

Bisphenol A, Genistein, Daidzein und Equol in Urin

B

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	Bisphenol A, Genistein, Daidzein
Analyt. Messprinzip:	Kapillargaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS)
Abgeschlossen im:	November 2007

Übersicht über die mit dieser Methode erfassbaren Parameter und die entsprechenden Arbeitsstoffe:

Arbeitsstoff	CAS	Parameter	CAS
Genistein	446-72-0	Genistein	446-72-0
Daidzein	486-66-8	Daidzein	486-66-8
		Equol	531-95-3
Bisphenol A	80-05-7	Bisphenol A	80-05-7

Zusammenfassung

Die vorliegende Methode erlaubt die Quantifizierung der Isoflavone Genistein und Daidzein, des Daidzein-Metaboliten Equol und des Bisphenol A (BPA) in humanen Urinproben.

Zur Aufarbeitung werden die Urinproben zunächst mit den internen Standards versetzt. Die in der Probe enthaltenen Analytkonjugate werden anschließend enzymatisch gespalten und mittels Festphasenextraktion gereinigt und angereichert. Nach Überführung in Silylether-Derivate werden die Analyten gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert.

D2 Bisphenol A und Isoflavone

Genistein (GEN)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 17$ bzw. 3%
	Streubereich	$u = 54$ bzw. 10% bei einer dotierten Konzentration von 10 bzw. 125 μg GEN pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 18\%$
	Streubereich	$u = 46\%$ bei einer dotierten Konzentration von 75 μg GEN pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel)	$r = 114$ bzw. 105% bei einer Sollkonzentration von 125 μg GEN pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen in Serie bzw. von Tag zu Tag
Nachweisgrenze:	5 μg GEN pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	18 μg GEN pro Liter Urin	

Daidzein (DAI)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 5$ bzw. 7%
	Streubereich	$u = 16$ bzw. 22% bei einer dotierten Konzentration von 10 bzw. 125 μg DAI pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 9\%$
	Streubereich	$u = 23\%$ bei einer dotierten Konzentration von 75 μg DAI pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel)	$r = 109$ bzw. 104% bei einer Sollkonzentration von 125 μg DAI pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen in Serie bzw. von Tag zu Tag
Nachweisgrenze:	4 μg DAI pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	9 μg DAI pro Liter Urin	

Equol (EQ)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 6$ bzw. 5%
	Streubereich	$u = 19$ bzw. 16% bei einer dotierten Konzentration von 10 bzw. 125 $\mu\text{g EQ}$ pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 15\%$
	Streubereich	$u = 39\%$ bei einer dotierten Konzentration von 75 $\mu\text{g EQ}$ pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel)	$r = 89$ bzw. 112% bei einer Sollkonzentration von 125 $\mu\text{g EQ}$ pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen in Serie bzw. von Tag zu Tag
Nachweisgrenze:	4 $\mu\text{g EQ}$ pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	11 $\mu\text{g EQ}$ pro Liter Urin	

Bisphenol A (BPA)

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 7$ bzw. 5%
	Streubereich	$u = 22$ bzw. 16% bei einer dotierten Konzentration von 2,2 bzw. 27,5 $\mu\text{g BPA}$ pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel)	$s_w = 10\%$
	Streubereich	$u = 26\%$ bei einer dotierten Konzentration von 16,5 $\mu\text{g BPA}$ pro Liter Urin und $n = 6$ Bestimmungen
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel)	$r = 94$ bzw. 90% bei einer Sollkonzentration von 27,5 $\mu\text{g BPA}$ pro Liter Urin und $n = 4$ Bestimmungen in Serie bzw. von Tag zu Tag
Nachweisgrenze:	3 $\mu\text{g BPA}$ pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	7 $\mu\text{g BPA}$ pro Liter Urin	

D4 Bisphenol A und Isoflavone

Östrogen wirksame Substanzen (Genistein, Daidzein, Equol und Bisphenol A)

Hormonell aktive Substanzen oder so genannte „endokrine Disruptoren“ stehen zunehmend in Diskussion, da mit der Exposition gegenüber diesen Substanzen, besonders im frühen Lebensalter, eine Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität einhergehen kann [1, 2]. Beim Menschen erfolgt die Exposition meistens über die Nahrung durch hormonell aktive Stoffe natürlichen oder anthropogenen Ursprungs [3, 4].

Phytoöstrogene

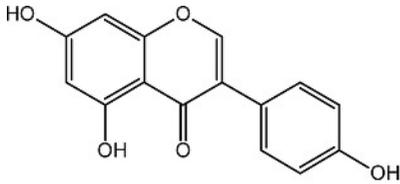
Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, zu denen unter anderen die Flavonone, Flavone und Isoflavone gehören (Grundstrukturen siehe Abb. 7 im Anhang). Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Isoflavone Daidzein (DAI) und Genistein (GEN), die in vielen Pflanzen, besonders aber in Sojaprodukten vorkommen [5]. Auch die bekannten Phytoöstrogene Formononetin und Biochanin A werden durch Enzyme von Darmbakterien und Lebermikrosomen zu DAI und GEN abgebaut (Demethylierung) [6, 7]. Einen Überblick über Phytoöstrogengehalte in Lebensmitteln gibt Tabelle 1.

Tab. 1. Phytoöstrogengehalte in ausgewählten Lebensmitteln.

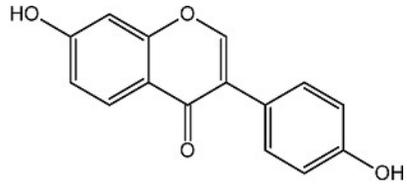
Lebensmittel	Daidzein [µg/g]	Genistein [µg/g]	Formononetin [µg/g]	Biochanin A [µg/g]	Literatur
Luzernesprossen	n. n.	n. n.	Spuren	Spuren	[8]
Bananen	n. n.	n. n.	–	–	[9]
Erbsen (grün)	73	n. n.	Spuren	n. n.	[10]
Erdbeeren, frisch	0,045	0,457	–	–	[11]
Erdnüsse, geröstet	0,037	0,172	–	–	[11]
Kleesprossen	n. n.	4	22,8	4,4	[10]
Kidney-Bohnen	n. n.	n. n.	n. n.	4,1	[10]
Orangen	n. n.	n. n.	–	–	[11]
Bier (Pilsener Urquell)	0,0006	0,0018	0,004	0,0013	[12]
Sojabohnen	676–1007	612–1382	n. n.	n. n.	[10]
Sojaprotein, Konzentrat, wassergewaschen	167–910	400–760	–	–	[13]
Sojasprossen	138–225	113–305	–	–	[13]
Tofu	113	166	n. n.	n. n.	[10]

n. n. nicht nachgewiesen

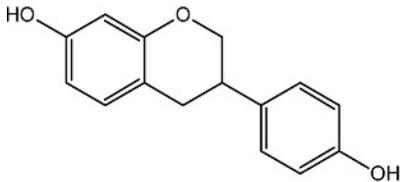
Die Aufnahme von DAI und GEN hängt sehr stark von den Ernährungsgewohnheiten ab. Die geschätzte tägliche Aufnahme von Isoflavonen reicht von 0,8 mg bei einer westlich geprägten und bis zu 47 mg bei traditioneller asiatischer Ernährung [14–17]. In letzter Zeit finden Soja-Präparate auch zunehmend Interesse als Nahrungsergänzungsmittel zur Linderung von Beschwerden im Klimakterium im Rahmen einer Hor-



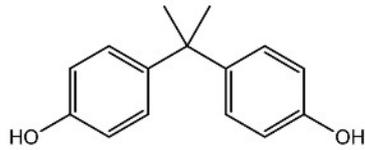
Genistein



Daidzein



Equol



Bisphenol A

Abb. 1. Strukturen der untersuchten östrogen wirksamen Substanzen.

monersatztherapie. Dabei werden Isoflavon-Dosen von 40 bis 118 mg pro Tag empfohlen [18]. Durch Enzymsysteme der Darmflora in Nagern und Menschen wird DAI teilweise zu Equol reduziert und GEN zu 4-Ethylphenol metabolisiert [19]. Aufgrund der vorliegenden xenoöstrogenen Struktur wurde Equol (EQ) als Metabolit des Isoflavons DAI in die vorliegende Methode mit aufgenommen (Strukturen siehe Abb. 1).

