistein

2.6.2 Isoflavone in Schweineplasmen

Die Analyse von Schweineplasmaproben auf Daidzein und Genistein wurde auf Basis einer flüssig/flüssig Extraktionsmethode mit Ethylacetat entwickelt und für die GC-MS Analyse um eine Derivatisierung ergänzt. Details zur Entwicklung und Optimierung siehe Kapitel 3.1.3 und 3.1.4.

2.6.2.1 Probenvorbereitung

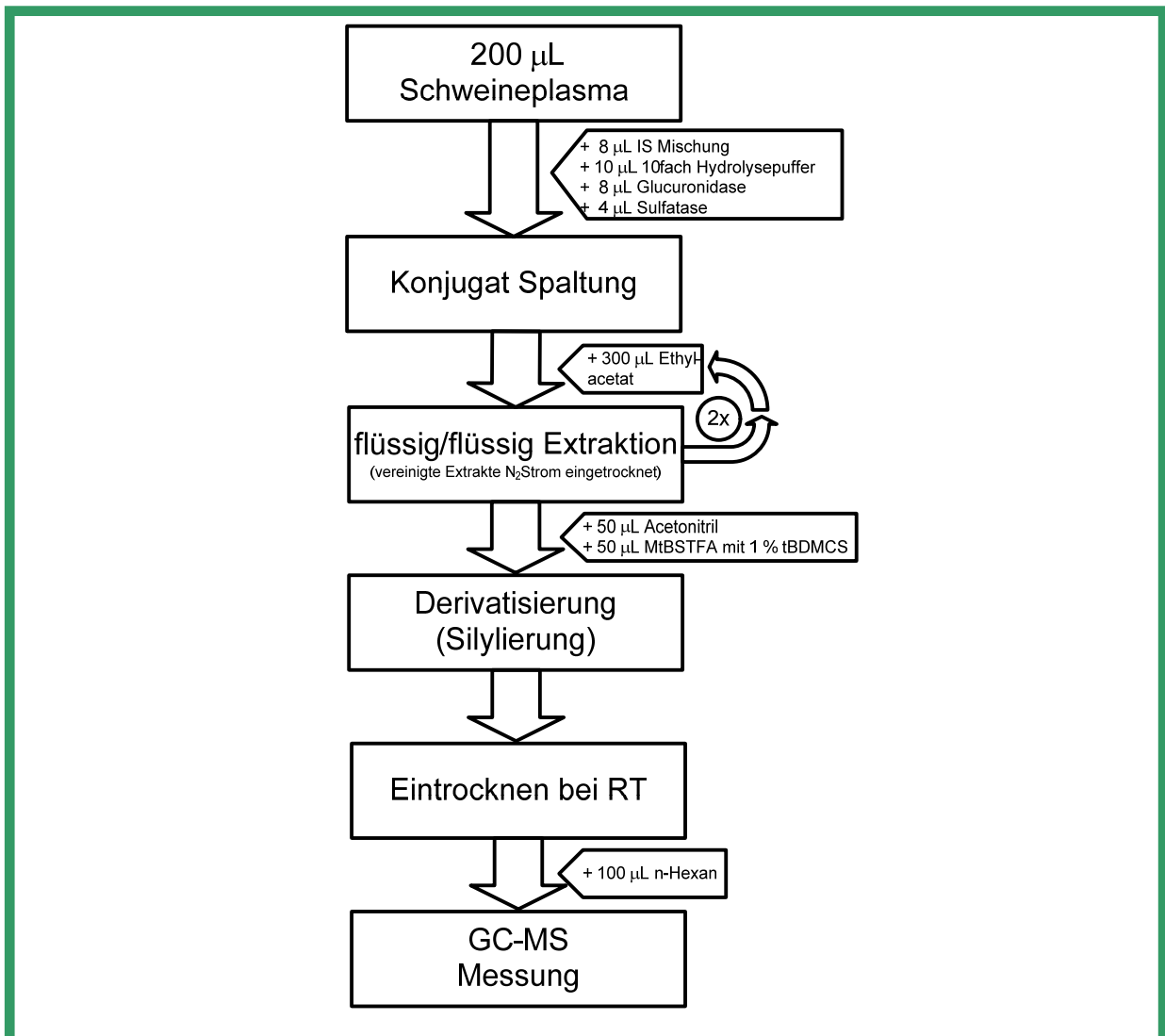


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Analyse von Daidzein und Genistein in Schweineplasmaproben.

200 µL der Plasmaprobe wurden mit 8 µL einer IS-Lösung (je 10 µg/mL D3-Daidzein, D4-Genistein) versetzt und geschüttelt. Zur Konjugatsspaltung wurden 22 µL einer Mischung aus 10fach Hydrolysepuffer:Glucuronidase:Sulfatase (5:4:2 v:v:v) zugegeben und die Probe über Nacht bei 37 °C in Thermoschüttler auf Stufe 14 (1400 UpM) geschüttelt. Nach dem Abkühlen wird die Probe zweimal mit 300µl Ethylacetat (Suprasolv) extrahiert, 1 min gemischt und 1 min bei 13200 UpM zentrifugiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingetrocknet. Anschließend wurde die Probe, nach Zugabe von 50 µl Acetonitril, für 2 min ultrabeschallt. Nach der Zugabe von 50µL Derivatisierungsreagenz (MtBSTFA mit 1 % tBDMCS) wurde die Probe bei 65 °C für 2 h geschüttelt. Lösungsmittel und Derivatisierungsreagenz wurden anschließend im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingedampft und der Rückstand durch 1 min schütteln mit 100 µL n-Hexan (Suprasolv) wieder gelöst. Nach 1 min Zentrifugation bei max. Stufe erfolgte die Überführung in Mikrovials und die Analyse mittels GC-MS.

2.6.2.2 Stammlösungen, Verdünnungen und Kalibrierreihen

Zur Herstellung der Stammlösung wurden jeweils 5 mg Daidzein bzw. 5 mg Genistein eingewogen und in einen 100 mL Messkolben überführt, bis zur Marke mit Acetonitril (Suprasolv) aufgefüllt (c=50 µg/mL) und geschüttelt.

1 mL der Daidzein Stammlösung (c=50 µg/mL) und 1 mL Genistein Stammlösung (c=50 µg/mL) wurden gemischt und in einem 10 mL Kolben mit Acetonitril (Suprasolv) aufgefüllt. Die Kalibrierproben wurden als fünffacher Ansatz hergestellt. Dazu wurden zunächst die jeweiligen, in der Tabelle 9 beschrieben, Mengen an Stammlösungsmischungen (Kalibrierlösung) in Eppendorf-Vials vorgelegt und in der Speedvac bei 40 °C getrocknet. Der Rückstand wurde durch die Zugabe der IS-Mischung (siehe unten) gelöst und dann mit Schweineplasma vermischt. Die Blindprobe enthielt als Ersatz für die IS-Lösung reines Acetonitril. Von den Kalibrierproben wurden jeweils 200 µL eingesetzt, der Rest wurde bei – 20 °C gelagert.

Die Herstellung der IS-Mischung erfolgte aus den gelieferten D3-Daidzein (c=60 µg/mL) und D4-Genistein (c=100 µg/mL) Lösungen durch Auffüllen von 100 µL D3-Daidzein und 60 µL D4-Genistein auf insgesamt 600 µL mit Acetonitril (Suprasolv).

Tabelle 9: Ansatz für fünf Kalibrierreihen zur Analyse von Genistein und Daidzein in Schweineplasma.
Die Kalibrierlösung/Verdünnung der Analyten wurden zunächst vorgelegt und eingetrocknet.

Kalibrier- standard	Schweine- plasma, μL	IS-Mischung, μL c=10 $\mu\text{g/mL}$ D4-Gen und D3-Dai	Kalibrierlösung/Verdünnung, μL c= 5 $\mu\text{g/mL}$ jeweils für Gen und Dai
P _{BI}	960	-- (40 nur AcN)	0
P0	960	40	0
P1	960	40	5
P2	960	40	10
P3	960	40	20
P4	960	40	40
P5	960	40	100
P6	960	40	200
P7	960	40	500

2.6.2.3 GC-MS Bedingungen 2

Die Analyse der vorbereiteten Proben erfolgte auf der Agilent GC 6890 mit Quadrupol MS 5973N und 7683 Autosampler mit folgenden Systemparametern:

Trärgas:	Helium 4.6, konstanter Fluss, 2,0 mL/min
Injektor:	CAS 4 plus (Kaltaufgabesystem)
Injektionsmethode:	2 μL Solvent Vent Injektion
Injektortemperatur:	Temperaturprogrammiert (wattierter Standardliner) 0,06 min 40 °C (100 mL/min Helium; Solvent Vent), 12 °C/s->310 °C, 10 min 310 °C
Trennsäule:	J&W, DB-1ms, 15 m * 0,25 mm * 0,25 mm
Temperaturprogramm:	2 min 160 °C, 30 °C/min->310 °C, 5 min 310 °C
Transferlinientemperatur:	280 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI)
MSD Temperatur:	230 °C Quelle, 150 °C Quadrupol
Detektierte Ionen:	Total Ion Chromatogram (TIC) von m/z = 400-600
Ionen zur Identifikation:	m/z = 425, 482 (Daidzein)
(Qualifier)	m/z = 428, 485 (D3-Daidzein) m/z = 555 (Genistein) m/z = 558 (D4-Genistein)

Ionen zur Quantifizierung:	m/z = 425 (Daidzein)
(Quantifier)	m/z = 428 (D3-Daidzein)
	m/z = 555 (Genistein)
	m/z = 558 (D4-Genistein, intensivstes Ion, da ein H getauscht werden kann)

2.7 Kombinierte BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analysen

2.7.1 BPA, Daidzein, Equol und Genistein in Urinen

Die folgende Methode dient zur kombinierten Bestimmung von BPA sowie den Isoflavonen Genistein, Daidzein und dessen Metabolit Equol in humanen Urinproben. Zur Probenaufarbeitung nach enzymatischer Hydrolyse wurde eine Festphasen-Extraktion der Aglykone gewählt, gefolgt von einer MtBSTFA-Derivatisierung für die GC-MS Analyse. Die Beschreibung der Methodenentwicklung befindet sich in Kapitel 3.1.4.

2.7.1.1 Probenvorbereitung

Das Flussschema zur Aufarbeitung humaner Urinproben ist in Abbildung 19 dargestellt.

Zunächst wurden 200 µL einer Urinprobe mit 8 µL der IS-Mischung (10 µg/mL D4-Genistein, D3-Daidzein und 2 µg/mL ¹³C₁₂-BPA) vermischt. Anschließend erfolgte die Hydrolyse durch Zugabe von 10 µL 10fach Hydrolysepuffer und einer Mischung aus β-Glucuronidase und Sulfatase (2:1).

Die so vorbereitete gesamte Probe wurde auf eine durch 300 µL Methanol und 300 µL Wasser konditionierte 1 mL Emporedisk SD (5,5 mg C18 Material, Standard Dichte) gegeben und langsam durch partiellen Unterdruck durchgesaugt. Anschließend wurde die SPE-Säule mit 300 µL 5 %ige MeOH gewaschen und danach für 10 min unter Unterdruck trocken gesaugt. Die Elution der Analyten erfolgte durch 300 µl Acetonitril/Ethylacetat (1:1) unter partiellem Unterdruck. Die so erhaltenen Extrakte wurden in der Speedvac bei 40 °C eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit 50 µL MtBSTFA versetzt, ultrabeschallt und für 30 min bei 75 °C unter ständigem Schütteln derivatisiert. Lösungsmittel und Derivatisierungsreagenz wurden im Stickstoffstrom bei 40 °C entfernt und der Rückstand mit 70 µL n-Hexan (Suprasolv) aufgenommen (1 min ultraschallt, geschüttelt und 1 min bei 13200 UpM zentrifugiert). Nach der Überführung in ein Mikroviaal erfolgte die Messung mittels GC-MS.

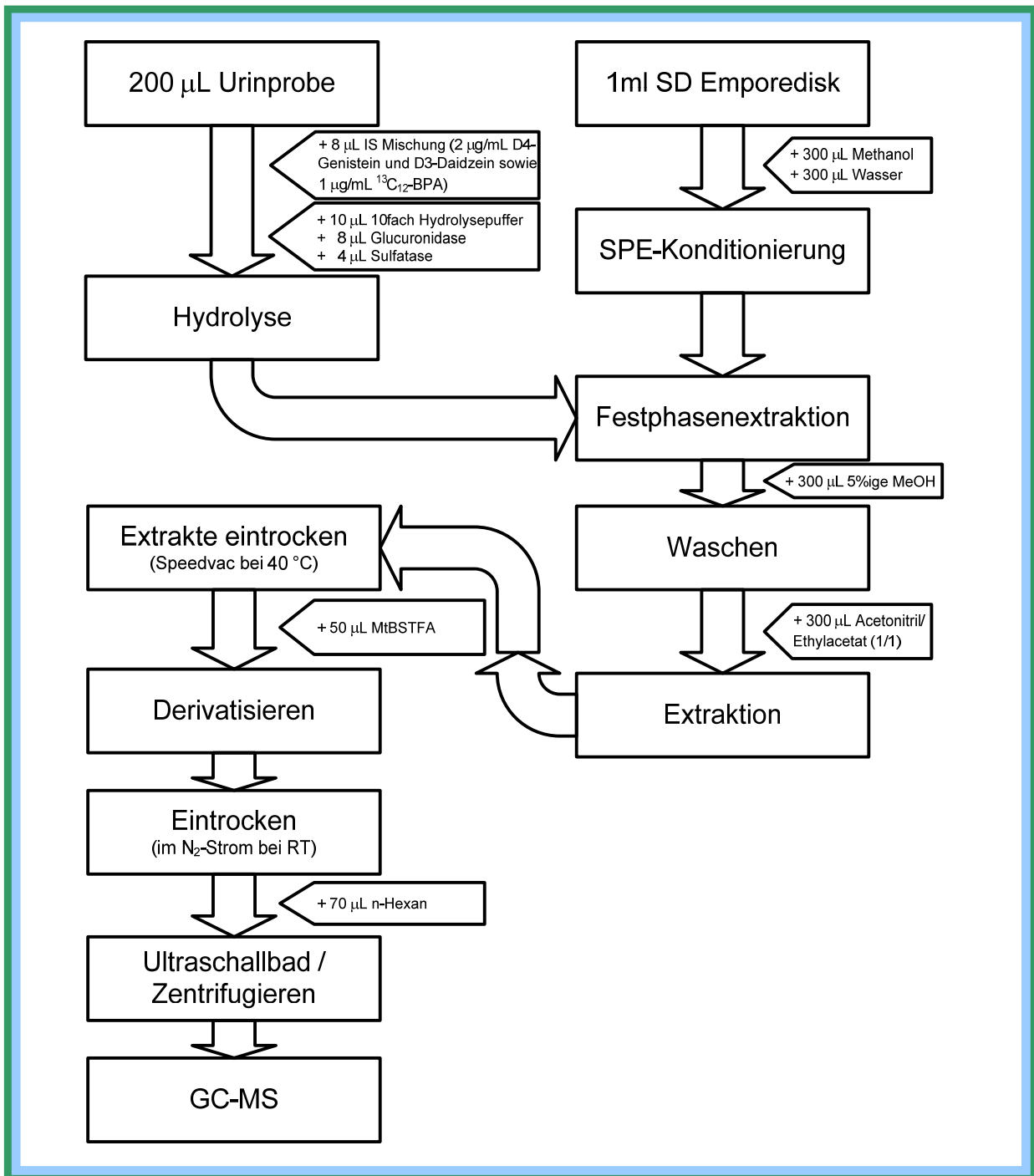


Abbildung 19: Flussschema für die BPA, Daidzein, Equol, und Genistein Analysen von Urinproben.

2.7.1.2 Herstellung von Stammlösung, Verdünnungen und Kalibrierreihen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden jeweils 5 mg Daidzein bzw. Genistein eingewogen, in einen 100 mL Messkolben vorgelegt und anschließend mit Methanol (Suprasolv) bis zur Marke aufgefüllt (analog zu Kapitel 2.6.1.2. nur mit Methanol als Lösungsmittel).

Als Ausgangslösung für BPA wurde eine der V1 Verdünnung analoge Lösung eingesetzt. Dazu wurden 110 mg BPA eingewogen, in einem 50 mL Kolben bis zur Marke mit Methanol

(Suprasolv) aufgefüllt und geschüttelt. Aus dieser Stammlösung wurde 1 mL entnommen und in einen 100 mL Kolben überführt und bis zur Marke mit Methanol (Suprasolv) aufgefüllt (BPA V1 Verdünnung). Zur Herstellung der Equol Stammlösung wurde 1 mg Equol eingewogen, in einem 20 mL Kolben mit Methanol (Suprasolv) aufgefüllt und gelöst.

1 mL Equol Stammlösung (c=50 µg/mL) wurden mit 1 mL der Daidzein Stammlösung (c=50 µg/mL), 1mL Genistein (c=50 µg/mL) und 500 µL der BPA Verdünnung V1 (c=22 µg/mL) im 10 mL Kolben gemischt und mit entionisierten H₂O bis zur Marke aufgefüllt (I1). 1 mL der Verdünnung I1 (c=5 µg/mL, bzw. 1,1 µg/mL) wurden in einem Messkolben mit entionisierten H₂O auf 10 mL verdünnt (I2 c = 0,5 µg/mL, bzw. 0,11 µg/mL). 1 mL I2 wurden anschließend in einen 10 mL Kolben vorgelegt und mit entionisierten H₂O bis zur Marke aufgefüllt (I3 c = 50 ng/mL, bzw. 11 ng/mL).

Die Herstellung der IS-Mischung erfolgte aus den gelieferten Isotopenstandards, die in Acetonitril gelöst waren, durch Auffüllen von 200 µL D3-Daidzein (c = 60 µg/mL), 120 µL D4-Genistein (c = 100 µg/mL) sowie 60 µL ¹³C₁₂-BPA (c = 100 µg/mL) auf insgesamt 600µl mit Acetonitril (Suprasolv). 200 µL der erhaltenen IS-Mischung werden mit 1,8 mL H₂O entionisiert auf 2 mL verdünnt (IS-Mischung 2; c = 2 µg/mL bzw. 1 µg/mL).

Je 200 µL Humanurin wurden als Matrix zur Herstellung einer Kalibrierreihe verwendet und mit den entsprechenden Verdünnungen versetzt (Tabelle 10). Anschließend wird die gesamte Mischung hydrolysiert (siehe Abbildung 19) und auf die SPE Säule gegeben, was eine Volumenkorrektur nicht nötig macht.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Kalibrierproben für die Analyse von Urinen auf Isoflavone, Isoflavon-Metabolite und BPA. µ

Kalibrierstandard	Urin, µL	IS-Mischung 2, µL c=2 µg/mL D3-Daidzein und D4-Genistein sowie 1 µg/mL (¹³ C ₁₂ -BPA)	Verdünnung, µL c Isoflavone bzw. BPA I3 c = 50 ng/mL, 11ng/mL I2 c=0,5 µg/mL, 0,11µg/mL I1 c=5 µg/mL, 1,1 µg/mL	Anteil Acetonitril in der Probe, %	Anteil Methanol in der Probe, %
U _{BI}	200	0	0	0	0
U ₀	200	8	0	0,4	0
U _{1/4}	200	8	10 I3	0,4	<0,1
U _{1/2}	200	8	20 I3	0,4	<0,1
U ₁	200	8	5 I2	0,4	<0,1
U ₂	200	8	10 I2	0,4	0,2
U ₃	200	8	20 I2	0,4	0,3
U ₄	200	8	4 I1	0,4	0,7
U ₅	200	8	10 I1	0,4	1,6
U ₆	200	8	20 I1	0,4	3,1

2.7.1.3 GC-MS Bedingungen 3

Die Analyse der vorbereiteten Proben erfolgte mit dem Agilent GC-MS (GC 6890 mit Quadrupol MS 5973N) und dem Gerstel MPS2 mit folgenden Systemparametern:

Trägergas:	Helium 4.6, konstanter Fluss, 2,0 mL/min
Injektor:	CAS 4 plus (Kaltaufgabesystem)
Injektionsmethode:	20 µL Solvent Vent Injektion
oder (konz. Proben)	2,5 µL Solvent Vent Injektion
Injektortemperatur:	Temperaturprogrammiert (Liner mit Verwirbelung) 0,08 min 25 °C (200 mL/min Helium; Solvent Vent), 12 °C/s->320 °C, 2 min 320 °C, 12 °C/s->400 °C
Injektionsgeschwindigkeit:	4 µL/s
Trennsäule:	J&W, DB-1ms, 15 m * 0,25 mm * 0,25 mm
Temperaturprogramm:	2 min 160 °C, 30 °C/min->310 °C, 5 min 310°C
Transferlinetemperatur:	280 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI)
MSD Temperatur:	230 °C Quelle, 150 °C Quadrupol
Detektierte Ionen:	Total Ion Chromatogram (TIC) von m/z = 200-600
Ionen zur Identifikation:	m/z = 425, 482 (Daidzein)
(Qualifier)	m/z = 428, 485 (D3-Daidzein)
	m/z = 470, 234 (Equol)
	m/z = 555 (Genistein)
	m/z = 558 (D4-Genistein)
	m/z = 213, 441, 456 (BPA)
	m/z = 225, 453, 468 (¹³ C ₁₂ -BPA)
Ionen zur Quantifizierung:	m/z = 425 (Daidzein)
(Quantifier)	m/z = 428 (D3-Daidzein)
	m/z = 470 (Equol)
	m/z = 555 (Genistein)
	m/z = 558 (D4-Genistein, stärkstes Ion)
	m/z = 441 (BPA)
	m/z = 453 (¹³ C ₁₂ -BPA)

2.8 Statistische und analytische Kenngrößen

2.8.1 Mittelwert, Regression und Korrelation

Wird eine zu bestimmende Größe x_j n mal gemessen und der systematische Fehler eliminiert, so erhält man Messwerte, die um einen statistischen Mittelwert schwanken. Das arithmetische Mittel ist durch

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j \quad (2)$$

definiert. \bar{x} ist dabei nur ein Schätzwert und wird als Mittelwert von n Messungen bezeichnet. Der wahre Mittelwert würde sich ergeben, wenn man die Messung unendlich oft wiederholen würde.

Um mathematische Gleichungen zu entwickeln, die einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalintensität (x_j und y_j) beschreiben, bedient man sich der Regressionsanalyse. Im einfachsten Fall besteht ein linearer Zusammenhang

$$y_j = mx_j + b \quad (3)$$

mit

$$m = \frac{n \sum_{j=1}^n x_j y_j - \sum_{j=1}^n x_j \sum_{j=1}^n y_j}{n \sum_{j=1}^n x_j^2 - \left(\sum_{j=1}^n x_j \right)^2} \quad (4)$$

und

$$b = \frac{\sum_{j=1}^n x_j^2 \sum_{j=1}^n y_j - \sum_{j=1}^n x_j \sum_{j=1}^n x_j y_j}{n \sum_{j=1}^n x_j^2 - \left(\sum_{j=1}^n x_j \right)^2}, \quad (5)$$

wobei m die Steigung (Empfindlichkeit) und b den Achsenabschnitt bezeichnet.

Ein Maß für den linearen Zusammenhang der Messwerte ist das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R . Je näher der Wert für R^2 an 1 liegt, desto besser korrelieren zwei Wertereihen.

$$R = \frac{n \sum_{j=1}^n x_j y_j - \sum_{j=1}^n y_j \sum_{j=1}^n x_j}{\sqrt{\left(n \sum_{j=1}^n x_j^2 - \left(\sum_{j=1}^n x_j \right)^2 \right) \left(n \sum_{j=1}^n y_j^2 - \left(\sum_{j=1}^n y_j \right)^2 \right)}} \quad (6)$$

2.8.2 Messpräzision, Methodenpräzision (V_K) und Richtigkeit

Die Präzision ist das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen. Als Präzisionsmaß wird die Standardabweichung s

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (7)$$

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (8)$$

oder die relative Standardabweichung, die auch als Variationskoeffizient V_K bezeichnet wird, angegeben. Hierbei steht n für die Anzahl der Werte, x_i für den Einzelwert und \bar{x} für den Mittelwert. Wenn der Standardabweichung eine Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden soll, so muss vorher die Normalverteilung, z. B. durch Anwenden eines David Tests sichergestellt sein. Die Anleitung zur Durchführung dieses Tests findet sich in Lehrbüchern der Analytik oder der Statistik [Kromidas 1999; Gottwald 2000].

Vielfach wird über unterschiedliche Arten von Präzisionen gesprochen. In Tabelle 11 sind die wesentlichen Präzisionen definiert. Dabei ist die Wiederholpräzision eine Art Oberbegriff für die Präzisionen zwischen den Serien und den Tag zu Tag Präzisionen, je nachdem wie „kurze“ Zeitabstände definiert wird.

Tabelle 11: Definition unteschiedlicher Präzisionen [Kromidas 1999].

Präzisionsart	Bedeutung
<i>Messpräzision</i>	Durch Mehrfachbestimmung einer stabilen homogenen Probe über obige Gleichung ermittelt
<i>Wiederholpräzision (Wiederholbarkeit)</i>	Bestimmung unabhängiger Ergebnisse innerhalb kurzer Zeitabstände unter Wiederholbedingungen. Wiederholbedingung meint dasselbe Verfahren an identischen Objekten mit demselben Bearbeiter und denselben Geräten.
<i>Präzision in der Serie</i>	Übereinstimmung von Ermittlungsergebnissen innerhalb einer Serie an identischem Material, in demselben Labor, mit demselben Bearbeiter.
<i>Präzision zwischen den Serien</i>	Übereinstimmung von unabhängigen Ermittlungsergebnissen in unterschiedlichen Serien an identischem Material, in demselben Labor mit demselben Bearbeiter.
<i>Präzision von Tag zu Tag</i>	Wie die Wiederholpräzision nur an mehreren aufeinander folgenden Tagen.
<i>Laborpräzision (laborinterne Vergleichspräzision)</i>	Ermittlungsergebnisse derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung eines Parameters (z. B. die bearbeitende Person wechselt)
<i>Vergleichspräzision (Reproduzierbarkeit)</i>	Bestimmung unabhängiger Ergebnisse unter Vergleichsbedingungen, d. h. dasselbe Verfahren wird an identischen Objekten aber durch unterschiedliche Bearbeiter und Geräte durchgeführt.

Die Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und einem als richtig angesehenen Wert. Als quantitatives Maß für die Richtigkeit gilt die systematische Ergebnisabweichung. Der Sollwert t-Test wird zur Prüfung auf Richtigkeit verwendet.

Dabei wird ein IST-Wert \bar{x} als Mittelwert von 6 Messungen einer Probe bekannten Gehalts ermittelt und anschließend überprüft, ob der SOLL-Wert μ (erwarteter Wert aus der Einwaage) mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Vertrauensbereichs des Analysenergebnisses liegt. Es gilt

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (9)$$

wobei n für die Anzahl der Wiederholungen (meist 6 oder mehr) und s für die Standardabweichung steht. Das Ergebnis t wird mit dem Wert aus der t-Tabelle [Kromidas 1999] verglichen. Ist $t_{gef} \leq t_{tab}$, so liegt der Sollwert mit gegebener Wahrscheinlichkeit (siehe t-Tabelle) im Vertrauensbereich des Analysenergebnisses.

2.8.3 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die DIN 32645 beschäftigt sich mit der Definition und Kalkulation von Nachweis- (NG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenzen (BG) innerhalb eines Laboratoriums unter Wiederholbedingungen. Dabei werden zwei Methoden unterschieden:

- Direkte Methode, auch Leerwertmethode genannt, bei der NG und EG aus der Unsicherheit des Leerwertes berechnet werden.
- Indirekte Methode, auch Kalibriergradenmethode genannt, bei der die Unsicherheit des Leerwertes über die Extrapolation von Regressionsdaten der Kalibrierfunktion berechnet wird.

Aufgrund der starken Varianz der Basislinie bei der Analyse von biologischen Proben Matrices wird in dieser Arbeit die Kalibriergradenmethode zur Berechnung von NG, EG und BG verwendet und im Folgenden erläutert.

So wird die Nachweisgrenze x_{NG} aus der Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , dem der t-Verteilung (für $f=n-2$ Freiheitsgrade), der Anzahl der Kalibrierproben n , der Anzahl der Messungen der Analysenprobe z , dem Mittelwert der Kalibrierprobengehalte \bar{x} und der Summe der Abweichungsquadrate Q_x berechnet über

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{z} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (10)$$

Die Summe der Abweichungsquadrate wird über

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (11)$$

berechnet. Dabei ist x_i die Gehaltsgröße.

Die Verfahrensstandardabweichung ist der Quotient aus Reststandardabweichung $s_{y,x}$ und Steigung der Kalibriergraden m

$$s_{x0} = \frac{s_{y,x}}{m} \quad (12)$$

Die Reststandardabweichung $s_{y,x}$ lässt sich über

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-2}} \quad (13)$$

berechnen. \hat{y}_i ist der geschätzte Funktionswert bei der Kalibrierung, der über

$$\hat{y}_i = m \cdot x_i + b \quad (14)$$

berechnet wird (siehe auch Abschnitt 2.8.1).

Die Erfassungsgrenze wird für den Fall, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art α (Signifikanzniveau) gleich der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art β (Wahrscheinlichkeit) ist, als zweifacher Wert der Nachweisgrenze kalkuliert. Ist $\alpha \neq \beta$, gilt hingegen

$$x_{EG} = x_{NG} + s_{x0} \cdot t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{z} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}. \quad (15)$$

Die Bestimmungsgrenze x_{BG} wird über

$$x_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{z} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{BG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (16)$$

iteriert. Dabei ist $t_{f,\alpha}$ das Quantil der t-Verteilung für f Freiheitsgrade und die Wahrscheinlichkeit α . Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurde jedoch die Näherung verwendet, dass für x_{BG} im Wurzelausdruck $k \cdot x_{NG}$ gesetzt werden kann. $1/k$ ist die relative Ergebnisunsicherheit (z. B. 0,25 für $k=4$).

Mit Hilfe dieser Gleichung ist es möglich, die Angabe von Analyseergebnissen mit den Ausdrücken

- Gehalt (wenn $x \geq x_{BG}$)
- nachgewiesen (wenn $x_{NG} \leq x \leq x_{BG}$)
- nicht nachgewiesen (wenn $x \leq x_{NG}$)

zu beschreiben. Damit ist es möglich, gesichertere Aussagen bei der Angabe von Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze zu machen.

Folgende weitere Gleichungen kamen für die Berechnung der Schnellschätzwerte zum Einsatz.

Die Schnellschätzung der Nachweisgrenze erfolgte über

$$x_{(NG)} = 1,2 \cdot \Phi_{n,\alpha} \cdot s_{x0} \quad (17)$$

und die der Bestimmungsgrenze über

$$x_{(BG)} = 1,2k \cdot \Phi_{n,\alpha} \cdot s_{x0} \quad (18)$$

Für den Faktor zur Schnellschätzung $\Phi_{n,\alpha}$ gilt für $f=n-1$

$$\Phi_{n,\alpha} = t_{f,\alpha} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad (19)$$

Häufig wird auch die Nachweisgrenze durch das kleinste von der Blindprobe noch signifikant unterscheidbare Analysensignal bestimmt (Nachweisgrenze nach 3σ Methode). Die kleinste Konzentration c_L , bei der das zugehörige Intensitätsverhältnis von Signal I und Untergrund I_U noch genügend statistisch gesichert ist, ist durch

$$\frac{I}{I_U} = 3\sigma_{rel} \quad (20)$$

gegeben.

Der Faktor 3 ist die statistische Sicherheit. Dieser legt fest, dass 99,73 % aller Messwerte innerhalb der Wertungsgrenze liegen. Für die Nachweisgrenze ergibt sich damit für kleine Konzentrationen

$$NG = E \cdot 3\sigma_{rel} \quad (21)$$

E ist die reziproke Empfindlichkeit (reziproke Steigung: m^{-1}). Vielfach wird das Signal-zu-Rausch-Konzept („signal to noise ratio“) verwendet. Dabei ändert sich Gl. (21) um den Faktor $\sqrt{2}$, der aus der quadratischen Addition der Rauschbeiträge des Signals und des maßgeblichen Untergrundes resultiert [Doerffel *et al.* 1994].

$$\frac{I}{I_U} = 3 \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_{rel} \quad (22)$$

Für die Nachweisgrenze ergibt sich dann

$$NG = m^{-1} \cdot 3 \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_{rel} \quad (23)$$

Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes \bar{x} zum richtigen Wert x_R Wert des Analyten in der Probe.

$$WR(\%) = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100 \quad (24)$$

Der Idealwert beträgt 100% und macht eine Aussage über die Selektivität, Richtigkeit und Robustheit.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung und Optimierung

In den folgenden Abschnitten werden die für unterschiedliche Aufgabenstellungen notwendigen Methodenentwicklungen bzw. Optimierungen beschrieben. Ferner wird ihre Leistungsfähigkeit durch Methodenparameter, Validierungsmessungen und Beispielchromatogramme belegt.

3.1.1 BPA in Plasmen

Für die BPA-Analyse von Plasmaproben wurde auf eine zuvor von Upmeier (2001) eingesetzte fl./fl. Extraktion weiterentwickelt. Diese Methode war bereits hinsichtlich der Wahl des Extraktionsmittels optimiert. Anders als bei Upmeier (2001) erfolgte die Extraktion in dieser Arbeit mit einer geringeren Menge DIPE, aber mehrfach um dem Nernstschen Verteilungsgesetz besser Rechnung zu tragen. Ferner wurden, wegen auftretender Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Signale für BPA-TMS-Ether, noch Versuche mit weiteren Derivatisierungsreagenzien durchgeführt.

Um ein Derivatisierungsreagenz auszuwählen, das auch bei einem stärker störenden Matrixhintergrund gute Ergebnisse bei der Routinemessung liefert, wurden eingetrocknete Proben mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien wie Acetylacetat, BSTFA oder SilprepTM versetzt. Gut reproduzierbarere Ergebnisse ergab die Derivatisierung, wenn acetyliert und anschließend erneut extrahiert wurde [Miyakoda *et al.* 1999]. Die beiden anderen Derivatisierungsreagenzien führten zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit (in der SL Aufgabe). Abbildung 20 zeigt die letztlich als optimal gewählte Derivatisierungsreaktion für BPA Analysen aus Plasma.

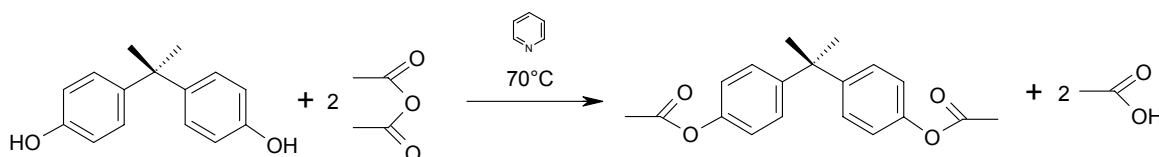


Abbildung 20: Acetylierung von BPA zum BPA(ac)₂.

Zur Ermittlung der Extraktionseffizienz (Extraktionsstufe aus Plasma) wurden zunächst vier gespikete Plasmaproben dreifach extrahiert, die jeweiligen Extrakte aber nicht vereinigt.

Nach der Derivatisierung jedes Extraktes wurde noch einmal dreifach mit DIPE extrahiert, die Extrakte dieser Stufe jedoch vereinigt. So wurde zunächst die Effizienz der drei Extraktionen in der ersten Stufe ermittelt. Analog wurde für die zweite Extraktionsstufe (Extraktionsstufe nach der Derivatisierung) verfahren: Dafür wurden vier Proben identischer Konzentration zunächst je zweimal extrahiert und die Extrakte wurden vereinigt. Nach erfolgter Derivatisierung wurden diese erneut dreifach ausgeschüttelt, und die Extrakte (nicht vereinigt, sondern) separat gemessen. Abbildung 21 zeigt die Signalintensität in Prozent in den jeweiligen Fraktionen für beide Stufen. Die Summe der Flächenwerte aus den Extraktionen wurde gleich 100% gesetzt, damit sich der Anteil der Signalintensität in den einzelnen Fraktionen leichter vergleichen lässt.

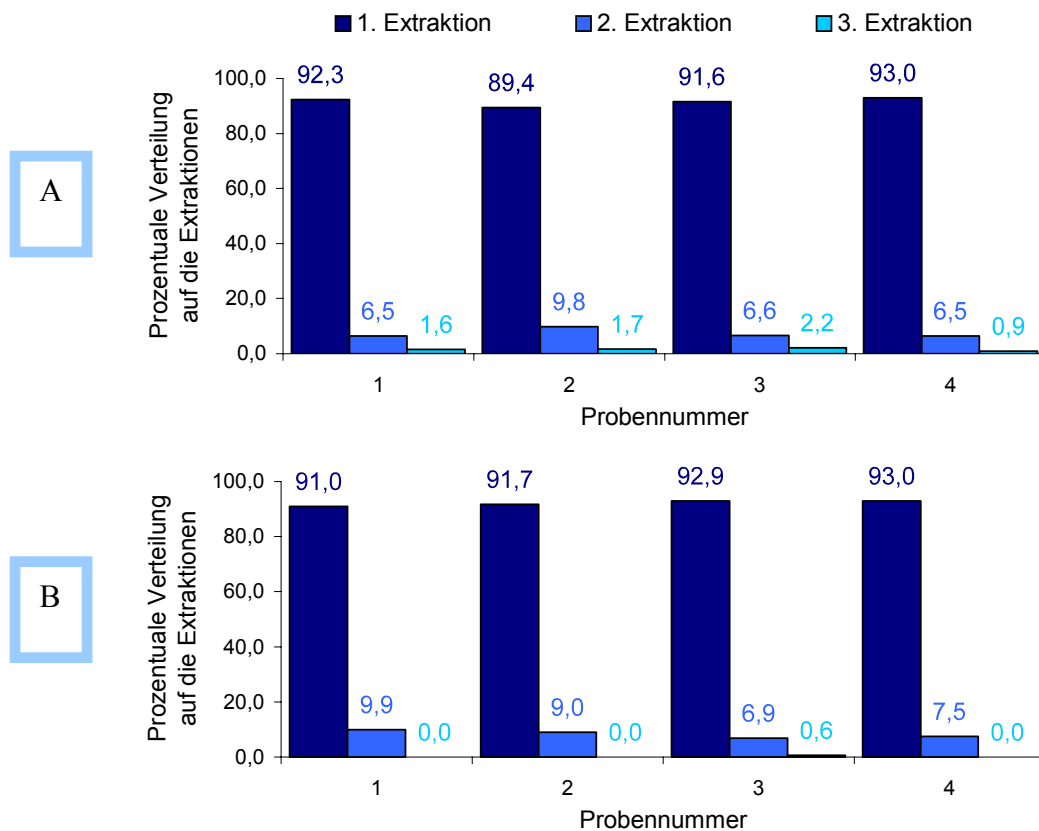


Abbildung 21: Relative Extraktionseffizienz der beiden Extraktionsstufen bei der BPA Proben- vorbereitung. A Extraktionseffizienz für BPA aus Plasma (erste Extraktionsstufe) und B Extraktions- effizienz für BPA(ac)₂ (zweite Extraktionsstufe).

