

**Entwicklung einer Methode mittels
Gaschromatographie und gekoppeltem *Triple-*
Quadrupol-Massenspektrometer zur Quantifizierung
von Estrogen-Metaboliten in humanem Brustgewebe**



DISSERTATION

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemikerin

Susanne Futh

aus Brandenburg an der Havel

Würzburg 2015

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie



**Entwicklung einer Methode mittels
Gaschromatographie und gekoppeltem *Triple-*
Quadrupol-Massenspektrometer zur Quantifizierung
von Estrogen-Metaboliten in humanem Brustgewebe**

DISSERTATION

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemikerin

Susanne Futh

aus Brandenburg an der Havel

Würzburg 2015

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von September 2010 bis Februar 2014 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. L. Lehmann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie - Lehrstuhl für Lebensmittelchemie - der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 Nr. 3, 6 und 9 der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 1. Oktober 2001, geändert durch die Satzung vom 7. Oktober 2002 und der Satzung vom 14. November 2005.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsfach vorgelegen hat.

Ich erkläre außerdem, dass ich außer dem im Zulassungsgesuch urkundlich nachgewiesenen akademischen Grad keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 30.06.2015

Susanne Futh

Meinen Eltern ...

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. Leane Lehmann für die Überlassung des interessanten Themas, die wertvollen Anregungen, Diskussionen und die konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Lehmann möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Frau Dr. Ulrike Waldhofen, Herrn Prof. Dr. Eckert und Herrn Dr. Gunter Steinmetz danke ich für die Bereitstellung der Gewebespenden im Rahmen der Humanstudie.

Herrn Dr. Harald Esch danke ich für seinen Rat bei analytischen und technischen Fragestellungen und insbesondere für seine Hilfsbereitschaft bei Reparatur- und Wartungsdurchführungen der GC/MS/MS sowie der Organisation der Gewebeentnahmen.

Katja Schmalbach möchte ich für ihre tatkräftige und zuverlässige Unterstützung bei der Präparation der Gewebespenden danken und für die stetige Hilfsbereitschaft bei fachlichen Problemen aller Art.

René Hauptstein und Jan Fuchs danke ich insbesondere für ihre Unterstützung bei Computer- und Software-Problemen.

Markus Zettner danke ich für die Einweisung in die GC/MS/MS und den GC/FID.

Meinen WAASIS Birgit Fuchs, Christoph Peschke und Paul Garbe möchte ich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten danken.

Daniela Martínez Jaramillo, Carolin Kleider, Annette Albrecht und Anne Scheffler möchte ich nicht nur für das fleißige Korrekturlesen großer Abschnitte dieses Manuskriptes danken, sondern auch für das stets offene Ohr bei Problemen jeglicher Art. Eure Freundschaft und die gemeinsamen Erlebnisse waren immer kräfteschöpfend und motivierend, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Auch allen übrigen Doktoranden des Arbeitskreises Lehmann (Sabrina Jäger, Daniela Pemp, Maryam Mahdiani und Benjamin Spielmann) danke ich für die gute und immer faire Zusammenarbeit, für die Hilfe bei fachlichen Problemen und den gemeinsamen Momenten, die stets eine willkommene Abwechslung im Laboralltag waren.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Motivation, ihre Fürsorge und dem Glauben an Mich. Auch für die grenzenlose Unterstützung, während großer Durststrecken auf dem gesamten Weg zu dieser Arbeit und ganz besonders auch für den Rückhalt im letzten Jahr, möchte ich Euch danken. Auch Basti und Steffi bin ich zu Dank verpflichtet. Nicht nur bei Computerproblemen habt ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ohne Euch hätte ich wahrscheinlich nicht die Kraft gehabt, diese Arbeit zu vollenden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
2	EINLEITUNG	1
2.1	Kanzerogenese der Brust	2
2.1.1	Inaktivierung von E2, E1 und deren Metabolite durch Konjugationsreaktionen	4
2.1.2	Prä- und postmenopausale Biosynthese von E2 und E1 in der Brust	7
2.1.3	Methoden- und Gerätebedingte Voraussetzungen zur Quantifizierung von E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe	11
3	PROBLEMSTELLUNG	14
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen	17
4.1.1	Analysengeräte	17
4.1.2	Laborgeräte.....	17
4.1.3	Verbrauchsmaterialien	19
4.1.4	Hilfsmittel	21
4.1.5	Chemikalien	22
4.1.6	Puffer und Lösungen	26
4.2	Methoden	35
4.2.1	Bestimmung einer geeigneten Ionisierungsenergie	35
4.2.1.1	<i>Lösungen</i>	35
4.2.1.2	<i>Durchführung</i>	36
4.2.2	Bestimmung charakteristischer Fragmente im Produktionenscan	36
4.2.2.1	<i>Lösungen</i>	36
4.2.2.2	<i>Durchführung</i>	37
4.2.3	<i>Screening</i> der Kollisionsenergien	37
4.2.3.1	<i>Lösungen</i>	37
4.2.3.2	<i>Durchführung</i>	38
4.2.4	<i>Fine-tuning</i> der Kollisionsenergien	39
4.2.4.1	<i>Lösungen</i>	39
4.2.4.2	<i>Durchführung</i>	39
4.2.5	Optimierung der <i>dwell-time</i>	41
4.2.5.1	<i>Lösungen</i>	41

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.5.2	Durchführung.....	41
4.2.6	Optimierung der <i>Initial</i> -Temperatur.....	42
4.2.6.1	Lösungen.....	43
4.2.6.2	Durchführung.....	43
4.2.7	Optimierung der <i>Transferline</i> -Temperatur	43
4.2.7.1	Lösungen.....	43
4.2.7.2	Durchführung.....	43
4.2.8	Optimierung der Ionenquell-Temperatur.....	44
4.2.8.1	Lösungen.....	44
4.2.8.2	Durchführung.....	44
4.2.9	Bestimmung des Response.....	45
4.2.9.1	Lösungen.....	45
4.2.9.2	Durchführung.....	45
4.2.10	Bestimmung des <i>Quantifier/Qualifier</i> -Verhältnisses.....	45
4.2.10.1	Lösungen.....	45
4.2.10.2	Durchführung.....	45
4.2.11	Überprüfung der Geräteperformance	46
4.2.11.1	Lösungen.....	46
4.2.11.2	Durchführung.....	46
4.2.12	<i>Screening</i> der Chemikalien und Laborgeräte auf mögliche Kontaminationen mit E2.....	46
4.2.12.1	Lösungen.....	46
4.2.12.2	Durchführung.....	47
4.2.13	Überprüfung der Extraktionseffizienz von Hexan und Chloroform	49
4.2.13.1	Lösungen.....	49
4.2.13.2	Durchführung.....	49
4.2.14	Quantifizierung von gespaltenen E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten in Standardlösungen	50
4.2.14.1	Lösungen.....	50
4.2.14.2	Säurehydrolyse zur Spaltung von <i>Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten</i>	52
4.2.14.3	Überprüfung verschiedener Inhibitoren für <i>β-Glucuronidase aus helix pomatia</i>	53
4.2.14.4	Überprüfung der Spaltungseffizienz der <i>β-Glucuronidase und Sulfatase</i> in Substratmischungen.....	55
4.2.15	Einfluss der Probenaufarbeitung auf die Wiederfindung	56
4.2.15.1	Lösungen.....	56

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.15.2 Durchführung.....	56
4.2.16 Optimierung der Extraktionseffizienz.....	58
4.2.16.1 Lösungen.....	58
4.2.16.2 Durchführung.....	58
4.2.17 Überprüfung der Aufarbeitung auf mögliche generierte Artefakte.....	60
4.2.17.1 Lösungen.....	60
4.2.18 Gewinnung und Lagerung von Gewebespenden.....	62
4.2.19 Studienpopulation.....	62
4.2.20 Aufarbeitung von Brustdrüsengewebe.....	63
4.2.20.1 Homogenisierung und Extraktion.....	63
4.2.21 Aufarbeitung der Proben mittels SPE.....	64
4.2.21.1 Lösungen.....	64
4.2.21.2 Durchführung.....	64
4.2.22 Messbedingungen.....	66
4.2.23 Messmethoden.....	69
4.2.23.1 Methodenentwicklung.....	69
4.2.23.2 Probenmessungen.....	70
4.2.24 Auswertung von GC/MS/MS-Chromatogrammen.....	75
4.2.24.1 Peakintegration.....	75
4.2.24.2 Peakfilterung.....	75
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	77
5.1 Entwicklung einer Mess-Methode zur simultanen Bestimmung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe.....	77
5.1.1 Bestimmung der optimalen Ionisierungsenergie im <i>fullscan</i> -Modus.....	77
5.1.2 Bestimmung der charakteristischen Tochterfragmente im Produktions- <i>scan</i>	81
5.1.3 Bestimmung der optimalen Kollisionsenergien für die spezifischen Massenübergänge von E1- und E2-Metaboliten.....	83
5.1.4 Optimierung der <i>dwell-time</i> der <i>Quantif</i> - und <i>Qualifier</i> -Übergänge von E1- und E2-Metaboliten.....	90
5.1.5 Referenzspezifische Kenndaten von E1- und E2-Metaboliten.....	98
5.2 Optimierung der GC-Methodenparameter.....	103
5.2.1 <i>Initial</i> -Temperatur.....	105

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.2	Temperatur der <i>Transferline</i>	107
5.2.3	Temperatur der Ionenquelle.....	110
5.3	Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode zur Isolierung und Aufreinigung von E1- und E2-Metaboliten aus Brustgewebe.....	114
5.3.1	Kriterien der Peak-Daten-Analyse.....	115
5.3.2	<i>Screening</i> der verwendeten Chemikalien und Laborgeräte auf mögliche Kontamination mit E2.....	117
5.3.3	Überprüfung der Extraktion auf den Verlust von E1- und E2-Metaboliten.....	122
5.3.4	Quantifizierung von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten in Standardlösungen.....	125
5.3.4.1	<i>Säurehydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten</i>	126
5.3.4.2	<i>Enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten</i>	128
5.3.4.3	<i>Überprüfung verschiedener Inhibitoren für β-Glucuronidase aus helix pomatia</i>	131
5.3.5	Einfluss der Festphasenextraktion und der enzymatischen Hydrolyse auf die Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten.....	133
5.3.6	Überprüfung kritischer Prozessschritte der Brustgewebsaufarbeitung bezüglich der Bildung und Eliminierung von Artefakten.....	142
5.3.6.1	<i>Überprüfung der Oxidationsstabilität von E2-d₃ während der Aufarbeitung von Brustgewebe</i>	142
5.3.6.2	<i>Überprüfung der Anwendbarkeit des modifizierten Protokolls im Rahmen optimierter Extraktionsbedingungen</i>	147
5.4	Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten über deuterierte interne Standards.....	152
5.4.1	Synthese deuterierter Referenzsubstanzen.....	153
5.4.1.1	<i>Charakterisierung der E2-Methylether-Standards</i>	154
5.4.1.2	<i>Charakterisierung des 2-HO-E2-d₃- und 4-HO-E2-d₃-Standards</i>	156
5.4.1.3	<i>Charakterisierung der E1-Methylether-Standards</i>	158
5.4.2	Charakterisierung der verwendeten E1-d ₄ -/E2-d ₃ -Metaboliten-Referenzmischung.....	161
5.4.2.1	<i>E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung</i>	161
5.4.2.2	<i>E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung</i>	161
5.4.3	Quantifizierung der E1-d ₄ -/E2-d ₃ -Metaboliten-Referenzmischung.....	164

INHALTSVERZEICHNIS

5.4.4	Anpassung der Absolutmengen an den erwarteten Probengehalt von E1 und E2	165
5.4.5	Stabilität der E1-d ₄ /E2-d ₃ -Metaboliten-Referenzmischung.....	167
5.4.5.1	<i>Vorversuche zur Lösungsstabilität von Catechol-Estrogenen</i>	168
5.4.6	Stabilitätsüberprüfung der deuterierten Standardmischungen über den gesamten Messzeitraum	169
5.4.7	Grundlagen zur Berechnung der Probengehalte und der NWG von E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe.....	175
5.5	E1- und E2-Metabolitenprofil im weiblichem Brustgewebe	179
5.5.1	Etablierung einer geeigneten Mess-Methode	180
5.5.2	Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten in Realproben	185
5.6	Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten in Realproben	190
5.6.1	Gewebekonzentration von E1- und E2-Metaboliten im Rahmen der analysierten Studienpopulation.....	192
5.7	Korrelationsanalysen.....	199
5.7.1	E2-Supplementierung.....	201
5.7.2	<i>Body-Mass-Index</i>	205
6	ZUSAMMENFASSUNG	214
7	SUMMARY.....	218
8	ANHANG	IX
9	LITERATURVERZEICHNIS	XCII
	LEBENS LAUF.....	CI

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ade	Desoxyadenin
AK	Arbeitskreis
AP-Stelle	Apurine Stelle
AZM	Arzneimittel mit estrogenen Wirkung
B-1	β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid + 1% Trimethylchlorsilan
ChAN	5 α -Cholestan
CE	Kollisionsenergie
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
d ₃	deutert
DHEA	Deydroepiandrostendion
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
EE2	Ethinylestradiol
E3	16- α -Hydroxyestradiol
E2-2,3-Q	17 β -Estradiol-2,3-Chinon
E2-3,4-Q	17 β -Estradiol-3,4-Chinon
16- α -HO-E1	16- α -Hydroxy-Estradiol
16- α -HO-E1	16- α -Hydroxy-Estron
E1-3-S	Estron-3-Sulfat
E2-3-S	17 β -Estradiol-3-Sulfat
E2-3-G	17 β -Estradiol-3-Glucuronid
engl.	Englisch
EI	Elektronenstoßionisation
FA	Ameisensäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Glucuronid
GA	Glucuronsäure
GC	Gaschromatographie
Gua	Desoxyguanin
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
2-HO-E2	2-Hydroxy-Estradiol

4-HO-E2	4-Hydroxy-Estradiol
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
<i>hp</i>	<i>helix pomatia</i>
HP-2	β -Glucuronidase aus <i>helix pomatia</i> (Typ HP-2)
H-1	β -Glucuronidase aus <i>helix pomatia</i> (Typ H-1)
HRT	Hormonersatztherapie <i>Hormone Replacement Therapy</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>(high performance liquid chromatography)</i>
17 β -HSD1 / 17 β -HSD2	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 beziehungsweise Typ 2
IA	Immunoassay
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ISTD	Interner Standard
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Flüssigkeitschromatographie
LM	Lösungsmittel
m	Analytmenge
M ⁺	Molekülion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
2-MeO-E1	2-Methoxy-Estron
4-MeO-E1	4-Methoxy-Estron
3-O-Me-2-HO-E1	3-O-Methyl-2-Hydroxy-Estron
3-O-Me-4-HO-E1	3-O-Methyl-4-Hydroxy-Estron
2-MeO-E2	2-Methoxy-Estradiol
4-MeO-E2	4-Methoxy-Estradiol
3-O-Me-2-HO-E2	3-O-Methyl-2-Hydroxy-Estradiol
3-O-Me-4-HO-E2	3-O-Methyl-4-Hydroxy-Estradiol
n	Anzahl
n.n.	nicht nachgewiesen
n.b.	nicht bestimmt
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ EDTA	Dinatriummethylenediamintetraacetat
NEM	Nahrungsergänzungsmittel

MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction monitoring
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NQO	NADPH-Chinonoxidoreduktase
NWG	Nachweisgrenze
p	Druck
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PBS-CMF	<i>(phosphate-buffered-saline-calcium-magnesium-free)</i>
PF	Peakfläche
PFV	Peakflächenverhältnis
Q / q	Quantifier-/Qualifier-Übergang
Q1 / Q2 / Q3	Quadrupol 1 / Kollisionszelle (Quadrupol 2) / Quadrupol 3
RKI	Robert Koch Institut
RIA	Radioimmunoassay
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
t _R	Retentionszeit
S	Sulfat
SA	Saccharinsäure
SAL	Saccharinsäure-1,4-Lacton
SIM	Selected Ion Monitoring
STS	Steroidsulfatase
STABW	Standardabweichung
SULT	Sulfotransferase
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
SQ / Q	Semichinon / Chinon
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TMS	Trimethylsilyl
UGT	Glucuronosyltransferase
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
pg	pikogramm

2 EINLEITUNG

Jährlich erkranken in Deutschland ungefähr 75.200 Frauen an Brustkrebs (RKI, 2013). Fast 18.000 Frauen sterben jährlich an den Folgen dieser Erkrankung, so dass das Mammakarzinom die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau darstellt. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielt die Exposition gegenüber dem weiblichen Sexualhormon 17 β -Estradiol (E2), dessen Bildung ausgehend von Estron (E1) durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (17 β -HSD1) katalysiert wird (Baker, 2001; zusammengefasst von Miettinen, 2000). Zwar tragen Frauen, in deren Verwandtschaft Brustkrebs-erkrankungen aufgetreten sind, ein vergleichsweise höheres Erkrankungsrisiko, jedoch lassen sich erblich bedingte Mutationen in als risikosteigernd bekannten „Brustkrebsgenen“ (BRCA) nur bei 5 bis 8% der Patientinnen nachweisen (Lux et al., 2005). Demnach gelten Lebensgewohnheiten, wie zum Beispiel Kinderlosigkeit (Nulliparität), ein höheres Alter bei der ersten Geburt, eine frühe erste Regelblutung (Menarche), ein später Eintritt in die Wechseljahre (Klimakterium) oder die Einnahme oraler Kontrazeptiva beziehungsweise eine Hormonersatztherapie (engl. *Hormone Replacement Therapy* - HRT), als entscheidende Risikofaktoren, da sie eine erhöhte Exposition gegenüber E2 mit sich bringen (RKI, 2013). Neben der Estrogenrezeptor-vermittelten Stimulierung der Zellproliferation spielt insbesondere die körpereigene Bildung von genotoxischen E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe eine entscheidende Rolle bei der Kanzerogenese. Die Konzentrationen dieser brustgewebsspezifischen Metabolite sowie die von E2 und E1 liegen im normalen Brustgewebe im unteren pikogramm-(pg) Bereich pro Gramm Gewebe (Rogen et al., 2003). Durch hormonelle Veränderungen aufgrund des Menopausalstatus existieren zwischen den Gehalten von E2, E1 und deren Metaboliten in der Prä- und Postmenopause erhebliche Unterschiede (zusammengefasst von Yaghjyan und Colditz, 2011), so dass für die Quantifizierung von E2, E1 und deren Metaboliten eine gezielte Isolation aus der komplexen Matrix sowie die Anwendung einer empfindlichen Mess-Methode notwendig sind. Infolge von Konjugationsreaktionen wie Sulfonierung und Glucuronidierung (zusammengefasst von Cavaliere und Rogan, 2011) liegen E2, E1 und deren Metabolite im Brustgewebe ferner zum Teil gebunden als Sulfat- und Glucuronid-Konjugate vor. Um den Anteil von Estrogenen bestimmen zu können, welcher glucuronidiert beziehungsweise sulfoniert im Gewebe vorliegt, ist eine spezifische Spaltung dieser Konjugate erforderlich. Demnach sind zusätzliche Anforderungen im Rahmen der Probenaufarbeitung zu erfüllen.

Im Folgenden soll sowohl auf die vermittelte Kanzerogenität von E2 und E1 in der Brust, deren Vorliegen als Konjugate als auch deren spezifische Synthese in der Prä- und Postmenopause eingegangen werden. Aber auch die notwendigen Methoden- und Geräte-bedingten Voraussetzungen zur Quantifizierung von freiem und gebundenem E2 und E1 werden im Anschluss näher betrachtet.

2.1 Kanzerogenese der Brust

Die in extrahepatischem Gewebe, wie zum Beispiel der Brust, vorliegenden Konzentrationen von E2 und dessen reaktiven Metaboliten werden durch das Zusammenspiel von E2-produzierenden und E2-inaktivierenden Enzymen bestimmt. Dabei können erhöhte E2-Konzentrationen durch eine verstärkte Biosynthese von E2, insbesondere bei adipösen postmenopausalen Frauen, durch eine verstärkte Umwandlung von Androgenen zu E2 im Fettgewebe (Siiteri, 1987) oder einer verminderten Eliminierung, resultieren. E2 und E1 befinden sich über die Isoenzyme 17 β -HSD1 und 17 β -HSD2 stetig in einem metabolischen Gleichgewicht (Abb. 1), wobei diese mit Hilfe der humanen Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) Isoenzyme 1A1 (hCYP1A1) und 1B1 (hCYP1B1) zu 2-/4-Hydroxy-E2 (2-/4-HO-E2) und 2-/4-Hydroxy-E1 (2-/4-HO-E1) oxidiert werden (Abb. 1; zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011).

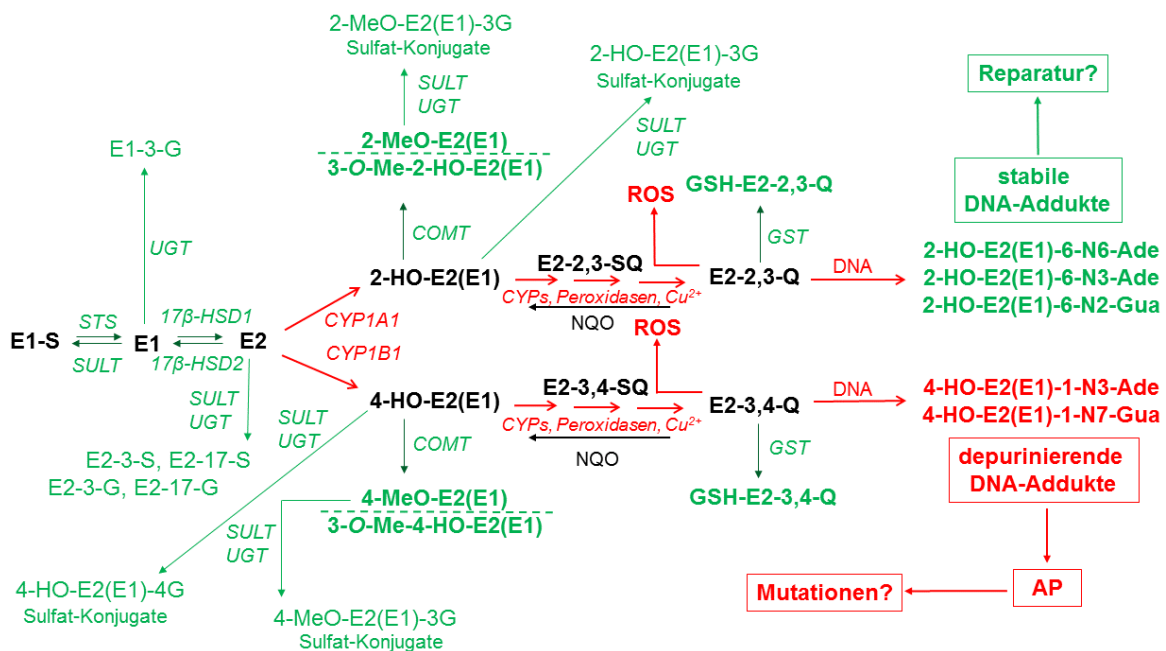


Abb. 1: Schematischer Überblick über den E2/E1-Metabolismus in der Brust. Ade: Desoxyadenin, AP: apurine Stellen, Gua: Desoxyguanin, GST: Glutathion-S-Transferase, G: Glucuronid, GSH: Glutathion, 17 β -HSD: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Q: Chinon, NQO: NADPH-Chinonoxidoreduktase, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, S: Sulfat, STS: Steroidsulfatase, SULT: Sulfotransferase, UGT: Glucuronosyltransferase.

Bei der Inaktivierung der Catechol-Estrogene scheint im Brustgewebe überwiegend die ubiquitär exprimierte Catechol-O-Methyltransferase (COMT) eine entscheidende Rolle zu spielen (Rogan et al., 2003). Demnach werden diese infolge einer Methylierung zu 2-/4-Methoxy-E2 (2-/4-MeO-E2), 3-O-Methyl-2-Hydroxy-E2 (3-O-Me-2-HO-E2) und 3-O-Methyl-4-Hydroxy-E2 (3-O-Me-4-HO-E2) beziehungsweise 2-/4-Methoxy-E1 (2-/4-MeO-E1) sowie 3-O-

Methyl-2-Hydroxy-E1 (3-O-Me-2-HO-E1) und 3-O-Methyl-4-Hydroxy-E1 (3-O-Me-4-HO-E1) entgiftet (Abb. 1; zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011; zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998).

Wenn die Konjugation der Catechol-Estrogene über O-Methylierung unzureichend wird, können Semi-Chinone (radikalische Intermediate) gebildet werden, die über Redoxcycling reaktive Sauerstoffspezies bilden (Abb. 1). Dabei kommt es zur Übertragung eines ungepaarten Elektrons auf molekularen Sauerstoff, wobei Superoxidradikal-Anionen gebildet werden. Über Superoxid-Dismutase werden Letztere abgefangen, indem sie zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff umgesetzt werden. Wasserstoffperoxid kann unter der katalytischen Wirkung von Fe^{2+} (Fenton-Reaktion) zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt werden (zusammengefasst von Fussell et al., 2011), welche oxidative Schäden an Makromolekülen wie Proteinen und DNA hervorrufen können (Liehr, 2000; Cavalieri et al., 2006).

Semi-Chinone können ferner enzymatisch durch CYPs und/oder Peroxidasen (Liehr, 1990) sowie nicht-enzymatisch zum Beispiel durch Cu^{2+} -Ionen (Li et al., 1994; Wang et al., 2010) zu den entsprechenden Chinonen weiter oxidiert werden (Abb. 1; 2-HO-E1(E2) zu E1(E2)-2,3-Chinon und 4-HO-E1(E2) zu E1(E2)-3,4-Chinon). Diese können anschließend durch Konjugation mit Glutathion, welche durch die Glutathion-S-Transferase katalysiert wird, entgiftet werden (Dawling et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung von Chinonen stellt die Reduktion durch die NADPH-Chinonoxidoreduktase zu den Catechol-Estrogenen dar (Danson et al., 2004). Sind diese Prozesse unzureichend, können Chinone als elektrophile Intermediate mit DNA-Basen reagieren und damit die Brustkrebsentstehung fördern (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011).

Die 3,4-Chinone reagieren über eine 1,4-Michael-Addition zu $\geq 97\%$ mit dem N3 von Adenin (Ade) und dem N7 von Guanin (Gua; Abb. 1). Die Instabilität der Zucker-Base-Bindung führt bereits nach wenigen Stunden zur Abspaltung der labilen Addukte 4-HO-E2(E1)-1-N3-Ade und 4-HO-E2(E1)-1-N7-Gua von der DNA (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2010; Convert et al., 2003), wobei es zur Entstehung von apurinen Stellen (AP-Stellen) kommt. Fehlerhafte Reparaturmechanismen dieser AP-Stellen können zur Bildung von Mutationen führen, welche die Initiation der Krebsentstehung begünstigen können (IARC, 2012; zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2010; Chakravarti et al., 2001).

Die 2,3-Chinone reagieren im Gegensatz dazu über eine 1,6-Michael-Addition mit der exozyklischen Aminogruppe von Ade und Gua (Abb. 1) und bleiben kovalent an der DNA gebunden (IARC, 2012; Debrauwer et al., 2003; Stack et al., 1996), weswegen sie auch als stabile Addukte bezeichnet werden. Da diese Addukte an der DNA verbleiben, sind sie für DNA-Reparatursysteme zugänglich (Cavalieri et al., 1997).

Bei der Reaktion von E2-2,3-Q mit der DNA wurde zusätzlich zu den stabilen Addukten auch ein depurinierendes Addukt (2-HO-E2-6-N3-Ade) nachgewiesen. Dessen gebildete Menge wurde über ^{32}P -Postlabeling quantifiziert und war signifikant kleiner ($4 \mu\text{mol/mol DNA-}^{32}\text{P}$), als die Menge der depurinierenden Addukte ($280 \mu\text{mol/mol DNA-}^{32}\text{P}$), die bei der Umsetzung von E2-3,4-Q mit DNA gebildet wurde. Auch wenn E2-2,3-Q und E2-3,4-Q in verschiedenen Mischungen (Mischungsverhältnis 3:1, 1:1 beziehungsweise 1:3) mit DNA umgesetzt wurden, überwog in allen Mischungen die gebildete Menge aus depurinierenden Addukten von E2-3,4-Q. Demnach ist für E2-3,4-Q im Vergleich zu E2-2,3-Q von einer höheren Reaktivität gegenüber der DNA auszugehen (Zahid et al., 2006).

Während eine verringerte COMT-Aktivität (beispielsweise aufgrund von Polymorphismen aber auch durch Wechselwirkung von Nahrungsbestandteilen mit dem Enzym selbst oder seiner Genexpression) zu einer unzureichenden Methylierung von Catechol-Estrogenen und daher zu einer erhöhten Oxidation zu Estrogen-Chinonen führt, was mit einer vermehrten Bildung von DNA-Addukten verbunden ist, führen nur Konjugationsreaktionen, insbesondere Glucuronidierung (Abb. 1) zur kompletten Inaktivierung und Ausscheidung von E2 (Guillemette, 2003). Welche Konjugate von E2, E1 und deren Metaboliten im Menschen und speziell im Brustgewebe vorliegen, wird im Folgenden erläutert.

2.1.1 Inaktivierung von E2, E1 und deren Metabolite durch Konjugationsreaktionen

Neben der O-Methylierung durch die COMT werden E2, E1 und deren Metabolite durch Konjugationsreaktionen wie Glucuronidierung und Sulfonierung entgiftet (Abb. 1).

Die Bildung von Glucuroniden wird durch die Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferase (UGT) katalysiert, welche in der Leber und in Estrogen-responsiven Geweben wie Prostata, Brust und Ovarien exprimiert wird (Albert et al., 1999). Durch Konjugation von Uridin-5'-diphosphat-Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) mit E2, Catechol-Estrogenen oder Methyl-Catecholen kommt es zur Inaktivierung des estrogenen Potentials und zur Erhöhung der Polarität für die renale und beziehungsweise biliäre Ausscheidung, so dass Glucuronide leichter als die unkonjugierten Substanzen mit dem Urin oder der Galle ausgeschieden werden (Guillemette, 2003). Glucuronide können jedoch durch β -Glucuronidasen hydrolysiert werden, wodurch die Ausgangssubstanzen wieder freigesetzt werden (Albin et al., 1993; Raftogianis et al., 2000). Nach einer *in vitro* Studie von Guillemette (2003) wird E2 von UGT1A1 beziehungsweise UGT1A8 und UGT2B7 an Position 3 und 17 glucuronidiert, wogegen eine Konjugation beziehungsweise Glucuronidierung von E1 nur an Position 3 möglich ist (Abb. 1). Diese erfolgt über UGT1A8. 2-HO-E1(E2) werden bevorzugt an Position 3 und 4-HO-E1(E2) an Position 4

glucuronidiert (Abb. 1). Die Glucuronidierung der Catechol-Estrogene erfolgt insbesondere durch UGT1A1 und UGT1A8, wobei diese eine höhere Spezifität für 2-HO-E1 und 2-HO-E2 besitzen. UGT2B7 zeigt im Gegensatz dazu eine größere Spezifität für die Glucuronidierung von 4-HO-E1 und 4-HO-E2 (Guillemette, 2003). Die Glucuronidierung von Methyl-Catecholen erfolgt bevorzugt an Position 3 (Abb. 1), wobei 2-MeO-E1(E2) beziehungsweise 4-MeO-E1(E2) gleichermaßen insbesondere durch die UGT1A8 glucuronidiert werden (Guillemette, 2003). Abb. 2 stellt exemplarisch die Bildung von E2-3-G und E2-17-G dar.

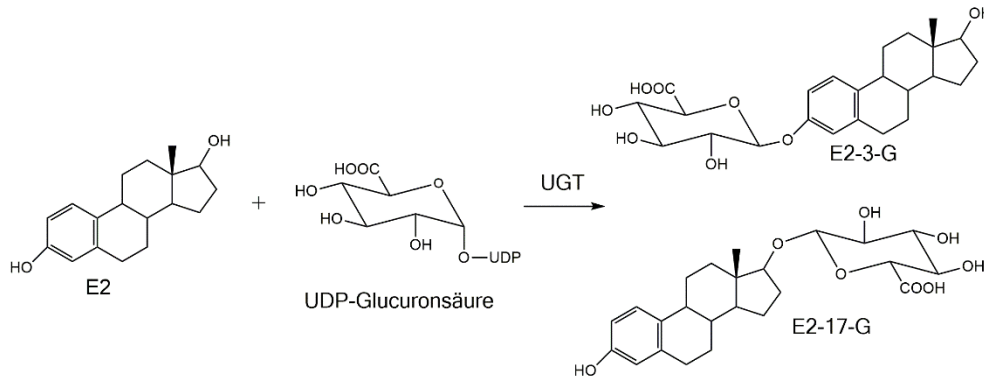


Abb. 2: Bildung der Glucuronid-Konjugate E2-3-G und E2-17-G ausgehend von E2.

E2 kann nur durch Glucuronidierung an Position 3 inaktiviert werden, wodurch E2-3-(β -D-Glucuronid (E2-3-G) gebildet wird (Abb. 1). Die Glucuronidierung an Position 17 führt demgegenüber zur Bildung von E2-17-(β -D-Glucuronid (E2-17-G; Abb. 1), welches durch Interaktion mit hepatocyclischen kanalikulären Membran-Effluxtransportern Cholestase induziert (Huang et al., 1998; Loe et al., 1996). Welche Glucuronide *in vivo* gebildet werden und insbesondere im weiblichem Brustgewebe vorliegen, ist allerdings noch unklar und stellt daher einen Ansatzpunkt weiterer Forschung dar.

Die weitere Metabolisierung der Estrogene erfolgt über Sulfonierungen mittels cytosolischen Sulfotransferasen (SULT1 und SULT2), wobei 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Cofaktor fungiert. E2-Sulfat (E2-S) und auch E1-Sulfat (E1-S) wurden bisher im weiblichen Brustgewebe nachgewiesen. Von Chetrite et al. (2000) wurden deren Gehalte im normalen Brustgewebe postmenopausaler Frauen mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt, wobei 232 ± 75 pg/g Gewebe beziehungsweise 237 ± 65 pg/g Gewebe resultierten. Estrogen-Sulfate haben eine längere Halbwertszeit als die entsprechenden unkonjugierten Estrogene und werden daher auch als Estrogenspeicher für die Bildung von E1 angesehen (Ruder et al., 1972; Zhu und Conney, 1998). E1-S ist das am meisten frei zirkulierende Estrogen und vermutlich wichtiger Vorläufer von aktiven Estrogenen in der postmenopausalen Frau (Pasqualini et al., 1989). Zirkulierendes E1-S wird zu den Zielzellen transportiert, in diese

wahrscheinlich über Anionentransporter aufgenommen (Raftogianis et al., 2000) und durch die Sulfatase zu freiem E1 hydrolysiert. E2-17-Sulfat (E2-17-S) wurde als Nebenprodukt im Urin und Blut der Frau nachgewiesen. E2-Disulfat wurde bisher nicht im menschlichen Urin oder Blut detektiert (Watanabe et al., 1987; Yoshizawa et al., 1992; Zhang und Henoin, 1999; Wang und James, 2005). Auch welche Sulfate ausgehend von Catechol-Estrogenen und Methyl-Catecholen im Brustgewebe gebildet werden, ist bisher noch unklar. Abb. 3 zeigt exemplarisch die Bildung von E2-3-S und E2-17-S.

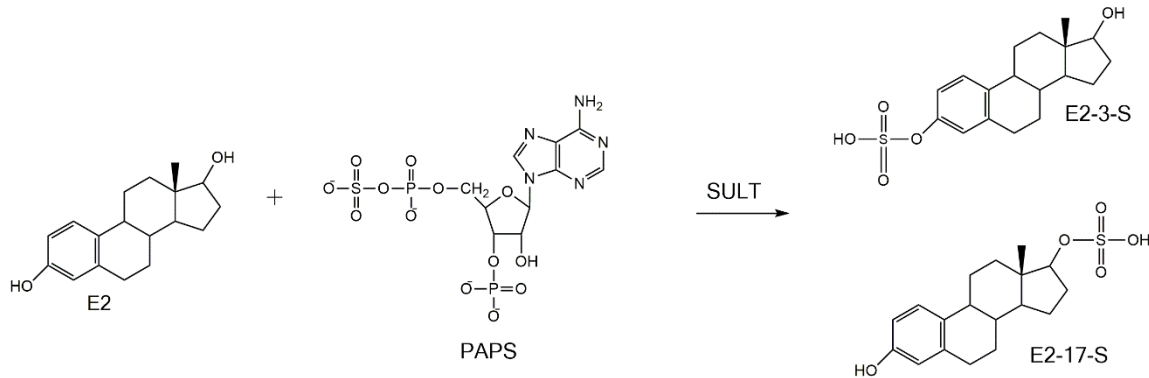


Abb. 3: Bildung der Sulfat-Konjugate E2-3-S und E2-17-S ausgehend von E2.

Im Gegensatz dazu existieren über die Glucuronidierung und Sulfonierung von E2 im humanen Blutplasma bereits mehr Erkenntnisse. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass die Glucuronidierung und Sulfonierung bevorzugt in 3-Position stattfindet (Raftogianis et al., 2000), während Glucuronidierungsprodukte in 17-Position nicht nachgewiesen wurden (Caron et al., 2009). Aufgrund dessen und da unter anderem von Guillemette (2003) *in vivo* die Konjugation von E2, E1 sowie Catechol-Estrogenen und Methyl-Catecholen durch UGTs und SULTs gezeigt wurde, sind diese Reaktionen ebenfalls bei der Entgiftung von E2, E1 und deren Metaboliten im weiblichen Brustgewebe denkbar. Demnach stellt die Analyse von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten neben den frei vorliegenden Estrogenen einen entscheidenden Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Um ein quantitatives Metabolitenprofil von freien und gebundenen E2- und E1-Metaboliten im weiblichen Brustgewebe zu erstellen, ist die Entwicklung einer empfindlichen Mess-Methode für den unteren pg-Bereich notwendig. Dieser niedrige Konzentrationsbereich resultiert aufgrund der geringen Gehalte von freien und gebundenen E2- und E1-Metaboliten im Gewebe.

Wie E2 und E1 im Brustgewebe prä- und postmenopausaler Frauen gebildet werden und welche Gehalte für E2, E1 und deren Metaboliten im Gewebe zu erwarten sind, soll im Folgenden näher betrachtet werden.

2.1.2 Prä- und postmenopausale Biosynthese von E2 und E1 in der Brust

In der Prämenopause stellen die Ovarien den Hauptbildungsort der Estrogene dar (McNatty et al., 1979). Ausgehend vom Cholesterol, einem C27-Sterol, erfolgt die Biosynthese der Estrogene über Pregnenolon und Androstendiol (C19). Letzteres diffundiert in die Granulosazellen der Ovarien, wo es unter dem Einfluss des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) durch die Aromatase in E1 umgewandelt wird. Über die 17 β -HSD Typ 1 erfolgt dessen Überführung in E2, wobei Androstendion auch über einen Zwischenschritt durch die 17 β -HSD zuerst in Testosteron überführt und anschließend ebenfalls durch die Aromatase in E2 umgewandelt werden kann. Bei der postmenopausalen Frau sind die Ovarien atrophiert, so dass von diesen kaum noch Estrogene gebildet werden. Die Steroidbiosynthese endet mit den C19-Androgenen: Androstendion, Testosteron, Androstendiol und Deydroepiandrostendion (DHEA; Distler et al., 2010). Die Estrogensynthese findet in der Postmenopause verstärkt im peripheren Fett- und Muskelgewebe, in der Niere oder Leber statt (Longcope et al., 1987; van Landeghem et al., 1985). Bei dieser extraglandulären Aromatisierung ist insbesondere die Umwandlung des adrenalen oder ovariellen Androstendions und Deydroepiandrostendions in E2 von Bedeutung, während die Aromatisierung von Testosteron in E2 fast zu vernachlässigen ist (Distler et al., 2010). Androstendion und DHEA werden aus der Nebennierenrinde freigesetzt, im peripheren Gewebe mit Hilfe der Aromatase zu Estrogenen umgewandelt und in den Körperkreislauf gebracht (Reed und Purohit, 2001).

Für die Gewebekonzentrationen von E2 und E1 im gesunden Brustgewebe existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. Dies ist auf die geringe Anzahl durchgeführter Studien beziehungsweise untersuchter Probandinnen zurückzuführen. Bisläng existieren 20 Studien, die Estrogen-Metabolite im Brustgewebe analysiert haben. Diesbezüglich konzentrieren sich fast 85% der Untersuchungen auf die Estrogen-Analyse in tumorösen Gewebe (zusammengefasst von Yaghjian und Colditz, 2011). Lediglich die Hälfte dieser Studien analysierten E2- und E1-Metabolite im gesunden Brustgewebe, so dass ebenfalls die Anzahl analysierter gesunder Frauen vergleichsweise gering war (Tab. 1). Die Anzahl der untersuchten Teilnehmerinnen variierte zwischen 8 und 164 Frauen. Insgesamt wurden 309 prä- und beziehungsweise 179 postmenopausale Frauen untersucht (Tab. 1). Weiterhin wurde auch nicht in allen Studien der Menopausalstatus der Teilnehmerinnen vollständig berücksichtigt (Tab. 1).

EINLEITUNG

Tab. 1: Zusammenfassung der bisher durchgeführten Studien, in denen E2- und E1-Metabolite im normalen Brustgewebe analysiert wurden; n.b.: nicht bekannt.

Literaturquelle	Studienpopulation		Mess-Methode	Metabolite
	Anzahl	Anzahl prä-/postmenopausal		
Vermeulen et al (1986)	64	0 / 64	RIA	E1, E2, E1-S
Thijssen et al. (1987)	28	22 / 6	RIA	E1, E2
Ernster et al. (1987)	164	164 / 0	RIA	E1, E2
Thijssen und Blankenstein (1989)	16	8 / 8	RIA	E1, E2, E1-S, E2-S
Reed et al. (1991)	8	0 / 8	RIA	E1
Van Landeghem et al. (1985)	113	73 / 40	RIA	E1, E2
O'Brian et al. (1997)	65	36 / 29	RIA	E1, E2
Blankenstein et al. (1999)	16	6 / 10	RIA	E1, E2, E1-S, E2-S
Chetrite et al. (2000)	14	0 / 14	RIA	E1, E2, E1-S, E2-S
Rogan et al. (2003)	49	n.b.	HPLC/ elektro- chemische Detektion	E2(E1) 2-HO-E2(E1) 4-HO-E2(E1) 2-MeO-E2(E1) 4-MeO-E2(E1)

In einer weiteren Studie von Rogan et al. (2003) wurden die Gehalte von freiem und gebundenen E1- und E2-Metaboliten in tumorösen und auch in normalen Brustgewebe analysiert. Eine Berücksichtigung des Menopausalstatus der Frauen erfolgte jedoch nicht, so dass diesbezüglich nur ein Vergleich der Gehalte von E1- und E2-Metaboliten im gesunden und erkrankten Gewebe erfolgte. Vom Menopausalstatus abhängig Unterschiede der Gewebespiegel von E1 und E2 konnten hierbei nicht näher betrachtet werden (Tab. 1). Des Weiteren wurden die Gehalte von E2, E1 sowie der hydroxylierten beziehungsweise methylierten Metabolite jeweils als Summe betrachtet, so dass ebenfalls keine differenzierte Aussage zwischen den Gehalten von E2 und E1 beziehungsweise E2- und E1-Hydroxylierungsprodukten sowie E2- und E1-Methylierungsprodukten möglich ist (Tab. 1). Mit Ausnahme der analysierten Gewebespiegel von Rogan et al. (2003), welche die Summe aus freien und gebundenen E2- und E1-Metaboliten darstellen, wurden in allen übrigen Studien entweder die Gehalte von freiem E2 beziehungsweise E1 oder die der Konjugate E2-S und E1-S analysiert (Tab. 1).

Für E2 werden im normalen Brustgewebe prä- und postmenopausaler Frau einerseits vergleichbare Gehalte beschrieben (Tab. 2; zusammengefasst von Yaghjian und Colditz, 2011; Thijssen et al., 1987 und van Landeghem et al., 1985), da in der Prä- und Postmenopause ungefähr 75% beziehungsweise nahezu 100% der Androgenen-Vorstufen (Androstendion und DHEA) durch die Aromatase in E2 umgewandelt werden (Russo und Russo, 2004). Andererseits wurde in der Studie von Thijssen und Blankenstein (1989) mittels RIA bei der Untersuchung polnischer Frauen in Abhängigkeit des Alters eine deutliche Abnahme des frei vorliegenden E2-Gehaltes beobachtet (Tab. 2), so dass postmenopausale polnische Frauen durchschnittlich 66,7% geringere E2-Gehalte aufzeigten. Die Ursache des weitaus geringeren E2-Gehaltes postmenopausaler polnischer Frauen im Vergleich zur Prämenopause ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei polnischen Frauen eine geringere Häufigkeit an Brustkrebs zu erkranken, beobachtet wurde. Demnach zeigten diese beim Vergleich des E1-Gehaltes zwischen normalen und tumorösen Brustgewebe ein abweichendes Verhalten (Thijssen und Blankenstein, 1989).

Für die Gehalte von E1 existieren auch unter Berücksichtigung der Menopause im normalen Brustgewebe übereinstimmende Angaben in der Literatur. Diesbezüglich sind für prämenopausale Frauen im Vergleich zur Postmenopause signifikant höhere E1-Gehalte beschrieben (Tab. 2; zusammengefasst von Yaghjian und Colditz, 2011; Thijssen et al., 1987 und van Landeghem et al., 1985). Des Weiteren sind in der Postmenopause die E1-Gehalte höher als die von E2, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede beschrieben werden (Tab. 2; Chetrite et al., 2000).

Da im gesunden Gewebe unter anderem die COMT-Aktivität gegenüber der Aktivität von CYP1A1 beziehungsweise CYP1A2 und CYP1B1 erhöht ist und daher die Inaktivierung der Catechol-Estrogene zu den Methyl-Catecholen überwiegt (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011; Mitrunen und Hirvonen, 2003), ist im Gewebe gesunder Frauen ebenfalls die Bildung von Methyl-Catecholen zu erwarten. Angaben über die Gewebespiegel von E2- und E1-Metaboliten im normalen Gewebe existieren lediglich in der Studie von Rogan et al. (2003), wobei diesbezüglich wiederum nur die Summen aus freien und gebundenen methylierten beziehungsweise hydroxylierten E1- und E2-Metaboliten betrachtet werden können (Tab. 1). Mittels COMT wird 2-/4HO-E2 beziehungsweise 2-/4-HO-E1 vorrangig zu 2-/4-MeO-E2 und 2-/4-MeO-E1 und in geringerem Umfang zu 3-O-Me-2-/4-HO-E2 beziehungsweise 3-O-Me-2-/4-HO-E1 methyliert (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990), so dass Letztere nur Nebenprodukte der Methylierung darstellen. Nach Rogan et al. (2003) resultieren für 4-MeO-E1(E2) höhere Gehalte als für 2-MeO-E1(E2) (Tab. 2), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten ist. Aufgrund einer verminderten CYP1B1-

Aktivität werden im gesunden Brustgewebe im Vergleich zu tumorösen Gewebe geringere Gehalte von 4-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E1 erwartet. Für 2-HO-E1 und 2-HO-E2 wurden diesbezüglich keine Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Gewebe beobachtet. Letzteres war ebenfalls auf die Gehalte von 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 zu übertragen, so dass im gesunden Brustgewebe auch alle hydroxylierten Metabolite von E1 und E2 zu erwarten sind (Tab. 2; Rogan et al., 2003).

Tab. 2: Übersicht der bisher publizierten Daten über die Gehalte von E2, E1 und deren Metaboliten im normalen Brustgewebe, wobei jeweils die mittleren Gehalte (soweit vorhanden differenziert nach dem Menopausalstatus) und die Standardabweichung angegeben sind. Wenn Letztere in der Literatur nicht zur Verfügung stand, ist der mittlere Gehalt von E2 und E1 aufgeführt. Literaturstellen die keine konkreten Gehaltsangaben von E2, E1 und den Metaboliten angaben, wurden nicht aufgeführt. Bis auf die Gehalte von Rogan et al. (2003) handelt es sich jeweils um die unkonjugierten E2- und E1-Metabolite; n.b.: nicht bestimmt.