Bisphenol A

Ein synthetischer Stoff mit endokriner Wirksamkeit ist Bisphenol A (BPA), das ein wichtiges Monomer für die Herstellung von Epoxidharzen, Polycarbonaten und anderen Kunststoffen darstellt. Im Jahr 2009 betrug die Weltproduktion von BPA 2,7 Mio. Tonnen, von denen jährlich etwa 100 Tonnen in die Atmosphäre gelangen [20]. Bei dieser Großchemikalie besteht die Gefahr der Exposition sowohl bei der Herstellung der Substanz selbst als auch bei deren weiterer Umsetzung zu Polymeren (Polycarbonaten und Epoxidharze). Aufgrund der endokrinen Wirkung der Substanz wurde für BPA ein MAK-Wert von 5 mg/m^3 (gemessen als einatembare Fraktion) festgelegt [21]. Außerdem besteht seit 2006 ein biologischer Leitwert für Bisphenol A in Höhe von 80 mg je Liter Urin [22].

BPA kommt in vielen Kunststoffflaschen sowie Dosenbeschichtungen vor, die für die Aufbewahrung verschiedener Lebensmittel verwendet werden. Durch eine Migration von BPA-Restmonomeren in verpackte Lebensmittel, ist BPA als Kontaminante in verschiedenen Getränken und Nahrungsmitteln nachweisbar [23–25]. Auch im Speichel von Patienten, die eine Zahnfüllung mit dem BPA-Monomer besitzen, wurde BPA nachgewiesen. Die durchschnittliche Exposition gegenüber BPA für einen Erwachsenen liegt laut Angaben der Europäischen Kommission bei etwa $30 \text{ } \mu\text{g}$ pro Tag (entspricht ca. $0,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) [25].

D6 Bisphenol A und Isoflavone

Diese Informationen bilden einen Referenzrahmen für die geschätzte tägliche Aufnahme an den östrogen wirkenden Isoflavonen sowie BPA. Die Exposition kann allerdings hinsichtlich der Art und Quantität sehr variabel sein. Während diese Expositionsdaten für eine Risikoabschätzung basisbildend sind, müssen für eine toxikologische Beurteilung der Exposition gegenüber Xenoöstrogenen sowohl die Toxikodynamik (Art der Wirkung, hormonelle Aktivität) und die Toxikokinetik (Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Elimination) als auch Aspekte des betroffenen endokrinen Systems mit berücksichtigt werden [1, 26, 27]. Die östrogene Wirkung von DAI, GEN und BPA wurde bereits in vielen Bioassays sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht und im Vergleich zu den Steroid-Östrogenen als schwach eingestuft [28–31]. Metabolismusstudien an Nagern zeigten eine weitgehende Konjugation der Isoflavone und des BPA durch Phase-II-Enzyme zu polaren Metaboliten [32–36]. In Humanstudien wurde ein sehr ähnlicher metabolischer Verlauf festgestellt [27, 37], der zu einer effektiven Ausscheidung der betrachteten Xenoöstrogene mit Eliminationshalbwerten von 5-8 h für DAI und GEN und von weniger als 6 h für BPA führt [38]. Die Verbindungen werden in Form der polaren Metabolite hauptsächlich über den Urin ausgeschieden. Durch Biomonitoringuntersuchungen im Urin wird somit eine Expositionsabschätzung ermöglicht. Für die Xenoöstrogene DAI, GEN und EQ wurden im Urin der US-Bevölkerung Hintergrundgehalte von im Mittel 68 µg DAI/g Kreatinin, 22 µg GEN/g Kreatinin und 8 µg EQ/g Kreatinin gefunden [39, 40].

Die Analytgehalte im Urin können Hinweise auf eine externe und interne Exposition geben [34]. Während das lipophile BPA direkt im Dünndarm resorbiert wird, ist die Aufnahme der untersuchten Isoflavone offensichtlich abhängig von der Form, in der

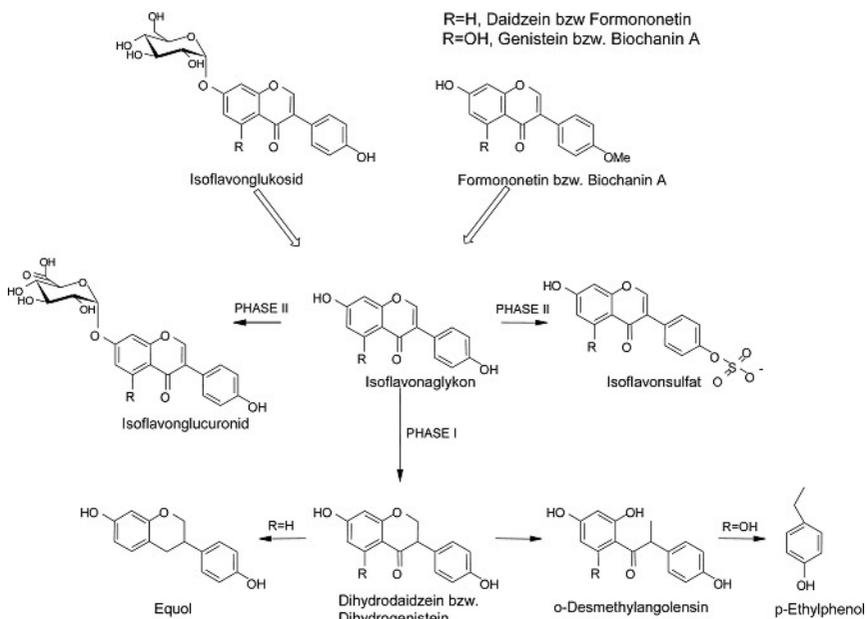


Abb. 2. Metabolismus der Isoflavone (gezeigt sind nur die Hauptmetabolite).

sie in der Nahrung vorliegen (Aglycon oder Konjugat) [41, 42]. In Sojabohnen liegen DAI und GEN hauptsächlich als Glucoside, Acetylglucoside oder Malonylglucoside vor, die vor der Resorption dekonjugiert werden müssen. Die Zuckerreste können durch Magensäure, β -Glucosidasen und/oder bakterielle Enzyme im Darm abgespalten werden [43]. In Abb. 2 sind die Hauptwege des Isoflavon-Metabolismus durch Phase-II-Enzyme zu Glucuroniden, Sulfaten oder Sulfato-Glucuroniden dargestellt. Die Konjugate werden schnell über den Urin ausgeschieden.

Für die hormonelle Aktivität sind die Konjugate der Isoflavone und des BPA von untergeordneter Bedeutung, da sie nicht hinreichend an den intrazellulären Östrogen-Rezeptor binden [35,44–46]. Im Gegensatz dazu hat EQ *in vitro* eine ähnliche oder sogar größere östrogene Wirkung als DAI [47, 48]. In der Bevölkerung sind 30-50% so genannte Equol-Ausscheider, die DAI zu EQ metabolisieren können [17, 42, 49, 50]. Daher sollte bei der Analyse von Isoflavonen im Urin EQ möglichst immer mitbestimmt werden.