Es ist deutlich zu erkennen, dass der jeweils dritte Schritt der Extraktionen vernachlässigt werden kann. Die zweite Extraktion führt noch zu einer Signalvergrößerung um bis zu 10 % und sollte daher trotz des erhöhten Arbeitsaufwandes beibehalten werden. Auf eine Derivatisierungsoptimierung wurde hier verzichtet: Zum einen führten die gewählten

Bedingungen (70 °C für 20 min) bereits zu guten Signalintensitäten. Ferner ist wegen der Extraktion nach Derivatisierung eine Optimierung hinsichtlich Zeit und Temperatur nicht gut durchführbar, weil eine fl./fl. Extraktion auf dieser Stufe u.U. stark verlustbehaftet ist. Ein wichtiger Punkt der Methodenoptimierung waren die Geräteeinstellungen an der GC-MS, wie Aufgabetechnik, Temperaturprogramm und Detektion: Das Ergebnis der Optimierung aus Zeit, Signalform und Signaltrennung findet sich im Abschnitt 2.5. Gerade wenn eine fl./fl. Extraktion eingesetzt wird, empfiehlt sich der Einsatz eines internen Standards (IS), der nach Möglichkeit vor der Aufarbeitung zugegeben werden und dem Analyten chemisch gleichen sollte. Als guter IS für BPA ist $^{13}\text{C}_{12}$ -(Ring)-BPA kommerziell verfügbar: Darin sind die Kohlenstoffatome in beiden aromatischen Systemen durch ^{13}C ersetzt; dies ermöglicht eine sehr gute Unterscheidung im Massenspektrum. Abbildung 22 zeigt ein Totalionenchromatogramm und die daraus errechneten Massensignale (BPA Quantifier sowie IS Quantifier) für die BPA-Analyse von Plasmen.

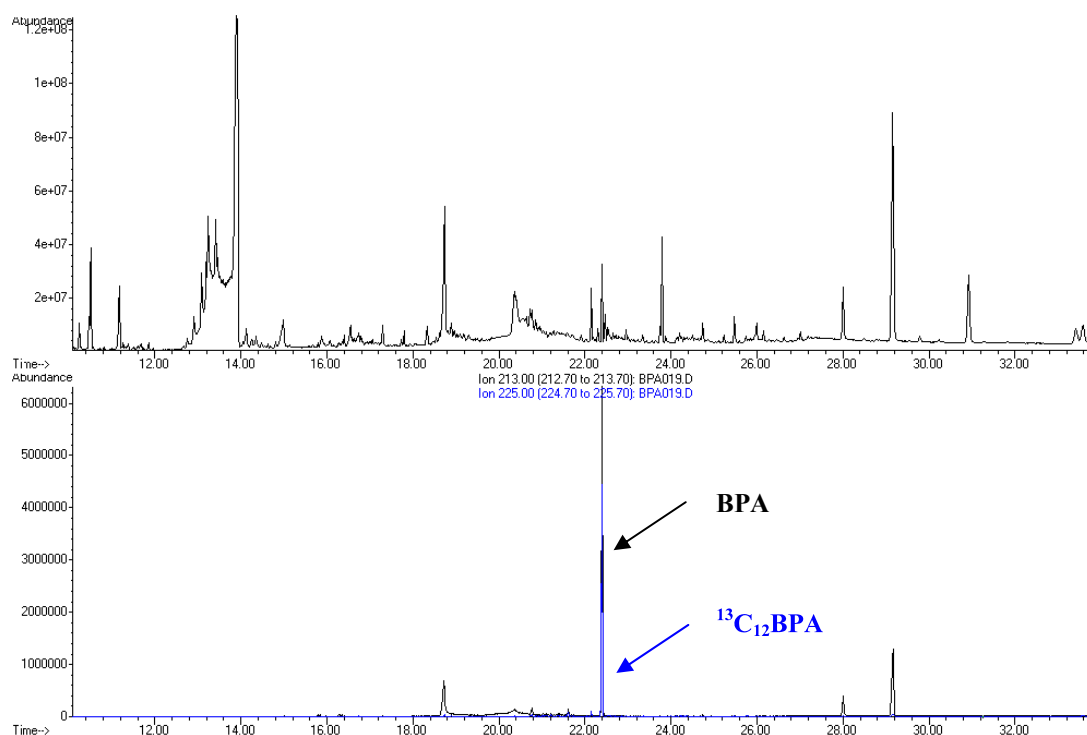


Abbildung 22: Totalionenchromatogramm und errechneter Quantifier zur Messung von BPA in Plasma (hier Schweineplasma).

Zu erkennen ist der durch Matrixbestandteile aus dem Plasma bedingte Untergrund; er war bei allen verwendeten Plasmen sehr ähnlich. Die errechneten Ionen für die BPA Quantifizierung zeigten ungestörte und somit gut verwendbare Signale. Auch die Signalform war bei dem gewählten Temperaturprogramm sehr gut.

Die Fähigkeit einer Methode und ihre Validierung werden durch eine Reihe von Prüfpunkten belegt (siehe Kapitel 2.8.2). Unsere Messungen zur Validierung der BPA Analysen in Plasma wurden an einer Saturn 4D MS durchgeführt. Für die später auch eingesetzte Agilent Anlage ergaben sich vergleichbare Werte (siehe Messpräzision für BPA in Gewebeproben).

Zunächst wurde durch 10fache Injektion derselben Probe die Messpräzision der Anlage bestimmt. Tabelle 12 zeigt die errechneten Werte.

Tabelle 12: Messpräzision der Saturn GC-MS bei der BPA-Analyse in Schweineplasma. Bestimmt durch die 10fache Injektion eines S4 Kalibrierstandards, d.h. 4,4ng BPA absolut.

Messung	Flächenwert BPA(ac) ₂	Flächenwert ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂	Fläche BPA(ac) ₂ / Fläche ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂
1	194454	135776	1,4
2	189566	136177	1,4
3	180208	130784	1,4
4	180079	133265	1,4
5	182375	134477	1,4
6	181456	131759	1,4
7	186250	139371	1,3
8	185419	136500	1,4
9	182397	137289	1,3
10	192190	135889	1,4
Mittelwert	185439	135129	1,37
Standardabweichung	5111	2599	0,03
Variationskoeffizient, %	3	2	2

Die errechnete Messpräzision liegt zwischen 2 und 3 %. Durch die Korrektur mit dem IS kann es zu einer Verbesserung aber auch zu einer Verschlechterung der Messpräzision kommen, wenn z.B. starke Matrixeffekte die Massenspuren unterschiedlich stark stören, und es so zu unterschiedlichen Integrationen kommt. Meist ist aber die Messpräzision sehr klein und primär vom Gerät und Aufgabesystem abhängig.

Die Verfahrenspräzision ist entscheidend, wenn die Methode von mehreren Personen durchgeführt wird. Hierzu wird das gesamte Verfahren von unterschiedlichen Personen durchgeführt und eine Probe mit definierter Konzentration bestimmt. Tabelle 13 zeigt die an verschiedenen Tagen durch mehrere Personen ermittelten Analyseergebnisse für identische Proben.

Tabelle 13: Bestimmung der Verfahrenspräzision der BPA-Analyse in Schweineplasma.

Proben- datum	Soll- Wert, ng/mL	Flächenwerte BPA(ac) ₂ m/z = 213	Flächenwerte ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂ m/z = 225 (IS)	korrigierter Flächenwert BPA(ac) ₂ /IS	errechneter Gehalt durch unabhängige Kal., ng/mL
10.08.2001	1100	209084	117099	1,79	1178,2
09.11.2001	1100	540695	343518	1,57	1038,6
06.11.2001	1100	535342	306682	1,75	1151,9
08.11.2001	1100	468623	291290	1,61	1061,6
30.08.2001	1100	64992	36467	1,78	1176,0
02.09.2001	1100	91982	51874	1,77	1170,1
Mittelwert		318453,0	191155,0	1,71	1129,4
Standardabweichung		215017,2	134276,6	0,10	66,3
Variationskoeffizient, %		68	70	6	6

Es wird deutlich, dass trotz erheblicher Unterschiede in den einzelnen Flächenwerten (blau unterlegt; auf unterschiedlich gute Extraktionen zurückzuführen), die Korrektur mit dem IS vergleichbare Werte ergibt. Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die ausführenden Personen, Fehler von im Mittel 6 % Abweichung zum Sollwert verursacht werden.

Als Qualitätsmerkmal wird häufig die Wiederfindungsrate innerhalb und zwischen den Serien (intra- und interassay variability) angegeben. Hier erfolgt die Aufarbeitung gespikter Proben durch eine Person. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse einer Vierfachbestimmung für zwei unterschiedliche Konzentrationen (niedrig und hoch) gezeigt.

Tabelle 14: Wiederfindungsraten für BPA-Analyse in Schweineplasma (in und zwischen den Serien).

Proben- bezeichnung	Soll- Wert, ng/mL	Wiederfindungsrate WR, %			
		(ohne IS-Korrektur)		(mit IS-Korrektur)	
		In der Serie	Zwischen den Serien	In der Serie	Zwischen den Serien
n1	220	72	80	66	85
n2	220	74	88	67	94
n3	220	82	85	75	91
n4	220	68	83	63	89
h1	1100	98	92	90	99
h2	1100	97	97	88	104
h3	1100	110	103	101	110
h4	1100	104	97	95	104
Mittelwert n		74	84	68	90
Mittelwert h		102	97	93	104

Für Plasmaproben mit niedrigen BPA-Konzentrationen liegt die Wiederfindung im Mittel bei 84 bzw 90 %, bei hohen Konzentrationen bei 97 bzw. 104 %. Selbst wenn die Korrektur durch den internen Standard nicht durchgeführt, sondern mit einer direkt nachfolgend gemess-

senen Kalibrierreihe berechnet wird, liegen die Wiederfindungen für BPA aus Plasma noch im Bereich >63 %. Die Wiederholpräzisionen in der Serie wurden bei den „n-Proben“ mit 4 % und den h-Proben mit 5 % berechnet.

Um eine Aussage über die Richtigkeit der Methode zu erhalten und systematische Abweichungen aufzudecken, wurde ein Sollwert t-Test durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.2). Da kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung stand, wurde jeder Wert aus vier Einzelwerten (Proben eines anderen Ansatzes) gemittelt, um den zufälligen Fehler zu reduzieren. Dann wurde mit einer mittleren Kalibrierungsfunktion (gemittelt aus sechs unabhängigen Kalibrierungen) der jeweilige Gehalt berechnet und der Sollwert t-Test durchgeführt. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 15: Sollwert t-Test für die BPA-Analysen in Schweineplasma (Sollwert 1100 ng/mL).

Probensatz	Berechneter Gehalt mit einer mittleren Kal. (n=6), ng/mL	Prozentualer Fehler zum Sollwert, %
1	1120,8	1,9
2	1059,1	3,7
3	1074,6	2,3
4	1053,1	4,3
5	1151,2	4,7
6	1175,5	6,9
Mittelwert	1105,7	
Standardabweichung	51,1	
Variationskoeffizient, %	4,6	
Sollwert t-Test	0,3	

Für eine sechsfach Bestimmung bei einer Wahrscheinlichkeit von $P = 95\%$ sollte $t_{\text{gefunden}} < t_{\text{Tabelle}}$ sein. Für $t(0,05; \text{einseitig}; f = n-1; n = 6)$ ist der tabellierte Wert 2,571. Damit konnte die Richtigkeit belegt werden.

Weitere wichtige Merkmale einer Methode sind die Kalibrierfunktion, Empfindlichkeit, Nachweisgrenze und Linearität. Im Folgenden ist eine Kalibrierfunktion dargestellt, welche auch zur Berechnung der Nachweisgrenze diente. Diese Reihe wurde auf zwei Anlagen, der Saturn GC-MS und der Agilent GC-MS, gemessen um den linearen Arbeitsbereich der beiden Detektoren zu bestimmen und die jeweiligen Nachweisgrenze zu berechnen. Abbildung 23 zeigt die Kalibrierfunktion der beiden Anlagen.

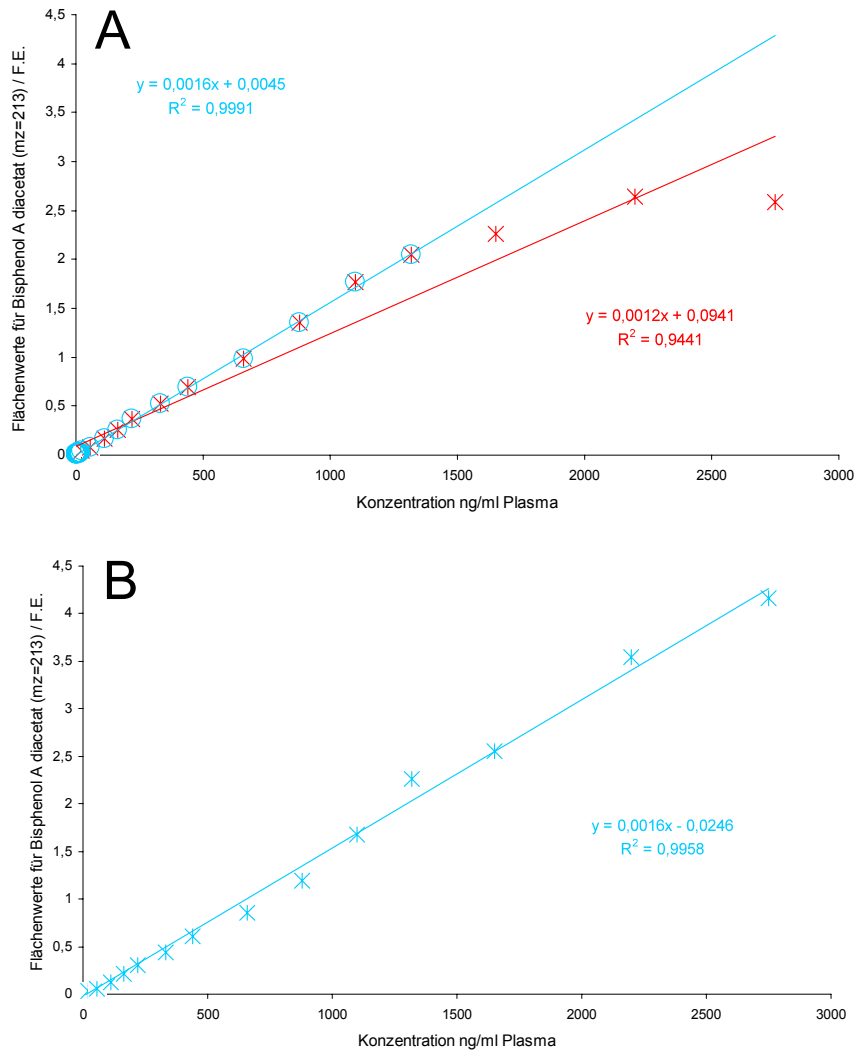


Abbildung 23: BPA-Kalibrierfunktion in Schweineplasma gemessen auf (A) Agilent GC-MS und (B) auf Saturn GC-MS.

Mit dem Agilent GC-MS ist das Ende des linearen Bereichs bei Konzentrationen über 1300 ng/mL zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Sättigung des MS Detektors zurückzuführen. Folglich wurde der obere Grenzwert bei der Agilent Anlage auf einen Flächenwert von circa 130 Mio. Flächeneinheiten für das m/z = 213 Signal (entsprach ca. 1300 ng/mL zu dem Zeitpunkt) gesetzt. Reale Proben, z.B. aus Kinetikstudien (vgl. Abschnitt 3.2.1.2), die ein größeres Signal erzeugten, wurden entsprechend verdünnt bzw. eine geringere Menge erneut aufgearbeitet¹.

Ein weiterer wichtiger Parameter einer Methode ist die Nachweisgrenze (NG). Meist wird sie nach der S/N = 3-Methode bestimmt. Dies hat jedoch den Nachteil, dass man die Signale

¹ Im laufenden Betrieb der Anlage wurde trotz der Konstanz der Kalibrierdaten, eine Abnahme der absoluten Flächenwerte beobachtet, was den linearen Bereich im Verlauf der Messungen (bezogen auf ng/mL) erweiterte.

manuell bestimmen muss. Oft ist die Angabe der NG in der Realität zu niedrig oder zeigt nur die NG der Anlage für diese eine Probe und nicht die der Methode. Um diese Probleme zu vermeiden, wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen gemäß DIN 32645 (Kalibriergeradenmethode) berechnet (siehe Kapitel 2.8.3). Tabelle 16 zeigt die für Kalibrierung von 1,1 bis 1100 ng/mL berechneten Ergebnisse für beide GC-MS Anlagen.

Tabelle 16: Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenzen für BPA-Analysen in Schweineplasma. Kalkuliert aus der Doppelbestimmung von 19 Kalibrierproben im Bereich von 0 bzw. 1,1 bis 1100 ng/mL.

Parameter ,ng/mL	Saturn GC-MS	Agilent GC-MS
Nachweisgrenze	24	14
Nachweisgrenze (Schnellschätzung)	47	28
Erfassungsgrenze	52	31
Bestimmungsgrenze	70	42
Bestimmungsgrenze (Schnellschätzung)	142	85

3.1.2 BPA in Geweben

Zur Analyse von BPA in Geweben wurde die im vorherigen Abschnitt beschriebene Methode angepasst, denn bei Geweben ist ein besonderer Aufschluss erforderlich, um das BPA vollständig extrahieren zu können. Hierzu wurde ein bereits in früheren Studien mit Daidzein verwendetes Verfahren für den Aufschluss von Rattengeweben angewendet [Janning *et al.* 2000, Degen *et al.* 2002b, Upmeier *et al.* 2000]. Dabei wird die homogenisierte Gewebeprobe zunächst einem Proteinabbau und anschließend der enzymatischen Hydrolyse unterworfen.

Da die Aufarbeitung weitgehend analog zu der in Kapitel 3.1.1. optimierten Aufarbeitung durchgeführt wird, war eine erneute Optimierung nicht erforderlich. Es wurde lediglich festgestellt, dass bei einigen Proben die Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung zur Verbesserung der Phasentrennung bei der ersten Extraktion führt.

Für einige Gewebe wurde noch das Temperaturprogramm am Gaschromatographen geändert, um eine gute Signalform für die Massenspur $m/z = 213$ in Abhängigkeit von der Gewebeart zu erhalten. Zunächst wurde mit Ratten-Geweben kalibriert (Leber der Kontrolltiere), da diese die geringsten Signalveränderungen aufwiesen. Erst als keine Rattengewebe mehr zur Verfügung standen, wurde nach einem geeigneten anderen Referenzgewebe gesucht. Der Test mit Schweineleber zeigte aber größere Probleme, sowohl bei der Aufarbeitung als auch bei der späteren Chromatographie durch einen erhöhten

Untergrund und schlechtere Signalformen. Weitere Tests mit Kaninchenleber, Hühnerleber (sehr fetthaltig), Rinderleber und Kalbsleber zeigten gute Resultate für Kalbsleber (allerdings nicht so gut wie Rattenleber). Abbildung 24 zeigt Totalionenchromatogramme für verschiedenen Lebergewebe.

Deutlich wird das Problem einer schlechten Signalform am Beispiel Kaninchenleber. Ein besseres Matrixmaterial für die Kalibrierung ist dagegen Kalbsleber. Hier zeigt das Totalionenchromatogramm ein ähnliches Bild wie bei Rattenleber und die extrahierten Qualifier haben eine gute Signalform. Daher wurde für die Validierungsmessungen der Gewebe-Methode als „Referenz“matrix dann Kalbsleber herangezogen.

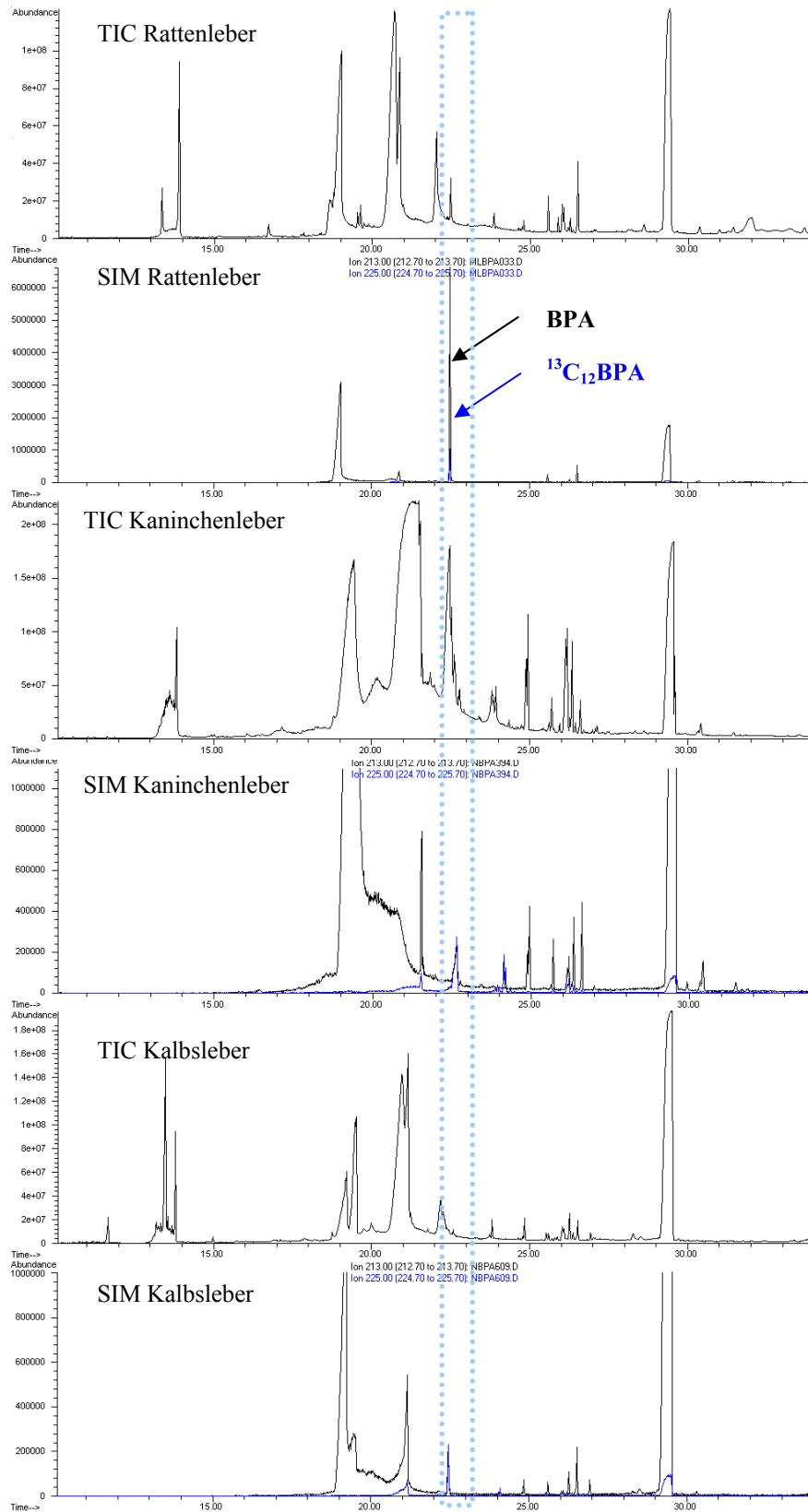


Abbildung 24: Totalionenchromatogramme und errechnete Quantifier/Qualifier von verschiedenen Lebergeweben. (Minimale Retentionszeitsveränderung entstehen durch die Kürzung der analytischen Säule während der Reinigungsvorgänge).

Zunächst wurde die Messpräzision bestimmt; hier für die Agilent GC-MS mit einem neuen Autosampler (Gerstel MPS2). Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der 10fach Injektion einer aufgearbeiteten Kalbsleberprobe im mittleren Konzentrationsbereich.

Tabelle 17: Messpräzision Agilent GC-MS mit Gerstel MPS2 für BPA-Analysen in Kalbsleber. Bestimmt durch die 10fache Injektion eines S5 Kalibrierstandards, d.h. 8,25 ng BPA absolut.

Messung	Flächenwert BPA(ac) ₂ , F.E.	Flächenwert ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂ , F.E.	Flächenwert BPA(ac) ₂ / Flächenwert ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂
1	17487997	5551143	3,2
2	20927096	6917882	3,0
3	20884586	6717388	3,1
4	20415376	7251159	2,8
5	19835607	6296839	3,2
6	19757157	6194180	3,2
7	17760724	5547835	3,2
8	16807536	5384975	3,1
9	17369126	5469246	3,2
10*	16134115	4992952	3,2
Mittelwert	18737932	6032360	3,1
Standardabweichung	1806017	754094	0,1
Variationskoeffizient [%]	10	13	4

* manuell integriert

Der Fehler ist gegenüber den Plasmamessungen etwas höher, was evt. auf die andere Anlage, doch vermutlich eher auf die komplexere Matrix zurückzuführen ist, die stärkere Störungen verursacht.

Dann wurde die Verfahrenspräzision für Kalbsleber ermittelt. Dazu wurden die Gehalte von gespikten Proben mit einer unabhängigen Kalibrierung, d.h. eine Kalibrierung, die nicht in der gleichen Serie wie die Proben erstellt wurden berechnet. Tabelle 18 zeigt die errechneten Werte.

Tabelle 18: Bestimmung der Verfahrenspräzision für BPA in Kalbsleberproben.

Proben- bezeichnung	Soll-Wert, ng/mL	Flächenwert BPA(ac) ₂ , F.E.	Flächenwert ¹³ C ₁₂ - BPA(ac) ₂ , F.E.	Flächenwert BPA(ac) ₂ / Flächenwert ¹³ C ₁₂ -BPA(ac) ₂	errechnete Konz.ng/mg
m1	550	16314934	13358776	1,2	596
m2	550	3959104	2931622	1,4	662
m3	550	18508942	17880140	1,0	501
m4	550	8069382	6876354	1,2	571
m5	550	4647738	4028585	1,2	561
m6	550	18917960	16990968	1,1	541
m7	550	4977087	4795125	1,0	502
Mittelwert		10770735	9551653	1,2	562
Standardabweichung		6852595	6368047	0,1	56
Variationskoeffizient, %		64	67	10	10

Zwischen den absoluten Werten der einzelnen Messtage sind hohe Schwankungen zu erkennen; diese reduzieren sich aber drastisch (auf 10 %), wenn man den IS zur Korrektur einsetzt. Die verbleibende Abweichung ist vor allem auf unterschiedlich starke Störung der Massenspektren für die Qualifier/Quantifier und auf die Anwesenheit der stärker bindenden Matrixbestandteile bei der Probenaufarbeitung und Probenaufgabe zurückzuführen.

Für Kalbsleber als Referenz-Matrix wurden auch Messungen zu den Wiederfindungsraten bei hohen (h), mittleren (m) und niedrigen (n) BPA-Gehalten durchgeführt. Tabelle 19 zeigt die erhaltenen Werte.

Tabelle 19: Wiederfindungsraten in und zwischen den Serien bei der BPA-Analyse in Kalbsleber.

Probenbezeichnung	Sollwert, ng/mL	Wiederfindungsrate WR, %			
		(ohne IS Korrektur) In der Serie	(mit IS Korrektur)	(ohne IS Korrektur) Zwischen den Serien	(mit IS Korrektur)
n1	220	75	85	156	103
n2	220	63	91	136	110
n3	220	73	92	154	110
n4	220	65	91	141	110
m1	550	91	111	52	110
m2	550	93	103	76	110
m3	550	80	93	83	106
m4	550	70	94	42	85
h1	1100	93	108		
h2	1100	93	100		
h3	1100	93	100		
h4	1100	88	108		
Mittelwert n		67	90	143	110
Mittelwert m		81	100	67	103
Mittelwert h		91	104		

Zu erkennen sind hier Verbesserungen zwischen den Serien, wenn mit dem IS korrigiert wird. Ein interner Standard ist nicht unbedingt nötig, wenn zusammen mit den Proben jeweils eine Kalibrierreihe gemessen wird, während zwischen den Serien deutlich stärkere Schwankungen ohne IS Korrektur auftreten. Verglichen mit den Plasma-Wiederfindungsreihen findet man etwas höhere Abweichungen, die auf den „Background“ zurückzuführen sind. Die Wiederholpräzisionen in der Serie für n, m und h Proben liegen bei 4 %, 8 % und 4 %.

Um eine Aussage über die Richtigkeit der Gewebe-Methode zu erhalten, wurde auch dafür ein Sollwert t-Test durchgeführt (siehe Kapitel 2.8.2). Analog zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise wurde der Mittelwert aus einer Vierfachmessung mit einer mittleren Kalibrierfunktion (errechnete Kalibrierfunktion aus 6 unabhängigen Kalibrierungen) berechnet. Tabelle 20 zeigt die errechneten Werte.

Tabelle 20: Sollwert t-Test für die BPA-Analyse in Kalbsleber (Sollwert 550 ng/mg).

Probensatz	Berechneter Gehalt (n = 6; Soll = 550 ng/mg), ng/mg	Fehler zum Sollwert, %
1	543	1
2	572	4
3	629	14
4	569	3
5	694	26
6	614	12
Mittelwert, ng/mg	604	
Standardabweichung, ng/mg	55	
VK, %	9	
Sollwert t-Test	2,4	

Da der Sollwert t-Test als bestanden gilt, wenn das Ergebnis kleiner als 2,571 ist (für t, P = 95%, f = n-1, n = 6), kann auch dieser Test als bestanden angesehen werden.

Als weitere wichtige Merkmale der Methode sind im Folgenden die Kalibrierfunktion (Abbildung 25) und die berechneten Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenzen dargestellt (Tabelle 21).

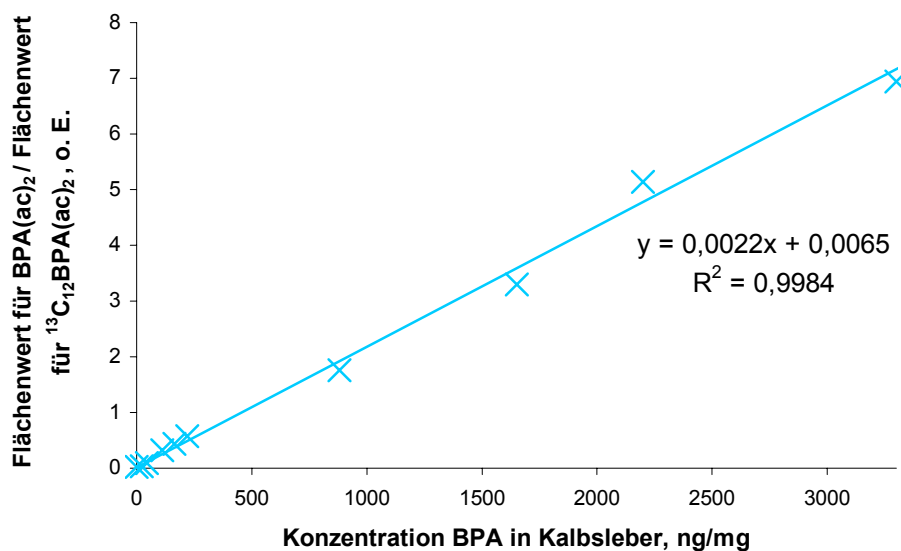


Abbildung 25: BPA-Kalibrierfunktion in Kalbsleber.

Diese Kalibrierfunktion zeigt einen deutlich größeren linearen Bereich als die im Abschnitt 3.1.1 gezeigte Funktion für BPA in Plasma (gemessen mit dem Agilent GC-MS). Wichtig ist aber, dass der hier eingetragene Wert für 3300 ng/mg nur 100 Mio. Flächeneinheiten aufwies.

Dieser Wert wurde bei den Plasmamessungen schon bei 1300 ng/mL überschritten (siehe 3.1.1). Ein möglicher Grund dieser Veränderung kann eine geringere Menge „flugfähiger“ Ionen, bedingt durch den Matrixuntergrund sein oder eine insgesamt durch Matrixbestandteile verringerte Extraktionsausbeute. Ebenso kann das zunehmende Alter der Anlage einen Beitrag zur „Unempfindlichkeit“ liefern. Über den Kalibrierbereich von 11-3300 ng/mg konnten die in Tabelle 21 aufgeführten Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenzen ermittelt werden.

Tabelle 21: Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenzen für BPA-Analyse in Kalbsleber nach DIN 32645. Kalkuliert aus der 6fach Bestimmung von 8 Kalibrierproben im Konzentrationsbereich von 0, bzw. 11-3300 ng/mg.

Parameter, ng/mg	Agilent GC-MS
Nachweisgrenze	32
Nachweisgrenze (Schnellschätzung)	105
Erfassungsgrenze	69
Bestimmungsgrenze	76
Bestimmungsgrenze (Schnellschätzung)	315

Da die Kalibrierungen bedingt durch die Matrix eine höhere Reststandardabweichung aufweisen, errechnen sich höhere Nachweisgrenzen als beim Plasma.

3.1.3 Isoflavone in Schweineplasmen

Die für eine Tierversuchsreihe an Schweinen erforderliche Analyse von Isoflavonen in Plasma wurde mittels fl./fl. Extraktion mit Ethylacetat nach Janning *et al.* (2000). durchgeführt. Anschliessend wurden die mit Ethylacetat extrahierten Proben für die GC-MS Analyse mit MtBSTFA derivatisiert, wie durch Liggins *et al.* (1998) publiziert.

Da nur eine geringe Anzahl an Plasma-Proben abzuarbeiten war, wurde entschieden, die Methode unter Verzicht auf eine ausführliche Optimierung zu adaptieren und lediglich Kalibrierreihen und Wiederfindungen als Qualitätsmarker zu bestimmen. Für die Kalibriermessungen wurde kommerziell erhältlichliches Schweineplasma eingesetzt.

Tabelle 22 zeigt die Wiederfindungsraten in und zwischen den Serien für unterschiedliche Konzentrationen (n, m, h).

Tabelle 22: Wiederfindungsrate in und zwischen den Serien für die Daidzein- und Genistein-Analyse in Schweineplasma (fl./fl. Extraktion) nach Korrektur durch den IS.

Mittelwert (n=4)	Soll-Wert ng/mL	Wiederfindungsrate WR, %			
		In der Serie		Zwischen den Serien	
		Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein
n Proben	150	94	104	72	104
m Proben	600	125	115	109	121
h Proben	2000	102	94		

Die Präzision in der Serie lag für hoch und niedrig konzentrierte Proben im Mittel bei 8 – 15 % für Daidzein und 5 - 15 % für Genistein. Der Versuch, Wiederfindungsdaten bei sehr geringen Gehalten zu messen, wurde durch Isoflavon-Blindwerte aus dem Referenz-Schweineplasma erschwert, das zur Herstellung der Kalibrierreihen und Wiederfindungsreihen verwendet wurde (Daten hier nicht gezeigt, Chromatogramm siehe unten). Gerade im mittleren und niedrigen Bereich treten Wiederfindungsdaten von über 100 % auf, was ebenfalls auf den Blindwert zurückgeführt werden kann. Abbildung 26 zeigt ein Chromatogramm des aufgearbeiteten Schweineplasma ohne Zugabe von Isoflavonen (sog. Reagenzienleerwert).

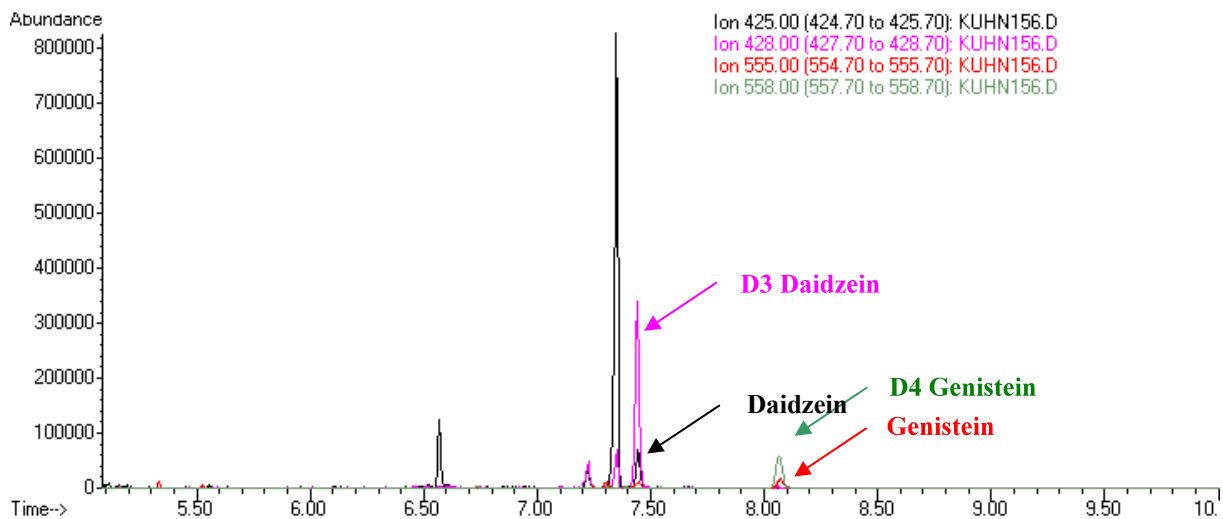


Abbildung 26: Chromatogramm einer Schweineplasma-Proben mit normalem Hintergrund (kommerzielles Schweineplasma).

Deutlich sind hier Signale für die Isoflavone zu erkennen. Mit Hilfe einer Kalibrierung, bei der der Achsenabschnitt vernachlässigt wurde, ließ sich aus dieser P0-Probe ein „Reagenzienleerwert“ von 70 ng/mL Daidzein bzw. 52 ng/mL Genistein für das kommerzielle Schweineplasma bestimmen. Dieser Isoflavon-Hintergrund stammt aus der Fütterung der

Schweine, die häufig mit Soja erfolgt. Da kein isoflavonfreies Schweine-Plasma zur Verfügung stand, um Kalibrierreihen zu erstellen, wurde für die Versuchstierproben (des FBN) davon ausgegangen, dass der Achsenabschnitt normalerweise bei isoflavonfreien Plasmen nahe Null liegt. Bei den Berechnungen wurde also nur die Steigung der Kalibrierfunktion verwendet. Dadurch konnten auch Werte für Tiere, die isoflavonarmes Futter erhielten, bestimmt werden (siehe Kapitel 3.2.2.). Abbildung 27 zeigt die verwendeten Kalibrierfunktionen. Der Bereich von der Nachweisgrenze bis zu 1000 ng/mL zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen Signal und Analytkonzentration. Darüber hinaus wurde die Linearität nicht überprüft.