Literaturquelle	E2 (pmol/g Gewebe)		E1 (pmol/g Gewebe)	
	prämeno- pausal	postmeno- pausal	prämeno- pausal	postmeno- pausal
Thijssen et al. (1987)	0,44	0,32	1,03	0,38
Thijssen und Blankenstein (1989)	0,48	0,19		
Reed et al. (1991)	n.b.	n.b.	n.b.	0,52 \pm 0,46
Van Landeghem et al. (1985)	0,2 - 2,6		0,2 - 3,3	
Chetrite et al. (2000)	n.b.	0,63 \pm 0,29	n.b.	0,75 \pm 0,26
Rogan et al. (2003)	pmol/g Gewebe			
	E1 + E2	2-MeO-E2(E1)	4-MeO-E2(E1)	3-O-Me-2-HO-E2(E1)
	4,1 \pm 3,0	3,5 \pm 2,8	4,1 \pm 2,6	n.b.
	2-HO-E1(E2)	4-HO-E1(E2)	16- α -HO-E2(E1)	
	5,4 \pm 5,1	3,4 \pm 2,7	2,8 \pm 1,2	

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es Ziel, eine GC/MS/MS-Methode für die Quantifizierung von freiem und gebundenen E2, E1 sowie deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten im normalen Brustgewebe zu entwickeln. Des Weiteren soll die Anwendbarkeit der Methode überprüft werden, so dass diese im nächsten Schritt auf reale Proben übertragen werden soll. Um die Verwendbarkeit der Methode zu bewerten, soll daher ein Vergleich der ermittelten Gehalte mit den oben vorgestellten, bisher publizierten Daten erfolgen. Welche Mess-Methoden sich für die Quantifizierung von freiem und gebunden E2, E1 und deren Metaboliten im Gewebe eignen beziehungsweise bisher in der Literatur verwendetet wurden und welche Ansprüche insbesondere im Rahmen der Probenaufarbeitung erfüllt werden müs-

sen, um den geringen Gewebekonzentration von E2- und E1-Metaboliten gerecht zu werden, soll im Folgenden betrachtet werden.

2.1.3 Methoden- und Gerätebedingte Voraussetzungen zur Quantifizierung von E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe

Die Konzentrationen von freiem E2 und E1 beziehungsweise der hydroxylierten und methylierten Metabolite liegen im normalen Gewebe lediglich im unteren pg-Bereich pro Gramm Gewebe (Tab. 2). Auch für gebundenes E2 und E1 aus Sulfat-Konjugaten sind Gehalte im unteren pg-Bereich pro Gramm Gewebe zu erwarten (Chetrite et al. 2000), so dass einerseits eine gezielte Isolation der Analyte aus der komplexen Probenmatrix erforderlich ist. Dies soll analog der Literatur über einen Extraktionsschritt erfolgen (Rogan et al., 2003; Gaikwad 2013). Andererseits ist eine Aufreinigung und Anreicherung der Analyte notwendig. Dafür soll eine Festphasenextraktion (eng. *solid phase extraction*) zum Einsatz kommen, die vielfach bei der Aufreinigung von Estrogenen aus verschiedenen Matrices, insbesondere Brustgewebe (Rogan et al., 2003) und Blutplasma (Belanger et al., 1990) verwendet wird. Um E2 und E1 aus Konjugaten zu erfassen, sind in Hinblick der Probenaufarbeitung besondere Anforderungen zu erfüllen. Aufgrund ihrer Struktur und Polarität sind Glucuronid- und Sulfat-Konjugate für eine gaschromatographische Analyse nicht geeignet, so dass zur Bestimmung von konjugiertem E2, E1 und deren Metaboliten eine Konjugatsspaltung erforderlich ist. Durch Verwendung von reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber und Sulfatase aus *helix pomatia* wird unter gleichzeitiger Hemmung der β -Glucuronidase-Aktivität eine gezielte Unterscheidung der gespaltenen Aglyca in Standardlösungen aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten ermöglicht, welche anschließend gaschromatographisch getrennt und mittels Flammenionisationsdetektor (FID) analysiert werden. Die zu entwickelnde Aufarbeitungsmethode ermöglicht daher ebenfalls die Spaltung von Glucuroniden und Sulfaten sowie die Quantifizierung als freies E2 in Standardlösungen.

Für die Analyse von Estrogenen im Brustgewebe wurden bisher insbesondere RIA-Methoden und Immunoassay-Methoden (IA) angewendet (Tab. 2; zusammengefasst von Yaghjyan und Colditz, 2011). RIA-Methoden sind einfach in ihrer Verwendung, jedoch in Hinblick der Reproduzierbarkeit, des linearen dynamischen Bereichs und dem Einfluss von Matrix-Effekten problematisch einzuschätzen (Gaikwad 2013). Auch Kreuzreaktionen (Tate und Ward, 2004; Andrew, 2001), zum Beispiel zwischen E2-Antikörpern und E1, (zusammengefasst von Yaghjyan und Colditz, 2011) führten zu stark variierenden E1-Konzentrationen und damit zur Beeinträchtigung der Analysenergebnisse. Im Gegensatz zu chromatographischen Analysemethoden, wie Gaschromatographie (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC) mit ge-

koppelten Massenspektrometer (MS), die in einem Probenlauf die simultane Analyse einer Vielzahl von Übergängen ermöglichen (Multi-Methoden), können mittels RIA oder IA in einem Assay lediglich zwischen ein und vier Analyte erfasst werden (Gaikwad 2013; zusammengefasst von Yaghjian und Colditz, 2011). Angaben zur Empfindlichkeit von RIA- oder IA-Methoden in Gewebematrix sind in der Literatur nicht vorhanden. Vergleichend zur Empfindlichkeit von *GC/MS* und *LC/MS* ist diese in der Literatur für Plasma beschrieben (Folkerd et al., 2013; Rosner et al., 2013), so dass zur Orientierung der Sensitivität von RIA- und IA-Methoden deren Empfindlichkeit in Plasma herangezogen werden kann. Aufgrund der geringen E2-Gehalte im Plasma postmenopausaler Frauen beschreiben Folkerd et al. (2014) eine hohe Schwankungsbreite des Gehaltes in Abhängigkeit der verwendeten Mess-Methode. Mit IA-Methoden, insbesondere RIA liegen die zu erwartenden Gehalte von E2 zwischen 21,7 und 101 pmol/L (direkter Immunoassay) beziehungsweise 22,0 und 58,7 pmol/L (indirekter Immunoassay). Mittels MS-Detektion können demgegenüber kleinere Analyt-Gehalte nachgewiesen werden. Hierbei schwanken die Gehalte für E2 zwischen 4,0 und 67,9 pmol/L. Die Empfindlichkeit von RIA-Methoden ist im Vergleich zur *GC/MS* beziehungsweise *LC/MS* weit aus schlechter, so dass gegenwärtig bei der Estrogen-Analyse verstärkt chromatographische Methoden Anwendung finden. Von Rogan et al. (2003) wurden E2, E1 und deren hydroxylierte sowie methylierte Metabolite im Brustgewebe mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) und elektrochemischer Detektion quantifiziert (Tab. 2). Die Nachweisgrenze (NWG) der analysierten Estrogen-Verbindungen lag näherungsweise bei 1 pmol/g Gewebe. Auch von Giese (2003) wird ein routinemäßiger Einsatz der HPLC mit elektrochemischer Detektion für Estrogene-Gehalte im Gewebe bis näherungsweise 1 pmol/g Gewebe beschrieben. Mittels *LC/MS/MS* wurden von Taioli et al. (2013) bei der Analyse von E2, E1 und deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten im Brustgewebe noch geringere NWG erzielt. Diese lagen für alle Metabolite bei 250 femtogramm (fg) auf der Säule. Gaikwad (2013) entwickelte mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) und gekoppeltem Triple-Quadrupol-MS eine Methode zur simultanen Bestimmung von über 100 Steroid-Verbindungen im normalen Brustgewebe. Diesbezüglich wurden auch E1, E2 sowie deren hydroxylierte und methylierte Metabolite erfasst, wobei noch geringere NWG im Bereich von 0,001 bis 15,7 pmol erreicht wurden Gaikwad (2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll für die Quantifizierung von freiem E2, E1 und deren Metaboliten eine Methode mittels Gaschromatographie und gekoppelten *Triple-Quadrupol-Massenspektrometer* (*GC/MS/MS*) entwickelt werden. Auch wenn bei dieser Methode gegenüber der *LC/MS/MS* eine Derivatisierung der Analyte erfolgen muss, welche sich als ein entscheidender Einflussfaktor auf die NWG einer Analysenmethode herausgestellt hat (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Braunersreuther, 2014), soll die Empfindlichkeit der Methode

durch die Optimierung der Ionisierungs- und Kollisionsenergien sowie der *dwell-time* gewährleistet werden. Zur Vermeidung Temperatur-bedingter Empfindlichkeitsverluste soll ferner die *Initial*-Temperatur sowie die *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur optimiert werden. Ob die entwickelte Mess-Methode für die routinemäßige Analyse von E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe geeignet ist, soll letztendlich bei der Übertragung der Methode auf reale Proben bewertet werden.

3 PROBLEMSTELLUNG

Nach Angaben des Robert Koch Instituts (2010) erkrankt jede 11. Frau in ihrem Leben an Brustkrebs. Brustkrebs stellt daher die häufigste Krebsneuerkrankung der Frau dar. Nur ein geringer Teil der Brustkrebspatientinnen trägt vermutlich familiär bedingte Mutationen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert werden. Der Großteil aller Neuerkrankungen ist auf hormonabhängige Brustkrebs-begünstigende Risikofaktoren, wie zum Beispiel Menopausalstatus, Kinderlosigkeit beziehungsweise ein höheres Alter bei der ersten Geburt, die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder einer *Hormone Replacement Therapy*, zurückzuführen (RKI, 2010). Diese Risikofaktoren verdeutlichen, dass weibliche Sexualhormone, insbesondere 17 β -Estradiol, Estron und deren Metabolite eine entscheidende Rolle bei der hormonellen Kanzerogenese der Brust spielen. Aber auch der persönliche Lebensstil, wie Alkohol- und Tabakkonsum sowie ein hoher *Body-Mass-Index* beeinflussen die Gehalte von 17 β -Estradiol und Estron im Brustgewebe (Mitrunen und Hirvonen, 2003), so dass diese mit einem verringerten oder erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll eine Methode für die Quantifizierung von freiem 17 β -Estradiol, Estron sowie deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten im Brustgewebe entwickelt werden. Da für diese Konzentrationen im unteren pikogramm-Bereich pro Gramm Gewebe zu erwarten sind (Rogen et al., 2003), wird die Anwendung einer empfindlichen Messmethode notwendig. Zur simultanen Bestimmung der geringen Gehalte von 17 β -Estradiol, Estron und den Metaboliten soll daher durch Messungen von Standardlösungen im *fullscan*, *Produktionenscan* und *multi-reaction-monitoring* ein Verfahren, mittels Gaschromatographie und gekoppelten *Triple-Quadrupol-Massenspektrometer*, auf Grundlage einer *multi-reaction-monitoring*-Methode, entwickelt werden.

Des Weiteren soll die Anwendbarkeit der entwickelten Methode überprüft werden, so dass diese im Anschluss auf reale Proben übertragen werden soll. Zu diesem Zweck wird gesundes Brustdrüsengewebe von Frauen, die sich aus rein kosmetischen Gründen einer Reduktions-Mammoplastik unterzogen haben, verwendet. Um den routinemäßigen Einsatz der Methode zu bewerten, sollen die ermittelten Gehalte mit den bisher publizierten Daten der Gewebekonzentrationen von 17 β -Estradiol, Estron sowie deren Metaboliten verglichen werden, wobei ebenfalls Korrelationen zwischen ausgewählten Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren und den analysierten Gewebespiegeln untersucht werden sollen.

Um im Rahmen der Methodenentwicklung maximale Signalintensitäten der etablierten *Quantifier*-Übergänge von 17 β -Estradiol, Estron und deren Metaboliten zu gewährleisten, müssen Empfindlichkeitsverluste so weit wie möglich reduziert werden. Daher soll eine Optimierung ausgewählter Methoden- und Geräte-Parameter erfolgen.

Anschließend soll eine Aufarbeitungsmethode für Brustgewebe entwickelt werden, die eine gezielte Isolation von 17β -Estradiol, Estron und deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten ermöglicht. Da hierbei ein Extraktionsschritt mit anschließender Festphasenextraktion geplant ist, soll mit undeuterten Standardlösungen die Extraktionseffizienz von Hexan mit der von Chloroform verglichen und der Einfluss der Festphasenextraktion auf den Verlust von 17β -Estradiol, Estron und deren Metaboliten bestimmt werden. Dafür ist es notwendig die Wiederfindungen der einzelnen Metabolite zu ermitteln, wobei die Peakflächen mit und ohne Extraktion beziehungsweise Aufreinigung bestimmt und miteinander verglichen werden sollen. Da 17β -Estradiol und dessen Metabolite im Brustgewebe zum Teil glucuronidiert beziehungsweise sulfoniert vorliegen, soll die Aufarbeitung ebenfalls die Spaltung dieser Konjugate sowie die Quantifizierung als freies 17β -Estradiol in Standardlösungen ermöglichen. Dazu soll eine alternative Messmethode zur massenspektrometrischen Analyse gesucht werden, mit welcher diese Konjugate erfasst werden können und folglich deren quantitative Spaltung ermöglicht wird. Aufgrund der gleichzeitigen β -Glucuronidase- und Sulfatase-Aktivität ist die Verwendung von Schneckensaft aus *helix pomatia* nicht geeignet. Ziel ist es daher, mit verschiedenen Inhibitoren für β -Glucuronidase aus *helix pomatia* beziehungsweise reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber sowie saurer Hydrolyse eine spezifische Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten zu ermöglichen. Bei der Bestimmung der Wiederfindung soll daher ebenfalls der Einfluss dieser Enzymproteine sowie die Bedingungen der hydrolytischen Spaltung bei 37°C für 16 Stunden untersucht werden.

Da eine Artefaktbildung während der Aufarbeitung einen kritischen Einflussfaktor auf die Analyseergebnisse darstellt und insbesondere Catechol-Estrogene als oxidationsempfindlich zu bewerten sind, soll die Aufarbeitung auf mögliche generierte Artefakte untersucht werden. Dazu sollen Standardlösungen als auch Gewebe mit deuteriertem 17β -Estradiol beziehungsweise einer Mischung aus deuteriertem 17β -Estradiol und Estron dotiert werden und nach vollständiger Aufarbeitung sowie einzelnen Prozess-Schritten auf mögliche Oxidationsprodukte, deuteriertem 2-/4-Hydroxyestradiol beziehungsweise 2-/4-Hydroxyestron, ausgehend von deuteriertem 17β -Estradiol beziehungsweise Estron, überprüft werden.

Die entwickelte Mess- und Aufarbeitungsmethode soll anschließend auf Brustgewebe übertragen werden, um die Anwendbarkeit des entwickelten Analyseverfahrens zu bewerten. Die Quantifizierung der einzelnen Analyten soll jeweils über die korrespondierenden deuterierten Analoga erfolgen, so dass es notwendig ist, deuterierte Standardmischungen aus 17β -Estradiol, Estron und den hydroxylierten und methylierten Metaboliten herzustellen. Die Standardmischungen müssen über den gesamten Messzeitraum eine gleichbleibend hohe Stabilität aufweisen. Dazu sollen zu jeder Probenserie zwei frisch hergestellte deuterierte Referenzen ohne Aufarbeitung analysiert werden und die absoluten Peakflächen von deu-

teriertem 17β -Estradiol, Estron sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten als Maß für die Lagerungsstabilität herangezogen werden.

Um Empfindlichkeitsverluste bei der Analyse der Proben möglichst gering zu halten, soll bei der Übertragung der in Standardlösungen entwickelten *multi-reaction-monitoring*-Methode auf Gewebematrix die Anwendbarkeit von *Qualifier*-integrierten Mess-Methoden gegenüber der ausschließlichen Verwendung der intensiveren *Quantifier*-Übergänge getestet werden. Die Etablierung der geeigneten Form von Mess-Methode soll dabei über den Vergleich der absoluten Peakflächen zwischen den einzelnen Mess-Methoden sowie den berechneten Quotienten aus *Quantifier* zu *Qualifier* in Standardlösungen und Gewebematrix erfolgen.

Die Güte der Aufarbeitung in Gegenwart von Gewebematrix soll über die Wiederfindung von deuteriertem 17β -Estradiol, Estron sowie der deuterierten hydroxylierten und methylierten Metabolite beurteilt werden. Hierzu sollen die Peakflächen der deuterierten Standards mit und ohne Aufarbeitung bestimmt und miteinander verglichen werden.

Im Anschluss daran sollen die ermittelten Gehalte von 17β -Estradiol, Estron und den Metaboliten mit den bisher publizierten Daten der Gewebekonzentrationen verglichen werden. Aufgrund der kleinen Studienpopulation sind die verfügbaren Daten bezüglich der Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren stark limitiert, so dass lediglich die Korrelationen zwischen 17β -Estradiol beziehungsweise Estron mit dem Menopausalstatus, dem *Body-Mass-Index* und Hormonsubstitutionen betrachtet werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Hilfsmittel sowie Chemikalien, Puffer und Lösungen. Des Weiteren werden die Gewinnung und Lagerung von Gewebespenden sowie die in dieser Arbeit angewandten Methoden näher erläutert.

4.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1.1 Analysengeräte

GC/FID	GC 6890 Plus (Art.-Nr. G1530A, Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen)
GC/MS/MS	Varian 450 GC/ Gas Chromatograph (Art.-Nr. GC 0905B064, Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen)
	Varian 300-MS/ TQ Mass Spectrometer (Art.-Nr. MS 0908W028, Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen)
	Varian CP 8400 Autosampler (GC0906B368, Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen)

4.1.2 Laborgeräte

Analysenwaage	Mettler AE-240-S (Art.-Nr. 702498; Mettler Toledo GmbH, Gießen)
Biofreezer	Typ 6483 (Art.-Nr. 73537; GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
	Typ UF 755G (Art.-Nr. 991.7050.32; Dometic Medical Systems; Luxemburg)
Einkanalpipetten	Eppendorf Research® (Eppendorf AG, Hamburg)
	10 - 100 µl (Art.-Nr. 3111 000.149)
	100 - 1000 µl (Art.-Nr. 3111 000.165)
	500 - 5000 µl (Art.-Nr. 3111 000.173)
	Microman (Gilson, Inc., Middleton, WI)
	10 - 100 µl (M100; Art.-Nr. F148504)
	50 - 250 µl (M250; Art.-Nr. F148505)
	100 - 1000 µl (M1000; Art.-Nr. F148506)

	Discovery Comfort (ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld) 0,5-10 µl (DV10C; Art.-Nr. 4042) 10 - 100 µl (DV100C; Art.-Nr. 4044) 20 - 200 µl (DV200C; Art.-Nr. 4045) 100 - 1000 µl (DV1000C; Art.-Nr. 4046) 1000 - 5000 µl (DV5000C; Art.-Nr. 4048)
Evaporatoren	Speed Vac Concentrator (Modell: Savant SPD 111V, Art.-Nr. SPD111V-230; Thermo Fisher Scientific, Bonn) sowie RVT 400 Refrigerated Vapor Refrigerated Vapor Trap (Modell: RVT 400-230, Art.-Nr. T11U-424900-TU; Thermo Fisher Scientific, Bonn) Rotational-Vacuum-Concentrator (Modell: RVC 2-25 CD plus, Art.-Nr. 101225; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) sowie Kühlfalle (Modell: CT 04-50 SA, Art.-Nr. 100505; Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode)
Heißsterilisator	Wärmeschrank mit forcierter Umluft (Art.-Nr. Serie FD 53, Binder Tuttlingen)
Messkolben	10 ml Superior (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)
Magnetrührer	IKA® RCT basic (Art.-Nr. 3810000; IKA Labor-technik Staufen)
Millipore-Laborsystem	Milli-Q Synthesis A10 (Millipore GmbH, Schwalbach); Quantum Ex Hochreinigungssäule mit Millipak Endfilter (VWR International GmbH, Darmstadt)
pH-Meter	inoLab pH 720 (Art.-Nr. 1A10-1112; Wissenschaftlich-Technische Werkstätten - WTW- Weilheim)
Präzisionsmörser	Anfertigung durch die institutseigene Werkstatt
Präzisionswaage	Denver Instrument (Modell: SI-2002; Denver Instrument GmbH, Göttingen)
Rotations- und Rüttelmischer	Mini-Rocker Shaker MR-1 (Art.-Nr. 90-ES-20; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Schüttelwasserbad	SW 22 (Art.-Nr. 9550322; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
Ultramikrowaage	Mettler Toledo AT21 Comperator (Mettler Toledo GmbH, Gießen)
Ultraschallbad	Sonorex (Typ RK-100; Bandelin electronic, Berlin)
Ultraturax	Ultra-Turrax® T10 basic (IKA®-Werke GmbH und Co. KG, Staufen)
SPE-Apparatur	Visiprep SPE Vacuum Manifold; 12-Port Model (Art.-Nr. 5-7030; Sigma Aldrich Chemie GmbH Geschäftsbereich Supelco, Deisenhofen)
Sterile Werkbank	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2 (Typ: Nu-480; INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald)
Vortexer	Vortex Genie 2 (Modell: G560E, Art.-Nr. 2-146860; Scientific Industries Si™, USA)
Zentrifugen	Multifuge 3SR plus, Heraeus (Art.-Nr. 75004371; Thermo Electron GmbH, Osterode) Fresco 21 Centrifuge, Heraeus (Art.-Nr.7500-2475; Thermo Electron GmbH, Osterode) Ultrazentrifuge (Modell: L8-60M; Beckman®, USA) EBA 12 (Typ: 1000; Hettich, Tuttlingen)

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Filamente	Filament for 3x0-MS and 1200/1200L systems (Art.-Nr. 9300000400; Brucker Daltonik GmbH, Bremen)
Kapillarsäulen	Varian factor four® capillary column VF-5ms 30 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm; Säulenmaterial: 5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan (Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen); Art.-Nr. CP 8944 Supelco SLB™5ms capillary column 30 m x 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm; Säulenmaterial: 5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan (Supelco Analytical Bellefonte, PA); Art.-Nr. 28471-4

Injektionskanülen	100 Sterican®, Einmal-Injektions-Kanüle (Art.-Nr. CT-21.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Injektionsspritzen	Spritze 701N, 10 µl, Ga262, 51 mm, aD 0,47 mm (Art.-Nr. 9180366; CTZ Klaus Trott Chromatographie, Kriftel)
Ionenquellen	Ion Volume, inert, 3x0-MS, Anwendung: EI (Art.-Nr. 93000020300; Bruker Daltonik GmbH, Bremen)
Liner	SSL-Liner (Borosilicat) HP 78,5 x 6,3; 4 mm iD deaktiv. Quarzwolle (Art.-Nr. 5183-4691; CZT Klaus Trott Chromatographie, Kriftel)
Pasteurpipetten	Glas, 230 mm (Art.-Nr. 612-1702; VWR International, Darmstadt) Glas, 150 mm (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe). Plastik, 7 ml, nicht steril, graduiert 3 ml (VWR International bvba, Leuven)
Pipettenspitzen	Spitzen ohne Filter für Eppendorf (Art.-Nr. 70.762 (1000µl); 70.760.002 (200 µl); 70.1115 (10µl), Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Spitzen für Microman-Pipetten (Art.-Nr. CP 100 F148414 (100 µl); CP 250 F148114 (250 µl); CP 1000 F148560 (1000 µl), Gilson, Inc., Middleton, WI)
Reagiergefäße	aus PP (Art.-Nr. 72.690.001; 1,5 ml; 72.695.500; 2 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
O-Ringe	non stick Liner O-Ring (Art.-Nr. 5188-5365; CTZ Klaus Trott Chromatographie, Kriftel)
Septen	Septa BTO®, 9 mm, Center Guide®, ca. 400 °C (Art.-Nr. 170900142; CTZ Klaus Trott Chromatographie, Kriftel)
SPE-Kartuschen	Bond Elut C18 500 mg, 3 ml (Art.-Nr. 12102088; Agilent Technologies® Deutschland, Böblingen) Supelclean™ C-18 SPE Tubes, 3 ml (Art.-Nr. 57012; Supelco Analytical, Bellefonte, PA)
Spritzen	10 ml (PZN: 3171038; TERUMO® GmbH, Eschborn)

Vials	Gewindeflasche (Art.-Nr. 451301212 und 4511-01211; CZT Klaus Trott Chromatographie) Schraubkappe (Art.-Nr. 3413S2022 und 3011-S1015; CTZ Klaus Trott Chromatographie) Mikroeinsätze, konisch (Art.-Nr. 501105031; CZT Klaus Trott Chromatographie) Federn (Art.-Nr. 501167011; CZT Klaus Trott Chromatographie)
Watteträger	Watteträger mit kleinem Wattekopf (15 cm Holz, unsteril, (PZN: 4768761; Höga-Pharm e. K., Cham)
Zentrifugenröhrchen	15 ml (Art.-Nr. 62.554.502; Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht) 15 ml (Art.-Nr. 114115; BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim) 50 ml (Art.-Nr. 227 270, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) Glas-Kulturröhrchen (100x16 mm, Art.-Nr. RG09; A. Hartenstein GmbH, Würzburg)

4.1.4 Hilfsmittel

Aluminiumfolie

Bechergläser

DURAN© Becher mit Ausguss (Art.-Nr. 2110614, 25 ml; Art.-Nr. 2110617, 50 ml; Art.-Nr. 2110624, 100 ml; Art.-Nr. 2110636, 250 ml; Art.-Nr. 2110653, 800 ml); DURAN Group GmbH, Wertheim/Main

Erlenmeyerkolben

DURAN© Erlenmeyerkolben, enghalsig mit Stopfen (Art.-Nr. 2121636, 250 ml); DURAN Group GmbH, Wertheim/Main

Hammer

handelsüblich, 300 g

Iodzählkolben

DURAN© Iodzählkolben mit Normschliff und Glasstopfen (Art.-Nr. 2419237, 250 ml); DURAN Group GmbH, Wertheim/Main

Laborglasflasche

DURAN© GL 45 mit Gewinde (Art.-Nr. 21801545, 1000ml); DURAN Group GmbH, Wertheim/Main

Laborspatel	Doppelspatel 18/8 Edelstahl (Art.-Nr E-1369, 2 mm Breite; E-1370, 4 mm Breite); Neolab Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg)
Messzylinder	DURAN® Messzylinder mit Sechskantfuß (Art.-Nr. 213961, 50 ml; Art.-Nr. 2139636, 100 ml; Art.-Nr. 2139636, 250 ml); DURAN Group GmbH, Wertheim/Main.
Parafilm	PARAFILM M®, 4 IN. X 125 FT. Rolle (Bemis Flexible Packaging, Oshkosh).

Pinzette

weitere diverse Glaswaren

4.1.5 Chemikalien

Standards

5α-Cholestan	> 97%, GC (Art.-Nr. C8003-100MG; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
17β-Estradiol	> 98% (Art.-Nr. E2758-1G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
E2-17-(β-D-Glucuronid)-Natriumsalz	\geq 98% (Art.-Nr. E1127-5MG; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
E2-3-(β-D-Glucuronid)-Natriumsalz	\geq 98% (Art.-Nr. E2127-5MG; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
E2-3-Sulfat-Natriumsalz	\sim 95% (Art.-Nr. E9505-25MG; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Estron	> 99% (Art.-Nr. E9750-1G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
2-Hydroxy-Estradiol	98% (Art.-Nr. F-B0774; Fountain Limited, Naxaar)
4-Hydroxy-Estradiol	98% (Art.-Nr. F-B0407; Fountain Limited, Naxaar)
16-α-Hydroxy-Estradiol	98% (Art.-Nr. F-B0825; Fountain Limited, Naxaar)
2-Hydroxy-Estron	98% (Art.-Nr. F-H921; Fountain Limited, Naxaar)
4-Hydroxy-Estron	98% (Art.-Nr. F-B0757; Fountain Limited, Naxaar)
16-α-Hydroxy-Estron	Eigensynthese AK Lehmann

2-Methoxy-Estradiol	98% (Art.-Nr. F-B0375; Fountain Limited, Naxaar)
4-Methoxy-Estradiol	98% (Art.-Nr. F-B00920; Fountain Limited, Naxaar)
2-Methoxy-Estron	98% (Art.-Nr. F-B0267; Fountain Limited, Naxaar)
3-O-Methyl-2-Hydroxy-Estron	98% (Art.-Nr. F-B313; Fountain Limited, Naxaar)
4-Methoxy-Estron	98% (Art.-Nr. F-H878; Fountain Limited, Naxaar)
3-Methoxy-2-Hydroxy-Estradiol	Eigensynthese AK Lehmann
3-Methoxy-4-Hydroxy-Estradiol	Eigensynthese AK Lehmann

markierte Standards

17β-Estradiol (16, 16, 17-d₃)	> 98% Atom-% D (Art.-Nr. 491187; Batch 1: OH08081, Batch 2: OH10193 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Estron (2, 4,16,16-d₄)	> 95% Atom-% D (Art.-Nr. 489204; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
2-Hydroxy-Estradiol-d₃	> 97% (Eigensynthese AK Lehmann)
4-Hydroxy-Estradiol-d₃	> 95% (Eigensynthese AK Lehmann)
16-α-Hydroxy-Estradiol (2, 4, 17-d₃)	98% (Art.-Nr. E888962; Toronto Research Chemicals; North York, ON)
2-Hydroxy-Estron (1, 4, 16, 16-d₄)	98% (Art.-Nr. D-5806; C/D/N Isotopes INC; Stadt)
4-Hydroxy-Estron (2, 4, 16, 16-d₄)	98% (Art.-Nr. D-5807; C/D/N Isotopes INC; Stadt)
16-α-Hydroxy-Estron (2, 4, 6, 6, 9-d₄)	98% (Art.-Nr. H941902; Toronto Research Chemicals; North York, ON)
2-Methoxy-Estradiol-d₃	Eigensynthese AK Lehmann
4-Methoxy-Estradiol-d₃	Eigensynthese AK Lehmann
2-Methoxy-Estron-d₄	Eigensynthese AK Lehmann
3-O-Methyl-2-Hydroxy-Estron-d₄	Eigensynthese AK Lehmann
4-Methoxy-Estron-d₄	Eigensynthese AK Lehmann
3-Methoxy-2-Hydroxy-Estradiol-d₃	Eigensynthese AK Lehmann
3-Methoxy-4-Hydroxy-Estradiol-d₃	Eigensynthese AK Lehmann

Lösungsmittel, Verbrauchskemikalien und Enzymsubstanzen

Aceton	HiPerSolv Chromanorm, 99,9% (Art.-Nr. 10123; VWR BDH Prolabo®, Leuven)
---------------	--

Aluminiumoxid	Puder (Art.-Nr. 393706201; Agilent Technologies®, Deutschland GmbH, Böblingen)
Ameisensäure (FA)	> 99%, p.a. (Art.-Nr. 10123; Grüssing GmbH, Filsum)
Ammoniumacetat	≥ 98% (Art.-Nr. A7330; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Calciumchlorid Dihydrat	> 99% (Art.-Nr. 22,350-6; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Chloroform	99,97% Analytical Reagent Grade (Art.-Nr. C/4960/17; Fisher Scientific Inc., USA)
Dichlormethan	ROTISOLV Pestilyse, ≥ 99,9% (Art.-Nr. T162.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	> 99% (Art.-Nr. P030.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Ethanol	> 99,5% (Art.-Nr. 5054.2; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Ethylacetat	≥ 99,5% (Art.-Nr. CP42.2; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
α-(+)-Glucose	≥ 99,5% (Art.-Nr. HN06.3; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
β-Glucuronidase Typ HP-2	aus <i>helix pomatia</i> ; Glucuronidase 197114 U/ml, 876 U/ml Sulfatase (Art.-Nr. G7017; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
β-Glucuronidase Typ H-1	aus <i>helix pomatia</i> (Typ H-1) 24910 U/g (Art.-Nr. S9626-10KU; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
β-Glucuronidase Typ B-1	aus Rinderleber, > 1000000 U/g solid (Art.-Nr. G0251-500KU; 1644000 U/g (Art.-Nr. G0251-500KU; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Glucuronsäure	> 98% (Art.-Nr. G5269-10G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
n-Heptan	Rotipuran > 99%, reinst (Art.-Nr. T174.1; Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe) Rotisol® > 99%, Pestilyse (Art.-Nr. X878.1; Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe)

	Chromasolv® plus for HPLC > 99% (Art.-Nr. 650536-1L; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
n-Hexan	Rotipuran® > 99% (Art.-Nr. T174.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	> 99% (Art.-Nr. P5405-250G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	≥ 99% (Art.-Nr. 3904.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Kaliumhydroxid (KOH)	1 mol/l (Art.-Nr. 22015; Grüssing GmbH, Filsum).
Kaliumphosphat	≥ 99% (Art.-Nr. P5655-500G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Magnesiumsulfat (MgSO₄)	≥ 99,5% (Art.-Nr. M7506-500G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Methanol ROTISOLV®	99,9% (Art.-Nr. 34860; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Methanol LiChrosolv®	99,9% (Art.-Nr. 1.06007.2500; Merck KGaA, Darmstadt)
Methanol (MeOH)	99,95% (Art.-Nr. AE71.2; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Natriumbicarbonat	Art.-Nr. S5761-1Kg; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	≥ 99,5% (Art.-Nr. 95886-1KG; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Natriumhydrogenphosphat x H₂O	≥ 99% (Art.-Nr. P030.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	1 M (Art.-Nr. 35256; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide mit Trimethylchlorsilan (BSTFA)	99% for GC derivatization (Art.-Nr. 394858-25ML; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim)
2-Propanol	Chromasolv® plus for HPLC, ≥ 99,8% (Art.-Nr. 34863-2,5L; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Saccharinsäure	> 98% (Art.-Nr. S4104-10G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Saccharinsäure-1,4-lacton x H₂O	Art.-Nr. S0375-1G; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Salzsäure	1 mol/l (Art.-Nr. 23204; Grüssing GmbH, Filsum)
Wasser	LC-MS Grade (Art.-Nr. 83645.320; VWR International GmbH, Darmstadt)

4.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Stammlösungen, Verdünnungen und Enzymlösungen wurden im Tiefkühlschrank gelagert (Temperatur $\leq -19^{\circ}\text{C}$). Die im Folgenden aufgeführten Puffer und Elutionsmittel wurden bei verschiedenen Versuchen dieser Arbeit verwendet, so dass diese keinem konkreten Versuchsabschnitt zugeordnet sind.

PBS-CMF (engl.: *phosphate-buffered-saline-calcium-magnesium-free*)

Es werden 20,00 g NaCl, 0,50 g KCl, 2,77 g Na₂HPO₄ sowie 0,51 g KH₂PO₄ unter Rühren in 250 ml Millipore-Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wird der Puffer 1:10 verdünnt.

Sörensen Phosphat-Puffer (5-fach)

11,35 Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) und 12 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) werden unter Rühren in je 250 ml Wasser (LC-MS grade) gelöst. Mit Hilfe der basischen Komponente (Na₂HPO₄-Lösung) wird die KH₂PO₄-Lösung unter ständigem Rühren auf einen pH Wert von 4,9 eingestellt.

Phosphat Puffer (20% MeOH)

Es werden 20 ml MeOH mit 80 ml Sörensen Phosphat-Puffer (siehe oben) gemischt und anschließend mit 0,8 ml Ameisensäure versetzt.

20% MeOH (v/v)

Es werden 40 ml MeOH mit 160 ml Wasser (MS-Grade) gemischt und anschließend mit 1,6 ml Ameisensäure versetzt.

85% MeOH (v/v)

Es werden 170 ml MeOH mit 30 ml Wasser (MS-Grade) gemischt und anschließend mit 0,3 ml Ameisensäure versetzt.

100% MeOH (v/v)

Es werden 400 ml MeOH mit 0,4 ml Ameisensäure versetzt.

MRM-Methodenentwicklung, Optimierung der GC-Methodenparameter und Herstellung deuterierter Standardmischungen

Von E1, 2-/4-HO-E1, 16- α -HO-E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 beziehungsweise E2, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2 und 2-/4-MeO-E2 sowie der jeweiligen deuterierten Analoga, mit Ausnahme von Methylierungsprodukten, standen Referenzlösungen in einer Konzentrationen von $c = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ gelöst in ACN sowie ACN (0,1% FA) bereits zur Verfügung (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Hoffmann, 2014). Deuteriertes 2- und 4-HO-E2 wurden im Rahmen der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Christoph Peschke (2011) synthetisiert. Auch von 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 waren Referenzlösungen einer Konzentration von $c = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (gelöst in MeOH) vorhanden (Dissertationsprojekt Zettner). Für deuteriertes beziehungsweise undeuteriertes E1, E2 sowie deren hydroxylierte Metabolite werden drei weitere Standardlösungen in ACN sowie ACN (0,1% FA) beziehungsweise in MeOH hergestellt:

($c_{\text{Metabolit}} = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) // 100 μl + 900 μl // 100 μl + 900 μl	Lösung 1 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)
($c_{\text{Metabolit}} = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$) // 100 μl + 900 μl	Lösung 2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)
($c_{\text{Metabolit}} = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$) // 100 μl + 900 μl	Lösung 3 ($c = 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$)

Die Synthese der methylierten deuterierten Standards erfolgte im Arbeitskreis (AK) Lehmann, jedoch nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

E2-Metaboliten-Referenzmischung 1

Die Mischung beinhaltet die folgenden Metabolite in einer Konzentration von $c = 30 \text{ ng}/10\text{ml}$:

E2 / E2- d_3 / 2-HO-E2 / 4-HO-E2 / 2-MeO-E2 / 4-MeO-E2

Die Herstellung der Mischung erfolgt durch das Zusammenpipettieren von jeweils 300 μl der 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$ Lösung 1 (gelöst in ACN) in ein Glas-Zentrifugenröhrchen. Nach dem Evaporieren des LM ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 3 \text{ h}$) wird der Rückstand dreimal in 500 μl ACN gelöst, jeweils mittels Glas-Pasteurpipette in ein 10 ml Messkolben überführt und mit ACN bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Qualitätssicherung

Es werden 1,5 ml E2-Standardlösung (Lösung 3; $c = 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$) in ein GC-Vial überführt und anschließend bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 2 \text{ h}$). Der Rückstand wird

in je 750 µl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen, für drei Stunden silyliert und für die späteren Analysen mittels GC/MS/MS im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Screening der Chemikalien und Laborgeräte auf Kontaminationen mit E2

Sulfatase-Lösung (100 U/Ansatz)

Die Sulfatase besitzt eine Aktivität von 24910 U/g Feststoff (Typ H-1). Für 100 U pro Inkubationsansatz sind 4,0 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 13,0 mg Feststoff eingewogen und in 650 µl Sørensen-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst. Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 100 U/200 µl und ist frisch herzustellen.

β-Glucuronidase-Lösung (10.000 U/Ansatz)

Die β-Glucuronidase besitzt eine Aktivität von 164400 U/g Feststoff (Typ B-1). Für 10000 U pro Inkubationsansatz sind 6,1 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 20,0 mg Feststoff eingewogen und in 656 µl Sørensen-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst. Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 10.000 U/200 µl und ist frisch herzustellen.

E2-d₃

550 µg E2-d₃ werden eingewogen und in 550 µl MeOH gelöst (c = 1 mg/ml). Von dieser Stammlösung erfolgen weitere Verdünnungen auf eine Konzentration von c = 1 pg/µl.

Lösung (c = 1 mg/ml) // 10 µl/1000 µl // 100 µl/1000 µl Endkonzentration c = 1 ng/µl

Lösung (c = 1 ng/µl) // 10 µl/1000 µl // 10 µl/1000 µl Endkonzentration c = 1 pg/µl

E2-3-Sulfat

686 µg E2-3-S werden eingewogen und in 686 µl MeOH gelöst (c = 1 mg/ml). Von dieser Stammlösung erfolgen weitere Verdünnungen auf eine Konzentration von c = 1 pg/µl.

Lösung (c = 1 mg/ml) // 10 µl/1000 µl // 100 µl/1000 µl Endkonzentration c = 1 ng/µl

Lösung (c = 1 ng/µl) // 10 µl/1000 µl Endkonzentration c = 10 pg/µl

Lösung (c = 10 pg/µl) // 100 µl/1000 µl Endkonzentration c = 1 pg/µl

E2-3-Glucuronid

239 µg E2-3-S werden eingewogen und in 239 µl MeOH gelöst (c = 1 mg/ml). Von dieser Stammlösung erfolgen weitere Verdünnungen auf eine Konzentration von c = 1 pg/µl.

Lösung (c = 1 mg/ml) // 10 µl/1000 µl // 100 µl/1000 µl Endkonzentration c = 1 ng/µl

Lösung (c = 1 ng/µl) // 10 µl/1000 µl Endkonzentration c = 10 pg/µl

Lösung (c = 10 pg/µl) // 100 µl/1000 µl

Endkonzentration c = 1pg/µl

Überprüfung der Extraktionseffizienz von Hexan und Chloroform

E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 2

Die Mischung beinhaltet die folgenden Metabolite:

E1 / 2-/4-MeO-E1 / 3-O-Me-2-HO-E1 c = 6000 pg/10 ml

E2 / 2-/4-MeO-E2 c = 7500 pg/10 ml

16-α-HO-E1/-E2 / 3-O-Me-2-/4-HO-E2 / 2-/4-HO-E2 / 2-/4-HO-E1 c = 30 ng/10 ml

Die Herstellung der Mischung erfolgt durch das Zusammenpipettieren von jeweils 60 µl, 75 µl und 300 µl der 100 pg/µl Lösung 1 (gelöst in ACN; Seite 27) von E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 beziehungsweise E2 und 2-/4-MeO-E2 sowie 16-α-HO-E1/-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2, 2-/4-HO-E2 und 2-/4-HO-E1 in ein Glas-Zentrifugenröhrchen. Nach dem Evaporieren des LM ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 3 \text{ h}$) wird der Rückstand dreimal in 500 µl ACN gelöst, jeweils mittels Glas-Pasteurpipette in ein 10 ml Messkolben überführt und mit ACN bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Überprüfung der Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase aus *helix pomatia* sowie Überprüfung verschiedener Inhibitoren für β -Glucuronidase

E2 für Inkubationsansatz

Es werden 244 µg E2 eingewogen und in 890 µl MeOH gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1 nmol/µl. Die Stammlösung wird mit MeOH auf eine Konzentration von 1 pmol/µl verdünnt:

1 nmol/µl // 10 µl/1000µl // 100 µl/1000µl c = 1 pmol/µl

E2-3-G für Inkubationsansatz

Es werden 92 µg E2-3-G eingewogen und in 200 µl MeOH gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1 nmol/µl. Die Stammlösung wird mit MeOH auf eine Konzentration von 1 pmol/µl und 10 pmol/µl verdünnt:

1 nmol/µl // 10 µl/1000µl c = 10 pmol/µl

10 pmol/µl // 100 µl/1000µl c = 1 pmol/µl

E2-3-S für Inkubationsansatz

Es werden 292 µg E2-3-S eingewogen und in 780 µl MeOH gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1 nmol/µl. Die Stammlösung wird mit MeOH auf eine Konzentration von 1 pmol/µl und 10 pmol/µl verdünnt:

1 nmol/µl // 10 µl/1000µl c = 10 pmol/µl
10 pmol/µl // 100 µl/1000µl c = 1 pmol/µl

E1 als interner Standard (ISTD)

Es werden 240 µg E1 in 240 µl MeOH gelöst (c = 1 mg/ml). Die Stammlösung wird mit MeOH auf eine Konzentration von c = 10 µg/ml verdünnt:

1 mg/ml // 10 µl /1000 µl c = 10 µg/ml

5α-Cholestan als interner Gerätestandard

324 µg 5α-Cholestan (ChAN) werden in 324 µl n-Heptan gelöst (c = 1 mg/ml). Aus dieser Stammlösung erfolgt eine Verdünnung mit n-Heptan auf eine Konzentration von c = 10 µg/ml:

1 mg/ml // 10 µl /1000 µl c = 10 µg/ml

Glucuronsäure-Lösung

Hemmkonzentration c = 150 mM in 2 ml Inkubationsansatz:

Es werden 68 mg Glucuronsäure (GA) eingewogen und in 2000 µl Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 4,9) gelöst. Für eine Konzentration von GA mit c = 150 mM in einem 2 ml Inkubationsansatz werden 1800 µl der hergestellten Lösung verwendet.

Hemmkonzentration c = 200 mM in 2 ml Inkubationsansatz:

Es werden 92 mg GA eingewogen und in 2000 µl Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 4,9) gelöst. Für eine Konzentration von GA mit c = 200 mM in einem 2 ml Inkubationsansatz werden 1800 µl der hergestellten Lösung verwendet.

Hemmkonzentration c = 500 mM in 2 ml Inkubationsansatz:

Es werden 259 mg GA eingewogen und in 2000 µl Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) gelöst. Für eine Konzentration von GA mit c = 500 mM in einem 2 ml Inkubationsansatz werden 1800 µl der hergestellten Lösung verwendet.

Saccharinsäure-Lösung

Hemmkonzentration c = 100 mM in 2 ml Inkubationsansatz:

Es werden 55 mg Saccharinsäure (SA) eingewogen und in 2000 µl *Sørensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) gelöst.

Saccharinsäurelacton-Lösung

Hemmkonzentration c = 10 mM in 2 ml Inkubationsansatz:

14,1 mg Saccharinsäure-1,4-Lacton-Monohydrat (SAL) werden in 6000 µl *Sørensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) gelöst.

Salzsäure

Es wird 12 M unverdünnte, konzentrierte Salzsäure (HCl) verwendet.

Sulfatase-Lösung (100 U/Ansatz)

Die Sulfatase besitzt eine Aktivität von 24910 U/g Feststoff (Typ H-1). Die Herstellung der Sulfatase-Lösung erfolgt analog der Herstellung *Screening der Chemikalien und Laborgeräte auf Kontaminationen mit E2*.

Sulfatase-Lösung (200 U/Ansatz)

Die Sulfatase besitzt eine Aktivität von 24910 U/g Feststoff (Typ H-1). Für 100 U pro Inkubationsansatz sind 8,0 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 27,0 mg Feststoff eingewogen und in 672 µl *Sørensen*-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst. Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 200 U/200 µl und ist frisch herzustellen.

***β*-Glucuronidase-Lösung (10.000 U/Ansatz)**

Die *β*-Glucuronidase besitzt eine Aktivität von 3695000 U/g Feststoff (Typ B-1). Für 10000 U pro Inkubationsansatz sind 2,7 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 9,0 mg Feststoff eingewogen und in 667 µl *Sørensen*-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst. Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 10.000 U/200 µl und ist frisch herzustellen.

Einfluss der Probenaufarbeitung auf die Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten

E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 3

Die Mischung beinhaltet die folgenden Metabolite:

E1 / 2-/4-MeO-E1 / 3-O-Me-2-HO-E1 c = 3000 pg/5 ml

E2 / 2-/4-MeO-E2 c = 3750 pg/5 ml

16-α-HO-E1/-E2 / 3-O-Me-2-/4-HO-E2 / 2-/4-HO-E2 / 2-/4-HO-E1 c = 15 ng/5 ml

Die Herstellung der Mischung erfolgt durch das Zusammenpipettieren von jeweils 30 µl, 37,5 µl und 150 µl der 100 pg/µl Lösung 1 (gelöst in ACN mit 0,1% FA; Seite 27) von E1, 2-/4-MeO-

E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 beziehungsweise E2 und 2-/4-MeO-E2 sowie 16- α -HO-E1/-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2, 2-/4-HO-E2 und 2-/4-HO-E1 in ein Glas-Zentrifugenröhrchen. Nach dem Evaporieren des LM ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 3 \text{ h}$) wird der Rückstand dreimal in 500 μl ACN (0,1% FA) gelöst, jeweils mittels Glas-Pasteurpipette in ein 10 ml Messkolben überführt und mit ACN (0,1% FA) bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Sulfatase-Lösung (100 U/Ansatz)

Die Sulfatase besitzt eine Aktivität von 24910 U/g Feststoff (Typ H-1). Für 100 U pro Inkubationsansatz sind 4,0 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 15,0 mg Feststoff eingewogen und in 748 μl *Sörensen*-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst. Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 10.000 U/200 μl und ist frisch herzustellen.

666,7 μl dieser Enzymlösung werden im Mastermix verwendet.

β -Glucuronidase-Lösung (10.000 U/Ansatz)

Die β -Glucuronidase besitzt eine Aktivität von 164400 U/g Feststoff (Typ B-1). Für 10000 U pro Inkubationsansatz sind 6,1 mg Feststoff notwendig. Für 3 Inkubationsansätze werden 22,0 mg Feststoff eingewogen und in 721 μl *Sörensen*-Phosphat Puffer (pH 4,9) gelöst.

Diese Lösung beinhaltet eine Enzymaktivität von 10.000 U/200 μl und ist frisch herzustellen.

666,7 μl dieser Enzymlösung werden im Mastermix verwendet.

Optimierung der Extraktionseffizienz

Es wird die E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 3 (Seite 31) verwendet.

Überprüfung der Aufarbeitung auf mögliche generierte Artefakte

E2-d₃ als ISTD

Es werden 234 μg E2-d₃ eingewogen und in 2000 μl MeOH gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Stammlösung wird mit MeOH auf eine Konzentration von 170 ng/ml verdünnt:

17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ // 100 $\mu\text{l}/1000\mu\text{l}$ // 100 $\mu\text{l}/1000 \mu\text{l}$

c = 170 ng/ml

Des Weiteren werden Standardlösungen von E2-d₃ und E1-d₄ in einer Konzentration von jeweils 10 pg/ μl verwendet.