Autoren: *S. Moors, M. Blaszkewicz*

Prüfer: *D. Barr*

Bisphenol A, Genistein, Daidzein und Equol in Urin

B

Matrix:	Urin
Arbeitsstoffe:	Bisphenol A, Genistein, Daidzein
Analyt. Messprinzip:	Kapillargaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS)
Abgeschlossen im:	November 2007

Inhalt

1	Grundlage des Verfahrens
2	Geräte, Chemikalien und Lösungen
2.1	Geräte
2.2	Chemikalien
2.3	Lösungen
2.4	Vergleichsstandards
2.4.1	Interner Standard
2.4.2	Vergleichsstandards
3	Probenahme und Probenaufbereitung
3.1	Probenahme
3.2	Probenaufbereitung
4	Instrumentelle Arbeitsbedingungen
4.1	Gaschromatographische Arbeitsbedingungen
4.2	Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen
5	Analytische Bestimmung
6	Kalibrierung
7	Berechnung der Analysenergebnisse
8	Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung
9	Beurteilung des Verfahrens
9.1	Präzision
9.2	Richtigkeit
9.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze
9.4	Validierungsdaten der Methodenvariante
9.5	Störeinflüsse
10	Diskussion der Methode
11	Literatur

2 Bisphenol A und Isoflavone

1 Grundlage des Verfahrens

Zur Bestimmung der Isoflavone Genistein und Daidzein, des Daidzein-Metaboliten Equol und von Bisphenol A in humanen Urinproben werden die Proben mit den internen Standardsubstanzen versetzt. Anschließend werden die enthaltenen Analytkonjugate enzymatisch gespalten und mittels Festphasenextraktion gereinigt und angereichert. Die Analyten werden in Silylether-Derivate überführt und nach gaschromatographischer Trennung massenspektrometrisch detektiert.

2 Geräte, Chemikalien und Lösungen

2.1 Geräte

- Gaschromatograph mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS), Autosampler und Datensystem zur Auswertung (z. B. Agilent GC 6890N, Quadrupol MS 5973N, Autosampler 7683, Software: Chemstation)
- Kaltaufgabesystem (z. B. Gerstel KAS4 Plus mit Controller 505, Software: Master-Software V1.8x)
- Gaschromatographische Säule: Länge: 15 m, innerer Durchmesser: 0,25 mm, stationäre Phase: 100%-Dimethylpolysiloxan, Filmdicke: 0,25 µm (z. B. DB-1-MS von J&W Scientific)
- pH-Meter (z. B. Metrohm)
- Beheizbarer Schüttler (z. B. Thermomixer Comfort von Eppendorf)
- Vakuum-Station mit Aufsätzen zur Festphasenextraktion und Trocknungsaufsatz (z. B. Phenomenex)
- Vakuumzentrifuge (z. B. SPD 111V Speedvac, RVT 400 von Thermo Savant)
- gekühlte Vakuumfalle (z. B. VN 100 Vakuum Controller von Thermo Electron)
- Membran-Vakuumpumpe (z. B. MZ2C von Vaccubrand)
- Ultraschallbad (z. B. Sonorex Rk 102H von Bandelin)
- Vortex-Mixer (z. B. Heidolph)
- Zentrifuge (z. B. Eppendorf)
- Eppendorf-Gefäße 0,5 mL, 1,5 mL und 2,0 mL (z. B. Eppendorf)
- Diverse Bechergläser und Glasflaschen (z. B. Brand, Schott)
- Festphasensäulen C18 (z. B. Empore Extraction Cartridge 4115 C18SD 4 mm i. D. × 1 mL von 3M)
- Festphasensäulen Lichrolut® RP 18 (500 mg, 3 mL Standard PP-Röhrchen, z. B. Merck)
- Verschiedene Messkolben (z. B. Brand)
- Verschiedene Pipetten mit variablen Volumina (z. B. Eppendorf, Gilson)
- Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf, Sarstedt)
- 2-mL-Probenials aus Borosilikatglas mit 0,2-mL-Borosilikatglaseinsätzen mit Polymerfuß und Schraubkappen und Silicon/PTFE Septen (z. B. VWR)
- Mikroliter-Spritzen 10 µL und 25 µL (z. B. Hamilton, SGE)

2.2 Chemikalien

- Bisphenol A, 99% (z. B. Sigma Aldrich, Nr. 239658)
- $^{13}\text{C}_{12}$ -Bisphenol A (Ring- $^{13}\text{C}_{12}$), 99% (z. B. Cambridge Isotope Laboratories, Nr. CLM-4325)
- Daidzein, $\geq 98\%$ (z. B. Fluka, Nr. D7802)
- D_3 -Daidzein ($3',5',8\text{-D}_3$), 97% (z. B. Cambridge Isotope Laboratories, Nr. DLM-4461)
- Equol, $\geq 99,0\%$ (z. B. Fluka, Nr. 45405)
- Genistein, $\geq 98\%$ (z. B. Fluka, Nr. G6649)
- D_4 -Genistein ($3',5',6,8\text{-D}_4$), 95% (z. B. Cambridge Isotope Laboratories, Nr. DLM-4460)
- Acetonitril, suprasolv (z. B. Merck, Nr. 100017)
- Ascorbinsäure, $\geq 99\%$ (z. B. Sigma, Nr. A5960)
- Eisessig p. a. (z. B. Merck, Nr. 100063)
- Ethylacetat, für die Gaschromatographie (z. B. Merck, Nr. 110972)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), wasserfrei (z. B. Aldrich, Nr. 431788)
- n-Hexan, für die Gaschromatographie (z. B. Merck, Nr. 104371)
- Methanol p. a. (z. B. Merck, Nr. 106018)
- Natriumacetattrihydrat p. a. (z. B. Merck, Nr. 106267)
- MTBSTFA mit 1% TBDMCS (N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoracetamid mit 1% tert-butyldimethylchlorsilan) (z. B. Aldrich, Nr. 375934)
- β -Glucuronidase (Escherichia coli K12) (z. B. Roche, Nr. 03707580001)
- Sulfatase (Abalone entrails, Type VIII) (z. B. Sigma-Aldrich, Nr. S9754)
- Wasser, bidestilliert
- Stickstoff 5.0
- Helium 4.6

2.3 Lösungen

- Hydrolysepuffer:
13,6 g Natriumacetattrihydrat, 1,0 g Ascorbinsäure und 0,1 g EDTA werden in ein 200-mL-Becherglas eingewogen und in ca. 70 mL bidest. Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung mit Eisessig auf pH = 5 eingestellt, in einen 100-mL-Messkolben überführt und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. Der Hydrolysepuffer sollte farblos sein.
- β -Glucuronidase-Lösung:
Die in Glycerin gelöste β -Glucuronidase (140 U/mL) kann direkt verwendet werden. Für die Isoflavonanalytik sollte vor der Verwendung eine Reinigung von eventuell vorhandenen Isoflavonen erfolgen. Dazu wird die Glucuronidase über eine mit Methanol und bidest. Wasser konditionierte Lichrolut RP18-Säule gegeben.
- Sulfatase-Lösung:
500 U Sulfatase werden in 5 mL bidest. Wasser gelöst, in 0,5-mL-Eppendorf-Gefäßen zu je 100 μL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert

4 Bisphenol A und Isoflavone

(100 U/mL). Nach Ansatz ist diese Lösung bei -20°C max. 1 Jahr verwendbar. Einmal aufgetaute Lösungen sollten nicht wieder eingefroren werden.