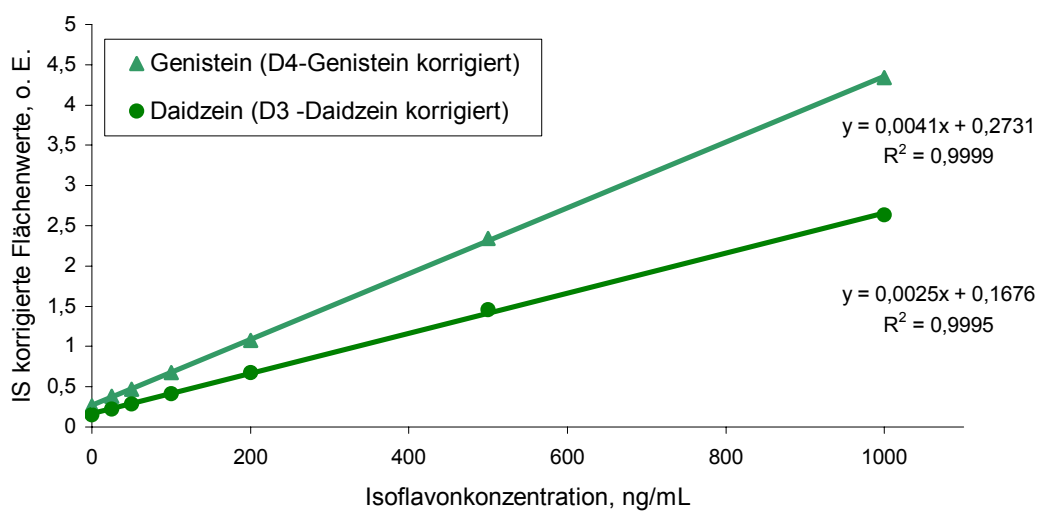


Abbildung 27: Kalibrierfunktion für Isoflavone in Schweineplasma (fl./fl. Extraktion).

Auf Basis der Kalibrierreihen wurden auch für diese Methode Nachweisgrenzen berechnet. Tabelle 23 zeigt die nach DIN 32645 erhaltenen Werte.

Tabelle 23: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen nach DIN für die Daidzein- und Genistein-Analyse in Schweineplasma. Berechnet aus 3 Kalibrierungen mit jeweils 7 Kalibrierpunkten im Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 ng/mL.

Parameter	Daidzein, ng/mL	Genistein, ng/mL
Nachweisgrenze	11	9
Nachweisgrenze (Schnellschätzung)	24	19
Erfassungsgrenze	26	22
Bestimmungsgrenze	46	37
Bestimmungsgrenze (Schnellschätzung)	71	57

Die so errechneten Nachweisgrenzen zeigen die Leistungsfähigkeit der Methode, wenn man isoflavonfreies Plasma zur Verfügung hat. In den untersuchten Chargen von Schweineplasma wurde ein variabler „natürlicher Hintergrundspiegel“ festgestellt. Bei allen weiteren Isoflavonmessungen wurde daher auch immer ein Reagenzienleerwert bestimmt.

3.1.4 BPA und Isoflavone in Urinen

Grundlage dieser Methode war die Vorgabe, mit einem Probenvolumen von circa 1 mL eine Methode mit möglichst geringem Arbeitsaufwand, einfacher Durchführbarkeit und hohem Probendurchsatz bei verläSSLicher Bestimmung von Daidzein, Equol und Genistein in der Probe zu entwickeln. Ein weiterer Informationsgewinn um BPA-Gehalt war zwar nicht Hauptziel, wurde aber bei der Methodenentwicklung berücksichtigt. Da uns zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung keine LC-MS Anlage zur Verfügung stand, wurde die Methode für die GC-MS Analyse entwickelt. Eine Analyse mittels HPLC-UV wurde aufgrund von Störungen durch die Urinmatrix, zu hoher Nachweisgrenzen für Equol und anderer Limitierungen (kein Autosampler für die Mikro-HPLC vorhanden) nicht in Betracht gezogen.

Ein wichtiger Punkt bei der Analyse der Proben mittels GC-MS ist die Derivatisierung. Es wurden verschiedene, häufig in der Literatur verwendete Silylierungsreagenzien für den Einsatz geprüft (siehe Tabelle 24). Aber auch Derivatisierungen wie Acetylierung oder Umsetzung mit Pentafluorbenzoylchlorid wurden getestet. Auf Test zur Methylierung wurde hier verzichtet, weil dabei ein Isoflavon in ein anderes überführt wird (Beispiel: Genistein in Biochanin A oder Prunetin) und eine Methylierung aufgrund der Toxizität der eingesetzten Reagenzien ohnehin nicht die erste Wahl ist. Tabelle 24 fasst verwendete Reagenzien, Derivate, Methodenliteratur und damit gemachte Erfahrungen zusammen.

Tabelle 24: Getestete Derivatisierungsmethoden für die GC-MS Bestimmung von Isoflavonen.

Reagenz	Derivat	Methode Literatur	Befund
Silprep	TMS-ether	Adlercreutz <i>et al.</i> 1994, Heinonen <i>et al.</i> 1999	Keine Signale auffindbar
DMF Silprep	TMS-ether	--*	Keine Signale auffindbar
Powersilprep	TMS-ether	--*	Signale nur bei Direktinjektion
BSTFA	TMS-ether	Morton <i>et al.</i> 1997	Signale (instabile Reproduzierbarkeit)
BSTFA 1%TMS	TMS-ether	Grace <i>et al.</i> 2003	Signale (schnellere, bessere Reproduzierbarkeit)
BSTFA 10 % TMS	TMS-ether	--*	Stabilstes BSTFA Ergebnis bei Direktinjektion
TSIM	TMS-ether		Keine Signale
MtBSTFA 1% tBDMCS	tBDMS-ether	Liggins <i>et al.</i> 1998, Setchell <i>et al.</i> 2003	Stabiler tBDMS-ether mit besserer Signalauflösung
Essigsäure- anhydrid/Pyridin	Acetat	--*	Keine Signale auffindbar
PFB	Pentafluor- benzoat	--*	Keine Signale (Isoflavone) auffindbar

wenn keine Literaturmethoden vorhanden waren, wurden die entsprechenden Arbeitsvorschriften der Hersteller verwendet (Katalogvorschriften).

Die Befunde in Kürze: Bei Derivatisierung mit BSTFA und sofortiger GC-MS-Analyse wurden brauchbare Ergebnisse erzielt. Noch bessere Resultate wurden aber mit der Methode von Liggins *et al.* (1998) und dem schwereren tBDMS-ether erreicht. Es zeigte sich, dass aufgrund der hohen Masse der Derivate viele Störungen umgangen werden, die bei den Massenspuren für Derivate mit niedrigerer Masse auftraten. Dadurch lassen sich geringere Isoflavonmengen nachweisen als durch den TMS-ether; zudem zeigte sich eine höhere Stabilität des tBDMS-ether Derivats. Daher wurde die Methode für den tBDMS-ether optimiert und weiterentwickelt. Abbildung 28 zeigt die vollständige Derivatisierung am Beispiel von Genistein.

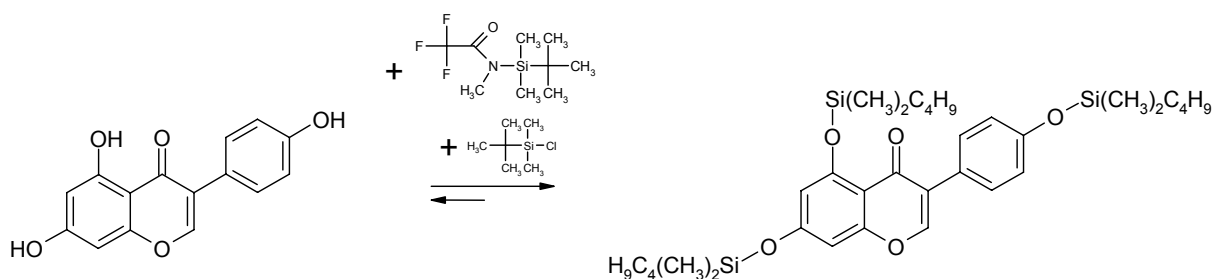


Abbildung 28: Derivatisierungsreaktion von Genistein zum tBDMS-ether.

Da die Extraktion von wässrigen Proben mittels SPE besonders hohe Durchsätze und eine zukünftige Automation erlaubt, wurde diese Technik favorisiert. Für Mehrfachbestimmungen

standen Probenmengen von 200-300 μL Aliquoten zur Verfügung. Auf dieser Basis wurde nach einer geeigneten SPE-Säule gesucht. Die meisten getesteten SPE-Säulen (wie z. B. Lichrolut C18, Chromabond C18 oder Strata C18) wiesen eine zu hohe Packungsmenge (meist für 1 mL Probe) und damit verbunden zu hohe Verluste auf (Daten hier nicht gezeigt). Als besonders günstig stellte sich ein neuer SPE Kartuschentyp von 3M heraus. Die sogenannte Empore Disk C18 SD bzw. HD hat eine geringe Packungsmenge mit großer Oberfläche, und zeichnet sich durch ein geringes Totvolumen aus, was eine Probenaufgabe und -elution mit kleinen Volumina (s.o.) ermöglicht.

Die Extraktionstechnik wurde auf Basis der mit den Säulen gelieferten Anleitung und nach Literaturdaten entwickelt. Nach der Aufgabe der Probe wurde mit 5 %iger MeOH gespült, anschließend die Säule trocken gesaugt und mit 1/1 Ethylacetat/Acetonitril eluiert [Grace *et al.* 2003]. Dies wurde an 6 Proben hoher Konzentration fraktioniert durchgeführt, um die Verluste durch den Spülschritt und das erforderliche Elutionsvolumen zu ermitteln. Abbildung 29 zeigt die relativen Analytmengen beim Spülen und Eluieren in 100 μL Schritten in den einzelnen Fraktionen.

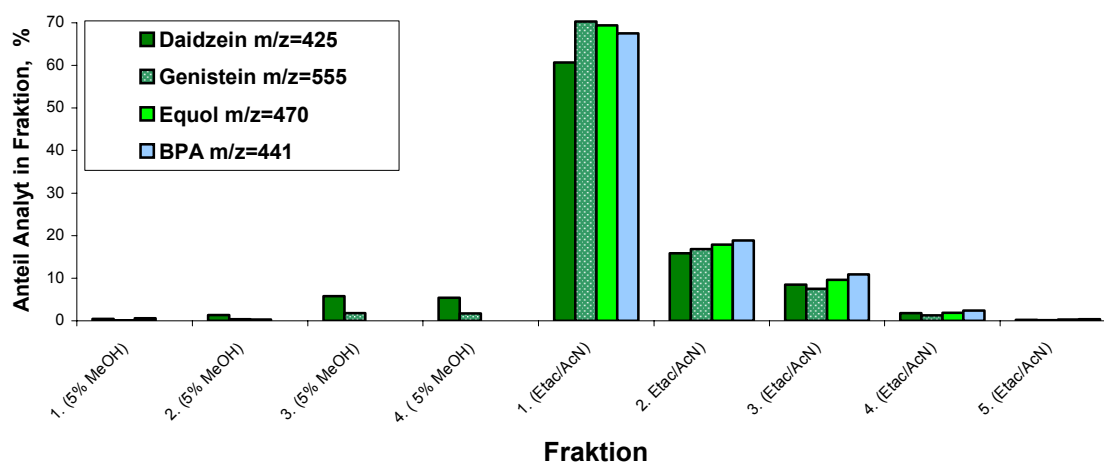


Abbildung 29: Ermittlung der Volumina für den Spül- und Elutionsschritt bei der Festphasenextraktion von BPA und Isoflavonen aus Urin; wiederholter Auftrag von 100 μL Spüllösung (5% MeOH) bzw. Elutionslösung (EtAc/AcN 1:1) Der relative Anteil der Fraktionen bezogen auf die Gesamtmenge (250 ng/mL Isoflavone bzw. 55 ng/mL BPA pro SPE Kartusche) wurde als Mittelwert aus n=6 Kartuschen bestimmt.

Nach Aufgabe der Urinprobe treten nur geringe prozentuale Verluste beim Spülen der Kartuschen mit 5 %iger methanolischer Lösung auf. Allerdings sollten die Mengen möglichst gering gehalten werden, da schon der dritte Waschschriff mit 100 μL zu leichten Verlusten führt. Die Elution mit EtAc/AcN erwies sich als sehr effektiv, so dass hier ein Gesamtvolumen

von 300 µl Elutionsmittel eingesetzt werden kann. Aus den obigen Daten und aus Gründen der Vereinfachung wurden für jeden Schritt der SPE (Konditionierung, Waschen, Extraktion) je 300 µL verwendet.

Ein weiterer Optimierungsschritt betraf die Ermittlung der Temperatur und Zeit zur Derivatisierung der Analyten zum tBDMS-ether. Dazu wurden für unterschiedliche Zeiten und Temperaturen jeweils vier Proben identischer Konzentration gemessen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 30 als Mittelwert aus jeweils vier Proben dargestellt.

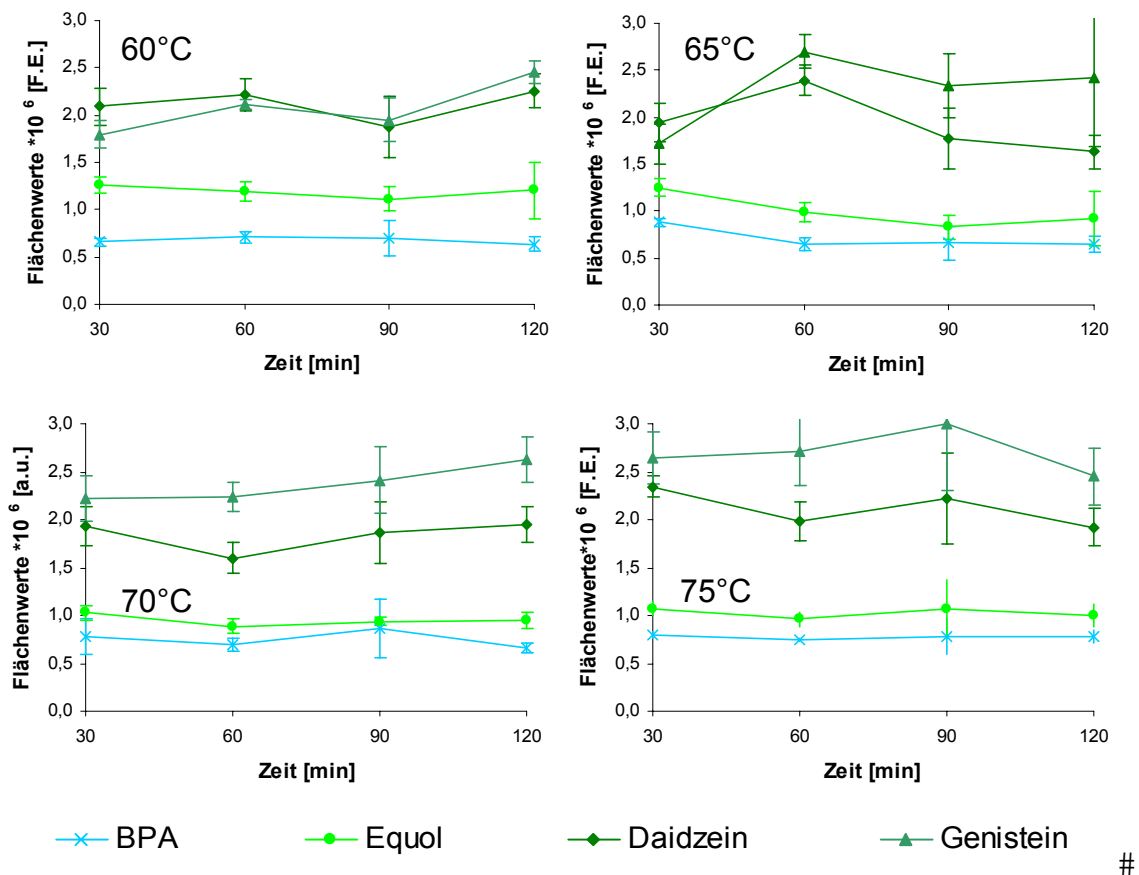


Abbildung 30: Flächenwerte für die Analyten BPA, Equol, Daidzein und Genistein in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit und den Derivatisierungstemperaturen 60, 65, 70 und 75°C (n=4). 2µL Splitlessinjektion von 20 ng/vial Isoflavone und 4,4 ng/vial BPA.

Für Genistein und Daidzein zeigen sich nach 90 min hohe Werte bei einer Derivatisierungstemperatur von 75 °C. Allerdings sind andere Temperaturen und kürzere Zeiten ohne wesentliche Verluste einsetzbar; die Schwankungen liegen im allgemeinen höher als die vermeintliche Auswirkung der Temperatur oder der Zeit. Daher kann bei diesem Schritt der zeitliche Faktor zur Aufarbeitung der Proben mit berücksichtigt werden. Als Derivatisierungs-

temperatur wurde daher die Temperatur mit den höchsten Flächenwerten bei niedrigstem Zeitaufwand gewählt, und alle weiteren Proben wurden für 30 min bei 75 °C derivatisiert.

Bei der Analyse mittels GC-MS wurde die Methode zunächst für ein Injektionsvolumen von 2 µL entwickelt (alle obigen Optimierungen basieren auf diesem Volumen). Anschließend wurde zur Verbesserung der NG das Aufgabevolumen erhöht und das Lösungsmittel ausgeblendet, um so mehr Analyt auf die Säule zu bringen. Die sogenannte „Solvent Vent“ Technik (auch „Large Volumen Injection“ LVI genannt) wurde mit dem Kaltaufgabesystem KAS4plus in Kombination mit dem MPS2 Autosampler realisiert. Einige Tests und Optimierungen der Aufgabetechnik ergaben schließlich hinreichend große Signale, um auch geringe Isoflavone-Gehalte in Urin quantitativ erfassen zu können, wenn 20 µL Injektionsvolumen verwendet werden. Abbildung 31 zeigt Beispiel-Chromatogramme für 2,5 µL und für 20 µL Injektion und verdeutlicht die Skalierung durch die Solvent Vent Technik.

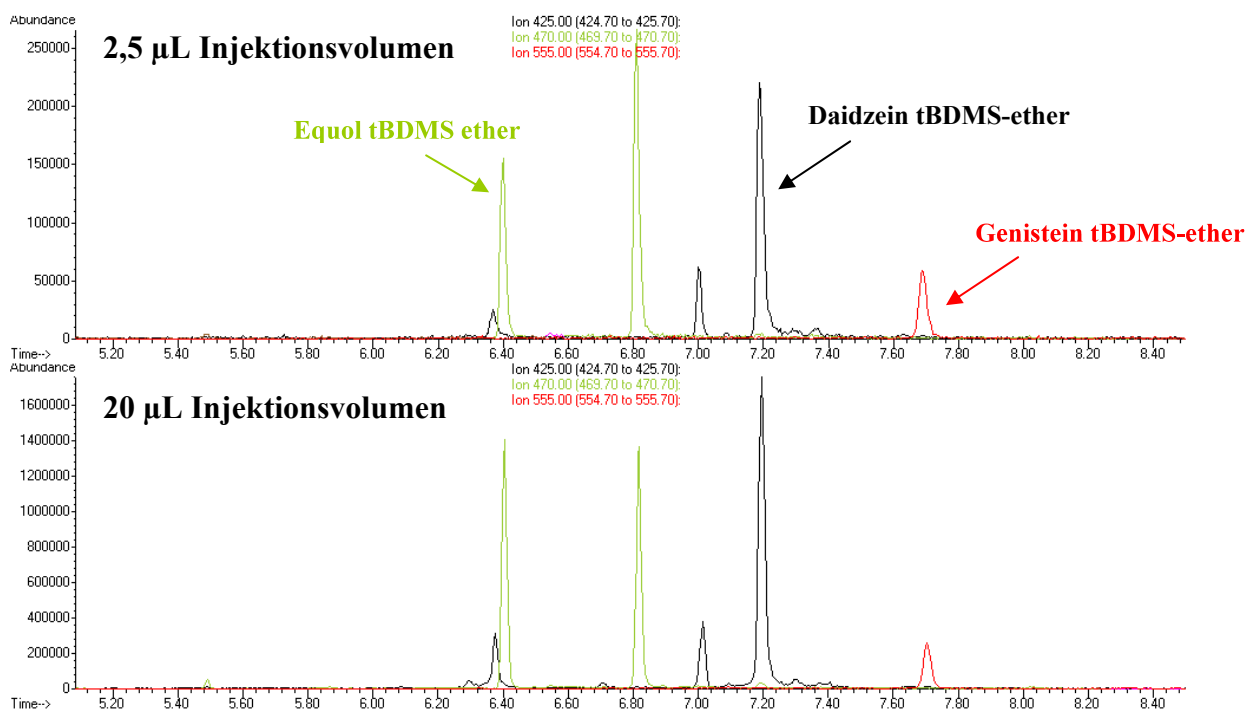


Abbildung 31: Chromatogramme für unterschiedliche Injektionsvolumina bei der Isoflavonanalytik mit dem Kaltaufgabesystem. Injiziert wurden 2,5 bzw. 20 µL Volumina derselben Probe im solvent vent modus.

Bitte y-Achsen Skalierung beachten!

Die Skalierung um den Faktor 8 ist gut zu erkennen. Weitere Tests zeigten, dass sogar eine weitere Steigerung des Aufgabevolumens auf 50 µL möglich wäre, jedoch für die Anwendung die Ergebnisse nicht verbessert, wohl aber den Reinigungsaufwand der GC-MS vergrößert. Zudem nimmt auch der Untergrund zu, wodurch sich die Nachweisgrenzen bei der Skalierung nicht linear verbessern. Daher wurde 20 µL als Injektionsvolumen gewählt.

Für die Spaltung der Isoflavon-Glucuronide und -Sulfate in den Urinen wurde auf die schon bewährte enzymatische Hydrolyse zurückgegriffen (vgl. Abschnitt 2.5.3). Insgesamt konnte so die aus Probenvorbereitung und GC-MS Analyse in Kapitel 2.7.1. dargestellte Methode zur Urinanalyse entwickelt werden.

Auch für diese Methode wurden verschiedene Prüfpunkte abgearbeitet, um Leistungsfähigkeit und Anwendbarkeit der Methode zu belegen. Zur Prüfung der Methode wurde ein nach Ernährung mit isoflavonfreier Kost gewonnene Spoturin eines freiwilligen Probanden eingesetzt; dieser „Referenzurin“ enthielt einen unterhalb der NG liegenden Gehalt an Daidzein und Genistein und einen Restgehalt an Equol nahe der NG. Eine vorher analysierte Stichprobe verschiedener Urine zeigte stark schwankende Isoflavon-Gehalte in diesen Proben, die daher kein geeignetes Ausgangsmaterial für eine Validierung waren. Daher wurde nur der nach isoflavonfreier Diät gewonnene Spoturin als Referenzurin verwendet.

Die Tabelle 25 zeigt die Messpräzision für eine 10fach-Injektion einer gespikten Probe mit mittlerer Konzentration für die verschiedenen Analyten. Equol ist hier noch nicht mittels IS korrigiert, weil der geeignete IS zu diesem Zeitpunkt noch nicht festgelegt war; alle anderen Werte wurden mit dem jeweiligen internen Standard korrigiert.

Tabelle 25: Messpräzision für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analysen (tBDMS-ether) in Humanurin. 20 µL solvent vent Aufgabe von je 125 ng Isoflavon und 27,5 ng BPA.

Messung	BPA/ ¹³ C ₁₂ -BPA	Equol, F.E.	Daidzein/ D3-Daidzein	Genistein/ D4-Genistein
1	0,24	7587599	1,32	1,91
2	0,24	7730821	1,31	1,91
3	0,24	7642495	1,31	1,89
4	0,24	7900620	1,32	1,90
5	0,24	7863800	1,33	1,91
6	0,24	7749441	1,31	1,87
7	0,24	7737316	1,32	1,92
8	0,24	7910189	1,33	1,87
9	0,24	7937358	1,32	1,89
10	0,24	7920513	1,33	1,87
Mittelwert	0,24	7798015	1,32	1,89
Standardabweichung	0,00	125114	0,01	0,02
Variationskoeffizient, %	1	2	1	1

Diese Messungen erfolgten mit Quantifier-Ionen in einem höheren Massenbereich als die vorherigen Messungen z. B. für BPA(ac)₂. Dadurch lassen sich eine höhere Präzision und

auch eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Urin ist als Matrix zwar weniger komplex als Gewebe, aber schwieriger als Plasma; daher ist der Fehler der Messpräzision mit 1-2 % sehr klein. Aufgrund des hohen Dampfdrucks des Lösungsmittels n-Hexan (der zu Verlusten beim Transfer vom Vial zum CIS führen könnte) würde man einen größeren Fehler bei den unkorrigierten Flächenwerten vermuten. Es zeigt sich aber, dass der MPS Autosampler mit einer hohen Präzision arbeitet.

Auch bei dieser Methode wurden Wiederfindungsraten bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. In Tabelle 26 sind die kalkulierten Werte für die Vierfachbestimmung identischer Proben gezeigt.

Tabelle 26: Wiederfindungsraten in und zwischen den Serien für die BPA-, Daidzein, Equol- und Genistein-Analysen in Humanurin.

Proben- name (n=4)	Sollkonzentration, ng/mL		Wiederfindungsraten, %							
	BPA	Isoflavone	In der Serie				Zwischen den Serien			
	BPA	Isoflavone	BPA	Equol	Daidzein	Genistein	BPA	Equol	Daidzein	Genistein
niedrig	2,2	10	-	100	92	80	-	-	-	-
mittel	16,5	75	101	95	104	100	119	90	127	126
hoch	27,5	125	97	102	104	104	90	112	104	105

Für eine vierfache Bestimmung der Proben mittlerer Konzentration errechnete sich ein Variationskoeffizient in der Serie von 3 % für BPA, 8 % für Equol, 6 % für Daidzein und 7 % für Genistein.

Für das Analysenverfahren wurde auch die Präzision des Verfahrens anhand von Proben mittlerer Konzentration bestimmt. Dazu kamen sechs Proben gleicher Konzentration zum Einsatz, die an verschiedenen Tagen von unterschiedlichen Personen bei Durchführung des gesamten Verfahrens gemessen wurden. Tabelle 27 zeigt die kalkulierten Gehalte und Variationen.

Tabelle 27: Verfahrenspräzisionen für die BPA-, Daidzein-, Equol- und Genistein-Analyse in Humanurin.

Proben- bezeichnung	Sollwerte, ng/mL		errechneter Gehalt durch unabhängige Kalibrierung, ng/mL			
	BPA	Isoflavone	BPA	Equol	Daidzein	Genistein
m1	16,5	75	14,2	65,6	72,4	70,8
m2	16,5	75	17,4	89,3	78,0	72,1
m3	16,5	75	17,9	73,2	89,7	95,3
m4	16,5	75	16,8	72,1	89,6	86,0
m5	16,5	75	14,9	59,4	85,3	98,2
m6	16,5	75	14,9	83,2	75,9	63,5
Mittelwert			16,0	73,8	81,8	81,0
Standardabweichung			1,5	11,0	7,4	14,2
Variationskoeffizient, %			10	15	9	18

Insgesamt ließen sich Verfahrenspräzisionen von 9-18% im „mittleren“ Konzentrationbereich ermitteln. Dabei ist anzumerken, dass BPA mit einem idealen ^{13}C -Standard korrigiert wird und eine geringe Variation aufweist. Stärkere Schwankungen treten beim Equol auf, was wohl auf den weniger idealen internen Standard zurückzuführen ist. Der Daidzein D3-Standard weist ebenfalls eine gute Stabilität auf, beim D4-Genistein Standard kann es für das Deuterium in 6 C-Position (zwischen den beiden Hydroxyl-Gruppen) zu einer Substitution mit Wasserstoff kommen, was die erhöhte Varianz erklären könnte. Equol wurde mit $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA korrigiert, weil es in Vortests zu guten Korrelationen von Kalibrierproben führte, eine Korrektur von Equol mit dem D3-Daidzein- oder D4-Genistein Standard aber deutlich schlechtere Korrelationen, bis hin zum Verlust des linearen Zusammenhangs zeigte.

Um zu prüfen, ob die Richtigkeit der Methode gewährleistet ist, wurde auch hier ein Sollwert t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Sollwert t-Test für die BPA-, Daidzei-, Equol- und Genistein-Analyse in Humanurin.

berechnete Gehalte und Abweichung zum Sollwert								
	BPA, ng/mL (Soll = 16,5 ng)	[%]	Equol, ng/mL (Soll = 75 ng/mL)	[%]	Daidzei, ng/mL (Soll = 75 ng/mL)	[%]	Genistein, ng/mL (Soll = 75 ng/mL)	[%]
1	14,5	12	58,1	22	69,5	7	70,9	6
2	18,2	10	88,1	17	78,4	5	75,5	1
3	16,2	2	58,1	23	82,7	10	92,8	24
4	18,0	9	66,8	11	83,4	11	91,0	21
5	14,3	13	66,6	11	71,5	5	62,8	16
6	16,6	1	84,7	13	83,4	11	76,3	2
\bar{x} ng/mL	16,3		70,4		78,2		78,2	
SA, ng/mL	1,6		13,0		6,2		11,6	
VK, %	10		18		8		15	
t-Test	0,3		0,9		1,2		0,7	

Die Streuung liegt zwischen 8 und 18 %, wobei auch hier ein Zusammenhang mit dem verwendeten internen Standard zu sehen ist. Der Sollwert t-Test gilt als bestanden, d. h. es liegt kein systematischer Fehler vor und die Methode kann als richtig bezeichnet werden, wenn für eine sechsfache Bestimmung bei einer Wahrscheinlichkeit von $P = 95\%$ $t_{\text{gef}} < 2,571$ ist (für $t(0,05; \text{einseitig}; f = n-1; n = 6)$). Da alle Werte des t-Test unterhalb des Sollwertes liegen, kann ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden.

Die höhere Varianz beim Equol und Genistein werden auf den jeweils nicht so „perfekten“ internen Standard zurückgeführt. Beim Genistein ließ sich die Signalqualität (Signalgröße) durch den Verzicht auf einen wattierten Liner etwas verbessern, was zu einer geringeren Varianz führte.

Typische Kalibrierfunktion für BPA und die Isoflavone sind in Abbildung 32a und b dargestellt.

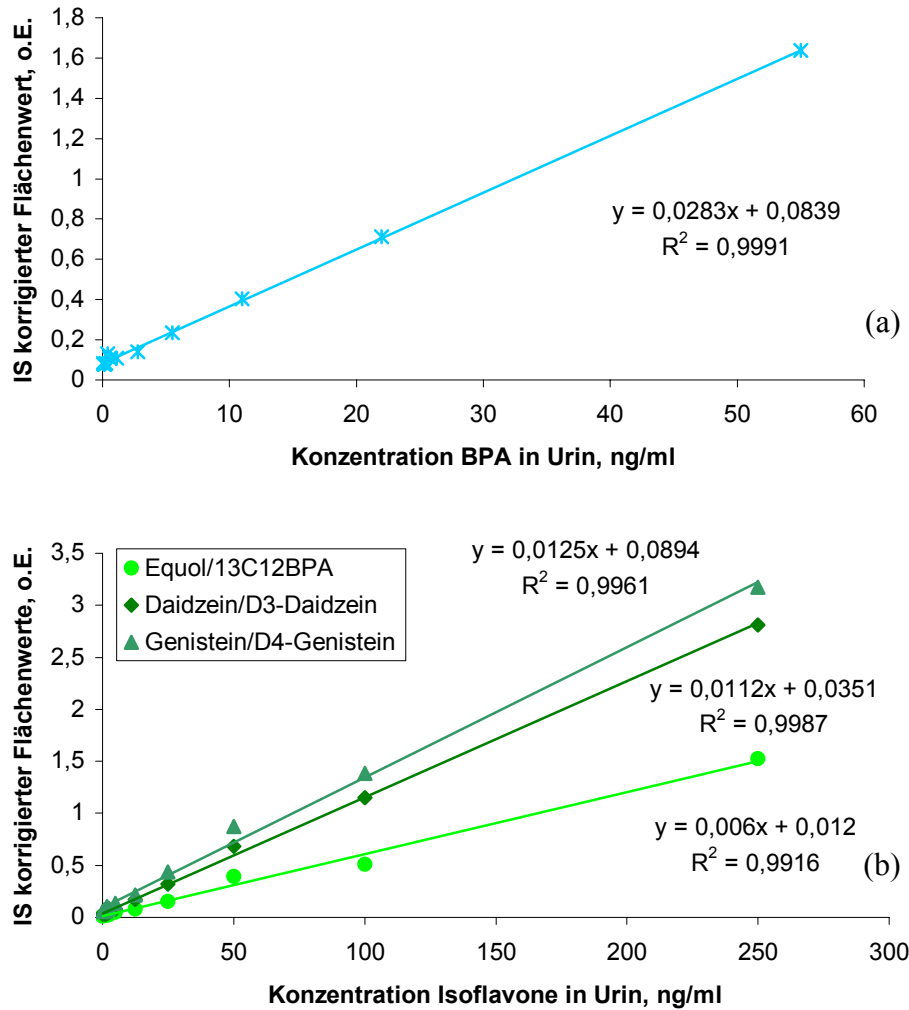


Abbildung 32: Typische Kalibrierfunktionen für die (a) BPA, (b) Equol, Daidzein und Genistein Analyse von Urinen.

Der lineare Bereich ist für die einzelnen Substanzen unterschiedlich. Im folgenden werden die Daten für die Injektion von 20 μ L mittels Kaltaufgabesystem berichtet. Für BPA wurden Kalibriermessungen bis 110 ng/mL durchgeführt (höchste Messung nicht gezeigt) und für Equol, Daidzein und Genistein bis 500 ng/mL. Der lineare Bereich war offenbar durch die Detektorkapazität begrenzt. Es zeigte sich, dass z.B für Daidzein bei einem Flächenwert größer 130 Mio. Flächeneinheiten die Kalibriergerade leicht abknickt. Daher wurden die Kalibriermessungen nur bis 250 ng/mL (wahrscheinlich linear bis 400 ng/mL für Daidzein) durchgeführt. Für Equol und Genistein ließ sich je nach Messung ein linearer Bereich bis zu 500 ng/mL belegen. Daher wurde für jede Kalibrierung die Linearität überprüft und der höchste Kalibrierstandard aus der Kalkulation genommen, wenn die Linearität nicht aus-

reichend gegeben war. Für die Messung von unbekanntem Proben wurde jeweils auf den höchsten Kalibriertstandard verzichtet (siehe Abbildung 32).

Analog zu den vorherigen Kapiteln wurden auch für diese Methode die Nachweisgrenzen nach DIN 32645 (Kalibriergeradenmethode) bestimmt. Die errechneten Wert sind in Tabelle 29 gelistet.

Tabelle 29: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für die BPA-, Daidzei-, Equol- und Genistein-Analysen in Urin. Errechnet aus der 3fach Bestimmung von 10 Kalibrierpunkten im Bereich von 0 bzw. 0,165-55 ng/mL BPA und 0 bzw. 0,75-250 ng/mL Isoflavone.

Parameter	BPA, ng/mL	Equol, ng/mL	Daidzein, ng/mL	Genistein, ng/mL
Nachweisgrenze	3	4	4	5
Nachweisgrenze (Schnellschätzung)	3	5	4	8
Erfassungsgrenze	6	8	7	13
Bestimmungsgrenze	7	11	9	18
Bestimmungsgrenze (Schnellschätzung)	10	15	12	25

Die Nachweisgrenzen der Methode sind trotz der komplexen Matrix Urin und der einfachen Aufarbeitung klein. Urine, deren Gehalt die Nachweisgrenzen der Isoflavone unterschritten, ließen sich nur durch eine strikte isoflavonarme Diät erhalten (vgl. Kapitel 3.2.3)

Ein Ergebnis der Validierungsmessungen muss noch aufgeführt werden. So zeigte das Kalt-aufgabesystem bei höheren Konzentrationen Verschleppungen in die nächste Messung. Dies kann bei Serien-Messungen problematisch werden, wenn unbekannte Proben mit sehr hohen Gehalten zwischen solchen mit geringen Gehalten auftreten. Der Versuch der Beseitigung einer Verschleppung durch Verwendung anderer Lösungsmittel oder Ausheizen des Liners brachte zwar Verbesserungen, konnte das Problem jedoch nicht vollständig lösen.

3.2 Methodenanwendung

Die folgenden drei Kapitel beschäftigen sich mit der Anwendung der optimierten und validierten Methoden im Rahmen toxikologischer Studien.

3.2.1 Toxikokinetik von BPA in trächtigen Ratten

Um die Toxikokinetik und insbesondere den transplazentaren Transfer von BPA zu untersuchen, wurde es in einer Dosierung von 10 mg/kg KG trächtigen DA/Han Ratten intravenös

verabreicht (vgl. Kapitel 2.5.1 und Moors *et al.* 2006). Die BPA-Konzentrationen in Plasma und in Geweben wurden, wie in Kapitel 2.5.3 bzw. Kapitel 2.5.4 beschrieben, bestimmt. Im Folgenden sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

3.2.1.1 BPA-Aglycon und Gesamt-BPA in Blut-Plasma von DA/Han Ratten

Die Analysen von BPA-Aglycon und „Gesamt“-BPA in Blut-Plasma erfolgten als Doppelbestimmung, d. h. jede Probe wurde zweimal aufgearbeitet und gemessen (an unterschiedlichen Tagen). Bei den Bestimmungen der BPA-Plasmakonzentrationen wurde eine größere Anzahl Proben analysiert als bei den Gewebeproben, da bei einigen Tieren zusätzlich zur Endzeitpunktabnahme noch Blut kurz nach der i.v. Injektion von BPA abgenommen wurde. Daher ergibt sich eine Tieranzahl pro Zeitpunkt von $n = 4-8$ Tieren. Die Tierzahl ist nicht für alle Zeitpunkte gleich, weil sich im Nachhinein einige Tiere als paravenös gespritzt herausstellten (siehe unten); falsch injizierte Tiere wurden dann bei der Gruppenmittelwertbildung nicht berücksichtigt. Die Abbildung 33 zeigt den Konzentrations-Zeit-Verlauf für BPA-Aglycon bzw. „Gesamt-BPA“ (Aglycon plus Konjugate) als Mittelwert aus $n = 4-8$ Tieren. Die gezeigten Fehlerbalken sind die Standardabweichung der jeweiligen Zeitgruppe.

Große Variationen in den BPA-Konzentrationen der Tiere einer Zeitgruppe, insbesondere zu frühen Zeiten, sind aber nicht Ausdruck geringer Messpräzision sondern interindividueller Schwankungen. Sie sind beim „destruktiven Design“ (wie dem hier vorgestellten Tierversuch) oft höher als Schwankungen, die bei Plasmakinetikstudien mit wiederholter Beprobung eines Tieres beobachtet werden.