Gewinnung von Gewebespenden

Krebs-Henseleit Puffer

Für einen Liter (L) Puffer werden folgende Komponenten eingewogen:

- D-Glucose: 2,0 g
- MgSO₄ (anh.): 0,141 g
- KH₂PO₄: 0,16 g
- KCl: 0,35 g
- NaCl: 6,9 g

Diese Komponenten werden in 90% des Volumens (Millipore Wasser) unter Rühren gelöst. Im Anschluss wird die Lösung mit 0,373 g Calciumchlorid Dihydrat und 2,1 g Natriumbicarbonat versetzt und der pH-Wert mit 1 M HCl auf $7,2 \pm 0,1$ eingestellt. Das Volumen wird auf 1 L ergänzt und der Puffer im Anschluss steril filtriert.

Bestimmung der Wiederfindung in Matrixproben, Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Gewebe, Korrelationsanalysen

E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung

Die Herstellung der Mischung erfolgt durch das Zusammenpipettieren von jeweils 440 µl der 10 ng/µl Lösung (gelöst in ACN mit 0,1% FA; Seite 27) von 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₃, 8,5 ml der 1:10 Verdünnung des 4-HO-E1-d₄-Methylether-Syntheseproduktes, 2 ml der 1:10 Verdünnung des 2-HO-E1-d₄-Methylether-Syntheseproduktes und 2 ml der 1:100 Verdünnung des 2-HO-E1-d₄-Methylether-Syntheseproduktes in ein 50 ml Schnappdeckelglas. Nachdem die Mischung für 30 Sekunden gevortext wurde, wird diese in Portionen zu je 1 ml in GC-Vials überführt. Die 2-/4-HO-E1-d₄-Methylether-Syntheseprodukte besitzen durch nicht umgesetzte Ausgangssubstanz und Nebenreaktionen Kontaminationen von E1-d₄, 16-α-HO-E1-d₄ sowie 2-/4-HO-E1-d₄ (Kap. 5.4.1.3), daher waren diese Metabolite durch den Zusatz der d₄-Methylether-Syntheseprodukte in der Mischung bereits enthalten. Alle Probenansätze werden im Rahmen der Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Gewebe sowie der Bestimmung der WFR mit 100 µl der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung versetzt (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht der den Probenansätzen zudotierten Absolutmengen über 100 µl einer E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung.

Metabolit	Absolutmenge (Metabolit/Ansatz)	Absolutmenge (Metabolit/2 µl)
E1-d ₄	224,3 pg	15,0 pg
2-HO-E1-d ₄	6213,3 pg	414,2 pg
4-HO-E1-d ₄	10963 pg	730,9 pg
16-α-HO-E1-d ₄	5724,7 pg	381,6 pg
2-/4-HO-E2-d ₃	17600 pg	1173,3 pg
2-MeO-E1-d ₄	10674,4 pg	711,6 pg
4-MeO-E1-d ₄	2061,5 pg	137,4 pg
3-O-Me-2-HO-E1-d ₄	1554,4 pg	103,6 pg

E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung

Die Herstellung der Mischung erfolgt durch das Zusammenpipettieren von 2,0 ml der 100 pg/µl Lösung (gelöst in ACN mit 0,1% FA; Seite 27) von E2-d₃, 490 µl der 10 ng/µl Lösung (gelöst in ACN mit 0,1% FA; Seite 27) von 16-α-HO-E2-d₃, 600 µl der 1:100 Verdünnung des 2-HO-E2-d₃-Methylether-Syntheseproduktes, 50 µl des unverdünnten Syntheseproduktes des 2-HO-E2-d₃-Methylether-Standards sowie 120 µl der 1:10 Verdünnung des 4-HO-E2-d₃-Methylether-Syntheseproduktes in ein 50 ml Schnappdeckelglas. Nachdem die Mischung für 30 Sekunden gevortext wurde, wird diese in Portionen zu je 1 ml in GC-Vials überführt. Alle Probenansätze wurden im Rahmen der Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Gewebe sowie der Bestimmung der WFR mit 100 µl beziehungsweise 15 µl der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung versetzt (Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht der den Probenansätzen zudotierten Absolutmengen über 100 µl beziehungsweise 15 µl einer E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung.

<i>100 µl E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung</i>		
Metabolit	Absolutmenge (Metabolit/Ansatz)	Absolutmenge (Metabolit/2 µl)
E2-d ₃	1600 pg	106,7 pg
16-α-HO-E2-d ₃	19600 pg	1306,7 pg
2-MeO-E2-d ₃	1983,7 pg	132,3 pg
4-MeO-E2-d ₃	831,8 pg	55,5 pg
<i>15 µl E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung</i>		
E2-d ₃	240 pg	16 pg
16-α-HO-E2-d ₃	2940 pg	196 pg
2-MeO-E2-d ₃	297,6 pg	19,8 pg
4-MeO-E2-d ₃	124,8 pg	8,3 pg

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung einer geeigneten Ionisierungsenergie

Für die Bestimmung der optimalen Ionisierungsenergie werden die charakteristischen Fragmente von E1, E2 sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite (Tab. 5) nach Castagnetta et. al. (1992) und Hernando et al. (2004) sowie von H.-O. Hoppen und L. Siekmann (1974) verwendet.

Tab. 5: Molekülion (M⁺) sowie charakteristische Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z) der intensivsten Fragmente von E1- und E2-Metaboliten.

Analyt	M ⁺	charakteristische m/z		
E1	342	257	244	218
2/4-HO-E1	430	345	306	-
16- α -HO-E1	430	341	286	-
2-/4-MeO-E1	372	357	342	-
3-O-Me-2-HO-E1	372	357	342	-
E2	416	326	285	-
2/4-HO-E2	504	373	325	-
16- α -HO-E2	504	324	414	-
2/4-MeO-E2	446	325	315	-
3-O-Me-2/4-HO-E2	446	325	315	-

Um die geeignete Ionisierungsenergie zu ermitteln, werden *fullscan*-Chromatogramme bei 20 eV, 70 eV und 150 eV aufgenommen. Dabei wird die optimale Ionisierungsenergie aus dem Vergleich der absoluten Peakflächen (PF) der charakteristischen Massenspuren von E1- und E2-Metaboliten ermittelt (Tab. 5).

4.2.1.1 Lösungen

E1 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E1 (c = 10 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-MeO-E1 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2-HO-E1 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
E2 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E2 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E2 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
2/4-MeO-E2 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2/4-HO-E2 (c = 100 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
BSFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.1.2 **Durchführung**

Zur Aufnahme der *fullscan*-Chromatogramme werden jeweils 150 µl der Referenzlösungen von E2 und dessen Metaboliten beziehungsweise 30 µl der Referenzlösungen von E1 und den Metaboliten mit $c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ in ein GC-Vial pipettiert und bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$). Von 16- α -HO-E1 werden 30 µl einer Konzentration von $c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ verwendet. Der Rückstand wird in je 15 µl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen, für drei Stunden silyliert und anschließend mittels GC/MS/MS analysiert. Da sich die charakteristischen Fragmente von E1- und E2-Metaboliten in einem Masse/Ladungsbereich (m/z) zwischen $m/z = 218$ beziehungsweise $m/z = 285$ und $m/z = 504$ befinden, wird das Messintervall im Quadrupol 1 (Q1) einheitlich auf einen Bereich von $m/z = 200$ beziehungsweise 250 - 600 eingestellt. Zur Analyse wird jeweils 1 µl des derivatisierten Standards in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15) angegeben. Die Absolutmengen auf der Säule betragen für E2 und dessen Metabolite jeweils 500 pg. Für E1 und dessen Metabolite beziehungsweise 16- α -HO-E1 resultiert eine Absolutmenge von 100 pg beziehungsweise 10 pg.

4.2.2 **Bestimmung charakteristischer Fragmente im Produktionenscan**

Das aus dem *fullscan* festgelegte *precursor*-ion wird selektiv in den Q1 geleitet und im zweiten Quadrupol (Q2) mittels Argon fragmentiert, während im dritten Quadrupol (Q3) in einem festgelegten Messintervall charakteristische Tochterfragmente gescreent werden. Die Wahl des eingestellten Messintervalls richtet sich dabei nach dem größten beziehungsweise kleinsten m/z des jeweiligen charakteristischen Fragments (Kap. 4.2.1), so dass dieses in einem Bereich zwischen $m/z = 200 - 450$ eingestellt wird.

4.2.2.1 **Lösungen**

E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E1 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-MeO-E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2-HO-E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
E2 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E2 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E2 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2/4-MeO-E2 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2/4-HO-E2 ($c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.2.2 Durchführung

Zur Aufnahme der Produktionenspektren werden 30 µl der Referenzlösungen von E2 und dessen Metaboliten mit $c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ in ein GC-Vial pipettiert. Von E1 und den Methyl-Catecholen werden 30 µl einer Konzentration von $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ verwendet, während von 2-/4-HO-E1 beziehungsweise 16- α -HO-E1 15 µl beziehungsweise 30 µl der Referenzlösungen mit $c = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ in ein GC-Vial pipettiert werden. Das Lösungsmittel (LM) wird anschließend im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 µl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 µl des derivatisierten Standards in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15) angegeben. Durch eine Variation der Kollisionsenergie (CE) im Q2 wird eine Optimierung der Massenspektren bezüglich der größtmöglichen absoluten PF bewirkt, wobei im Zuge dessen eine CE von 5 eV, 10 eV, 15 eV, 20 eV und 30 eV getestet wird. Die Absolutmengen auf der Säule betragen für E2 und dessen Metabolite jeweils 100 pg. Für E1, dessen Methyl-Catechole sowie von 2-/4-HO-E1 beziehungsweise 16- α -HO-E1 betragen die Absolutmenge jeweils 10 pg, 50 pg sowie 100 pg.

4.2.3 Screening der Kollisionsenergien

Um eine möglichst große Empfindlichkeit für den Nachweis und die Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten zu gewährleisten, wird für die jeweiligen *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenübergänge der Einfluss verschiedener CE auf die resultierende PF untersucht.

4.2.3.1 Lösungen

E1 ($c = 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-MeO-E1 ($c = 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2-HO-E1 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
E2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
16- α -HO-E2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
2/4-MeO-E2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2/4-HO-E2 ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
BSFTA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.3.2 Durchführung

Um zunächst einen möglichst weiten Bereich der CE zu testen, wird jeweils ein *Screening* bei 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV durchgeführt. Die jeweilige Analytlösung wird in ein GC-Vial pipettiert (Tab. 6), das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl des derivatisierten Standards in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15) angegeben. Die Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten variieren dabei zwischen 2 pg und 10 pg auf der Säule (Tab. 6). Die im *Screening* der CE zu verwendende *dwell-time* beträgt 0,25 Sekunden (sec.)

Tab. 6: Massenübergänge, Ausgangskonzentrationen und Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten im *Screening* der CE.

Analyt	Über- gang (m/z)	C _{Analyt} (pg/ μl)	pipettiertes Volumen (μl)	Absolutmenge (pg/Säule)
E1	342_257	1	60	2
	342_244			
	342_218			
2-/4-HO-E1	430_345	10	30	10
	430_306			
16- α -HO-E1	430_286	10	15	5
2-MeO-E1	372_342	1	60	2
	372_357			
4-MeO-E1	372_342	1	120	4
	372_357			
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	10	15	5
	372_357			
E2	416_285	10	30	10
	416_326			
2-/4-HO-E2	504_373	10	30	10
	504_325			
16- α -HO-E2	504_414	10	30	10
	504_324			
	504_295			
2-/4-MeO-E2	446_315	10	30	10
	446_325			
	446_416			
3-O-Me-2/4-HO-E2	446_315	10	30	10
	446_325			
	446_416			

4.2.4 *Fine-tuning der Kollisionsenergien*

Die *CE*, welche im *Screening* die größte absolute *PF* erzielt, wird einem *Fine-tuning* unterzogen. Durch kleinere Abstufungen der *CE* wird getestet, ob eine *CE*, die sich nur geringfügig von der im *Screening* ermittelten, maximalen *CE* unterscheidet, zu einer höheren Intensität der Tochterfragmente von E1- und E2-Metaboliten führt und folglich eine Verschiebung der optimalen *CE* hervorruft.

4.2.4.1 **Lösungen**

E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
16-α-HO-E1 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-MeO-E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2-HO-E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
E2 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
16-α-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2/4-MeO-E2 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2/4-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.4.2 **Durchführung**

Die jeweilige Analytlösung wird in ein GC-Vial pipettiert (Tab. 7), das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl des derivatisierten Standards in das *GC/MS/MS*-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15) angegeben. Die Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten variieren dabei zwischen 2 und 10 pg auf der Säule (Tab. 7). Die im *Fine-tuning* der *CE* zu verwendende *dwell-time* beträgt 0,25 sec.

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 7: Massenübergänge, Ausgangskonzentrationen und Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten im *Fine-tuning* der CE.

Analyt	Massen- übergang	CE <i>Fine-tuning</i> (eV)	c _{Analyt} (pg/μl)	pipetiertes Volumen (μl)	Absolutmenge <i>Fine-tuning</i> (pg/Säule)
E1	342_257	5 - 18	1	60	2
	342_244	10 - 22			
	324_218	10 - 22			
2-HO-E1	430_345	10 - 18	10	30	10
	430_306	10 - 22			
4-HO-E1	430_345	10 - 18	10	30	10
	430_306	10 - 22			
16-α-HO-E1	430_286	8 - 22	10	15	5
2-/4-MeO-E1	372_342	10 - 20	1	60	2
	372_357	3,5 - 12			
4-MeO-E1	372_342	10 - 20	1	60	2
	372_357	3,5 - 12			
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	5 - 14	1	60	2
	372_357	2,5 - 10			
E2	416_285	10 - 20	1	75	2,5
	416_326	5 - 15			
2-HO-E2	504_373	10 - 22	10	30	10
	504_325	2,5 - 22			
4-HO-E2	504_373	10 - 22	10	30	10
	504_325	9 - 22			
16-α-HO-E2	504_414	2,5 - 15	10	30	10
	504_324	2,5 - 15			
	504_295	10 - 22			
2-MeO-E2	446_315	8 - 16	1	75	2,5
	446_325	5 - 16			
	446_416	10 - 22			
4-MeO-E2	446_315	8 - 16	1	75	2,5
	446_325	5 - 16			
	446_416	10 - 22			
3-O-Me-2-HO-E2	446_315	5 - 15	10	30	10
	446_315	3 - 15			
	446_416	10 - 22			
3-O-Me-4-HO-E2	446_315	5 - 15	10	30	10
	446_325	3 - 15			
	446_416	10 - 22			

4.2.5 Optimierung der dwell-time

Neben der *CE* besitzt ebenfalls die *dwell-time* erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit einer *multi-reaction-monitoring (MRM)*-Methode. Alle *Quanti-* und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten werden daher mit einer unterschiedlich langen *dwell-time* gescannt (0,05 sec. / 0,08 sec. / 0,10 sec. / 0,15 sec. / 0,20 sec. / 0,25 sec. / 0,30 sec. / 0,40 sec.) und die Intensität der resultierenden PF sowie die Anzahl der Peak-Datenpunkte ausgewertet.

4.2.5.1 Lösungen

E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
16-α-HO-E1 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-MeO-E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2-HO-E1 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
E2 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
16-α-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
2/4-MeO-E2 (c = 1 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
3-O-Me-2/4-HO-E2 (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.5.2 Durchführung

Die jeweilige Analytlösung wird in ein GC-Vial pipettiert (Tab. 8), das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl des derivatisierten Standards in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten variieren dabei zwischen 1 pg und 10 pg auf der Säule (Tab. 8).

Tab. 8: Massenübergänge, Ausgangskonzentrationen und Absolutmengen von E1- und E2-Metaboliten sowie deren *CE* bei der Optimierung der *dwell-time*.

Analyt	Übergang (m/z)	CE (eV)	C _{Analyt} (pg/μl)	pipettiertes Volumen (μl)	Absolutmenge (pg/Säule)
E1	342_257	10	1	30	1
	342_244	14			
2-HO-E1	430_345	16	10	30	10
	430_306	22			
4-HO-E1	430_345	16	10	30	10
	430_306	22			
16-α-HO-E1	430_286	8	10	15	5
2-MeO-E1	372_342	12	1	60	2
	372_357	7,5			
4-MeO-E1	372_342	12	1	60	2
	372_357	7,5			
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	12	1	60	2
	372_357	7,5			
E2	416_285	13	1	60	2
	416_326	7			
2-HO-E2	504_373	18	10	30	10
	504_325	15			
4-HO-E2	504_373	18	10	30	10
	504_325	15			
16-α-HO-E2	504_414	7,5	10	30	10
	504_324	9			
2-MeO-E2	446_315	14	1	75	2,5
	446_325	14			
4-MeO-E2	446_315	14	1	75	2,5
	446_325	14			
3-O-Me-2-/4-HO-E2	446_315	12	10	30	10
	446_325	18			

4.2.6 Optimierung der Initial-Temperatur

Um eine effektive gaschromatographische Trennung und Aufkonzentrierung der Analyten zu gewährleisten sowie zur Vermeidung von Peakverbreiterungen oder Mehrfachpeaks, wird die *Initial-Temperatur* optimiert. Um einen möglichst weiten Temperaturbereich zu testen, wird eine *Initial-Temperatur* von 60°C, mit einer schrittweisen Temperaturerhöhung von 10°C, bis hin zu einer maximalen Temperatur von 100°C überprüft (Start: 60-100°C; 60°C/min bis 250°C; 1,8°C/min bis 270°C). Diesbezüglich werden die absoluten PF der extrahierten

Quantifier-Übergänge ermittelt, wobei ein signifikanter Unterschied der mittleren PF zwischen unterschiedlichen *Initial*-Temperaturen als Maß für die Effektivität der Aufkonzentrierung herangezogen wird.

4.2.6.1 **Lösungen**

E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 (c = 30 ng/μl) siehe Kap. 4.1.6

BSTFA, n-Heptan siehe Kap. 4.1.5

4.2.6.2 **Durchführung**

100 μl der E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 werden in ein GC-Vial pipettiert, das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl der derivatisierten E2-Metaboliten-Referenzmischung in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmengen von E2, dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten betragen 10 pg auf der Säule.

4.2.7 *Optimierung der Transferline-Temperatur*

Damit die im GC getrennten Verbinden in der *Transferline* nicht wieder vermischt werden, muss die Temperatur der *Transferline* ca. 10°C über der Endtemperatur des Temperaturprogrammes liegen (Hesse et al., 2005). Um einen möglichst breiten Temperaturbereich der *Transferline* zu untersuchen, werden in Anbetracht der verwendeten Endtemperatur von 275°C , neben einer *Transferline*-Temperatur von 285°C , ebenfalls 240°C , 250°C , 260°C , 270°C , 280°C , 290°C und 300°C getestet. Die Temperatur der Ionenquelle wird konstant auf eine Temperatur von 250°C eingestellt. Diesbezüglich werden die absoluten PF der extrahierten *Quantifier*-Übergänge ermittelt, wobei ein signifikanter Unterschied der mittleren PF zwischen unterschiedlichen *Transferline*-Temperaturen als Maß einer eventuellen Kondensation des Analyten in der *Transferline* herangezogen wird.

4.2.7.1 **Lösungen**

E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 (c = 30 ng/μl) siehe Kap. 4.1.6

BSTFA, n-Heptan siehe Kap. 4.1.5

4.2.7.2 **Durchführung**

100 μl der E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 werden in ein GC-Vial pipettiert, das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl der

derivatisierten E2-Metaboliten-Referenzmischung in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmengen von E2, dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten betragen 10 pg auf der Säule.

4.2.8 Optimierung der Ionenquell-Temperatur

Die Temperatur der Ionenquelle sollte 25°C bis 50°C unterhalb der Endtemperatur des Temperaturprogrammes liegen, um eine partielle Kondensation des Analyten in der Ionenquelle zu vermeiden (Thomson et al., 2007). Bezüglich der verwendeten Endtemperatur von 275°C und des maximalen Response von E2 und dessen Metabolite bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C, 270°C, 280°C, und 285°C werden diese *Transferline*-Temperaturen bei unterschiedlichen Temperaturen der Ionenquelle untersucht. Dabei wird Letztere zunächst auf die jeweilige *Transferline*-Temperatur eingestellt und schrittweise auf 260°C, 250°C, 240°C und 230°C herabgesetzt. Diesbezüglich werden die absoluten PF der extrahierten *Quantifier*-Übergänge ermittelt, wobei ein signifikanter Unterschied der mittleren PF zwischen unterschiedlichen Ionenquell-Temperaturen als Maß einer eventuellen Kondensation des Analyten in der Ionenquelle herangezogen wird.

Die Temperatur der Ionenquelle ist stets unterhalb der *Transferline*-Temperatur zu betreiben, so dass bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C und 270°C auf die Überprüfung einer Ionenquell-Temperatur von 280°C beziehungsweise 285°C verzichtet wird.

4.2.8.1 Lösungen

E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 (c = 30 ng/μl)	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.8.2 Durchführung

100 μl der E2-Metaboliten-Referenzmischung 1 werden in ein GC-Vial pipettiert, das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 μl n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl der derivatisierten E2-Metaboliten-Referenzmischung in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmengen von E2, dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten betragen 10 pg auf der Säule.

4.2.9 Bestimmung des Response

4.2.9.1 Lösungen

E2, E2-d ₃ , 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2, 2-/4-MeO-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2 1 (c = 1 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
E1, 2-/4-HO-E1, 16- α -HO-E1, 2-/4-MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E2 1 (c = 1 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.9.2 Durchführung

150 μ l des jeweiligen Standards werden in ein GC-Vial pipettiert, das LM im Evaporator abgedampft (ϑ = 20°C, p = 15 mbar, t = 45 min), der Rückstand in je 15 μ l n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μ l in das GC-/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmenge pro Standard beträgt jeweils 5 pg auf der Säule.

4.2.10 Bestimmung des Quantifier/Qualifier-Verhältnisses

4.2.10.1 Lösungen

E2, 2-/4-MeO-E2 (c = 1 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
E1, 2-/4-MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E2 (c = 1 pg/ μ l)	siehe Kap. 4.1.6
2-/4-HO-E1-/E2, 16- α -HO-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2	siehe Kap. 4.1.6
BSTFA, n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5

4.2.10.2 Durchführung

Es werden jeweils 60 μ l (E2, 2-/4-MeO-E2) und 75 μ l (E1, 2-/4-MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E2) einer Standardlösung mit einer Konzentration von 1 pg/ μ l in ein GC-Vial pipettiert. Von 2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2 werden jeweils 30 μ l einer Konzentration von 10 pg/ μ l verwendet. Das LM wird im Evaporator abgedampft (ϑ = 20°C, p = 15 mbar, t = 30 min), der Rückstand in je 15 μ l n-Heptan sowie BSTFA aufgenommen und für drei Stunden silyliert. Zur Analyse wird jeweils 1 μ l in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 (Tab. 15 und Tab. 16) angegeben. Die Absolutmengen auf der Säule betragen für E1 und 2-/4-MeO-E1 sowie 3-O-Me-2-HO-E2 2 pg. Für E2 und 2-/4-MeO-E2 beziehungsweise 2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2 betragen diese 2,5 pg und 10 pg.

4.2.11 Überprüfung der Geräteperformance

Im Rahmen der Qualitätssicherung muss die Geräteempfindlichkeit dauerhaft gewährleistet werden. Daher wird in regelmäßigen Abständen, insbesondere nach einem Methodenwechsel, ein E2-Qualitätsstandard analysiert.

4.2.11.1 Lösungen

E2 (c = 1 pg/μl) siehe Kap. 4.1.6

4.2.11.2 Durchführung

15 μl des derivatisierten E2-Standards werden in ein GC-Vial pipettiert. Zur Analyse wird jeweils 1 μl der Lösung in das GC/MS/MS-System injiziert. Die Arbeitsbedingungen und die zu verwendende Mess-Methode sind in Kap. 4.2.22 beziehungsweise Kap. 4.2.23.2 angegeben. Die Absolutmenge von E2 beträgt 1 pg auf der Säule.

4.2.12 Screening der Chemikalien und Laborgeräte auf mögliche Kontaminationen mit E2

4.2.12.1 Lösungen

Ameisensäure	siehe Kap. 4.1.5
BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
<i>β</i> -Glucuronidase aus Rinderleber (10.000 U; Typ B-1, 1644000 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
E2-d ₃ (c = 1 pg/μl und 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
E2-3-S (c = 1 pg/μl und 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
E2-3-G (c = 1 pg/μl und 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
Isopropanol	siehe Kap. 4.1.5
Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6
Sulfatase (100 U; Typ H-1, 24910 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
Phosphat-Puffer (20% MeOH)	siehe Kap. 4.1.6
MeOH	siehe Kap. 4.1.5
MeOH 85% (v/v)	siehe Kap. 4.1.6
MeOH (0,1% FA)	siehe Kap. 4.1.6
Wasser (LC-MS grade)	siehe Kap. 4.1.5

4.2.12.2 Durchführung

Zunächst muss eine Kontamination der verwendeten Derivatisierungsreagenzien (BSTFA und n-Heptan) ausgeschlossen werden. Dazu werden 15 µl BSTFA in ein GC-Vial pipettiert und 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert. Anschließend werden die absolute PF der extrahierten *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt und als Maß für eine mögliche Kontamination herangezogen. Nachdem eine Kontamination von BSTFA ausgeschlossen wurde, werden 2 ml n-Heptan in ein Glas-Zentrifugenröhrchen überführt und das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 2 \text{ h}$). Der Rückstand wird in 30 µl BSTFA aufgenommen, für drei Stunden silyliert und jeweils 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert, wobei wiederum die extrahierte *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt wird (Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22; Mess-Methode Kap. 4.2.23.2, Tab. 23).

Von den LM (MeOH, Isopropanol, Ameisensäure), den Elutionsmitteln (85% MeOH, MeOH mit 0,1% FA) sowie dem Extraktionsmittel (Chloroform) werden jeweils 2 ml in ein Glas-Zentrifugenröhrchen überführt und das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 1 \text{ h}$). Der Rückstand wird in je 15 µl BSTFA + n-Heptan aufgenommen. Nach der Derivatisierung für drei Stunden wird jeweils 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert und die extrahierte *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt (Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22; Mess-Methode Kap. 4.2.23.2, Tab. 23).

Von E2-d₃, E2-3-G sowie E2-3-S werden jeweils 30 µl der 10 pg/µl Lösung in ein GC-Vial pipettiert. Das LM wird im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$), der Rückstand in je 15 µl BSTFA + n-Heptan aufgenommen und nach Derivatisierung für drei Stunden wird jeweils 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert und die extrahierte *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt (Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22; Mess-Methode Kap. 4.2.23.2, Tab. 23).

Um eine E2-Kontamination der verwendeten SPE-Kammer zu vermeiden, werden alle benutzen Leur-Lock Verbindungen nach jeder Probenaufarbeitung (Kap. 4.2.20) jeweils mit 2 x 2 ml Isopropanol und 2 x 2 ml MeOH gespült und anschließend mit 2 x 2 ml MeOH (0,1% FA) eluiert. Das Eluat wird in einem Glas-Zentrifugenröhrchen aufgefangen und das LM im Evaporator abgedampft ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 2 \text{ h}$). Der Rückstand wird in je 15 µl BSTFA + n-Heptan aufgenommen, für drei Stunden silyliert und jeweils 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert, wobei wiederum die absolute PF der extrahierten *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt wird (Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22; Mess-Methode Kap. 4.2.23.2, Tab. 23).

Nachdem eine E2-Kontamination aller Leur-Lock Verbindungen ausgeschlossen wurde, wird der gesamte Deckel der Kammer sorgfältig mit Aluminiumfolie umhüllt und bis zur nächsten Probenaufarbeitung aufbewahrt.

Um eine E2-Kontamination der verwendeten Puffer, Enzymlösungen sowie Glucuronid- und Sulfat-Standardlösungen auszuschließen, werden folgende Blindwert-Kombinationen nach säulenchromatographischer Aufreinigung untersucht und die extrahierte *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt (Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22; Mess-Methode Kap. 4.2.23.2, Tab. 23).

- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer
- 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH)
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 50 µl E2-d₃
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 200 µl H-1 (100 U)
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 200 µl H-1 (100 U) + 50 µl E2-d₃
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 200 µl B-1 (10.000 U) + 50 µl E2-d₃
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 50 µl E2-3-S + 50 µl E2-d₃
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 50 µl E2-3-G + 50 µl E2-d₃
- 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer + 50 µl E2-3-S + 50 µl E2-3-G + 50 µl E2-d₃

Die Säulen werden zunächst analog Kap. 4.2.21 mit MeOH vorkonditioniert und mit Phosphat-Puffer (20% MeOH) gespült. Anschließend werden die Blindwerte auf die Säulen (Glas-Pasteurpipette) aufgeben, wobei diese im Anschluss daran jeweils mit 3 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) nachgewaschen werden. Die Elution erfolgt mit 85% MeOH (v/v, Plastik-Pasteurpipette) in ein Glas-Zentrifugenröhrchen. Die 85% MeOH-Fraktion wird über Nacht bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$) und der Rückstand in 15 µl BSTFA + 15 µl n-Heptan aufgenommen. Nach der Derivatisierung für drei Stunden wird jeweils 1 µl in das GC/MS/MS-System injiziert und die absolute PF der extrahierten *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt. Die Absolutmengen von E2-d₃, E2-3-S und E2-3-G betragen jeweils 50 pg/Ansatz. Bei Enzymzusatz beträgt die Sulfatase-Aktivität 100 U/Ansatz und die β -Glucuronidase-Aktivität 10.000 U/Ansatz.

Die Arbeitsbedingungen und die Mess-Methode, welche im *Screening* der Chemikalien und Laborgeräte auf mögliche Kontaminationen mit E2 verwendet werden, sind in Kap. 4.2.22 beziehungsweise Kap. 4.2.23.2 angegeben. Um die Geräteempfindlichkeit während der Messungen zu gewährleisten, wird nach jeder dritten Injektion ein E2-Qualitätsstandard in einer Absolutmenge von 1 pg auf der Säule analysiert (Kap. 4.2.11).

4.2.13 Überprüfung der Extraktionseffizienz von Hexan und Chloroform

4.2.13.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 2	siehe Kap. 4.1.6
Hexan	siehe Kap. 4.1.5
Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6

4.2.13.2 Durchführung

Testansätze bestehend aus 1900 µl Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) und 100 µl der E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 2 werden mit 2 ml Chloroform beziehungsweise 2 ml Hexan extrahiert. Im Anschluss daran wird die jeweilige organische Phase bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 2 \text{ h}$). Der Rückstand wird in 15 µl n-Heptan + 15 µl BSTFA aufgenommen, gevortext und unverzüglich in ein 100 µl Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird 1 µl des Testansatzes der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18) angegeben. Die Absolutmengen von E2, dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten gibt Tab. 9 wieder.

Tab. 9: Übersicht der den Testansätzen zudotierten Absolutmengen des jeweiligen Metaboliten über 100 µl einer E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 2.

Metabolit	Absolutmenge (Metabolit/Ansatz)	Absolutmenge (Metabolit/1 µl)
E1	60 pg	2 pg
2-/4-MeO-E1	60 pg	2 pg
3-O-Me-2-HO-E1	60 pg	2 pg
E2	75 pg	2,5 pg
2-/4-MeO-E2	75 pg	2,5 pg
2-/4-HO-E1	300 pg	10 pg
2-/4-HO-E2	300 pg	10 pg
16- α -HO-E1	300 pg	10 pg
16- α -HO-E2	300 pg	10 pg
3-O-Me-2-HO-E2	300 pg	10 pg
3-O-Me-4-HO-E2	300 pg	10 pg

Im Anschluss daran werden die extrahierten *Quantifier*-Übergänge für E1, E2 und deren Metabolite ermittelt. Bei einem Übergang in die organische Phase wird die prozentuale Wiederfindung (WFR) berechnet. Dazu werden 100 µl der E1-/E2-Metaboliten-Referenz-

mischung 2 als Bezugspunkt ($\equiv 100\%$) ohne Chloroformextraktion beziehungsweise Hexanextraktion bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^\circ\text{C}$, $p = 15 \text{ mbar}$, $t = 30 \text{ min}$) und der Rückstand in $15 \mu\text{l}$ n-Heptan + $15 \mu\text{l}$ BSTFA aufgenommen, gevortext und in ein $100 \mu\text{l}$ Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird $1 \mu\text{l}$ der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18).

4.2.14 Quantifizierung von gespaltenen E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten in Standardlösungen

Schneckensaft aus *helix pomatia*, welcher für die Konjugatspaltung im Brustgewebe verwendet werden soll, weist eine Sulfatase- und β -Glucuronidase-Aktivität auf. Ziel ist es die Menge an E2 zu bestimmen, welche aus den Modellsubstraten E2-3-G und E2-3-S enzymatisch gespalten werden kann. Gleiches gilt für reine β -Glucuronidase aus Rinderleber und Sulfatase des Typs H-1, deren Spaltungseffizienz ebenfalls überprüft werden soll.

4.2.14.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
5 α -Cholestan (c = 10 $\mu\text{g/ml}$)	siehe Kap. 4.1.6
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
HCl	siehe Kap. 4.1.6
E1 (c = 10 $\mu\text{g/ml}$)	siehe Kap. 4.1.6
E2 (c = 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
E2-3-G (c = 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$, c = 20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
E2-3-S (c = 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$, c = 20 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)	siehe Kap. 4.1.6
Ethylacetat	siehe Kap. 4.1.5
β -Glucuronidase aus Rinderleber (10.000 U; Typ B-1, 3695000 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
GA (150/200/500 mM)	siehe Kap. 4.1.6
KOH	siehe Kap. 4.1.5
MeOH	siehe Kap. 4.1.5
Sulfatase (Typ HP-2; 152900 U/ml)	siehe Kap. 4.1.5
Sulfatase (Typ H-1; 24910 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6
SA (100 nM)	siehe Kap. 4.1.6
SAL (10 nM)	siehe Kap. 4.1.6

4.2.14.1.1 Enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten

Da bisher unbekannt ist, mit welcher Affinität β -Glucuronidase und Sulfatase die Substrate E2-3-G und E2-3-S spalten, wird folgender Test entworfen. Zur Verfügung steht Schneckensaft aus *helix pomatia*, welcher eine β -Glucuronidase- und Sulfatase-Aktivität aufweist (Typ HP-2 beziehungsweise H-1) sowie reine β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1).

4.2.14.1.2 Durchführung

Die Prüfung der Spaltungseffizienz erfolgt in zwei Testreihen *mit* (+ HP-2 beziehungsweise H-1) und *ohne* Enzymzusatz (- HP-2 beziehungsweise H-1) aus Schneckensaft, während als Positivprobe ein Ansatz mit je 1 nmol E2 dient.

Die Inkubationsansätze besitzen ein Endvolumen von 2 ml und enthalten je 1 nmol Substrat (E2, E2-3-G und E2-3-S), 1 nmol E1 als Extraktionsstandard sowie im Fall einer Enzymzugabe eine β -Glucuronidase-Aktivität von 10.000 U. Durch Verwendung von 5-fach Sørensen Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,9 wird das pH-Optimum der β -Glucuronidase eingestellt. Das Pipettierschema ist in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Pipettierschema für die Überprüfung der Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase aus *helix pomatia*.

	E2/E2-3-G/E2-3-S (1 nmol) -HP-2	E2/E2-3-G/E2-3-S (1 nmol) +HP-2
E2/E2-3-G/E2-3-S (c = 10 pmol/ μ l)	100 μ l	100 μ l
E1 (ISD c = 10 μ g/ml)	30 μ l	30 μ l
<i>helix pomatia</i>	-	70 μ l
Sørensen Phosphat-Puffer (5-fach)	1870 μ l 2 x 935 μ l	1800 μ l 2 x 900 μ l
Σ	2000 μ l	2000 μ l

Die Ansätze werden im Schüttelwasserbad inkubiert (37°C, 16 h), je dreimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen nach Zentrifugation (5000 rpm, 3 min) vereinigt. Das LM wird im Evaporator abgedampft (Raumtemperatur - RT, p = 50 mbar, t = 1 h) und der Rückstand in 100 μ l MeOH aufgenommen, in ein GC-Vial überführt und 20 μ l einer 5 α -Cholestanlösung (c=10 μ g/ml) dazu pipettiert. Das LM wird erneut evaporiert (RT, p = 15 mbar, t = 30 min) und der Rückstand in je 15 μ l n-Heptan und BSTFA aufgenommen und für 3 h silyliert. Die gaschromatographische Analyse erfolgt anschließend nach Kap. 4.2.22.

Bei der Überprüfung einer Enzymaktivität von 100 U Sulfatase/Ansatz beziehungsweise 200 U/Ansatz wird analog Tab. 10 vorgegangen, wobei gefriergetrocknete Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1; 24910 U/g) verwendet wird.

Zur Prüfung der Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase aus Rinderleber wird analog dem beschriebenen Vorgehen verfahren, während die Inkubationsansätze mit dem Substrat E2-3-S aufgrund der fehlenden Sulfatase-Aktivität vernachlässigt werden. Das Pipettierschema ist in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Pipettierschema für die Überprüfung der Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase aus Rinderleber.

	E2/E2-3-G (1 nmol) <i>ohne</i> β -Glucuronidase	E2/E2-3-G (1 nmol) <i>mit</i> β -Glucuronidase
E2/E2-3-G (c = 10 pmol/ μ l)	100 μ l	100 μ l
E1 (ISD c = 10 μ g/ml)	30 μ l	30 μ l
Glucuronidase-Lösung in Puffer (10.000 U)	-	200 μ l
Sörensen Phosphat-Puffer (5-fach)	1870 μ l 2 x 935 μ l	1670 μ l 2 x 835 μ l
Σ	2000 μ l	2000 μ l

4.2.14.2 Säurehydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten

Eine Möglichkeit der nicht-enzymatischen Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten stellt die Säurehydrolyse dar. Dabei werden unter Einwirkung von konzentrierter Säure die oben genannten Konjugate hydrolytisch gespalten und die Menge des gespaltenen E2 gaschromatographisch erfasst.

4.2.14.2.1 Durchführung

Die Inkubationsansätze werden entsprechend Tab. 12 pipettiert und mit 100 μ l 12 M HCl versetzt. Als interner Extraktionsstandard dient je 1 nmol E1, während die Inkubation in 1-fach und 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer stattfindet.

Tab. 12: Pipettierschema für die Untersuchung der säurekatalysierten Hydrolyse von je 1 nmol E2-3-G und E2-3-S.

	E2/E2-3-G/E2-3-G <i>ohne HCl</i> (1 nmol)	E2/E2-3-G/E2-3-S <i>mit HCl</i> (1 nmol)
E2/E2-3-G/E2-3-S (c = 10 pmol/μl)	100 μl	100 μl
E1 (c = 10 μg/ml)	30 μl	30 μl
Sörensen Phosphat-Puffer (1-fach/5-fach)	1870 μl 2 x 935 μl	1870 μl 2 x 935 μl
HCl (c = 12 M)	-	100 μl

Die Ansätze werden für 16 h bei RT inkubiert, anschließend mit 12 M KOH auf pH 4,9 eingestellt und je dreimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend nochmals auf ihren pH-Wert überprüft und gegeben falls auf pH 4,9 eingestellt. Anschließend werden 30 μl E1 (c = 10 μg/ml) dazugeben und der Ansatz mit 70 μl Schneckensaft aus *helix pomatia* versetzt (entspricht einer β -Glucuronidase-Aktivität von 10.000 U beziehungsweise einer Sulfatase-Aktivität von 50 U). Die Ansätze werden im Schüttelwasserbad bei 37°C für 16 h inkubiert, je dreimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen nach Zentrifugation (5000 rpm, 3 min) vereinigt. Das LM wird im Evaporator abgedampft (RT, p = 50 mbar, t = 1 h) und der Rückstand in 100 μl MeOH aufgenommen, in ein GC-Vial überführt und 20 μl einer 5 α -Cholestanlösung (c = 10 μg/ml) dazu pipettiert. Das LM wird erneut evaporiert (RT, p = 15 mbar, t = 30 min) und der Rückstand in je 15 μl n-Heptan und BSTFA aufgenommen und für 3 h silyliert. Die gaschromatographische Analyse erfolgt anschließend nach Kap. 4.2.22.

4.2.14.3 **Überprüfung verschiedener Inhibitoren für β -Glucuronidase aus *helix pomatia***

Eine Inkubation mit Schneckensaft aus *helix pomatia* führt aufgrund der beiden Enzymaktivitäten zur gleichzeitigen Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten und macht daher eine getrennte Bestimmung von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten unmöglich. Eine kompetitive Hemmung der β -Glucuronidase mittels verschiedener Inhibitoren ermöglicht die Bestimmung von gespaltenen E2 aus seinen Sulfat-Konjugaten nach Inkubation mit Schneckensaft aus *helix pomatia*, während der Anteil von E2 aus Glucuronid-Konjugaten durch Differenzbildung aus einem Ansatz ohne Inhibitor bestimmt werden kann. Diesbezüglich wurden verschiedene Inhibitoren der Literatur entnommen und auf ihre Hemmwirkung getestet (Levy et al., 1958). Geprüft wurden SA, SAL und GA.

Als Positivprobe dient ein Ansatz mit E2 und β -Glucuronidase-Zusatz, während E2-3-G mit β -Glucuronidase und zusätzlich je 10 mM SAL, 100 mM SA und 150/200/500 mM GA inkubiert wird.

4.2.14.3.1 Durchführung

Die Ansätze werden entsprechend Tab. 13 pipettiert. Als interner Standard dient 300 ng E1 pro Inkubationsansatz (entspricht 1 nmol E1). Vor Inkubation wird der pH-Wert der einzelnen Ansätze mit 1 M HCl am pH-Meter auf 4,9 eingestellt. Dazu werden je 50 μ l HCl (10 mM SAL-Ansatz), 50 μ l HCl (100 mM SA-Ansatz), 100 μ l HCl (150 mM GA-Ansatz), 200 μ l HCl (200 mM GA-Ansatz) und 400 μ l HCl (500 mM GA-Ansatz) verwendet.

Die Ansätze werden im Schüttelwasserbad für 16 h bei 37°C inkubiert, je dreimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen nach Zentrifugation (5000 rpm, 3 min) vereinigt. Das LM wird im Evaporator abgedampft (RT, p = 50 mbar, t = 1 h), der Rückstand in 100 μ l MeOH aufgenommen und in ein GC-Vial überführt. Anschließend werden 20 μ l einer 5 α -Cholestanlösung (c=10 μ g/ml) dazu pipettiert und das LM erneut evaporiert (RT, p = 15 mbar, t = 30 min). Der Rückstand wird in je 15 μ l n-Heptan und BSTFA aufgenommen und für 3 h silyliert. Die gaschromatographische Analyse erfolgt anschließend nach Kap. 4.2.22.

Tab. 13: Überprüfung der Hemmwirkung verschiedener Konzentrationen von SA, SAL und GA auf β -Glucuronidase aus *helix pomatia*.

Testansatz	E2 (1 nmol) -HP-2	E2/ E2-3-G (1 nmol) +HP-2	E2-3-G (1 nmol) SAL 10 mM	E2-3-G (1 nmol) SA 100 mM	E2-3-G (1 nmol) GA 500 mM
E2/E2-3-G (c = 10 pmol/ μ l)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
E1 (c = 10 μ g/ml)	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l
<i>helix pomatia</i> (10.000 U)	-	70 μ l	70 μ l	70 μ l	70 μ l
Sörensen Phosphat- Puffer (5-fach)	1870 μ l	1800 μ l	-	-	-
SAL (c = 10 mM) (in 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer)	-	-	1800 μ l	-	-
SA (c = 100 mM) (in 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer)	-	-	-	1800 μ l	-
GA (c=150/200/500 mM) (in 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer)	-	-	-	-	1800 μ l
Σ	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l

4.2.14.4 **Überprüfung der Spaltungseffizienz der β -Glucuronidase und Sulfatase in Substratmischungen**

Um zu überprüfen, ob die ermittelte Spaltungseffizienz von Sulfatase (Typ H-1) und β -Glucuronidase (Typ B-1) hinsichtlich der Konjugate E2-3-G und E2-3-S (Kap.4.2.14) mit physiologischen Bedingungen vergleichbar ist, wird deren Spaltungseffizienz ebenfalls in Substratmischungen überprüft

4.2.14.4.1 **Durchführung**

Es werden jeweils 1 nmol E2, E2-3-G und E2-3-S in 1-fach *Sørensen* Phosphat-Puffer verwendet. Als interner Extraktionsstandard dient je 1 nmol E1. Die Konzentrationen der verwendeten Standardlösungen entsprechen mit Ausnahme des Glucuronid- und Sulfat-Standards Tab. 13. Von E2-3-G beziehungsweise E2-3-S wird eine Standardlösung der Konzentration von 20 pmol/ μ l verwendet.

Bei Verwendung von Sulfatase (Typ H-1) beträgt die Sulfatase-Aktivität von 100 U/Ansatz. Die β -Glucuronidase-Aktivität beträgt diesbezüglich 1872 U/Ansatz. Als β -Glucuronidase-Hemmer wird SA in einer Konzentration von 100 mM verwendet. Bei Verwendung von β -Glucuronidase (Typ B-1) beträgt die β -Glucuronidase-Aktivität jeweils 10 000 U/Ansatz.

Es werden folgende Testansätze pipettiert:

- E2 (*ohne Enzym*): 100 μ l E2 + 30 μ l E1 + 1870 μ l *Sørensen* Phosphat-Puffer
- E2 (*mit H-1*): 100 μ l E2 + 30 μ l E1 + 200 μ l H-1 + 1670 μ l *Sørensen* Phosphat-Puffer
- E2 (*mit B-1*): 100 μ l E2 + 30 μ l E1 + 200 μ l B-1 + 1670 μ l *Sørensen* Phosphat-Puffer
- E2 (*mit H-1, SA*): 100 μ l E2 + 30 μ l E1 + 200 μ l H-1 + 1670 μ l SA-Lösung
- E2 (*mit B-1, SA*): 100 μ l E2 + 30 μ l E1 + 200 μ l H-1 + 1670 μ l SA-Lösung
- E2-3-G/E2-3-S (*ohne Enzym*): 50 μ l E2-3-G + 50 μ l E2-3-S + 30 μ l E1 + 1870 μ l *Sørensen* Phosphat-Puffer
- E2-3-G/E2-3-S (*mit B-1*): 50 μ l E2-3-G + 50 μ l E2-3-S + 30 μ l E1 + 200 μ l B-1 + 1670 μ l *Sørensen* Phosphat-Puffer
- E2-3-G/E2-3-S (*mit H-1, SA*): 50 μ l E2-3-G + 50 μ l E2-3-S + 30 μ l E1 + 200 μ l H-1 + 1670 μ l SA-Lösung

Die Ansätze werden im Schüttelwasserbad für 16 h bei 37°C inkubiert, je dreimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen nach Zentrifugation (5000 rpm, 3 min) vereinigt. Das LM wird im Evaporator abgedampft (RT, p = 50 mbar, t = 1 h), der Rückstand in 100 μ l MeOH aufgenommen und in ein GC-Vial überführt. Anschließend werden 20 μ l einer 5 α -Cholestanlösung (c=10 μ g/ml) dazu pipettiert und das LM erneut evaporiert (RT, p = 15 mbar, t = 30 min). Der Rückstand wird in je 15 μ l n-Heptan und BSTFA aufgenommen und für 3 h silyliert. Die gaschromatographische Analyse erfolgt anschließend nach Kap. 4.2.22.

4.2.15 Einfluss der Probenaufarbeitung auf die Wiederfindung

Um mögliche Analyt-Verluste im Rahmen der Probenaufarbeitung abzuschätzen, wird ein Mastermix bestehend aus *Sörensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung auf vier Testansätze aufgeteilt, mit Chloroform extrahiert und anschließend einer SPE-Behandlung unterzogen. Dabei wird jeweils ein Testansatz mit beziehungsweise ohne Inkubation behandelt, um deren Einfluss auf die WFR zu bestimmen. Zwei weitere Testansätze werden unter Zugabe von β -Glucuronidase (Typ B-1) oder Sulfatase (Typ H-1) für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, um eine Aussage über den Analyt-Verlust bei der enzymatischen Hydrolyse von E2-Konjugaten zu treffen.

4.2.15.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
E1-/E2-Metaboliten-Referenzlösung 3	siehe Kap. 4.1.6
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
β -Glucuronidase aus Rinderleber (10.000 U; Typ B-1, 3695000 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
Sulfatase (Typ H-1; 24910 U/g)	siehe Kap. 4.1.5
MeOH	siehe Kap. 4.1.5
MeOH 85% (v/v)	siehe Kap. 4.1.5
Phosphat-Puffer (20% MeOH)	siehe Kap. 4.1.6
<i>Sörensen</i> Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6
Wasser (LC-MS grade)	siehe Kap. 4.1.5

4.2.15.2 Durchführung

Mastermix 22,4 ml 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer werden mit 2,8 ml einer E1-/E2-Metaboliten-Referenzlösung 3 versetzt und auf 4 Testansätze á 6 ml aufgeteilt.

Zwei der Testansätze werden einer Enzymbehandlung mit β -Glucuronidase (Testansatz III) beziehungsweise Sulfatase (Testansatz IV) unterzogen, wobei der entsprechende Testansatz mit 666,7 μ l des jeweiligen Enzyms versetzt wird. Testansätze ohne Enzym (Testansatz I und II) werden mit dem gleichen Volumen *Sörensen* Phosphat-Puffer ergänzt.