- Enzymmischung (β -Glucuronidase/Sulfatase, 2 : 1):
200 μL der β -Glucuronidase-Lösung und 100 μL der Sulfatase-Lösung werden in ein 0,5-mL-Eppendorfgesäß pipettiert und gut durchmischt. Die Enzymmischung muss für jede Analysenserie frisch hergestellt werden.
- Waschlösung (5% Methanol in Wasser):
In einem 50-mL-Messkolben werden etwa 20 mL bidest. Wasser vorgelegt, 2,5 mL Methanol zugegeben und der Kolben mit bidest. Wasser aufgefüllt.
- Elutionslösung (Ethylacetat/Acetonitril, 1 : 1):
In einem 50-mL-Messkolben werden genau 25 mL Ethylacetat pipettiert und der Kolben mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt.

2.4 Vergleichsstandards

2.4.1 Interner Standard

- Stammlösung der internen Standards:
200 μL d_3 -Daidzein ($c = 60 \mu\text{g}/\text{mL}$), 120 μL d_4 -Genistein ($c = 100 \mu\text{g}/\text{mL}$) und 60 μL $^{13}\text{C}_{12}$ -Bisphenol A ($c = 100 \mu\text{g}/\text{mL}$) werden in ein 2-mL-Probenvial pipettiert und 220 μL Acetonitril zugegeben. Die Stammlösung enthält je 20 mg/L d_3 -Daidzein und d_4 -Genistein sowie 10 mg/L $^{13}\text{C}_{12}$ -Bisphenol A.
- Dotierlösung der internen Standards:
200 μL der IS-Stammlösung werden in ein 2-mL-Probenvial pipettiert und mit 1800 μL bidest. Wasser gemischt. Die Dotierlösung enthält je 2 mg/L d_3 -Genistein und d_4 -Daidzein sowie 1 mg/L $^{13}\text{C}_{12}$ -Bisphenol A.

2.4.2 Vergleichsstandards

- Stammlösung Genistein ($c = 50 \text{ mg}/\text{L}$):
In einem 100-mL-Messkolben werden genau 5 mg Genistein eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Stammlösung Daidzein ($c = 50 \text{ mg}/\text{L}$):
In einem 100-mL-Messkolben werden genau 5 mg Daidzein eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Stammlösung Equol ($c = 50 \text{ mg}/\text{L}$):
In einem 20-mL-Messkolben wird genau 1 mg Equol eingewogen und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Stammlösung Bisphenol A ($c = 2,2 \text{ g}/\text{L}$):
In einem 50-mL-Messkolben werden genau 110 mg BPA vorgelegt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

Die Stabilität der Stammlösungen wurde nicht überprüft. Über einen Zeitraum von > 3 Monaten zeigten sich jedoch keine relevanten Veränderungen bei Kalibrierungen, die aus der gleichen Stammlösung angesetzt wurden.

Verdünnungen zur Kalibrierung

- Bisphenol A Vorverdünnung ($c = 22 \text{ mg/L}$):
1 mL der BPA-Stammlösung wird in einem 100-mL-Messkolben vorgelegt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Dotierlösung I ($c = 5 \text{ mg/L}$ bzw. $1,1 \text{ mg/L}$):
Je 1 mL der Stammlösungen von Equol, Daidzein und Genistein sowie 500 μL der Bisphenol A Vorverdünnung werden in einen 10-mL-Messkolben pipettiert und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Dotierlösung I enthält je 5 mg/L EQ, DAI und GEN sowie 1,1 mg/L BPA.
- Dotierlösung II ($c = 0,5 \text{ mg/L}$ bzw. $0,11 \text{ mg/L}$):
1 mL der Dotierlösung I wird in einen 10-mL-Messkolben pipettiert und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Dotierlösung II enthält je 0,5 mg/L EQ, DAI und GEN sowie 0,11 mg/L BPA.

Kalibrierung

Die Kalibrierstandards werden entsprechend Tabelle 2 in 1,5-mL-Eppendorfgefäßen angesetzt. Für die Kalibrierung sollte ein isoflavonarmer Poolurin verwendet werden, der von Probanden gewonnen wurde, die sich mindestens 2,5 Tage isoflavonarm ernährt haben (vor allem Verzicht auf Sojaprodukte). Der Blindwert der hergestellten Kalibrierreihe sollte möglichst keine quantifizierbaren Analytsignale zeigen.

Tab. 2. Pipettierschema zur Erstellung der Kalibrierreihe.

Kalibrier-Standard	Dotierung [$\mu\text{g/L}$]		Poolurin [μL]	Dotier-lsg. I [μL]	Dotier-lsg. II [μL]	IS-Dotier-lsg. [μL]
	EQ, DAI, GEN	BPA				
Blindwert	–	–	200	–	–	–
K0	0	0	200	–	–	8
K1	12,5	2,8	200	–	5	8
K2	25,0	5,5	200	–	10	8
K3	50,0	11,0	200	–	20	8
K4	100	22,0	200	4	–	8
K5	250	55,0	200	10	–	8

3 Probenahme und Probenaufbereitung

3.1 Probenahme

Zur Bestimmung einer Hintergrundbelastung gelten keine zeitlichen Einschränkungen für die Probenahme. Bis zur Aufarbeitung werden die Urinproben bei -20°C in Polyethylenbehältern aufbewahrt.

6 Bisphenol A und Isoflavone

3.2 Probenaufbereitung

Die Urinprobe wird vor der Analyse aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Ein 200- μ L-Aliquot der Probe wird in ein 1,5-mL-Eppendorfgefäß überführt, mit 8 μ L Doterlösung der internen Standards versetzt und kurz geschüttelt.

Hydrolyse

Die Probe wird mit 10 μ L des Hydrolysepuffers und 12 μ L der Enzymmischung versetzt und anschließend über Nacht (17 h) in einem beheizbaren Schüttler bei 37°C und maximaler Schüttelstufe inkubiert.

Festphasenextraktion (SPE)

Zur Konditionierung werden auf die SPE-C18-Säulen je 300 μ L Methanol gegeben und unter Vakuum fast vollständig durchgesaugt. Anschließend wird auf jede Säule 300 μ L bidest. Wasser gegeben und ebenfalls unter Vakuum durchgesaugt. Es ist darauf zu achten, dass die SPE-Säulen nie vollständig trocken laufen!

Die über Nacht hydrolysierte Probe wird 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Anschließend wird die gesamte Lösung mithilfe einer 300- μ L-Pipette auf die konditionierte SPE-Säule gegeben und unter Vakuum fast vollständig durch die SPE-Säule gesaugt. Es ist erneut darauf zu achten, dass die SPE-Säule nicht vollständig trocken läuft. Anschließend wird die Säule mit 300 μ L der Waschlösung (5% Methanol in Wasser) gewaschen und dann 10 min unter Vakuum getrocknet. Die Elution der Analyten erfolgt mit 300 μ L der Elutionslösung (Ethylacetat/Acetonitril) in ein neues 1,5-mL-Eppendorfgefäß. Die Elutionslösung wird dazu unter leichtem Vakuum langsam durch die SPE-Säule gesaugt. Eine Zweiphasenbildung im Eppendorfgefäß zeigt eine ungenügende Trocknung an, die sich aber nicht negativ auf die weitere Aufarbeitung auswirkt. Anschließend wird die Probe mittels Vakuumzentrifuge bei 40°C zur Trockne gebracht (ca. 1 bis 2 h).

Derivatisierung (Silylierung)

Die getrocknete Probe wird mit 50 μ L des Silylierungsmittels (MTBSTFA mit 1% TBDMCS) versetzt, etwa 2 min im Ultraschallbad inkubiert und kurz gevortext. Anschließend wird die Probe bei 75°C für 30 min im beheizbaren Schüttler inkubiert (höchste Schüttelstufe). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Probenlösung im Stickstoffstrom unter leichter Erwärmung (40°C) zur Trockne gebracht.