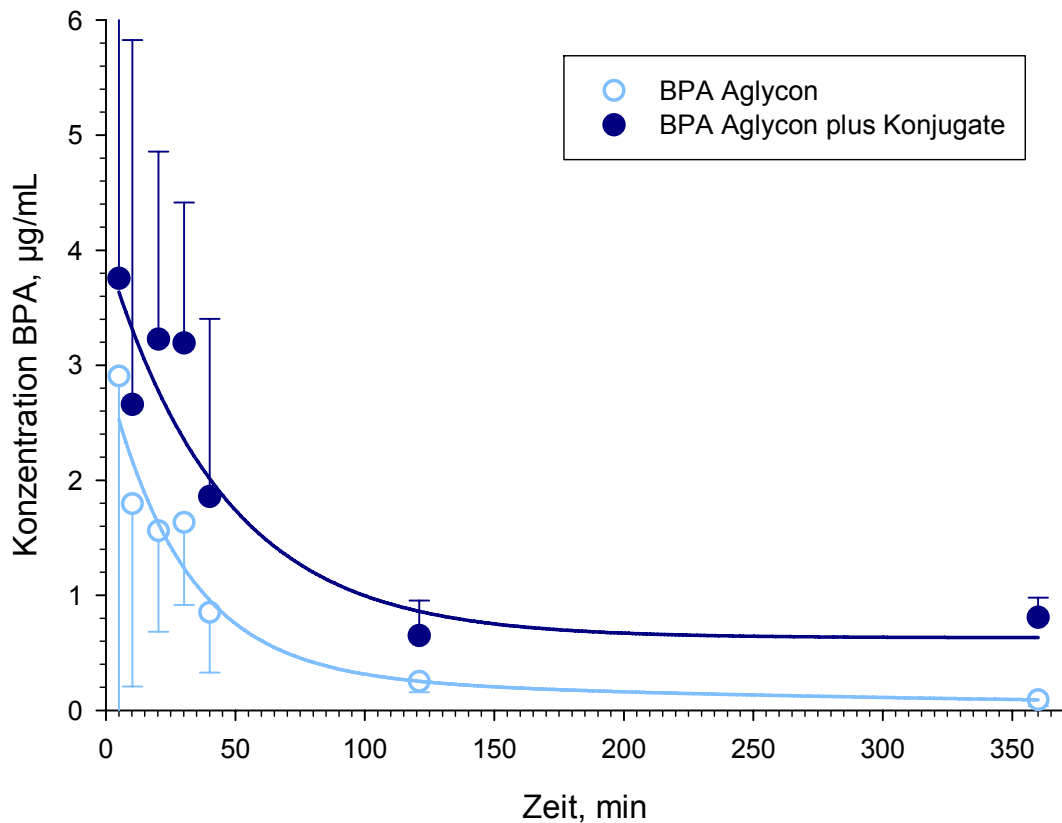


Abbildung 33: Konzentrations-Zeit-Verlauf für BPA-Aglycon und BPA-Aglycon plus Konjugat in Plasma von trächtigen (Tag 18) DA/Han-Ratten nach i.v. Injektion von 10 mg/kg KG BPA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 4-8 Tieren pro Zeitgruppe \pm SA.

Die eingezeichneten Kurven wurden entsprechend einer biexponentiellen Abnahme mit vier Variablen berechnet. Direkt nach der Injektion zirkulieren im Mittel 3,8 $\mu\text{g/mL}$ BPA im Plasma, innerhalb von 2 h fällt dieser Wert auf 0,7 $\mu\text{g/mL}$. Ein ähnlicher Verlauf wurde für das BPA-Aglycon gemessen: Hier zeigt sich zu Beginn des Versuchs eine maximale Plasmakonzentration von im Mittel 2,9 $\mu\text{g/mL}$, die innerhalb von 2 h auf 0,3 $\mu\text{g/mL}$ fällt. Nach 6 h ist die Konzentration von BPA-Aglycon auf 0,1 $\mu\text{g/mL}$ gesunken, während die Konzentration an Gesamt-BPA noch bei 0,8 $\mu\text{g/mL}$ liegt.

Die errechneten Halbwertszeiten sind in

Tabelle 30 zusammengefasst. Die Berechnungen zeigen vergleichbare Werte, wenn der initiale Term der biexponentiellen Funktion oder ein einfaches Steigungsdreieck als Berechnungsgrundlage gewählt wird.

Tabelle 30: Halbwertszeiten für BPA in Plasma. (A) nach biexponentiellem Modell berechnet, (B) mittels Zwei-Punkte-Steigung berechnet.

(A) Biexponentielle Funktion

$$y = ae^{-bx} + ce^{-dx} \quad \frac{\ln 2}{b \cdot 60} = t_{1/2} (\text{in } h)$$

Parameter für	a	b	c	d	t _{1/2} , h
BPA-Aglycon	2621,0526	0,0336	314,5480	3,4388e-3	0,34
BPA Gesamt	3358,5184	0,0222	630,8222	6,1409e-11	0,52

(B) Berechnet mit Steigungsdreieck (5 und 40 min)

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \frac{c_{5\text{min}}}{2 \cdot m} = t_{1/2}$$

	m, µg h/mL	t _{1/2} , h
BPA-Aglycon	3,522	0,41
BPA Gesamt	3,251	0,58

Da der Anteil an Aglycon im Plasma bzw. dessen Umsetzung zum östrogen inaktiven Konjugat (vgl. Tabelle 2) von besonderem Interesse ist, wurden die Werte aus Abbildung 33 noch einmal in anderer Weise aufgetragen (siehe Abbildung 34), nämlich als Anteil Aglycon prozentual zum gesamten BPA. So wird die Geschwindigkeit der Detoxifikation über Phase II Reaktionen eher deutlich.

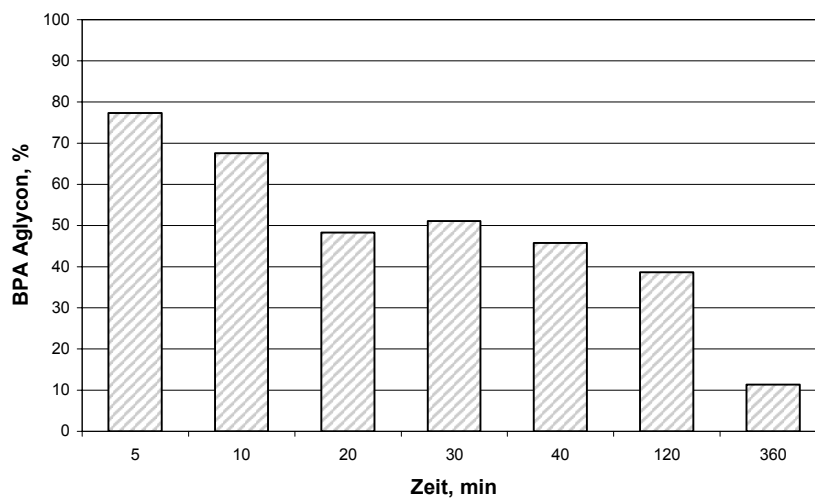


Abbildung 34: Prozentualer Anteil BPA-Aglycon am gesamten zirkulierenden BPA im Rattenplasma.

Zu Beginn ist der Anteil BPA-Aglycon sehr hoch: 77 % liegen 5 min nach der Injektion in unkonjugierter Form vor; dann fällt der Anteil an BPA-Aglycon innerhalb der ersten 30 min bereits auf 50 % der gesamten Menge an BPA ab. Nach 360 min sind nur noch 10 % des zirkulierenden BPA in der Aglycon Form vorhanden.

Im Verlauf der Messungen traten immer wieder mal unerwartete Befunde auf, z. B. wurden für manche Tiere ungewöhnlich niedrige BPA-Werte im Plasma ermittelt (gerade auffällig bei der 5 min Gruppe). Um diese ungewöhnlichen Befunde zu untersuchen, wurde in einem zweiten Versuchsteil eine zusätzliche Probenahme kurz nach der Injektion durchgeführt; sie machte die Resultate teilweise erklärbar und somit auswertbar. Wegen der starken Pigmentierung der DA/Han Ratten (DA = dark agouti, steht für eine dunkle Fellfarbe und Hautfärbung) kommt es vor, dass Tiere paravenös injiziert werden. Bei erfolgreicher i.v. Injektion sind die Plasmaspiegel anfangs immer höher als in später genommenen Proben. Wird hingegen die Vene verfehlt, zeigt sich zunächst ein niedriger Plasmaspiegel, der im weiteren Verlauf des Experimentes durch Resorption aus dem Gewebe ansteigt. Die Abbildung 35 a und b zeigen beispielhaft an jeweils zwei Tieren die BPA-Plasmaspiegel für paravenöse und für korrekte i.v. Injektionen.

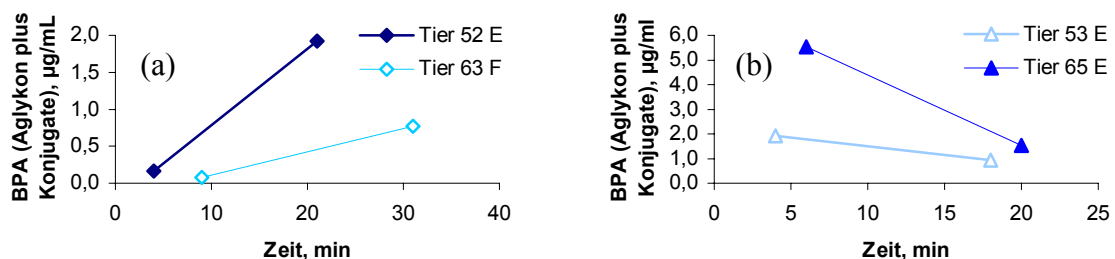


Abbildung 35: Plasmakonzentrationen nach (a) paravenöser Injektion bzw. (b) venöser Injektion von 10 mg/kg KG BPA an trächtigen DA/Han Ratten.

Auffällig ist die sehr niedrige Konzentration an BPA bei den Tieren 52 und 63 kurz nach Beginn des Experiments. Tiere mit einem solchen Konzentrationsverlauf wurden als paravenös injiziert aus der Wertung genommen. Die Tiere 53 und 65 zeigen dagegen beispielhaft den erwarteten Verlauf bei korrekter i.v. Injektion. Dennoch blieben auch nach „Filterung“ der Daten einige Tiere mit ungewöhnlichen Plasma- oder Gewebskonzentrationen übrig. Allerdings können interindividuelle Schwankungen zwischen den Tieren einer Gruppe erheblich sein. Da keine weitere Begründung für einen Ausschluss dieser ungewöhnlichen Werte vorliegt, wurden diese bei der Mittelwertbildung mit einbezogen.

3.2.1.2 Gesamt-BPA in mütterlichen Rattengeweben

Zu jedem Versuchszeitendpunkt wurden die Tiere getötet und nach der in Kapitel 2.5.4. beschriebenen Methode auf BPA untersucht. Tiere, die aufgrund der Blutspiegel als offensichtlich paravenös injiziert identifiziert werden konnten, wurden in der Gewebsauswertung nicht berücksichtigt. In Geweben wurde immer Gesamt-BPA (Summe aus BPA-Aglycon und BPA-Konjugaten) bestimmt, weil eine Konjugatsspaltung bei der Aufarbeitung durch den Inhalt zerstörter Zellkompartimente (z. B. Lysosomen), die hydrolysierende Enzyme enthalten, nicht auszuschließen ist. Grundsätzlich erfolgten Doppelbestimmungen; bei Unregelmäßigkeiten wurde noch eine dritte Bestimmung der Gewebeprobe. durchgeführt.

Die in n=4-8 Tieren gemessenen BPA-Konzentrationen sind in Zeitgruppen zusammengefasst. Abbildung 36 zeigt die ermittelten Konzentrations-Zeit-Verläufe von BPA in den mütterlichen Geweben Leber und Niere.

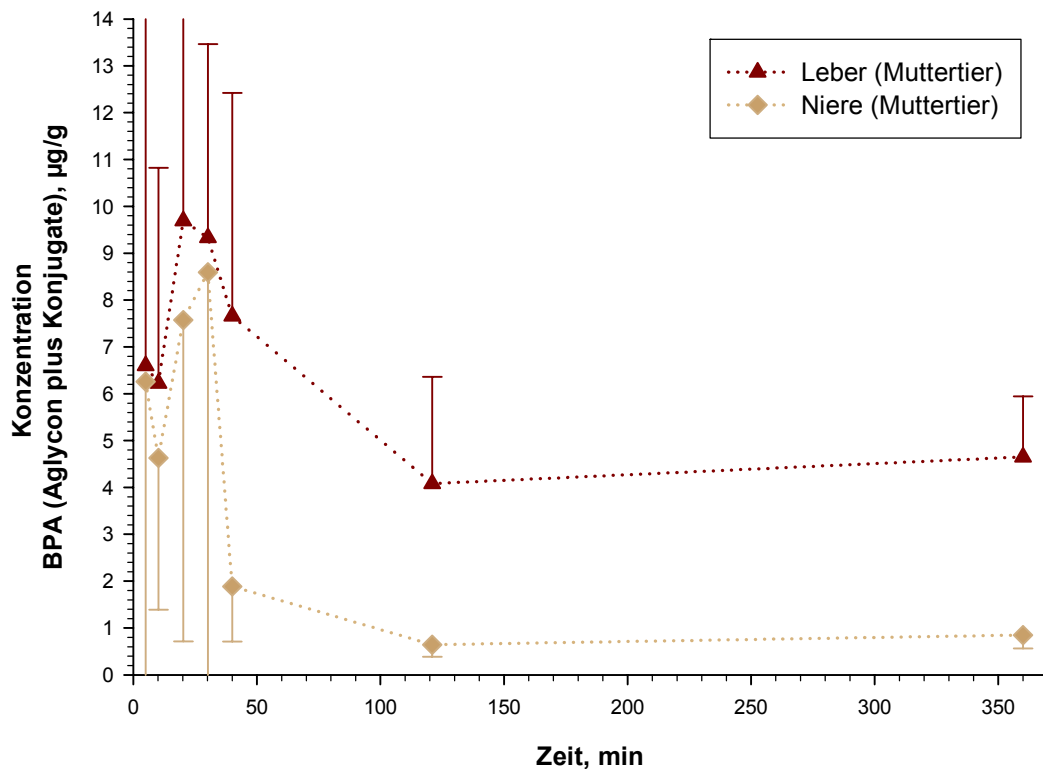


Abbildung 36: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in Leber und Niere der Muttertiere (DA/Han Ratten) nach Applikation von 10 mg/kg KG. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA aus n = 4-8 Tieren.

Relativ hohe Konzentrationen von 9,7 bzw. 9,3 $\mu\text{g/g}$ traten 20 bzw. 30 min nach der Applikation in der Leber der Muttertiere auf. Sie fallen innerhalb der nächsten 90 min rasch auf etwa die Hälfte der Spitzenwerte ab. Ein vergleichbarer Verlauf der Gewebekonzentrationen findet sich auch in den Nieren der Muttertiere. Hier ist nach Spitzenkonzentrationen

von 7,6 bzw. 8,6 $\mu\text{g/g}$ ein noch schnellerer Abfall als bei der Leber zu beobachten. Nach 120 min ist in den Nieren die BPA Konzentration unter 0,7 $\mu\text{g/g}$ gefallen (also auf 1/10 der c_{max} in diesem Gewebe).

Die folgende Abbildung (Abbildung 37) zeigt die Konzentrations-Zeit-Verläufe in Plazenta und Uterus der Muttertiere.

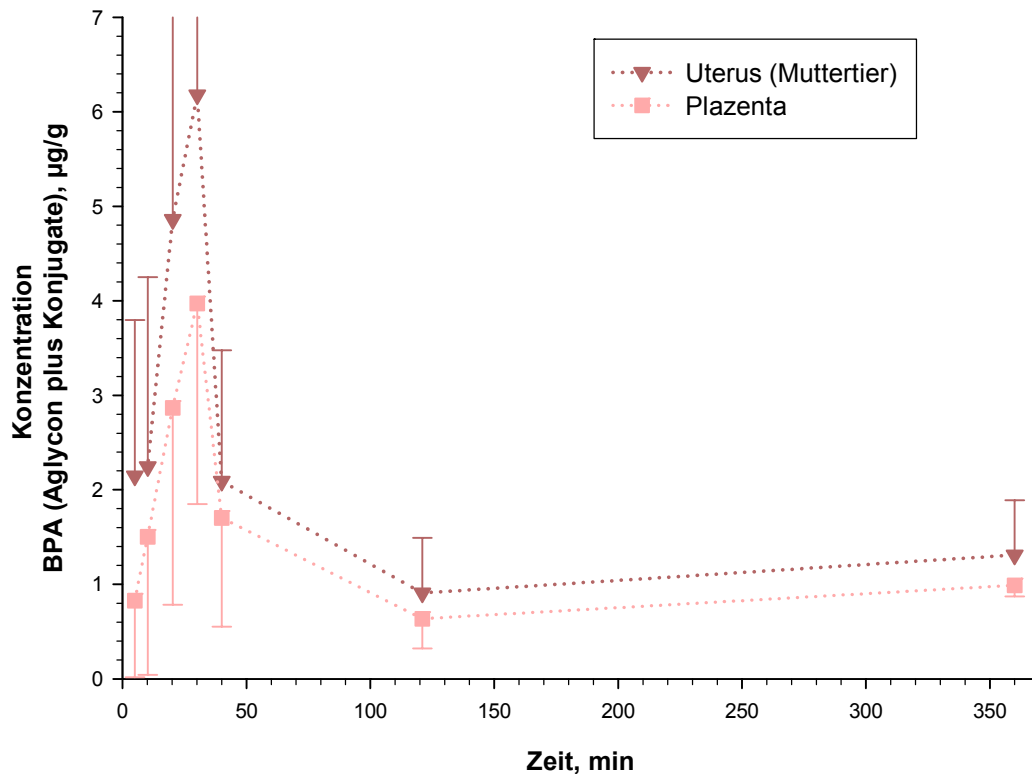


Abbildung 37: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in Plazenta und Uterus der Muttertiere (DA/Han Ratten) nach Applikation von 10 mg/kg KG BPA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA aus $n = 4-8$ Tieren.

Beide Gewebe zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven. Die Konzentrationsmaxima sind hier nach 30 min erreicht und liegen bei 6,2 $\mu\text{g/g}$ für Uterus und 4,0 $\mu\text{g/g}$ für Plazenta. Sie sinken innerhalb von 90 min auf 0,9 bzw. 0,6 $\mu\text{g/g}$ (zirka ein Sechstel der c_{max}). Bei 360 min ist ein leichter Anstieg der Gehalte zu erkennen. Der Anstieg dürfte auf eine enterohepatische Rezirkulation zurückzuführen sein, liegt allerdings noch im Bereich der Schwankungsbreite der Mittelwerte. Im Vergleich mit Leber oder Niere der Muttertiere werden im Uterus und in der Plazenta nur halb so hohe Gewebekonzentrationen gemessen.

3.2.1.3 Gesamt-BPA in fötalen Rattengeweben

Zur Untersuchung des transplazentaren Transfers von BPA wurden Gewebekonzentrationen in fötalen Geweben bestimmt. Dazu wurden BPA-Analysen in fötaler Leber und in Fötenhomogenat (Homogenat aus allen restlichen fötalen Geweben, ohne Leber) durchgeführt. Die Fötengewebe jeweils eines Muttertiers wurden vereinigt und entsprechend deren Zugehörigkeit zu einer Zeitgruppe dann die Mittelwerte aus $n = 4-8$ Tieren gebildet. Abbildung 38 zeigt die BPA-Konzentrationen in den beiden fötalen Geweben.

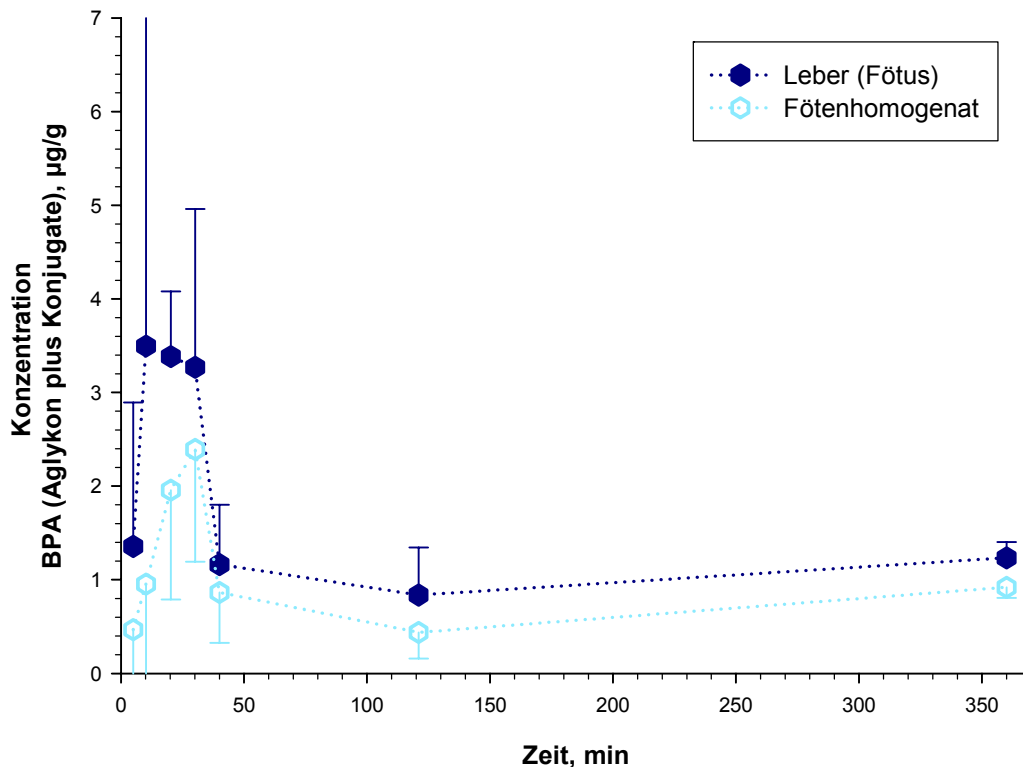


Abbildung 38: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BPA in fötaler Leber und Fötenhomogenat (DA/Han Ratten) nach Applikation von 10 mg/kg KG (BPA). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SA aus $n = 4-8$ Tieren.

Es ist ein schneller Anstieg der BPA Konzentration in der fötalen Leber mit dem Maximum von 3,4 - 3,5 $\mu\text{g/g}$ etwa 10 - 30 min nach der Injektion zu erkennen. Im Fötenhomogenat findet sich ein ähnlicher Verlauf wie in Plazenta und Uterus der Muttertiere, mit einem Maximum von 2,4 $\mu\text{g/g}$ nach 30 min und einem schnellen Abfall innerhalb von 90 min auf 0,4 $\mu\text{g/g}$. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf für die Fötenleber ähnelt im Prinzip dem der Leber des Muttertieres, allerdings liegt die Maximalkonzentration in der Fötenleber deutlich niedriger und eher im gleichen Bereich wie der höchste Gehalt in der Plazenta.

Sowohl Fötenleber als auch Fötenhomogenat zeigen, wie schon Uterus und Plazenta, einen leichten Anstieg der Gewebegehalte bei 360 min. Dieser Verlauf kann auf eine enterohepatische Rezirkulation hindeuten (siehe Kapitel 1.2).

3.2.1.4 Überblick toxikokinetischer Parameter für BPA in Rattengeweben

Für jede Konzentrations-Zeit-Kurve wurde mittels trapezoidaler Anpassung (SigmaPlot 9.0) die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Die Halbwertszeiten wurden aus dem initialen Term einer biexponentiellen Kurvenanpassung berechnet, da aufgrund der kurzen Versuchsdauer und einer wohl einsetzenden enterohepatischen Rezirkulation die Kurven sehr flach auslaufen. Bei den Geweben wurde als Startpunkt der biexponentiellen Funktion der C_{max} -Wert gewählt. Somit repräsentiert diese Halbwertszeit im Gewebe die Halbwertszeit zum Abklingen der im Gewebe angefluteten Substanz. Es ließen sich initiale Halbwertszeiten von 9 bis 31 min berechnen. Die in den verschiedenen Geweben wiedergefundenen Anteile der BPA Dosis liegen im Bereich von 0,5 – 4,5 %, wobei der Spitzenwert in der Leber des Muttertieres ermittelt wurde. Da sich die Anteile für das Fötenhomogenat und Fötenleber schlecht getrennt ermitteln ließen, wurden die Gehalte beider Gewebe gemittelt und das Gesamtfötengewicht zur weiteren Berechnung verwendet (siehe Tabelle 31 letzte Zeile).

In Tabelle 31 sind alle ermittelten toxikokinetischen Parameter für BPA in maternalem Plasma und Geweben trächtiger DA/Han Ratten und deren Föten zusammengefasst.

Tabelle 31: Zusammenfassung der toxikokinetischen Parameter für BPA in DA/Han Ratten.

Plasma/ Gewebetyp	$t_{1/2}^*$, h	C_{max} , ng/mL bzw. g	C_{max} bei min	Plasma/ Gewebemenge , g bzw. mL	Anteil der Dosis, % **	AUC, µg/g min	Clearance CL, 1/min
Plasma BPA-Aglycon	0,34	2905	5	6,0	0,9	143	0,07
Plasma BPA-Gesamt	0,52	3755	5	6,0	1,1	379	0,03
Leber Muttertier	0,43	9689	20	9,2	4,5	1810	0,01
Niere Muttertier	0,3	8594	30	1,3	0,6	501	0,02
Uterus Muttertier	0,23	6178	30	2,0	0,6	529	0,02
Plazenta Muttertier	0,32	3972	30	2,6	0,5	379	0,03
Fötenleber	0,15	3496 (3268)	10(30)	#	#	430	0,02
Fötenhomogenat	0,21	2392	30	#	#	271	0,04
Fötus Gesamt		2829	30	6,3	0,9		

vollständiges Blutvolumen pro Tier nicht bestimmbar, daher wurde mit 6 mL gerechnet

* jeweils von C_{max} bis 360 min mit angepasster biexponentieller Funktion

**im Mittel 200 g als Muttertiergewicht

Nach der Sektion der Leber sind die Gewichte (durch Verluste bei der Sektion) nur noch schwer zu bestimmen. Daher wurde nur Gesamfötus gerechnet.

3.2.2 *Daidzein und Genistein in Futtermitteln und Schweineplasmen*

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem IfADo und dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf wurde die Analyse der Isoflavone genutzt, um die Exposition und die Bioverfügbarkeit in Schweinen zu bestimmen. Details zum Tierversuch selbst und dort untersuchte Einflüsse der Isoflavone auf div. Wachstumsparameter bei Schweinen sind bereits publiziert [Kuhn et al. 2004].

Hauptaugenmerk lag bei dem oben genannten Versuch auf mögliche Effekte von Daidzein und Genistein im Futtermittel auf die Mastschweine: Dazu wurden Sojaprodukte mit unterschiedlichem Isoflavongehalt an eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe (je 19 kastrierte Schweine) verfüttert. Die Kontrollgruppe erhielt Futter mit „Soybeanmeal“ (kurz SBM) mit einem „normalen“ Gehalt an Isoflavonen (s.u. Tabelle 32, Kontrollrationen); die Versuchsgruppe erhielt ein durch Ethanolextraktion fast isoflavon-freies „Soy Protein Concentrate“ (kurz SPC, s.u. Tabelle 32, Versuchsrationen) Futter. Eine Unterkategorisierung in Rationen 1- 4 (vgl. Tabelle 32) erfolgte nur, weil die Tiere je nach Entwicklungsstadium Futter mit unterschiedlichem Aminosäuregehalt erhielten.

3.2.2.1 Futtermittel

Es kamen zwei Methoden zur Bestimmung der Gehalte an Daidzein und Genistein in den Futtermitteln („Kontrollration“ und „Versuchsration“) bzw. in den Blutproben der damit gefütterten Schweine zur Anwendung. Für die Isoflavonanalyse der Futtermittel kam die in Kapitel 2.6.1 beschriebene Methode zum Einsatz. Da die verwendete Standardadditionstechnik einen hohen zeitlichen Aufwand bedeutet, wird sie i.d.R. nur bei geringen Probenzahlen eingesetzt. Abbildung 39 zeigt die Chromatogramme zur Standardaddition beim Futtermittel „Kontrollration 2“, und Abbildung 40 zeigt die zugehörigen Standardadditionsfunktionen.

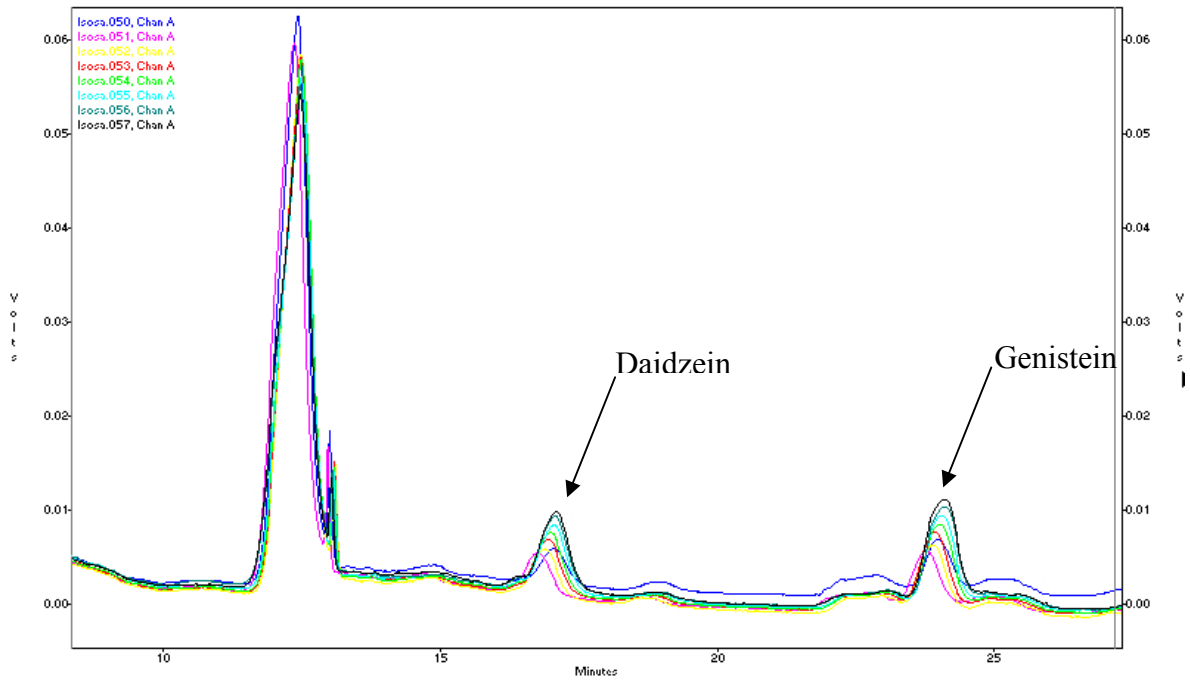


Abbildung 39: Chromatogramme der Standardadditionen zur Daidzein und Genistein Analyse des Futtermittels "Kontrollration 2" mit Mikrobore-HPLC-UV.

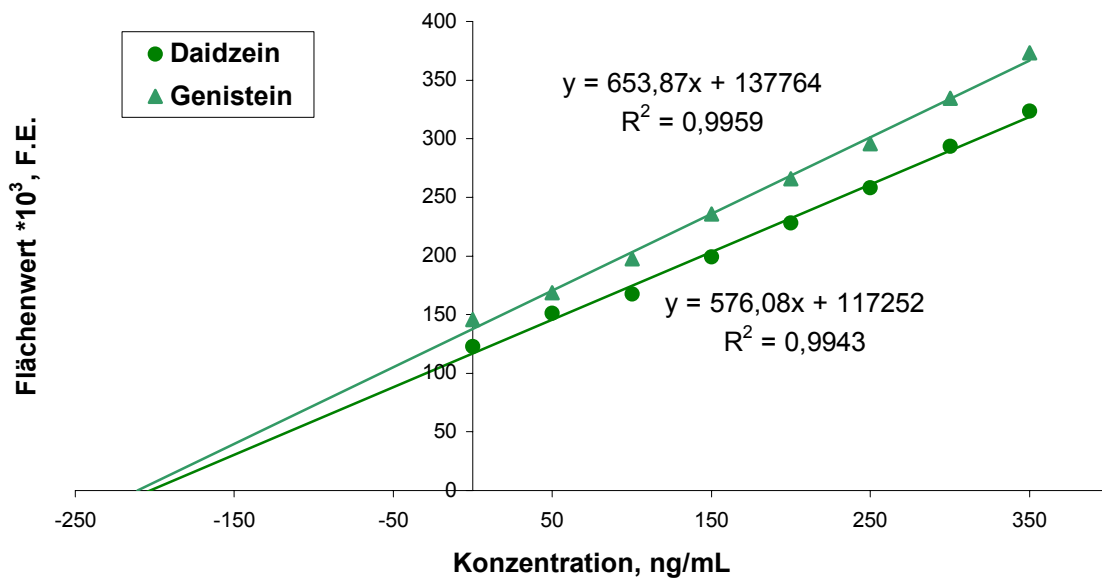


Abbildung 40: Standardadditionsfunktionen der Analyse von "Kontrollration 2". Aufgetragen sind die mittels Mikro HPLC-UV gemessenen Flächenwerte gegen die hinzugefügte Menge Daidzein bzw. Genistein. Der Schnittpunkt mit der Abszisse gibt den Gehalt der Probe an.

Aus Abbildung 40 kann man durch Ablesen der Schnittstelle mit der Abszisse oder durch Berechnung aus der Funktion einen Wert von 204 bzw. 210 ng/mL für Daidzein bzw. Genistein berechnen. Berücksichtigt man die Verdünnungsschritte und die eingesetzte Menge an Futtermittel, so ergibt sich ein Gehalt von 102 µg/g Daidzein bzw. 105 µg/g Genistein für „Kontrollration 2“. Entsprechende Messungen für weitere Futtermittelproben mit den berechneten Gehalten an Daidzein und Genistein sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Isoflavongehalte in Futtermitteln für Schweine (Studie zum Einfluss von Isoflavonen auf Wachstumsparameter bei Schweinen).

Produktname	Gemessene Gehalte, µg/g Futter		FBN kalkulierte Gehalte, µg/g Futter	
	Daidzein	Genistein	Daidzein	Genistein
Kontrollration 1	103	95	102	94
Kontrollration 2	102	105	83	77
Kontrollration 3	76	91	69	64
Kontrollration 4	29	61	49	45
Versuchsration 1	n.d.	n.d.	7	15
Versuchsration 2	n.d.	n.d.	6	12
Versuchsration 3	n.d.	n.d.	5	10
Versuchsration 4	n.d.	n.d.	3	7
Sauenfutter DA 3	n.d.	n.d.		

Nachweisgrenze 10 µg/g; n.d. not detected (d. h. < 10 µg/g)

Die beiden ersten Spalten geben die durch Standardaddition gemessenen Isoflavongehalte der Rationen wieder; in den rechten Spalten sind die vom FBN kalkulierten Werte (wegen Soja-Zugabe erwartete Gehalte) eingetragen. Die Übereinstimmung zwischen gemessenen und kalkulierten Gehalten ist sehr gut. In den „Versuchsrationen“ sind die Daidzein/Genistein Gehalte alle <10 µg/g und viel niedriger als in den sog. „Kontrollrationen“ (mit Soja-Zusatz). Die hier analysierten Kontroll- und Versuchsrationen dienten dem FBN zur Fütterung einer Kontrollgruppe (d. h. mit Soja-Zusatz ernährte Schweine) und einer Versuchsgruppe, die isoflavonfrei aufgezogen wurden. Um die Bioverfügbarkeit der Isoflavone in den Tieren zu untersuchen, wurden Blutproben am *IfADo* analysiert (s.u., Abschnitt 3.2.2.2.). Die Methode zur Nahrungsmittelanalyse kam bei einer Reihe weiterer Proben zum Einsatz. So wurde u.a. die Isoflavon-Gehalte in einem kommerziell erhältlichen Sojaprotein (Soja 80) und in Sojamehlen bestimmt, die für eine humane Isoflavonexposition herangezogen wurden.

Tabelle 33: Gehalte von Isoflavonen in Sojamehlen und kommerziellen Sojaprotein.

Produktname	Gemessene Gehalte, µg/g Futter	
	Daidzein	Genistein
E436	41	84
Sojamehl 438	404	458
Soja 80 ²	216	466

¹ NG 10 µg/g; n.d. not detected (d. h. < 10 µg/g)

Das Soja 80 Protein diente später dazu, eine Aufnahme („Soy Challenge“), wie sie bei asiatischer Ernährung vorkommt, zu simulieren und die daraus resultierende Isoflavon-Ausscheidung im Urin zu ermitteln (s.u., Abschnitt 3.2.3.).

3.2.2.2 Isoflavon-Blutspiegel in Schweinen

Am FBN asservierte Blutproben der mit Kontrollrationen oder Versuchsrationen gefütterten Schweine wurden am *IfADo* analysiert, um die innere Exposition der Tiergruppen anhand der Plasmaspiegel von Daidzein und Genistein zu untersuchen. Hierzu kam die in Kapitel 2.6.2. beschriebene Methode der fl./fl. Extraktion nach enzymatischer Hydrolyse der Isoflavon-Konjugate zum Einsatz, denn es wurde hier keine Unterscheidung in Aglycone und Konjugate angestrebt, sondern nur der „Gesamtgehalt“ bestimmt. Abbildung 41 zeigt die Mittelwerte der Doppelbestimmungen für Daidzein und Genistein im Schweineplasma.

² kommerziell erhältliches Sojaprotein (Decathlon, Herne), zur Hochrechnung für die „SoyChallenge“ wurde das Ergebnis einer IS korrigierten Standardaddition (Zugabe von Biochanin A) verwendet, dabei errechnen sich für Daidzein 258 µg/g und für Genistein 504 µg/g.

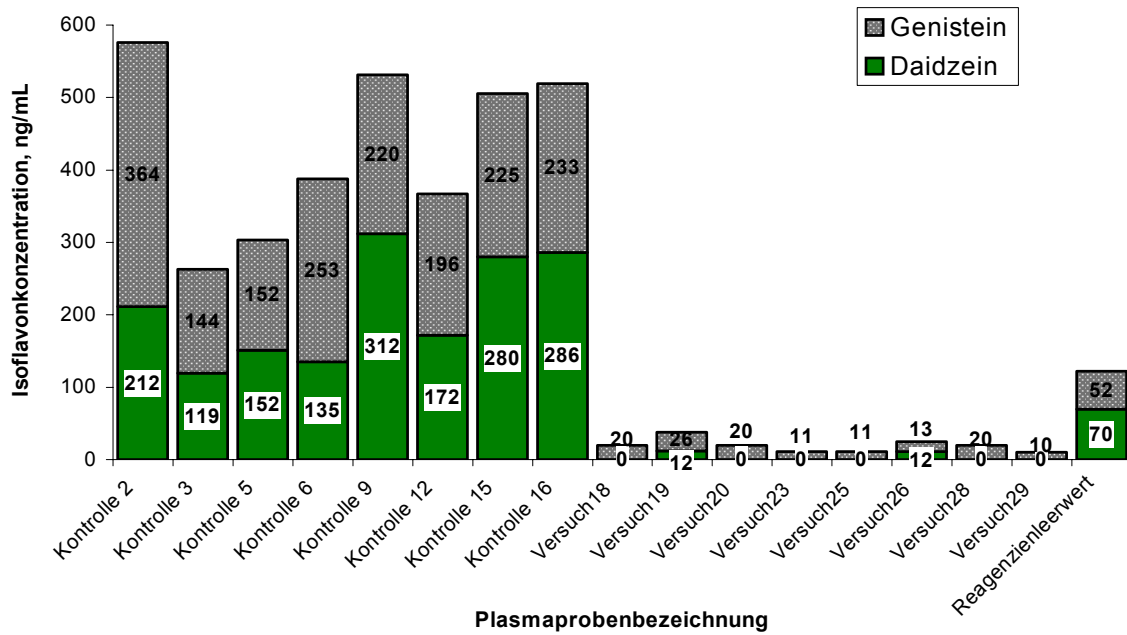


Abbildung 41: Konzentrationen von Daidzein und Genistein in Schweineplasma nach Fütterung mit isoflavonreichen bzw. isoflavonarmen Futtermitteln. 0 = not detected (d. h. < 11 ng/mL Daidzein und < 9 ng/mL Genistein)

Die Befunde bestätigen die deutlich höhere Isoflavonexposition der Kontrolltiere, während die Versuchstiere nur geringe Isoflavongehalte zeigen. Auffallend ist die hohe Variabilität in den mit Soja-Zusatz gefütterten Kontrolltieren infolge interindividueller Schwankungen. Zum Vergleich ist noch ein Reagenzienleerwert - hier der Messwert eines kommerziell erworbenen Schweineplasma - dargestellt. Wie zu erkennen, liegen die Plasmakonzentrationen für die isoflavonfrei gefütterten (Versuchs-)Schweine deutlich darunter.