Die Testansätze werden nach folgendem Schema aufgearbeitet:

Testansatz I

6,0 ml Mastermix werden mit 666,7 μ l Sørensen Phosphat-Puffer versetzt und auf 3 Ansätze á 2 ml aufgeteilt. Nachdem jeder Ansatz mit 2 ml Chloroform extrahiert wurde, wird die organische Phase bis zur Trockene evaporiert (RT, p = 50 mbar, t = 1 h), der Rückstand in 2 ml Phosphat-Puffer (20 % MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 4.2.21). Die 85% MeOH-Fraktion wird über Nacht bis zur Trockene evaporiert (ϑ = 20°C, p = 15 mbar), der Rückstand in 15 μ l BSTFA + 15 μ l n-Heptan aufgenommen und unverzüglich in ein 100 μ l Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß werden 1 μ l Probe der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18) angegeben.

Testansatz II

6,0 ml Mastermix werden mit 666,7 μ l Sørensen Phosphat-Puffer versetzt und auf 3 Ansätze á 2 ml aufgeteilt. Anschließend wird jeder Ansatz für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und nachfolgend mit 2 ml Chloroform extrahiert. Nach dem Evaporieren der organischen Phase bis zur Trockene (RT, p = 50 mbar, t = 1 h) wird der Rückstand in 2 ml Phosphat-Puffer (20 % MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE unterzogen (Kap. 4.2.21). Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog Testansatz I.

Testansatz III

6,0 ml Mastermix werden mit 666,7 μ l β -Glucuronidase (10.000 U-/Ansatz) versetzt und auf 3 Ansätze á 2 ml aufgeteilt. Anschließend wird jeder Ansatz für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und nachfolgend mit 2 ml Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation (1,5 h; 5000 rpm) bis zur Phasentrennung wird die organische Phase entnommen und bis zur Trockene evaporiert (RT, p = 50 mbar, t = 1 h). Der Rückstand wird in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE unterzogen (Kap. 4.2.21). Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog Testansatz I.

Testansatz IV

6,0 ml Mastermix werden mit 666,7 μ l Sulfatase (100 U/Ansatz) versetzt und auf 3 Ansätze á 2 ml aufgeteilt. Anschließend wird jeder Ansatz für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und nachfolgend mit 2 ml Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation (1,5 h; 5000 rpm) bis zur Phasentrennung wird die organische Phase entnommen und bis zur Trockene evaporiert (RT, p = 50 mbar, t = 1 h). Der Rückstand wird in

2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE unterzogen (Kap. 4.2.21). Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog Testansatz I.

Zur Bestimmung der WFR werden 200 µl der E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 3 als Bezugspunkt (\equiv 100%) ohne Inkubation, Chloroformextraktion und SPE-Behandlung bis zur Trockene evaporiert (RT, $p = 15$ mbar, $t = 30$ min). Der Rückstand wird in 15 µl n-Heptan + 15 µl BSTFA aufgenommen und in ein 100 µl Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird 1 µl der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18) angegeben. Die Absolutmenge auf der Säule beträgt für E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 4 pg. Für E2 und 2-/4-MeO-E2 beziehungsweise 2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E1-/E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2 betragen diese jeweils 5 pg beziehungsweise 20 pg.

4.2.16 Optimierung der Extraktionseffizienz

Um den Analyt-Verlust von E1- und E2-Metaboliten während der Chloroformextraktion zu verringern, werden Testansätze bestehend aus *Sörensen* Phosphat-Puffer und einer E1-/E2-Metaboliten-Referenzlösung 3 einer Extraktion mit unterschiedlich hohen Extraktionsvolumina unterzogen. Neben der *einfachen* Extraktion mit 2 ml Chloroform wird vergleichend eine *zweifach-* (4 ml) beziehungsweise *dreifach* Extraktion (6 ml) durchgeführt.

4.2.16.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
E1-/E2-Metaboliten-Referenzlösung 3	siehe Kap. 4.1.6
<i>Sörensen</i> Phosphat-Puffer	siehe Kap. 4.1.6
Phosphat-Puffer (20% MeOH)	siehe Kap. 4.1.6

4.2.16.2 Durchführung

Mastermix 17,4 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer werden mit 2,2 ml einer E1-/E2-Metaboliten-Referenzlösung 3 versetzt und auf 3 Ansätze á 6 ml aufgeteilt.

Jeder Ansatz wird mit 666,7 µl *Sörensen* Phosphat-Puffer versetzt und auf 3 Testansätze á 2 ml aufgeteilt.

Die Testansätze werden nach folgendem Schema aufgearbeitet:

Testansatz I 2 ml Mastermix werden mit 2 ml Chloroform extrahiert (*einfach* Extraktion) und die organische Phase bis zur Trockene evaporiert ($p = 50$ mbar, $t = 1$ h, RT). Nachdem der Rückstand in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) aufgenommen wurde, wird dieser einer Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 4.2.21) unterzogen. Die 85% MeOH-Fraktion wird über Nacht bis zur Trockene evaporiert ($\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$, $p = 15$ mbar), der Rückstand in 15 μl BSTFA + 15 μl n-Heptan aufgenommen und unverzüglich in ein 100 μl Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß werden 1 μl Probe der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18) angegeben.

Testansatz II 2 ml Mastermix werden zweimal mit 2 ml Chloroform extrahiert (*zweifach* Extraktion) und die organischen Phasen bis zur Trockene evaporiert ($p = 50$ mbar, $t = 1$ h, RT). Der Rückstand wird in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 4.2.21) unterzogen. Das weitere Vorgehen erfolgt analog Testansatz I.

Testansatz III 2 ml Mastermix werden dreimal mit 2 ml Chloroform extrahiert (*dreifach* Extraktion) und die organischen Phasen bis zur Trockene evaporiert ($p = 50$ mbar, $t = 1$ h, RT). Der Rückstand wird in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) aufgenommen und einer Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 4.2.21) unterzogen. Das weitere Vorgehen erfolgt analog Testansatz I.

Zur Bestimmung der WFR werden 200 μl der E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung 3 als Bezugspunkt ($\equiv 100\%$) ohne Chloroformextraktion und SPE-Behandlung bis zur Trockene evaporiert (RT, $p = 15$ mbar, $t = 30$ min). Der Rückstand wird in 15 μl n-Heptan + 15 μl BSTFA aufgenommen und in ein 100 μl Insert/GC-Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird 1 μl der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Die Arbeitsbedingungen sind in Kap. 4.2.22 sowie Kap. 4.2.23.1 (Tab. 17 und Tab. 18) angegeben. Die Absolutmenge auf der Säule beträgt für E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 4pg. Für E1 und 2-/4-MeO-E2 beziehungsweise 2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E1-/E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2 betragen diese jeweils 5 pg beziehungsweise 20 pg.

4.2.17 Überprüfung der Aufarbeitung auf mögliche generierte Artefakte

4.2.17.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
E1-d ₄ (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
E2-d ₃ (c = 170 ng/ml)	siehe Kap. 4.1.6
E2-d ₃ (c = 10 pg/μl)	siehe Kap. 4.1.6
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
KOH (1 M)	siehe Kap. 4.1.5
MeOH	siehe Kap. 4.1.5
MeOH 20% (v/v)	siehe Kap. 4.1.6
MeOH 85% (v/v)	siehe Kap. 4.1.6
PBS-CMF	siehe Kap. 4.1.6
Sörensen Phosphat-Puffer	siehe Kap. 4.1.6
Sulfatase (Typ HP-2; 152900 U/ml)	siehe Kap. 4.1.5
Wasser (LC-MS grade)	siehe Kap. 4.1.5

4.2.17.1.1 Überprüfung der deuterierten Standards auf Verunreinigungen mit deuterierten Oxidationsprodukten

Um Verunreinigungen des E2-d₃- beziehungsweise E1-d₄-Standards mit deuterierten Oxidationsprodukten auszuschließen, werden 80 μl einer E2-d₃-Lösung (c = 170 ng/ml) beziehungsweise 22,5 μl einer E1-d₄-Lösung (c = 10 pg/μl) bis zur Trockene evaporiert und der Rückstand in 15 μl BSTFA + 15 μl n-Heptan aufgenommen. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird 1 μl E2-d₃ beziehungsweise 2 μl E1-d₄ der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert, wobei die absoluten PF der jeweiligen deuterierten Catechol-Estrogene ermittelt werden (507_373 für 2/4-HO-E2-d₃ und 434_345 für 2-/4HO-E2-d₄). Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Die Absolutmengen auf der Säule betragen 1,7 pmol für E2-d₃ sowie 15 pg für E1-d₄.

4.2.17.1.2 Überprüfung des allgemein gültigen Protokolls der Gewebeaufarbeitung (Rogen *et al.*, 2003)

4.2.17.1.3 Durchführung

Zur Überprüfung einer möglichen Artefaktbildung werden 5 g homogenisiertes Brustgewebe in 12 ml Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen und mit 81 μl einer E2-d₃-Lösung (c = 170 ng/ml) versetzt. Die Absolutmenge E2-d₃ pro Ansatz entspricht 50 pmol. Zur Unter-

scheidung von freiem E2 beziehungsweise E2 aus Konjugaten wird der Probenansatz auf 6 Teilansätze mit jeweils 2 ml Homogenat aufgeteilt. Dabei werden drei Ansätze für die Hydrolyse von E2-Konjugaten mit 70 µl Schneckensaft aus *helix pomatia* (entspricht einer β -Glucuronidase-Aktivität von 10.000 U) versetzt. Die Ansätze werden für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend mit 1M KOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Entfettung der Probenansätze erfolgt jeweils mit 3 ml Chloroform, wobei die wässrige Phase nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 9000 g einer Aufreinigung mittels SPE unterzogen wird. Diesbezüglich wird die C18-Säule zum Anfeuchten des festen Säulenmaterials im ersten Schritt mit je 1 ml MeOH und 1 ml Millipore Wasser gespült. Im zweiten Schritt findet eine Konditionierung mit 1 ml PBS-CMF-Puffer statt, während im Anschluss die Probe auf die Säule gegeben wird. Im nächsten Schritt wird mit 3 ml PBS-CMF-Puffer und 2 ml 20 % MeOH (v/v) gespült. Im letzten Schritt werden mögliche generierte Artefakte von E2-d₃ mit 85% MeOH (v/v) eluiert. Die 85% MeOH-Fraktion wird über Nacht bis zur Trockene evaporiert (p = 15 mbar, t = 1 h, RT) und der Rückstand in 15 µl BSTFA + 15 µl n-Heptan aufgenommen. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß wird 1 µl Probe der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert, wobei die absoluten PF des extrahierten Quantifier-Übergangs, 507_373, für 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ ermittelt werden. Die Bestimmung der Menge deuterierter Catechol-Estrogene erfolgte anhand des Peakflächenverhältnisses (PFV) von 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ zu E2-d₃. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Die Absolutmenge von E2-d₃ beträgt 0,28 pmol auf der Säule.

4.2.17.1.4 Überprüfung kritischer Prozessschritte

Die Zugabe des ISTD zur Gewebematrix, die Gewebeinkubation sowie die Entfettung mit Chloroform (Kap. 4.2.17.1.2) wurden als kritische Prozess-Schritte gewertet und auf eine mögliche Artefaktbildung überprüft. Diesbezüglich werden die Probenansätze direkt nach der Zugabe des ISTD, der Inkubation beziehungsweise der Chloroformextraktion mittels SPE aufgereinigt (Kap. 4.2.17.1.2) und auf eine mögliche Artefaktbildung getestet. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22.

4.2.17.1.5 Überprüfung des modifizierten Protokolls der Gewebeaufarbeitung

200 mg Brustgewebe werden in 2 ml Sörensen Phosphat-Puffer aufgenommen und mit 24 µl einer E2-d₃-Lösung (c = 10 pg/µl) beziehungsweise 22,5 µl einer E1-d₄-Lösung (c = 10 pg/µl) versetzt. Die Absolutmengen von E2-d₃ beziehungsweise E1-d₄ entsprechen 240 pg sowie 225 pg pro Ansatz. Die Probenansätze werden sofort mit Chloroform (Kap. 4.2.20.1) bei RT über Nacht extrahiert und analog Kap. 4.2.20.1 sowie Kap. 4.2.21 weiter aufgearbeitet. Die im Verlauf der Aufarbeitung möglichen generierten Oxidationsprodukte werden nach dreistündiger Derivatisierung bestimmt. Dazu werden 2 µl Probe der GC/MS/MS zugeführt und

MRM-Modus analysiert, wobei die absoluten PF der extrahierten *Quantifier*-Übergänge für 2-/4HO-E2-d₃ (507_373), 2-/4HO-E2-d₄ (434_345), E1-d₂ (344_259), und 2-/4-HO-E1-d₂ (432_342) ermittelt werden. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Die Absolutmengen von E2-d₃ und E1-d₄ betragen 16 pg beziehungsweise 15 pg auf der Säule.

4.2.18 Gewinnung und Lagerung von Gewebespenden

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben sind durch Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Eckert (Gemeinschaftspraxis für Plastische Chirurgie, Würzburg), Herrn Dr. Steinmetz (Abteilung für Plastische und Ästhetische Chirurgie, Rotkreuzklinik Würzburg) und Frau Dr. Waldhofen (Praxis für Plastische und Ästhetische Chirurgie - St. Elisabeth Krankenhaus, Bad Kissingen) zur Verfügung gestellt worden.

Die Proben wurden aus dem entfernten Brustgewebe gewonnen, welches während einer Reduktions-Mammoplastik oder Bruststraffung entnommen wurde. Diesbezüglich wird das entfernte Brustdrüsengewebe noch im Operationssaal in eiskalten Krebs-Puffer (Kap. 4.1.6) eingelegt, für die folgenden Untersuchungen von anhaftendem Fettgewebe freigelegt und portionsweise in Aluminiumfolie (jeweils 5 g) bei - 80°C im Biofreezer gelagert.

4.2.19 Studienpopulation

Zwischen August 2010 und September 2014 nahmen insgesamt 30 Frauen an der Studie „*Polymorphismus 17β-Estradiol metabolisierender Enzyme im gesunden Brustgewebe und deren Einfluss auf die Spontanmutationsrate*“ teil. Die Studienpopulation setzte sich aus Teilnehmerinnen in einem Alter von 18 bis 57 Jahren zusammen, die sich unabhängig des Forschungsvorhabens für eine Reduktions-Mammoplastik oder Bruststraffung entschieden hatten. Frauen, mit positiven Befund bei der obligatorischen Vorsorgeuntersuchung zeitnah zur Reduktions-Mammoplastik und familiärem Brustkrebs (Eltern, Geschwister) wurden als Gewebespendnerinnen ausgeschlossen. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden für die Studie wichtige Daten der Teilnehmerinnen erhoben:

- Alter der Probandinnen
- *Body-Mass-Index* (BMI)
- Anzahl Schwangerschaften
- Rauchverhalten
- Alkoholkonsum
- Einnahme von Wirkstoffen, die wie Estrogene wirken (AZM - zum Beispiel Kontrazeptiva, Hormonsubstitution, Nahrungsergänzungsmittel - NEM)

Die Gewebespenden wurden entsprechend einem festgelegten Dokumentationssystem codiert, archiviert und anonym mit Hilfe eines Patientencodes übermittelt.

Aufgrund der kleinen Studienpopulation waren die verfügbaren Daten bezüglich der oben genannten Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren stark limitiert, so dass lediglich Korrelationen zwischen den Gewebespiegeln von E1- und E2-Metaboliten mit dem Menopausalstatus, dem BMI und Hormonsubstitutionen betrachtet wurden. Der BMI der Teilnehmerinnen wird dabei folgendermaßen berechnet (Lippert, 2000):

$$BMI = \text{Körpergewicht in kg} / (\text{Körpergröße} \times \text{Körpergröße}) \text{ in m}^2$$

4.2.20 Aufarbeitung von Brustdrüsengewebe

Aufgrund der geringen Gehalte von E1, E2 und deren Metaboliten im Brustgewebe sowie der Komplexität der Matrix erfordert die Analyse der Gewebeproben eine Aufarbeitung, die neben der Abtrennung der vorhandenen Matrix ebenfalls eine Aufreinigung beziehungsweise Aufkonzentrierung der Metabolite beinhaltet.

Zur Inaktivierung der Glasoberfläche gegenüber Derivatisierungsreagenzien und zur Vermeidung von Kriechverlusten der Analyten an der Glaswand (Knapp 1979, Kushinsky und Anderson, 1974) werden bei allen Schritten der Probenaufarbeitung silanisierte Glasgeräte verwendet (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Braunersreuther, 2014).

4.2.20.1 Homogenisierung und Extraktion

4.2.20.1.1 Lösungen

Chloroform	siehe Kap. 4.1.5
Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6
Phosphat-Puffer (20% MeOH)	siehe Kap. 4.1.6
d ₃ -E2-Metaboliten-Referenzmischung	siehe Kap. 4.1.6
d ₄ -E1-Metaboliten-Referenzmischung	siehe Kap. 4.1.6

4.2.20.1.2 Durchführung

Zunächst erfolgt eine Zerkleinerung und Homogenisierung von 1 g Gewebe mit Hilfe eines geschlossenen Präzisionsmörser und flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver, um eine möglichst homogene Verteilung des Drüsengewebes zu erzielen. Für die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse wird nachfolgend eine Aliquotierung des Probenmaterials vorgenommen. Dafür werden zweimal 200 mg und einmal 350 mg eingewogen und der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Für jeden Probenansatz werden 2 ml Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) mittels einer Eppendorf-Pipette in ein verschließbares, silanisiertes Glas-Zentrifugenröhrchen

vorgelegt und mit dem homogenisierten Probenmaterial versetzt. Die Zugabe des jeweiligen ISTD erfolgt anschließend über 15 µl beziehungsweise 100 µl einer d₃-E2- und 100 µl einer d₄-E1-Metaboliten-Referenzmischung mittels Direktverdrängungs-Pipetten.

Eine weitere Homogenisierung der Probenansätze wird im Anschluss mittels Ultraturax (dreimal für 30 Sekunden) vorgenommen. Um dabei möglichen Oxidationseinflüssen vorzubeugen, werden die Proben zwischendurch auf Eis abgekühlt. Zur Isolierung der Metabolite aus dem Gewebehomogenat wird nachfolgend eine Extraktion mit 2 ml Chloroform bei RT über Nacht, mittels einem automatischen Rüttelmischer, durchgeführt. Nach Zentrifugation der Probenansätze (5000 rpm, 5 min, RT) sowie der konservativen Abnahme der organischen Phasen (Glas-Pasteurpipette) erfolgte eine weitere Extraktion des Gewebehomogenats mit 2 ml Chloroform auf einem Vortexer bei RT. Nach Zentrifugation entsprechend der oben genannten Bedingungen werden die organischen Phasen in einem silanisierten Glas-Zentrifugenröhrchen vereinigt und bis zur Trockene evaporiert (p = 50 mbar, t = 1 h, RT). Nach Aufnahme des Rückstandes in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) werden die Proben zur Aufreinigung sowie Aufkonzentrierung der Analyten einer SPE unterzogen.

4.2.21 Aufarbeitung der Proben mittels SPE

4.2.21.1 Lösungen

BSTFA	siehe Kap. 4.1.5
n-Heptan	siehe Kap. 4.1.5
Isopropanol	siehe Kap. 4.1.5
MeOH	siehe Kap. 4.1.5
MeOH (0,1% FA)	siehe Kap. 4.1.6
MeOH 85% (v/v)	siehe Kap. 4.1.6
Phosphat-Puffer (pH 4,9)	siehe Kap. 4.1.6
Phosphat-Puffer (20% MeOH)	siehe Kap. 4.1.6
Wasser (LC-MS grade)	siehe Kap. 4.1.5

4.2.21.2 Durchführung

Nach dem Konditionieren der Säulen mit 2 x 2 ml MeOH (Plastik-Pasteurpipette) werden diese mit 2 x 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) auf den pH-Wert der Proben eingestellt. Anschließend werden die Proben auf die Säulen (Glas-Pasteurpipette) aufgeben, wobei diese im Anschluss daran jeweils mit 3 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) nachgewaschen werden. Die Elution der Metabolite erfolgt mit 85% MeOH (v/v, Plastik-Pasteurpipette) in ein silanisiertes Glas-Zentrifugenröhrchen. Die Fließgeschwindigkeit der Elutionsmittel durch die SPE-Säulen wird über Druckventile auf 1 ml/min eingestellt. Die 85% MeOH-Fraktion wird über Nacht bis

zur Trockene evaporiert ($p = 15 \text{ mbar}$, $t = 1 \text{ h}$, RT) und der Rückstand in $15 \mu\text{l}$ BSTFA + $15 \mu\text{l}$ n-Heptan aufgenommen, gevortext und unverzüglich in ein $100 \mu\text{l}$ Insert/Vial überführt. Nach dreistündiger Derivatisierung im geschlossenen Reaktionsgefäß werden $2 \mu\text{l}$ Probe der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Abb. 4 gibt das Aufarbeitungsschema für humanes Brustdrüsengewebe wieder.

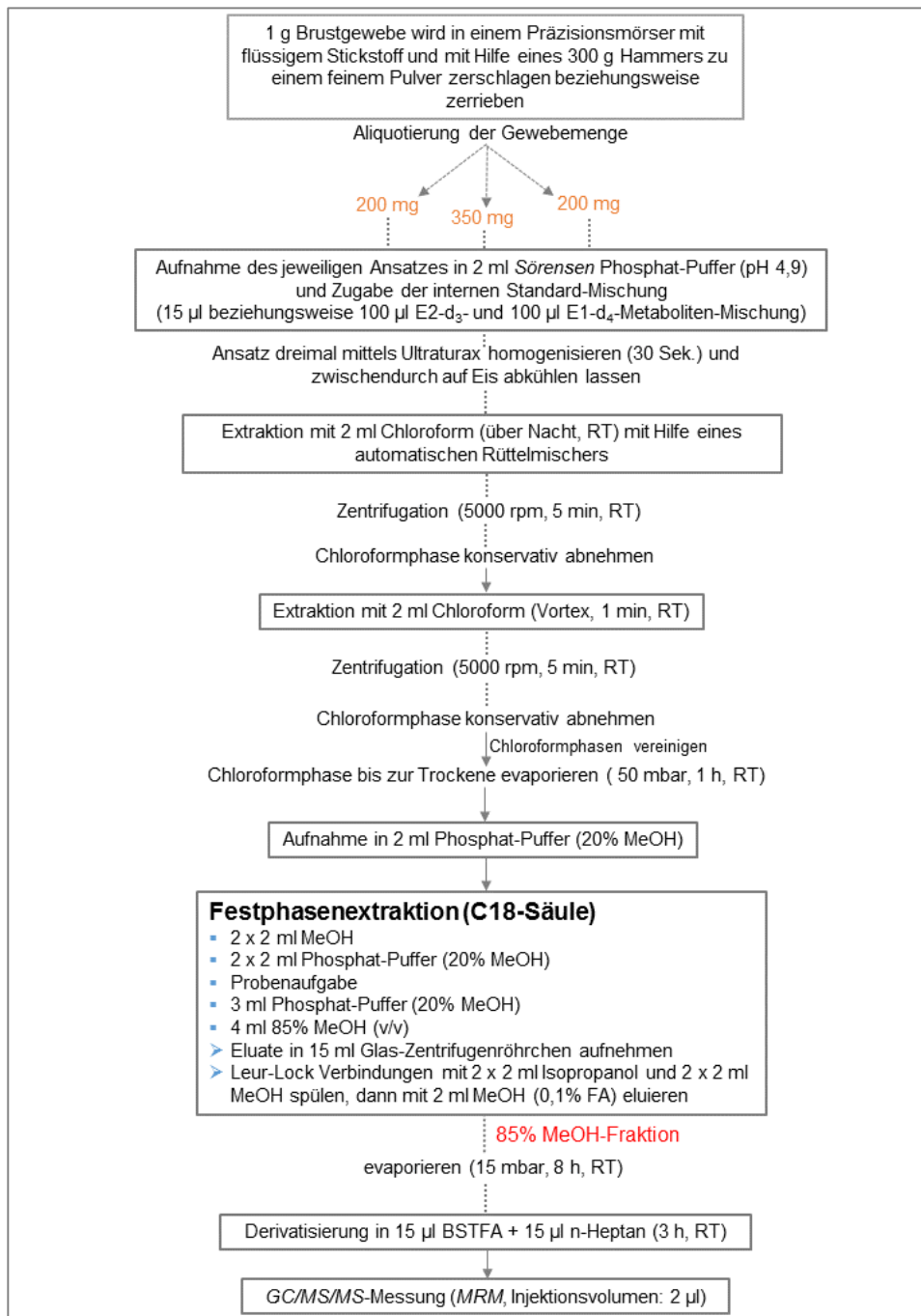


Abb. 4: Aufarbeitungsschema für humanes Brustdrüsengewebe zur Isolierung und Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten.

Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination des Systems mit E2, werden zu jeder Probenreihe jeweils zwei Blindwerte als Negativkontrolle mitgeführt. Diese werden ohne Probenzusatz analog den Matrixproben hergestellt, aufgearbeitet und analysiert.

Für die Bestimmung der WFR werden 100 µl der E1-d₄- und 15 µl beziehungsweise 100 µl einer d₃-E2-Metaboliten-Referenzmischung als Bezugspunkt (≙ 100%) ohne Chloroformextraktion und SPE-Behandlung bis zur Trockene evaporiert (p = 15 mbar, t = 30 min, RT). Der Rückstand wird in 15 µl n-Heptan + 15 µl BSTFA aufgenommen, gevortext und in ein 100 µl Insert/GC-Vial überführt. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Um eine E2-Kontamination der verwendeten Leur-Lock Verbindungen der SPE-Kammer auszuschließen, werden diese nach der Probenaufarbeitung entsprechend Kap. 4.2.12 behandelt (Abb. 4).

4.2.22 Messbedingungen

Die Überprüfung der inhibierenden Wirkung von SA, SAL und GA auf β -Glucuronidase von *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2 und Typ H-1) erfolgte an einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem Flammenionisations-Detektor (FID; Firma Agilent 6890 Plus Series). Dieser wurde ebenfalls für die Überprüfung der Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase aus *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2 und Typ H-1) sowie β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) verwendet. Die entsprechenden Geräteparameter sind in Tab 14 aufgeführt.

Tab 14.: Arbeitsbedingungen GC/FID.

Parameter	GC/FID (Agilent 6890 Plus Series)
Säule	Phenomenex ZB-5-ms (30 m * 0,25 mm ID * 0,2 µm D _F)
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	270 °C
Injektionsvolumen	1 µl (splitless)
Temperaturprogramm	60 °C - 0 min → 250 °C mit 30°C/min - 6,33 min → 295 °C mit 1,8 °C/min - 31,33 min
Trärgas	Helium, 1 ml/min
Make-up-Gas	Stickstoff

Die *MRM*-Methodenentwicklung von E1- und E2-Metaboliten, die Optimierung der GC-Methodenparameter sowie die Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe erfolgte an einem Gaschromatographen (Firma Varian 450-GC) gekoppelt mit einem *Triple-Quadrupol*-Massenspektrometer (Firma Varian 300-MS). Die entsprechenden Geräteparameter sind in der folgenden Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Optimierte Arbeitsbedingungen der verwendeten *GC/MS/MS*-Systems.

Parameter	GC (Varian 450-GC)
Säule	Supelco SLB TM 5 ms (30 m * 0,25 mm ID * 0,2 µm D _F)
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	1 µl (splitless) <i>Autosampler Spülprogramm</i> vor Injektion: 1 x 5 µl Ethylacetat, 1 x 5 µl n-Heptan nach Injektion: 5 x 5 µl Ethylacetat, 5 x 5 µl n-Heptan
Temperaturprogramm	60 °C - 0 min → 250 °C mit 60°C/min - 6,33 min → 275 °C mit 1,8 °C/min - 23,00 min
Trägergas	Helium; 1 ml/min
Parameter	MS (Varian MS-300)
Ionisierungsart	EI (70 eV)
Filament	50 µA
Kollisionsgas	Argon; 0,8 mTorr
Detektorspannung	EDR Maximum (1385 V)
Temperatur Ionenquelle	250°C
Temperatur <i>Transfer-Line</i>	280°C
Temperatur <i>manifold</i>	40°C
<i>dwell-time</i>	<i>Fullscan</i> : 0,3 sec. Produktionen- <i>scan</i> : 0,5 sec. / 0,25 sec. <i>Screening / Fine-tunig</i> : 0,25 sec. Entwicklung der Aufarbeitungsmethode / Probenmessungen: Kap. 4.2.23.1 und Kap. 4.2.23.2
<i>delay</i>	11 min

Diesbezüglich sind die optimierten Arbeitsbedingungen des verwendeten GC/MS/MS-Systems aufgeführt, daher ist zu beachten, dass die Ionisierungsenergie, die *Transferline-Temperatur* sowie die Temperatur der Ionenquelle beziehungsweise die *dwell-time* im Rahmen der Methodenentwicklung Kap. 4.2.1 bis Kap. 4.2.8 variabel zu verwenden sind. Die Identifizierung der einzelnen Analyte erfolgte mit Hilfe von Messungen im *fullscan*-Modus ($m/z = 100 - 600$; Kap. 4.2.1). Die jeweiligen *Quantifier*- und *Qualifier*ionen wurden durch Aufnahme von Produktionenspektren (Kap. 4.2.2) ermittelt. Eine Übersicht über die *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten, deren charakteristisches Bildungsverhältnis sowie die optimierten *CE* gibt Tab. 16 wieder.

Tab. 16: Substanzspezifische MS/MS-Parameter für E1- und E2-Metabolite im positiven Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV) Die grau hinterlegten Balken repräsentieren die *MRM*-Übergänge, wobei die obere Zeile den jeweiligen *Quantifier* und die untere Zeile den *Qualifier* darstellt.

Analyt	Übergang (m/z)	CE (eV)	mittleres Quantifier/Qualifier Verhältnis
<i>E1-Metabolite</i>			
E1	342_257	10	1,41 ± 0,15
	342_244	14	
2-HO-E1	430_345	16	2,08 ± 0,37
	430_306	22	
4-HO-E1	430_345	16	3,45 ± 0,62
	430_306	22	
16- α -HO-E1	430_286	8	-
2-MeO-E1	372_342	12	3,02 ± 0,72
	372_357	7,5	
4-MeO-E1	372_342	12	2,32 ± 0,33
	372_357	7,5	
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	12	2,83 ± 0,31
	372_357	7,5	
<i>E2-Metabolite</i>			
E2	416_285	13	1,64 ± 0,14
	416_326	7	
2-HO-E2	504_373	18	1,51 ± 0,19
	504_325	15	
4-HO-E2	504_373	18	1,15 ± 0,16
	504_325	15	
16- α -HO-E2	504_414	7,5	1,19 ± 0,06
	504_324	9	

MATERIAL UND METHODEN

Analyt	Übergang (m/z)	CE (eV)	mittleres Quantifier/Qualifier Verhältnis
2-MeO-E2	446_315	14	1,29 ± 0,04
	446_325	14	
4-MeO-E2	446_315	14	1,06 ± 0,13
	446_325	14	
3-O-Me-2-HO-E2	446_315	14	1,58 ± 0,16
	446_416	14	
3-O-Me-4-HO-E2	446_315	14	1,37 ± 0,14
	446_416	14	

4.2.23 Messmethoden

4.2.23.1 Methodenentwicklung

Um einen möglichen Einfluss der SPE und der enzymatischen Hydrolyse sowie der Chloroformextraktion auf den Verlust von E1- und E2-Metaboliten zu ermitteln, werden für die Analyse von Testansätzen die *MRM*-Methoden *E1_Metabolite.mth* (Tab. 17) beziehungsweise *E2_Metabolite.mth* herangezogen. Diese beinhalten alle *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten.

Tab. 17: *MRM*-Methode (*E1_Metabolite.mth*) für undeuterierte E1-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die obere Zeile der *MRM*-Übergänge repräsentiert den jeweiligen *Quantifier*-Übergang und die untere Zeile den entsprechenden *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: Kap. 4.2.22.

Analyt	Übergang (m/z)	CE (eV)	<i>dwell-time</i> (sec.)
E1	342_257	10	0,25
	346_244	14	0,25
2-/4-MeO-E1	372_342	12	0,25
3-O-Me-2-HO-E1	372_357	7,5	0,25
2-/4-HO-E1	430_345	16	0,25
	430_306	22	0,25
16- α -HO-E1	430_286	8	0,25

Tab. 18: *MRM*-Methode (E2_Metabolite.mth) für undeuterierte E2-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die obere Zeile der *MRM*-Übergänge repräsentiert den jeweiligen *Quantifier*-Übergang und die untere Zeile den entsprechenden *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: Kap. 4.2.22.

Analyt	Übergang (m/z)	CE (eV)	dwel-time (sec.)
E2	416_285	13	0,25
	416_326	17	0,25
2-/4-MeO-E2	446_315	14	0,25
3-O-Me-2-/4-HO-E2	446_325	14	0,25
2-/4-HO-E2	504_373	18	0,25
	504_325	15	0,25
16- α -HO-E2	504_414	7,5	0,25
	504_324	9	0,25

4.2.23.2 **Probenmessungen**

Zur Überprüfung der synthetisierten Standards auf mögliche Kontaminationen (Kap. 5.4.1) und zur Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe (Kap. 5.6) werden 2 unterschiedliche Formen einer *MRM*-Methode herangezogen.

Während die Methode *I_E1_E2_Metabolite_deuteriert_undeuteriert.mth* nur die *Quantifier*-Übergänge von deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metaboliten beinhaltet, berücksichtigen die Methoden *II_meCE_deuteriert_undeuteriert.mth*, *III_CE_deuteriert_undeuteriert.mth* und *IV_E3_16alpha-HOE1_deuteriert_undeuteriert.mth* neben den *Quantifier*-Übergängen auch alle *Qualifier*-Übergänge von E1, E2 sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten.

Bei der Berechnung der *scan-time* in den jeweiligen *time-segmenten* ist zu berücksichtigen, dass für Metabolite mit gleichen *MRM*-Übergängen lediglich einmal der *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergang innerhalb der Methode verwendet wird. Der besseren Übersicht halber wurden nachfolgend jedoch auch diese Metabolite einzeln aufgeführt. Tab. 19 gibt die einzelnen Methodenparameter der *MRM*-Methode *I_E1_E2_Metbolite_deuteriert_undeuteriert.mth* wieder.

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 19: *MRM-Methode (I_E1_E2_Metabolite_deuteriert_undeuteriert.mth)* für deuterierte und undeuterierte E1- und E2-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die obere Zeile der *MRM*-Übergänge repräsentiert den jeweiligen undeuterierten *Quantifier*-Übergang und die untere Zeile den entsprechenden *Quantifier*-Übergang der deuterierten Analoga. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: 4.2.22.

Substanz	Übergang (m/z)	CE (eV)	t_R (min)	dwel-time (sec.)	scan-time (sec.)
<i>Segment I</i>	<i>(delay: 11,0 - 13,9 min)</i>				1,0
E1	342_257	10	13,153	0,25	
	346_261	10	13,103	0,25	
E2	416_285	13	13,550	0,25	
	419_285	13	13,525	0,25	
<i>Segment II</i>	<i>(delay: 13,9 - 20,22 min)</i>				1,8
2-HO-E1	430_345	16	15,222	0,15	
	434_345	16	15,177	0,15	
4-HO-E1	430_345	16	16,006	0,15	
	434_345	16	15,960	0,15	
16- α -HO-E1	430_286	8	15,624	0,15	
	434_286	8	15,177	0,15	
2-HO-E2	504_373	18	15,644	0,15	
	507_373	18	15,622	0,15	
4-HO-E2	504_373	18	16,399	0,15	
	507_373	18	16,373	0,15	
16- α -HO-E2	504_414	7,5	16,765	0,15	
	507_417	7,5	16,739	0,15	
2-MeO-E1	372_342	12	15,179	0,15	
	376_346	12	15,100	0,15	
4-MeO-E1	372_342	12	14,568	0,15	
	376_346	12	14,508	0,15	
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	12	15,036	0,15	
	376_346	12	14,977	0,15	
2-MeO-E2	446_315	14	15,633	0,15	
	449_315	14	15,639	0,15	
4-MeO-E2	446_315	14	14,988	0,15	
	449_315	14	14,959	0,15	

Tab. 20 gibt die einzelnen Methodenparameter der *MRM-Methode II_meCE_deuteriert_undeuteriert.mth* wieder.

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 20: *MRM-Methode (II_E1_E2_meCE_deuteriert_undeuteriert.mth)* für deuterierte und undeuterierte E1- und E2-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellenspannung: 70 eV). Die oberen Zeilen der *MRM*-Übergänge repräsentieren jeweils den undeuterten beziehungsweise deuterierten *Quantifier*-Übergang und die unteren Zeilen den entsprechenden undeuterten beziehungsweise deuterierten *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: Kap. 4.2.22.

Substanz	Übergang (m/z)	CE (eV)	t_R (min)	dwel-time (sec.)	scan-time (sec.)
<i>Segment I (delay: 11,0 - 13,9 min)</i>					1,6
E1	342_244	14	13,153	0,15	
	342_257	10		0,15	
E1-d ₄	346_246	14	13,103	0,15	
	346_261	10		0,15	
E2	416_285	13	13,550	0,25	
	416_326	7		0,25	
E2-d ₃	419_285	13	13,525	0,25	
	419_329	7		0,25	
<i>Segment II (delay: 13,9 - 20,22 min)</i>					1,2
2-MeO-E1	372_342	12	15,179	0,15	
	372_357	7,5		0,15	
2-MeO-E1-d ₄	376_346	12	15,100	0,15	
	376_361	7,5		0,15	
4-MeO-E1	372_342	12	14,568	0,15	
	372_357	7,5		0,15	
4-MeO-E1-d ₄	376_346	12	14,508	0,15	
	376_361	7,5		0,15	
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	12	15,036	0,15	
	372_357	7,5		0,15	
3-O-Me-2-HO-E1-d ₄	376_246	12	14,977	0,15	
	376_361	7,5		0,15	
2-MeO-E2	446_315	14	15,633	0,15	
	446_325	14		0,15	
2-MeO-E2-d ₃	449_315	14	15,639	0,15	
	449_328	14		0,15	
4-MeO-E2	446_315	14	14,988	0,15	
	446_325	14		0,15	
4-MeO-E2-d ₃	449_315	14	14,959	0,15	
	449_328	14		0,15	

Die folgenden Tab. 21 beziehungsweise Tab. 22 geben einen Überblick über die einzelnen Methodenparameter der MRM-Methoden *III_E1_E2_CE_deuteriert_undeuteriert.mth* beziehungsweise *IV_E3_16alpha-HOE1_deuteriert_undeuteriert.mth*.

Tab. 21: MRM-Methode (*III_E1_E2_CE_deuteriert_undeuteriert.mth*) für deuterierte und undeuterierte E1- und E2-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die oberen Zeilen der MRM-Übergänge repräsentieren jeweils den undeuterierten beziehungsweise deuterierten *Quantifier*-Übergang und die unteren Zeilen den entsprechenden undeuterierten beziehungsweise deuterierten *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen GC/MS/MS: Kap. 4.2.22.

Substanz	Übergang (m/z)	CE (eV)	t_R (min)	dwel-time (sec.)	scan-time (sec.)
<i>Segment I (delay: 11,0 - 13,9 min)</i>					1,6
E1	342_244	14	13,153	0,15	
	342_257	10		0,15	
E1-d ₄	346_246	14	13,103	0,15	
	346_261	10		0,15	
E2	416_285	13	13,550	0,25	
	416_326	7		0,25	
E2-d ₃	419_285	13	13,525	0,25	
	419_329	7		0,25	
<i>Segment II (delay: 13,9 - 20,22 min)</i>					1,2
2-HO-E1	430_345	16	15,222	0,15	
	430_306	22		0,15	
2-HO-E1-d ₄	434_345	16	15,177	0,15	
	434_308	22		0,15	
4-HO-E1	430_345	16	16,006	0,15	
	430_306	22		0,15	
4-HO-E1-d ₄	434_345	16	15,960	0,15	
	434_308	22		0,15	
2-HO-E2	504_373	18	15,644	0,15	
	504_325	15		0,15	
2-HO-E2-d ₃	507_373	18	15,622	0,15	
	507_328	15		0,15	
4-HO-E2	504_373	18	16,399	0,15	
	504_325	15		0,15	
4-HO-E2-d ₃	507_373	18	16,373	0,15	
	507_328	15		0,15	

Tab. 22: *MRM*-Methode (IV_E3_16alpha-HOE1_deuteriert_undeuteriert.mth) für deuterierte und undeuterierte E1- und E2-Metabolite. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die oberen Zeilen der *MRM*-Übergänge repräsentieren jeweils den undeuterierten beziehungsweise deuterierten *Quantifier*-Übergang und die unteren Zeilen den entsprechenden undeuterierten beziehungsweise deuterierten *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: Kap. 4.2.22.

Substanz	Übergang (m/z)	CE (eV)	t_R (min)	dwel-time (sec.)	scan-time (sec.)
<i>Segment I</i> (delay: 11,0 - 13,9 min)					1,6
E1	342_244	14	13,153	0,15	
	342_257	10		0,15	
E1-d ₄	346_246	14	13,103	0,15	
	346_261	10		0,15	
E2	416_285	13	13,550	0,25	
	416_326	7		0,25	
E2-d ₃	419_285	13	13,525	0,25	
	419_329	7		0,25	
<i>Segment II</i> (delay: 13,9 - 20,22 min)					0,9
16-α-HO-E1	430_286	8	15,624	0,15	
16-α-HO-E1-d ₄	434_286	8	15,177	0,15	
16-α-HO-E2	504_414	7,5	16,765	0,15	
	504_324	9		0,15	
16-α-HO-E2-d ₃	507_417	7,5	16,739	0,15	
	507_327	9		0,15	

Um die Geräteempfindlichkeit dauerhaft zu gewährleisten, wurde im Rahmen der Qualitätssicherung in regelmäßigen Abständen ein E2-Qualitätsstandard analysiert (1 pg E2/Säule; Kap. 4.2.11). Dafür wurde die *MRM*-Methode_ *Sensitivity*.mth herangezogen. Die Methodenparameter sind in Tab. 23 angegeben.

Tab. 23: *MRM*-Methode (Sensitivity.mth) zur Überprüfung der Geräteperformance. Positiver Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV). Die obere Zeile der *MRM*-Übergänge repräsentiert den undeuterierten beziehungsweise deuterierten *Quantifier*-Übergang und die untere Zeile den entsprechenden *Qualifier*-Übergang. Arbeitsbedingungen *GC/MS/MS*: Kap. 4.2.22.

Substanz	Übergang (m/z)	CE (eV)	t_R (min)	dwel-time (sec.)	scan-time (sec.)
E2	416_285	13	13,550	0,5	
	416_326	7		0,5	
E2-d ₃	419_285	13	13,525	0,5	2,0
	419_329	7		0,5	

4.2.24 Auswertung von GC/MS/MS-Chromatogrammen

Für die Aufnahme sämtlicher MS-Chromatogramme wurde ein Varian 450-GC Gaschromatograph gekoppelt mit einem Varian 300-MS Massenspektrometer verwendet.

Alle Chromatogramme wurden über die gerätespezifische Auswertesoftware *MS Data Review* (ver. 6.9.2) der Firma Varian ausgewertet und interpretiert. Um die Vergleichbarkeit der Daten im Rahmen dieser Arbeit und mit weiterführenden Arbeiten zu gewährleisten, wurden software-spezifische automatische Auswertemethoden, insbesondere die automatische Peakintegration angewendet.

4.2.24.1 Peakintegration

Die Peakintegration erfolgte automatisch über die Software *MS Data Review*, dabei wurden die in Abb. 5. aufgeführten Parameter der Peakintegration automatisch vorgegeben.

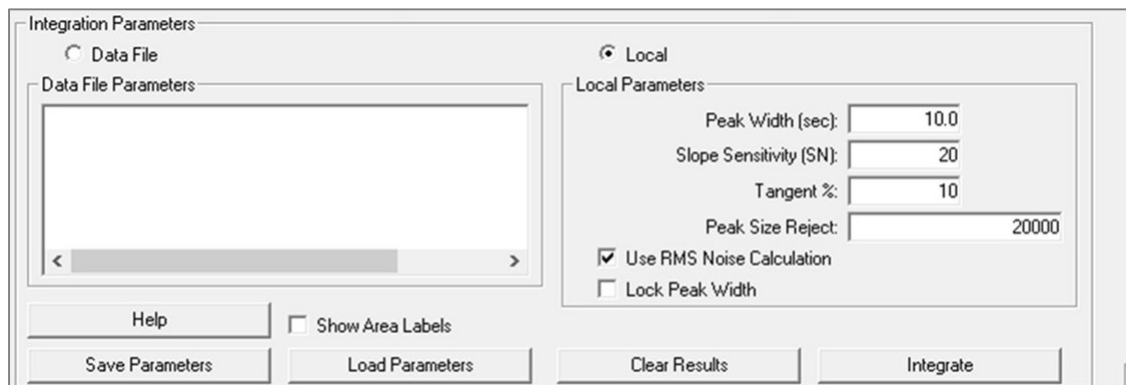


Abb. 5: Integrationsparameter für die automatische Peakintegration der Auswertesoftware *MS Data Review* (ver. 6.9.2; Firma Varian).

4.2.24.2 Peakfilterung

Alle generierten MS-Chromatogramme wurden zur Reduzierung des Rauschens und in Hinblick einer einfacheren Datenauswertung einer automatischen Glättung unterzogen. Weniger Rauschen in den Peaks führt zu kleineren Standardabweichungen und folglich zu einer höheren Präzision. Angewendet wurde diesbezüglich eine *Savitsky-Golay*-Glättung mit der kleinsten wählbaren Filterbreite von 5 Punkten. Gegenüber der *Mittelwert-Filterung* besitzt die *Savitsky-Golay*-Filterung den Vorteil, dass die Peakhöhe durch die Filterung weniger reduziert wird, wodurch größere Empfindlichkeitsverluste vermieden werden. Im Zuge dessen wurde ebenfalls die Filterbreite auf 5 Punkte gesetzt. Eine 9-Punkt-Filterung oder 13-Punkt-Filterung würde zu einer stärkeren Reduzierung der Peakhöhe führen (Thorne und Gskell, 1986). Die im Rahmen der Arbeit angewandte *Savitsky-Golay*-Glättung entspricht folglich trotz

Glättung und Filterung des Peakprofils am ehesten dem aus den Rohdaten generierten Peak. Abb. 6 gibt die verwendeten Glättungs- und Filterungseinstellungen wieder.

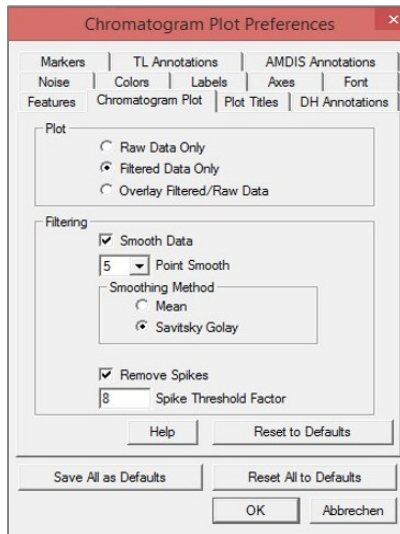


Abb. 6: Parameter der automatischen Glättung und Filterung der Auswertesoftware *MS Data Review* (ver. 6.9.2; Firma Varian).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Entwicklung einer Mess-Methode zur simultanen Bestimmung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zur Quantifizierung von freiem E1, E2 sowie der korrespondierenden hydroxylierten und methylierten Metabolite im Brustgewebe entwickelt werden. Da für diese Konzentrationen im unteren pg-Bereich pro Gramm Gewebe zu erwarten sind (Rogen et al., 2003), wurde die Anwendung einer empfindlichen Mess-Methode notwendig.

Durch Messungen im *MRM*-Modus können diese geringen Analyt-Gehalte nachgewiesen werden. Dazu wird zunächst im *fullscan*-Modus nach Elektronenstoßionisation (EI) das Ion mit der größten absoluten Intensität eines Analyten bestimmt. Dieses *Precursor-Ion* wird anschließend nach dem Q1 selektiv in den Q2 geleitet und mittels Argon erneut fragmentiert, während es anschließend im Q3 nochmals entsprechend des *m/z*-Verhältnisses dem Detektor zugeführt wird. Diese zusätzliche Fragmentierung des *Precursors* zu charakteristischen Tochterfragmenten ermöglicht eine spezifische Analyse bei gleichzeitiger Ausblendung von Matrixeffekten. Durch die Etablierung eines *Quali*- und *Quantifier*-Übergangs wird eine doppelte Absicherung zur Identifizierung der gesuchten Substanzen gewährleistet.

Um insbesondere bei geringen Analyt-Gehalten eine maximale Signalintensität des *Quanti*- und *Qualifiers* zu gewährleisten, müssen Methoden- und Geräte-bedingte Empfindlichkeitsverluste so weit wie möglich reduziert werden. Daher wurde eine Optimierung der Ionisierungs- und Kollisionsenergien sowie der *dwell-time* beziehungsweise *Initial*-Temperatur sowie der *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur durchgeführt.