Nach Zugabe von 70 μ L n-Hexan wird die Probe für 1 min im Ultraschallbad inkubiert, kurz gevortext und dann 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend mit einer Pipette in 2-mL-Probenvials mit Mikroeinsetz überführt und sofort analysiert.

4 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die Analyse der nach Abschnitt 3 vorbereiteten Proben erfolgt auf einem GC-MS-Gerät mit folgenden Systemparametern:

4.1 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	DB1-MS
	Länge:	15 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Temperaturen:	Säule:	2 min bei 160°C; dann Anstieg 30°C/min auf 310°C; 5 min bei Endtemperatur
	Injektor:	0,08 min bei 25°C; dann Anstieg 12°C/s auf 320°C; 2 min halten; dann Anstieg 12°C/s auf 400°C
	Transferline:	280°C
Injektion:	Liner:	Standardliner mit Verwirbelungseinstichen
Methode:	Kaltaufgabesystem (CAS 4 plus)	20 µL solvent-vent Injektion, 200 mL/min Helium; solvent-vent (im splitvent: 100 mL/min (Liner ausheizen))
	Geschwindigkeit:	4 µL/s
Trägergas:	Helium 4.6	
	konstanter Fluss:	2,0 mL/min

4.2 Massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Ionisationsart:	Elektronenstoßionisation (EI)
Temperaturen:	Quelle: 230°C
	Quadrupol: 150°C
Ionisationsenergie:	70 eV

Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

5 Analytische Bestimmung

Zur gaschromatographischen Analyse wird für eine zusätzliche Anreicherung der Analyten mit einem Kaltaufgabesystem gearbeitet, bei dem ein 20-µL-Aliquot der Probenlösung injiziert und eingengt wird. Bei jeder Analysenserie werden ein Blindwert, eine

8 Bisphenol A und Isoflavone

Tab. 3. Retentionszeiten und registrierte Massen.

Parameter	Retentionszeit [min]	Quantifier [m/z]	Qualifier [m/z]
Bisphenol A	5,1	441	213, 456
¹³ C ₁₂ -Bisphenol A	5,1	453	225, 468
Equol	6,0	470	234
Daidzein	6,8	425	482
D ₃ -Daidzein	6,8	428	485
Genistein	7,2	555	–
D ₄ -Genistein	7,2	558	–

Qualitätskontrollprobe sowie ein hoher und ein niedriger Kalibrierstandard zur Kontrolle mitgeführt.

Es werden die zeitlichen Verläufe der in Tabelle 3 aufgeführten Ionenspuren im Single-Ion-Monitoring-Modus (SIM) registriert. Die in Tabelle 3 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Kapillarsäule und des daraus resultierenden Retentionsverhaltens der Substanzen zu überzeugen.

In Abb. 3 (im Anhang) ist das Chromatogramm eines K2-Kalibrierstandards dargestellt, das mit einem Injektionsvolumen von 20 µL mittels Kaltaufgabesystem (solvent vent) erzeugt wurde. Abb. 4 (im Anhang) zeigt ein Chromatogramm der Standardlösungen von BPA, Daidzein und Genistein zusammen mit den jeweiligen internen Standards.

6 Kalibrierung

Die Kalibrierstandards werden analog zu den Angaben in Abschnitt 3.2 aufgearbeitet und entsprechend Abschnitt 4 und 5 mittels GC-MS analysiert. Die Kalibriergeraden werden erstellt, indem die Quotienten aus den Peakflächen der Analyten und des jeweiligen internen Standards gebildet und gegen die dotierte Konzentration aufgetragen werden. Da für Equol kein eigener isotope markierter Standard vorhanden ist, wird der Daidzein-Metabolit mit Hilfe von ¹³C₁₂-BPA als internem Standard quantifiziert. Dieser Standard zeigte gegenüber den isotope markierten Isoflavonen bessere Ergebnisse für Equol. Für die Routineanalytik empfiehlt es sich einmal pro Woche eine komplette Kalibrierung durchzuführen. Ansonsten sollte je Analysenserie ein Blindwert, eine Qualitätskontrollprobe sowie ein hoher und ein niedriger Kalibrierstandard zur Kontrolle mitgeführt werden. Die Kalibrierkurve ist zwischen den Nachweisgrenzen und einer Konzentration von je 250 µg DAI, GEN, EQ bzw. 110 µg BPA pro Liter Urin linear. Abb. 5 (im Anhang) zeigt beispielhaft die Kalibriergeraden der vier Analyten.

7 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Bestimmung des Analytgehaltes einer Probe wird der Quotient der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des dazugehörigen internen Standards gebildet und in die

entsprechende nach Abschnitt 6 erstellte Kalibriergerade eingesetzt. Man erhält den Analytgehalt in μg je Liter Urin.

8 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den speziellen Vorbemerkungen dieses Werkes verfahren [51–53]. Zur Absicherung der Analysenergebnisse sind Doppelbestimmungen vorteilhaft.

Zur Präzisionskontrolle wird innerhalb jeder analytischen Serie eine dotierte Urinprobe analysiert, die eine konstante und bekannte Konzentration an den untersuchten Östrogenen enthält. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial durch Dotierung von isoflavonarmem Poolurin (siehe Punkt Kalibrierung unter Abschnitt 2.4) selbst hergestellt werden. Das Qualitätskontrollmaterial wird anschließend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration des Kontrollmaterials sollte im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegen. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt [53].

Durch die messtägliche Kontrolle von zwei Kalibrierstandards sowie einem Reagenzienleerwert, kann auf das stete Mitführen einer kompletten Kalibrierung verzichtet werden. Bei einer Abweichung der beiden Kalibrierstandards von der vorgegebenen Schwankungsbreite (15–20%), sollte jedoch eine erneute vollständige Kalibrierung erfolgen. Das Mitführen eines Leerwerts durch den Analysengang ist unerlässlich, um Kontaminationen in den Analyseschritten zu erkennen.

9 Beurteilung des Verfahrens

9.1 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurden dotierte Urinproben mit niedriger und hoher Analytkonzentration je viermal parallel aufgearbeitet und analysiert. Die so ermittelten Präzisionen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden sechs mit Standardlösungen dotierte Urinproben an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

10 Bisphenol A und Isoflavone

Tab. 4. Präzisionen in der Serie (n = 4).

Parameter	Dotierte Analytkonzentration [$\mu\text{g/L}$]		Standardabweichung (rel.) [%]		Streubereich [%]	
	Urin 1	Urin 2	Urin 1	Urin 2	Urin 1	Urin 2
Genistein	10	125	17	3	54	10
Daidzein	10	125	5	7	16	22
Equol	10	125	6	5	19	16
Bisphenol A	2,2*	27,5	7	5	22	16

* Diese Konzentration liegt unterhalb der durch die Schwankung der Kalibrierfunktionen bestimmten Nachweisgrenzen, ließ sich aber dennoch gut bestimmen, allerdings kam es gelegentlich im niedrigen Konzentrationsbereich zu größeren Schwankungen (siehe Abschnitt 9.5).

Tab. 5. Präzisionen von Tag zu Tag (n = 6).

Parameter	Dotierte Analytkonzentration [$\mu\text{g/L}$]	Standardabweichung (rel.) [%]	Streubereich [%]
Genistein	75	18	46
Daidzein	75	9	23
Equol	75	15	39
Bisphenol A	16,5	10	26

9.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde durch Wiederfindungsversuche mit dotierten Urinproben überprüft. Dazu wurde Poolurin mit definierten Analytkonzentrationen dotiert, vierfach aufgearbeitet und analysiert. Die Bestimmung erfolgte sowohl in Serie als auch von Tag zu Tag. Die so ermittelten, mittleren relativen Wiederfindungsraten sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab. 6. Relative Wiederfindungsraten in Serie und von Tag zu Tag (n = 4).