3.2.3 Isoflavon-Gehalte und BPA in humanen Urinproben

Mit der in Kapitel 2.7.1. beschriebenen Methode wurde eine erste Stichprobe von n=8 Probanden hinsichtlich der Ausscheidung an BPA, Daidzein, Equol und Genistein untersucht. Dazu wurden 24 h Urine von freiwilligen Probanden (Alter 18 bis 55 Jahre), die sich „normal“ ernährten, gesammelt und analysiert, um einen ersten Überblick über die zu erwartenden Konzentrationen aus üblichen Expositionen zu erhalten. Abbildung 42 zeigt die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

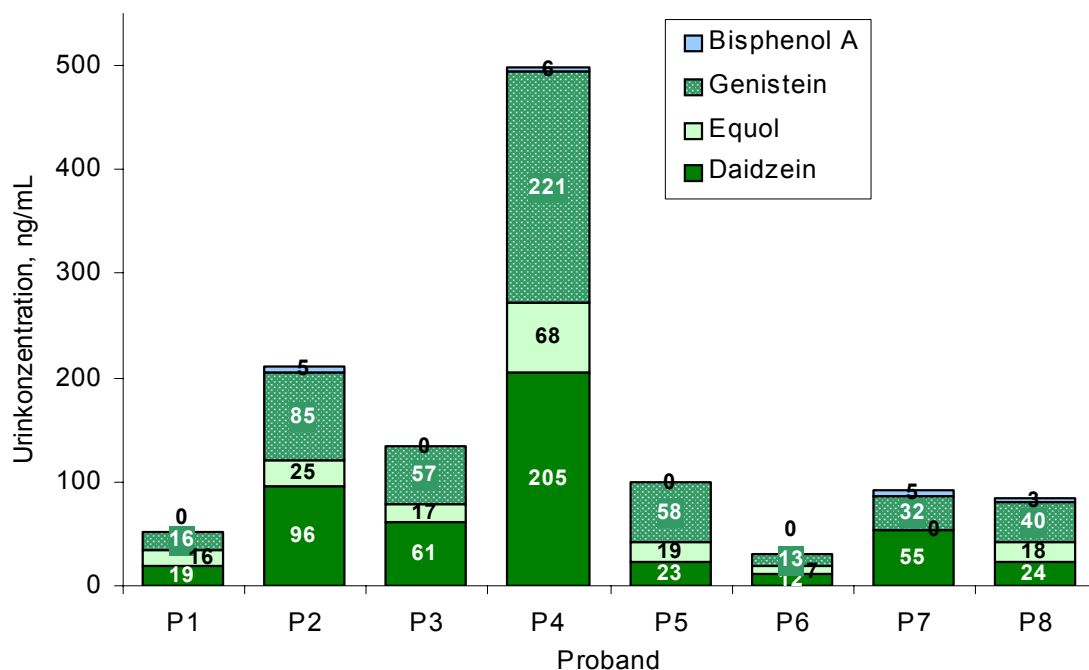


Abbildung 42: BPA, Daidzein, Equol und Genistein Analysen von 24h-Urinen von 8 Probanden (0 bedeutet unterhalb der Nachweisgrenze).

Zunächst fallen deutliche interindividuelle Unterschiede in den gemessenen Urinkonzentrationen der Phytoöstrogene auf: Sie variieren für Genistein zwischen 13 und 221 ng/mL und für Daidzein zwischen 12 und 205 ng/mL, liegen aber alle deutlich über der Nachweisgrenze. Ein Proband scheidet kein Equol aus, bzw. lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 4 ng/mL; die übrigen 7 Urine enthielten zwischen 7 und 68 ng/mL Equol. Vier Probanden scheideten BPA in Konzentrationen zwischen 3 bis 6 ng/mL aus, die anderen vier Urine lagen unterhalb der Nachweisgrenze für BPA von 3 ng/mL.

Im Durchschnitt dieser Stichprobe lagen die Werte bei 5 ng/mL BPA, 62 ng/mL Daidzein, 24 ng/mL Equol und 65 ng/mL Genistein. Proben, die Werte unterhalb der Nachweisgrenzen zeigten, sind in dieser Mittelwertbildung nicht berücksichtigt.

Berücksichtigt man die individuellen 24h Urinvolumina, so lassen sich aus den Konzentrationen (ng/mL) auch die entsprechenden Gesamtausscheidungen (in µg/Tag) der Probanden berechnen. Wie in Abbildung 43 gezeigt, ändert das aber wenig am Gesamtbild.

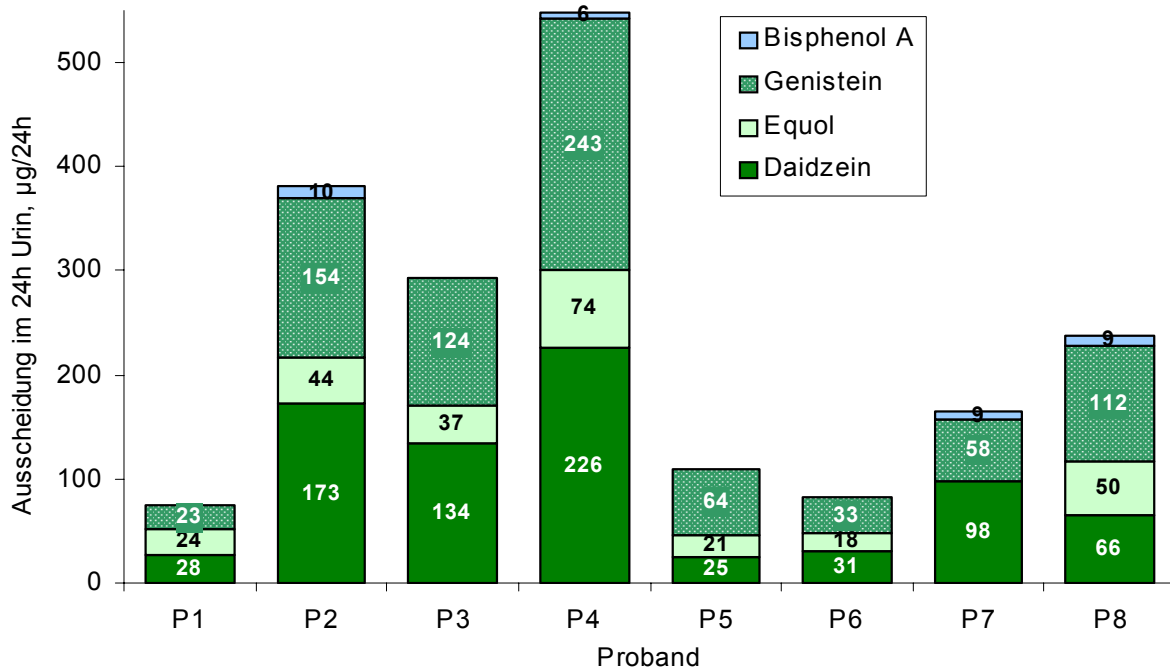


Abbildung 43: BPA, Daidzein, Equol und Genistein Urin-Ausscheidung innerhalb von 24h.

Es ist zu erkennen, dass alle Probanden Daidzein und Genistein ausscheiden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmass, und ein hoher Anteil dieser Stichprobe offenbar auch Equol produziert: So wurden im Mittel 102 µg/Tag Genistein, 98 µg/Tag Daidzein und 38 µg/Tag Equol ausgeschieden. Demgegenüber ist die gemittelte Ausscheidung an BPA mit 9 µg/Tag (bei 4 von 8 Probanden) deutlich niedriger.

Um zu untersuchen, ob sich auch Spoturine als eine „Momentaufnahme“ zur Abschätzung der Exposition eignen, wurde eine weitere Gruppe (zweite Stichprobe) in die Untersuchung einbezogen. Es handelte sich um männliche Probanden im Alter von 18 bis 32 Jahren mit normaler westlicher Ernährung, die Spoturine an unterschiedlichen Zeitpunkten des Tages abgaben.

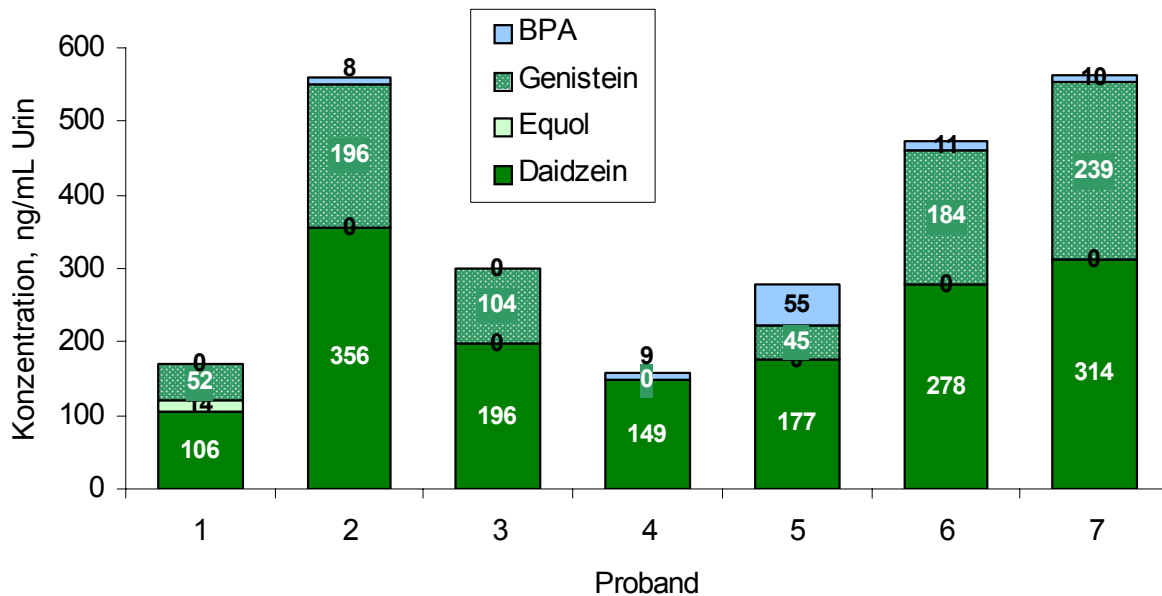


Abbildung 44: BPA- und Isoflavongehalte in Spoturinen von 7 Probanden.

Auch hier findet man deutliche interindividuelle Unterschiede in den Phytoöstrogenkonzentrationen: Sie liegen für Genistein zwischen 45 und 239 ng/mL und für Daidzein zwischen 106 und 356 ng/mL; nur ein Proband dieser Gruppe schied Equol aus, und zwar 14 ng/mL. Bei zwei Probanden konnte BPA nicht nachgewiesen werden ($< NG$ von 3 ng/mL), die fünf übrigen Urine enthielten zwischen 8 und 55 ng/mL. Die Mittelwerte für diese Stichprobe, nämlich 225 ng/mL für Daidzein, 117 ng/mL für Genistein und 19 ng/mL für BPA, liegen also etwas höher als für die Stichprobe der 24h Urine (siehe Abbildung 42).

Wenn man die (mittleren) Konzentrationen in Spoturinen auf ein durchschnittliches Urinvolumen von 1,7 L hochrechnet, um die tägliche Ausscheidung abzuschätzen, ergibt das etwa 382 μ g Daidzein, 199 μ g Genistein, 24 μ g Equol und 32 μ g BPA pro Tag. Diese Schätzung ist allerdings aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Spoturinen um eine „Momentaufnahme“ nach Exposition handelt, weniger zuverlässig als Werte, die in 24h Urinen ermittelt wurden. Da sich die erste (Abbildung 42) und die zweite Stichprobe (Abbildung 44) nicht überlappen, kann man diese hinsichtlich der Anzahl der Personen, die Equol ausscheiden, zusammenfassen. So zeigen 8 von 15 (entspricht 53 %) der Probanden Equolwerte oberhalb der Nachweisgrenze. Zudem ernährten sich die beiden untersuchten Personengruppen mit üblicher (deutscher) Mischkost, und ihre Urinkonzentrationen geben daher Einblick in die hier typische Expositionssituation. Um die Auswirkungen der Ernährung auf die Phytoöstrogenausscheidung mit dem Urin genauer zu untersuchen, führte ein weiterer Proband über mehrere Tage eine isoflavonarme Diät durch und danach eine „Soy Challenge“,

d.h. kontrollierte Aufnahme eines Sojaprodukts mit bekannter Daidzein und Genistein Menge. Die isoflavonarme (IA) Diät erfolgte über einen Zeitraum von mehr als sieben typischen Halbwertszeiten (> 48 h; siehe Kapitel 1.4.2). Dabei wurden vom Probanden nur solche Nahrungsmittel konsumiert, die laut Venus Datenbank keine nachweisbaren Gehalte an Daidzein, Genistein, Biochanin A oder Formononetin haben. Vor Beginn und zum Ende der Diät wurden jeweils Spoturine gesammelt, und nach Verzehr des Sojaprodukts dann ein 24h Sammelurin. Die Ergebnisse der Isoflavon-Analysen in diesen Proben sind in Abbildung 45 gezeigt.

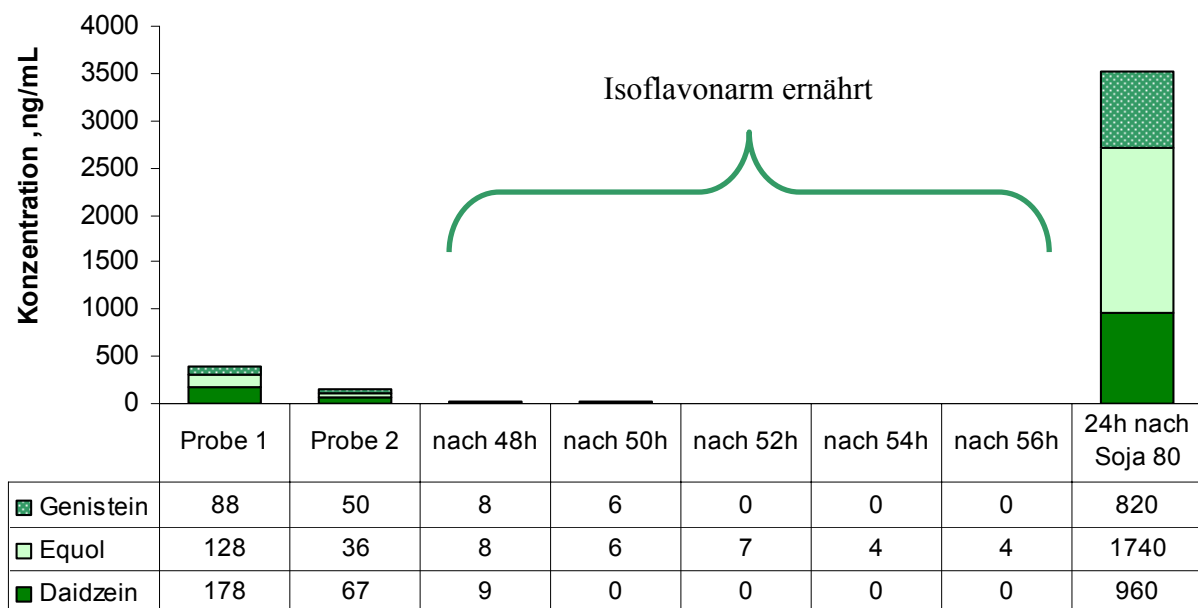


Abbildung 45: Isoflavongehalte in Spoturinen eines Probanden, nach „normaler“ (Probe 1 und 2), nach „isoflavonarmer“ (IA) und in einem 24h Sammelurin nach Verzehr von 50 g Sojaprotein. 0 = < NG

Probe 1 und Probe 2 zeigen die „Normalwerte“ des Probanden; bei diesen Proben handelte es sich um zwei Spoturine vor der Durchführung der isoflavonfreien Diät. Weitere Proben wurden danach gesammelt: 48 h nach Einhaltung der Diät enthielt der Urin noch einstellige Werte (ng/mL) an Isoflavonen, während nach 52 h die Isoflavongehalte des Urins nicht mehr sicher zu quantifizieren waren. Der 54 h nach Beginn der isoflavonarmen Diät gesammelte Spoturin wurde dann, als praktisch isoflavonfreier Referenzurin (interne Bezeichnung Phytofrei 4), für alle Validierungsmessungen der „Urinmethode“ verwendet (vgl. Kapitel 3.1.4).

Demgegenüber enthält der nach Verzehr von 50 g Soja 80 (Analyse siehe Unterkapitel 3.2.2.1.) gesammelte 24 h Urin des Probanden deutlich, nämlich etwa 10-fach höhere

Isoflavon-Konzentrationen als zuvor, bei normaler westlicher Ernährung (Abbildung 45). Die mit Soja aufgenommene Menge (12,9 mg Daidzein und 25,2 mg Genistein) entspricht etwa der üblichen Isoflavon-Aufnahme in der asiatischen Bevölkerung (~45 mg/Tag). Auffällig ist noch die hohe Equolausscheidung des Probanden, der offensichtlich einen großen Teil des aufgenommenen Daidzein in Equol umgewandelt hat, allerdings auch schon unter Normalkost deutlich messbare Equolkonzentrationen im Urin zeigte.

Rechnet man die gemessenen Konzentrationen auf das Urinvolumen von 1,7 L um, so ergeben sich innerhalb eines Tages nach „Soy Challenge“ Ausscheidungen von 1630 µg Daidzein, 2960 µg Equol und 1390 µg Genistein. Bezieht man die im 24 h Urin ermittelten Mengen auf die zuvor aufgenommene Dosis, so ergibt sich eine Wiederfindungsrate von 6 % für Genistein bzw. 13 % für Daidzein. Unter Berücksichtigung des aus Daidzein gebildeten Equol-Anteils erhöht sich die Wiederfindungsrate für Daidzein auf 37 %. Der Versuch illustriert beispielhaft den Einfluss der Ernährung: So lag bei Sojakonsum die Isoflavonausscheidung um den Faktor 10 höher als bei der üblichen westlichen Ernährungsweise.

4 Diskussion

Hauptaufgabe dieser Arbeit war die Etablierung und Optimierung geeigneter analytischer Methoden zur Quantifizierung einiger östrogenen Chemikalien in komplexen biologischen Matrices wie Blutplasma, Gewebe und Urin. Bei den untersuchten Stoffen handelt es sich um schwach östrogen aktive Substanzen anthropogener (Bisphenol A, BPA) oder natürlicher (Daidzein, Genistein, Equol) Herkunft (siehe Kapitel 1.3 und 1.4). Solche Stoffe werden auch als Endokrine Disruptoren bezeichnet, weil sie in die hormonelle Regulation (vgl. Kapitel 1.1) eingreifen können. Sie stehen in Verdacht, aufgrund ihrer hormonartigen Wirkung bei hinreichend hohen Expositionen in frühen Phasen der Entwicklung, ungünstige Folgen bei Mensch und Tier zu verursachen. Das Xenooestrogen BPA und die Isoflavon-Phytoöstrogene Daidzein und Genistein sind als weit verbreitet in der Nahrung vorkommende Substanzen von besonderem Interesse in Hinblick auf eine vergleichende toxikologische Bewertung möglicher gesundheitlicher Risiken [Degen and Bolt, 2000; Degen 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Aufgabenstellungen bearbeitet:

1) Für BPA wurde seine Verteilung im Organismus und der transplazentare Transfer in DA/Han Ratten untersucht. Ein Ziel war es, die BPA-Daten u.a. für Vergleiche mit zuvor durchgeführten toxikokinetischen Studien mit Daidzein [Degen et al. 2002b] heranziehen zu können. Es sind 2) Methoden zur Analyse von Isoflavonen in Futtermitteln und in Blutproben (Plasma) eingesetzt worden, um Exposition und Bioverfügbarkeit der Phytoöstrogene in einem Tierversuch an Schweinen zu untersuchen. Dann sind 3) humane Urinproben auf BPA- und Isoflavon-Gehalte hin analysiert worden, um mit Hilfe dieser Biomonitoring Untersuchungen erste Ergebnisse zu den Expositionen bei üblicher (deutscher) Ernährungsweise zu gewinnen.

Für alle drei Anwendungen wurden geeignete und validierte Methoden zur Analyse von BPA und Phytoöstrogenen in den o.g. biologischen Matrices etabliert und optimiert. Im Folgenden werden zunächst (unter 4.1) hier entwickelte analytische Methoden diskutiert und mit publizierten Methoden verglichen. Dabei wird auf Probleme bei der Methodenentwicklung, mögliche Fehlerquellen und Lösungsansätze eingegangen. Dann werden (unter 4.2) die wichtigsten Ergebnisse der Methodenanwendung diskutiert. Abschliessend werden (unter 4.3) einige vergleichende Betrachtungen zur toxikologischen Bedeutung von BPA und Isoflavon-Phytoöstrogenen angestellt, die sich aus den neuen Befunden ableiten lassen.

4.1 Vergleich und Bewertung der analytischen Methoden

Für die Entwicklung geeigneter Methoden zur Analyse von BPA und Isoflavonen im biologischen Material standen im Labor zwei GC-MS Anlagen und eine mikro-HPLC Anlage zur Verfügung. Zur Analyse von BPA wurde die GC-MS als empfindlichste Technik favorisiert; die Isoflavone wurden in zwei Fällen mit mikro-HPLC-UV, in anderen Matrices mit der GC-MS bestimmt. Die Aufarbeitung verschiedener Probenmaterialien (Blutplasma, Gewebe, Urin oder Nahrungs-/Futtermittel) und die Analytanreicherung (fl./fl. Extraktion oder SPE) wurden jeweils angepasst und auch weitere Schritte (u.a. Derivatisierungsreaktionen) optimiert. Schwerpunkte der analytischen Methodenentwicklung waren Messpräzision, Verfahrenspräzision, Wiederfindung und Nachweisgrenzen. Aber auch die einfache Durchführbarkeit sowie Kosten und Zeit wurden nach Möglichkeit berücksichtigt. Andere gut geeignete Analystechniken wie die LC-MS standen uns erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung; deren Einsatz wird im Abschnitt 5 diskutiert.

4.1.1 Analyse von BPA in Plasma und Gewebe

Zur Anreicherung von BPA aus Blutplasma ist eine fl./fl. Extraktionsmethode mit DIPE genutzt und hinsichtlich der Anzahl der Extraktionsschritte optimiert worden (vgl. 3.1.1). Gegenüber der Einfachextraktion [Upmeier 2001] erhöhte dies die Ausbeute um etwa 10 %. Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin lieferte sehr stabile und reproduzierbare Ergebnisse. Diese Art der Derivatisierung nutzen in abgewandelter Form auch andere Gruppen [Miyakoda *et al.* 2000., Lee and Peart 2000, Kawaguchi *et al.* 2004]. Dagegen führte der häufig als Derivat verwendete BPA TMS-ether (siehe auch Tabelle 24) in Vorversuchen gelegentlich zu Signalverlusten; eine mögliche Ursache dafür könnten Matrixeffekte in Verbindung mit der splitless Aufgabe sein. In allen GC-MS Messungen diente kommerziell erhältliches $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA als idealer interner Standard.

Für die Analysen von BPA in Geweben wurde die Probenvorbereitung angepasst: Um die Gewebestrukturen aufzuschließen, wurde der fl./fl. Extraktion ein Lyse- und Proteinabbauschritt vorangestellt. Auf diese Weise ließen sich sehr gute Kalibrierungen mit den Rattenlebern der unbehandelten Kontrolltiere erreichen (vgl. 3.1.2). Das für Blutplasmaproben eingesetzte Extraktionsmittel und auch das Derivatisierungsreagenz konnten beibehalten werden. Für die Validierung der Gewebemethode stand Rattenleber unbehandelter Tiere aber nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung; doch erwies sich Kalbsleber (trotz eines etwas

höheren Background, Abbildung 24) als geeignetes Referenzgewebe, denn die Parameter der Kalibrierfunktionen ergaben nur geringe Unterschiede zu denen mit Rattenleber. Analog zu der für Plasma durchgeführten Qualitätssicherung war es so möglich, auch für Gewebeproben die NG (nach DIN), WR, Variationen in und zwischen den Serien sowie den linearen Bereich zu ermitteln. Alle Parameter lagen in einem für die angestrebte Applikation (vgl. Kapitel 3.2.1) akzeptablen Bereich.

Die hinsichtlich Probenaufarbeitung und Art der Derivatisierung optimierte Methode wurde sowohl für Plasma als auch für Gewebe einer ausführlichen Prüfung unterworfen, um auch einen Vergleich zu anderen publizierten Methoden zu ermöglichen. Tabelle 34 (s.u.) stellt die hier entwickelte Methode auf der Basis von Qualitätsparametern anderen Methoden gegenüber, die sich aber teilweise in Extraktionsverfahren, Derivatisierungsreagenz, Analysetechnik oder Matrix unterscheiden. In der Übersicht sind auch Qualitätsparameter für die BPA Bestimmung in Urin aufgeführt. Dazu wurden jedoch eine andere Extraktion (SPE) Derivatisierung und Detektion als bei der in dieser Arbeit vorgestellten „Urinmethode“ verwendet, denn die dort aufgeführte Methode wurde ausschließlich zur Analyse auf BPA genutzt, während unsere Methode zur simultanen Bestimmung der Isoflavone entwickelt wurde (vgl. 3.1.4).

Für die ermittelte Messpräzision von 2-3 % war ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich, denn diese Werte, die ein Bild zum Fehler der technischen Seite (d.h. der GC-MS-Anlage und dem Autosampler) liefern, werden selten publiziert. Der ermittelte Wert variierte hier um 1-2 % (2% für den Varian Autosampler (Plasma) und 1-4% für MPS2 (Leber bzw. Urin)), und lag im Rahmen der durch den Hersteller angegebenen Messpräzisionen.

Ein wesentlich wichtigerer Punkt ist die Präzision (Variation in der Serie und zwischen den Serien). In diesem Punkt sind unsere Werte für BPA Analysen in Plasma und Urin durchaus vergleichbar bzw. besser als die in zwei anderen Dissertationen [Colnot 2001; Upmeier 2001] und in zwei publizierten GC-MS Methoden [Kawaguchi *et al.* 2004; Yoshimura *et al.* 2002] berichteten Variationen (Tabelle 34). Ähnliches gilt für den Vergleich mit einer kürzlich publizierten HPLC-Methode zur BPA Analyse in Plasma und Geweben [Xiao *et al.* 2006].

Tabelle 34: Vergleich ausgewählter Methoden zur BPA-Analyse in verschiedenen Matrices anhand von Qualitätsparametern. Grau unterlegt sind die in dieser Arbeit ermittelten Daten. Literaturquellen geben nicht immer eindeutig an, ob es sich um Variationen in der Serie (iS) oder zwischen den Serien (zS) handelt).

Literatur	Analyten Derivattyp		Analysen- technik	Matrix	NG, ng/mL	Linearer Bereich, ng/mL	WR, %	Variation (iS, zS), %
Colnot 2001	d16 BPA	TMS-ether	GC-MS, EI, SPE	Plasma	2,4	0,24-456	95	9 (iS)
	d16 BPA	TMS-ether	GC-MS, NCI, SPE	Urin	0,24			
	BPA	TMS-ether	GC-MS, NCI, SPE	Plasma	4,8			
Kawaguchi <i>et al.</i> 2004	BPA	Acetat	GC-MS	Plasma	0,1 [†]	0,02-10	99	10 (iS)
			mit CIS (-150°C)	Wasser	0,005 [†]	0,005-10	105	4 (iS)
			und TD, Twister™	Urin	0,02 [†]	0,02-10	95	6 (iS)
Moors <i>et al.</i> 2006 (diese Arbeit)	BPA	Acetat	GC-MS, EI, fl./fl.	Plasma	14 [‡]	14-1300	90	4 (iS), 6 (zS)
			GC-MS, EI, fl./fl.	Leber	32 [‡]	32-3300	90-110	4 (iS), 10 (zS)
			TBMS-ether	Urin	3 [‡]	3-110	90-119	3 (iS), 10 (zS)
Upmeier 2001	BPA	TMS-ether	GC-MS, EI, fl./fl.	Plasma	12	5-1000	82	7 (zS)
Xiao <i>et al.</i> 2006	BPA		HPLC-FLD, fl./fl.	Serum	2,8	10-50000	83,5-95	0,3 (iS), 8,2 (zS)
				Leber	1,4	10-50000	84,0-92,1	0,1 (iS), 6,0 (zS)
				Testis	1,4	10-50000	78,6-96,0	1,3 (iS), 5,6 (zS)
Yoshimura <i>et al.</i> 2002	BPA	Pentafluorbenzylether	GC-MS, NCI, SPE	Serum	0,005	0,01-100	101	5-6 (iS)

* S/N = 10:1 sonst S/N = 3:1

aus idealer Lösung hochgerechnet

‡ nach DIN 32 645 Kalibriergeradenmethode

Bei der Extraktion (fl./fl. oder SPE) kommt es in der Regel je nach ausführender Person (die die Probe aufarbeitet) zu mehr oder weniger stark schwankenden Ergebnissen. Diese Schwankungen werden meist mit kommerziell verfügbarem ¹³C₁₂-(Ring)-BPA ausgeglichen, um die Verfahrenpräzision zu verbessern und die Robustheit der Methode zu erhöhen. Ohne den Einsatz eines internen Standards sind Analysen in biologischen Matrices nur mit direkter Kalibrierung möglich und können selbst dann erhöhten Schwankungen unterliegen, wenn nicht mit sehr hoher Sorgfalt gearbeitet wird. Alle in Tabelle 34 dargestellten Methoden arbeiten deshalb mit internen Standards. Von mir wurde der ¹³C-Standard gewählt, weil dieser sehr stabil ist und die m/z Differenz zum Analyten eine ausreichende massenspektrometrische Trennung ermöglicht.

Für die Wiederfindungen wurden für die hier entwickelte BPA-Methode im mittleren Konzentrationsbereich 84 bzw. 90 % (in bzw. zwischen den Serien) und für den hohen

Konzentrationsbereich 97-104 % aus dotierten Schweineplasma-Proben berechnet. Insgesamt ist sie auch bei der Wiederfindung damit gut vergleichbar mit anderen Methoden.

Als weiteres Qualitätsmerkmal wird i.d.R. die *Nachweisgrenze* angegeben. Meist wird diese über das S/N=3 Verhältnis berechnet, um bei der gegebenen Konzentration das Signal noch „sicher“ vom Background-Rauschen unterscheiden zu können. Da bei biologischen Proben der Untergrund jedoch stark variieren kann, ist diese Größe nur bedingt gültig. Daher wird in der vorliegenden Arbeit die Nachweisgrenze mit Hilfe der Kalibriergradenmethode nach DIN 32645 berechnet. Dieses Vorgehen erfordert im Vorfeld zwar mehr Arbeit, erlaubt dann aber gute Aussagen zur Methode, weil die Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion und damit die Schwankung und der Kalibrierbereich mit einfließen. Wegen der unterschiedlichen Arten der Ermittlung der Nachweisgrenzen ist ein direkter Vergleich zu den in Tabelle 34 aufgeführten Nachweisgrenzen nur bedingt möglich, weil die mittels S/N-Methode ermittelten Nachweisgrenzen meist deutlich niedriger liegen.

Für Plasma-Proben wurden die Nachweisgrenzen auf zwei Geräten bestimmt: Die 10 Jahre alte Varian Saturn 4D schneidet mit 24 ng/mL BPA schlechter ab als die Agilent 5973 mit 14 ng/mL. Moderne Geräte haben meist eine bessere Nachweisgrenze, bedingt durch die allgemeine technische Entwicklung und Zunahmen bei der Empfindlichkeit und Präzision des Detektors. Verglichen mit anderen würde sich die vorliegende Methode mit der Acetylierung am oberen Ende und mit der MtBSTFA-Derivatisierung im mittleren Bereich einordnen. Hätte man in dieser Arbeit die Nachweisgrenzen über das S/N-Verfahren bestimmt, so wären zudem niedrigere Nachweisgrenzen ermittelt worden als die oben genannten.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu belegen und systematische Abweichungen auszuschließen, wurde ein Sollwert t-Test durchgeführt und bestanden. Da zur Kalibrierung kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung stand, wurde auf unabhängig dotierte Proben zurückgegriffen. Zwar könnte man die Validität der Methode durch zertifizierte Referenzstandards noch überprüfen, falls diese verfügbar werden, doch finden sich in der Literatur zur BPA Analytik bisher keine so aufwendigen Tests; ein Vergleich entfällt daher.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Methode gut in das Spektrum vorhandener publizierter Methoden einordnet, wobei hier nur ein relevanter Ausschnitt der publizierten Methoden behandelt werden konnte. Verbesserungen hinsichtlich der Nachweisgrenze wären noch möglich. Betrachtet man aber den Einsatzbereich und die dort vorliegenden BPA Konzentrationen, kann die Methode als optimal für die Anwendung bezeichnet werden. Ein Vorteil der Plasma- und Gewebe-Methode ist, dass die Acetylierung eine kostengünstige Derivatisierung ist und in Kombination mit der fl./fl. Extraktion auf eine teure Festphasen-

extraktion verzichtet werden kann. Allerdings wird der Kostenvorteil durch großen Arbeitsaufwand erreicht, der sich zudem schlecht durch Automatisierung verkürzen lässt. Eine Erleichterung stellt in dieser Hinsicht die von uns für Urinproben und von einigen anderen für diese Matrix oder Serum eingesetzte SPE dar (vgl. Tab 34). Wie beispielsweise die Arbeit von Xiao et al. (2006) zeigt, sind inzwischen auch HPLC-basierte Methoden eine Alternative für BPA Analysen im biologischen Material.

4.1.2 *Daidzein und Genistein Analyse in Futtermitteln*

Zur Analyse von Futtermitteln auf Daidzein und Genistein wurden die Pulverproben wie geliefert eingesetzt, einer sauren Hydrolyse unterworfen und die Isoflavon-Aglykone durch ethanolische Extraktion angereichert, ehe sie mittels HPLC-UV (s.u.) analysiert wurden. Die Mikro-HPLC Methode, durchgeführt als Standardaddition, lieferte dabei zuverlässige Ergebnisse für die Futtermittelanalyse. Für die Mikro-HPLC Methode wurden Nachweisgrenzen von 10 µg Daidzein und Genistein pro g Futtermittel ermittelt [Degen *et al.* 2002a]. Die Wiederfindungsraten und weitere Qualitätsparameter wurden nicht bestimmt, da es sich um eine etablierte Methode handelt. Die Standardadditionsmethode war notwendig da die UV-Detektion oft durch Störungen aus der Matrix beeinflusst wird als z. B. die MS-Detektion. Daher war es hier nötig, den Matrixhintergrund, lange Equilibrierzeiten der Mikro-Säule und eventuell auftretende Probleme durch Partikel zu berücksichtigen. Dies gelang durch die Anwendung der Standardadditionsmethode. Die Standardaddition verringert den Einfluss der o.g. Schwankungen, da innerhalb einer Serie eine Kombination aus Kalibrierung und Probe gemessen wird. Zuvor durchgeführte Testmessungen zeigten gute Wiederfindungsraten innerhalb der Serie, was für den Einsatz der Standardaddition spricht

Zur Analyse von Nahrungsmitteln werden eine Reihe von Methoden mit unterschiedlichen Analysen- und Aufarbeitungstechniken eingesetzt. Einige Beispiele mit gängigen Verfahren für Aufschluss und Aufarbeitung sind in Tabelle 35 aufgeführt. Zum Aufschluss wird dabei die saure oder enzymatische Hydrolyse genutzt: Eine saure Hydrolyse ist billiger und schneller, kann aber u.U. auch unerwünschte Reaktionen fördern; enzymatische Hydrolyse ist etwas schonender, aber vergleichsweise zeitaufwendig.

Tabelle 35: Beispiele für Isoflavon-Analysen in Nahrungsmittel mit unterschiedlichen Aufschlüssen und Analyseverfahren.

Literatur	Analyten	Nahrungsmittel	Aufschluss	Aufarbeitung	Detektion
Franke <i>et al.</i> 1995	Dai, Gen, Eq, Bio, For usw.	Sojaprodukte, Erbsen, Bohnen, Mungokeime usw.	saure Hydrolyse (HCl, direkte Injektion, EtOH), ultrabeschallt, Rückfluß 80 °C		HPLC-DAD
Franke <i>et al.</i> 1998	Dai, Gen, Gly (Glucoside; Manoylglucoside; Acetylglucoside)	versch. Soja-produkte	Ultraschall, mit 80 % MeOH rühren für Aglycon		HPLC-DAD
Mazur <i>et al.</i> 1996	Dai, Gen, Bio, For usw.	Sonnenblumenkerne, Leinsamen, Sojamehl usw.	enzym. Hydrolyse u. saure Hydrolyse	fl./fl. Etherex. u. SPE Extraktion	GC-MS TMS-ether
Mazur 1998	Dai, Gen	Hafer, Roggen, Mais, Weizen, Leinsamen, usw.	dreistufige Hydrolyse		GC-MS Isotopen-dilution
Murphy <i>et al.</i> 1999	Dai, Gen, Daidzin, Genistin	Sojamilch, Hamburger	leicht sauer/keine Hydrolyse	rühren mit Wasser/Acetonitril/ 0,1 N HCl	HPLC-UV

4.1.3 Daidzein und Genistein Analyse in Plasma aus Schweineblut

Für Phytoöstrogen-Analysen in Schweineblut wurden die Plasmaproben einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und die Isoflavon-Aglykone durch fl./fl. Extraktion mit Ethylacetat angereichert, ehe sie nach Derivatisierung mit MtBSTFA mittels GC-MS analysiert wurden. Durch das Matrixmaterial bedingte Probleme werden so weitgehend reduziert und erlauben den Einsatz einer Kalibriermethode. Die Methode wurde nach Prüfung relevanter Qualitätsparameter dann auf reale Proben angewendet.

Auf der Basis der Kalibrierdaten ließen sich gute Nachweisgrenzen für Daidzein (11 ng/mL) und Genistein (9 ng/mL) in Plasma berechnen. Sie liegen im Bereich anderer Methoden (siehe unten, Tabelle 36). Über die S/N = 3-Methode bestimmten Twaddle *et al.* (2002) etwas niedrigere Nachweisgrenzen, um 3 ng/mL Plasma für Daidzein, Equol und Genistein, bei Wiederfindungsraten von 88 bis 99 %. Bei unserer Methode lagen die Nachweisgrenzen durch die verwendete Berechnungstechnik etwas höher, und es wurden Wiederfindungsraten zwischen 72 und 121 % bestimmt. Letztere wird durch die Blindwertkorrektur im niedrigen Bereich erhöht, die wegen eines Isoflavon-haltigen „Referenz-Blutplasma“ (s.u.) nötig war. Hier kann künftig die Verwendung von isoflavonfreiem Plasma Verbesserungen bringen. In der Serie sind Variationen von 5-15 % bestimmt worden. Auf die Messungen der Variation zwischen den Serien wurde verzichtet wegen der geringen Anzahl zu messender Proben, die zudem sofort nach Kalibrierung und Proben für die Wiederfindungsraten gemessen wurden.