Im Folgenden wurde zunächst die Ionisierungsenergie bestimmt, bei der die maximale Signalintensität des *Precursors* zu beobachten war. Durch die Anwendung der optimalen Ionisierungsenergie wurde ebenfalls bei weiterer Fragmentierung des jeweiligen *Precursors* die maximale Signalintensität des *Quanti*- und *Qualifier*-Übergangs gewährleistet.

5.1.1 Bestimmung der optimalen Ionisierungsenergie im *fullscan*-Modus

Infolge des verwendeten Varian-300-MS Massenspektrometers war zur Bestimmung der geeigneten Ionisierungsenergie die Aufnahme von *fullscan*-Chromatogrammen bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV möglich.

Die optimale Ionisierungsenergie wurde aus dem Vergleich der absoluten PF charakteristischer Massenspuren von E1- und E2-Metaboliten ermittelt (Kap. 4.2.1), wobei das Fragment mit der größten Signalintensität für die weitere Fragmentierung im Produktions-*scan* (Kap. 5.1.2) herangezogen wurde. Dabei war insbesondere das *Precursor*-Ion beziehungsweise das M^+ zu beachten, da die Ionisierungsenergie mit deren größter Intensität bei weiterer Fragmentierung ebenfalls die maximale Signalintensität charakteristischer Tochterfragmente erwarten ließ. Zur Aufnahme der *fullscan*-Chromatogramme wurde Absolutmengen von E1, E2 und der korrespondierenden Metaboliten von 10 pg bis 500 pg mittels GC/MS/MS analysiert (Kap. 4.2.1).

Da alle Analyten vor der gaschromatographischen Analyse mit BSTFA/n-Heptan derivatisiert wurden, erfolgten alle massenspektrometrischen Auswertungen auf Grundlage der trimethylsilylierten (TMS) E1- und E2-Derivate.

Exemplarisch wird im Folgenden die Auswertung des *fullscans* von TMS-E2 dargestellt.

Bestimmung der optimalen Ionisierungsenergie von E2

Zur Bestimmung der maximalen Peakintensitäten wurden 500 pg E2 bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV im *fullscan*-Modus analysiert. Entsprechend der charakteristischen Fragmente von E2-Metaboliten (Kap. 4.2.1) wurde das Messintervall im Q1 auf einen Bereich zwischen $m/z = 250 - 600$ eingestellt.

Aus den *fullscan*-Chromatogrammen von E2 wurden drei Fragmente, $m/z = 416$, $m/z = 285$ und $m/z = 326$, identifiziert (Abb. 7).

Das Fragment $m/z = 416$ entspricht dem M^+ und gibt die molare Masse von TMS-E2 wieder. Die Fragmente $m/z = 285$ und $m/z = 326$ sind einerseits auf die Spaltung des D-Ringes des Gonan Grundgerüsts zurückzuführen, andererseits auf die Abspaltung der Silanolgruppe an C2 beziehungsweise C17 (Abb. 7). Diese Fragmente sind ebenfalls von Castagnetta et. al., (1992) als charakteristisch für TMS-E2 beschrieben, so dass im Folgenden deren Signalintensitäten bei den getesteten Ionisierungsenergien betrachtet wurden.

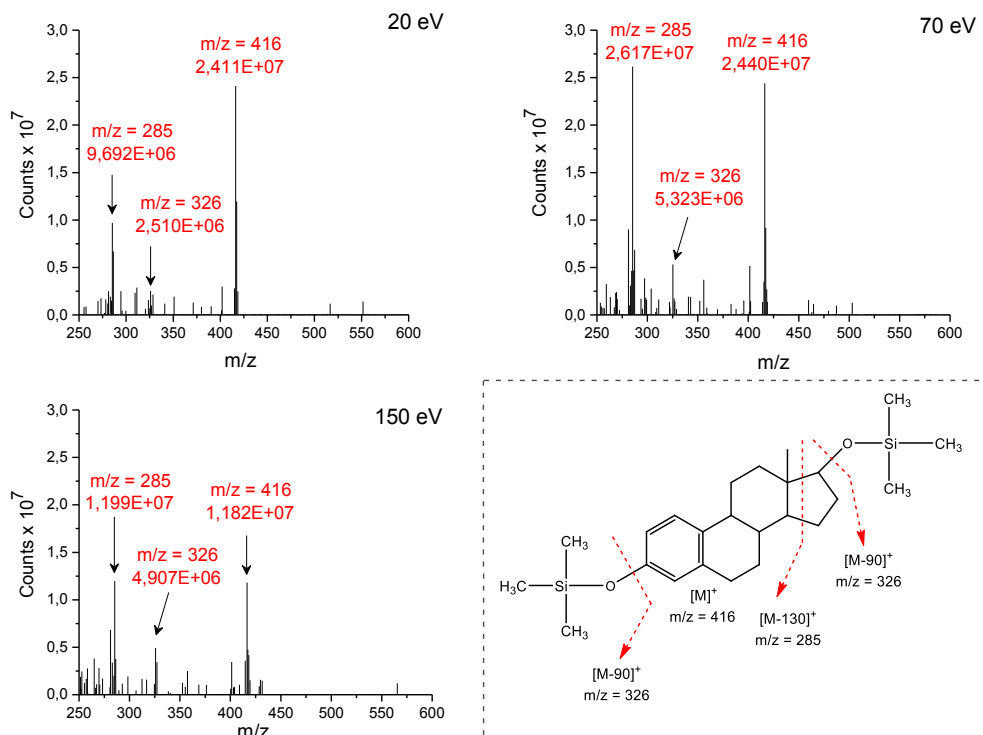


Abb. 7: Fullscan-Chromatogramme von TMS-E2 aufgenommen im Intervall von $m/z = 250 - 600$ (*dwell-time*: 0,3 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV sowie mögliche Fragmentierungspositionen und daraus resultierende Fragmente beziehungsweise Massenübergänge; $m_{E2/S\ddot{a}ule} = 500$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l (Einfachinjektion). Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Fragmente $m/z = 416$, $m/z = 285$ und $m/z = 326$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Für das M^+ sowie für $m/z = 285$ und $m/z = 326$ resultierten bei 70 eV mit 24.400.000 Counts sowie 26.170.000 Counts und 5.323.000 Counts die maximalen Signalintensitäten (Abb. 7). Auch wenn im Vergleich dazu bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV für das M^+ mit 24.110.000 Counts lediglich 2% kleinere Signalintensitäten erzielt wurden, zeigten die Fragmente $m/z = 285$ und $m/z = 326$ mit 9.692.000 Counts und 2.510.000 Counts, 63% beziehungsweise 53% kleinere absolute Signalintensitäten auf (Abb. 7). Die hohe Energiezufuhr von 150 eV führte beim M^+ zur stärksten Fragmentierung (Abb. 7). Die dabei resultierende absolute Signalintensität von lediglich 11.820.000 Counts verdeutlicht, dass bei dessen weiterer Fragmentierung ebenfalls keine Maximalwerte für die Tochterfragmente, $m/z = 285$ und $m/z = 326$, zu erwarten wären. Auch wenn die Signalintensität des Fragments $m/z = 326$ mit 4.907.000 Counts nur um 8% von der Signalintensität bei 70 eV variierte, resultierte für das Fragment $m/z = 285$ bei 20 eV mit 11.990.000 Counts eine um 54% geringere Signalintensität (Abb. 7). Infolgedessen wurde unter EI-Bedingungen für alle weiteren Messungen von E2 eine Ionisierungsenergie von 70 eV verwendet. Ferner wies das M^+ von E2 bei 70 eV gegenüber $m/z = 285$ beziehungsweise $m/z = 326$ die höchste maximale Signalintensität auf, so dass dieses als *Precursor-Ion* im Produktionscan verwendet wurde (Abb. 8).

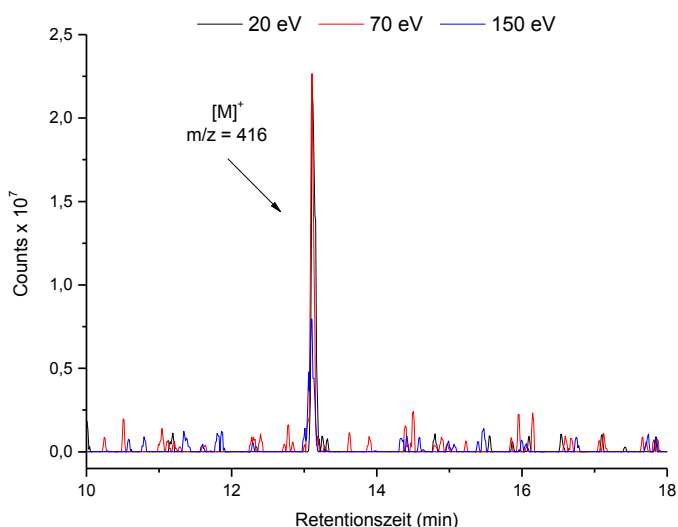


Abb. 8: Absolute PF des extrahierten M^+ von TMS-E2 bei 20 eV, 70 eV und 150 eV, aufgenommen im Intervall von $m/z = 250 - 600$ (*dwell-time*: 0,3 sec.) mittels GC/MS/MS; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 500$ pg. Injektionsvolumen: 1 μl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

In analoger Weise wurde für alle E1- und E2-Metabolite die Ionisierungsenergie optimiert und deren jeweiliger *Precursor* festgelegt.

Für das M^+ und die charakteristischen Tochterfragmente von E2-Metaboliten führte jeweils eine Ionisierungsenergie von 70 eV zur maximalen Signalintensität (Anhang, Tab. 40). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von E2- und E1-Metaboliten wurden die Ergebnisse der Effektivität verschiedener Ionisierungsenergien bezüglich der Signalintensität charakteristischer Fragmente auf die Analytik von E1-Metaboliten übertragen. Zur Erzeugung der Tochterfragmente von E1-Metaboliten wurde folglich eine Ionisierungsenergie von 70 eV verwendet (Anhang, Tab. 41), wobei die charakteristischen Tochterfragmente als auch die jeweiligen Molekülonen der Literatur entnommen wurden (Kap. 4.2.1).

Die *fullscan*-Chromatogramme von E2-Hydroxylierungs- und Methylierungsprodukten sowie von E1 und den entsprechenden hydroxylierten sowie methylierten Metaboliten sind dem Anhang (Abb. 67 - Abb. 69) zu entnehmen. Die Fragmentierungspositionen und die resultierenden Fragmente beziehungsweise Massenübergänge von E1- und E2-Metaboliten befinden sich ebenfalls im Anhang (Abb. 70 - Abb. 73 und Tab. 42 - Tab. 45).

5.1.2 Bestimmung der charakteristischen Tochterfragmente im Produktionscan

Zur eindeutigen Identifizierung von E1- und E2-Metaboliten im *MRM*-Modus mussten deren substanzspezifische *Quali*- und *Quantifier*-Ionen bestimmt werden. Diese resultierten aus einer erneuten Fragmentierung des im *fullscan* festgelegten *Precursor*-Ions (Kap. 5.1.1). Dadurch wurde eine selektive Analyse von E1- und E2-Metaboliten gewährleistet, während gleichzeitig störende Matrixeffekte ausgeblendet wurden.

Zur Aufnahme der Produktionenspektren wurden Absolutmengen von E1, E2 sowie deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten von 10 pg bis 100 pg mittels *GC/MS/MS* analysiert (Kap. 4.2.2). Durch die Variation der *CE* im Q2 wurde gleichzeitige eine Optimierung der Übergänge bezüglich der größtmöglichen absoluten PF bewirkt. Diesbezüglich konnte aufgrund der gerätetechnischen Bedingungen des verwendeten *Varian-300-MS* die Aufnahme von Produktionenspektren in einem Intervall von 1 eV bis 50 eV erfolgen. Während eine kleinere *CE* zu einem unspezifischen oder fehlenden Fragmentierungsverhalten führen kann, steigt bei einer zu hohen Energiezufuhr der Anteil nicht-charakteristischer, kleiner Fragmente. Infolgedessen wurde eine *CE* von 5 eV bis 30 eV getestet.

Exemplarisch wird im Folgenden die Auswertung des Produktionenspektrums von TMS-E2 dargestellt.

Bestimmung charakteristischer Tochterfragmente von E2

Aus der Aufnahme von *fullscan*-Chromatogrammen (Kap. 5.1.1) wurden für E2 zwei charakteristische Fragmente, $m/z = 285$ und $m/z = 326$, identifiziert. Da diese im *MRM*-Modus als *Quanti*- beziehungsweise *Qualifier*-Ion fungieren, wurde für deren Etablierung die Signalintensität bei einer *CE* von 5 eV, 10 eV, 15 eV, 20 eV und 30 eV untersucht. Diesbezüglich wurden 100 pg E2 mittels *GC/MS/MS* analysiert (Kap. 4.2.2).

Bei einer *CE* von 10 eV war für die Fragmente $m/z = 285$ und $m/z = 326$ mit 65.180.000 Counts sowie 28.450.000 Counts die maximale Signalintensität zu beobachten (Abb. 9). Auch wenn sich die Signalintensität des Fragments $m/z = 326$ bei 5 eV mit 27.720.000 Counts nur um 3% von der Signalintensität bei 10 eV unterschied, resultierte für das Fragment $m/z = 285$ bei 5 eV mit 32.710.00 Counts eine um 50% geringere Signalintensität (Abb. 9). Ab 15 eV war eine stetige Abnahme der Signalintensitäten beider Tochterfragmente zu beobachten (Abb. 9). Hierbei schwankte die Signalintensität für $m/z = 285$ in einem Bereich von 63.070.000 Counts bis 28.570.000 Counts. Für $m/z = 326$ resultierte Signalintensitäten von 19.780.000 Counts und 9.357.000 Counts (Abb. 9). Durch die hohe Energiezufuhr bei 30 eV resultierte für das M^+

die stärkste Fragmentierung. Dies hatte zur Folge, dass $m/z = 326$ nicht mehr nachzuweisen war, beziehungsweise $m/z = 285$ die kleinste Signalintensität aufzeigte (Abb. 9).

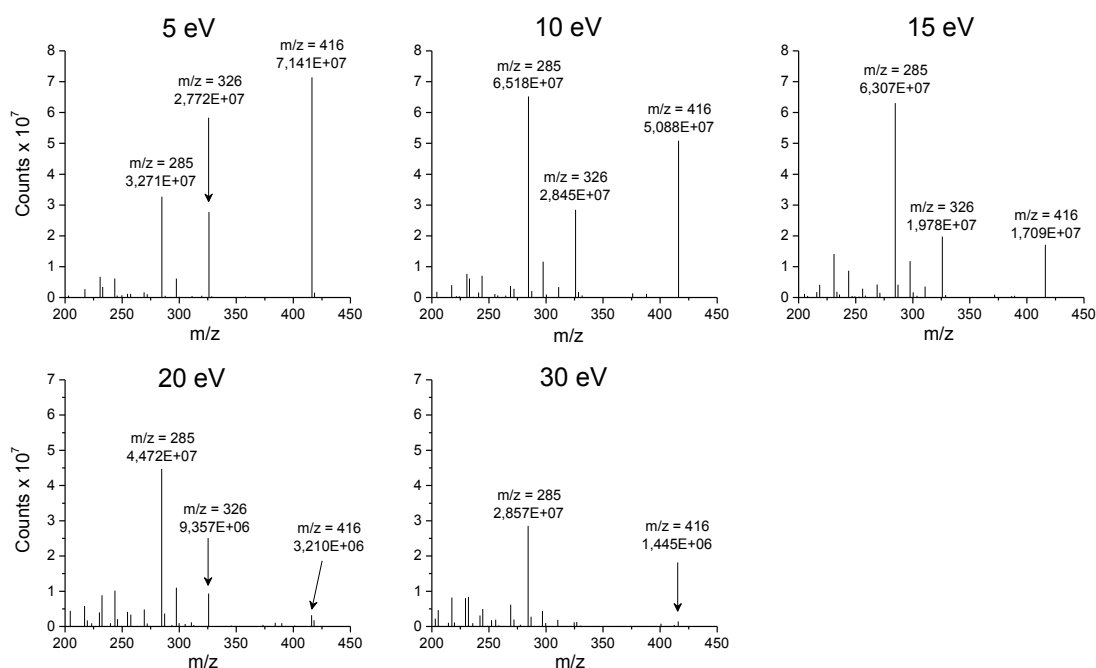


Abb. 9: Produktionspektren von TMS-E2 aufgenommen im Intervall von $m/z = 416 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,5 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV beziehungsweise 30 eV; $m_{E2/S\ddot{a}ule} = 100$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l (Einfachinjektion). Dargestellt sind die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 285$ und $m/z = 326$ sowie des *Precursor*-Ions $m/z = 416$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Nach Wood et al. (2005) fungiert das intensivere Fragment als *Quantifier*, w\ahrend das weniger intensive Fragment als *Qualifier* herangezogen wird. Im Produktionspektrum von E2 resultierte f\ur $m/z = 285$ stets eine h\ohere Signalintensit\at als f\ur $m/z = 326$ (Abb. 9). Infolgedessen wurde $m/z = 285$ im *MRM*-Modus als *Quantifier*-\u00dcbergang verwendet, w\ahrend $m/z = 326$ als *Qualifier* zur Absicherung des Analyten herangezogen wurde.

Eine Aussage \u00fcber die optimalen CE der *MRM*-\u00dcberg\angnge 416_285 und 416_326 von E2 konnte nach Aufnahme eines *Produktionenscans* nicht getroffen werden, da im Q3 jegliche Fragmente des *Precursor*-Ions $m/z = 416$ im Intervall zwischen $m/z = 200 - 450$ detektiert wurden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein *Screening* der CE im *MRM*-Modus durchgef\ohrt (Kap. 5.1.3). Dabei wurden die im *Produktionenscan* ermittelten charakteristischen Tochterfragmente von E1- und E2-Metaboliten durch Variation der CE intensiviert und jeweils die optimale CE f\ur die oben genannten \u00dcberg\angnge ermittelt.

In analoger Weise wurden f\ur alle E1- und E2-Metabolite die charakteristischen Tochterfragmente im Produktionspektrum bestimmt (Anhang, Abb. 74 - Abb. 82).

Tab. 24 gibt die *Precursor*- sowie *Quantifier*- und *Qualifier*-Ionen von E1- und E2-Metaboliten wieder.

Tab. 24: *Precursor* sowie *Quanti*- und *Qualifier*-Ionen von E1- und E2-Metaboliten bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV, wobei die entsprechenden *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge aus dem Vergleich der absoluten Signalintensitäten charakteristischer Tochterfragmente etabliert wurden. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Analyt	<i>Precursor</i> (m/z)	<i>Quantifier</i> (m/z)	<i>Qualifier</i> (m/z)
E1	342	257	244 218
2-/4-HO-E1	430	345	306
16- α -HO-E1	430	286	-
2-/4-MeO-E1	372	342	357
3-O-Me-2-HO-E1	372	342	357
E2	416	285	326
2-/4-HO-E2	504	373	325
16- α -HO-E2	504	414	324 295
2-/4-MeO-E2	446	315	325
3-O-Me-2-/4-HO-E2			416

5.1.3 Bestimmung der optimalen Kollisionsenergien für die spezifischen Massenübergänge von E1- und E2-Metaboliten

Durch Variation der *CE* im Q2 können die im *Produktionenscan* ermittelten charakteristischen Massenfragmente intensiviert werden. Dabei ist die *CE* ideal, wenn die *PF* der Tochterfragmente von E1- und E2-Metaboliten maximal sind. Da die Tochterfragmente im *Produktionenscan* im Q3 nicht selektiv ausgewählt werden können, sondern alle Fragmentierungsprodukte des jeweiligen *Precursors* detektiert werden, ist es notwendig, die *CE* der *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge im *MRM*-Modus zu optimieren. Dabei werden die Tochterfragmente im Q3 bei variierender *CE* detektiert.

Um zunächst einen möglichst weiten Bereich der *CE* zu testen, wurde jeweils ein *Screening* bei 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV durchgeführt.

Die maximalen Konzentrationen von E1- und E2-Metaboliten liegen im Gewebe im unteren pg-Bereich pro Gramm Drüsengewebe (Kap. 5.6.1), so dass für den intensiveren *Quantifier*-

Übergang lediglich absolute PF zwischen 200.000 und 300.000 Counts zu erwarten waren. Daher wurden in Abhängigkeit des jeweiligen Response (Kap.5.1.5) Absolutmengen von E1, E2 und den endsprechenden Metaboliten von 2 bis 10 pg mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.3). Anschließend wurde die *CE* mit der maximalen absoluten PF des jeweiligen *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs ermittelt.

Exemplarisch wird im Folgenden die Auswertung des *Screenings* von E2 dargestellt.

Screening der Kollisionsenergie für die spezifischen Massenübergänge von E2

Zur Bestimmung der optimalen *CE* des *Quali*- und *Quantifiers* wurden 10 pg von E2 im *MRM*-Modus bei 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV analysiert, wobei die aus dem *Produktionenscan* ermittelte charakteristische *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur, 416_285 beziehungsweise 416_326, verwendet wurde (Kap. 5.1.2).

Für den *Quantifier* von E2 wurde bei einer *CE* von 15 eV mit einer PF von 1.440.000 Counts der maximale Response beobachtet, währenddessen der *Qualifier* mit 872.000 Counts bei einer *CE* von 10 eV maximal wurde (Abb. 10).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass sich die Intensitäten der *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Massenspuren nur geringfügig voneinander unterscheiden. Dementsprechend war die PF des *Quantifiers* bei 5 eV mit 1.350.000 Counts und bei 10 eV mit 1.370.000 Counts nur 6,3% beziehungsweise 4,9% kleiner als bei 15 eV. Für den *Qualifier* resultierte bei einer *CE* von 5 eV eine PF von 696.000 Counts. Diese war um 20,2% kleiner als das Maximum der PF.

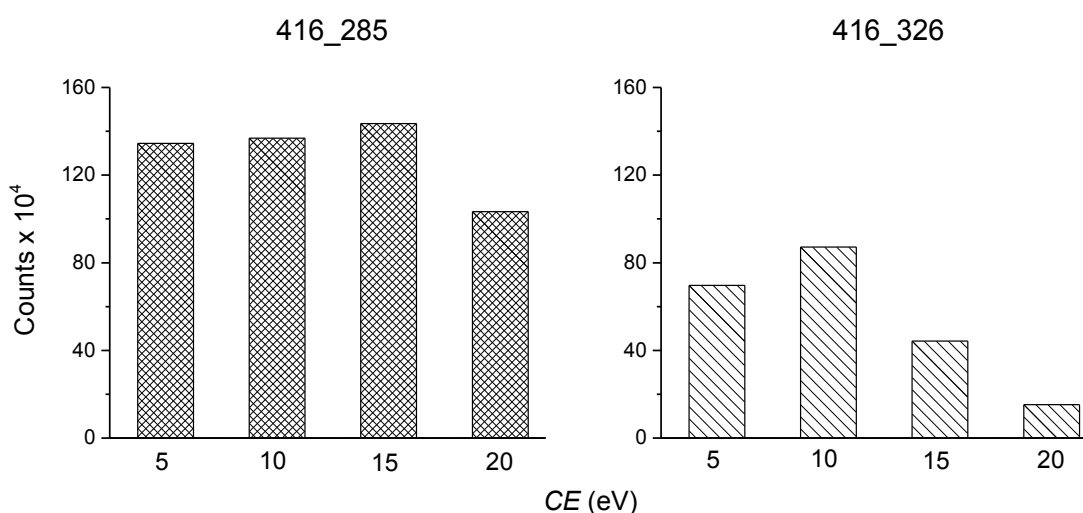


Abb. 10: *Screening* der *CE* zur Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E2. Analyse mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des *Quantifier*- (416_285) und *Qualifier*-Übergangs (416_326) bei einer *CE* von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{E2/Säule} = 10$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Da das *Screening* lediglich als Orientierung für den maximalen Response des *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs fungierte, erfolgte dieses jeweils in Einfachbestimmung. Im Anschluss daran wurde ein *Fine-tuning* durchgeführt, bei dem engere Bereiche mit kleineren Abstufungen der *CE* getestet wurden. Um diese Ergebnisse statistisch zu bestätigen, wurde für alle E1- und E2-Metabolite eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Während für den *Quantifier* von E2 diesbezüglich eine *CE* um 15 eV überprüft wurden, wurde für den *Qualifier* der Bereich um 10 eV herangezogen.

In analoger Weise wurden alle E1- und E2-Metabolite dem *Screening* der *CE* unterzogen (Anhang, Abb. 83 - Abb. 87). Eine Ausnahme davon stellte 16- α -HO-E1 dar. Diesbezüglich wurde aus *fullscan*-Chromatogrammen $m/z = 430$ als *Precursor*-Ion etabliert (Anhang, Abb. 68). Dessen weitere Fragmentierung lieferte im *Produktionenscan* die charakteristischen Fragmente $m/z = 286$ und $m/z = 341$ (Anhang, Abb. 79). Diese sind einerseits auf die Spaltung des D-Ringes des Gonan Grundgerüsts zurückzuführen und andererseits auf die Abspaltung der Silanolgruppe an C2 und C16 (Anhang, Abb. 83).

Während für den Übergang 430_286 ein scharfes Signal zu beobachten war, resultierten für den Übergang 430_341 vier Signale (Anhang, Abb. 83). Möglicherweise sind diese auf die Zersetzung von 16- α -HO-E1 beziehungsweise auf die gleichzeitige Abspaltung und Dimerisierung der Silanolgruppen zurückzuführen, so dass lediglich das Hintergrundrauschen detektiert wurde, beziehungsweise vier Übergänge resultierten. Auf weitere Untersuchungen wurde in diesem Zusammenhang verzichtet, so dass für 16- α -HO-E1 nur der Übergang $m/z = 430_{286}$ als *Quantifier* berücksichtigt wurde.

Die folgende Tab. 25 gibt einen Überblick über die eingesetzten Absolutmengen sowie die im *Screening* ermittelten optimalen *CE*, die den maximalen Response bezüglich der getesteten Massenübergänge von E1 und E2-Metaboliten Metaboliten aufzeigten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tab. 25: Im *Screening* ermittelte optimale *CE* der getesteten Übergänge von E1 und E2-Metaboliten. Die obere Zeile repräsentiert den *Quantifier*, während die unteren Zeilen die *Qualifier*-Übergänge zeigen. Dargestellt sind die absoluten PF einer Einfachbestimmung. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Analyt	Über- gang (m/z)	Menge (pg/Säule)	CE (eV)	max. Response PF (Counts)
E1	342_257	2	10	475.500
	342_244		20	435.000
	342_218		15	63.800
2-HO-E1	430_345	10	15	115.000
	430_306		20	81.100
4-HO-E1	430_345	10	15	326.000
	430_306		15	109.000
16- α -HO-E1	430_286	5	10	560.000
2-MeO-E1	372_342	2	15	312.400
	372_357		10	155.100
4-MeO-E1	372_342	4	10	592.000
	372_357		5	224.000
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	5	10	484.100
	372_357		5	113.000
E2	416_285	10	15	1.440.000
	416_326		10	872.000
2-HO-E2	504_373	10	20	130.500
	504_325		10	133.500
4-HO-E2	504_373	10	15	161.400
	504_325		10	101.400
16- α -HO-E2	504_414	10	5	2.240.000
	504_324		5	216.300
	504_295		20	151.800
2-MeO-E2	446_315	10	10	610.000
	446_325		10	511.800
	446_416		20	176.900
4-MeO-E2	446_315	10	10	746.000
	446_325		10	752.400
	446_416		15	198.700
3-O-Me-2-HO-E2	446_315	10	10	157.200
	446_325		5	111.100
	446_416		15	169.500
3-O-Me-4-HO-E2	446_315	10	10	519.000
	446_325		5	236.200
	446_416		20	427.000

Fine-tuning der CE der Quanti- und Qualifier-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten

Im Anschluss des Screenings wurde ein *Fine-tuning* der CE durchgeführt, bei dem engere Bereiche mit kleineren Abstufungen getestet wurden. Dabei war zu überprüfen, ob eine geringfügig kleinere beziehungsweise größere Energie, als die im Screening ermittelte optimale CE, eine höhere Intensität des *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs bewirkt und folglich eine Verschiebung der optimalen CE hervorruft. In Hinblick der entwickelten MRM-Methode wurde die CE mit dem maximalen Response des jeweiligen *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs ermittelt und anschließend im Q3 für den *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergang verwendet.

Um Empfindlichkeitsverluste zu reduzieren, war es notwendig, die *scan-time* innerhalb eines *time-segments* möglichst klein zu halten (Kap. 5.1.4). Dazu wurde für E1- beziehungsweise E2-Metabolite, welche die gleichen MRM-Übergänge besitzen, ebenfalls dieselbe CE verwendet, sofern keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den absoluten PF zu beobachten waren.

Wenn für einen Metaboliten infolge aufgenommener Produktionenspektren (Kap. 5.1.2) neben einem *Quantifier*-Übergang mehrere *Qualifier*-Übergänge resultierten (E1, 16- α -HO-E2, 2-/4-MeO-E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2), wurden zunächst die nach Castagnetta et al. (1992) sowie von Hernando et al. (2004) beschriebenen Übergänge auf deren Anwendbarkeit getestet. Dabei fungierte der intensivere Übergang als *Quantifier*, während der weniger intensive Übergang als *Qualifier* herangezogen wurde. Im Anschluss daran wurde die CE des maximalen Response für den zweiten *Qualifier*-Übergang ermittelt. Dabei wurde dieser im Rahmen der MRM-Methode als *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Ersatz nur berücksichtigt, wenn dessen absolute PF signifikant größer waren, als die des bereits festgelegten *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs.

Exemplarisch wird im Folgenden die Auswertung des *Fine-tunings* von E2 dargestellt.

Fine-tuning der CE für die spezifischen Massenübergänge von E2

In Anbetracht des Screenings wurde für den *Quantifier* von E2 (416_285) der Bereich der CE um 15 eV getestet, während für den *Qualifier* (416_326) engere Abstufungen um 10 eV herangezogen wurden.

Von 10 eV bis 20 eV variierten für den *Quantifier* die mittleren PF von 824.000 ± 57.100 Counts bis 979.000 ± 75.600 Counts (Abb. 11), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Der maximale Response resultierte bei 13 eV, so dass diese *CE* für den *Quantifier*-Übergang von E2 verwendet wurde (Abb. 11).

Für den *Qualifier* schwankten die mittleren PF in einem Bereich zwischen 6 eV und 11 eV von 473.000 ± 45.300 Counts bis 576.000 ± 28.400 Counts (Abb. 11). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der PF war ebenfalls nicht zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Lediglich die Verringerung von 7 eV auf 5 eV beziehungsweise deren Erhöhung in einen Bereich zwischen 12 eV und 15 eV (Abb. 11) war mit einer signifikanten Abnahme der mittleren PF auf 443.000 ± 41.700 Counts beziehungsweise 318.000 ± 30.700 Counts bis 440.000 ± 23.500 Counts verbunden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Das Maximum des *Qualifiers* war demnach bei 7 eV vorhanden. Um maximale PF des *Qualifier*-Übergangs von E2 zu generieren, wurde daher eine *CE* von 7 eV verwendet.

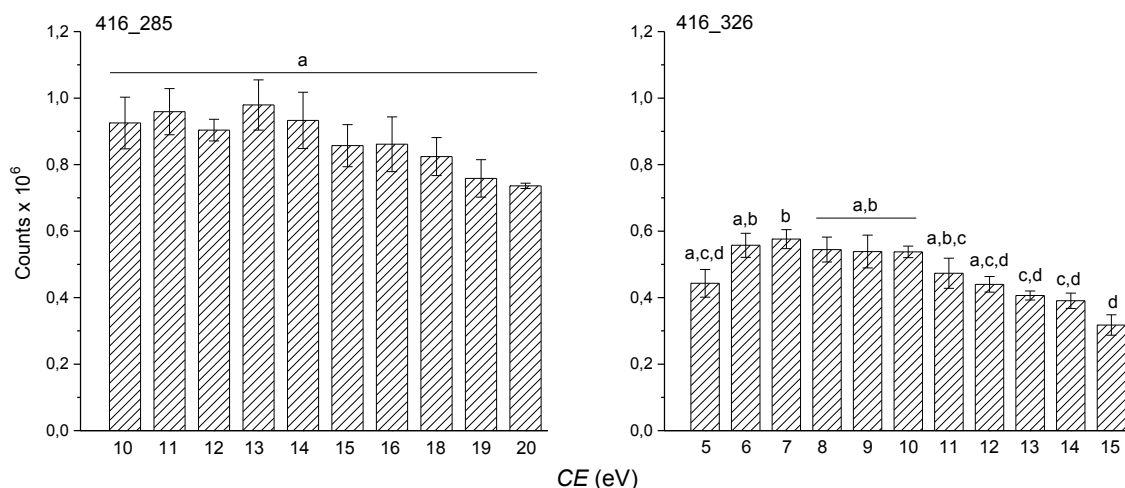


Abb. 11: Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E2 bezüglich der *CE*. Analyse mittels *GC/MS/MS* (jeweils Zweifachinjektion), im *MRM*-Modus (dwell-time: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (416_285) beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs (416_326) bei einer unterschiedlichen *CE*; $m_{E2/Säule} = 2,5$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 46.

In analoger Weise wurden alle E1- und E2-Metabolite dem *Fine-tuning* der *CE* unterzogen (Anhang, Abb. 88 - Abb. 92 sowie Tab. 46 - Tab. 54). Tab. 26 gibt einen Überblick über die im Rahmen der Methodenentwicklung etablierten *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten sowie den festgelegten *CE* zur Gewährleistung einer maximalen Signalintensität.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tab. 26: Übersicht über die im *Fine-tuning* ermittelten optimalen *CE* der getesteten Massenübergänge von E1 und E2-Metaboliten. Die obere Zeile repräsentiert den *Quantifier*, während die untere Zeile die *Qualifier*-Übergänge zeigt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (PF ± STABW) aus drei unabhängigen Bestimmungen der absoluten PF des *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Anhang: Tab. 46 - Tab. 54.

Analyt	Über- gang (m/z)	Menge (pg/Säule)	<i>CE</i> (eV)	max. Response PF ± STABW
E1	342_257	2	10	1.110.000 ± 141.000
	342_244		14	788.000 ± 17.100
2-HO-E1	430_345	10	16	308.000 ± 26.700
	430_306		22	151.000 ± 30.400
4-HO-E1	430_345	10	16	452.000 ± 39.200
	430_306		22	133.000 ± 13.900
16-α-HO-E1	430_286	5	8	406.400 ± 87.500
2-MeO-E1	372_342	2	12	732.000 ± 32.400
	372_357		7,5	262.000 ± 33.900
4-MeO-E1	372_342	2	12	517.000 ± 71.700
	372_357		7,5	225.000 ± 30.700
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	2	12	319.000 ± 33.500
	372_357		7,5	114.000 ± 3.560
E2	416_285	2,5	13	979.000 ± 75.600
	416_326		7	576.000 ± 28.400
2-HO-E2	504_373	10	18	465.000 ± 58.500
	504_325		15	317.000 ± 15.500
4-HO-E2	504_373	10	18	388.000 ± 57.400
	504_325		15	345.000 ± 6.890
16-α-HO-E2	504_414	10	7,5	275.000 ± 30.100
	504_324		9	231.000 ± 16.800
2-MeO-E2	446_315	2,5	14	278.000 ± 38.100
	446_325		14	221.000 ± 23.600
4-MeO-E2	446_315	2,5	14	614.000 ± 78.100
	446_325		14	584.000 ± 18.100
3-O-Me-2-HO-E2	446_315	10	12	240.000 ± 17.400
	446_325		18	134.000 ± 19.200
3-O-Me-4-HO-E2	446_315	10	12	482.000 ± 57.200
	446_325		18	549.000 ± 36.400

Für die Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe fanden die jeweils deuterierten Analoga als ISTD Anwendung (Kap. 5.4). Infolge des vergleichbaren Response zwischen den deuterierten und den undeuterierten Standards wurde die *CE* des maximalen Response ebenfalls für die deuterierten Analoga verwendet.

5.1.4 Optimierung der *dwell-time* der *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten

Neben der *CE* besitzt ebenfalls die *dwell-time* erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit einer *MRM*-Methode. Je länger diese gewählt wird, desto länger fixiert die Linse im Q2 das gewählte *Precursor*-Ion und desto reproduzierbarer erfolgt dessen Fragmentierung. Allerdings führt eine längere *dwell-time* zu einer Verringerung der Empfindlichkeit, da weniger Scans pro Sekunde ablaufen.

Die entwickelte *MRM*-Methode sollte auf alle *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge der hydroxylierten und methylierten E1- und E2-Metabolite sowie deren deuterierte Analoga angewendet werden. Da diesbezüglich eine Vielzahl von Übergängen in demselben *time-segment* einer Methode vereint werden, war ebenfalls darauf zu achten, dass die *dwell-time* nicht zu lang gewählt wird, damit für jeden Peak die Mindestanzahl an 6 Peak-Datenpunkten erhalten werden kann (Kromidas und Kuss, 2008; Hübschmann, 2009). Demnach wurde im Folgenden der Einfluss einer unterschiedlich langen *dwell-time* auf die Anzahl an Peak-Datenpunkten und dem maximalen Response von E1- und E2-Metaboliten untersucht.

Dazu wurden E1, E2 und die hydroxylierten beziehungsweise methylierten Metabolite in einer Absolutmenge von 1 pg bis 10 pg mittels *GC/MS/MS* im *MRM-Modus* analysiert (Kap 4.2.5), wobei die in Kap. 5.1.3 festgelegten *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten sowie deren optimierten *CE* herangezogen wurden. Alle Vorversuche wurden bei einer *dwell-time* von 0,25 sec. durchgeführt, so dass vergleichend dazu der Einfluss einer kürzeren *dwell-time* (0,05 sec. / 0,08 sec. / 0,10 sec. / 0,15 sec. und 0,20 sec.) sowie einer längeren *dwell-time* (0,30 sec. und 0,40 sec.) getestet wurde.

Um die *scan-time* innerhalb eines *time-segments* nicht unnötig zu erhöhen, und um einen Kompromiss bezüglich der Anzahl an Peak-Datenpunkten, des maximalen Response sowie der Länge der *dwell-time* zu finden, wurde für alle *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergänge gleichermaßen, sofern keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den absoluten PF zu beobachten waren, die kürzeste *dwell-time* festgelegt, bei der alle Übergänge die Mindestanzahl an 6-Peak-Datenpunkten aufzeigten. Sofern ein *Quantifier*- oder *Qualifier*-Übergang nicht die Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten (Kap. 5.3.1) aufzeigte, wurde die entsprechende *dwell-time* bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Exemplarisch wird im Folgenden die Optimierung der *dwell-time* für E2-Metabolite dargestellt.

17 β -Estradiol

Für den *Quantifier* von E2 variierten die mittleren PF bei einer *dwell-time* zwischen 0,10 sec. und 0,40 sec. von 186.100 ± 36.000 Counts bis 242.300 ± 26.400 Counts (Abb. 12). Dabei

waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

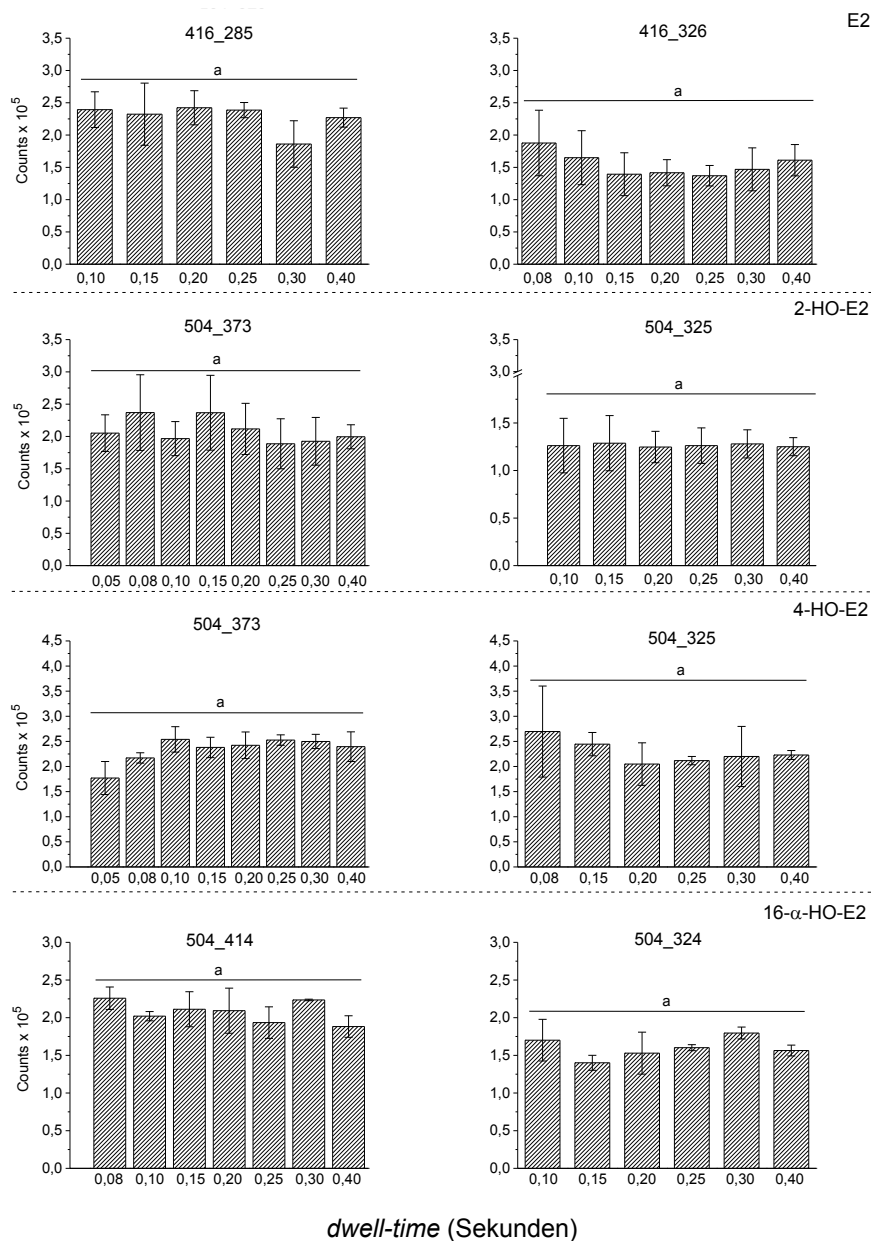


Abb. 12: Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E2 und E2-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachmessung) im MRM-Modus. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (416_285, 504_373 und 504_414) und *Qualifier*-Übergangs (416_326, 504_325 und 504_324) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E2; 10 pg für 2-/4-HO-E2 und 16- α -HO-E2. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 55 - Tab. 58.

Auch für den *Qualifier*-Übergang von E2 waren bei einer *dwell-time* zwischen 0,10 sec. und 0,40 sec. keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren PF zu be-

obachten. Letztere schwankten diesbezüglich in einem Bereich von 137.000 ± 15.800 Counts bis 165.000 ± 41.800 Counts (Abb. 12).

E2-Hydroxylierungsprodukte

Während für den *Quantifier*-Übergang von 2-HO-E2 die mittleren PF bei einer *dwell-time* von 0,05 sec. bis 0,40 sec. in einem Bereich von 188.700 ± 38.700 Counts bis 237.000 ± 58.600 Counts (Abb. 12) variierten, schwankten die mittleren PF des *Qualifier*-Übergangs bei einer *dwell-time* zwischen 0,10 sec. und 0,40 sec. von 124.700 ± 16.500 Counts bis 128.800 ± 29.000 Counts (Abb. 12). Es wurden weder für den *Quantifier* noch für den *Qualifier* statistisch signifikante Unterschiede beobachtet (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Für den *Quantifier*-Übergang von 4-HO-E2 waren ebenfalls über den gesamten getesteten Bereich der *dwell-time* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren PF zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Diese schwankten zwischen 177.100 ± 32.900 Counts und 253.980 ± 25.360 Counts (Abb. 12). Die mittleren PF des *Qualifier*-Übergang zeigten ebenfalls bei einer *dwell-time* von 0,08 sec. und zwischen 0,15 sec. und 0,40 sec. keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), wobei diese in einem Bereich von 204.800 ± 42.300 Counts bis 269.600 ± 90.600 Counts schwankten (Abb. 12).

Die mittleren PF des *Qualifier*-Übergangs von 16- α -HO-E2 variierten bei einer *dwell-time* von 0,08 sec. bis 0,40 sec. von 188.200 ± 14.300 Counts bis 225.800 ± 14.900 Counts (Abb. 12). Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Dieser Trend setzte sich ebenfalls für den *Qualifier* fort. Hier führte die Verwendung einer *dwell-time* zwischen 0,10 sec. bis 0,40 sec. zu mittleren PF von 140.100 ± 9.900 Counts bis 179.600 ± 7.900 Counts (Abb. 12), wobei keine signifikanten Unterschiede resultierten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Im Rahmen der einheitlichen *dwell-time*-Etablierung für alle E2-Metabolite wurde für den *Qualifier*-Übergang eine *dwell-time* von 0,05 sec. nicht berücksichtigt, da für E2 und E2-Hydroxylierungsprodukte diesbezüglich nur 5 Peak-Datenpunkte resultierten (Abb. 13). Dieser Aspekt war ebenfalls auf den *Quantifier*-Übergang von E2 und 16- α -HO-E2 zu übertragen, da auch hierbei nicht die notwendige Anzahl von 6 Peak-Datenpunkten beobachtet wurde (Abb. 13). Auch bei einer *dwell-time* von 0,08 sec. war für den *Quantifier* von E2 nicht die Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten vorhanden (Abb. 13), so dass auch diese *dwell-time* keine Anwendung fand. Gleichmaßen resultierten für den *Qualifier*-Übergang von 2-HO-E2 und 16- α -HO-E2 bei 0,08 sec. beziehungsweise 4-HO-E2 bei 0,1 sec. (Abb. 13) lediglich 5-Peak-Datenpunkte. Folglich wurden auch diese *dwell-times* bezüglich der einheitlichen *dwell-time*-Etablierung für den *Qualifier*-Übergang nicht berücksichtigt.

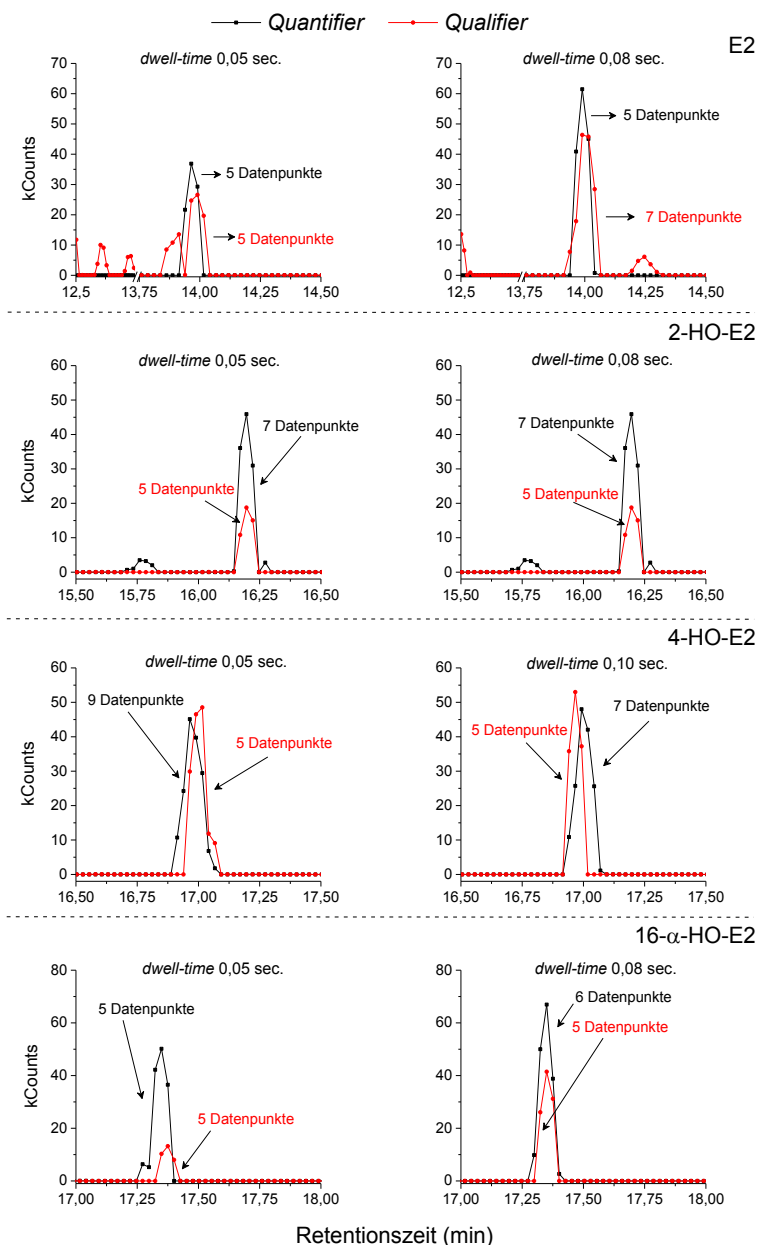


Abb. 13: Exemplarische Chromatogramme zur Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E2 und E2-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*- (schwarz) und *Qualifier*-Massenspuren (rot) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E2; 10 pg für 2-/4-HO-E2 und $16\text{-}\alpha\text{-HO-E2}$. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E2-Methylierungsprodukte

Für den *Quantifier* von 2-MeO-E2 variierten die mittleren PF bei einer *dwell-time* von 0,08 sec. bis 0,40 sec. zwischen $209.700 \pm 13.000 \text{ Counts}$ und $254.900 \pm 24.600 \text{ Counts}$ (Abb. 14) wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Für den *Qualifier*-Übergang waren über den gesamten getesteten Bereich der *dwell-time* keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test,

$p < 0,05$). Die mittleren PF schwankten von 140.600 ± 15.400 Counts bis 163.400 ± 19.800 Counts (Abb. 14).