Parameter	Dotierte Analytkonzentration [$\mu\text{g/L}$]	Mittlere relative Wiederfindung [%] (n = 4)	
		In Serie	Von Tag zu Tag
Genistein	10	119	–
	75	–	126
	125	114	105
Daidzein	10	108	–
	75	–	127
	125	109	104
Equol	10	104	–
	75	–	90
	125	89	112
Bisphenol A	16,5	–	119
	27,5	94	90

9.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach der DIN-Methode 32645 (Kalibriergeradenmethode) berechnet. Dazu wurden für jeden Analyten drei unabhängige Kalibrierungen mit je 10 Kalibrierpunkten erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, berechnet nach DIN 32645.

Parameter	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]
Genistein	5	18
Daidzein	4	9
Equol	4	11
Bisphenol A	3	7

9.4 Validierungsdaten der Methodenvariante

Als Alternative zur direkten splitless-Injektion von 20 μL der aufgearbeiteten Probenlösung (vergleiche Abschnitt 3.2) kann die Methode auch ohne Einsatz eines Kaltaufgabesystems durchgeführt werden. Dazu werden nur 2 μL der Probenlösung direkt (splitless) in das GC-MS-System injiziert. Im Rahmen der erfolgreichen Methodenprüfung wurde diese Methodenvariante angewandt. Die damit erhaltenen Validierungsdaten sind in Tabelle 8 dargestellt. Trotz des 10fach geringeren Injektionsvolumens liegen die Nachweisgrenzen bei dieser Methodenvariante nur um den Faktor 2–4 höher.

Tab. 8. Validierungsdaten bei Einsatz der Methodenvariante (Injektionsvolumen: 2 μL).

Parameter	Dotierte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	BPA	Equol	Daidzein	Genistein
Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]		5	15	11	9
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]		9	29	26	20
Präzision in Serie [%; n = 6]	50	8	12	8	11
	125	5	9	5	7
Präzision von Tag zu Tag [%; n = 4]	50	7	13	9	12
	125	8	9	8	9
rel. Wiederfindungsrate (Richtigkeit) [%; n = 4]	30	109 \pm 10	102 \pm 6	110 \pm 5	115 \pm 7
	50	101 \pm 4	102 \pm 4	100 \pm 5	99 \pm 5
	125	100 \pm 4	100 \pm 2	99 \pm 4	98 \pm 4
Absolute Wiederfindung nach Extraktion [%; n = 6]		81 \pm 2	88 \pm 4	85 \pm 5	90 \pm 2

12 Bisphenol A und Isoflavone

9.5 Störeinflüsse

BPA ist ubiquitär vorhanden und kommt u. a. auch in Hausstaub vor. Beim Aufarbeiten der Proben ist deshalb auf besondere Sauberkeit zu achten. Unzureichend gespülte Gefäße können sonst zu einem nicht unerheblichen Blindwert an BPA führen. Auch das verwendete bidestillierte Wasser kann unter Umständen BPA enthalten. Daher sollte das verwendete Wasser vorher gereinigt werden, indem es durch eine mit Methanol konditionierte Lichrolut RP 18 Säule geführt wird. Zur Kontrolle des Blindwerts ist bei jeder Analysenserie unbedingt ein Reagenzienleerwert mitzuführen.

Das Fragmentierungsmuster der Analyten im Massenspektrometer wird durch den pH-Wert stark beeinflusst. Daher erfolgt im Rahmen der Probenaufarbeitung eine Pufferung der Urinproben, so dass eine dahingehende Störung der Analysenergebnisse vermieden wird. Bei sehr hoch konzentrierten Proben, insbesondere bei Urinproben von Probanden, die sich sojareich ernähren (z. B. asiatische Küche), ist mit Verschleppungen bei der Injektion im Kaltaufgabesystem zu rechnen. In diesem Fall sollte der Ausheisschritt des Liners verlängert bzw. modifiziert werden oder es sollten alternativ direkt 2 µL der Probe injiziert werden (siehe auch Abschnitt 10).

Um den Memory-Effekt zu minimieren, empfiehlt sich zudem ein regelmäßiges Einspritzen von reinem n-Hexan zwischen den zu analysierenden Proben, insbesondere aber nach hoch konzentrierten Proben. Wird der lineare Bereich der Methode überschritten, sollten die Proben nochmals verdünnt aufgearbeitet werden.

10 Diskussion der Methode

Die vorliegende Methode wurde basierend auf den Arbeiten von Liggins et al., Setchell et al. und Moors et al. [54–56] entwickelt und ermöglicht die sensitive Bestimmung der östrogen wirkenden Substanzen Genistein, Daidzein, Equol und Bisphenol A. Da die genannten Stoffe vorwiegend als Konjugate über den Urin ausgeschieden werden, erfolgt die Bestimmung im Urin nach einer Hydrolyse, bei der Glucuronide und Sulfate gespalten werden. Um eine empfindliche Erfassung der Parameter mittels GC-MS zu gewährleisten, erfolgt die Bestimmung der Analyten nach Derivatisierung der freien Hydroxylgruppen. In Abb. 6 ist die angewandte Silylierungsreaktion am Beispiel von GEN dargestellt.

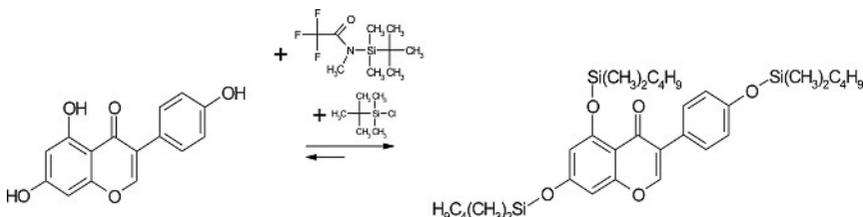


Abb. 6. Derivatisierungsreaktion am Beispiel von Genistein.

Die Bedeutung der Methode liegt maßgeblich im umweltmedizinischen Bereich, da die Phytoöstrogene DAI und GEN fast ausschließlich über die Nahrung aufgenommen werden. Für die Großchemikalie Bisphenol A, der ebenfalls eine östrogene Wirkung zugeschrieben wird, ist dagegen auch eine arbeitsmedizinische Relevanz gegeben.

Durch die simultane Erfassung von vier wichtigen hormonell aktiven Substanzen ist das Analysenverfahren für vielfältige arbeits- und umweltmedizinische Anwendungen einsetzbar.

Zur Empfindlichkeitsteigerung wurde bei der vorliegenden Methode mit einem Kaltaufgabesystem gearbeitet, wobei 20 µL der Probenlösung eingespritzt und durch ein Temperaturprogramm im Injektorblock eingengt werden. Alternativ ist die Durchführung der Methode aber auch möglich, indem direkt 2 µL der aufgearbeiteten Probe in das GC-MS-Gerät injiziert werden. Die Nachweisgrenzen liegen bei Verwendung der Methodenalternative um den Faktor 2 bis 4 höher. Der lineare Arbeitsbereich des Verfahrens ist durch die Detektorkapazität nach oben begrenzt, welche bei dem hier verwendeten Massenspektrometer Agilent MSD 5973N bei circa 130 Mio. Flächeneinheiten liegt. Bei einem Aufgabevolumen von 20 µL im Kaltaufgabemodus lag diese Grenze bei circa 300 bis 400 µg Analyt je Liter Urin. Urinproben mit derartig hohen Isoflavongehalten sind z. B. bei Personen zu erwarten, die viele Sojaprodukte zu sich nehmen. Durch eine verdünnte Aufarbeitung können die genannten Östrogene aber auch in hoch konzentrierten Proben zuverlässig ermittelt werden.