Ein Teil der Varianz der Wiederfindungsraten lässt sich durch den damals noch im Einsatz befindlichen „alten“ Autosampler Agilent 7683 erklären (gekoppelt mit dem im Splitless-Mode betriebenen CIS4). Die Anlage zeigte in dieser Kombination plötzliche Signalverluste, die aber nach der Anschaffung des neuen Autosamplers MPS2 nicht mehr auftraten. Die dennoch guten Nachweisgrenzen sind im Wesentlichen durch geringe Störsignale aus der Matrix und besonders stabile und schwere Isoflavon-Derivate zu erklären.

Die hier verwendeten deuterierten Standards erwiesen sich als gut geeignet; sie neigen aber je nach Umgebungsbedingung (sauer/alkalisch) mehr oder weniger stark zum Wasserstoff-Deuterium-Austausch. So wird ein Deuterium im D4-Genistein besonders leicht ausgetauscht, während die anderen Deuteronen extremere Bedingungen benötigen. Bei einer Methodenänderungen, insbesondere den pH-Wert der Probe während der Aufarbeitung betreffend (z.B. saure statt enzymatischer Hydrolyse), sollte die Stabilität der internen Standards daher überprüft werden.

Problematisch bei den Messungen war der im kommerziellen Plasma enthaltene Hintergrund an Isoflavonen. Er ist je nach Plasmacharge unterschiedlich und resultiert aus der Fütterung der Schweine, von denen das Plasma stammt. Um das „Referenz“-Plasma zur Kalibrierung einsetzen zu können, wurde nicht direkt der Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion zur Berechnung unbekannter Proben genutzt, sondern alle Werte wurden wegen des „Reagenzienleerwertes“ von ~70 ng/mL (Daidzein) und ~52 ng/mL (Genistein) über eine Verschiebung der Kalibrierfunktion um den Achsenabschnitt kalkuliert. Dies führt allerdings zu einer höheren Ergebnisunsicherheit besonders im niedrigen Konzentrationsbereich, da der wahre Achsenabschnitt unbekannt ist. Daher sollte, wenn geringe Mengen Daidzein oder Genistein im Blut nachgewiesen werden müssen, ein möglichst isoflavonfreies Blutplasma zur Kalibrierung verwendet werden.

4.1.4 *BPA, Daidzein, Equol und Genistein Analyse in Urinen*

Zur Entwicklung einer Methode zur simultanen Analyse von BPA, Daidzein, Equol und Genistein in geringen Volumina von Urinproben wurden Teile verschiedener, bereits publizierter Methoden getestet. Letztlich führten diverse Vortests und Optimierungen (siehe 3.1.4.) zu der in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Methode auf der Basis einer enzymatischen Hydrolyse und Festphasenextraktion, gefolgt von einer Derivatisierung mit MtBSTFA für die GC-MS Analyse. Tabelle 36 ordnet die Methode anhand der erfassten Qualitätsparameter in die Literatur ein. Da es, abgesehen von erst kürzlich entwickelten LC-MS Methoden, für die

simultane Bestimmung von BPA, Equol, Daidzein und Genistein mittels GC-MS keinen direkten Vergleich gibt, wird im folgenden ein Literatur-Vergleich für Isoflavon-Analysen vorgenommen. Eine entsprechende Einordnung unserer Methode für BPA Analysen in Urin erfolgte bereits im Abschnitt 4.1.1. (Tabelle 34).

Tabelle 36: Vergleich von Methoden zur Analyse von Isoflavonen in komplexen Matrices anhand von Qualitätsparametern. Grau: Daten der vorliegenden Arbeit. (iS = in der Serie; zS = zwischen den Serien)

Literatur	Analyten	Derivattyp	Technik	Matrix	NG, ng/g	Lin. Bereich, ng/g bzw. mL	WR, %	Variation (iS, zS), %	IS	
Adlercreutz <i>et al.</i> 1995a	Genistein	TMS-ether	GC-MS, EI, Isotopendilution	Faezes	2,7-10,8		93-96	10 (iS), 25 (zS)	D4-Genistein	
	Daidzein	TMS-ether		Faezes	2,5-10,1		85-99	6 (iS), 9 (zS)	D4-Daidzein	
	Equol	TMS-ether		Faezes	2,4-9,7		80-90	10 (iS), 12 (zS)	D4-Equol	
Colnot 2001	Daidzein	TMS-ether	GC-MS, EI, fl./fl. SPE	Plasma	7,6				BPA	
	Daidzein	underivatisiert	HPLC-UV, verdünnt direkt aufgegeben	Urin	127,1	NG-10000			Flavon	
Degen <i>et al.</i> 2002a	Genistein	underivatisiert	Mikro HPLC-UV verdünnt eingespritzt	Futter	10	10-5000			Biochanin A	
	Daidzein	underivatisiert		Futter	10	10-5000			Biochanin A	
Grace <i>et al.</i> 2003	Genistein	TMS-ether	GC-MS, EI, SPE	Urin	1,3 [§]	NG-2000	91-100	4 (iS), 6 (zS)	¹³ C ₃ -Genistein	
	Daidzein	TMS-ether		Urin	1,3 [§]	NG-2000	99-101	4 (iS), 4 (zS)	¹³ C ₃ -Daidzein	
	Equol	TMS-ether		Urin	1,3 [§]	NG-2000	94	2 (iS), 6(zS)	¹³ C ₃ -Equol	
Kuklennyk <i>et al.</i> 2004	Genistein	underivatisiert	LC-MS, online-SPE, {manuelle SPE}	Urin	0,5 {0,8}	--	99-122 {95-112}	5 {8-11}	D4-Genistein	
	Daidzein			Urin	0,4 {1,6}		101-111 {98-121}	4-5 {7-11}	D3-Daidzein	
	Equol			Urin	0,3 {3,3}		93-115 {97-108}	7-10 {17-23}	D4-Equol	
Moors (diese Arbeit)	Genistein	tBDMS-ether	GC-MS, EI, CIS, SPE	Urin	5	5-250	105-126	7(iS), 18 (zS)	D4-Genistein	
	Daidzein	tBDMS-ether		Urin	4	4-250	104-127	6(iS), 9 (zS)	D3-Daidzein	
	Equol	tBDMS-ether		Urin	4	4-250	90-112	8(iS), 15 (zS)	¹³ C ₁₂ -BPA	
Morton <i>et al.</i> 2002	Genistein	TMS-ether	GC-MS, EI, fl./fl.	Serum	0,1				D4-Genistein	
	Daidzein	TMS-ether		Serum	0,1				D4-Daidzein	
	Equol	TMS-ether		Serum	0,1				D4-Equol	
Tekel <i>et al.</i> 1999	Genistein	TMS-ether	GC-MS, EI, Tandem SPE	Urin	2,2 [#]	2-25	76-90	8-22% (iS)	⁶ -Hydroxyflavon	
	Daidzein	TMS-ether		Urin	2,3 [#]	2-25	77-89	6-17% (iS)	⁶ -Hydroxyflavon	
Twaddle <i>et al.</i> 2002	Genistein	underivatisiert	LC-MS/MS,ESI	Plasma	2,7		88-96	3-8 (zS)	D4-Genistein	
	Daidzein	underivatisiert		verd. mit ACN, SPE	Plasma	2,5		88-90	3-11 (zS)	D3-Daidzein
	Equol	underivatisiert			Plasma	2,4		97-99	4-13 (zS)	D4-Equol

§ berechnet aus der kleinsten sichtbaren Konzentration (abgeschätzt aus niedriger Kalibrierung)

Gibt pauschal 10 ng/mL als zutreffender an.

Für die Analyten Daidzein, Equol und Genistein und aufgrund der Matrix Urin, ist primär ein Vergleich mit Arbeiten von Grace *et al.* (2003), Kuklennyk *et al.* (2004) oder Tekel *et al.* (1999) von Interesse: Während Kuklennyk *et al.* (2004) eine LC-MS Technik verwenden, setzen die beiden anderen Gruppen die GC-MS Analyse ein, aber andere Derivattypen und andere interne Standards als die hier entwickelte Methode. Die in dieser Arbeit nach DIN 32645 berechneten Nachweisgrenzen zeigen eine gute Übereinstimmung mit denen von Tekel *et al.* (1999); bessere Nachweisgrenzen berichten Grace *et al.* (2003), schätzen diese aber aus der kleinsten noch sichtbaren Konzentration ab. Die Präzisionen in der Serie liegen in ähnlichen Bereichen; die Methode von Grace schneidet aufgrund der stabileren ¹³C-Standards bei den Präzisionen zwischen den Serien aber besser ab. Diese und andere Gruppen setzen als Derivatisierungsreagenz BSTFA mit 1% TMCS ein: Es führte in unseren Vortests ebenfalls zu brauchbaren Ergebnissen, hatte aber nicht die hohe Verlässlichkeit wie das hier verwendete MtBSTFA. Deutlich unempfindlicher ist die Methode von Colnot (2001) zur Daidzein Analyse in Urin mittels HPLC-UV, die allerdings auf jegliche Probenvorbereitung verzichtet. Seine GC-MS Methode für Daidzein Analysen in Plasma erreicht aber ähnliche Nachweisgrenzen wie die in dieser Arbeit entwickelte Methode oder andere Methoden zur Isoflavon-Analyse in dieser Matrix.

Für Matrices wie Blutplasma oder Faeces entwickelte Methoden (Tabelle 36) sind hier nur zur Orientierung aufgeführt. Adlercreutz *et al.* (1995a) berichten ähnliche Nachweisgrenzen und Präzisionen zwischen den Serien wie die vorliegende Methode. Eine fl./fl. Extraktion wie bei Morton *et al.* (2002) ist trotz der geringen Nachweisgrenzen aufgrund des hohen Zeitaufwands und der schlechten Automatisierbarkeit ungünstig für die Routine (hohe Probenzahlen); weitere Qualitätsparameter waren dort nicht angegeben. Für die Routine besser geeignet ist die für Plasmaproben validierte LC-MS/MS Methode von Twaddle *et al.* (2002).

Insgesamt kann man sagen, dass sich die neue Methode zur Isoflavon- und BPA Analyse in Urin mit ihren Kenngrößen gut in die Literatur einordnen lässt und gegenüber anderen GC-MS Methoden einige Verbesserungen bringt. Da unsere Methode konsequent auf hohen Probendurchsatz bei niedrigem Arbeitsaufwand ausgelegt ist, lässt sich, mit einem Arbeitsaufwand von 3-4 Stunden für die Vorbereitung, eine GC-MS-Anlage mit Autosampler für 24h voll auslasten (3 Messungen pro Stunde). Der Zeitaufwand anderer Methoden ließ sich aus der Literatur leider nicht immer exakt abschätzen; doch sind mehrfache SPE-Schritte oder das Eintrocknen von Extrakten am Rotationsverdampfer klare Hinweise auf eine zeitintensive Aufarbeitung. Den Bedarf an zeiteffizienten Methoden für die Analyse von Umwelt-

östrogenen dokumentieren auch Arbeiten wie die von Kuklenyik *et al.* (2004) und Ye *et al.* (2005a,b) zur Entwicklung einer online-SPE in Verbindung mit LC-MS Techniken.

Nachfolgend werden noch einige technische Aspekte unserer GC-MS Methode diskutiert: Sie setzt zur Analyttrennung eine DB-1-ms Säule von J&W ein, die sowohl TMS-ether als auch tBDMS-ether schnell und zuverlässig trennt. Das Säulentemperaturprogramm ist mit der Gesamtlaufzeit von unter 20 min (inklusive Abkühlzeit) bereits hinsichtlich Geschwindigkeit optimiert. Eine weitere Beschleunigung wäre nur noch im isothermen Betrieb möglich, führt aber zu einer unzureichenden Signaltrennung. Die am weitesten verbreitete DB-5-ms Säule wurde auch getestet, ist aber wegen längerer Verweildauer der Substanzen auf der Säule für eine große Probenzahl nicht so günstig.

Zur Aufkonzentration und Aufreinigung kommen verschiedene Techniken zum Einsatz, wie z.B. SPE (s.u.). Eine Methode zur Verbesserung der Empfindlichkeit ist die Injektion großer Probenvolumina. Dazu werden Kaltaufgabesysteme, die selektiv das Lösungsmittel verdampfen bevor die Probe auf die Chromatographische Säule überführt wird, eingesetzt. Selbst aus einer geringen Menge Probe kann so im Solvent Vent Betrieb sehr viel Analyt auf die Säule gebracht werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete CIS4 System der Firma Gerstel zeigte eine sehr gute Reproduzierbarkeit sowie eine einfache Wartung. Eine gute Reproduzierbarkeit wurde aber erst in Verbindung mit dem MPS2 Autosampler der Firma Gerstel erreicht, während sich beim Autosampler von Agilent (ist nicht optimal für den Betrieb mit dem Kaltaufgabesystem ausgelegt), Reproduzierbarkeitsprobleme zeigten. Nachdem der Autosampler durch den besser geeigneten Autosampler MPS2 ausgetauscht war, wurde nach dem Optimum aus Trockenzeit/Aufheizzeit, Aufgabetemperatur/Aufgabegeschwindigkeit/Trockengasstrom und Linerart gesucht. Für „schwere“ tBDMS Derivate konnten so stabile, reproduzierbare Ergebnisse mit sehr guten Nachweisgrenzen zur Ermittlung geringer Isoflavongehalte in Urinen erreicht werden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen und einer Validierung der Methode war es aber notwendig, einen praktisch isoflavon-freien Referenzurin zu generieren, denn Humanurin enthält bei üblicher westlicher Ernährung immer deutlich detektierbare Isoflavonkonzentrationen (vgl. 3.2.3).

Da das Probenvolumen auf 200 µL festgelegt war, wurde eine spezielle SPE-Kartusche (3M Empore Disk mit geringem Packungsvolumen und einer Maximalkapazität von 300 µL) zur Vorreinigung und Extraktion eingesetzt. Ein Nachteil sind relativ hohe Kosten für diese SPE Kartuschen mit dem geringem Totvolumen. Ein Vorteil ist aber das geringe Elutionsvolumen, was bei geeigneter Verdünnung zukünftig eine direkte Kopplung ohne Aufkonzentration an eine Flüssigkeitschromatographie ermöglichen kann (siehe Kapitel 5).

Als interne Standards kamen gut geeignete, kommerziell verfügbare Verbindungen zum Einsatz, zur Analyse der Isoflavone also (3',5',8-D3)-Daidzein und (3',5',6,8-D4)-Genistein. Ein Ersatz von drei bzw. vier Protonen durch Deuteronen geschieht durch Umsetzung der nicht deuterierten Verbindung mit NaOD. Allerdings können diese Standards ihre Deuteronen wieder gegen Protonen tauschen: Auf ein Deuteron im D4-Genistein trifft dies besonders zu (wohl in 6 Position; siehe Abbildung 6) und führt dazu, dass D4-Genistein als intensivstes Signal $m/z = 558$ (und nicht wie erwartet $m/z = 559$) zeigt. In Anbetracht der Möglichkeit, der interne Standard könne einen signifikanten Beitrag zur gemessenen Isoflavonmenge durch Substitution aller Deuteronen leisten, wurde immer ein „Nullwert“ bestehend aus Referenzurin, der nur den internen Standard enthält, mitgeführt. Dabei zeigte sich, dass keine signifikante Änderung des $m/z = 555$ oder $m/z = 425$ Signals (Signale der nicht deuterierten Verbindungen Daidzein und Genistein) im Vergleich zum Reagenzienleerwert auftritt. Zusätzlich wurden Tests durchgeführt, um zu bestimmen inwieweit sich die Substitution in Abhängigkeit vom pH-Wert verändert. Dies geschieht z.B. unter stark sauren oder stark alkalischen Bedingungen, wo sich die Signalintensität hin zu den nicht deuterierten Verbindungen verändert. Beim Einsatz eines gepufferten Systems konnte jedoch die Stabilität des „Fragmentierungsschemas“ über eine Reihe von Proben gezeigt werden. Dennoch wären (kommerziell verfügbare) ^{13}C -Standards wünschenswert, die diese Probleme ganz umgehen. Für Equol konnte kein chemisch identischer Standard erworben und eingesetzt werden. Daher wurden in einigen Vorversuchen Equol-Messungen mit den deuterierten Verbindungen D3-Daidzein und D4-Genistein korrigiert. Dabei wurde aber deutlich, dass sie als interne Standards für Equol weniger gut geeignet sind als das ebenfalls mitgeführte $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA. Deshalb wurde die Korrektur von Equol dann mit $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA durchgeführt. Auch hier wäre, insbesondere im Hinblick auf noch bessere Präzisionen zwischen den Serien, ein Wechsel zu einem ^{13}C -Equol-Standard sicher günstig. Seit einiger Zeit werden ^{13}C -Equol und Isoflavon-Standards durch Nigel Botting an der St. Andrews Universität in Schottland synthetisiert; sie sind aber bislang nicht kommerziell verfügbar.

Anzumerken bleibt noch, dass sich während der Messung sehr hoch konzentrierter Proben Verschleppungen der Isoflavone zeigten, was auf die Solvent Vent Technik zurückzuführen ist. Erst nachdem der Liner in einem zusätzlichen Ausheizschritt auf 400 °C erhitzt und mit 200 mL/min Helium gespült wurde, ließen sich diese Signale verringern. Hier könnten durch ein pyrolysefähiges Kaltaufgabesystem (600 °C Ausheizschritt) Verschleppungen vollständig beseitigt werden und so „Zwischenspülschritte“ bei der Routinemessung eingespart werden.

4.2 Analysenbefunde im toxikologischen Kontext

Durch die Anwendung der vorgestellten Analysemethoden erhaltene neue toxikologische Daten sind in wesentlichen Teilen inzwischen auch als Originalarbeiten publiziert bzw. zur Publikation eingereicht worden (siehe Seite I). Im Folgenden werden die Befunde daher mit Verweis auf die entsprechende Publikation diskutiert.

4.2.1 *Toxikokinetik und transplazentarer Transfer von BPA bei DA/Han Ratten* [Moors et al. 2006]

In der „Scientific Community“ bestehende Bedenken über hormonell aktive Chemikalien richten sich vor allem auf Expositionen während früher, empfindlicher Entwicklungsstadien. Das Beispiel Diethylstilbestrol zeigt eindrücklich, dass der Fötus während der Entwicklung empfindlich auf östrogene Substanzen reagiert [Newbold 1995, NRC 1999, Vandenberg 2004]. Aufgrund seiner weiten Verbreitung (siehe Kapitel 1.3.) ist der Übergang einer östrogenartig wirkenden Chemikalie wie BPA von der Mutter zum Fötus von grundsätzlichem Interesse, auch wenn eine daraus resultierende Entwicklungstoxizität meist nur nach sehr hohen Dosen dokumentiert ist [Kim *et al.* 2001, Tyl *et al.* 2002].

Um den Übergang vom Muttertier zum Fötus und die Gewebeverteilung der bevorzugt fettlöslichen Substanz BPA zu untersuchen, wurde im Tierversuch BPA intravenös (*i.v.*) an trächtige DA/Han Ratten verabreicht. Dabei ist eine Kernfrage, ob evt. lokal hohe Konzentrationen in Zielgeweben erreicht werden. Die Studie folgte dabei dem Versuchsdesign von Degen *et al.* (2002b) für Daidzein. Die BPA Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma und Geweben werden nachfolgend diskutiert und die ermittelten kinetischen Daten mit denen anderer Studien verglichen (Tabelle 37 bis Tabelle 39).

Tabelle 37: Vergleich von Studien zur Verteilung von BPA in trächtigen Ratten verschiedener Stämme nach *i.v.* und *per os* Applikation unterschiedlicher BPA-Dosen.

Rattenstamm	Applikation und Dosis, mg/kg KG	GD	t _{1/2} , h	Plasmakonz. im Muttertier, ng/mL		Konzentration im Fötengewebe, ng/g		Konzentration in der Plazenta, ng/g		Literatur
				Gesamt	Aglycon	Gesamt	Aglycon	Gesamt	Aglycon	
DA/Han	10 <i>i.v.</i>	18	0,52	≈3800 bei 5 min	2950 900	3500 bei 10-20 min		≈ 4000 bei 30 min		Moors <i>et al.</i> 2006 (diese Arbeit)
SD	2 <i>i.v.</i>	17 - 19	0,60		927		794		1399	Shin <i>et al.</i> 2002
SD	10 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	16		1763 bei 15 min	64	31 bei 15 min	18	342 bei 15 min	95	Domoradzki <i>et al.</i> 2003
F344	0,5 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	18			31	< NG			9,9	Kurebayashi <i>et al.</i> 2004
Wistar	10 <i>p.o.</i>	19			34		11	--		Miyakoda <i>et al.</i> 1999
F344	1000 <i>p.o.</i>	18			14700		9220	--		Takahashi and Oishi 2000

Die aufgeführten Zeiten entsprechen den C_{max}-Zeiten.
GD: Schwangerschaftstag (gestational day)

Am ähnlichsten im Design ist die Studie von Shin *et al.* (2002), in der 2 mg/kg KG *i.v.* an SD Ratten verabreicht wurde. Im Vergleich zu den DA/Han Ratten unserer Studie (höhere BPA Dosis) zeigen die SD Ratten dann auch initial etwa drei- bis viermal niedrigere Plasmakonzentrationen. Ebenso wie Shin *et al.* (2002) wurden in unserer Arbeit höhere Konzentrationen in der Plazenta als im Blutplasma bestimmt. Eine solche Verteilung zwischen Blut und Gewebe ist für die lipophile Substanz BPA nicht überraschend. Der *in vivo* Befund steht in Einklang mit *in vitro* Daten von Csanady *et al.* (2002), die folgende Verteilungskoeffizienten ermittelten: 1,46 für Leber:Blut, 1,35 für Niere:Blut und 1,43 für Plazenta:Blut. Anzumerken ist noch, daß in Shin's Versuch die Ratten anästhesiert waren; etwas längere Halbwertszeiten können daher mit verringerter Kreislaufaktivität erklärt werden.

Nach *i.v.* Injektion verteilt sich BPA sehr schnell im Organismus (anhand der C_{max}-Zeiten zu erkennen), und ein Teil der Dosis erreicht über die Plazenta auch den Fötus. Die zwischen 5 min und 6 h ermittelten Konzentrationen im Föten sind ähnlich hoch wie in der Plazenta (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38). Man erkennt also einen Transfer vom Muttertier zum Föten ohne eine massgebliche Verringerung durch die Plazenta (von einigen Gruppen als Plazentabariere bezeichnet [Miyakoda *et al.* 1999]). Eine Differenzierung der Form, in der

BPA in den Föten gelangt, ist nicht trivial, denn etliche Gewebe, u.a. Plazenta, enthalten Glucuronidaseaktivität [Domoradzki *et al.* 2003]. So könnte anflutendes BPA-Glucuronid dort ins Aglykon gespalten werden oder, wie von Kurebayashi *et al.* (2004) vermutet, als Konjugat aufgenommen werden. In unseren Gewebeanalysen erfolgte kein Versuch der Unterscheidung, weil bei der Aufarbeitung (Gewebehomogenisation und Gewebeaufschluss) Hydrolasen freigesetzt werden und ein Messergebnis zum Konjugat/Aglykon Verhältnis beeinflussen können [Degen *et al.* 2002b].

Die Konzentrations-Zeit-Profile in Plasma (Abbildung 33) sowie maternaler Gewebe (Leber und Niere, Abbildung 36) weisen auf eine starke hepatische Extraktion und renale Ausscheidung von BPA aus dem Blutkreislauf hin. Dies zeigen auch andere Studien, die zwar in anderen Ratten-Stämmen und mit *per os* Applikation durchgeführt wurden, aber wie die vorliegende Arbeit deutlich geringere Anteile von BPA in Uterus, Plazenta oder Fötus finden als in mütterlichen Geweben [Domoradzki *et al.* 2003, Miyakoda *et al.* 1999]. Kurebayashi *et al.* (2004) fand nach *p.o.* Gabe von 0,5 mg/kg KG ¹⁴C-BPA an F344 Ratten am Tag 18 der Trächtigkeit zwar noch geringe Werte an BPA-Aglycon in der Plazenta, konnte aber keine Substanz mehr im Föten nachweisen. Diese und weitere Befunde (Tabelle 37) sprechen für eine sehr begrenzte Bioverfügbarkeit von BPA nach oraler Applikation.

Hohe BPA Konzentrationen im Plasma der Muttertiere und Föten fanden Takahashi and Oishi (2000), die allerdings auch 1 g/kg KG *p.o.* als Bolus an F344 Ratten verabreichten, also eine Dosis, die einem Drittel der LD₅₀ entspricht. Die Plasmaspiegel erreichten nach 20 min zunächst ein Maximum, fielen dann schnell ab; vergleichsweise lange Verweilzeit von BPA in den Föten dürfte wohl auf Nachresorption von BPA infolge der hohen Dosis zurückzuführen sein. Andere Gruppen konnten dagegen nach der Gabe an trächtige Ratten nur geringe Anteile des *p.o.* applizierten BPA in der hormonell aktiven Form (Aglykon) im Plasma oder Gewebe feststellen [Domoradzki *et al.* 2003, Miyakoda *et al.* 1999, Kurebayashi *et al.* 2004].

Wie erwartet hat der Applikationspfad grossen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von BPA (Aglycon): Bei *p.o.* Gabe ist sie deutlicher geringer als beispielsweise nach *i.p.* oder *i.v.* Applikation, da bereits im gastrointestinalen Trakt eine Glucuronidierung stattfinden kann. Tabelle 38 vergleicht toxikokinetische Parameter und BPA-Aglycon Konzentrationen im Plasma von nicht schwangeren Ratten in Abhängigkeit von Dosis und Applikationspfad.

Tabelle 38: Vergleich der toxikokinetischen Parameter von BPA in nicht trächtigen Ratten verschiedener Stämme und für unterschiedliche Applikationsarten und Dosen.

Rattenstamm	Applikation und Dosis, mg/kg KG	Geschlecht	t _{1/2} , h	C _{max} , ng/mL		t _{max} , min		AUC, µgh/mL		Literatur
				Gesamt	Aglycon	Gesamt	Aglycon	Gesamt	Aglycon	
DA/Han	10 i.v. 10 p.o. 100 p.o.	♀	38,5		~15000 ~30 ~150	1 90 30				Upmeier et al. 2000
F344	10 i.p. 100 i.p. 10 s.c. 100 s.c. 10 p.o. 100 p.o.	♀ ¹⁴ C-BPA		2270 67810 520 5660 1820 28330	870 13130 340 3970 40 2290	15 30 45 45 5 15	15 15 45 45 15 15	15,3 247 21,6 297 9,54 94,9	1,4 26,2 3,1 31,5 0,4 4,4	Pottenger et al. 2000
SD	0,2 i.v. 0,5 i.v. 1 i.v. 2 i.v.	♂	0,8 1 0,7 0,6		102,6* 216,4* 407,2* 854,4*				37,7 83,1 161,6 303,0	Yoo et al. 2000
Wistar	100 p.o.	♂	16,5		3980					Xiao et al. 2006

* Extrapoliert auf null (um C_{max} am Nullpunkt bei i.v. zu bestimmen)

Kurz nach *i.v.* Applikation ist die zirkulierende BPA Aglycon Konzentration deutlich größer als nach der *p.o.* Applikation vergleichbarer Dosen [Upmeier et al. 2000]. Zudem nehmen die Blutspiegel bei *p.o.* Gabe verschiedener Dosen nicht immer im gleichen Mass zu. Vergleicht man die Applikationspfade untereinander, so ist deutlich mehr BPA systemisch verfügbar, wenn *i.v.*, *i.p.* oder *s.c.* appliziert wird als nach *per os* Gabe ([Pottenger et al. 2000] und Tabelle 38, letzte Spalte).

Wie eingangs dargestellt (1.3.2.), ist der Hauptweg der BPA Metabolisierung die Konjugation mit Glucuronsäure [Snyder et al. 2000, Inoue et al. 2005]. Auch nach *i.v.* Applikation an trächtige Ratten war schon nach kurzer Zeit ein großer Teil des BPA zum hormonell inaktiven Konjugat metabolisiert (Abbildung 34). Das spricht für eine schnelle Inaktivierung von BPA im maternalen Organismus. Im Prinzip mit BPA vergleichbare Befunde liegen zur Kinetik von Daidzein [Degen et al. 2002b] und Genistein [Doerge et al. 2001] in trächtigen Ratten vor. In welchen Anteilen Aglykon und Konjugate im Föten vorliegen, ist nur für Genistein genauer bekannt: Fötale Serum enthielt etwa 20-fach geringere Genistein Gesamt-Konzentrationen als maternales Serum, doch die Konzentrationen des biologisch aktiveren Aglykon lagen im Föten nur 5-fach unten denen der Muttertiere [Doerge et al. 2001]. Das steht in Einklang mit einer deutlich geringeren

Konjugationskapazität in Föten als in adulten Tieren [Coughthie *et al.* 1988, Lucier *et al.* 1977, Matsumoto *et al.* 2002]. Beim Neugeborenen (Nager oder Mensch) ist der Phase-II Metabolismus noch nicht so weit entwickelt wie im adulten Organismus, und östrogene Umweltstoffe können daher möglicherweise weniger effizient inaktiviert werden.

Da auch in der Schwangerschaft u.U. mit Änderungen in kinetischen Parametern zu rechnen ist, interessiert ein Vergleich von Studien an nicht trächtigen Ratten und trächtigen Ratten. In Tabelle 39 sind für BPA verfügbare Daten zusammengestellt.

Tabelle 39: Vergleich toxikokinetischer Parameter von BPA in trächtigen und nicht trächtigen Ratten³.

Rattenstamm	Applikation und Dosis, mg/kg KG	GD	t _{1/2} , h	Plasmakonz. im Muttertier, ng/mL		Literatur
				Gesamt	Aglycon	
DA/ Han	10 <i>i.v.</i>	18	0,52 initial	≈3800 bei 5 min	2950	Moors <i>et al.</i> 2006 (diese Arbeit)
DA/ Han	10 <i>i.v.</i>	n.t.	38,5 terminal	bei 1 min	~15000	Upmeier <i>et al.</i> 2000
SD	10 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	16	-	1763 bei 15 min	64	Domoradzki <i>et al.</i> (2003)
SD	10 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	n.t.	-	716 bei 15 min		
F344	0,5 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	18	-	bei 30 min	31	Kurebayashi <i>et al.</i> 2004
F344	0,1 <i>p.o.</i> (¹⁴ C-BPA)	n.t.	18	5,8 bei 30 min		

GD: Schwangerschaftstag; n.t.: nicht trächtig

Domoradzki *et al.* (2003) verabreichten 10 mg/kg KG ¹⁴C-BPA *via* Schlundsonde an trächtige und nicht trächtige SD Ratten: Sie fanden etwas unterschiedliche Verteilungen von BPA in Geweben trächtiger und nicht trächtiger Ratten, doch durchaus vergleichbare Konzentrations-Zeit-Profile für BPA und BPA-Glucuronid im Blut der Tiere. Unter Berücksichtigung der inter-individuellen Variabilität in beiden Gruppen, zeigten die kinetischen Parameter von trächtigen und nicht trächtigen Tieren gute Übereinstimmungen. Die Studie von Kurebayashi *et al.* (2004) gestattet wegen unterschiedlicher Dosen und Parameter (Gesamt BPA bzw. Aglycon) keinen Vergleich der beiden Gruppen.

³ Zu Tabelle 39 ist noch angemerkt, daß die initial höheren Plasmaspiegel in nicht trächtigen Tieren auf den früheren Messzeitpunkt (1 statt 5 min) nach *i.v.* Injektion zurückgehen und die Unterschiede in der Halbwertszeit darauf beruhen, dass verschiedene Phasen der Elimination von BPA (initial bzw. terminal) berechnet worden sind.

Vorliegende Studien an einem anderen Rattenstamm (DA/Han) und mit anderer Applikationsart (*i.v.* statt *p.o.*), kommen zu ähnlichen Schlussfolgerungen wie die Studie von Domoradzki *et al.* (2003): Der Plasma-Konzentrations-Zeitverlauf nach *i.v.* Injektion an trächtige DA/Han Ratten zeigte grosse Ähnlichkeit mit dem in nicht trächtigen Tieren (siehe Abbildung 33 und Fig.1 in Upmeier *et al.* 2000). Dies wurde auch in umfangreichen statistischen Vergleichen und Modellierungen bestätigt, die keine besonderen Abweichungen zu höheren oder niedrigeren Werten im Plasma dieser beiden Gruppen fanden [Selinski and Degen, 2004].

Bei der Ratte wird BPA-Glucuronid über die Galle in den Darm ausgeschieden, wo durch bakterielle Dekonjugation die Spaltung zum Aglycon und eine Rückresorption stattfinden können. Upmeier *et al.* (2000) fanden bei nicht trächtigen Ratten, denen 100 mg/kg KG *p.o.* appliziert wurde, den für eine enterohepatische Rezirkulation typischen zweiten Anstieg in der BPA-Plasma-Konzentration nach circa 6 h. Unser Experiment zum transplazentaren Transfer war zwar nicht für den Nachweis einer enterohepatischen Rezirkulation ausgelegt, doch der leichte Wiederanstieg der Konzentrationen im Plasma 6 h nach Applikation könnte darauf zurückzuführen sein.

BPA-Glucuronid wird, aufgrund der je nach Tierart unterschiedlichen Molmassengrenze (siehe Kapitel 1.2), beim Nager primär über die Galle ausgeschieden, während Mensch und Affen es überwiegend renal ausscheiden. In Ratten spielt enterohepatische Rezirkulation daher eine grössere Rolle als in den beiden anderen Spezies. Daraus resultieren auch unterschiedlich lange Verweilzeiten des BPA (terminale Halbwertszeit), wie ein Spezies-übergreifender Vergleich der toxikokinetischen Parameter zeigt (siehe Tabelle 40).

Tabelle 40: Toxikokinetische Parameter für BPA in verschiedenen Spezies.

Spezies	Applikation und Dosis, mg/kg KG	t _{1/2} ,h (terminal) für Gesamt BPA	C _{max} , ng/mL Gesamt BPA	t _{max} , min	AUC, ng h/mL	Literatur
F344 Ratten	0,1 i.v. 0,1 p.o. (¹⁴ C BPA)	39,5 44,5	5,5	23	118 (0-48h) 102	Kurebayashi <i>et al.</i> 2003
F344 Ratten	10 s.c. 100 s.c. 100 p.o.		872 3439 580	60 60 30	3377 (0-24h) 23001 1350	Negishi <i>et al.</i> 2004b
Cynomolgus Affen	10 s.c. 100 s.c. 10 p.o. 100 p.o.		57934 10851 2793 5732	120 120 30 42	39040 (0-24h) 189627 3247 52595	s.o.
Cynomolgus Affen	0,1 i.v. 10 p.o. (¹⁴ C BPA)	13,5 (♂); 14,7 (♀) 9,6 (♂); 9,8 (♀)	104 bzw. 107	30	377 bzw. 382 265 bzw. 244	Kurebayashi <i>et al.</i> 2002
Mensch	0,07 p.o. (d ₁₆ BPA)	3,4	~180	80	-	Völkel <i>et al.</i> 2002

Zusammenfassend zeigen die Vergleiche, dass durchaus deutliche Unterschiede in der Kinetik von BPA zwischen verschiedenen Spezies und Applikationspfaden auftreten. Zudem kann der Entwicklungsgrad eines Organismus (fötal, neugeboren, adult) eine unterschiedlich effiziente Metabolisierung bedingen. Demgegenüber hat der Zustand der Trächtigkeit, zumindest bei Ratten, keine deutlich messbaren Unterschieden in der Metabolisierung von BPA bewirkt [Domoradzki *et al.* 2003, Moors *et al.* 2006, Upmeier *et al.* 2000]. Das zeigten auch Tierversuche mit dem Phytoöstrogen Daidzein (s.u.).

Das Experiment zur Untersuchung des transplazentaren Transfers von BPA in DA/Han Ratten war Teil eines Forschungsverbundes, der sich die Aufgabe gestellt hatte, die Toxikokinetik und Toxikodynamik von ausgewählten hormonell aktiven Chemikalien zu charakterisieren [Degen and Bolt 2001]. In dem Rahmen ist auch die Toxikokinetik von Daidzein in nicht trächtigen und in trächtigen DA/Han Ratten untersucht worden [Janning *et al.* 2000, Degen *et al.* 2002b]. Auch hier zeigten die Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe beider Gruppen keine relevanten Abweichungen voneinander. Weitere umfangreiche statistische Vergleiche der Verteilung des Isoflavons Daidzein in trächtigen und nicht trächtigen DA/Han Ratten mit dem Xenooöstrogen BPA zeigten ebenfalls keine auffälligen Unterschiede [Selinski and Degen 2003, Selinski and Degen 2004]. Beide Substanzen, werden rasch und in erheblichen Anteilen glucuronidiert: So liegt in trächtigen DA/Han Ratten nach 2 h 60 % und nach 6 h 90 % des BPA konjugiert vor; etwas schneller verläuft die

Glucuronidierung von Daidzein, hier liegen nach 40 min bereits 70 % konjugiert vor (jeweils nach i.v. Injektion von 10 mg/kg KG). Dennoch ist sowohl für BPA (Tabelle 37) wie auch Daidzein [Degen *et al.* 2002b] und Genistein [Doerge *et al.* 2001] ein transplazentarer Transfer, wenn auch quantitativ geringer Anteile der an trächtige Ratten verabreichten Dosis, nachgewiesen worden.

4.2.2 *Phytoöstrogenexposition bei Schweinen* [Kuhn *et al.* 2004]

In der Nahrungsmittel produzierenden Industrie spielen das Wachstum und die Fleischentwicklung von Schlachttieren eine besonders große Rolle. Dabei können Substanzen, die eine östrogene Wirkung haben, zu veränderten Wachstumscharakteristika führen. Basis für sehr viele Mastfutter ist Soja, das (wie eingangs in Kapitel 1.4. erläutert) die östrogenartig wirkenden Isoflavone Daidzein und Genistein in relativ hoher Menge enthält. Am FBN (Forschungsinstitut für die Biologie der Nutztiere) sollten mögliche Effekte der Isoflavone im Futtermittel auf Mastschweine untersucht werden; unsere Aufgabe am *IfADo* war es, die Isoflavongehalte in den Futtermitteln und Blutproben der Tiere zu analysieren, also die Ermittlung der äußeren und inneren Exposition [Kuhn *et al.* 2004].

Zur Analyse der Futtermittelproben kam die unter Kapitel 2.6.1. beschriebene Methode der Mikro-HPLC-UV als Standardadditionsvariante zum Einsatz. Ein Vergleich der in den fertigen Futterrationen gemessenen Gehalte zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den vorab auf Basis der Soja-Zusätze kalkulierten Isoflavon-Gehalten (siehe Tabelle 32). Die für das im Versuch eingesetzte Soybeanmeal gemessenen Daidzein- und Genistein-Werte liegen dabei im typischen Bereich von Sojaprodukten (siehe Venus Datenbank oder Tabelle 3), während die Gehalte in Futter auf SPC Basis (Ethanol-extrahiertem Sojaproteinkonzentrat) nahe der Nachweisgrenze bzw. darunter liegen.