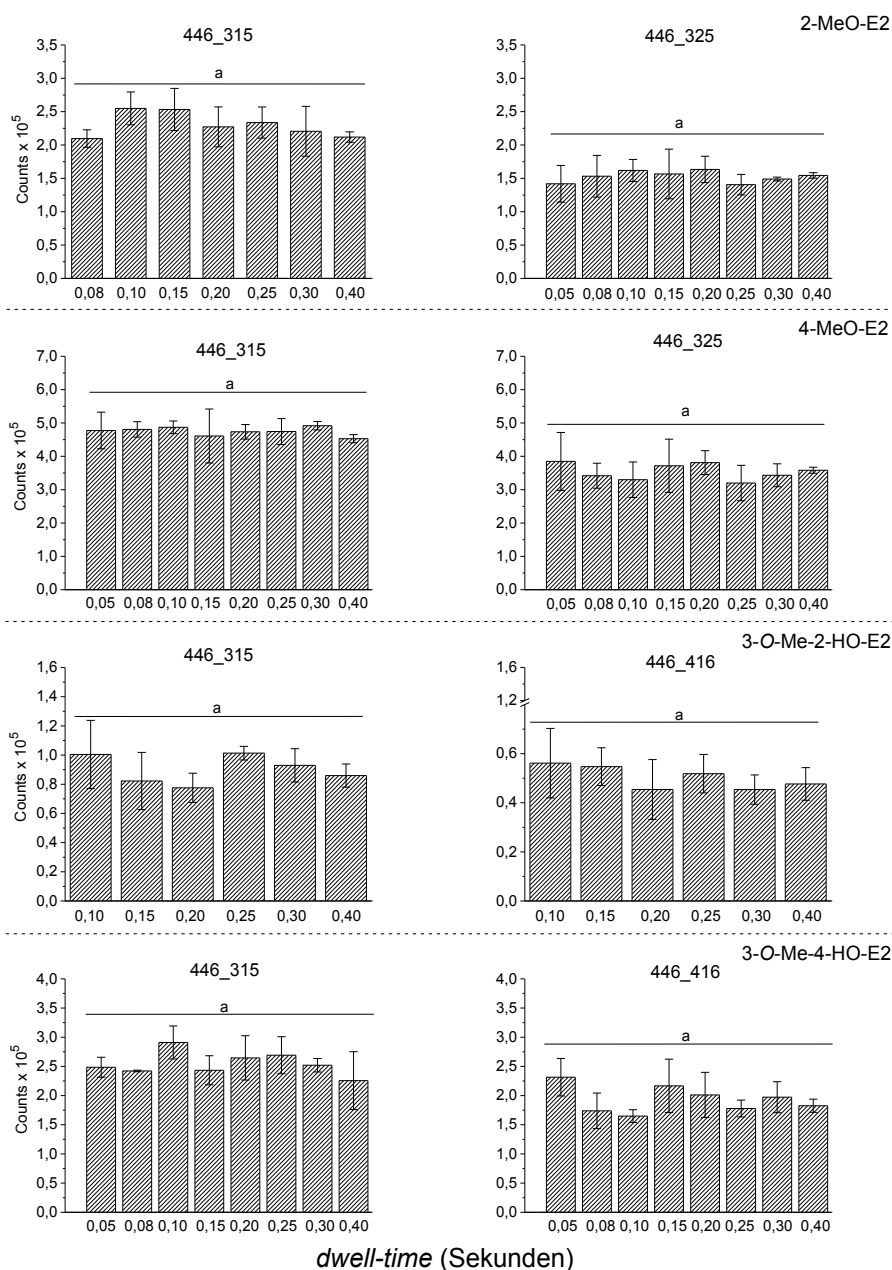


Abb. 14: Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E2-Methylierungsprodukten bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachmessung) im MRM-Modus. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (446_315) und *Qualifier*-Übergangs (446_325 und 446_416) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2,5$ pg für 2-/4-MeO-E2; 10 pg für 3-O-Me-2-/4-HO-E2. Injektionsvolumen: 1 μ l. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 59 - Tab. 62.

Sowohl für den *Quantifier*- als auch den *Qualifier*-Übergang von 4-MeO-E2 waren bei allen getesteten *dwell-times* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren PF

zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Letztere schwankten diesbezüglich zwischen 452.900 ± 12.160 Counts und 491.800 ± 12.700 Counts beziehungsweise 319.900 ± 53.100 Counts bis 384.800 ± 86.800 Counts (Abb. 14).

Für den *Quali*- und *Quantifier*-Übergang von 3-O-Me-2-HO-E2 resultierten bei einer *dwell-time* von 0,10 sec. bis 0,40 sec. mittlere PF von 77.600 ± 10.000 Counts bis 101.300 ± 4.700 Counts beziehungsweise 45.400 ± 6.000 Counts bis 56.100 ± 14.100 Counts (Abb. 14). Dabei waren ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Auch für den *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergang von 3-O-Me-4-HO-E2 resultierten bei allen getesteten *dwell-times* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren PF (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Diese schwankten für den *Quantifier* zwischen 225.600 ± 49.500 Counts und 291.000 ± 28.300 Counts (Abb. 14) und für den *Qualifier* in einem Bereich von 164.800 ± 11.000 Counts bis 231.500 ± 32.200 Counts (Abb. 14).

Für den *Quantifier*-Übergang von 2-MeO-E2 resultierten bei der Verwendung einer *dwell-time* von 0,05 sec. lediglich 5 Peak-Datenpunkte (Abb. 15).

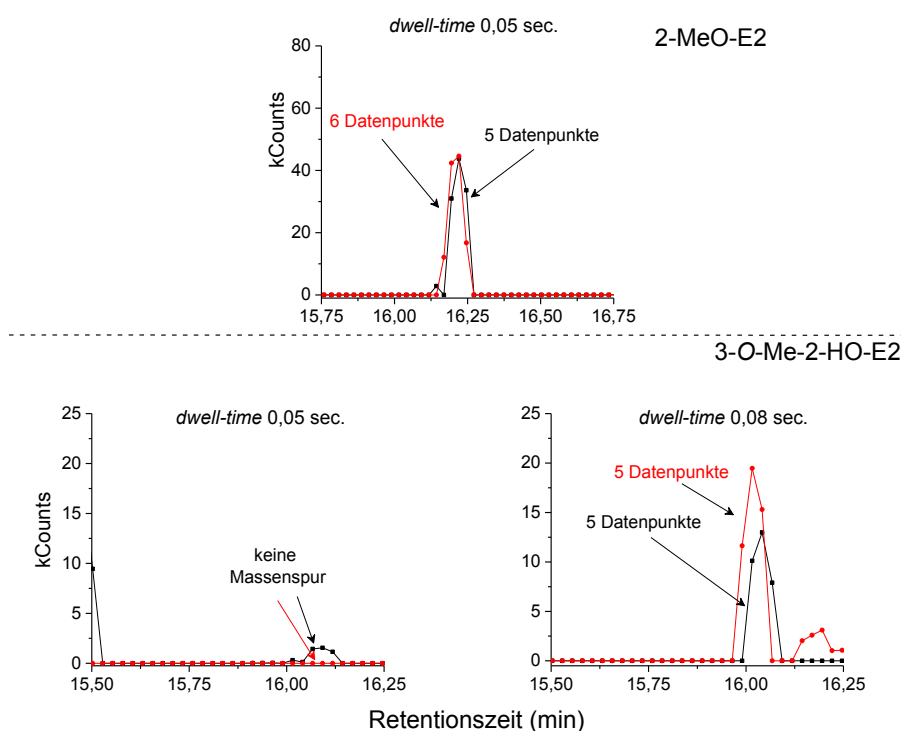


Abb. 15: Exemplarische Chromatogramme zur Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von 2-MeO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E2 bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*- (schwarz) und *Qualifier*-Massenspuren (rot) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2,5$ pg für 2-MeO-E2; 10 pg für 3-O-Me-2-HO-E2. Injektionsvolumen: 1 μ l. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Dieser Aspekt war ebenfalls auf den *Quanti*- sowie den *Qualifier* von 3-O-Me-2-HO-E2 bei einer *dwell-time* von 0,08 sec. zu übertragen (Abb. 15), so dass diesbezüglich für beide Metabolite nicht die ausreichende Mindestanzahl von 6 Peak-Datenpunkten vorhanden war. Weiterhin wurde für 3-O-Me-2-HO-E2 bei einer *dwell-time* von 0,05 sec. weder eine *Quantifier*- noch eine *Qualifier*-Massenspür beobachtet (Abb. 15). Je kürzer die *dwell-time* gewählt wird, desto besser ist zwar die Zeitauflösung bei der pro Messzyklus auf einer Masse gemessen wird, allerdings ist das MS bei einer zu kurzen *dwell-time* ständig am Umschalten zwischen den einzelnen Massen, wodurch die Präzision abnimmt (Kromidas und Kuss, 2008; Hübschmann, 2009). Folglich sinkt die Anzahl an Datenpunkten beziehungsweise es kommt kein Peak zustande (Abb. 15), so dass ferner am Beispiel der E2-Methylierungsprodukte verdeutlicht wurde, dass sowohl eine *dwell-time* von 0,05 sec. als auch von 0,08 sec. im Rahmen der einheitlichen *dwell-time*-Etablierung von E2 und dessen Metaboliten keine Berücksichtigung finden konnte.

Auch wenn der maximale Response von E2-Metaboliten lediglich für den *Qualifier*-Übergang von 2-HO-E2 bei einer *dwell-time* von 0,15 sec. zu verfolgen war, wurde sowohl für den *Quantifier* als auch den *Qualifier* von E2 sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten gleichermaßen eine *dwell-time* von 0,15 sec. festgelegt, da diese die kürzeste *dwell-time* darstellt, bei der für beide *MRM*-Übergänge die notwendige Mindestanzahl von 6 Peak-Datenpunkten zu beobachten war. Die Verwendung einer kürzeren *dwell-time* als 0,15 sec. führte durch die Abnahme von Peak-Datenpunkten zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit, während eine längere *dwell-time* eine unnötige *scan-time* Erhöhung innerhalb eines *time-segments* zur Folge hätte. Da ferner über den gesamten betrachteten Bereich der *dwell-time* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren PF des *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergangs resultierten, musste nicht ausschließlich die *dwell-time* des maximalen Response im Rahmen der *MRM*-Methode festgelegt werden, da signifikante Empfindlichkeitsverluste daher auch bei der Verwendung einer *dwell-time* von 0,15 sec. auszuschließen waren. Zugunsten der *scan-time*-Reduzierung wurde daher eine *dwell-time* von 0,15 sec. für alle E2-Metabolite etabliert.

Analog den E2-Metaboliten wurden E1 und die entsprechenden hydroxylierten und methylierten Metabolite der Optimierung der *dwell-time* unterzogen (Anhang, Abb. 93 - Abb. 95; Tab. 63 - Tab. 68), wobei ebenfalls zugunsten der *dwell-time*-Reduzierung für alle E1-Metabolite eine *dwell-time* von 0,1 sec. verwendet werden konnte.

dwell-time- und Retentionszeiten-gebundene Etablierung von Messmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden neben E1- und E2-Metaboliten ebenfalls deren hydroxylierte und methylierte Metabolite im Brustgewebe quantifiziert (Kap. 5.6.1). Infolge deren unter-

schiedlicher Retentionszeiten (t_R ; Kap. 5.1.5) unterteilten sich die angewandten *MRM*-Methoden jeweils in 2 unterschiedliche *time-segments*:

- Segment I: delay: 11,0 - 13,9 min
E1, E1-d₄, E2, E2-d₃

- Segment II: delay: 13,9 - 20,22 min
2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2-d₄, 2-/4-HO-E2, 2-/4-HO-E2-d₃
2-/4-MeO-E1, 2-/4-MeO-E1-d₄, 2-/4-MeO-E2, 2-/4-MeO-E2-d₃
16- α -HO-E1, 16- α -HO-E1-d₄, 16- α -HO-E2, 16- α -HO-E2-d₃

Unter Berücksichtigung der festgelegten *dwell-time* von 0,15 sec. für alle *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten war es aufgrund einer zu hohen *scan-time* nicht möglich, alle Übergänge in einer *MRM*-Methode zu vereinen. Daher wurden 2 verschiedene Formen einer *MRM*-Methode etabliert.

Während die Methode *I_E1_E2_Metabolite_deuteriert_undeuteriert.mth* nur die *Quantifier*-Übergänge von deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metaboliten berücksichtigte, beinhalteten die weiteren *MRM*-Methoden neben den *Quantifier*-Übergängen auch alle *Qualifier*-Übergänge von E1 und E2-Metaboliten. Dabei wurden die deuterierten beziehungsweise undeuterierten Massenübergänge der E1-/E2-Methylierungsprodukte (*II_me-CE_deuteriert_undeuteriert.mth*), der E1-/E2-Hydroxylierungsprodukte (*III_CE_deuteriert_undeuteriert.mth*) sowie von 16- α -HO-E2 (E3) und 16- α -HO-E1 (*IV_E3_16alpha-HOE1_deuteriert_undeuteriert.mth*) auf 3 separate Messmethoden aufgeteilt (Kap. 4.2.23.2).

Entsprechend den Optimierungen der *dwell-time* wurde für alle *Quanti*- beziehungsweise *Qualifier*-Übergänge im *Segment II* der Methoden I bis IV eine *dwell-time* von 0,15 sec. festgelegt. Da sich im *Segment I* der Methode I lediglich die *Quantifier*-Übergänge von deuteriertem beziehungsweise undeuteriertem E1 und E2 befinden, wurde die *dwell-time* zur Gewährleistung einer höheren Reproduzierbarkeit auf 0,25 sec. verlängert (Kap. 4.2.23.2).

In den *MRM*-Methoden II bis IV wurden im *Segment I* neben den *Quantifier*-Übergängen auch die *Qualifier*-Übergänge von deuteriertem und undeuteriertem E1 beziehungsweise E2 vereint. Im Rahmen der *dwell-time* Optimierung resultierten für den *Quantifier*-Übergang von E1 sowohl bei einer *dwell-time* von 0,25 sec. als auch bei 0,15 sec. stets 7 Peak-Datenpunkte. Auch für den *Qualifier*-Übergang wurden bei einer *dwell-time* von 0,15 sec. konstant 7 Peak-Datenpunkte beobachtet (Anhang, Tab. 63), so dass zugunsten der *scan-time* Reduzierung für beide *MRM*-Übergänge von E1 die *dwell-time* auf 0,15 sec. verkürzt wurde (Kap. 4.2.23.2). Für den *Quantifier*-Übergang von E2 resultierten bei einer *dwell-time* von 0,25 sec. maximal 8 Peak-Datenpunkte. Bei der Verkürzung der *dwell-time* auf 0,15 sec. waren sowohl für den *Quantifier*- als auch den *Qualifier*-Übergang maximal 7 Peak-Datenpunkte zu verzeichnen

(Anhang, Tab. 55). Demnach wurde in den Methoden II bis IV zugunsten einer höheren Reproduzierbarkeit für beide *MRM*-Übergänge von E2 eine *dwell-time* von 0,25 sec. festgelegt (Kap. 4.2.23.2).

5.1.5 Referenzspezifische Kenndaten von E1- und E2-Metaboliten

Für die eindeutige Identifizierung von E1- und E2-Metaboliten spielen neben charakteristischen *MRM*-Übergängen (Kap. 5.1.2) ebenfalls referenzspezifische Kenndaten eine wichtige Rolle. Dazu gehören t_R , Response und das *Quantifier/Qualifier*-Bildungsverhältnis. Bei deren Bestimmung wurden die in Kap. 5.1.2 festgelegten *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten sowie deren optimierte *CE* verwendet (Kap. 5.1.3).

Retentionszeiten

Um E1, E2 und die entsprechenden Metabolite im Brustgewebe eindeutig zu identifizieren, wurden diese anhand ihrer absoluten beziehungsweise relativen t_R den spezifischen *MRM*-Übergängen zugeordnet. Demnach war es notwendig, die einzelnen t_R von deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metaboliten zu ermitteln. Diese wurden mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus bestimmt, wobei die relative t_R aus dem Quotienten der mittleren t_R des jeweiligen Metaboliten zum ISTD E2-d₃ gebildet wurde (Tab. 27).

Tab. 27: t_R von deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metaboliten. Angegeben sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Anhang, Tab 69.

Analyt	absolute t_R (min) MW \pm STABW	relative t_R
E1	13,153 \pm 0,002	0,973
E1-d ₄	13,109 \pm 0,002	0,969
2-HO-E1	15,222 \pm 0,005	1,126
2-HO-E1-d ₄	15,177 \pm 0,001	1,122
4-HO-E1	16,006 \pm 0,007	1,183
4-HO-E1-d ₄	15,961 \pm 0,001	1,180
16- α -HO-E1	15,624 \pm 0,004	1,155
16- α -HO-E1-d ₄	15,177 \pm 0,001	1,122
2-MeO-E1	15,159 \pm 0,011	1,121
2-MeO-E1-d ₄	15,100 \pm 0,002	1,116
4-MeO-E1	14,568 \pm 0,010	1,077
4-MeO-E1-d ₄	14,508 \pm 0,001	1,073
3-O-Me-2-HO-E1	15,036 \pm 0,012	1,112
3-O-Me-2-HO-E1-d ₄	14,977 \pm 0,001	1,107
E2	13,550 \pm 0,002	1,001
E2-d ₃	13,525 \pm 0,002	1,000
2-HO-E2	15,644 \pm 0,005	1,157
2-HO-E2-d ₃	15,622 \pm 0,002	1,155

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Analyt	absolute RT (min) MW \pm STABW	relative Retention
4-HO-E2	16,399 \pm 0,001	1,213
4-HO-E2-d ₃	16,373 \pm 0,001	1,211
16- α -HO-E2	16,765 \pm 0,011	1,140
16- α -HO-E2-d ₃	16,739 \pm 0,001	1,238
2-MeO-E2	15,663 \pm 0,003	1,158
2-MeO-E2-d ₃	15,640 \pm 0,001	1,156
4-MeO-E2	14,988 \pm 0,001	1,108
4-MeO-E2-d ₃	14,959 \pm 0,001	1,106
3-O-Me-2-HO-E2	15,510 \pm 0,006	1,147
3-O-Me-2-HO-E2-d ₃	15,485 \pm 0,001	1,159
3-O-Me-4-HO-E2	15,825 \pm 0,011	1,170
3-O-Me-4-HO-E2-d ₃	15,791 \pm 0,002	1,168

Response

Aufgrund der strukturellen Unterschiede von E1, E2 und deren Metabolite weisen diese unter anderem neben einem unterschiedlichen Fragmentierungsmuster ebenfalls einen unterschiedlich starken Response auf. Abhängig vom Ansprechverhalten des Detektors auf den jeweiligen Analyten ist es möglich, dass gleiche Analytmengen unterschiedliche absolute PF ergeben.

Für die Quantifizierung von E1 und E2 sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten im Brustgewebe wurde ein Standardgemisch aus den jeweils deuterierten Analoga hergestellt (Kap. 5.4.1). Dabei sollten die Mengen von Analyt und ISTD in einem vergleichbaren Bereich liegen, damit deren Response bei der Analyse mittels *GC/MS/MS* vergleichbar ist. Des Weiteren war zu beachten, dass sich eventuelle Konzentrationsänderungen eines Analyten, insbesondere durch Verluste im Rahmen der SPE oder durch Enzymbindung während der Konjugatspaltung (Kap. 5.3.5), ebenfalls auf den ISTD auswirken. Die zudotierten Mengen des ISTD sollten daher annähernd der Menge des Analyten entsprechen. Für die Herstellung des Standardgemisches war es daher notwendig den Response von E1- und E2-Metaboliten sowie deren WFR (Kap. 5.3.5) zu bestimmen, wobei diese Ergebnisse aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metaboliten auf den jeweiligen deuterierten ISTD übertragen wurden.

Zur Bestimmung des jeweiligen Response wurde die gleiche Menge an Analyt mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.9) und die resultierenden PF miteinander verglichen. Abb. 16 gibt die absoluten PF von E1- und E2-Metaboliten bei einer Analytmenge von jeweils 5 pg auf der Säule wieder.

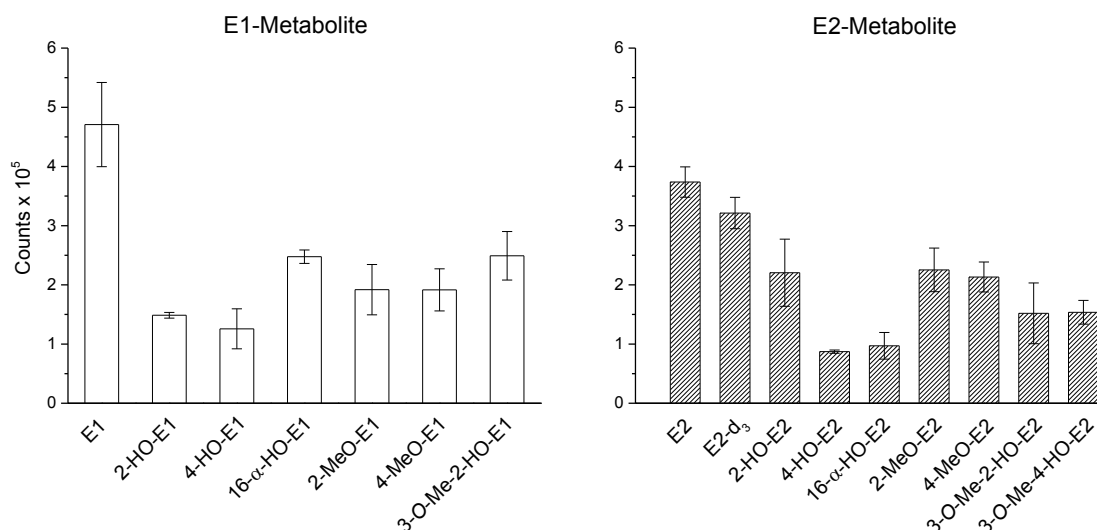


Abb. 16: Absolute PF von E1- und E2-Metaboliten bei einer Analytmenge von jeweils 5 pg/Säule. Analyse mittels GC/MS/MS, im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 70.

Für die Bestimmung des substanzspezifischen Responsefaktors (RF) wurde die PF von E2-d₃ als Bezugspunkt herangezogen und das PFV von E1- und E2-Metaboliten zum ISTD gebildet (Tab. 28).

Tab. 28: Absolute PF von 5 pg E1, E2 und der hydroxylierten und methylierten Metabolite sowie deren substanzspezifischer RF, welcher sich aus dem Quotienten der PF des Analyten zur PF von E2-d₃ berechnete. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Anhang, Tab. 70.

Analyt	absolute PF (Counts) MW ± STABW	PFV (Analyt/ E2-d ₃)	Analyt	absolute PF (Counts) MW ± STABW	PFV (Analyt /E2-d ₃)
E1	470.800 ± 71.100	1,5	E2	373.700 ± 25.700	1,2
2-MeO-E1	191.600 ± 35.500	0,6	E2-d ₃	321.300 ± 26.600	1,0
4-MeO-E1	191.800 ± 42.500	0,6	2-MeO-E2	225.300 ± 36.900	0,7
3-O-Me-2-HO-E1	249.100 ± 41.000	0,8	4-MeO-E2	213.290 ± 25.300	0,7
2-HO-E1	148.600 ± 4.900	0,5	3-MeO-2-HO-E2	151.982 ± 51.300	0,5
4-HO-E1	125.700 ± 33.800	0,4	3-MeO-4-HO-E2	153.600 ± 20.000	0,5
16-α-HO-E1	247.600 ± 11.300	0,8	2-HO-E2	220.600 ± 56.700	0,7
			4-HO-E2	87.150 ± 2.800	0,3
			16-α-HO-E2	97.000 ± 22.500	0,3

Aufgrund der ähnlichen Struktur von E2 und E2-d₃ wurde erwartet, dass gleiche Einspritzmengen näherungsweise die gleichen absoluten PF ergeben. Die mittlere PF von E2 war im

Vergleich zur PF von E2-d₃ nur geringfügig größer. Der Response von E2 und der deuterierten Analoga war daher vergleichbar, so dass ein RF von 1,2 resultierte (Abb. 16, Tab. 28).

Für 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 resultierten ebenfalls aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit vergleichbare absolute PF und ein vergleichbarer Response. Mit einem RF von 0,7 wurden beide Methylierungsprodukte geringfügig schwächer detektiert als E2-d₃ (Abb. 16, Tab. 28). Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 erwartet. Trotz struktureller Ähnlichkeit zu 2-MeO-E2 beziehungsweise 4-MeO-E2 wurden für diese kleinere PF beobachtet, so dass ebenfalls kleinere PFV zu E2-d₃ resultierten. Mit einem RF von 0,5 für 3-O-Me-2-HO-E2 beziehungsweise 3-O-Me-4-HO-E2 sind diese zwar etwas schwächer detektiert worden als 2-/4-MeO-E2, dennoch liegt deren Response noch in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 16, Tab. 28).

Da 2-HO-E2 und 4-HO-E2 ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen wurde erwartet, dass beide vergleichbare PF und einen ähnlichen RF besitzen. Die PF von 2-HO-E2 war jedoch 2,5-fach so hoch wie diejenige von 4-HO-E2. Mit einem RF von 0,7 war der Response von 2-HO-E2 vergleichbar mit dem Response von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2. 4-HO-E2 wurde gegenüber E2-d₃ in etwa genauso schlecht detektiert wie 16- α -HO-E2, da beide ähnliche absolute PF und einen RF von 0,3 aufzeigten (Abb. 16, Tab. 28).

Für E1 resultierte ein RF von 1,5, demnach war dessen Response bei gleicher Einspritzmenge durchschnittlich 21% höher als von E2 (Abb. 16, Tab. 28). Für 2-MeO-E1 beziehungsweise 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 resultierte ein RF von 0,6 beziehungsweise 0,8. Der Response der E1-Methylierungsprodukte war demnach aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit vergleichbar (Abb. 16, Tab. 28).

Für 2-HO-E1 und 4-HO-E1 wurden in etwa die gleichen PF beobachtet, so dass diese mit einem RF von 0,4 und 0,5 einen vergleichbaren Response infolge struktureller Ähnlichkeit aufzeigten (Abb. 16, Tab. 28). Für 16- α -HO-E1 wurde ein RF von 0,8 ermittelt. Demnach war dessen Response vergleichbar mit dem Response von E1-Methylierungsprodukten (Abb. 16, Tab. 28). Während das Ansprechverhalten des Detektors für 2-HO-E1 und 4-HO-E1 im Vergleich zu E2-d₃ mehr als doppelt so schlecht war, wurde 16- α -HO-E1 analog der E1-Methylierungsprodukte nur unwesentlich schwächer detektiert (Abb. 16, Tab. 28).

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von E1- und E2-Metaboliten wurde nicht für alle der oben genannten Verbindungen ein vergleichbarer Response beobachtet, so dass dieser Aspekt bei der Herstellung des deuterierten Standardgemisches zu berücksichtigen war (Kap. 5.4.1).

Quantifier/Qualifier-Verhältnis

Neben den charakteristischen *MRM*-Übergängen (Kap. 5.1.2) ist ebenfalls das *Quantifier/Qualifier*-Bildungsverhältnis substanzspezifisch, so dass dieses unterstützend bei der Identifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe herangezogen wurde (Kap. 5.5.1).

Zur Ermittlung der substanzspezifischen Flächenverhältnisse wurde eine Analytmenge von 2 pg bis 10 pg mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.10), wobei das charakteristische *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis anschließend über den Quotienten der absoluten PF des jeweiligen *Quantifier*- und *Qualifier*s bestimmt wurde (Tab. 29). Da für 16- α -HO-E1 im Rahmen der Methodenentwicklung kein *Qualifier*-Übergang generiert wurde (Kap. 5.1.3), war es für diesen Metaboliten nicht möglich, ein *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis festzulegen.

Tab. 29: *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis von E1- und E2-Metaboliten. Die obere Zeile der *MRM*-Übergänge repräsentiert den jeweiligen *Quantifier* und die untere Zeile den *Qualifier*. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Anhang, Tab. 71.

Analyt	Massen- übergang	Menge (pg/Säule)	<i>Quantifier/Qualifier</i> -Verhältnis (Spannweite)
E1	342_257	2	2,67 - 3,37
	342_244		
2-HO-E1	430_345	10	1,38 - 2,67
	430_306		
4-HO-E1	430_345	10	2,58 - 4,26
	430_306		
2-MeO-E1	372_342	2	1,86 - 5,10
	372_357		
4-MeO-E1	372_342	2	1,97 - 2,86
	372_357		
3-O-Me-2-HO-E1	372_342	2	2,28 - 3,72
	372_357		
E2	416_285	2,5	1,24 - 2,18
	416_326		
2-HO-E2	504_373	10	0,94 - 2,05
	504_325		
4-HO-E2	504_373	10	0,91 - 1,49
	504_325		
16- α -HO-E2	504_414	10	0,96 - 1,47
	504_324		
2-MeO-E2	446_315	2,5	0,86 - 1,62
	446_325		
4-MeO-E2	446_315	2,5	0,93 - 1,16
	446_325		
3-O-Me-2-HO-E2	446_315	10	1,10 - 2,34
	446_416		
3-O-Me-4-HO-E2	446_315	10	1,06 - 1,48
	446_416		

Abb. 17 gibt die mittleren PFV des *Quantifier*/*Qualifier*-Verhältnisses von E1- und E2-Metaboliten wieder.

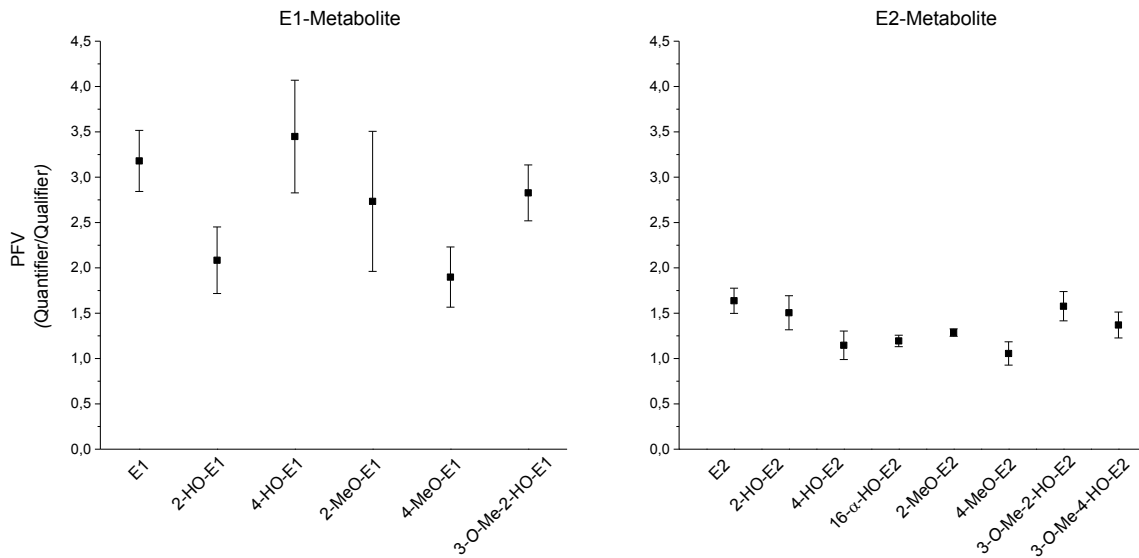


Abb. 17: Charakteristische *Quantifier*/*Qualifier*-Verhältnisse von E1- und E2-Metaboliten. Diesbezüglich wurden Standardlösungen von E1- und E2-Metaboliten mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.) analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion) des Quotienten der absoluten PF aus *Quantifier* und *Qualifier*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1; $2,5 \text{ pg} = \text{E2}$ und 2-/4-MeO-E2; $10 \text{ pg} = 2\text{-}/4\text{-HO-E1}$, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 71.

5.2 Optimierung der GC-Methodenparameter

Da die maximalen Konzentrationen von E1- und E2-Metaboliten im Gewebe im unteren pg-Bereich pro Gramm Drüsengewebe liegen (Rogen et al. 2003), war es einerseits notwendig, eine empfindliche MRM-Methode zu entwickeln (Kap. 5.1) und andererseits, die GC-Methodenparameter zu optimieren, um Temperatur-bedingte Empfindlichkeitsverluste zu vermeiden. Diese Verluste resultieren infolge einer Diskriminierung und Anreicherung der Probe während des chromatographischen Trennprozesses, wodurch eine verringerte Intensität der Signale durch Memory-Effekte hervorgerufen werden kann. Andererseits war es aufgrund der geringen Analytmengen wichtig, durch einen möglichst hohen Aufkonzentrierungseffekt der Analyten deren optimale beziehungsweise effektive Signalintensität zu gewährleisten und damit verbunden eine Erhöhung des Nachweisvermögens zu erzielen.

Ungewollte Zersetzungsreaktionen oder Anreicherungen des Analyten resultieren einerseits durch partielle Kondensation des Analyten in der *Transferline*- oder Ionenquelle und durch zu hoch beziehungsweise zu niedrig gewählte Temperaturen des Injektors beziehungsweise Detektors. Auf die Festlegung der optimalen Injektor- und Detektortemperatur wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, so dass im Folgenden die effektive Aufkonzentrierung des

Analyten (Kap. 5.2.1) und die Vermeidung einer partiellen Kondensation, durch die Optimierung von *Transferline*- und Ionenquell-Temperaturen (Kap. 5.2.2 und Kap. 5.2.3), näher betrachtet werden.

Eine effektive Aufkonzentrierung des Analyten wird durch den sogenannten Lösungsmittel-effekt bewirkt. Um diesen gezielt hervorzurufen, muss die *Initial*-Temperatur 10°C bis 15°C unterhalb der Siedetemperatur des verwendeten LM liegen (Hübschmann, 2009). Dadurch rekondensiert das LM an den Wänden des Liners und wirkt ähnlich einer stationären Phase, welche die flüchtigen Komponenten retiniert und dabei von hinten nach vorn schrumpft, da das in Richtung des GC strömende Trägergas das LM von den Wänden verdunsten lässt. Im letzten Moment des Verdampfens werden die flüchtigen Analyte schlagartig freigesetzt, wodurch die Aufkonzentrierung der Analyte und eine scharfe Peakform hervorgerufen werden. Schwerflüchtige Verbindungen rekondensieren zunächst auf den Wänden des Liners und verbleiben auch dort nachdem das LM abgedampft ist. Beim Ansteigen der Temperatur gemäß Temperaturprogramm gehen diese in die Gasphase über und verbleiben im Anfangsbereich der Säule als schmale Banden. Beim weiteren Erhöhen der Temperatur wandern diese erneut voran und sind als scharfe Peaks zu beobachten (Hübschmann, 2009).

Um den Einfluss der *Initial*-Temperatur auf die Aufkonzentrierung beziehungsweise die Signalintensität von E2-Metaboliten zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Standardsubstanzen Analysen mittels GC/MS/MS bei unterschiedlichen *Initial*-Temperaturen durchgeführt (Kap. 4.2.6). Da das im Rahmen der Derivatisierung verwendete Silylierungsreagenz BSTFA unverdünnt zu einer schnellen und irreversiblen Schädigung der Kapillarsäule führt (Albero et al., 2012), wurde dieses vor jeder GC-Analyse 1:1 mit n-Heptan verdünnt. Demnach wurde im Rahmen der Optimierung der *Initial*-Temperatur der Siedepunkt von n-Heptan mit einer Temperatur von 98,42°C berücksichtigt.

Damit die im GC getrennten Verbinden in der *Transferline* nicht wieder vermischt werden, muss deren Temperatur möglichst hoch gehalten werden. Die *Transferline*-Temperatur sollte ca. 10°C über der Endtemperatur des Temperaturprogrammes liegen (Hesse et al., 2005), wobei vom Hersteller eine maximal zu verwendende Temperatur der *Transferline* von 350°C angegeben ist. Um daher Empfindlichkeitsverluste von E2-Metaboliten durch partielle Kondensation zu vermeiden, wurde zunächst die *Transferline*-Temperatur bei konstanter Temperatur der Ionenquelle optimiert (Kap. 5.2.2). Allerdings bedarf es ebenfalls einer Optimierung Letzterer (Kap. 5.2.3), da unter anderem wenig flüchtige Zersetzungsprodukte bei einer zu niedrigen Temperatur der Ionenquelle auf deren Oberfläche halbleitende Schichten bilden können, die zu schlecht definierten Potenzialen und folglich zur Defokussierung führen. Dadurch wird nicht nur ein erhöhter Reinigungsbedarf der Ionenquelle notwendig (Gross, 2013), sondern gleichzeitig deren Lebensdauer erheblich vermindert.

Zur Optimierung der *Initial*-Temperatur sowie der *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur wurde von E2 und den Metaboliten eine Absolutmenge von 10 pg im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.6 - Kap. 4.2.8) und die absolute PF des jeweiligen extrahierten *Quantifier*-Übergangs ermittelt. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied der mittleren PF zwischen unterschiedlichen *Initial*-Temperaturen beziehungsweise *Transferline*- und Ionenquell-Temperaturen als Maß für die Effektivität der Aufkonzentrierung sowie einer eventuellen Kondensation des Analyten in der *Transferline* beziehungsweise Ionenquelle herangezogen.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von E2- und E1-Metaboliten wurden die Ergebnisse der Optimierungen bezüglich der *Initial*-Temperatur, der *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur im Anschluss auf die Analytik von E1-Metaboliten sowie den deuterierten E1- und E2-Metaboliten übertragen.

5.2.1 *Initial*-Temperatur

Damit eine effektive gaschromatographische Trennung und Aufkonzentrierung der Analyten gewährleistet werden kann sowie zur Vermeidung von Peakverbreiterungen oder Mehrfachpeaks, sollte die Probe innerhalb einer schmalen Zone am Säulenanfang kondensieren. Dabei ist die Temperatur nur langsam und schrittweise zu erhöhen, damit das LM vom Injektor in Richtung der Säule verdampft und die schwerflüchtigen Analyten an der Front fokussiert werden.

Unter Berücksichtigung der Siedetemperatur von n-Heptan (98,42°C) und um einen möglichst weiten Temperaturbereich zu testen, wurde eine *Initial*-Temperatur von 60°C, mit einer schrittweisen Temperaturerhöhung von 10°C, bis hin zu einer maximalen Temperatur von 100°C überprüft (Start: 60-100°C; 60°C/min bis 250°C; 1,8°C/min bis 270°C).

Bei E2 und E2-d₃ führte eine *Initial*-Temperatur von 60°C zur effektivsten Aufkonzentrierung beziehungsweise Fokussierung, da die absoluten PF mit 1.510000 ± 49.100 Counts und 558.200 ± 95.800 Counts signifikant höher waren, als die PF, die bei der Verwendung von 70°C, 80°C, 90°C und 100°C als *Initial*-Temperatur ermittelt wurden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18). Während für E2 die PF von 1.060000 ± 30.500 Counts bis 1.280000 ± 18.800 Counts variierten, schwankten diese bei E2-d₃ im Bereich von 418.100 ± 48.400 Counts bis 501.000 ± 98.800 Counts (Abb. 18).

Auch bei 2- und 4-HO-E2 waren bei einer *Initial*-Temperatur von 60°C die mittleren PF mit 1.020000 ± 38.200 Counts beziehungsweise 1.460000 ± 47.300 Counts signifikant größer gegenüber allen weiteren getesteten *Initial*-Temperaturen (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Bei der Erhöhung der Temperatur auf 70°C, 80°C, 90°C und 100°C resultierten für 2-HO-E2

PF von 699.000 ± 55.000 Counts bis 828.700 ± 78.800 Counts. Für 4-HO-E2 lagen diese in einem Bereich von 986.700 ± 69.400 Counts bis 1.190000 ± 78.000 Counts (Abb. 18).

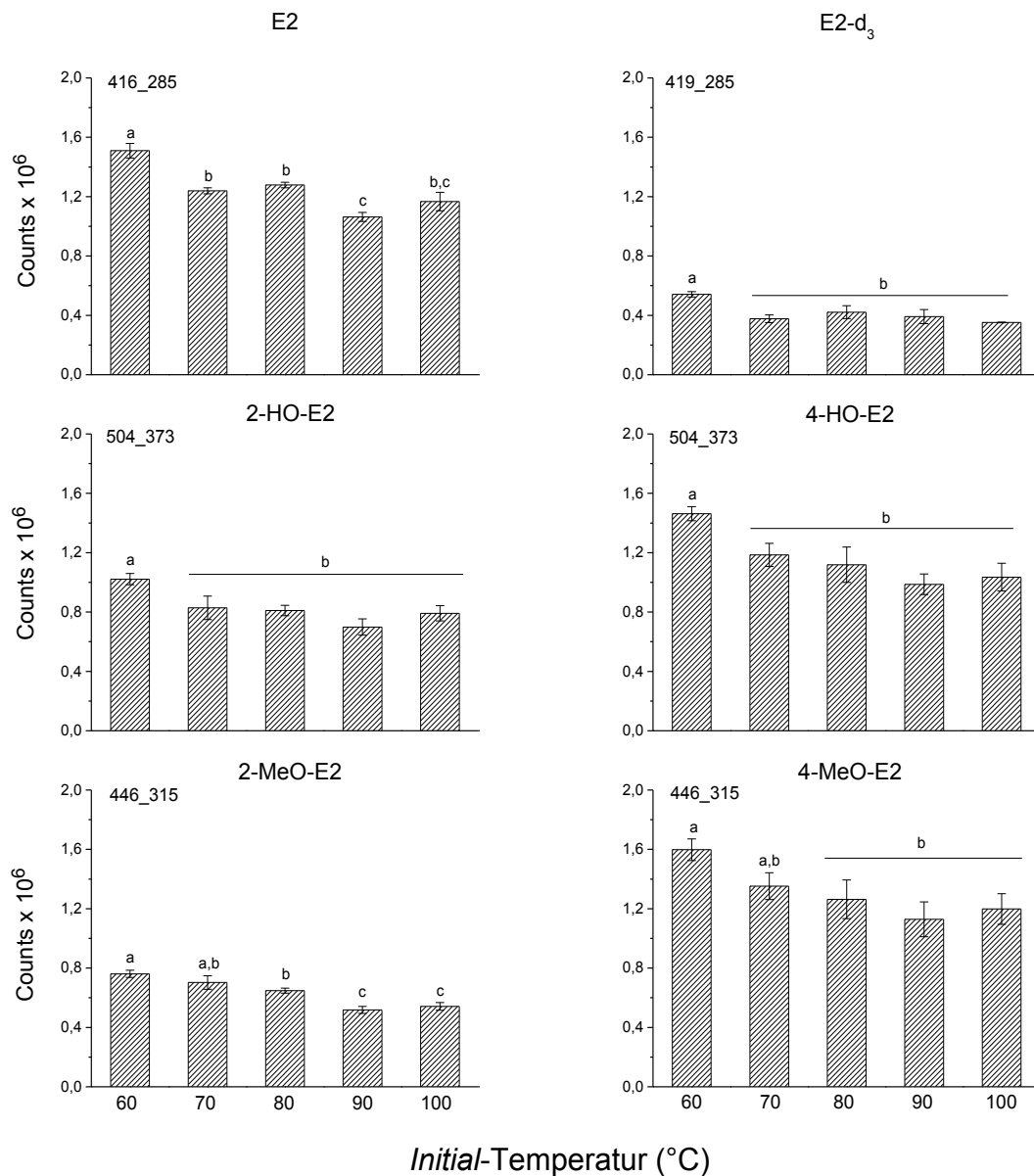


Abb. 18: Einfluss der *Initial*-Temperatur auf die absolute PF von E2 sowie dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs (416_285, 419_285, 504_373 und 446_315) bei einer *Initial*-Temperatur von 60°C bis 100 °C; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10$ pg. Injektionsvolumen: 1 µl. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 72.

Eine Erhöhung der Anfangstemperatur ließ zwar für E2, E2-d₃ und den E2-Hydroxylierungsprodukten einen schlechteren Aufkonzentrierungseffekt resultieren, dennoch verlief die Fokussierung der Analyten in diesem Temperaturbereich relativ konstant, da sich die Mittelwerte

deren PF nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18). Eine Ausnahme davon war bei E2 zu beobachten, da eine *Initial*-Temperatur von 90°C, im Vergleich zu 70°C, 80°C und 100°C, mit einer signifikanten Abnahme der PF auf 1.060000 ± 30.5000 Counts verbunden war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18).

Bei 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 schwankten die mittleren PF bei einer *Initial*-Temperatur von 60°C und 70°C von 702.800 ± 45.800 Counts bis 761.200 ± 24.400 Counts beziehungsweise von 1.130000 ± 87.200 Counts bis 1.230000 ± 122.500 Counts, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18). Erst ab einer *Initial*-Temperatur von 80°C war eine signifikante Abnahme der PF auf 647.600 ± 17.000 Counts für 2-MeO-E2 beziehungsweise auf 1.080000 ± 89.300 Counts für 4-MeO-E2 zu verfolgen (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18). Während sich die damit verbundene schlechtere Fokussierung für 2-MeO-E2 bei einer *Initial*-Temperatur von 90°C und 100°C fortsetzte, blieben die PF von 4-MeO-E2 in diesem Temperaturbereich konstant (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18). Ähnlich wie bei 2- und 4-HO-E2 sowie E2-d₃ unterschieden sich die Mittelwerte der PF von 4-MeO-E2 in diesem Temperaturbereich nicht statistisch signifikant voneinander (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 18).

Abschließend ist festzuhalten, dass die Verwendung einer *Initial*-Temperatur von 60°C bei E2 und dessen hydroxylierten und methylierten Metaboliten zu höheren beziehungsweise signifikant höheren Signalintensitäten führte. Die resultierende effektivere Aufkonzentrierung äußerte sich bei E2 beziehungsweise E2-d₃ in einem Anstieg der mittleren PF von durchschnittlich $21,4 \pm 6,3\%$ und $17,3 \pm 6,4\%$. Während für 2-HO-E2 und 4-HO-E2 in diesem Zusammenhang ein Anstieg der mittleren PF von $23,4 \pm 5,6\%$ sowie $26,1 \pm 6,0\%$ beobachtet wurde, betrug dieser für 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 $20,9 \pm 6,0\%$ beziehungsweise $22,7 \pm 11,5\%$. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen eine *Initial*-Temperatur von 60°C verwendet.

5.2.2 Temperatur der Transferline

In Anbetracht dessen, dass die Temperatur der *Transferline* ca. 10°C über der Endtemperatur eingestellt werden soll (Hesse et al., 2005), wurde unter Berücksichtigung der verwendeten Endtemperatur von 275°C neben einer *Transferline*-Temperatur von 285°C ebenfalls 240°C, 250°C, 260°C, 270°C, 280°C, 290°C und 300°C getestet, um einen möglichst breiten Temperaturbereich der *Transferline* zu untersuchen. Die Temperatur der Ionenquelle wurde dabei analog bisheriger Messungen konstant auf eine Temperatur von 250°C eingestellt.

Bei einer *Transferline*-Temperatur von 250°C bis 300°C variierten bei E2 die PF in einem Bereich von $1.180.000 \pm 149.000$ Counts bis $1.450.000 \pm 79.000$ Counts. Dabei unterschieden sich die Mittelwerte der PF nicht statistisch signifikant voneinander (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), so dass in diesem Temperaturbereich kein Empfindlichkeitsverlust von E2 durch partielle Kondensation zu beobachten war (Abb. 19). Lediglich eine Reduzierung der *Transferline*-Temperatur von 270°C auf 240°C führte zu einem Kondensationseffekt von E2, da dieser mit einer signifikant niedrigeren PF von $1.450.000 \pm 79.000$ Counts auf $1.100.000 \pm 54.600$ Counts verbunden war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 19).

Bei E2-d₃ unterschieden sich die Mittelwerte der PF über den gesamten getesteten Temperaturbereich der *Transferline* nicht statistisch signifikant voneinander, so dass kein Kondensationseffekt zu verzeichnen war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Die PF schwankten dabei in einem Bereich von 663.800 ± 55.600 Counts bis 854.300 ± 49.700 Counts (Abb. 19). Ein ähnliches Verhalten bezüglich des getesteten Temperaturbereiches der *Transferline* war bei den E2-Hydroxylierungsprodukten zu verfolgen. Die Verwendung einer *Transferline*-Temperatur von 240°C bis 300°C ergab für 2-HO-E2 PF von 273.800 ± 24.900 Counts bis 348.900 ± 18.100 Counts. Dabei resultierten keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Für 4-HO-E2 lagen die PF diesbezüglich in einem Bereich von 202.200 ± 24.400 Counts bis 305.500 ± 48.000 Counts. Signifikante Unterschiede zwischen den mittleren PF und damit verbundene Empfindlichkeitsverluste durch Kondensationseffekte waren ebenfalls nicht für 4-HO-E2 bezüglich des getesteten Temperaturbereiches der *Transferline* zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 19).