Verwendete Messgeräte

Gaschromatograph (GC 6890, Agilent, USA) mit Quadrupol-Massenspektrometer (5973N, Agilent, USA) und automatischem Probengeber.

11 Literatur

- [1] *National Research Council*: Hormonally Active Agents in the Environment. National Academy Press, Washington DC (1999).
- [2] *G.H. Degen und H.M. Bolt*: Endocrine disruptors: Update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73, 433–441 (2000).
- [3] *S. Fritsche und H. Steinhart*: Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 153–179 (1999).
- [4] *G.H. Degen*: Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 9, 848–856 (2004).
- [5] *K. Reinli und G. Block*: Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* 26, 123–148 (1996).
- [6] *W.H. Tolleson, D.R. Doerge, M.I. Churchwell, M.M. Marques, D.W. Roberts*: Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4783–4790 (2002).
- [7] *H. Hur und F. Rafii*: Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 192, 21–25 (2000).
- [8] *H. Saloniemi, K. Wähälä, P. Nykänen-Kurki, K. Kallela, I. Saastamoinen*: Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 13–17 (1995).
- [9] *W. Mazur*: Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 729–742 (1998).

14 Bisphenol A und Isoflavone

- [10] *A.A. Franke, L.J. Custer, C.M. Cerna, K.K. Narala*: Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1905–1913 (1994).
- [11] *J. Liggins, L.J. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W.A. Coward, S.A. Bingham*: Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J. Nutr. Biochem.* 11, 326–331 (2000).
- [12] *O. Lapcik, M. Hill, R. Hampl, K. Wähälä, H. Adlercreutz*: Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 63, 14–20 (1998).
- [13] *U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service*: USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods. Release 1.3 (2002). URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>, aufgerufen am 06.06.2011.
- [14] *L.K. Boker, Y.T. Van der Schouw, M.J. De Kleijn, P.F. Jacques, D.E. Grobbee, P.H. Peeters*: Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J. Nutr.* 132, 1319–1328 (2002).
- [15] *M.J. De Kleijn, Y.T. Van der Schouw, P.W. Wilson, H. Adlercreutz, W. Mazur, D.E. Grobbee, P.F. Jacques*: Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study (1–4). *J. Nutr.* 131, 1826–1832 (2001).
- [16] *P.L. Horn-Ross, S. Barnes, M. Lee, L. Coward, J.E. Mandel, J. Koo, E.M. John, M. Smith*: Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control* 11, 289–298 (2000).
- [17] *Y. Arai, M. Uehara, Y. Sato, M. Kimira, A. Eboshida, H. Adlercreutz, S. Watanabe*: Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J. Epidemiol.* 10, 127–135 (2000).
- [18] *T. Usui*: Pharmaceutical prospects on phytoestrogens. *Endocr. J.* 53, 7–20 (2006).
- [19] *E. Bowey, H. Adlercreutz, I. Rowland*: Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germfree and human flora associated rats. *Food Chem. Toxicol.* 41, 631–636 (2003).
- [20] *L.N. Vandenberg, M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto*: Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30, 75–95 (2009).
- [21] *H. Greim* (Hrsg): Bisphenol A. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 23. Lieferung, VCH-Verlag, Weinheim (1996).
- [22] *H. Greim und H. Drexler* (Hrsg): Bisphenol A. Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und Biologische Leitwerte (BLW). 14. Lieferung, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim (2007).
- [23] *A. Goodson, W. Summerfield, I. Cooper*: Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit. Contam.* 19, 796–802 (2002).
- [24] *B.L. Tan und A.M. Mustafa*: Leaching of bisphenol A from new and old babies' bottles, and new babies' feeding teats. *Asia Pac. J. Public Health* 15, 118–123 (2003).
- [25] *Scientific Committee on Food*: Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A (expressed on 17 April 2002). European Commission, URL: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out128_en.pdf, aufgerufen am 06.06.2011.
- [26] *G.H. Degen, H. Foth, R. Kahl, H. Kappus, H.G. Neumann, F. Oesch, R. Schulte-Hermann*: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene. Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT. *Umweltmed. Forsch. Praxis* 4, 367–374 (1999).
- [27] *G.H. Degen, P. Janning, J. Wittsiepe, A. Upmeyer, H.M. Bolt*: Integration of mechanistic data in the toxicological evaluation of endocrine modulators. *Toxicol. Lett.* 127, 225–237 (2002).
- [28] *G. Eisenbrand, B. Müßler, G.H. Degen*: Kombinationswirkungen hormonartig wirkender Chemikalien. In: *H.M. Bolt, B. Griefahn, H. Heuer, W. Laurig* (Hrsg): Arbeitsphysiologie heute. Band 2. IfADo, Dortmund, S. 27–39 (2000).
- [29] *P. Diel, T. Schulz, K. Smolnikar, E. Strunck, G. Vollmer, H. Michna*: 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, 1–10 (2000).
- [30] *P. Diel, S. Schmidt, G. Vollmer, P. Janning, A. Upmeyer, H. Michna, H.M. Bolt, G.H. Degen*: Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch. Toxicol.* 78, 183–193 (2004).

- [31] *S. Schmidt, G.H. Degen, J. Seibel, T. Hertrampf, G. Vollmer, P. Diel*: Hormonal activity of combinations of genistein, bisphenol A and 17 β -estradiol in the female Wistar rat. *Arch. Toxicol.* 80, 839–845 (2006).
- [32] *P. Janning, U.S. Schuhmacher, A. Upmeyer, P. Diel, H. Michna, G.H. Degen, H.M. Bolt*: Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Arch. Toxicol.* 74, 421–430 (2000).
- [33] *T. Bayer, T. Colnot, W. Dekant*: Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicol. Sci.* 62, 205–211 (2001).
- [34] *G.H. Degen, P. Janning, P. Diel, H. Michna, H.M. Bolt*: Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Arch. Toxicol.* 76, 23–29 (2002).
- [35] *R.W. Snyder, S.C. Maness, K.W. Gaido, F. Welsch, S.C. Sumner, T.R. Fennell*: Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 225–234 (2000).
- [36] *S. Moors, P. Diel, G.H. Degen*: Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application. *Arch. Toxicol.* 80, 647–655 (2006).
- [37] *J.W. Lampe*: Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J. Nutr.* 133, 956S–964S (2003).
- [38] *W. Völkel, T. Colnot, G.A. Csanády, J.G. Filser, W. Dekant*: Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281–1287 (2002).
- [39] *L. Valentin-Blasini, M.A. Sadowski, D. Walden, L. Caltabiano, L.L. Needham, D.B. Barr*: Urinary phytoestrogen concentrations in the U.S. population (1999–2000). *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 15, 509–523 (2005).
- [40] *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*: Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. CDC, Atlanta (GA), 285–306 (2005).
- [41] *K.D. Setchell, N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirscher, J.E. Heubi*: 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, 447–453 (2002).
- [42] *M.S. Faughnan, A. Hawdon, E. Ah-Singh, J. Brown, D.J. Millward, A. Cassidy*: Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br. J. Nutr.* 91, 567–574 (2004).
- [43] *A.J. Day, M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J. Rhodes, M.R. Morgan, G. Williamson*: Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436, 71–75 (1998).
- [44] *J.B. Matthews, K. Twomey, T.R. Zacharewski*: In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptor alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157 (2001).
- [45] *E. Federici, A. Touché, S. Choquart, O. Avanti, L. Fay, E. Offord, D. Courtois*: High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old Glycine max tissue cultures. *Phytochemistry* 64, 717–724 (2003).
- [46] *Y. Zhang, T.T. Song, J.E. Cunnick, P.A. Murphy, S. Hendrich*: Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J. Nutr.* 129, 399–405 (1999).
- [47] *S.O. Mueller, S. Simon, K. Chae, M. Metzler, K.S. Korach*: Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol. Sci.* 80, 14–25 (2004).
- [48] *N. Sathyamoorthy und T.T. Wang*: Differential effects of dietary phytoestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* 33, 2384–2389 (1997).
- [49] *I.R. Rowland, H. Wiseman, T.A. Sanders, H. Adlercreutz, E.A. Bowey*: Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer* 36, 27–32 (2000).