Um zu belegen, dass die verfütterten Isoflavone bioverfügbar waren, wurden von den Tieren der Kontroll- und der Versuchsgruppe am Schlachttag (Tag 166) Blutproben asserviert, und im Plasma (mit der in Kapitel 2.6.2. beschriebenen Methode) die Isoflavonkonzentrationen analysiert. Tabelle 41 zeigt die ermittelten mittleren Plasmakonzentrationen nach isoflavon- armer und isoflavonreicher Fütterung. Am FBN wurden darüberhinaus weitere Parameter, wie Futterkonsum, Gewichtszunahme, die Zusammensetzung von Muskelfleisch und die mRNA Expression ausgewählter Gene erfasst, die aber alle keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufwiesen [Kuhn *et al.* 2004]. Gerade deshalb war es wichtig, die zirkulierenden Isoflavonkonzentrationen im Versuch zu dokumentieren.

Tabelle 41: Mittlere Daidzein und Genistein Plasmakonzentrationen nach Fütterung isoflavonarmer und isoflavonreicher Futtermittel.

Plasmakonzentration, ng/mL	Daidzein (Gesamt)	Genistein (Gesamt)
in Gruppe „SBM“ (mit Daidzein und Genistein)	161,8±41,5	239,4±43,6
in Gruppe „SPC“ (ohne Daidzein und Genistein)	7,8±2,6	21,8±9,5

Es zeigte sich eine 20- bzw. 11-fach höhere Plasmakonzentration an Daidzein bzw. Genistein in den Kontrolltieren verglichen mit den Versuchstieren. Keiner der anderen Parameter wie Fett, Proteinanteil, Gewichtszunahme oder m-RNA Expression ließ Rückschlüsse auf eine *biologische* Wirkung der Isoflavone zu [Kuhn *et al.* 2004]. Somit kann ein Einfluss von Daidzein bzw. Genistein bei der Aufnahme im Dosisbereich einer üblichen Fütterung mit Soja auf das Wachstum von Schweinen wohl ausgeschlossen werden, obwohl die im Blut zirkulierenden Isoflavon-Konzentrationen eine innere Exposition eindeutig belegen.

Vergleicht man nun die in den Tieren gemessenen Blutspiegel (Tabelle 41) mit denen, die durch Setchell *et al.* (1998a) für auf Sojabasis ernährte Kleinkinder ermittelt wurden, so wird deutlich, dass die Schweine etwa um den Faktor 2-3 geringere innere Spiegel erreichten (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Daidzein- und Genistein-Konzentrationen in Plasma verschiedener Personengruppen

Personengruppe	Dosis/Tag	Daidzein, ng/mL	Genistein, ng/mL	Literatur
Kinder ernährt mit Muttermilch		1,4	2,8	Setchell <i>et al.</i> 1998a
Kinder ernährt mit Kuhmilch		2,1	3,2	„
Kinder ernährt auf Sojabasis	28-47 mg	295	684	„
Postmenopausale Frauen unter HRT mit Isoflavon ¹	100 mg	470	683	Mathey <i>et al.</i> 2006
Prostata Patienten unter Isoflavonbehandlung	300 mg	914 ³	648-783 ²	Miltyk <i>et al.</i> 2003

¹ Tag 30; in zwei Portionen (Morgens und Abends) verabreicht, Probenahme am nächsten Morgen ~12h

² Tag 28, eine Portion, Probenahme 24h nach Applikation,

³ Mittelwert der Studie über die Tage 31-56, Probenahme 12h nach Applikation.

Berechnet man aus den Daten der Futtermittelanalysen, unter Berücksichtigung der Futteraufnahme von täglich 2 kg, die Isoflavonaufnahme der Tiere, ergibt dies eine tägliche Dosis von ~90 mg je Isoflavon (Gesamt 180 mg Daidzein und Genistein) oder 2,1 mg Isoflavon pro kg KG. Das ist (bezogen auf das Körpergewicht) ungefähr dreimal soviel wie

bei einer traditionellen „japanischen“ Ernährung mit ~47 mg Isoflavonen pro Tag; d. h. ~0,78 mg/kg KG; 60 kg [Arai *et al.* 2000] und entspricht etwa der 1,2-fachen Dosis, die Mathey *et al.* (2006) als „Hormone Replacement Therapie“ (HRT) an postmenopausale Frauen verabreichte. Die bei diesen Frauen gemessenen Isoflavon-Plasmaspiegel (Tabelle 42) lagen aber dreimal höher als bei sojaernährten Schweinen. Dies könnte durch eine bessere Resorption der Isoflavone im Menschen oder durch eine bessere Aufnahme aus dem Präparat (z.B. durch hohen Aglycon-Anteil in den HRT Kapseln) bedingt sein. Auch eine andere Darm-Flora und verschieden lange Transit-Zeiten im Darm könnten den Unterschied möglicherweise erklären: Bakterielle Enzyme im Darm können die Hydrolyse der Glucoside fördern, während eine verringerte Transit-Zeit zu einer geringeren Bioverfügbarkeit der Isoflavone führt [Bowey *et al.* 2003, Hendrich 2002, Hur *et al.* 2000]. Weiter stellt sich die Frage, ob Menschen im Gegensatz zu Schweinen Isoflavone evt. langsamer abbauen. Für den Menschen liegen kinetische Daten vor [z.B. Franke *et al.* 2004, Rowland *et al.* 1999]; aber uns sind keine Daten zur Metabolisierung und Elimination von Daidzein und Genistein im Schwein bekannt. Es wäre auch interessant zu klären, in welchen Anteilen die Isoflavone als Konjugate (Glucuronide/Sulfate) bzw. Aglycon (der „aktiven“ Form) im Blut der Tiere vorliegen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Nach der Aufnahme von Sojaprotein konnte die Bioverfügbarkeit der Isoflavone in Schweinen gezeigt werden; bei üblicher Fütterung liegen die Plasmakonzentrationen im dreistelligen ng/mL Bereich. Ähnliche bzw. noch höhere Blutspiegel treten bei isoflavonreicher Ernährung im Menschen auf.

4.2.3 *Biomonitoring zur Ermittlung der Human-Exposition gegen Isoflavone (Daidzein, Genistein) und Bisphenol A* [Moors *et al.*, submitted]

Das biologische Monitoring, also die Analyse von Blut- oder Urinproben, ist ein heute breit eingesetztes Instrument zur Bestimmung von Expositionen gegen Schadstoffe und Umweltchemikalien [Kap. 22.2 in Greim und Deml 1996; Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, 2005; <http://www.cdc.gov/exposurereport/>]. Wenn möglich, werden im Biomonitoring Urinproben herangezogen, um die invasive Gewinnung von Blutproben zu umgehen, der Spender in der Regel nicht so gern zustimmen.

4.2.3.1 Daidzein, Equol und Genistein Ausscheidung

Die BPA- und die Isoflavonausscheidungen in Urinen zweier Stichproben, bestehend aus Personen mit hier üblicher Ernährungsweise, sind mit einer validierten Methode analysiert worden. Wie in Kapitel 3.2.3. dargestellt, wurden dabei 24 h (Sammel-)Urine und Spoturine untersucht. Beide Urintypen eigneten sich dazu, eine Aussage über unterschiedlich hohe Isoflavonausscheidungen im Kollektiv der Spender zu machen. Um das Spektrum von sehr niedrigen bis zu sehr hohen Isoflavonausscheidungen in Abhängigkeit von der Ernährung zu simulieren, führte ein Proband zunächst eine phytoöstrogenarme Diät durch und nahm danach als Bolus 50 g Sojaprotein (12,9 mg Daidzein und 25,2 mg Genistein wie in phytoöstrogenreicher Diät) zu sich. Dieser Versuch zeigte deutlich die Abhängigkeit der Uringehalte von der Isoflavonaufnahme und ermöglichte zudem die Berechnung von Wiederfindungsraten für Daidzein und Genistein aus der Nahrung im Urin.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die von anderen Forschergruppen in 24 h Urinen gemessene Isoflavonausscheidung bei verschiedenen Personengruppen, teils nach Sojaaufnahme oder bei normaler Ernährung, und vergleicht diese mit den Werten der Stichprobe in dieser Arbeit.

Tabelle 43: Isoflavonausscheidung verschiedener Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlicher Ernährungsweise und nach „Soja-Challenge“.

Personen	Aufnahme, µg/Tag		Urinausscheidung, µg/Tag (WR, %)			Literatur
	Daidzein	Genistein	Daidzein	Equol	Genistein	
Japaner	16523	30262	5847 (35)	5572 (35)	3512 (12)	Arai <i>et al.</i> 2000
Nordamerikaner	-	-	80	42	41	Hutchins <i>et al.</i> 1995
	8585	19606	985 (11)	173 (2)	448 (2)	
Nordamerikaner	-	-	142-155	19-108	30-61	Karr <i>et al.</i> 1997
	13000	23000	2363-3459 (18-26)	17-1428 (0,1-12)	1388-2011 (6-9)	
Nordamerikaner	8000	22000	3051 (38)	4364 (57)	1741 (8)	Lampe <i>et al.</i> 1998
Nordamerikaner	24800	27400	♂ 15020 (60)	--	♂ 7730 (28)	Lu <i>et al.</i> 1995*
			♀ 25560 (103)		♀ 9110 (33)	
Deutsche	-	-	98	38	102	Moors (diese Arbeit)
	12900	25200	1630 (13)	2960 (24)	1390 (6)	
Briten	4829 [#]	6215 [#]	1754 (36)		730 (12)	Ritchie <i>et al.</i> 2004a

* Konzentrationen aus dem letzten 24h Urin nach viermaliger Gabe der Dosis.

[#] markiert die normale Aufnahme bei den Briten an Isoflavonen

WR von Equol beziehen sich auf die Menge Daidzein, wobei molaren Massen als Korrektur berücksichtigt wurden.

Die für 24 h Sammel-Urine der deutschen Stichprobe (bei hier üblicher Ernährung) ermittelte Werte liegen im zweistelligen µg/Tag Bereich und ähneln sehr den Daten von

Hutchins *et al.* (1995) und Karr *et al.* (1997) für Nordamerikaner mit „westlicher“ Ernährungsweise. Somit kann unsere Stichprobe als Gruppe mit typisch „westlicher“ Ernährung eingeordnet werden. Eine Ausnahme von den, für diesen Ernährungstyp charakteristischen und relativ geringen Werten, bilden hier die Briten, für die Ritchie *et al.* (2004a) höhere durchschnittliche Werte ermittelten, allerdings bei Nahrungsanalysen auch eine gegenüber anderen Studien höhere Isoflavon-Aufnahme fanden (vgl. Tabelle 4), was wiederum die höhere Ausscheidung erklärt. Noch höhere und zumeist mit der aufgenommenen Isoflavonmenge zusammenhängende Urinausscheidungen zeigen die Studien in Japanern und anderen Personengruppen nach „Soja-Challenge“ (Tabelle 43).

Die für die zweite Stichprobe analysierten Spoturine zeigten Isoflavonkonzentrationen von 24-382 ng/mL und liegen im Mittel etwas über denen der 24h Urine. Das kann mit der Stichprobe selbst zusammenhängen oder damit, dass Spoturin manchmal konzentrierter ist als ein 24 h Urin. Spoturine sind jedoch zur Feststellung der Ernährungsart (Isoflavon-reich oder Isoflavon-arm) gut geeignet, wie kürzlich auch von anderen gezeigt worden ist [Grace *et al.* 2004, Hoey *et al.* 2004].

Analysiert man die beiden Stichproben (24h und Spoturine) hinsichtlich des Anteils der Equolausscheider, so scheiden 8 von 15 Personen Equol oberhalb der Nachweisgrenze aus, also 53%. Eine andere Definition, die besagt, dass derjenige ein Equolausscheider ist, der mehr als 1 μmol Equol/Tag (ca. 272 μg) ausscheidet, kann hier nicht angewendet werden, weil sie die Aufnahme einer bestimmten Daidzein-Dosis voraussetzt [Setchell *et al.* 2002]. Definitiv als „Equolausscheider“ kann aber der Proband bezeichnet werden, der nach Sojaprotein-Einnahme neben hohen Daidzein- und Genistein-Mengen auch sehr viel Equol im Urin ausschied, und zwar ca. 12 μmol Equol (Tabelle 43); davor (unter Normalkost) waren es ungefähr 0,8 μmol Equol (siehe Abbildung 45).

Nach Bolusgabe von Soja errechnen sich für die Wiederfindung der Isoflavone im 24h Urin beim Probanden 13 % für Daidzein, bzw. 37 % zusammen mit dem Metaboliten Equol, und 6 % für Genistein. Für Daidzein liegt das in der Schwankungsbreite von 25-51 % und für Genistein am unteren Ende der publizierten Urin-Wiederfindungsraten von 7-20 % (s.u., Tabelle 44). Die grosse Spanne zeigt, dass die Isoflavonausscheidung zwar mit der Aufnahme korreliert ist, in Hinblick auf den im Urin gefundenen Dosisanteil aber doch erheblich variieren kann [Setchell *et al.* 2003, Shelnutt *et al.* 2000, Ritchie *et al.* 2004b, Rüfer 2006, Xu *et al.* 2000]. Für individuelle Variabilität werden eine unterschiedlich gute Resorption der Isoflavonformen, die Transitzeiten im Darm und weitere Faktoren verantwortlich gemacht.

Tabelle 44 zeigt die Wiederfindung für Daidzein und Genistein im Urin (1 bis 3 Tage) nach der Aufnahme von definierten Isoflavon Mengen. Zum Vergleich ist noch die erheblich höhere renale Ausscheidung und Wiederfindung einer BPA Dosis aufgeführt, die von Colnot (2001) mit deuteriertem Material beim Menschen bestimmt wurde.

Tabelle 44: Wiederfindungsraten von BPA, Daidzein und Genistein in Urin.

Substanz (Urinsammlung)	WR, %				
	Xu et al. 2000	Shelnutt et al. 2000	Setchell et al. 2003	Faughnan et al. 2004	Colnot 2001
Genistein (24 h)	9-16		8		
Genistein (48 h)	18-20	7			
Genistein (96 h)				13	
Daidzein (24 h)	38-51		25		
Daidzein (48 h)	26-27	27			>26
Daidzein (96 h)				31	
BPA (34 h)					>95

Für die Wertigkeit der Daten von Urinmessungen spielt die relativ geringe Wiederfindung der Isoflavone aber nur eine untergeordnete Rolle. Trotz variierender Wiederfindungen lässt sich leicht feststellen, ob eine Person zum Durchschnitt der Bevölkerung mit üblicher westlicher Ernährung gehört oder zu einer Gruppe von asiatisch oder sojareich ernährter Personen. Ein Rückschluss auf eine hohe Exposition gegenüber einer „normalen“ Exposition ist somit problemlos möglich. Dies zeigen u.a. die in Urinproben erhobenen Daten des Probanden nach Sojabolusgabe und nach strikter Diät mit „isoflavonarmen“ Lebensmitteln, die anhand der Venus Datenbank ausgewählt und über einen Zeitraum von 56h konsumiert wurden. Erst danach sinkt der Isoflavongehalt in Urin gegenüber den „normalen“ Konzentrationen ab, bis unterhalb der analytischen Nachweisgrenze. Derartig geringe Konzentrationen konnten in keinem anderen Urin der Stichproben ermittelt werden. Da die „isoflavonarme“ Diät durch die Anzahl der Produkte sehr stark eingeschränkt ist, kann davon ausgegangen werden, dass sie in der breiten Bevölkerung so kaum vorkommen wird. Daher kann dieser spezielle Urin als die untere Referenz für Isoflavonmessungen verwendet werden.

4.2.3.2 BPA Ausscheidung

Bei der Analyse von Urinproben der Stichprobe zeigte sich nur eine sehr geringe BPA Ausscheidung für deutsche Erwachsene mit hier üblicher Ernährung: Geht man zunächst vom „worst case“, also dem Maximalwert von 55 ng/mL (bei einem Probanden im Spoturin ge-

messen) und einer Urinmenge von 1,7 L in 24h aus, so ergibt das für diesen Fall eine Ausscheidung von ~94 µg/Tag. Da der grösste Teil einer aufgenommenen BPA Dosis im Urin ausgeschieden wird, nämlich >95% (siehe Tabelle 44 [Colnot 2001]), kann Ausscheidung hier ohne grosse Korrektur der Exposition gleichgesetzt werden. Eine Ausscheidung/Exposition in Höhe von ~94 µg/Tag würde - bezogen auf ein Körpergewicht von 60 kg - einer BPA Dosis von 1,6 µg/kg KG entsprechen. Dieser Wert unterschreitet noch deutlich den durch das SCF der EU (2002) festgelegten TDI von 10 µg/kg KG und kann somit als unbedenklich angesehen werden. Für alle übrigen Probanden (Spoturine und 24 h Urine) wurden noch geringere Konzentrationen gemessen. In den 24 h Urinen lag die BPA Ausscheidung im Mittel bei 5 µg/L. Andere Studien, z.B. Calafat *et al.* (2005), fanden noch geringere Urinkonzentrationen für BPA, im Durchschnitt 1,33 µg/L, mit einer Spannbreite von 0,22 bis 5,18 µg/L bei 394 Personen in den USA. Unsere deutsche Stichprobe liegt (ohne Einbeziehung der Proben < NG) am oberen Ende dieser Spanne, und der sehr hohe Einzelwert (siehe oben) muss eher als Ausnahme angesehen werden.

4.3 Beiträge zur toxikologischen Bewertung von BPA und Isoflavonen

Die Exposition ist ein Eckpunkt toxikologischer Bewertungen für alle Chemikalien, auch solche mit hormoneller Aktivität wie Xeno- und Phytoöstrogene. Exposition kann auf unterschiedlichen Wegen und Ebenen ermittelt werden: die „äußere“ Exposition z.B. über Analyse von Nahrungsmitteln, im speziellen Fall also deren Gehalten an Isoflavonen und BPA. Doch oft interessiert eine „innere“ Exposition noch mehr, also die nach Resorption im Organismus vorliegende Konzentration des Fremdstoffs oder seiner Metabolite (siehe auch Abbildung 9). Zu deren Ermittlung wird heute das biologische Monitoring eingesetzt, also die Analyse von Blut- oder Urinproben. Das Biomonitoring bedient sich dabei oft analytischer Methoden, die auch für Untersuchungen zur Toxikokinetik von Substanzen entwickelt und genutzt werden. Aus Nahrungsmittelanalysen abgeleitete Expositionen können aber, z.B. bei Personen mit anderer als landesüblicher Ernährungsweise (Art und Menge betreffend), deutlich über- oder unterschätzt werden. Biomonitoring-Daten gestatten dagegen Aussagen für das Individuum bzw. die Stichprobe und erfassen auch weitere Expositionspfade (dermale Aufnahme oder Inhalation), wenn diese einen Beitrag zur Gesamtbelastung liefern [Kap. 22.2 in Greim und Deml 1996, Kap. 42.1 in Marquardt und Schäfer 2004].

Aus Nahrungsmittelanalysen war bereits bekannt, dass der Mensch in ganz unterschiedlicher Höhe gegenüber Phytoöstrogenen (Isoflavonen) und BPA exponiert ist. So wird BPA nur in geringen Mengen (als Kontaminante) im μg Bereich aufgenommen, während Isoflavone im mg Bereich aufgenommen werden, je nach Ernährungsweise < 1 mg bis zu 50 mg (Tabelle 4). Konkrete Daten zur Exposition einer deutschen Stichprobe lagen aber bislang nicht vor. In Urinproben von Probanden bei hier üblicher Ernährung gewonnene Daten zeigen nun, dass BPA Expositionen erwachsener Deutscher im Mittel bei $9 \mu\text{g}/\text{Tag}$ liegen, also „Belastungen“ von $< 0.15 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ täglich entsprechen (Kapitel 4.2.3). Selbst der für einen Maximalwert der Stichprobe berechnete Wert von $94 \mu\text{g}/\text{Tag}$ oder $1,6 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ (für eine 60 kg Person) liegt noch weit unter dem in Europa geltenden TDI von $10 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ für BPA [EU 2002] und kann somit als gesundheitlich unbedenklich angesehen werden.

Zur Phytoöstrogenexposition in Deutschland liegen nunmehr neuere epidemiologische Daten vor, die aber keine Messungen beinhalteten sondern mittels Fragebogen erhoben wurden [Linseisen *et al.* 2004]. In unserer Stichprobe ermittelte Isoflavon-Konzentrationen im Urin liegen in vergleichbaren Bereichen wie sie für Nordamerikaner bei typisch „westlicher“ Ernährungsweise berichtet wurden [Hutchins *et al.* 1995, Karr *et al.* 1997], aber deutlich unterhalb der Werte, die bei typisch asiatischer Ernährungsweise im Urin gefunden werden [z.B.

Arai et al 2000]. Die Stichprobe scheint damit durchaus für unsere Region repräsentativ zu sein. Andere Phytoöstrogen-Analysen in Urin adulter Deutscher sind bisher nicht bekannt.

Die Daten aus der Urin-Analyse dieser Arbeit zeigen ferner, daß die Isoflavonausscheidung der Probanden bei üblicher deutscher Ernährung deutlich höher lag als die von BPA: Die Werte für Daidzein von 25-226 µg/Tag, Equol 18-74 µg/Tag und Genistein 23-243 µg/Tag (siehe Abbildung 43) reflektieren dabei nicht unmittelbar die „Exposition“, weil nur ein Teil der aufgenommenen Phytoöstrogen-Dosis über den Urin eliminiert wird (Unterkapitel 4.2.3.1 und Tabelle 44). Doch selbst ohne eine Korrektur wird bereits deutlich, daß ein erheblich grösserer Teil der mit der Nahrung aufgenommenen „Östrogenäquivalente“ aus Phytoöstrogenisoflavonen und nur ein Bruchteil aus der BPA-Exposition stammt. Für eine solche relationale Betrachtung (Östrogenäquivalente) kann man die relative östrogene Potenz heranziehen, für die publizierte Daten aus *in vitro* Untersuchungen mit BPA und Isoflavonen vorliegen (siehe Tabelle 2 und Tabelle 5) oder Daten aus *in vivo* Studien. Letztere sind hier relevanter, weil sie die Kinetik der Substanzen berücksichtigen. Vergleichende Studien mit oraler Gabe im uterotrophen Assay an Ratten zeigten, bezogen auf Ethinylestradiol = 1, relative östrogene Potenzen von $1,6 \times 10^{-4}$ für BPA, $2,2 \times 10^{-4}$ für Genistein und $0,6 \times 10^{-4}$ für Daidzein [Diel *et al.* 2000], also etwa 1000-fach geringere Wirkstärken der Umweltöstrogene als des Steroidöstrogens, das in oralen Kontrazeptiva eingesetzt wird.

Die Frage nach einem möglichen Risiko für die menschliche Entwicklung kann somit wie folgt beantwortet werden: Für Bisphenol A kann aufgrund der niedrigen Exposition und der schnellen Metabolisierung bei geringer östrogenen Potenz ein Risiko praktisch ausgeschlossen werden. Für Daidzein und Genistein ist das Risiko einer östrogenen Wirkung und damit verbundener möglicher Effekte auf die Entwicklung ebenfalls sehr gering. Allerdings könnten bei Kindern mit hoher Sojaaufnahme u.U. wirksame innere Spiegel erreicht werden, wie es Untersuchungen an Säuglingen, die mit Sojaprotein ernährt wurden, nahelegen [Setchell *et al.* 1997, 1998]. Dabei bleibt jedoch unklar, ob daraus unerwünschte Wirkungen resultieren, denn bislang sind aus epidemiologischen Studien für diese Personengruppe keine negativen Ergebnisse bekannt geworden [Kohler *et al.* 1984, Lasekan *et al.* 1999, Strom *et al.* 2001].

5 Ausblick

Es sind geeignete Methoden zur Analyse bestimmter östrogenen Chemikalien etabliert und validiert und dann mit Erfolg zu deren Quantifizierung in komplexen biologischen Matrizes wie Blutplasma, Gewebe und Urin eingesetzt worden. Optimierungen verschiedener Schritte bei der Probenaufarbeitung und der eigentlichen Analyse mittels GC-MS sind hier ausführlich dokumentiert und lassen erkennen, daß es bei der GC-MS-Technik nur noch kleinere Verbesserungsmöglichkeiten gibt. So könnten z.B. anstelle deuterierter interner Standards für die Isoflavone und Equol auch ^{13}C -Standards eingesetzt werden, wenn diese kommerziell verfügbar werden. Falls es notwendig wird, noch geringere Konzentrationen an Bisphenol A in Urin präzise zu erfassen, wäre es möglich, eine separate Analyse, die zur Derivatisierung dann Pentafluorbenzylbromid oder Pentafluorbenzoylchlorid nutzt, einzusetzen. Allerdings könnte dann ein Blindwertproblem verstärkt in den Vordergrund treten, da selbst Laborstaub BPA im Spurenbereich enthält [Vortrag Sickerling 2002 am IfADo; Wilson *et al.* 2006].

Ein Blindwertproblem für BPA gilt es auch zu bedenken, wenn die hier entwickelte Analysenmethode zur simultanen Bestimmung von Isoflavonen und BPA in Urin für größere Kollektive eingesetzt wird, deren Urinproben in Plastikbehältern gelagert worden sind, aus denen möglicherweise BPA in die Probe übergetreten ist. Ob ungewöhnlich hohe BPA Werte in den Urinen aus den Lagergefäßen oder einer „echten“ Exposition stammen, kann aber unterschieden werden, wenn man BPA-Konjugate und BPA-Aglycon separat erfasst: Vom Organismus aufgenommenes BPA wird ja ganz überwiegend als Glucuronid ausgeschieden, während Kontaminationen aus Plastikbehältern, bereits ohne enzymatische Hydrolyse, als „freies“ BPA extrahiert und analysiert werden können. Für die Isoflavon-Analytik stellt sich dieses Problem in Urinproben nicht. Doch kann z.B. bei Untersuchungen der Blutspiegel eine differenzierte Analyse der Anteile an Aglycon bzw. Glucuroniden oder Sulfaten (wegen der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit) durchaus von Interesse sein.

Weitere Verbesserungen gegenüber den hier dargestellten Analysenverfahren auf Basis der GC-MS dürften nur mit anderen Analysengeräten zu erzielen sein, wie z. B. einer LC-MS. Ein Vorteil ist in diesem Fall geringere Aufarbeitungszeit durch Wegfall der Derivatisierung. Ferner bietet die Flüssigkeitschromatographie die Chance der Unterscheidung aller Metabolite der Phase II, weil keine Derivatisierung durchgeführt werden muss und somit Glucuronide, Sulfate oder gemischte Konjugate erhalten bleiben können. Bei Einsatz eines Triple-Quadrupol-Gerätes oder Ionenfallentechnik in der LC-MS können, mittels

Quantifizierung über Tochter-Ionen, mit der GC-MS vergleichbare Nachweisgrenzen erreicht werden. Eigene Vorversuche zur Übertragung unserer Methoden auf die LC-MS konnten inzwischen mit vielversprechenden Ergebnissen abgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes der Flüssigkeitschromatographie ist die relativ einfache Kopplung mit einer automatisierten SPE-Probenvorbereitung, um den Arbeitseinsatz noch stärker zu reduzieren und somit Kosten einzusparen. Eine höher automatisierte Probenvorbereitung bietet sich aber auch für GC-MS-Technik an. Dies würde die Abarbeitung größerer Probenzahlen erleichtern und eine noch bessere Reproduzierbarkeit bei geringerem Arbeitsaufwand ermöglichen.

Weitere interessante Anwendungen für die im Rahmen dieser Arbeit am *IfADo* etablierten Techniken zur Analyse von Isoflavonen im biologischen Material zeichnen sich bereits ab:

- a) Die Isoflavon-Analyse in Plasma kann künftig eingesetzt werden für Studien zur Kinetik von Daidzein und Genistein in Ziegenlämmern, die mit Soja exponiert sind (Kooperation mit dem FBN in Dummerstorf)
- b) Die Isoflavon-Analyse in Urin wird demnächst eingesetzt werden für Studien im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem Forschungsinstitut für Kinderernährung (FKE in Dortmund): Hier sollen bei Kindern aus der sogenannten DONALD-Studie (**D**ortmund **N**utritional and **A**nthropometric **L**ongitudinally **D**esigned-Study) erhobene Ernährungs- und Entwicklungs-Parameter auch den aus vielen asservierten Urinproben zu ermittelnden Phytoöstrogen-Daten gegenübergestellt werden.

Für solche Routinemessungen werden künftig zu jeder Serie Qualitätssicherungsproben mitgeführt, um die Einhaltung von Grenzwerten der analytischen Methode zu gewährleisten und zusätzliche aufwendige Kalibrierungen zu vermeiden.

Neben der gezielten Analyse von Phytoöstrogen-Isoflavonen in Urin könnte es von Interesse sein, auch Flavone und Lignane zu erfassen, für die positive Effekte auf die menschliche Gesundheit diskutiert werden [Constantinou *et al.* 2001, Graf 2005, Hollman 1999]. Hier bestünde die Möglichkeit, die bestehende GC-MS Analytik zu erweitern, oder, wenn die Isoflavonanalytik auf eine andere Technik übertragen wird, ohne allzu große Änderungen interessante Lignane und Flavone mit in die Methode zu integrieren.

6 Zusammenfassung

Es ist bekannt, daß Substanzen anthropogenen Ursprungs wie beispielsweise Bisphenol A (BPA), aber auch natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe wie die Isoflavone Genistein und Daidzein, östrogene Aktivität zeigen und in hinreichend hoher Dosierung entwicklungs- und reproduktionstoxische Wirkungen bei Tieren verursachen können. Es besteht Besorgnis, daß solche Chemikalien bei Aufnahme über die Nahrung auch wirksame Spiegel im Menschen erreichen und über Eingriffe in hormonell gesteuerte Prozesse unerwünschte Effekte auslösen (sog. endokrine Disruption). In der vorliegenden Arbeit sind analytische Methoden zur Bestimmung von BPA, Genistein, Daidzein und Equol in Blutplasma, Geweben und Urinen entwickelt, optimiert und validiert worden, um Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung dieser endokrin aktiven Stoffe und ihrer Metaboliten zu untersuchen.

Für BPA, das in der Polycarbonatherstellung als Kopolymer dient und mit der Nahrung als Kontaminante aufgenommen wird, ist die Verteilung im Nager-Organismus und der transplazentare Transfer untersucht worden: In einer Kinetik Studie wurden, nach *i.v.* Applikation an trächtige Ratten, die Spiegel von BPA in Plasma- sowie in maternalen und fötalen Gewebeproben zu verschiedenen Zeiten ermittelt. Für die Analyse der Proben wurde eine flüssig/flüssig (fl./fl.) Extraktionsmethode mit anschließender GC-MS Analyse entwickelt, die es erlaubt, BPA in den biologischen Matrices zu analysieren. In Plasma und Geweben konnte BPA bis zur Nachweisgrenze von 14 ng/mL bzw. 32 ng/mg (nach DIN 32645 berechnet) mit Wiederfindungsraten (WR) von 84 - 110 % je nach Gewebe und Konzentration, bestimmt werden. Die Präzisionen zwischen den Serien wurden für Plasma mit 6 % und die für Lebergewebe mit 10 % bestimmt.

Die Analyse von Plasma- und Geweben trächtiger DA/Han Ratten, die am 18. Tag der Schwangerschaft mit 10 mg/kg KG BPA *i.v.* dosiert wurden, ergab folgende Befunde: Etwa 5 min nach Applikation wurden hohe maternale Plasmakonzentrationen (3,8 µg/mL) gemessen, die im weiteren Verlauf (nach 2 h) auf ein Zwanzigstel abnahmen. Zudem konnte eine rasche Metabolisierung von BPA durch Phase II Enzyme belegt werden. Aus den Plasma Konzentrationen-Zeit Verläufen ergaben sich Halbwertszeiten von 0,34 h für das BPA-Aglycon und 0,52 h für das Gesamt BPA (Konjugate). In allen Geweben zeigten sich 20 - 30 min nach Injektion die jeweils höchsten Konzentrationen, mit fallender Tendenz der Absolutwerte: Leber(Muttertier) > Niere(Muttertier) > Uterus > Plazenta > Leber(Fötus) > Fötenhomogenat. Im weiteren Verlauf nahmen die Werte rasch ab, und nach 6 h waren nur noch geringe

Mengen BPA in den Geweben nachweisbar. Ein vergleichbarer Verlauf der in Plazenta und fötaler Leber gemessenen Konzentrationen spricht für den ungehinderten Übergang von BPA zum Föten. Im Tierversuch konnte also gezeigt werden, daß BPA schnell in alle Gewebe verteilt, aber auch effizient konjugiert und ausgeschieden wird [Moors *et al.*, 2006, Arch. Toxicol. 80: 647-655].

Für Untersuchungen zur Aufnahme und Bioverfügbarkeit der Isoflavone Daidzein und Genistein, die vor allem in Soja vorkommen, wurden a) die Isoflavongehalte im Mastfutter von Schweinen und b) die Isoflavonkonzentrationen im Blut (Plasma) der Tiere bestimmt. Die Analyse der Futtermittel erfolgte mittels Mikro-HPLC-UV nach ethanolischer Extraktion unter Verwendung der Standardadditionstechnik. Die Nachweisgrenzen lagen bei 10 µg/g Futter. Zur Analyse der Schweineplasmaproben kam eine fl./fl. Extraktion mit anschließender GC-MS-Messung zur Anwendung. Dabei wurden Nachweisgrenzen von 11 ng/mL bzw. 9 ng/mL für Daidzein und Genistein (DIN 32645) sowie WR von 72 - 121 % je nach Substanz und Konzentration erreicht. Die Präzisionen lagen bei 5 - 15 %. Die Analysen dieser Arbeit zeigten, daß bei Tieren unter Fütterung mit isoflavonfreiem Futter kaum Daidzein oder Genistein im Plasma zirkulierte, die Tiergruppe mit einer Isoflavonaufnahme von etwa 2,1 mg/kg KG dagegen 10- bis 20-fach höhere Plasmakonzentrationen aufwies. Der Mastversuch ergab ferner, dass eine mittlere Isoflavonaufnahme von ~180 mg/Tag während der Wachstumsphase bei Schweinen nicht zu signifikanten Veränderungen etlicher biologischer Parameter führte [Kuhn *et al.*, 2004, Arch Anim. Nutr. 58: 265-276].

Zur Abschätzung der Humanexpositionen gegenüber BPA, Daidzein und Genistein wurde eine weitere Methode auf der Basis einer Festphasenextraktion mit anschließender GC-MS Analyse etabliert, die eine simultane Bestimmung der Substanzen bzw. deren Metaboliten in kleinen Volumina von Urinproben ermöglicht. Durch Kaltaufgabe konnten die Nachweisgrenzen nochmals gegenüber den obigen GC-MS Methoden auf 3, 4, 4 und 5 ng/mL für BPA, Equol, Daidzein und Genistein verbessert werden. Die Wiederfindungsraten betragen je nach Substanz und Konzentrationsbereich 80 - 127 %; die Präzisionen zwischen den Serien lagen bei 10 % für BPA, 9 % für Daidzein, 15 % für Equol und 18 % für Genistein.

Mit Hilfe dieser Methode wurden in zwei Stichproben von jeweils 7 bzw. 8 Personen die in Spoturinen bzw. Sammelurinen ausgeschiedenen Mengen an BPA, Daidzein, Equol und Genistein ermittelt, um die Exposition bei üblicher deutscher Ernährungsweise abzuschätzen. In den 24 h Urinen wurden im Mittel 9 µg/Tag BPA, 98 µg/Tag Daidzein, 38 µg/Tag Equol und 102 µg/Tag Genistein bestimmt. Um auch die Spannbreite der Isoflavonaufnahme zu untersuchen, wurde ferner der Urin eines Probanden nach isoflavonfreier Diät und nach Soja-

proteinbolus untersucht. Nach 52 h isoflavonfreier Ernährung wurden im Urin keine messbaren Isoflavonkonzentrationen mehr gefunden. Eine definierte Aufnahme von 12,9 mg Daidzein und 25,2 mg Genistein, die einer typisch asiatischen Exposition entspricht, führte zu hohen Konzentrationen Daidzein, Equol und Genistein im 24 h Urin, mit Wiederfindungen von 13 % der Dosis für Daidzein (bzw. 37 %, unter Berücksichtigung des Metaboliten Equol) und 6 % der Dosis für Genistein [Moors *et al.*, submitted to Molec. Nutr. Food Res.].

Die Anwendung der entwickelten Methoden liefert neue Beiträge zu einer vergleichenden toxikologischen Risikoabschätzung für die Umweltöstrogene BPA, Daidzein und Genistein, die sich wie folgt zusammenfassen lässt: (a) In Human-Urin ermittelte Konzentrationen lassen auf eine geringe Exposition gegenüber BPA und Phytoöstrogen-Isoflavonen bei einer typisch „westlichen“ Ernährungsweise schließen. Die Exposition gegen BPA ist aber deutlich (mehr als 10-fach) geringer als die gegen Isoflavone. Berücksichtigt man die unterschiedlich hohe Fraktion der Dosis, die renal ausgeschieden wird, sind die Unterschiede noch grösser. (b) Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Tierversuchs zur Kinetik von BPA und weitere von anderen durchgeführte Versuche mit BPA und Isoflavonen in Ratten zeigen, dass durch schnelle Metabolisierung und Ausscheidung nur ein Bruchteil der Substanzen unverändert im Organismus bioverfügbar sind. In Anbetracht der geringen östrogenen Potenz der Stoffe und der niedrigen Expositionen ist daher mit einer sehr geringen Gefährdung für den Menschen zu rechnen. Allerdings werden Kleinkinder, deren Phase II Metabolismus noch nicht voll entwickelt ist und die aufgrund einer speziellen Ernährung mit Sojaprodukten relativ hoch gegen Isoflavone exponiert sind, von einigen Gremien [CERHR 2006, COT 2003, SKLM der DFG 1998] als Risikogruppe angesehen.

7 Summary

Compounds of anthropogenic origin such as bisphenol A (BPA), but also naturally occurring phytochemicals such as the isoflavones daidzein and genistein are known to have estrogenic activity and can exert developmental and reproductive toxicity in animals at sufficiently high doses. There is concern that such chemicals, upon ingestion with food, may also lead to effective levels in humans and cause adverse effects by interfering with hormonally regulated processes (endocrine disruption). In the present work analytical methods for the determination of BPA, daidzein, equol and genistein in plasma, tissue and urine were developed, optimized and validated to further examine exposure, distribution and elimination of these endocrine active compounds and their metabolites.

BPA, a copolymer in polycarbonate plastics and food packing materials, is mainly ingested as dietary contaminant. Its distribution and transplacental transfer was investigated in a kinetic study in rodents: Upon i.v. administration of BPA to pregnant rats, the levels in plasma and in several maternal and fetal tissues were determined at various times after application. For the analysis of the samples, a liquid/liquid (l./l.) extraction method followed by GC-MS analysis was optimized and validated for BPA analysis in these biological matrices. The method was suitable for measuring reliably BPA concentrations in plasma and in tissues down to the limits of detection (LOD) of 14 ng/mL and 32 ng/mL (calculated according to DIN 32645). The recovery varied between 84% - 110 %, depending on tissue and concentration, and the inter-assay variations were calculated to 6 % and 10 % for plasma and liver.