Bei 2-MeO-E2 variierten die PF bei einer *Transferline*-Temperatur zwischen 250°C und 300°C in einem Bereich von 555.800 ± 88.900 Counts bis 695.600 ± 66.500 Counts. Da sich die Mittelwerte der PF nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), ist für 2-MeO-E2 in diesem Temperaturbereich der *Transferline* ein Empfindlichkeitsverlust durch partielle Kondensation auszuschließen (Abb. 19). Lediglich bei einer Abnahme der *Transferline*-Temperatur von 280°C auf 240°C war eine signifikante Reduktion der PF auf 485.200 ± 80.700 Counts zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 19). Demnach führte die Verwendung einer *Transferline*-Temperatur von 240°C zu einem Verlust von 2-MeO-E2 durch partielle Kondensation. Da sich die Mittelwerte der PF von 4-MeO-E2 über den gesamten getesteten Temperaturbereich der *Transferline* nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), resultierte bei 4-MeO-E2 kein Empfindlichkeitsverlust durch Kondensation. Die PF schwankten hierbei in einem Bereich von 835.600 ± 61.400 Counts bis $1.050.000 \pm 66.800$ Counts (Abb. 19).

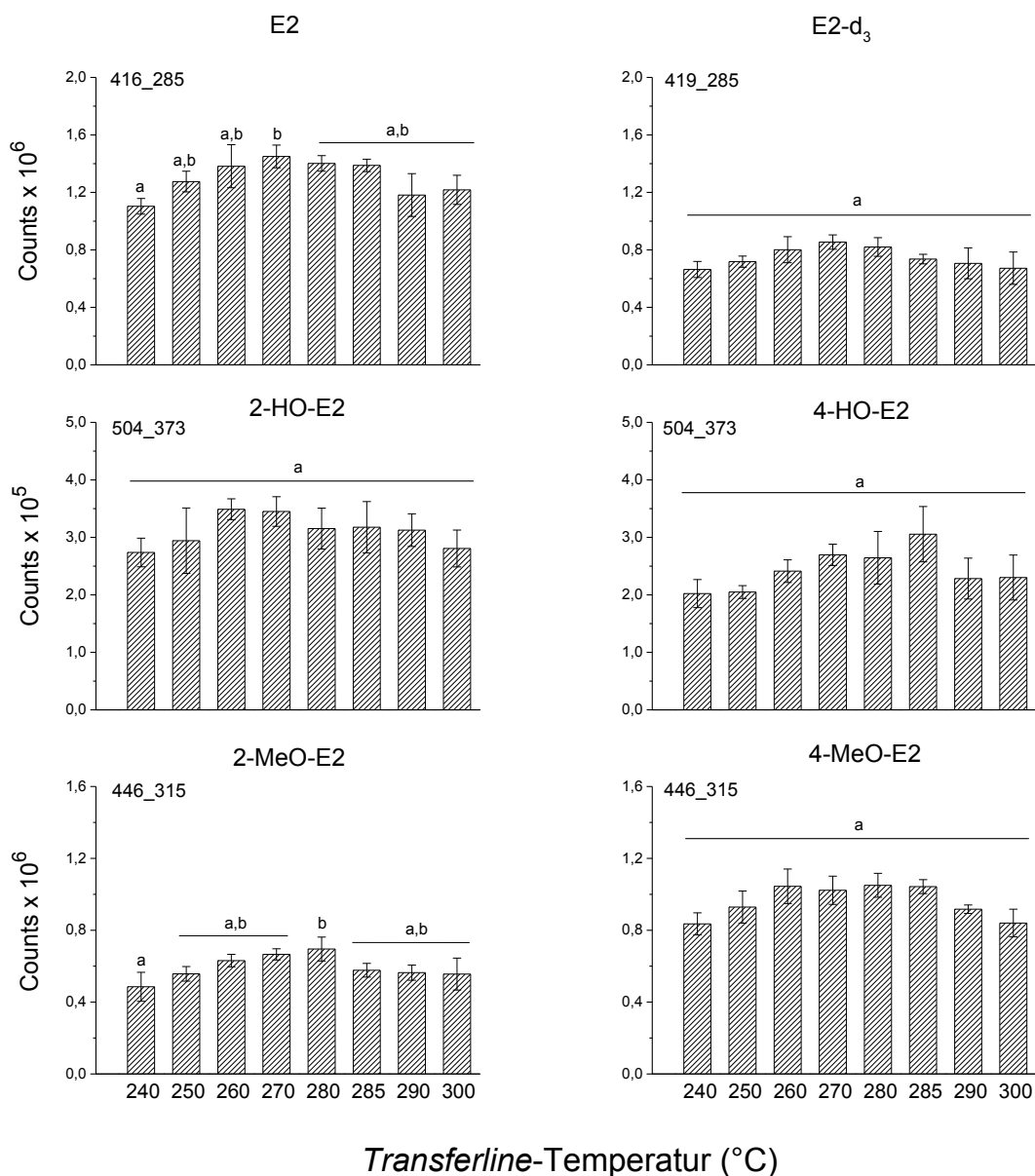


Abb. 19: Einfluss der *Transferline*-Temperatur auf die absolute PF von E2 sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten. Analyse mittels *GC/MS/MS* (jeweils Einfachmessung) im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs (416_285, 419_285, 504_373 und 446_315) bei einer *Transferline*-Temperatur von 240°C bis 300°C; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 73.

Abschließend ist festzuhalten, dass bei einer *Transferline*-Temperatur von 240°C bis 300°C und einer Ionenquell-Temperatur von 250°C ein Empfindlichkeitsverlust durch partielle Kondensation von E2, E2-d₃ sowie den hydroxylierten und methylierten Metaboliten ausgeschlossen werden kann. Eine Ausnahme davon war bei der Reduzierung der *Transferline*-Temperatur von 270°C auf 240°C für E2 beziehungsweise 280°C auf 240°C für 2-MeO-E2 zu beobachten. Demnach kann bei einer Ionenquell-Temperatur von 250 °C jede der getesteten

Transferline-Temperaturen verwendet werden. Lediglich eine *Transferline*-Temperatur von 240°C erwies sich für E2 und 2-MeO-E2 infolge partieller Kondensationseffekte als ungeeignet. Da ferner bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C bis 285°C der jeweils maximale Response für E2 und dessen Metabolite resultierte, wurde dieser Temperaturbereich der *Transferline* im Anschluss bei einer variierenden Temperatur der Ionenquelle untersucht. Tab. 30 gibt einen Überblick über die Eignung der getesteten *Transferline*-Temperaturen bei einer Ionenquell-Temperatur von 250°C für E2-Metabolite.

Tab. 30: Zusammenfassung der geeigneten (+) beziehungsweise nicht geeigneten (-) *Transferline*-Temperaturen (getesteter Temperaturbereich 240°C bis 300°C) für E2 und dessen Metabolite im positiven Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV) bei einer Ionenquell-Temperatur von 250°C. Rot hervorgehoben ist die *Transferline*-Temperatur des jeweiligen max. Response, wobei die PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs ermittelt wurde. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Analyt	Übergang (m/z)	<i>Transferline</i> -Temperatur (°C)							
		240	250	260	270	280	285	290	300
E2	416_285	-	+	+	+	+	+	+	+
E2-d ₃	419_285	+	+	+	+	+	+	+	+
2-HO-E2	504_315	+	+	+	+	+	+	+	+
4-HO-E2	504_315	+	+	+	+	+	+	+	+
2-MeO-E2	446_315	-	+	+	+	+	+	+	+
4-MeO-E2	446_315	+	+	+	+	+	+	+	+

5.2.3 Temperatur der Ionenquelle

Eine fortwährende Arbeitsweise bei zu hohen Ionenquell-Temperaturen kann neben einer Zersetzung von Probenkomponenten ebenfalls zu einer Zersetzung des Oberflächenmaterials der Ionenquelle führen und folglich deren Lebensdauer erheblich herabsetzen. Demnach ist die Optimierung der Ionenquell-Temperatur unerlässlich.

Im Allgemeinen sollte im positiven Ionisierungsmodus bei Elektronenstoßionisation die Ionenquelle bei einer Temperatur von 150°C bis 250°C betrieben werden (Gross, 2013). Des Weiteren ist darauf zu achten, dass die Temperatur 25°C bis 50°C unterhalb der Endtemperatur des Temperaturprogrammes liegt, um eine partielle Kondensation von Analyten in der Ionenquelle zu vermeiden (Thomson et al., 2007). In Anbetracht der verwendeten Endtemperatur von 275°C sowie des maximalen Response von E2 und dessen Metabolite (Kap. 5.2.2) bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C (2-HO-E2), 270°C (E2, E2-d₃) sowie 280°C (2-MeO-E2, 4-MeO-E2) und 285°C (4-HO-E2) wurden diese *Transferline*-Temperaturen bei unterschiedlichen Temperaturen der Ionenquelle untersucht. Um einen möglichst

weiten Temperaturbereich der Ionenquelle abzudecken, wurde Letztere zunächst auf die jeweilige *Transferline*-Temperatur eingestellt und anschließend auf 260°C, 250°C sowie 240°C und 230°C herabgesetzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Temperatur der Ionenquelle stets unterhalb der *Transferline*-Temperatur betrieben wird, um die Kondensation der sich in der Gasphase befindlichen Analyt-Moleküle zwischen dem Ort der Verdampfung und der Ionisierung in der Ionenquelle zu verhindern. Daher wurde bei den *Transferline*-Temperaturen von 260°C und 270°C auf die Überprüfung einer Ionenquell-Temperatur von 280°C beziehungsweise 285°C verzichtet.

Exemplarisch wird im Folgenden die Optimierung der Ionenquell-Temperatur für E2 und E2-d₃ dargestellt.

E2 und deuteriertes E2

Bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C und einer Ionenquell-Temperatur von 230°C bis 260°C variierten die PF von E2 in einem Bereich von $1.930.000 \pm 216.700$ Counts bis $2.310.000 \pm 332.000$ Counts. Die Mittelwerte der PF unterschieden sich dabei nicht statistisch signifikant (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$) voneinander, so dass kein Empfindlichkeitsverlust von E2 durch partielle Kondensation in der Ionenquelle zu beobachten war (Abb. 20). Auch bei einer *Transferline*-Temperatur von 270°C unterschieden sich die Mittelwerte der PF von E2 über den getesteten Bereich der Ionenquell-Temperatur (Abb. 20) nicht statistisch signifikant voneinander (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), so dass ein Verlust von E2 durch Kondensationseffekte auszuschließen war. Die PF schwankten von $1.970.000 \pm 192.800$ Counts bis $2.250.000 \pm 243.900$ Counts (Abb. 20). Ähnliche Ergebnisse resultierten für eine *Transferline*-Temperatur von 280°C beziehungsweise 285°C. Über den gesamten getesteten Temperaturbereich der Ionenquelle von 230°C bis 280°C beziehungsweise 230°C bis 285°C war kein signifikanter Unterschied zwischen den PF zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Folglich ist ein Verlust von E2 durch Kondensation ebenfalls bei diesen *Transferline*-Temperaturen über den betrachteten Bereich der Ionenquell-Temperatur auszuschließen. Die mittleren PF schwankten in diesem Zusammenhang in einem Bereich von $1.870.000 \pm 117.500$ Counts bis $2.230.000 \pm 216.300$ Counts beziehungsweise $1.790.000 \pm 209.200$ Counts bis $1.960.000 \pm 331.200$ Counts (Abb. 20).

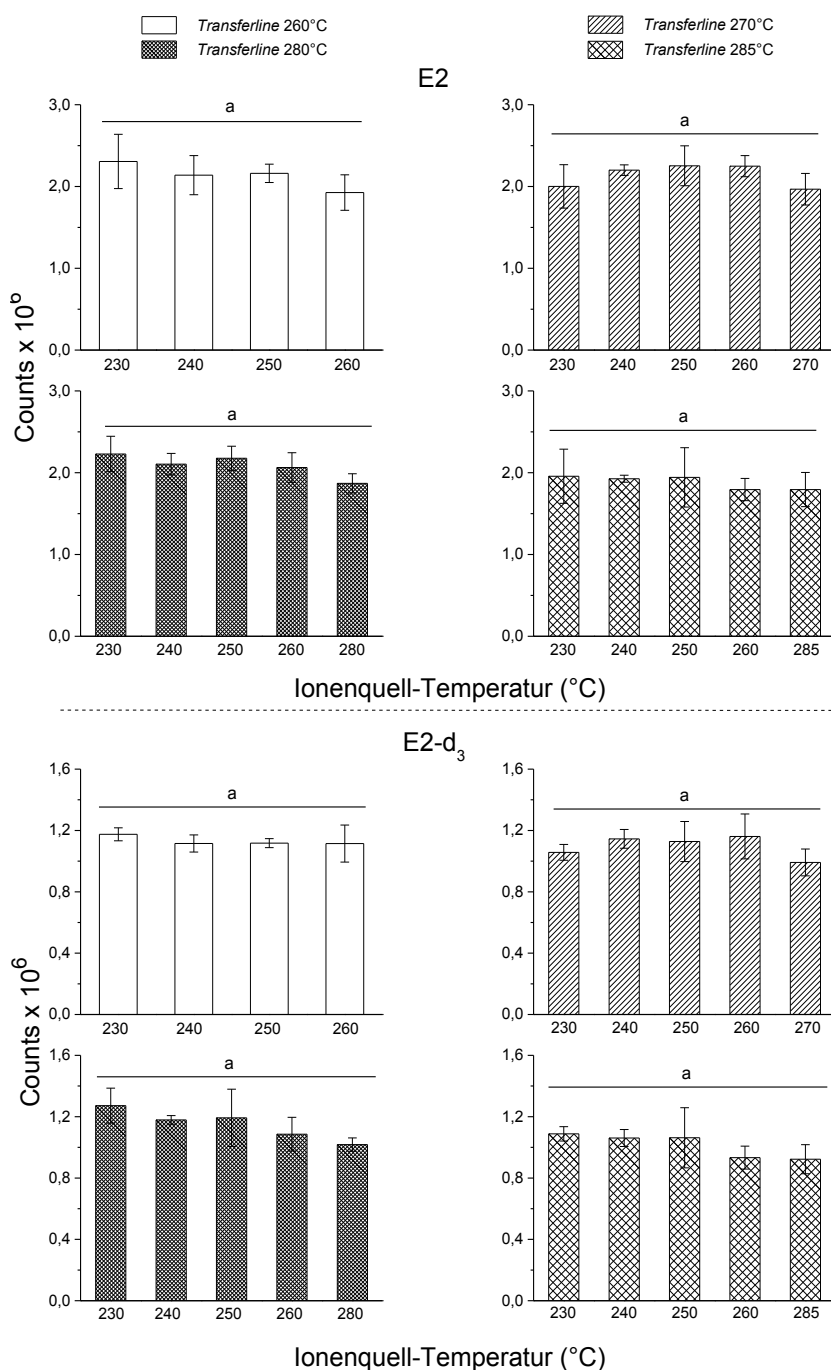


Abb. 20: Einfluss der Ionenquell- und *Transferline*-Temperatur auf die absolute PF von E2 und E2-d₃. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwel-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs (416_285 beziehungsweise 419_285) bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C bis 285°C und einer variierenden Ionenquell-Temperatur (230°C bis 285°C); m_{Analyt/Säule} = 10 pg. Injektionsvolumen: 1 µl. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, p < 0,05). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 74.

Bei allen *Transferline*-Temperaturen wurde bezüglich des jeweiligen getesteten Temperaturbereiches der Ionenquelle kein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren PF von E2 beobachtet. Auch der Vergleich der Ionenquell-Temperaturen mit dem maximalen Response

lieferte keine signifikanten Unterschiede (getestet mittels ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Um eine maximale Signalintensität von E2 zu generieren, kann daher eine Ionenquell-Temperatur von 230°C in Kombination mit einer *Transferline*-Temperatur von 260°C, 280°C oder 285°C gleichermaßen verwendet werden, wie die Kombination aus einer Ionenquell-Temperatur von 250°C und einer *Transferline*-Temperatur von 270°C (Abb. 20).

Bei E2-d₃ schwankten die mittleren PF bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C und einer Ionenquell-Temperatur von 230°C bis 260°C zwischen $1.110.000 \pm 120.600$ Counts bis $1.180.000 \pm 42.500$ Counts (Abb. 20). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der PF war nicht festzustellen, so dass ein Kondensationseffekt von E2-d₃ auszuschließen war. Dieser Trend setzte sich ebenfalls bei einer *Transferline*-Temperatur von 270°C und einem Temperaturbereich der Ionenquelle von 230°C bis 270°C fort. Die mittleren PF variierten von 991.500 ± 87.400 Counts bis $1.160.000 \pm 146.200$ Counts (Abb. 20) und zeigten keine signifikanten Unterschiede (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Auch bei einer *Transferline*-Temperatur von 280°C und 285°C war kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der PF in dem jeweiligen betrachteten Temperaturbereich der Ionenquelle zu beobachten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). In diesem Zusammenhang schwankten die mittleren PF von $1.020.000 \pm 43.300$ Counts bis $1.270.000 \pm 11.400$ Counts beziehungsweise 922.800 ± 94.700 Counts bis $1.090.000 \pm 46.800$ Counts (Abb. 20). Folglich ist ein Kondensationseffekt von E2-d₃ bei allen *Transferline*-Temperaturen und den überprüften Temperaturbereichen der Ionenquelle auszuschließen. Dieses Ergebnis resultierte ebenfalls bei der Betrachtung der Ionenquell-Temperaturen mit dem maximalen Response (Abb. 20). Auch diesbezüglich war kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der PF festzustellen (getestet mittels ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Um eine maximale Signalintensität von E2-d₃ zu erzielen, kann eine *Transferline*-Temperatur von 260°C beziehungsweise 280°C und eine Ionenquell-Temperatur von 230°C verwendet werden. Ebenfalls kann eine *Transferline*-Temperatur von 270°C und 285°C in Verbindung mit einer Ionenquell-Temperatur von 260°C beziehungsweise 230°C Anwendung finden.

In analoger Weise wurden die Hydroxylierungs- und Methylierungsprodukte von E2 der Optimierung der Ionenquell-Temperatur unterzogen (Anhang, Abb. 97 und Abb. 98; Tab. 75 und Tab. 76). Tab. 31 verdeutlicht, dass keine *Transferline*-Temperatur existiert, bei der E2 und dessen Metabolite einheitlich bei derselben Ionenquell-Temperatur ihren jeweiligen maximalen Response besitzen. Aufgrund der gerätetechnischen Gegebenheiten konnte nicht für jeden Metaboliten eine separate *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur eingestellt werden. Innerhalb einer Methode kann daher immer nur eine *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur

festgelegt werden. Folglich ist es notwendig, einen Kompromiss bezüglich dem maximalen Response bei den jeweiligen *Transferline*- und Ionenquell-Temperaturen zu finden.

Tab. 31: Zusammenfassung des jeweiligen max. Response von E2 und dessen Metaboliten im positiven Ionisierungsmodus (Ionenquellspannung: 70 eV) bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C bis 285°C. Der getestete Temperaturbereich der Ionenquelle betrug 230°C bis 285°C. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.), wobei jeweils die PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs ermittelt wurde. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Anhang, Tab. 74. - Tab. 76.

Ionenquell-Temperatur (°C) des max. Response	Analyt	<i>Transferline</i> -Temperatur (°C)				
	E2-Metabolite	Übergang (m/z)	260	270	280	285
	E2	416_285	230	250	230	230
	E2-d ₃	419_285	230	260	230	230
	2-HO-E2	504_373	260	270	250	285
	4-HO-E2	504_373	240	250	250	250
	2-MeO-E2	446_315	260	260	250	250
	4-MeO-E2	446_315	260	250	250	250

Für die Hydroxylierungs- und Methylierungsprodukte resultierte der maximale Response bei einer *Transferline*-Temperatur von 280°C und einer Ionenquell-Temperatur von 250°C. Auch wenn für E2 und E2-d₃ in diesem Zusammenhang der maximale Response bei einer Ionenquell-Temperatur von 230°C zu beobachten war, unterschieden sich die mittleren PF bezüglich der Verwendung einer *Transferline*-Temperatur von 280°C und einer Ionenquell-Temperatur von 250°C durchschnittlich nur um 2,4% und 6,2%. Demnach wurde für alle weiteren Untersuchungen eine *Transferline*-Temperatur von 280°C in Verbindung mit einer Ionenquell-Temperatur von 250°C verwendet (Tab. 31).

5.3 Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode zur Isolierung und Aufreinigung von E1- und E2-Metaboliten aus Brustgewebe

Zur gezielten Isolation von E1, E2 sowie deren Metaboliten aus Brustgewebe wurde eine Extraktion mit anschließender SPE-Aufarbeitung durchgeführt. Diesbezüglich wurde mit Hilfe von undeuterten Standardlösungen der E1- und E2-Metabolite die Extraktionseffizienz von Hexan mit der von Chloroform verglichen und der Einfluss der SPE auf den Verlust von E1, E2 sowie der Metabolite untersucht. Dafür war es notwendig die WFR der einzelnen Metabolite zu bestimmen, wobei die PF mit und ohne Extraktion sowie SPE bestimmt und miteinander verglichen wurden.

Da E2 und dessen hydroxylierte und methylierte Metabolite im Brustgewebe zum Teil glucuronidiert beziehungsweise sulfoniert vorliegen, sollte die entwickelte Aufarbeitungsmethode ebenfalls die Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten sowie die Quantifizierung als

freies E2 in Standardlösungen ermöglichen. Diesbezüglich war es Ziel, mit verschiedenen Inhibitoren für β -Glucuronidase aus *helix pomatia* beziehungsweise reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber sowie saurer Hydrolyse eine spezifische Spaltung der oben genannten Konjugate zu ermöglichen. Bei der Bestimmung der WFR wurde daher auch der Einfluss dieser Enzymproteine sowie die Bedingungen der hydrolytischen Spaltung untersucht.

Um einen möglichen Einfluss von Oxidationseffekten während der Aufarbeitung auszuschließen, wurden Standardlösungen als auch Gewebe mit E2-d₃ beziehungsweise einer Mischung aus E2-d₃ und E1-d₄ dotiert und nach vollständiger Aufarbeitung sowie einzelnen Prozessschritten auf mögliche generierte Artefakte untersucht.

Aufgrund der geringen Konzentrationen von E2 in den zu untersuchenden Gewebespenden haben bereits Kontamination-Spuren von E2 erheblichen Einfluss auf die Richtigkeit der Analyseergebnisse. Vor jeder Gewebeaufarbeitung musste daher eine E2-Kontamination der verwendeten Laborgeräte, Chemikalien und Standardlösungen ausgeschlossen werden, so dass es diesbezüglich notwendig war, verschiedene *Screening*-Methoden zur Kontaminationsüberprüfung zu entwickeln. Die resultierenden PF von E2 wurden dabei nach festgelegten Kriterien der Peak-Daten-Analyse beurteilt.

5.3.1 Kriterien der Peak-Daten-Analyse

E2 ist in den zu untersuchenden Brustgewebeproben in Konzentrationen im unteren pg-Bereich pro Gramm Drüsengewebe enthalten (Rogen et al. 2003). Damit ein Peak daher eindeutig als E2-Peak identifiziert und quantifiziert werden kann, sind verschiedene Kriterien bei der Datenanalyse zu berücksichtigen, die bei der Auswertung der in dieser Arbeit aufgenommenen GC/MS/MS-Spektren angewandt wurden.

Aus statistischer Sicht muss in Anbetracht der Boltzmann-Verteilung ein Peak aus mindestens 6 Datenpunkten bestehen, um eine vertrauenswürdige Integration der entsprechenden PF zu gewährleisten. Ferner ist für die Quantifizierung neben dem intensiveren *Quantifier*-Übergang ebenfalls das Vorhandensein des weniger intensiven *Qualifier*-Übergangs notwendig, da über diesen abgesichert wird, dass es sich tatsächlich um die gesuchte Substanz handelt (Kap. 5.1.2.) Zudem muss sich ein Peak deutlich vom Hintergrundrauschen der entsprechenden Massenspur abheben, wobei das Substanzsignal das Rauschsignal dabei um den Faktor 2, 3 oder höher übersteigt, damit die Integrierbarkeit der PF gewährleistet ist (Hübschmann, 2009). Das im Rahmen der Derivatisierung verwendete Silylierungsreagenz wurde jeweils 1:1 mit n-Heptan verdünnt, so dass in der vorliegenden Arbeit im Zuge der Qualitätssicherung das Rauschen mit n-Heptan bestimmt wurde und im Anschluss auf eine maximale PF von 10 kCounts festgelegt worden ist (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 21). Die oben genannten Kriterien sind nicht nur vollständig vom *Quantifier*- sondern auch vom *Qualifier* zu erfüllen, wobei beide Massenübergänge ebenfalls eine entsprechende Mindestpeakfläche

besitzen müssen, damit diese eindeutig als ein Peak identifiziert beziehungsweise gewertet werden können. Damit sich der *Quantifier*-Übergang (416_285) von E2 aus mindestens 6 Datenpunkten zusammensetzt und für dessen automatische Peakintegration ist mindestens eine PF von ungefähr 100.000 Counts notwendig. In diesem Flächenbereich ist durch manuelle Integration ebenfalls der Nachweis des *Qualifier*-Übergangs von E2 (416_326) mit einer ausreichenden Anzahl an Datenpunkten möglich (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 21). Für diese *Quantifier*- und *Qualifier*-Mindestpeakflächen ist näherungsweise eine E2-Menge von 1 pg auf der Säule notwendig. Die gerätespezifische Bestimmungsgrenze von E2 betrug folglich 1 pg auf der Säule. Um die damit verbundene Geräteempfindlichkeit dauerhaft zu gewährleisten, wurde im Rahmen der Qualitätssicherung in regelmäßigen Abständen ein E2-Qualitätsstandard, in einer Menge von 1 pg E2/Säule, analysiert (Kap. 4.2.11) und im Anschluss die *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier*-Massenspur von E2 auf ihre jeweilige Mindestpeakfläche überprüft (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 21).

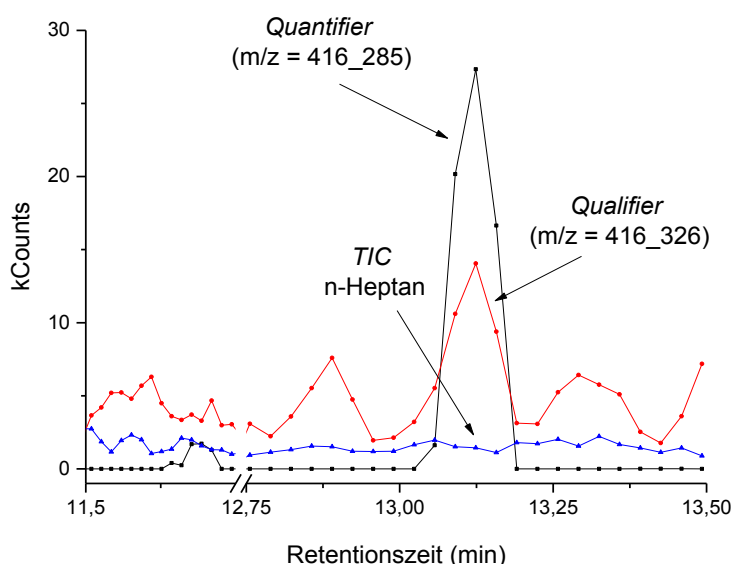


Abb. 21: Überlagerte Chromatogramme der extrahierten *Quantifier*- (416_285) und *Qualifier*-Massenspur (416_326) von E2 sowie das entsprechende Totalionenchromatogramm von n-Heptan. Analyse mittels GC/MS/MS (Einfachmessung) im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.); $m_{E2\text{-Säule}} = 1 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Neben den *MRM*-Übergängen wurde für alle E1- und E2-Metabolite das *Quantifier/Qualifier*-Bildungsverhältnis bestimmt (Kap. 5.1.5). Da dieses für den jeweiligen Analyt charakteristisch ist, wurde es unterstützend bei der Identifizierung von E1, E2 und den jeweiligen Metaboliten im Brustgewebe herangezogen (Kap.5.6).

5.3.2 Screening der verwendeten Chemikalien und Laborgeräte auf mögliche Kontamination mit E2

Im gesunden Brustgewebe liegen die maximal zu erwartenden Konzentrationen von E2 im unteren pg-Bereich pro Gramm Drüsengewebe (Rogen et al., 2003). Daher haben bereits geringste Kontaminations-Spuren von E2 erheblichen Einfluss auf die Richtigkeit der Analysenergebnisse, so dass vor jeder Probenaufarbeitung alle zu verwendenden Chemikalien, Standardlösungen und Laborgeräte auf eine Kontamination mit E2 zu überprüfen sind.

Von den LM (MeOH, Isopropanol, n-Heptan), den Elutionsmitteln (85% MeOH, MeOH mit 0,1% FA) sowie dem Extraktionsmittel (Chloroform) wurden jeweils 2 ml bis zur Trockene evaporiert, in BSTFA derivatisiert, anschließend mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kap. 4.2.12) und die absolute PF der extrahierten *Quantifier*- und *Qualifier*-Massenspur von E2 ermittelt. Im Zuge dessen wurden diese nach festgelegten Kriterien der Datenanalyse, der Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten, der Mindestpeakfläche, dem charakteristischen *Quantifier/Qualifier*-Bildungsverhältnis sowie dem Abheben des Peaks vom Hintergrundrauschen, ausgewertet (Kap. 5.3.1).

Die Glucuronid- und Sulfatlösungen (E2-3-G, E2-3-S) sowie E2-d₃ wurden in Absolutmengen von 10 pg/Säule analog der Chemikalien analysiert (Kap. 4.2.12) und den Kriterien der Datenanalyse (Kap. 5.3.1) unterzogen. Diese fanden ebenfalls bei der Kontaminationsüberprüfung der SPE-Kammer, dem Derivatisierungsreagenz (BSTFA), den Enzymlösungen (Sulfatase *Typ H-1*, *β-Glucuronidase Typ B-1*) sowie den Pufferlösungen (*Sørensen Phosphat-Puffer* und *Sørensen Phosphat-Puffer mit 20% MeOH*) Anwendung (Kap. 4.2.12). Die Enzym- und Pufferlösungen wurden vor der gaschromatographischen Analyse zunächst mittels SPE aufgearbeitet (Kap. 4.2.12) und anschließend den Kriterien der Datenanalyse unterzogen (Kap. 5.3.1).

Um die Geräteempfindlichkeit zu gewährleisten, wurde ein E2-Qualitätsstandard in einer Menge von 1 pg E2/Säule mitgeführt, welcher nach jeder dritten Leerwertmessung der Chemikalien, Laborgeräte beziehungsweise Standardlösungen und Enzymlösungen gleichermaßen im MRM analysiert wurde (4.2.11).

Bei den 12 Positionen der SPE-Kammer betrug die absolute PF der jeweiligen *Quantifier*-Massenspur von E2 (416_285) maximal 2 kCounts und ging damit vollständig im Hintergrundrauschen unter (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 22). Die SPE-Kammer ist daher kontaminationsfrei und wurde für die Probenaufarbeitung (Kap. 4.2.20) verwendet.

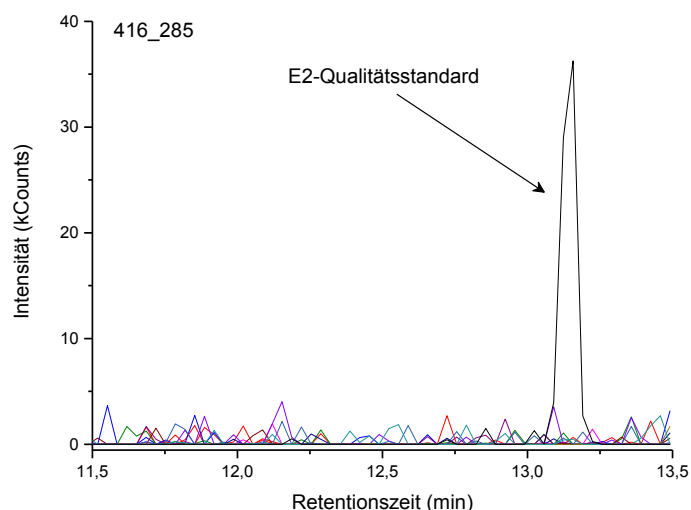


Abb. 22: Leerwertmessungen der 85% MeOH-Fraktion von 12 Positionen der verwendeten SPE-Kammer zur Überprüfung auf Kontaminationen mit E2. Analyse mittels GC/MS/MS (Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Zur Gewährleistung der Geräteempfindlichkeit wurde E2 als Qualitätsstandard in festgelegten Intervallen analysiert; $m_{E2/S\ddot{a}ule} = 1$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*-Massenspuren (416_285) von E2. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Bei der Überprüfung der Chemikalien und Standardlösungen resultierte für die jeweilige extrahierte E2-Quantifier-Massenspur (416_285) eine maximale PF von 4 kCounts (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 23).

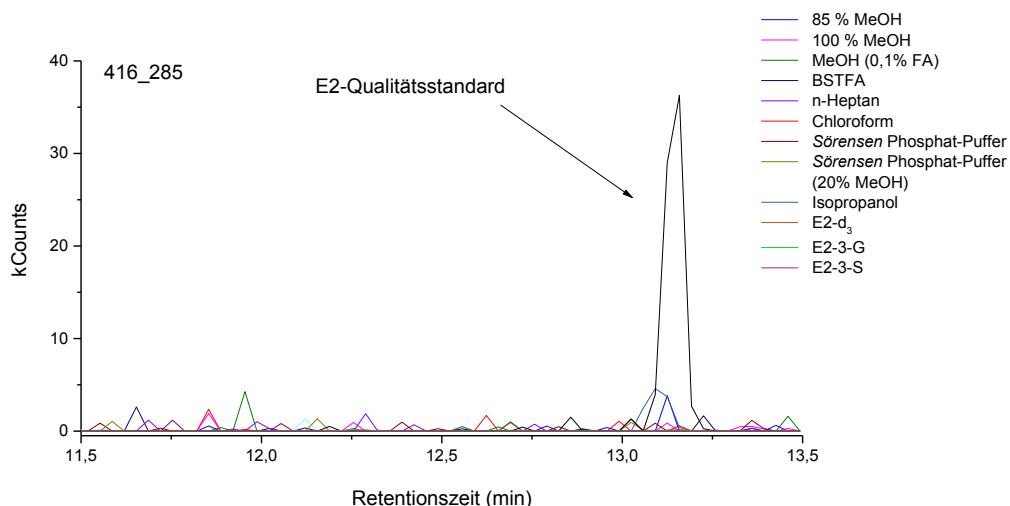


Abb. 23: Leerwertmessungen der 85% MeOH-Fraktion aller verwendeten Chemikalien und Standardlösungen zur Überprüfung auf Kontaminationen mit E2. Analyse mittels GC/MS/MS (Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Zur Gewährleistung der Geräteempfindlichkeit wurde E2 als Qualitätsstandard in festgelegten Intervallen analysiert; $m_{E2/S\ddot{a}ule} = 1$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*-Massenspuren (416_285) von E2. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Demnach gehen auch diese PF vollständig im Rauschen unter. Die Standardlösungen und Chemikalien werden daher als kontaminationsfrei bewertet (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 23). Während Letztere für die Brustgewebsaufarbeitung verwendet wurden (Kap. 4.2.20), sind die Standardlösungen von E2-3-G und E2-3-S im Rahmen der Methodenentwicklung zur Spaltung von E2-Konjugaten herangezogen worden (Kap. 5.3.4).

Um in Hinblick der Probenaufarbeitung eine E2-Kontamination auszuschließen (Kap. 5.6), wurde *Sörensen* Phosphat-Puffer über eine SPE-Säule aufgearbeitet und anschließend mittels GC/MS/MS analysiert (Kap. 4.2.12). Gleichmaßen wurden verschiedene Blindwerte unter Zusatz von Glucuroniden und Sulfaten einer Aufarbeitung unterzogen, um ebenfalls in weiterführenden Arbeiten bei der Probenaufarbeitung mit Konjugatspaltung eine Kontamination mit E2 auszuschließen. Unter Verwendung von 50 pg E2-d₃/Ansatz und 50 pg Substrat/Ansatz wurden folgende Blindwert-Kombinationen untersucht: *Sörensen* Phosphat-Puffer sowie *Sörensen* Phosphat-Puffer mit E2-3-G, E2-3-S beziehungsweise einer Mischung aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten. Um zu überprüfen, ob die in den Enzymlösungen enthaltene Matrix ebenfalls an die charakteristischen MRM-Übergänge von E2 gebunden ist und folglich bei deren Verwendung fälschlicherweise eine E2-Kontamination detektiert wird, wurden die Enzyme Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) und β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) untersucht. Des Weiteren wurde ein Ansatz der Sulfatase ohne die Zugabe von E2-d₃ getestet, um auszuschließen, dass die Detektion von E2 aufgrund des deuterierten Standards resultierte (Kap. 4.2.12).

Bei dem Blindwertansatz aus *Sörensen* Phosphat-Puffer und E2-d₃ setzte sich der *Quantifier* beziehungsweise *Qualifier* aus 7 beziehungsweise 6 Datenpunkten zusammen (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24). Demnach ist für beide Massenübergänge das Kriterium der Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten erfüllt. Deren absolute PF betragen 7,5 kCounts und 2,5 kCounts für den *Quantifier*- beziehungsweise *Qualifier* und gehen demnach vollständig im Rauschen unter, so dass diesbezüglich nicht von einer E2-Kontamination auszugehen ist. Im *Sörensen* Phosphat-Puffer ist folglich kein E2 nachweisbar, so dass dieser für die Probenaufarbeitung verwendet wurde.

Ähnliche Resultate waren bei dem Blindwertansatz aus *Sörensen* Phosphat-Puffer, Sulfat-Konjugat und E2-d₃ zu beobachten. Diesbezüglich bestand der *Quantifier* aus 6 Datenpunkten und der *Qualifier* aus 8 Datenpunkten. Daher war auch bei diesem Ansatz das Kriterium für die Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten erfüllt. Die absoluten PF lagen mit 7 kCounts für den *Quantifier* und 2,5 kCounts für den *Qualifier* vollständig im Hintergrundrauschen, so dass auch bei diesem Blindwertansatz eine E2-Kontamination auszuschließen war (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24).

Des Weiteren zeigte sich deutlich, dass keine Korrelation zwischen der PF und der Anzahl an Peak-Datenpunkten existiert. Folglich kann sich auch der *Qualifier*, der eine viel kleinere PF als der *Quantifier* besitzt, aus einer höheren Anzahl an Datenpunkten zusammensetzen.

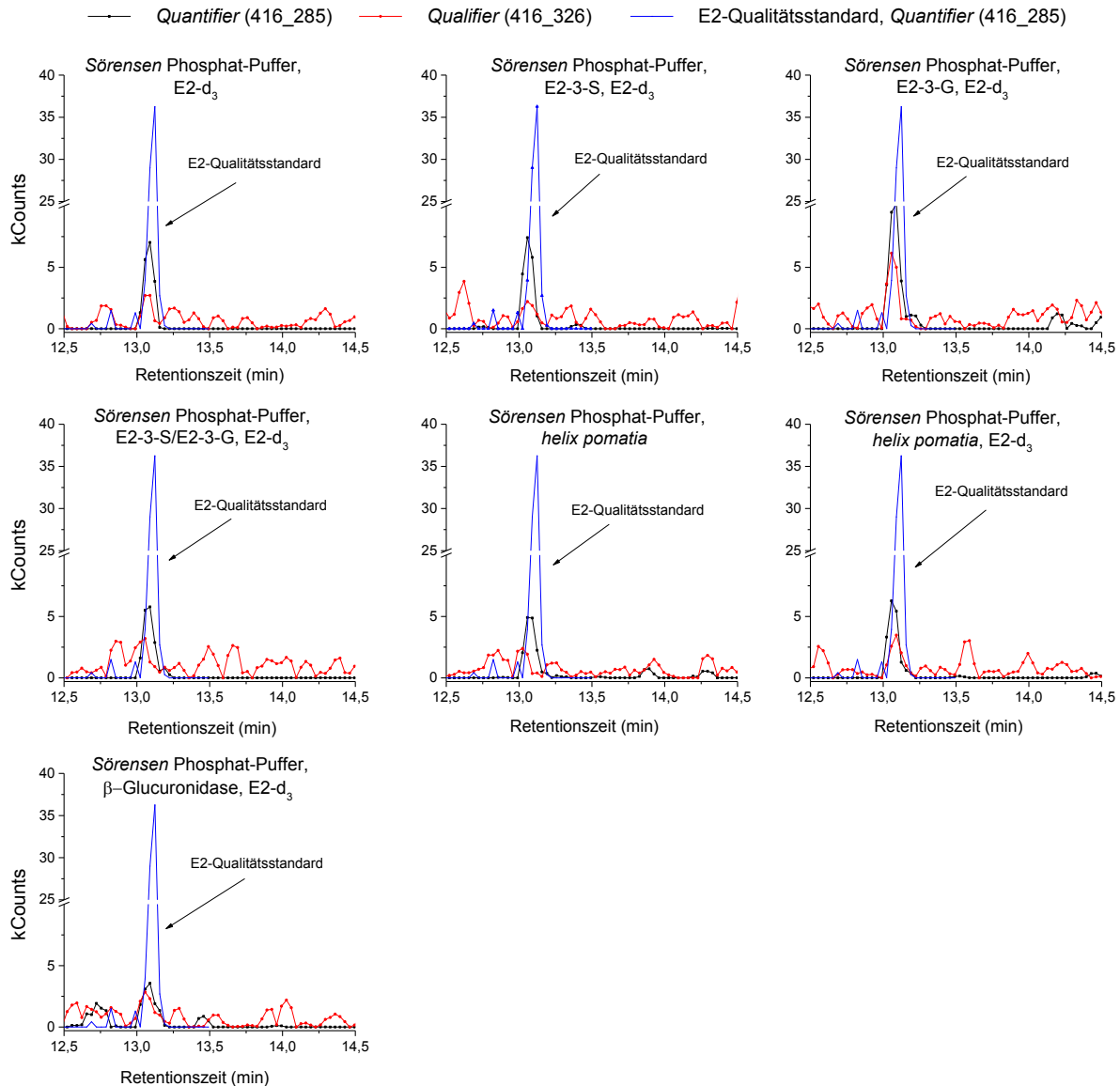


Abb. 24: Leerwertmessungen der 85% MeOH-Fraktion des Sörensen Phosphat-Puffers, der Glucuronid- und Sulfat-Standardlösungen sowie Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) und β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) zur Überprüfung auf Kontaminationen mit E2. Analyse mittels GC/MS/MS (Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Zur Gewährleistung der Geräteempfindlichkeit wurde E2 als Qualitätsstandard in festgelegten Intervallen analysiert; $m_{E2/S\ddot{a}ule} = 1 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Die Absolutmengen von E2-d₃, E2-3-S und E2-3-G betragen jeweils 50 pg/Ansatz. Bei Enzymzusatz betrug die Sulfataseaktivitat (Typ H-1) 100 U/Ansatz und die β -Glucuronidaseaktivitat (Typ B-1) 10.000 U/Ansatz. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*- (416_285, schwarz und blau) und *Qualifier*-Massenspuren (416_326, rot) von E2. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Bei dem Blindwertansatz aus Puffer, Glucuronid-Konjugat und E2-d₃ bestand der *Quantifier* aus 6 Datenpunkten. Der *Qualifier* setzte sich lediglich aus 5 Datenpunkten zusammen (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24). Demnach wurde von diesem das Kriterium der Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten nicht erfüllt. Für einen Nachweis von E2 müssen beide Massenübergänge eine ausreichende Anzahl an Peak-Datenpunkten aufweisen. Dieser Aspekt trifft nicht zu, so dass auch ohne Berücksichtigung der jeweiligen Mindestpeakfläche eine E2-Kontamination auszuschließen ist.

Der Blindwertansatz bestehend aus der Mischung mit Sulfat- und Glucuronid-Konjugaten sowie E2-d₃ zeigte für den *Quantifier*-Übergang 6 Datenpunkte. Beim *Qualifier*-Übergang resultierten 8 Datenpunkte. Die absoluten PF lagen mit 6 kCounts für den *Quantifier* und 3 kCounts für den *Qualifier* vollständig im Rauschen (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24). Eine E2-Kontamination war daher auszuschließen, so dass auch diesbezüglich die Verwendbarkeit der Glucuronid- und Sulfat-Konjugat-Standardlösung bestätigt wurde. Während für den Blindwertansatz mit Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) für den *Quantifier* 8 Peak-Datenpunkte resultierten, waren für den *Qualifier* 7 Peak-Datenpunkte zu verzeichnen (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24), so dass beide Massenübergängen die Mindestanzahl an Datenpunkten aufzeigten. Aus diesem Grund musste die Betrachtung der Mindestpeakfläche hinzugezogen werden. Mit einer absoluten PF von 5 kCounts beziehungsweise 2,5 kCounts unterschieden sich *Quantifier*- und *Qualifier* nicht vom Rauschen. Bei der Übertragung der enzymatischen Hydrolyse von E2-3-G und E2-3-S auf Brustgewebe sind die getestete Glucuronid- beziehungsweise Sulfat-Standardlösung heranzuziehen, da diese frei von E2-Kontaminations-Spuren sind.

Für den Blindwertansatz bestehend aus Sulfatase von *helix pomatia* (Typ H-1) und E2-d₃ waren sowohl für den *Quantifier* als auch den *Qualifier* 8 Peak-Datenpunkte zu beobachten, so dass von beiden Massenübergängen die Mindestanzahl an Peak-Datenpunkten erfüllt wurde. Die Mindestpeakflächen von 6 kCounts beziehungsweise 3,5 kCounts für den *Quantifier* beziehungsweise *Qualifier* lagen jedoch vollständig im Hintergrundrauschen, so dass die Verwendbarkeit der Sulfatase (Typ H-1) und von E2-d₃ bestätigt wurde (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24).

Der Blindwert mit β -Glucuronidase-Zusatz ließ für den *Quantifier*-Übergang 8 Peak-Datenpunkte resultieren. Der *Qualifier* setzte sich sogar aus 10 Peak-Datenpunkten zusammen. Die jeweiligen absoluten PF lagen jedoch mit 3,5 kCounts und 3 kCounts für den *Quantifier* beziehungsweise *Qualifier* vollständig im Rauschen (exemplarisches Chromatogramm; Abb. 24).

Die in den Enzymlösungen enthaltene Matrix ist folglich nicht an die *MRM*-Übergänge von E2 gebunden, so dass Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) und β -Glucuronidase aus Rinder-

leber (Typ B-1) in weiterführenden Arbeiten für die Konjugatspaltung im Brustgewebe herangezogen werden können.

5.3.3 Überprüfung der Extraktion auf den Verlust von E1- und E2-Metaboliten

Um E1- und E2-Metabolite gezielt aus der Probenmatrix freizusetzen, soll im Rahmen der Aufarbeitung eine Extraktion mit Chloroform durchgeführt werden. Da die maximalen Konzentrationen von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe lediglich im unteren pg-Bereich zu erwarten sind (Rogen et al., 2003), ist diesbezüglich zu beachten, dass deren Verluste im Zuge der Extraktion so gering wie möglich gehalten werden.

Um die Eignung der Chloroformextraktion zu überprüfen, wurden Testansätze bestehend aus Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer E1-/E2-Metabolitenmischung mit Chloroform extrahiert und die organische Phase nach Derivatisierung mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kap. 4.2.13). Im Anschluss daran wurden die extrahierten Quantifizier-Übergänge von E1, E2 und deren Metabolite ermittelt. Bei einem Übergang in die organische Phase wurde ferner die prozentuale WFR berechnet. Dazu wurde eine E1-/E2-Metabolitenmischung definierter Konzentration (Kap. 4.2.13) ohne Extraktion als Referenzpunkt bis zur Trockene evaporiert, derivatisiert und anschließend mittels GC/MS/MS analysiert (Kap. 4.2.13).

Nach Rogen et al. (2003) wurde zur Entfettung und Freisetzung der Analyten aus der Gewebematrix eine Extraktion mit Hexan durchgeführt. Um dessen Eignung zu überprüfen, wurden weitere Testansätze mit Hexan extrahiert und ein eventueller Übergang von E1- und E2-Metaboliten in die organische Phase mittels GC/MS/MS im MRM-Modus bestimmt (Kap. 4.2.13).

E1 wurde sowohl bei Hexan- als auch bei Chloroformextraktion in der organischen Phase nachgewiesen. Während nach der Extraktion mit Hexan $66,4 \pm 1,8\%$ in der organischen Phase vorhanden waren, betrug die WFR nach der Extraktion mit Chloroform $76,2 \pm 2,7\%$ (Abb. 25), wobei statistisch signifikant mehr E1 in die organische Phase überging. (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Für E2 betrug die WFR nach Hexanextraktion $22,5 \pm 4,1\%$. Nach Extraktion mit Chloroform ging dieses zu $57,1 \pm 6,7\%$ in die organische Phase über (Abb. 25). Auch für E2 war die WFR bei Chloroformextraktion statistisch signifikant größer, als bei der Extraktion mit Hexan (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$).