16 Bisphenol A und Isoflavone

- [50] *P.B. Grace, J.I. Taylor, N.P. Botting, T. Fryatt, M.F. Oldfield, S.A. Bingham*: Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 315, 114–121 (2003).
- [51] *Bundesärztekammer*: Qualitätssicherung der quantitativen Bestimmungen im Laboratorium. Neue Richtlinien der Bundesärztekammer. *Dt. Ärztebl.* 85, A699–A712 (1988).
- [52] *Bundesärztekammer*: Ergänzung der „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“. *Dt. Ärztebl.* 91, C159–C161 (1994).
- [53] *J. Angerer, T. Göen, G. Lehnert*: Mindestanforderungen an die Qualität von umweltmedizinisch-toxikologischen Analysen. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 3, 307–312 (1998).
- [54] *J. Liggins, L. Bluck, W.A. Coward, S.A. Bingham*: A simple method for the extraction and quantification of daidzein and genistein in food using gas chromatography mass spectrometry. *Biochem. Soc. Trans.* 26, S87 (1998).
- [55] *K.D. Setchell, N.M. Brown, P. Desai, L. Zimmer-Nechemias, B.E. Wolfe, W.T. Brashear, A.S. Kirschner, A. Cassidy, J.E. Heubi*: Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.* 131, 1362S–1375S (2001).
- [56] *S. Moors, M. Blaszkewicz, H.M. Bolt, G.H. Degen*: Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 787–798 (2007).

Autoren: *S. Moors, M. Blaszkewicz*

Prüfer: *D. Barr*

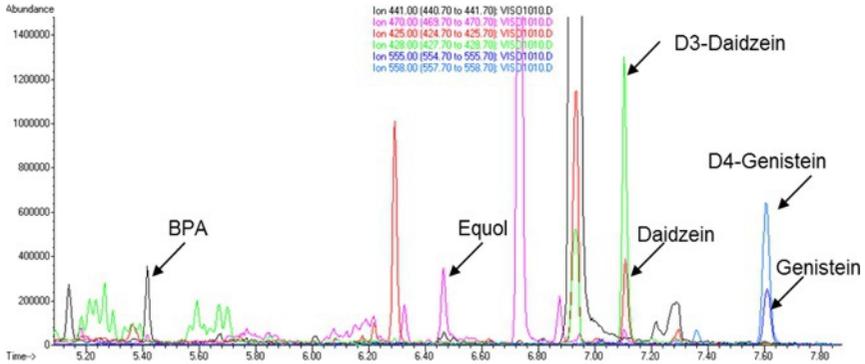


Abb. 3. Chromatogramm eines K2-Kalibrierstandards in Urin.

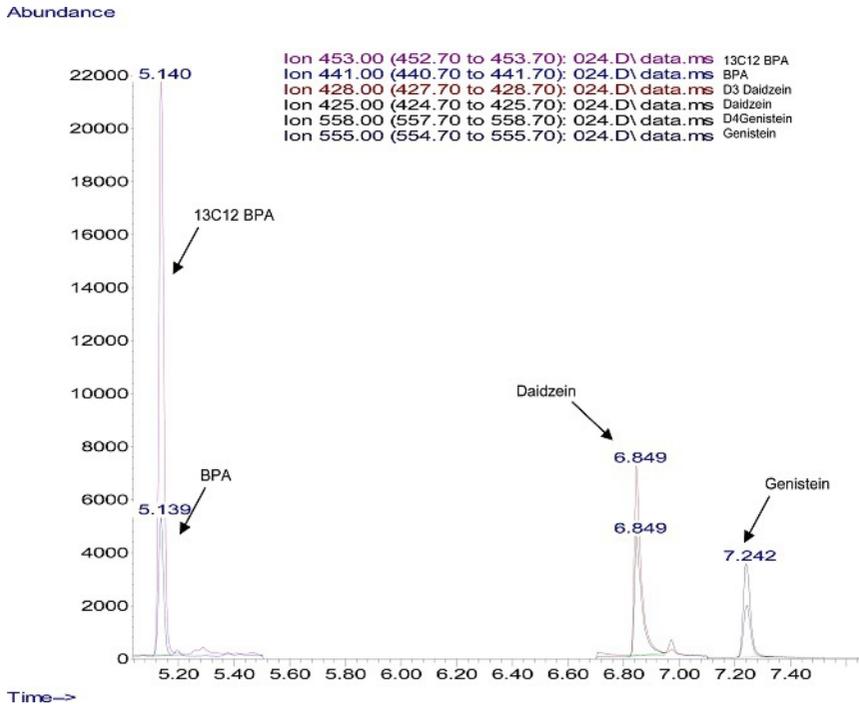


Abb. 4. Chromatogramm der Analyten BPA, Daidzein und Genistein mit internen Standards.

18 Bisphenol A und Isoflavone

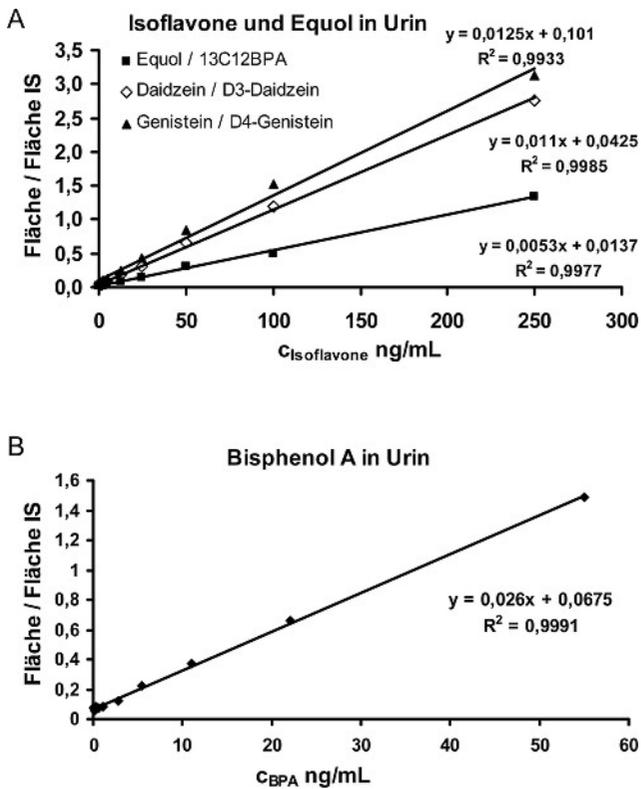
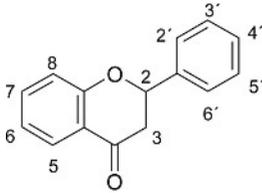


Abb. 5. Kalibrierfunktionen: A: Isoflavone und Equol, B: Bisphenol A.

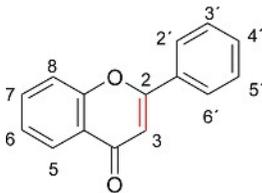


Flavanone



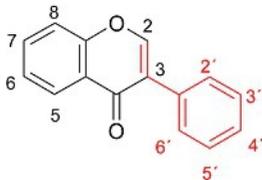
Flavanon
Naringenin: 4', 5, 7-Trihydroxyflavanon

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)

Abb. 7. Grundstruktur der Flavanone, Flavone und Isoflavone.