The analysis of plasma and tissue samples from pregnant DA/Han rats, treated with 10 mg/kg bw BPA i.v. on day 18 of gestation, showed the following results: Soon (5 min) after dosing high plasma concentrations (3.8 µg/mL) were measured which declined within 2 h to the twentieth part of the initial value. Moreover, rapid metabolism of BPA by phase II enzymes to glucuronide conjugates was observed. Half-lives of 0.34 h for the BPA-aglycon and 0.52 h for total BPA (conjugates) were calculated from plasma concentration time courses. In tissues, the highest concentrations occurred 20-30 min after injection, with values in falling order in: liver(dam) > kidney(dam) > uterus > placenta > liver(fetus) > fetus homogenate. In the course of the experiment peak values decreased quickly, and after 6 h only small parts of BPA were detected in the tissues. The rather similar concentration time courses in placenta and in fetal liver argue for an undisturbed transfer of BPA into the fetus. In summary, the results of this animal study point to a fast distribution of BPA in maternal and

fetal tissues, yet indicate also an efficient conjugation and elimination [Moors *et al.*, 2006, Arch. Toxicol. 80: 647-655].

For studies on the uptake and bioavailability of the isoflavones daidzein and genistein which are mainly found in soy, we analyzed a) the isoflavone content of some pig feeds and b) isoflavone concentrations in pig blood (plasma samples) from groups of animals fed with the experimental diets. For the analysis of pig feed a method involving acid hydrolysis and ethanol extraction followed by micro HPLC-UV analysis with standard addition was used. The limits of detection were 10 µg/g for both daidzein and genistein (calculated via S/N = 3 procedure). For analysis of pig plasma, enzymatic hydrolysis and liquid/liquid extraction followed by GC-MS analysis was used. For this method limits of detection were 11 ng/mL and 9 ng/mL for daidzein and genistein (according to DIN 32645) and the recovery rates were between 72 – 121 %, depending on substance and concentration. The interassay variations were 5 - 15 %. Our analysis of pig plasma and pig feeds showed that, in the soy-free fed group almost no daidzein or genistein circulated in the plasma, whereas 10-20 fold higher plasma-concentrations were found in the standard-fed group, with an uptake of isoflavones of 2.1 mg/kg bw. Thus, the isoflavones were bioavailable. Moreover, the feeding study with gilts receiving about ~180 mg/day isoflavone showed no significant changes in a range of parameters when compared to soy-free fed animals [Kuhn *et al.*, 2004, Arch Anim. Nutr. 58: 265-276].

To investigate human exposure against BPA, daidzein and genistein, a biomonitoring method based on solid phase extraction followed by GC-MS analysis was established which allows simultaneous determination of the analytes and their metabolites in small volumes of urine. For this method the application of a cooled injection system in solvent vent mode improved the limits of detection for BPA, equol, daidzein and genistein to 3, 4, 4 and 5 ng/mL; recovery rates varied depending on substance and concentration between 80 - 127 %. The interassay variations were 10 % for BPA, 9 % for daidzein, 15 % for equol and 18 % for genistein.

This method was then applied to an analysis of BPA, daidzein, equol and genistein levels in spot (7) and in 24 h urine samples (8) of volunteers on a typical German diet to estimate their exposure on the basis of excreted amounts. In the 24 h urines, mean values of 9, 98, 38 and 102 µg/day were calculated for BPA, daidzein, equol and genistein, respectively. To investigate the ranges of isoflavone intake and excretion, also urine samples collected from one volunteer on an isoflavone-free diet and after soy challenge were analyzed. No isoflavones were found in his urine after a period of 52 h on isoflavone-free diet, whilst the defined isoflavone

intake of 12.9 mg daidzein and 25.2 mg genistein in soy protein (typical exposure with an Asian-type diet) resulted in high urinary concentrations of daidzein, equol and genistein, with recoveries of 13 % of the dose for daidzein (or 37 % when equol is included) and 6 % for genistein in the 24 h urine [Moors *et al.*, submitted to Molec. Nutr. Food Res.].

Data obtained by applying the validated analytical methods to a kinetic study in rats and a small biomonitoring study provide new information useful in a comparative toxicological risk assessment for the environmental estrogens BPA, daidzein, and genistein: (a) The levels determined in urine samples of our German cohort indicate a low exposure to BPA and isoflavones with the typical Western-type diet. Exposure to BPA is clearly (at least 10-fold) lower than that to isoflavones. Taking into account that the part of an ingested dose which is excreted in urine is higher for BPA (>90%) than for the isoflavones (<40%), this difference becomes even more pronounced. (b) The animal study on the toxicokinetics of BPA analyzed by us as well as related studies by others with BPA and isoflavones indicate that due to rapid phase-II metabolism and excretion only a fraction of the estrogenic parent compound is bioavailable in the organism. In light of the known and low hormonal potency of the compounds and the low dietary exposure they are unlikely to present a practical risk to human health. Yet, infants whose phase II metabolism is not fully developed and who are exposed to high levels of isoflavones with a special soy-diet, are considered as risk group by some committees [CERHR 2006, COT 2003, SKLM of the DFG 1998].

8 Literatur

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Watanabe, S., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., and Hase, T. (1994) Determination of lignans and isoflavonoids in plasma by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Detect. Prev.* **18**(4), 259-271.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Kurzer, M. S., Wahala, K., Makela, T., and Hase, T. (1995a) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Anal. Biochem.* **225**(1), 101-108.
- Adlercreutz, H., van der, W. J., Kinzel, J., Attalla, H., Wahala, K., Makela, T., Hase, T., and Fotsis, T. (1995b). Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**(1), 97-103.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H., and Watanabe, S. (2000). Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J. Epidemiol.* **10**(2), 127-135.
- Ashby, J., and Tinwell, H. (1998). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ. Health Perspect.* **106**(11), 719-720.
- Atkinson, A., and Roy, D. (1995a). In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**(2), 424-433.
- Atkinson, A., and Roy, D. (1995b). In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**(1), 60-66.
- Atkinson, J. C., Diamond, F., Eichmiller, F., Selwitz, R., and Jones, G. (2002). Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent. Mater.* **18**(2), 128-135.
- Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F., and Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* **332**(5), 281-285.
- Barnes, S., Coward, L., Kirk, M., and Sfakianos, J. (1998) HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**(3), 254-262.
- Barrett, J.R. (2006) The science of soy. *Environm. Health Perspect.* **114**(6), A353-A358
- Bayer, T., Colnot, T., and Dekant, W. (2001). Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicol. Sci.* **62**(2), 205-211.
- Beard, J. (2006). DDT and human health. *Science of The Total Environment* **355**(1-3), 78-89.
- Bennetts, H. W., Underwood, E. J., and Shier, F. L. A. (1946). specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia.; *Aust. J. Agric. Res.* **22**, 131-138.
- Boker, L. K., Van der Schouw, Y. T., De Kleijn, M. J., Jacques, P. F., Grobbee, D. E., and Peeters, P. H. (2002). Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J. Nutr.* **132**(6), 1319-1328.
- Bornmann G., and Loeser A. (1959). [Monomers-polymers; studies on plastics from epsilon-caprolactam or bisphenol.]. *Arzneimittelforschung.* **9**(1), 9-13.
- Bowerman, W. W., Best, D. A., Grubb, T. G., Sikarskie, J. G., and Giesy, J. P. (2000). Assessment of environmental endocrine disruptors in bald eagles of the Great Lakes. *Chemosphere* **41**(10), 1569-1574.
- Bowey, E., Adlercreutz, H., and Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem. Toxicol.* **41**(5), 631-636.
- Brede, C., Fjeldal, P., Skjevrak, I., and Herikstad, H. (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit. Contam* **20**(7), 684-689.
- Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., and Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* **103**(6), 608-612.
- Bühning J. (2000). Vom billigen Plastik zum Material der Zukunft. *Separators Digest* **1/2000**, 10-11.
- Bujan, L., Mansat, A., Pontonnier, F., and Mieusset, R. (1996). Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ* **312**(7029), 471-472.
- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., and Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* **113**(4), 391-395.
- Cappelletti, V., Fioravanti, L., Miodini, P., and Di, F. G. (2000). Genistein blocks breast cancer cells in the G(2)M phase of the cell cycle. *J. Cell Biochem.* **79**(4), 594-600.

- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**(6854), 609-613.
- Carson, R. (1962). *Silent Spring*, Mariner Books.
- CERHR (2006) Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Expert Panel Evaluation of Genistein and Soy Formula, Meeting Summary. <http://cerhr.niehs.nih.gov>
- Chang, Y. C., and Nair, M. G. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. (1995) *J.Nat.Prod.* **58**(12), 1892-1896.
- Colborn, T., Myers, J. P., and Dumanoski, D. (1996). *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? A scientific detective story.*, Penguin Books, New York.
- Coldham, N. G., Darby, C., Hows, M., King, L. J., Zhang, A. Q., and Sauer, M. J. (2002). Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica* **32**(1), 45-62.
- Colnot, T. (2001) Beurteilung von Phyto- und Xenoöstrogenen am Beispiel ausgewählter Substanzen - Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein und Bisphenol A in Menschen und Ratten. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Constantinou, A. I., Lantvit, D., Hawthorne, M., Xu, X., van Breemen, R. B., and Pezzuto, J. M. (2001). Chemopreventive effects of soy protein and purified soy isoflavones on DMBA-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer* **41**(1-2), 75-81.
- COT Report; Committee on Toxicity of Chemicals on Food/Consumer Products and the Environment. COT Report-Phytoestrogens and Health. London: Food Standards Agency; 2003 – <http://www.food.gov.uk/multimedia/webpage/phytoreportworddocs>
- Coughtrie, M.W., Burchell, B., Leakey, J.E., and Hume, R. (1988) The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **34**, 729-735.
- Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D., and Barnes, S. (1993). Genistein, daidzein, and their β -glycosides conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods from American and Asian Diets. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1961-1967.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M., and Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl), 1486S-1491S.
- Csanady, G. A., Oberste-Frielinghaus, H. R., Semder, B., Baur, C., Schneider, K. T., and Filser, J. G. (2002). Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch. Toxicol.* **76**(5-6), 299-305.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., and Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**(1), 71-75.
- De Kleijn, M. J., Van der Schouw, Y. T., Wilson, P. W., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D. E., and Jacques, P. F. (2001). Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J. Nutr.* **131**(6), 1826-1832.
- Degen, G. H., and Bolt, H. M. (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **73**(7), 433-441.
- Degen G.H., and Bolt, H. M. (2001) Comparative investigation of synthetic estrogens and phytoestrogens - general concept and research strategy. Proceedings of the 2nd Status Seminar "Endocrine Disruptors"
- Degen, G.H., Foth, H., Kahl, R., Kappus, H., Neumann, H.G., Oesch, F. und Schulte-Hermann, R.H. (1999) Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xeno-oestrogene. Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* **4**, 367-374
- Degen, G. H., Janning, P., Diel, P., and Bolt, H. M. (2002a). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* **128**(1-3), 145-157.
- Degen, G. H., Janning, P., Diel, P., Michna, H., and Bolt, H. M. (2002b). Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Arch. Toxicol.* **76**(1), 23-29.
- Degen G.H., Janning P., Wittsiepe J., Upmeyer A., and Bolt H.M. (2002c) Integration of mechanistic data in the toxicological evaluation of endocrine modulators. *Toxicology Letters* **127**, 225-237
- Degen, G. H. (2004). Endocrine Disruptoren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitschutz* (9), 848-856.

- Delclos, K. B., Bucci, T. J., Lomax, L. G., Latendresse, J. R., Warbritton, A., Weis, C. C., and Newbold, R. R. (2001). Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* **15**(6), 647-663.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1998) Hormonally Active Agents in Food, Symposium, DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln, Wiley-VCH, Weinheim
- Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., Vollmer, G., and Michna, H. (2000). Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **73**(1-2), 1-10.
- Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., Upmeier, A., Michna, H., Bolt, H. M., and Degen, G. H. (2004). Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch. Toxicol.* **78**(4), 183-193.
- Dodds E.C., and Lawson W. (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**, 996.
- Doerffel, K., Geyer, R., and Müller, H. (1994). Analytikum, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I., and Holder, C. L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **28**(3), 298-307.
- Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R.R. and Delclos, K. B. (2001). Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* **15**(2), 105-110.
- Domoradzki, J. Y., Pottenger, L. H., Thornton, C. M., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., Dryzga, M. D., Shiotsuka, R. N., and Waechter, J. M., Jr. (2003). Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol. Sci.* **76**(1), 21-34.
- Dow Chemical Co. (1988) Bisphenol A: 13-week aerosol toxicity study with Fisher 344 rats. Study Report K-001304-011
- Duncan, A. M., Phipps, W. R., and Kurzer, M. S. (2003). Phyto-oestrogens. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* **17**(2), 253-271.
- Edmonds, J. S., Nomachi, M., Terasaki, M., Morita, M., Skelton, B. W., and White, A. H. (2004). The reaction of bisphenol A 3,4-quinone with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**(2), 556-561.
- Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J., and Park, B. K. (2001). Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**(1), 103-113.
- Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikkka T, and Harazono A (2001) Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* **15**(5): 505-523
- European Union (2003) Risk Assessment of 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A): Human Health Effects. EUR 20843 EN European Chemicals Bureau.
- Faughnan, M. S., Hawdon, A., Ah-Singh, E., Brown, J., Millward, D. J., and Cassidy, A. (2004). Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br. J. Nutr.* **91**(4), 567-574.
- Federici, E., Touche, A., Choquart, S., Avanti, O., Fay, L., Offord, E., and Courtois, D. (2003). High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old Glycine max tissue cultures. *Phytochemistry* **64**(3), 717-724.
- Fisch, H., Goluboff, E. T., Olson, J. H., Feldshuh, J., Broder, S. J., and Barad, D. H. (1996). Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil. Steril.* **65**(5), 1009-1014.
- Fluka (2006). Laborchemikalien und analytische Reagenzien, Riedel-de Haen, Buchs SG, Schweiz.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(7), 2690-2694.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., and Narala, K. K. (1994) Quantitation of Phytoestrogens in Legumes by HPLC. *J.Agric.Food Chem.* **42**, No. 9
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., and Narala, K. (1995) Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **208**(1), 18-26
- Franke, A. A., Custer, L. J., Wang, W., and Shi, C. Y. (1998). HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* **217**(3), 263-273.
- Franke, A. A., Custer, L. J., and Hundahl, S. A. (2004) Determinants for urinary and plasma isoflavones in humans after soy intake. *Nutr.Cancer* **50**(2), 141-154

- Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**(1), 205-212.
- Giusti, R. M., Iwamoto, K., and Hatch, E. E. (1995). Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann. Intern. Med.* **122**(10), 778-788.
- Goodman, J.E., McConnell, E.E., Sipes, I.G., Witorsch, R.J., Slayton, T.M., Yu, C.J., Lewis, A.S., and Rhomberg, L. (2006) An updated weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**, 387-457
- Goodson, A., Summerfield, W., and Cooper, I. (2002). Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit. Contam* **19**(8), 796-802.
- Gottwald, W. (2000). Statistik für Anwender, Wiley-VCH, D-69469 Weinheim.
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Botting, N. P., Fryatt, T., Oldfield, M. F., and Bingham, S. A. (2003). Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **315**(1), 114-121.
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Low Y.-L., Luben, R.N., *et al.*, (2004). Phytoestrogen concentrations in plasma and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relationship to breast cancer in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**,:698-708.
- Gray, G.M., Cohen, J.T., Cunha, G., Hughes, C., McConnell, E.E., Rhomberg, L., Sipes, I.G., and Mattison, D. (2004) Weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol A. *Human Ecol. Risk Assess.* **10**, 875-921
- Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and Chambon, P. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J. Steroid Biochem.* **24**(1), 77-83.
- Greim, H., and Deml, E. (1996). Toxikologie, VCH, Weinheim.
- Guillette, L. J., Jr., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., and Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* **102**(8), 680-688.
- Han, D. H., Denison, M. S., Tachibana, H., and Yamada, K. (2002). Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(7), 1479-1487.
- Head, K. A. (1998). Isoflavones and other soy constituents in human health and disease. *Alternative Medicine Review* **3**(1), 433-450.
- Heinonen, S., Wahala, K., and Adlercreutz, H. (1999). Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-euol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Anal. Biochem.* **274**(2), 211-219.
- Heinonen, S. M., Hoikkala, A., Wahala, K., and Adlercreutz, H. (2003). Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **87**(4-5), 285-299.
- Hendrich, S. (2002). Bioavailability of isoflavones. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **777**(1-2), 203-210.
- Herbst, A. L., Ulfelder, H., and Poskanzer, D. C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N. Engl. J. Med.* **284**(15), 878-881.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y., and Taketani, Y. (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr. J.* **46**(6), 773-778.
- Hock, B., Rohte, S., and Seifert, M. (2000). Hormone in der Umwelt - die Tests im Überblick. *Nachrichten aus der Chemie* **48**(7), 918-925.
- Hoey, L., Rowland, I. R., Lloyd, A. S., Clarke, D. B., and Wiseman, H. (2004). Influence of soya-based infant formula consumption on isoflavone and gut microflora metabolite concentrations in urine and on faecal microflora composition and metabolic activity in infants and children. *Br. J. Nutr.* **91**(4), 607-616.
- Horn-Ross, P. L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J. E., Koo, J., John, E. M., and Smith, M. (2000). Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control* **11**(4), 289-298.
- Hu, J. Y., and Aizawa, T. (2003). Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Res.* **37**(6), 1213-1222.
- Hübschmann, H. J. (1996). Handbuch der GC/MS, VCH, D-69451 Weinheim.

- Hur, H., and Rafii, F. (2000). Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**(1), 21-25.
- Hur, H. G., Lay, J. O., Jr., Beger, R. D., Freeman, J. P., and Rafii, F. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch. Microbiol.* **174**(6), 422-428.
- Hutchins, A. M., Slavin, J. L., and Lampe, J. W. (1995) Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J.Am.Diet.Assoc.* **95**(5), 545-551.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H., and Kato, S. (2005). Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos.* **33**, 55-59.
- Jaga, K., and Dharmani, C. (2003). Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **16**(1), 7-20.
- Jagadeesh, S., Kyo, S., and Banerjee, P. P. (2006). Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **66**(4), 2107-2115.
- Janning, P., Schuhmacher, U. S., Upmeier, A., Diel, P., Michna, H., Degen, G. H., and Bolt, H. M. (2000). Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Arch. Toxicol.* **74**(8), 421-430.
- Ju, Y.H., Fultz, J., Allred, K.F., Doerge, D.R., and Helferich, W.G. (2006) Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis* **27** (4) :856-63. [Epub 2006 Jan 6]
- Karr, S. C., Lampe, J. W., Hutchins, A. M., and Slavin, J. L. (1997) Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am.J.Clin.Nutr.* **66**(1), 46-51.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N., and Nakazawa, H. (2004). Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **805**(1), 41-48.
- Kazakov, A. L. (1979). Study of the hypolipidemic activity of natural isoflavones. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **13**(1), 51-53.
- Kim, J. C., Shin, H. C., Cha, S. W., Koh, W. S., Chung, M. K., and Han, S. S. (2001). Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci.* **69**(22), 2611-2625.
- King, R. A., Broadbent, J. L., and Head, R. J. (1996) Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J.Nutr.* **126**(1), 176-182.
- King, R. A., and Bursill, D. B. (1998). Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**(5), 867-872.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., and Fujimoto, N. (2002). Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 554-559.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellowaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., and Aromaa, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **146**(3), 223-230.
- Kohler, L., Meeuwisse, G., and Mortensson, W. (1984). Food intake and growth of infants between six and twenty-six weeks of age on breast milk, cow's milk formula, or soy formula. *Acta Paediatr. Scand.* **73**(1), 40-48.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. and Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**: 2279-2286.
- Kromidas, S. (1999). Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, D-69469 Weinheim.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., and Aou, S. (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* **45**(3), 345-356.
- Kuhn, G., Hennig, U., Kalbe, C., Rehfeldt, C., Ren, M. Q., Moors, S., and Degen, G. H. (2004). Growth performance, carcass characteristics and bioavailability of isoflavones in pigs fed soy bean based diets. *Arch. Anim Nutr.* **58**(4), 265-276.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(12), 5925-5930.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der, B. B., and Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**(10), 4252-4263.
- Kuklennyik, Z., Ye, X., Reich, J. A., Needham, L. L., and Calafat, A. M. (2004). Automated online and off-line solid-phase extraction methods for measuring isoflavones and lignans in urine. *J. Chromatogr. Sci.* **42**(9), 495-500.

- Kulling, S. E., Lehmann, L., and Metzler, M. (2002). Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **777**(1-2), 211-218.
- Kuo, H. W., and Ding, W. H. (2004). Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1027**(1-2), 67-74.
- Kurebayashi, H., Harada, R., Stewart, R. K., Numata, H., and Ohno, Y. (2002). Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci.* **68**(1), 32-42
- Kurebayashi, H., Betsui, H., and Ohno, Y. (2003). Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol. Sci.* **73**(1), 17-25.
- Kurebayashi, H., Nagatsuka, S. I., Nemoto, H., Noguchi, H., and Ohno, Y. (2004). Disposition of low doses of (14)C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. *Arch. Toxicol.*
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., and Taketani, Y. (2002). The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr. J.* **49**(4), 465-471.
- Lamartiniere, C. A., Zhang, J. X., and Cotroneo, M. S. (1998). Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl), 1400S-1405S.
- Lamartiniere, C. A., Wang, J., Smith-Johnson, M., and Eltoum, I. E. (2002a). Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol. Sci.* **65**(2), 228-238.
- Lamartiniere, C. A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R., and Elgavish, A. (2002b). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J. Nutr.* **132**(3), 552S-558S.
- Lambert, C., and Larroque, M. (1997). Chromatographic analysis of water and wine samples for phenolic compounds released from food-contact epoxy resins. *J. Chromatogr. Sci.* **35**(2), 57-62.
- Lampe, J. W., Karr, S. C., Hutchins, A. M., and Slavin, J. L. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**(3), 335-339.
- Lapcik, O., Hill, M., Hampl, R., Wahala, K., and Adlercreutz, H. (1998). Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* **63**(1), 14-20.
- Lasekan, J. B., Ostrom, K. M., Jacobs, J. R., Blatter, M. M., Ndife, L. I., Gooch, W. M., III, and Cho, S. (1999). Growth of newborn, term infants fed soy formulas for 1 year. *Clin. Pediatr. (Phila)* **38**(10), 563-571.
- Lee, H. B., and Peart, T. E. (2000). Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **83**(2), 290-297.
- Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S., and Lee, K. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci.* **75**(1), 40-46.
- Liggins, J., Bluck, L. J., Coward, W. A., and Bingham, S. A. (1998) Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal. Biochem.* **264**(1), 1-7.
- Liggins, J., Bluck, L. J. C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., and Bingham, S. A. (2000). Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **11**(6), 326-331.
- Linseisen, J., Piller, R., Hermann, S., and Chang-Claude, J. (2004). Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Intl J Cancer* **110**, 284-290.
- Lopez-Cervantes, J., and Paseiro-Losada, P. (2003). Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit. Contam* **20**(6), 596-606.
- Lu, L. J., Grady, J. J., Marshall, M. V., Ramanujam, V. M., and Anderson, K. E. (1995) Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. *Nutr. Cancer* **24**(3), 311-323.
- Lucier, G.W. and McDaniel, O.S. (1977). Steroid and non-steroid UDP glucuronyltransferase: glucuronidation of synthetic estrogens as steroids. *J Steroid Biochem* **8**, 867-872
- Lundholm, C. E. (1997). DDE-induced eggshell thinning in birds: Effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **118**(2), 113-128.
- Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H., and Gurbide, E. (1993). In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **45**(5), 399-405.
- Martino, M. A., Nevadunsky, N. S., Magliaro, T. J., and Goldberg, M. I. (2002). The DES (diethylstilbestrol) years: bridging the past into the future. *Primary Care Update for OB/GYNS* **9**(1), 7-12.
- Marquardt H., and Schäfer S.G. (2004). Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Mannheim.

- Mathey, J., Lamothe, V., Coxam, V., Potier, M., Sauvant, P., and Pelissero, C. B. (2006). Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(3), 957-65.
- Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishino, H., and Aoike, A. (1993). Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res.* **53**(6), 1328-1331.
- Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G. L., Morita, M., and Kawamoto, T. (2003). Bisphenol A levels in human urine. *Environ. Health Perspect.* **111**(1), 101-104.
- Matsumoto, J., Yokota, H., and Yuasa, A. (2002). Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **110**(2), 193-196.
- Matthews, J. B., Twomey, K., and Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* **14**(2), 149-157.
- Mazur, W. (1998). Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* **12**(4), 729-742.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wahala, K., Ojala, S., Salakka, A., and Adlercreutz, H. (1996) Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal. Biochem.* **233**(2), 169-180.
- McClain R.M., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., Edwards, J. A., and Bausch, J. (2006). Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem. Toxicol.* **44**(1), 56-80.
- McLachlan, J. A. (1993). Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* **101**(5), 386-387.
- Miltyk, W., Craciunescu, C. N., Fischer, L., Jeffcoat, R. A., Koch, M. A., Lopaczynski, W., Mahoney, C., Jeffcoat, R. A., Crowell, J., Paglieri, J., and Zeisel, S. H. (2003). Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 875-882.
- Miodini, P., Fioravanti, L., Di Fronzo, G., and Cappelletti, V. (1999). The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br. J. Cancer* **80**(8), 1150-1155.
- Miyakoda, H., Tabata, M., Onodera, S., and Takeda, K. (1999). Passage of Bisphenol A into the Fetus of the Pregnant Rat. *J. Health Sci.* **45**, 318-323.
- Miyakoda, H., Tabata M., Onodera S., and Takeda K. (2000). Comparison of Conjugative Activity, Conversion of Bisphenol A to Bisphenol A Glucuronide, in Fetal and Mature Male Rat. *J. Health Sci.* **46**(4), 269-274.
- Moors, S., Diel, P., and Degen, G. H. (2006). Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application. *Arch. Toxicol.* published online DOI: 10.1007/s00204-006-0097-x
- Morrissey, R. E., George, J. D., Price, C. J., Tyl, R. W., Marr, M. C., and Kimmel, C. A. (1987). The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **8**(4), 571-582.
- Morton, M. S., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., Correia, R., Blacklock, N., Chan, P. S., Cheng, C., Lloyd, S., Chieh-ping, W., and Griffiths, K. (1997) Measurement and metabolism of isoflavonoids and lignans in the human male. *Cancer Lett.* **114**(1-2), 145-151.
- Morton, M. S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L. D., and Evans, B. A. (2002). Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J. Nutr.* **132**(10), 3168-3171.
- Murphy, P. A. (1982) Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* **34** 60-64.
- Murphy, P. A., Song, T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, G. R., Trainer, D., and Holden, J. (1999). Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J. Agric. Food Chem.* **47**(7), 2697-2704.
- Murphy, P. A., Barua, K., and Hauck, C. C. (2002). Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *Journal of Chromatography B* **777**(1-2), 129-138.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., and Ono, H. (2001) Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod. Toxicol.* **15**: 399-411
- Nakagawa, Y., and Suzuki, T. (2001). Metabolism of bisphenol A in isolated rat hepatocytes and oestrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cells. *Xenobiotica* **31**(3), 113-123.
- Nau, H. (1994). Toxikokinetik. In *Lehrbuch der Toxikologie* (Marquardt H. and Schäfer S.G., Eds.), pp. 32-66. Spektrum-Verlag, Heidelberg.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., and Yoshikawa, Y. (2004a). Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ. Health Perspect.* **112**(11), 1159-1164.

- Negishi, T., Tominaga, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Hayasaka, I., Kuroda, Y., and Yoshikawa, Y. (2004b). Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Exp. Anim* **53**(4), 391-394.
- Newbold, R. (1995). Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 7**, 83-87.
- Newbold, R.R., Banks, E.P., Bullock, B., and Jefferson, W. (2001) Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* **61**:4325–4328
- NTP (1982). Carcinogenesis Bioassay of Bisphenol-A (CAS No. 80-05-7) in F344 Rats B6C3F1 Mice (Feed Study). *National Toxicology Program Technical Report 215*(Order No. PB82-184060 (NTIS)), 1-116.
- NTP (2006). Toxicology and Carcinogenesis Study of Genistein (CAS No. 446-72-0) in Sprague-Dawley Rats (Feed Study). *NIH Publication No. 06-4430 Technical Report Series No. 545*.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M., and Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104**(3), 298-305.
- Otto, M. (2000). Analytische Chemie, VCH, Weinheim.
- O'Neil, M. J., Smith, A., and Heckelman, P. E. (2004). The Merck Index 13. Auflage, Merck Publications, Darmstadt.
- Polkowski, K., and Mazurek, A. P. (2000). Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol. Pharm.* **57**(2), 135-155.
- Porrini, S., Belloni, V., Della, S. D., Farabollini, F., Giannelli, G., and ssi-Fulgheri, F. (2005). Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats. *Brain Res. Bull.* **65**(3), 261-266.
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z., and Waechter, J. M., Jr. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* **54**(1), 3-18.
- Pritchett, J. J., Kuester, R. K., and Sipes, I. G. (2002). Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos.* **30**(11), 1180-1185.
- Pulgar, R., Olea-Serrano, M. F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J. M., and Olea, N. (2000). Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ. Health Perspect.* **108**(1), 21-27.
- Reinli, K., and Block, G. (1996). Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* **26**(2), 123-148.
- Richelle, M., Pridmore-Merten, S., Bodenstab, S., Enslin, M., and Offord, E. A. (2002). Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J. Nutr.* **132**(9), 2587-2592.
- Ritchie, M. R., Morton, M. S., Deighton, N., Blake, A., and Cummings, J. H. (2004a). Plasma and urinary phytoestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis. *Br. J. Nutr.* **91**(3), 447-457.
- Ritchie, M. R., Morton, M. S., Thompson, A. M., Deighton, N., Blake, A., Cummings, J. H., and Steel, C. M. (2004b). Investigation of the reliability of 24 h urine excretion as a biomarker of isoflavone exposure over time and over a wide range of isoflavone intakes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**(9):1286-9
- Rolfe, B. G. (1988). Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* **1**(1), 3-10.
- Rostagno, M. A., Palma, M., and Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A* **1012**(2), 119-128.
- Rowland, I., Wiseman, H., Sanders, T., Adlercreutz, H., and Bowey, E. (1999). Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem. Soc. Trans.* **27**(2), 304-308.
- Rüfer, C. Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten. (2006) Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH).
- Russell, L., Hicks, G. S., Low, A. K., Shepherd, J. M., and Brown, C. A. (2002). Phytoestrogens: a viable option? *Am. J. Med. Sci.* **324**(4), 185-188.
- Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y., and Yuasa, A. (2002). Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**(2), 171-176.
- Saloniemi, H., Wahala, K., Nykanen-Kurki, P., Kallela, K., and Saastamoinen, I. (1995) Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **208**(1), 13-17.
- Schwedt, G. (1995). Taschenatlas der Analytik, Thieme Verlag, Stuttgart.

- Scientific Committee on Food (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. SCF/CS/PM/3936 Final. 17-4-2002. European Commission Health & Consumer Protection Directorate C - Scientific Opinions. URL: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out128_en.pdf
- Selinski S., and Degen G.H. (2003) Estimation of the Mean AUC of the Xenoestrogens Daidzein, Bisphenol A, and p-tert-Octylphenol. published online, Universität Dortmund SFB 475. Komplexitätsreduktion in Multivariaten Datenstrukturen. 5/2003 published online. URL: <http://www.sfb475.uni-dortmund.de/berichte/tr05-03.ps>
- Selinski S., and Degen G.H. (2004) Comparison of the Toxicokinetics of Daidzein and Bisphenol A in Pregnant and Non-Pregnant DA/Han Rats, Universität Dortmund SFB 475. Technical Report, SFB 475 Komplexitätsreduktion in Multivariaten Datenstrukturen. 41/2004 published online. URL: <http://www.sfb475.uni-dortmund.de/berichte/tr41-04.ps>
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., and Heubi, J. E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* **350**(9070), 23-27
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., and Heubi, J. E. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl), 1453S-1461S.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A., and Heubi, J. E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.* **131**(4 Suppl), 1362S-1375S.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., and Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**(2), 447-453.
- Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P., and Cassidy, A. (2003). Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**(2), 411-419.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., and Barnes, S. (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J.Nutr.* **127**(7), 1260-1268.
- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., and Badger, T. M. (2000). Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, 413-419.
- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., Ronis, M. J., and Badger, T. M. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**(3), 588-594.
- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y., and Ozawa, S. (2002). Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology in Vitro* **16**(5), 549-556.
- Shin, B. S., Yoo, S. D., Cho, C. Y., Jung, J. H., Lee, B. M., Kim, J. H., Lee, K. C., Han, S. Y., Kim, H. S., and Park, K. L. (2002). Maternal-fetal disposition of bisphenol A in pregnant Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**(5-6), 395-406.
- Sickerling, J. (2002) Erfassung von Schadstoffemissionen beim Recycling von Industrieverpackungen unter besonderer Berücksichtigung von Epoxidharzen. Universität Dortmund.
- Silbernagel, S., and Lang, F. (1998). Taschenatlas der Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* **16**(5), 972-978.
- Slavin, J. L., Karr, S. C., Hutchins, A. M., and Lampe, J. W. (1998). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl), 1492S-1495S.
- Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C., and Fennell, T. R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **168**(3), 225-234.
- Song, T., Barua, K., Buseman, G., and Murphy, P. (1998) A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am.J.Clin.Nutr.* **68**(6 Suppl), 1474S-1479S.
- Stob, M. (1983) Naturally occurring food toxicants: estrogens. In: Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants. CRC Press, New York, pp. 81-100
- Strom, B. L., Schinnar, R., Ziegler, E. E., Barnhart, K. T., Sammel, M. D., Macones, G. A., Stallings, V. A., Drulis, J. M., Nelson, S. E., and Hanson, S. A. (2001). Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA* **286**(7), 807-814.
- Takahashi, O., and Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ. Health Perspect.* **108**(10), 931-935.

- Takahashi, O., and Oishi, S. (2003) Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* **41**(7), 1035-1044.
- Tan, B. L., and Mustafa, A. M. (2003). Leaching of bisphenol A from new and old babies' bottles, and new babies' feeding teats. *Asia Pac. J. Public Health* **15**(2), 118-123.
- Tang, B.Y. and Adams, N.R. (1980) Effect of equol on oestrogen receptors and on synthesis of DNA and protein in the immature rat uterus. *J. Endocrinol* **85**, 291-297
- Tekel, J., Daeseleire, E., Heeremans, A., and van Peteghem, C. (1999). Development of a simple method for the determination of genistein, daidzein, biochanin A, and formononetin (biochanin B) in human urine. *J. Agric. Food Chem.* **47**(9), 3489-3494.
- Tolleson, W. H., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Marques, M. M., and Roberts, D. W. (2002). Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **50**(17), 4783-4790.
- Toppiari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jr., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De, M. E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., and Skakkebaek, N. E. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* **104** Suppl 4, 741-803.
- Trock, B.J., Hilakivi-Clarke, L., and Clarke, R. (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 459-471
- Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., and Doerge, D. R. (2002). High-throughput quantification of soy isoflavones in human and rodent blood using liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **777**(1-2), 139-145.
- Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., Keimowitz, A. R., Brine, D. R., Veselica, M. M., Fail, P. A., Chang, T. Y., Seely, J. C., Joiner, R. L., Butala, J. H., Dimond, S. S., Cagen, S. Z., Shiotsuka, R. N., Stropp, G. D., and Waechter, J. M. (2002). Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **68**(1), 121-146.
- Upmeier, A. (2001) Toxikokinetik von östrogenartig wirkenden Industriechemikalien und Phytoöstrogenen. Universität Dortmund.
- Upmeier, A., Degen, G. H., Diel, P., Michna, H., and Bolt, H. M. (2000). Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch. Toxicol.* **74**(8), 431-436.
- Vandenbergh, J. G. (2004). Fremde Geschlechtshormone im Uterus. *Spektrum der Wissenschaft* **05/2004**, 38-43.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanady, G. A., Filser, J. G., and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* **15**(10), 1281-1287.
- Völkel, W., Bittner, N., and Dekant, W. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **33**(11), 1748-1757.
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., and Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev. Toxicol.* **30**(1), 71-133.
- Wang, G., Kuan, S. S., Francis, O. J., Ware, G. M., and Carman, A. S. (1990). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.* **38**(1), 185-190.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K., and Adlercreutz, H. (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J.Nutr.* **128**(10), 1710-1715.
- Watzl, B., and Rechkemmer, G. (2001). Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* **48**(12), 498-502.
- Wei, H., Cai, Q., and Rahn, R. O. (1996). Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* **17**(1), 73-77.
- Wu, A. H., Ziegler, R. G., Nomura, A. M., West, D. W., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Hoover, R. N., and Pike, M. C. (1998). Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(6 Suppl), 1437S-1443S.
- Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorkow, C., and Seidlova-Wuttke, D. (2003). Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* **44** Suppl 1, S9-20.
- Wuttke, W., Jarry, H., Westphalen, S., Christoffel, V., and Seidlova-Wuttke, D. (2002). Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **83**(1-5), 133-147.

- Xiao, Q., Li, Y., Ouyang, H., Xu, P., and Wu, D. (2006). High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **830**(2), 322-329.
- Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., Cook, L., and Hendrich, S. (1994) Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.* **124**(6), 825-832.
- Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., and Hendrich, S. (2000). Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *J. Nutr.* **130**(4), 798-801.
- Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S., and Tsugane, S. (2003). Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**(12), 906-913.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., and Takatsuki, M. (2000). Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* **108**(12), 1147-1150.
- Ye, X., Kuklennyk, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M. (2005a) Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **383**(4):638-644
- Ye, X., Kuklennyk, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M. (2005b) Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine. *Anal. Chem.* **77**(16): 5407-13.
- Yoo, S. D., Shin, B. S., Kwack, S. J., Lee, B. M., Park, K. L., Han, S. Y., and Kim, H. S. (2000). Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. *J. Toxicol. Environ. Health A* **61**(2), 131-139.
- Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., and Ohta, S. (2004). Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol. Sci.* **78**(1), 50-59.
- Yoshimura, Y., Brock, J. W., Makino, T., and Nakazawa, H. (2002). Measurement of bisphenol A in human serum by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **458**(2), 331-336.
- Zalko, D., Soto, A. M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., and Cravedi, J. P. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* **111**(3), 309-319.
- Zava, D. T., and Duwe, G. (1997). Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr. Cancer* **27**(1), 31-40.
- Zhang, M., Xie, X., Lee, A. H., and Binns, C. W. (2004). Soy and isoflavone intake are associated with reduced risk of ovarian cancer in southeast China. *Nutr. Cancer* **49**(2), 125-130.
- Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A., and Hendrich, S. (1999a). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J. Nutr.* **129**(2), 399-405.
- Zhang, Y., Wang, G. J., Song, T. T., Murphy, P. A., and Hendrich, S. (1999b). Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J. Nutr.* **129**(5), 957-962.
- Zhou, J. R., Mukherjee, P., Gugger, E. T., Tanaka, T., Blackburn, G. L., and Clinton, S. K. (1998). Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Res.* **58**(22), 5231-5238.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Entwicklung und Optimierung von analytischen Methoden zur Bestimmung der Toxikokinetik von Xeno- und Phytoöstrogenen und Einsatz im biologischen Monitoring“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.