E1- und E2-Hydroxylierungsprodukte wurden weder nach Hexan- noch nach Chloroformextraktion in der organischen Phase nachgewiesen (nicht dargestellt). Dies ist auf die geringe Stabilität der Catechol-Estrogene in reinem Acetonitril (ACN) zurückzuführen (Kap. 5.4.5.1), so dass bereits in der frisch hergestellten E1-/E2-Metabolitenmischung, die ebenfalls als Re-

ferenzpunkt für die Berechnung der WFR mitgeführt wurde, keine Catecholestrogene mehr nachzuweisen waren.

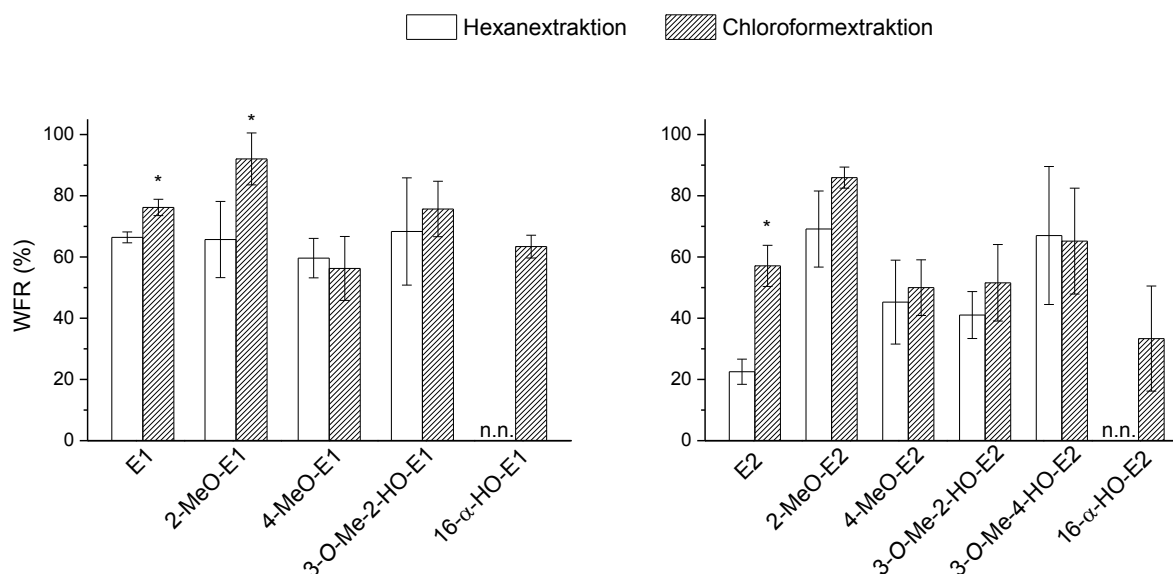


Abb. 25: Prozentuale WFR von E1, E2 und den Metaboliten nach Hexan- und Chloroformextraktion in der organischen Phase. Testansätze bestehend aus Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer E1-/E2-Metabolitenmischung wurden jeweils mit Hexan beziehungsweise Chloroform extrahiert, die organische Phase bis zur Trockene evaporiert und im Anschluss derivatisiert. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1; 10 pg für E2, 2-/4-MeO-E2 = $2,5 \text{ pg}$; 2-/4-HO-E1, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E1, 16- α -HO-E2, 3-O-Me-2/4-HO-E2. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion) Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1. Rohdaten im Anhang, Tab. 77.

Weder 16- α -HO-E1 noch 16- α -HO-E2 waren nach Hexanextraktion in der organischen Phase nachzuweisen (Abb. 25). Bei der Extraktion mit Chloroform gingen diese jedoch zu $63,4 \pm 3,7\%$ beziehungsweise $33,33 \pm 17,2\%$ in die organische Phase über (Abb. 25). Dieser Aspekt ist auf die strukturellen Eigenschaften beziehungsweise auf die unterschiedliche Polarität der verwendeten Extraktionsmittel zurückzuführen. Im Gegensatz zu E1 oder E2 besitzt 16- α -HO-E1 beziehungsweise 16- α -HO-E2 eine zusätzliche OH-Gruppe an C16 (Abb. 26), wodurch deren Polarität erhöht wird. Da Chloroform mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4,8$ (bei 25°C) eine weitaus höhere Polarität als Hexan ($\epsilon = 1,9$; bei 25°C) aufweist, waren 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 nur nach der Extraktion mit Chloroform in der organischen Phase nachzuweisen.

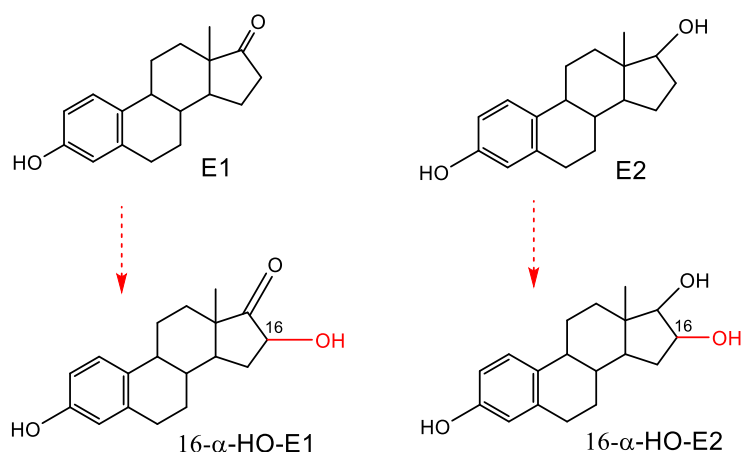


Abb. 26: Molekülstruktur von E1 und E2 sowie 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2.

Für 2-MeO-E1 war die WFR nach der Extraktion mit Chloroform, ebenfalls wie bei E1 und E2, statistisch signifikant größer, als bei der Extraktion mit Hexan (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Demnach ging dieses bei letzterer Extraktion zu $65,7 \pm 12,5\%$ und bei der Extraktion mit Chloroform zu $92,0 \pm 8,5\%$ in die organische Phase über (Abb. 25). Für 2-MeO-E2 resultierte bei Hexanextraktion eine WFR von $69,1 \pm 12,4\%$ (Abb. 25). Bei der Extraktion mit Chloroform betrug diese $85,9 \pm 3,5\%$ (Abb. 25). Wenn auch zwischen beiden Extraktionen kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet wurde (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$), lagen die Ergebnisse hinsichtlich der WFR von 2-MeO-E1 erwartungsgemäß in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 25).

Die WFR von 4-MeO-E1 betrug nach Hexanextraktion $59,6 \pm 6,4\%$, während nach der Extraktion mit Chloroform $56,3 \pm 10,4\%$ in der organischen Phase vorhanden waren. (Abb. 25). Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Die WFR von 4-MeO-E2 lagen diesbezüglich in einem vergleichbaren Bereich. Diese betragen $45,3 \pm 13,7\%$ und $50,0 \pm 9,1\%$ bei Hexan- beziehungsweise Chloroformextraktion (Abb. 25), wobei ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$).

Auch 3-O-Me-2-HO-E1 war sowohl nach Hexan- als auch nach Chloroformextraktion in der organischen Phase nachzuweisen. Die resultierenden WFR waren mit $68,3 \pm 17,5\%$ und $75,7 \pm 9,1\%$ (Abb. 25) für Hexan- beziehungsweise Chloroformextraktion vergleichbar mit denen der übrigen E1-Methylierungsprodukte, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Extraktionen zu verfolgen war (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$).

Während 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 nach Hexanextraktion zu $41,0 \pm 7,7\%$ beziehungsweise $67,0 \pm 22,5\%$ (Abb. 25) in der organischen Phase vorhanden waren, lag deren WFR nach Chloroformextraktion bei $51,6 \pm 12,5\%$ und $65,2 \pm 17,3\%$ (Abb. 25), wobei auch diesbezüglich für beide Methylierungsprodukte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Extraktionen resultierten (Abb. 25; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$).

Abschließend ist festzuhalten, dass sowohl die Chloroform- als auch die Hexanextraktion zu einem erheblichen Analyt-Verlust führte. 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 waren aufgrund ihrer höheren Polarität nicht nach der Extraktion mit Hexan in der organischen Phase nachweisbar. Für die Catechol-Estrogene war es aufgrund ihrer geringen Stabilität in der verwendeten ACN-Metabolitenmischung nicht möglich, eine Aussage über deren Verlust bei der Extraktion mit Hexan- beziehungsweise Chloroform zu treffen. Für E1, E2 und die Methylierungsprodukte variierte die WFR in der organischen Phase von 20% bis über 90%. Demnach würden E1- und E2-Metabolite bei Aufarbeitung der wässrigen Phase bis zu 90% verloren gehen, so dass im Anschluss auf deren Aufarbeitung verzichtet wurde.

Für die Bestimmung von E1- und E2-Metaboliten wurde folglich die organische Phase herangezogen. Da für E1, E2 und 2-MeO-E1 die WFR nach Chloroformextraktion signifikant größer waren, als bei der Extraktion mit Hexan, wurde diesbezüglich die organische Phase nach Chloroformextraktion verwendet.

5.3.4 Quantifizierung von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten in Standardlösungen

Neben den in Kap. 5.6.1 quantifizierten frei vorliegenden Estrogenen ist bei der Bestimmung des E2-Metabolitenprofils im Brustgewebe zu berücksichtigen, dass E2, dessen Catechol-Estrogene sowie die Methyl-Catechole, 2-MeO-E2 sowie 4-MeO-E2, ebenfalls zum Teil gebunden als Sulfat- und Glucuronid-Konjugate vorliegen (zusammengefasst von Guillemette et al., 2004; Zhang und Henion, 1999).

Ziel war es daher, eine Methode zu entwickeln, die neben frei vorliegenden Estrogenen ebenfalls den Anteil von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten erfasst. Dafür wurden Vorarbeiten in Standardlösungen durchgeführt, die in weiterführenden Arbeiten auf Brustgewebe übertragen werden können.

E2-Konjugate sind aufgrund ihrer Struktur und Polarität nicht gaschromatographisch zu erfassen, so dass eine Hydrolyse dieser Konjugate notwendig wurde. Infolge fehlender Angaben in der Literatur über die Spaltung von Glucuroniden und Sulfaten wurde deren Spaltungseffizienz in Standardlösungen hinsichtlich der Modell-Substrate E2-3-G und E2-3-S überprüft (Kap. 2.1.1). Dabei war es Ziel, E2 vollständig aus den entsprechenden Konjugaten freizusetzen und es somit für eine Analyse mittels GC zugänglich zu machen.

Zunächst sollte eine einfache, möglichst preiswerte Methode zur selektiven Spaltung von E2-Sulfaten entwickelt werden. Nach Belanger et al. (1990) wurde E2-3-S aus Blutplasma und Prostata durch Säurehydrolyse ohne Einsatz kostenintensiver Enzyme zu freiem E2 hydrolysiert, so dass in Anlehnung daran, zur Spaltung von Sulfaten eine saure Hydrolyse unter Verwendung von 12 M HCL getestet wurde. Von Rogan et al. (2003) wurden Estrogen-

Konjugate im Brustgewebe durch Inkubation mit dem Magensekret der *helix pomatia* (Weinbergsschnecke) gespalten. *Helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2 und Typ H-1) weist neben einer β -Glucuronidase-Aktivität ebenfalls in geringerem Umfang eine Sulfatase-Aktivität auf (Trontelj, 2012; Produktinformation *helix pomatia*, Sigma Aldrich). Da bisher unbekannt ist, mit welcher Aktivität diese Enzyme E2-3-S und E2-3-G zu freiem E2 hydrolysieren, wurden deren Spaltungseffizienzen im Rahmen der enzymatischen Hydrolyse mit Schneckensaft aus *helix pomatia* bestimmt. Aufgrund der gleichzeitigen β -Glucuronidase- und Sulfatase-Aktivität führte dessen Verwendung jedoch zu einer simultanen Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten, wodurch eine selektive Bestimmung von E2 aus Glucuronid- beziehungsweise Sulfat-Konjugaten nicht möglich war. Daher wurde einerseits eine kompetitive Hemmung der β -Glucuronidase mittels verschiedener Inhibitoren getestet, um den Anteil von E2 aus Sulfat-Konjugaten zu bestimmen. Andererseits wurde in diesem Zusammenhang die Spaltungseffizienz reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) überprüft, um eine selektive Bestimmung von Glucuronid-Konjugaten zu ermöglichen.

Zur Überprüfung der Spaltungseffizienz wurden äquimolare Mengen einer Positivkontrolle (E2) und Testansätze bestehend aus E2-3-G beziehungsweise E2-3-S und dem ISTD E1 in Sörensen Phosphat-Puffer chemisch (Kap. 4.2.14.2) beziehungsweise enzymatisch (Kap. 4.2.14.1.1) für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad behandelt, die wässrige Phase nach Extraktion mit Ethylacetat auf einen pH-Wert von 4,9 eingestellt und das gesplattene E2 nach Derivatisierung mittels GC/FID analysiert (Kap. 4.2.22).

Zur Überprüfung der Inhibitoren für β -Glucuronidase aus *helix pomatia*-Extrakt wurden die Testansätze aus E2-3-G und β -Glucuronidase mit SA, SAL beziehungsweise GA inkubiert und im Anschluss den oben genannten Bedingungen unterzogen (Kap. 4.2.14.3).

Für die Bestimmung der Spaltungseffizienz wurde für die Positivkontrolle und den E2-Konjugaten das PFV von E2 zum ISTD E1 berechnet und das PFV der Positivkontrolle auf 100% gesetzt.

Im Fall einer vollständigen Konjugatspaltung sollte für die chemisch beziehungsweise enzymatisch behandelten Glucuronid- beziehungsweise Sulfat-Proben und der Positivkontrolle nahezu das gleiche relative PFV ermittelt werden.

5.3.4.1 Säurehydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten

Eine Möglichkeit zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten stellt die Säure-katalysierte Hydrolyse dar.

Nach 16 h Inkubation bei 37°C unter Einwirkung von 12 M HCl wurde das gesplattene E2 mittels GC/FID bestimmt (Kap. 4.2.22). Um einen möglichen Einfluss der Pufferstärke auf die Hydrolyse zu untersuchen, wurden die Inkubationen in 1-fach und 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 1 nmol E2 verwendet, welches mit 100 μ l 12 M

HCl inkubiert wurde. Die Testansätze, bestehend aus 1 nmol E2-3-G beziehungsweise 1 nmol E2-3-S, wurden ebenfalls mit 100 µl 12 M HCl inkubiert und das freigesetzte E2 nach Aufarbeitung und Derivatisierung (Kap. 4.2.14.2) mittels GC/FID analysiert (Kap. 4.2.22).

Während E2-3-S bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer zu $18,5 \pm 1,9\%$ gespalten wurde, betrug die Spaltungseffizienz unter den gleichen Inkubationsbedingungen in 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer $15,4 \pm 1,3\%$ (Abb. 27), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied resultierte (Abb. 27; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Glucuronid-Konjugate wurden unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse weder in 1-fach noch in 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer gespalten, da nach gaschromatographischer Analyse kein E2 detektierbar war (Abb. 27).

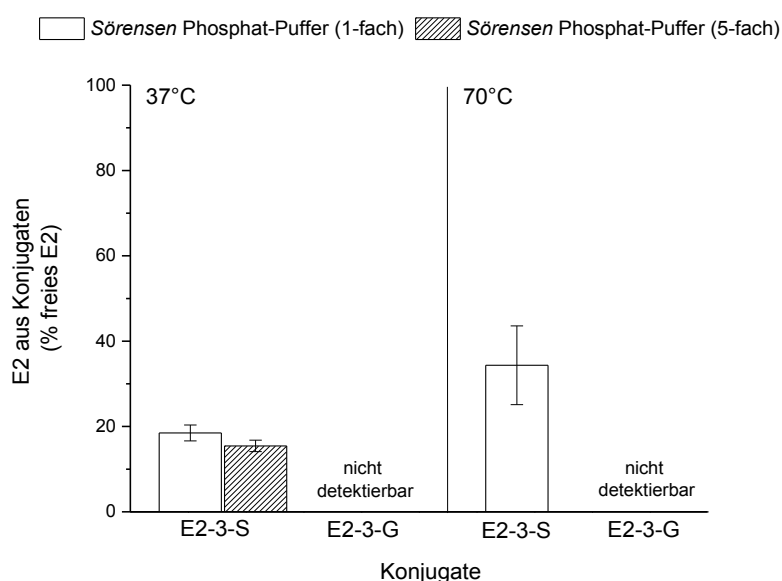


Abb. 27: Spaltungseffizienz von 1 nmol E2-3-S und 1 nmol E2-3-G in 1-fach beziehungsweise 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Alle Testansätze und die Positivkontrollen (1 nmol E2) wurden mit 1 nmol E1 als ISTD dotiert, jeweils unter Zugabe von 100 µl 12 M HCl den jeweiligen Inkubationsbedingungen unterzogen und anschließend nach Extraktion mit Ethylacetat mittels GC/FID analysiert. Das PFV der Positivkontrolle wurde jeweils auf 100% gesetzt und betrug in 1-fach beziehungsweise 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer $1,23 \pm 0,07$ sowie $1,49 \pm 0,02$. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) des gespaltenen E2 aus E2-3-S und E2-3-G. Signifikante Unterschiede zwischen den resultierenden Spaltungseffizienzen wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 78 - Tab. 80.

Infolge der schlechten Spaltungseffizienz wurde die Inkubationstemperatur auf 70°C erhöht. Unter diesen Bedingungen wurde für E2-3-S eine Spaltungseffizienz von $34,4 \pm 9,2\%$ in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer erzielt (Abb. 27). Auf die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten hatte die Temperaturerhöhung keinen Einfluss, da nach gaschromatographischer Analyse ebenfalls kein E2 detektierbar war (Abb. 27).

Auch wenn sich bei einer Inkubationstemperatur von 70°C im Vergleich zur Inkubation bei 37°C die freigesetzte E2-Menge aus Sulfat-Konjugaten von $18,5 \pm 1,9\%$ auf $34,4 \pm 9,2\%$ erhöhen ließ und die Spaltungseffizienz fast verdoppelt wurde, ist die Säure-katalysierte Hydrolyse keine geeignete Methode zur Spaltung von Sulfat-Konjugaten, da diese nicht vollständig verlief. Des Weiteren war bei der Verwendung von 1-fach beziehungsweise 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer kein signifikanter Unterschied zwischen der Spaltungseffizienz bezüglich des Sulfat-Konjugates zu verfolgen, so dass bei der Verwendung von 1-fach beziehungsweise 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer ähnliche Spaltungseffizienzen zu erwarten sind. Damit erfolgte die sauer katalysierte Hydrolyse von E2-3-S bei 37°C in 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer mit $15,4 \pm 1,3\%$ etwa genauso so schlecht, wie in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer mit $18,5 \pm 1,9\%$. Ebenfalls als ungeeignet hatte sich die saure Hydrolyse für die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten herausgestellt, da unter den getesteten Inkubationsbedingungen kein E2 freigesetzt wurde (Abb. 27).

5.3.4.2 **Enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten**

Die Aktivität von Enzymen kann durch Verschiebung des Temperatur- und pH-Optimums, unterschiedliche Pufferstärken sowie letztendlich über Aktivitätserhöhung- beziehungsweise -erniedrigung beeinflusst werden, so dass deren variierender Einfluss auf die Spaltungseffizienz von E2-3-S und E2-3-G im Rahmen der enzymatischen Hydrolyse überprüft wurde. Neben β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2) standen ebenfalls reine β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) sowie gefriergetrocknete Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) zur Verfügung. In Hinblick der selektiven Spaltung von E2 aus Glucuronid- beziehungsweise Sulfat-Konjugaten wurde zunächst der Einfluss der oben genannten variierenden Inkubationsparameter in Gegenwart von β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2) getestet, wobei die optimierten Inkubationsbedingungen im Anschluss auf die Überprüfung der Spaltungseffizienz mit β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) beziehungsweise Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) übertragen wurden.

Von Rogan et al. (2003) wird die Spaltung von Estrogen-Konjugaten mit 10.000 U β -Glucuronidase aus *helix pomatia* beschrieben. In Anbetracht dessen, wurden Testansätze bestehend aus 1 nmol E2-3-G beziehungsweise 1 nmol E2-3-S ebenfalls mit 10.000 U β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2) inkubiert, wobei die Sulfatase-Aktivität diesbezüglich 50 U/Ansatz betrug. Das gespaltene E2 wurde im Anschluss nach der weiteren Aufarbeitung und Derivatisierung (Kap.4.2.14.4) mittels GC/FID bestimmt (Kap. 4.2.22). Dabei wurde der pH-Wert des *Sörensen* Phosphat-Puffers zunächst auf 4,9 eingestellt, da dieser dem optimalen pH-Wert der β -Glucuronidase entspricht (Produktinformation *helix pomatia*, Sigma Al-

drich). Als Positivkontrolle wurde 1 nmol E2 verwendet, welches ebenfalls mit 50 U Sulfatase und 10.000 U β -Glucuronidase von *helix pomatia* (Typ HP-2) inkubiert wurde.

Während für E2-3-G in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer eine Spaltungseffizienz von $85,4 \pm 4,3\%$ resultierte, betrug diese für E2-3-S $30,2 \pm 2,8\%$ (Abb. 28). Die Spaltung der Sulfat-Konjugate erfolgte demnach über 35% schlechter, als die der Glucuronid-Konjugate.

Um die geringe Spaltungseffizienz der Sulfatase zu verbessern, wurde der pH-Wert des *Sörensen* Phosphat-Puffers auf den optimalen pH der Sulfatase von 6,2 eingestellt (Produktinformation *helix pomatia*, Sigma Aldrich). Unter diesen Bedingungen wurde das Sulfat-Konjugat zu $30,0 \pm 1,5\%$ hydrolysiert, wobei in Hinblick der Spaltungseffizienz bei pH 4,9 kein statistisch signifikanter Unterschied resultierte (Abb. 28; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Auf die Überprüfung des Einflusses der pH-Wert-Erhöhung auf die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten wurde in diesem Zusammenhang verzichtet.

Weiterhin wurde der Einfluss der Pufferstärke auf die Spaltungseffizienz untersucht. In 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer wurde für 1 nmol E2-3-G mit β -Glucuronidase aus *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2) eine Spaltungseffizienz von $85,8 \pm 2,8\%$ ermittelt (Abb. 28). Bezüglich der Spaltungseffizienz von $85,4 \pm 4,3\%$ in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer war kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb. 28), so dass ein Einfluss der Pufferstärke auf die Hydrolyse von Glucuronid-Konjugaten ausgeschlossen wurde.

Aufgrund der gleichzeitigen Sulfatase- und β -Glucuronidase-Aktivität von *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2) ist eine getrennte Bestimmung von E2 aus Glucuronid- beziehungsweise Sulfat-Konjugaten nicht möglich. Zur selektiven Bestimmung von E2 aus Glucuronid-Konjugaten wurde reine β -Glucuronidase aus Rinderleber getestet (Typ B-1).

Nach der Inkubation von 1 nmol E2-3-G mit 10.000 U β -Glucuronidase aus Rinderleber resultierte in 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer eine Spaltungseffizienz von $84,6 \pm 4,3\%$ (Abb. 28). Im Vergleich zur Spaltungseffizienz mit β -Glucuronidase aus *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2) war kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb. 28; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), so dass bei der Verwendung reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber keine Erhöhung der Hydrolyse von Glucuronid-Konjugaten zu verzeichnen war. Bei der Untersuchung des Einflusses der Pufferstärke auf die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten wurde bei Verwendung von 1-fach beziehungsweise 5-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer kein signifikanter Unterschied bezüglich der Spaltungseffizienz festgestellt (Abb. 28; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), so dass diese Ergebnisse im Anschluss auf die Hydrolyse von Glucuronid-Konjugaten in Gegenwart reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber übertragen wurden. Die Spaltungseffizienz von Sulfat-Konjugaten wurde nicht in Gegenwart unterschiedlicher Pufferstärken getestet. Da sich jedoch zeigte, dass die Pufferstärke des *Sörensen* Phosphat-Puffers keinen Einfluss auf die Spaltung von Glucuroniden besitzt, wurden alle weiteren Versuche zur Hydrolyse von E2-Konjugaten in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer durchgeführt. Aufgrund der

fehlenden Sulfatase-Aktivität hatte die Verwendung von reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber keinen Einfluss auf die Spaltung von Sulfat-Konjugaten, so dass nach gaschromatographischer Analyse kein E2 zu detektieren war (nicht dargestellt).

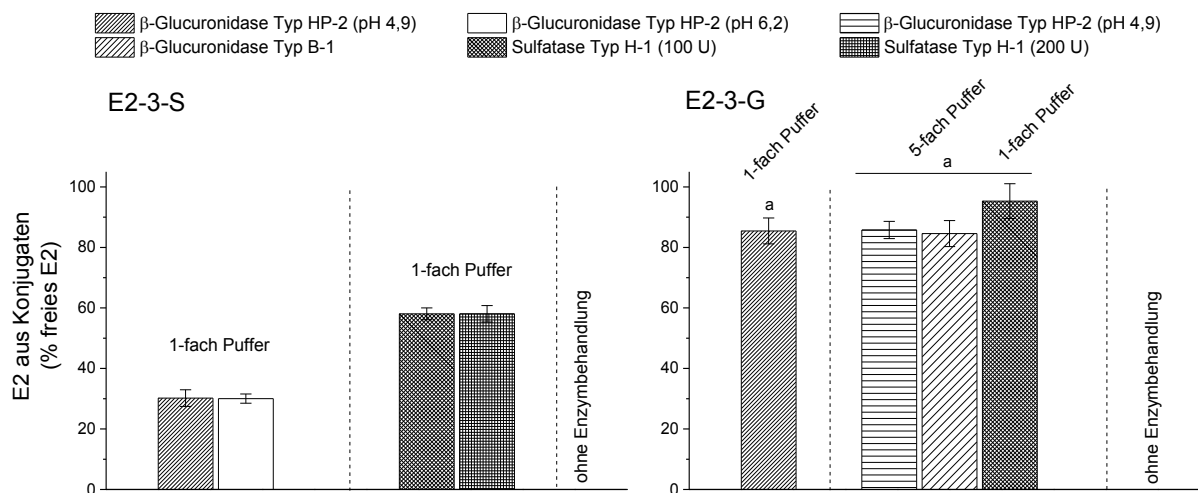


Abb. 28: Enzymatische Spaltungseffizienz von je 1 nmol E2-3-S und E2-3-G mit β -Glucuronidase und Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ HP-2 beziehungsweise H-1) und reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) in Gegenwart verschiedener Sørensen Phosphat-Pufferstärken. Als ISTD diente je 1 nmol E1 unter Verwendung einer β -Glucuronidase-Aktivität von 10.000 U/Ansatz beziehungsweise Sulfatase-Aktivität von 50 U/Ansatz (Typ HP-2). Die β -Glucuronidase-Aktivität des Typs B-1 betrug ebenfalls 10.000 U/Ansatz. Bei Verwendung von Sulfatase (Typ H-1) betrug die Sulfatase-Aktivität 100 U/Ansatz beziehungsweise 200 U/Ansatz. Die β -Glucuronidase-Aktivität betrug dabei 1872 U/Ansatz beziehungsweise 3744 U/Ansatz. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37°C mit anschließender GC/FID-Analyse. Für die Bestimmung der Spaltungseffizienz wurde für die Positivkontrolle und E2-3-S sowie E2-3-G das PFV von E2 zum ISTD berechnet und das PFV der Positivkontrolle auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) des gespaltenen E2 aus E2-3-S und E2-3-G. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede bei der Spaltungseffizienz von E2-3-G (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Spaltungseffizienz von E2-3-S wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 81 - Tab. 84.

Da die Spaltung des Sulfat-Konjugates mit 50 U Sulfatase aus *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2) bei einem pH-Wert von 4,9 lediglich zu $30,2 \pm 2,8\%$ erfolgte, wurde die Sulfatase-Aktivität auf 100 U/Ansatz erhöht, um ebenfalls eine Erhöhung der Konjugat-Hydrolyse zu erzielen. Dazu wurde gefriergetrocknete Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) getestet, welche eine restliche β -Glucuronidase-Aktivität von 1872 U/Ansatz besaß.

E2-3-S wurde unter Verwendung von Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) zu $58,1 \pm 2,0\%$ gespalten (Abb. 28), so dass die Spaltungseffizienz der Sulfat-Konjugate fast verdoppelt wurde. E2-3-G wurde zu $95,3 \pm 5,7\%$ gespalten (Abb. 28). Demnach wurden mit Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) ähnliche Ergebnisse wie bei der Hydrolyse mit *helix pomatia* Extrakt

und β -Glucuronidase aus Rinderleber erzielt (Abb. 28), wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede resultierten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Um die Spaltungseffizienz der Sulfat-Konjugate weiterhin zu verbessern, wurde die Sulfatase-Aktivität verdoppelt. Diesbezüglich hatte eine Sulfatase-Aktivität von 200 U/Ansatz keinen steigenden Effekt auf die Spaltungseffizienz von E2-3-S, da dieses lediglich zu $58,1 \pm 2,7\%$ hydrolysiert wurde und die freigesetzte E2-Menge der aus den Testansätzen mit 100 U Sulfatase/Ansatz entsprach (Abb. 28). Vermutlich lag bei einer Sulfatase-Aktivität von 100 U/Ansatz bereits eine Enzymsättigung vor, so dass bei deren Aktivitätserhöhung nicht mehr E2 freigesetzt wurde. Eine Messung der Enzymkinetik, die diese These bestätigt, wurde jedoch nicht durchgeführt. Auf die Überprüfung des Einflusses der Erhöhung der Sulfatase-Aktivität auf die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten wurde in diesem Zusammenhang verzichtet. Ferner fand ohne Enzymzugabe sowohl bei E2-3-G als auch bei E2-3-S keine spontane Hydrolyse in 1-fach beziehungsweise 5-fach Sörensen Phosphat-Puffer statt, da nach gaschromatographischer Analyse von 1 nmol E2-3-G beziehungsweise 1 nmol E2-3-S kein E2 zu detektieren war (Abb. 28).

Für eine selektive Bestimmung von E2 aus Sulfat-Konjugaten war es notwendig, die verbleibende β -Glucuronidase-Aktivität zu hemmen. Daher wurden im Folgenden verschiedene Inhibitoren der β -Glucuronidase auf deren Verwendbarkeit getestet (Kap. 5.3.4.3).

5.3.4.3 **Überprüfung verschiedener Inhibitoren für β -Glucuronidase aus *helix pomatia***

Die Verwendung von Schneckensaft aus *helix pomatia*-Extrakt führt aufgrund der gleichzeitigen β -Glucuronidase- und Sulfatase-Aktivität zu einer simultanen Spaltung von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten. Zur selektiven Bestimmung von Sulfat-Konjugaten wurde daher eine kompetitive Hemmung der β -Glucuronidase aus *helix pomatia*-Extrakt (Typ HP-2) durchgeführt.

Dafür wurden Testansätze bestehend aus 1 nmol E2-3-G und 10.000 U β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2) mit SA, SAL beziehungsweise GA inkubiert und das gespaltene E2 im Anschluss nach der weiteren Aufarbeitung und Derivatisierung (Kap. 4.2.14.3) mittels GC/FID analysiert (Kap. 4.2.22).

Für SAL wurde eine Hemmkonzentration von 10 mM getestet (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Marie Schober, 2011). Um diesbezüglich eine vergleichbare Inhibitorwirkung der SA auf β -Glucuronidase zu erreichen, wurde nach Levvy et al. (1958) die 300-fache Konzentration von SA im Vergleich zu SAL verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit von SA in wässrigen Lösungen wurde eine Konzentration von 100 nM getestet. Für GA wurde die inhibierende Wirkung auf β -Glucuronidase von *helix pomatia* in Konzentrationen von 150 nM und 200 nM

überprüft, da für eine 50%ige Hemmung der β -Glucuronidase aus *helix pomatia* mit dem Substrat Phenolphthalein-Glucuronid 100 mM GA verwendet wurden (Levy et al., 1958). Bei einer Konzentration von 150 mM beziehungsweise 200 mM GA wurde keine Hemmung der β -Glucuronidase (Typ HP-2) beobachtet (Anhang, Abb. 99), so dass eine Konzentration von 500 mM GA getestet wurde (Abb. 29).

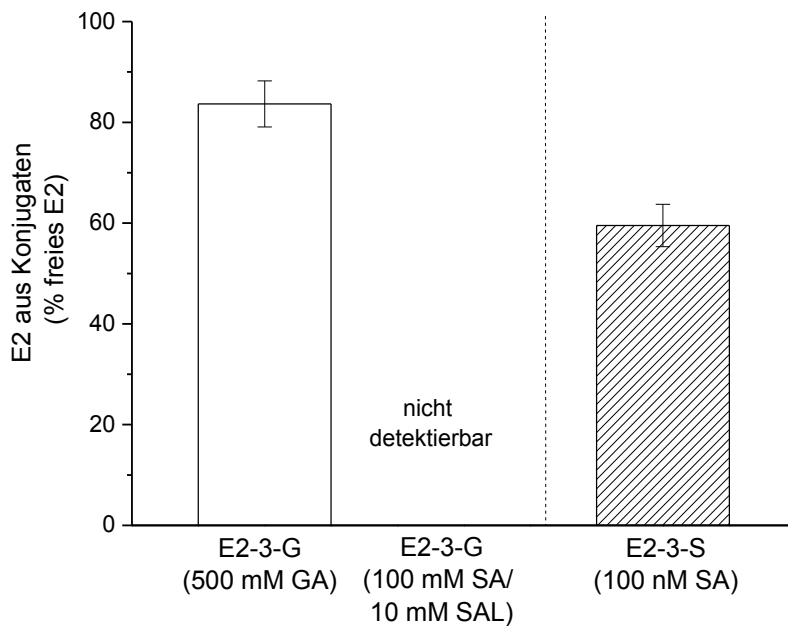


Abb. 29: Überprüfung der Hemmwirkung von 100 mM SA, 10 mM, SAL und 500 mM GA auf 10.000 U β -Glucuronidase (Typ HP-2) aus *helix pomatia* mit 1 nmol E2-3-G beziehungsweise E2-3-S als Substrat im 2 ml Inkubationsansatz (pH 4,9). Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad mit anschließender GC/FID-Analyse. Das PFV der Positivkontrolle, wurde auf 100% gesetzt und betrug $1,23 \pm 0,03$. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) des gespaltenen E2 aus E2-3-S und E2-3-G. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 85.

Auch diesbezüglich resultierte keine Hemmung der β -Glucuronidase, da 1 nmol E2-3-G unter Einwirkung von 500 mM GA zu $83,7 \pm 4,6\%$ gespalten wurde (Abb. 29). Auf weitere Versuche zur Überprüfung der Inhibitorwirkung von GA auf β -Glucuronidase (Typ HP-2) wurde verzichtet, da durch Steigerung der Konzentration von GA im 2 ml Inkubationsansatz die entsprechende Einwaage zu groß wurde.

Bei der Verwendung von 100 mM SA und 10 mM SAL war nach der Inkubation von E2-3-G und 100 mM SA beziehungsweise 10 mM SAL mit β -Glucuronidase kein E2 nachzuweisen (Abb. 29). Ein qualitativer Nachweis von E2 war folglich nicht möglich, so dass sich die Hemmung der β -Glucuronidase (Typ HP-2) mit 100 mM SA und 10 mM SAL als vollständig herausstellte. Ansätze mit Sulfat-Konjugaten wurden bei der Inkubation mit Inhibitor zu $59,5 \pm 4,2\%$ gespalten (Abb. 29) und wurden daher aufgrund der fehlenden Glucuronidase-Aktivität gleichermaßen gespalten, wie ohne einen β -Glucuronidase Inhibitor (Kap. 5.3.4.2).

Um zu überprüfen, ob die ermittelte Spaltungseffizienz von Sulfatase (Typ H-1) und β -Glucuronidase (Typ B-1) hinsichtlich der Konjugate E2-3-G und E2-3-S (Kap. 5.3.4.2) mit physiologischen Bedingungen vergleichbar ist, wurde deren Spaltungseffizienz ebenfalls in Substratmischungen überprüft. Unter Zusatz von β -Glucuronidase (Typ B-1) betrug die Spaltungseffizienz für Glucuronid-Konjugate $97,6 \pm 2,3\%$ (Anhang, Abb. 100, Tab. 86). Sulfat-Konjugate wurden in diesem Zusammenhang unter Zugabe von Sulfatase (Typ H-1) und SA zu $58,6 \pm 3,5\%$ gespalten (Anhang, Abb. 100, Tab. 86). E2-3-G und E2-3-S wurden daher in Substratmischungen gleichermaßen gespalten, wie in einzelnen Standardlösungen (getestet mittels, Mittelwert t-Test, $p < 0,05$; Anhang, Abb. 100, Tab. 86).

Abschließend ist festzuhalten, dass eine Methode entwickelt wurde, welche die spezifische Spaltung von E2-Konjugaten ermöglicht. Auch wenn sich die Säurehydrolyse für die Spaltung von Konjugaten, infolge der unvollständigen beziehungsweise fehlenden Hydrolyse von Sulfaten und Glucuroniden, als ungeeignet herausstellte (Kap. 5.3.4.1), sind die Versuche zur enzymatischen Hydrolyse (Kap. 5.3.4.2) bei weiterführenden Arbeiten auf Brustgewebe zu übertragen. Demnach kann der Einfluss von Matrixeffekten auf die enzymatische Hydrolyse von E2-3-G und E2-3-S in Brustgewebe überprüft und anschließend mit den in einzelnen Standardlösungen beziehungsweise Substratmischungen ermittelten Werten verglichen werden. Dabei ist für die Bestimmung von E2 aus Glucuroniden β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) zu verwenden, während für die spezifische Spaltung von Sulfat-Konjugaten Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) heranzuziehen ist. Eine vollständige kompetitive Hemmung der β -Glucuronidase-Aktivität wurde mit 100 mM SA der 10 mM SAL erzielt. Folglich kann neben frei vorliegenden Estrogenen, die entsprechend Kap. 5.6.1 ohne chemische oder enzymatische Hydrolyse detektiert werden, ebenfalls der Anteil von Estrogenen bestimmt werden, welcher glucuronidiert beziehungsweise sulfoniert im Brustgewebe vorliegt.

Zu diesem Zweck ist es notwendig die Probenansätze aufgrund der komplexen Matrix sowie der geringen Konzentrationen von E1- und E2-Metaboliten (Rogen et al., 2003) mittels SPE aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Um den Analyt-Verlust in diesem Zusammenhang abzuschätzen, wurde im Folgenden die WFR von E1- und E2-Metaboliten unter Berücksichtigung der SPE sowie der enzymatischen Hydrolyse ermittelt.

5.3.5 Einfluss der Festphasenextraktion und der enzymatischen Hydrolyse auf die Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten

Für E1- und E2-Metabolite sind im Brustgewebe Konzentrationen im unteren pg-Bereich pro Gramm Gewebe zu erwarten (Rogen et al., 2003). Aufgrund dessen sowie in Anbetracht der komplexen Matrix ist es im Rahmen der Aufarbeitung notwendig, die Proben über eine SPE-

Säule aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Um für weiterführende Arbeiten den Verlust der Analyten bei der Hydrolyse von Sulfat- und Glucuronid-Konjugaten abzuschätzen, wurde der Einfluss der enzymatischen Hydrolyse für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad mit Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) beziehungsweise β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) ebenfalls in die Betrachtung einbezogen (Kap. 5.3.4).

Um einen eventuellen Einfluss der SPE und der Inkubation auf den Verlust von E1, E2 und den Metaboliten zu ermitteln, wurde ein Mastermix bestehend aus Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer Referenzmischung, bestehend aus E1, E2 sowie den jeweiligen hydroxylierten und methylierten Metaboliten auf vier Testansätze aufgeteilt (Kap. 4.2.15). Dabei wurde jeweils ein Testansatz mit beziehungsweise ohne Inkubation behandelt (Kap. 4.2.15). Ansätze ohne Inkubation wurden nach der Extraktion mit 2 ml Chloroform sofort mittels SPE aufgereinigt und im Anschluss mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.1), während bei den Ansätzen mit Inkubation die Chloroformextraktion erst im Anschluss der Temperaturbehandlung erfolgte. Nach dem Evaporieren der Chloroformphase bis zur Trockene erfolgte für Letztere Testansätze analog derjenigen ohne Inkubation eine Aufnahme des Rückstandes in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) sowie die Aufreinigung über eine SPE-Säule (Kap. 4.2.15).

Bei der Spaltung von Glucuroniden mit β -Glucuronidase aus *helix pomatia* ist eine Bindung der Glucuronide an deren Enzymproteine möglich, wobei neben einer verminderten Spaltungseffizienz der β -Glucuronidase ein erhöhter Analyt-Verlust beobachtet wurde (Trontelj, 2012). Demnach ist ebenfalls bei der Inkubation von E1- und E2-Metaboliten mit β -Glucuronidase oder Sulfatase eine Bindung an die jeweiligen Enzymproteine denkbar, wodurch der Analyt im Rahmen der SPE nicht mehr vollständig an die stationäre Phase bindet und demnach ein gewisser Teil des Analyten verloren geht. Um den Einfluss der Enzymzugabe auf den Verlust von E1- und E2-Metaboliten zu überprüfen, wurde deren WFR nach der Inkubation mit β -Glucuronidase oder Sulfatase bestimmt (Kap. 4.2.15).

Im Normalfall ist für alle Testansätze eines Metaboliten ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen WFR auszuschließen, da weder eine Inkubationsbehandlung noch die Enzymzugabe von β -Glucuronidase oder Sulfatase zu einem signifikanten Analyt-Verlust führen sollten. Auch wenn Analyt-Verluste durch die SPE nicht vermeidbar sind (Makin et al., 2010), ist für alle Testansätze eines Metaboliten ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen WFR auszuschließen, da sich Verluste infolge der SPE bei allen Testansätzen gleichermaßen widerspiegeln sollten. Bei den enzymatisch behandelten Testansätzen wäre zwar eine Erhöhung der WFR von E2 durch die Spaltung von E2-Konjugaten möglich, da aber auf die Zugabe von Sulfaten und Glucuroniden verzichtet wurde, sollten alle Testansätze vergleichbare WFR aufweisen.

Zur Bestimmung der WFR wurde eine Metabolitenmischung definierter Konzentration bestehend aus E1, E2 sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite (Kap. 4.2.15) als Referenzpunkt bis zur Trockene evaporiert, derivatisiert und anschließend mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.2). Auf die Zugabe eines ISTD wurde verzichtet, da eventuelle Geräteschwankungen durch die randomisierte Messung der Proben ausgeglichen wurden.

Wiederfindung von E2 und E1

Wenn auch für E2 bei allen Testansätzen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen WFR vorhanden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$) war, resultierten lediglich bei sofortiger Aufarbeitung und der Aufarbeitung nach Inkubation mit $58,7 \pm 8,7\%$ beziehungsweise $61,4 \pm 15,8\%$ vergleichbare WFR (Abb. 31), so dass die Inkubationsbehandlung nicht zu einem höheren Analyt-Verlust führte. Bei den enzymatisch behandelten Ansätzen waren die WFR deutlich schlechter. Nach der Inkubation mit β -Glucuronidase beziehungsweise Sulfatase war E2 lediglich zu $41,7 \pm 14,3\%$ und $46,8 \pm 8,8\%$ in der organischen Phase (Abb. 31). Diesbezüglich war der Verlust im Vergleich zu den Testansätzen, die nach Inkubation der SPE unterzogen wurden, durchschnittlich um $19,7\%$ und $14,6\%$ höher. Da ein signifikanter Analyt-Verlust durch die Inkubationsbehandlung ausgeschlossen wurde, sind die geringeren WFR bei der Zugabe von β -Glucuronidase oder Sulfatase auf die Bindung von E2 an deren Proteine zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse waren für E1 zu verfolgen. Während die WFR nach sofortiger Aufarbeitung sowie der Aufarbeitung nach Inkubation mit $69,9 \pm 16,3\%$ beziehungsweise $63,0 \pm 5,5\%$ vergleichbar waren (Abb. 31), resultierten nach der Inkubation mit β -Glucuronidase oder Sulfatase, infolge der Bindung von E1 an Enzymproteine, größere Verluste ($48,3 \pm 14,4\%$ und $53,1 \pm 3,6\%$), wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede resultierten (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Wiederfindung von E2- und E1-Hydroxylierungsprodukten

Bei den Testansätzen der sofortigen Aufarbeitung resultierten für 2- und 4-HO-E2 WFR von $417,5 \pm 152,9\%$ und $175,0 \pm 64,2\%$ (Abb. 31). Bei 2- und 4-HO-E1 wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet. Diesbezüglich betrug die WFR $306,2 \pm 71,9\%$ für 2-HO-E1 beziehungsweise $181,7 \pm 72,4\%$ für 4-HO-E2 (Abb. 31).

Folglich waren bei den Catechol-Estrogenen die absoluten PF nach sofortiger Aufarbeitung mittels SPE im Vergleich zur Referenzlösung signifikant größer, so dass diesbezüglich Catechole von E1 und E2 generiert wurden.

Estrogene werden ausgehend vom Cholesterin synthetisiert (zusammengefasst von Mitrunen und Hirvonen, 2003). Infolge deren strukturellen Ähnlichkeit können chemische Reaktionen des Cholesterins ebenfalls auf Estrogene übertragen werden (Abb. 30). Die Autoxidation des

Cholesterols erfolgt unter anderem in Gegenwart von Luftsauerstoff an der Doppelbindung des B-Rings (Smith, 1987). Möglicherweise sind bei der sofortigen Aufarbeitung mittels SPE auch E1 und E2 durch Oxidation an der Doppelbindung von C2 beziehungsweise C4 des aromatischen A-Rings zu 2-HO-E1 und 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E1 und 4-HO-E2 umgewandelt worden (Abb. 30).

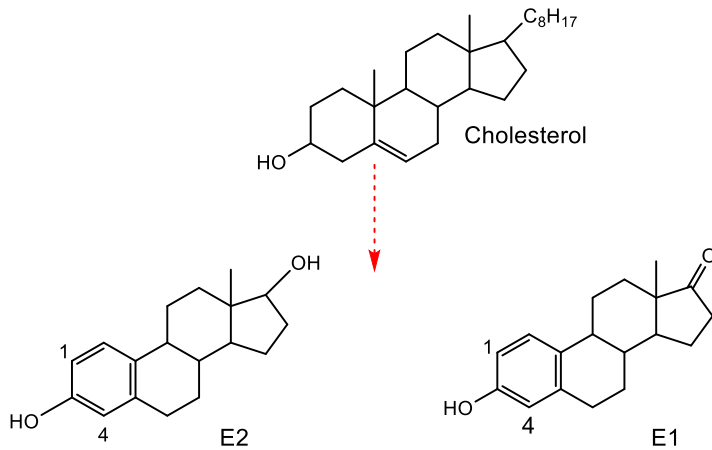


Abb. 30: Molekülstruktur von Cholesterol, E1 und E2.

Da die Verluste von E1 und E2 bei sofortiger Aufarbeitung mittels SPE durchschnittlich mit 31,1% und 41,3% sehr hoch waren (Abb. 31), ist es möglich, dass diese nicht nur aufgrund der Probenaufarbeitung mittels SPE sondern ebenfalls durch deren Umwandlung zu E1- und E2-Catecholen resultierten. Nach der Inkubation für 16 h bei 37°C mit beziehungsweise ohne Enzymzugabe und anschließender Aufarbeitung mittels SPE waren E1- und E2-Catechole nicht mehr nachzuweisen (Abb. 31). Möglicherweise wurden deren Verluste durch die zusätzliche Inkubation beziehungsweise der Inkubation mit Enzymzusatz so groß, dass diese nicht mehr nachzuweisen waren. Catechol-Estrogene sind jedoch auch als oxidationsempfindlich zu bewerten, wodurch eine Artefaktbildung während der Aufarbeitung einen kritischen Einflussfaktor auf die Analysenergebnisse darstellen könnte. Eventuell sind die Catechole von E1 und E2 während der Temperatur- und Enzymbehandlung über die Semichinone zu den entsprechenden Chinonen weiteroxidiert worden (Cavalieri et al., 2006; Rogen et al., 2003). Demnach wurde deren Anteil soweit reduziert, dass sie nicht mehr nachzuweisen waren (Abb. 31). Infolge dessen hätte bei der Inkubation des Standards eine Oxidation stattgefunden.

Da ebenfalls E1- und E2-Metabolite im Brustgewebe oxidationsempfindlich sind und folglich die Richtigkeit der Analysenergebnisse durch die Artefaktbildung beeinträchtigt ist, war es notwendig, die Bildung von Oxidationsprodukten ebenfalls in Gegenwart von Matrix zu überprüfen (Kap. 5.3.6). Ascorbinsäure und 1,4-Dithiothreitol werden in der Literatur vielfach zur Verringerung der Oxidation von Catechol-Estrogenen eingesetzt (Moon et al., 2011). Eine

Überprüfung deren Verwendbarkeit im Rahmen der hier beschriebenen Versuche wurde jedoch nicht durchgeführt.

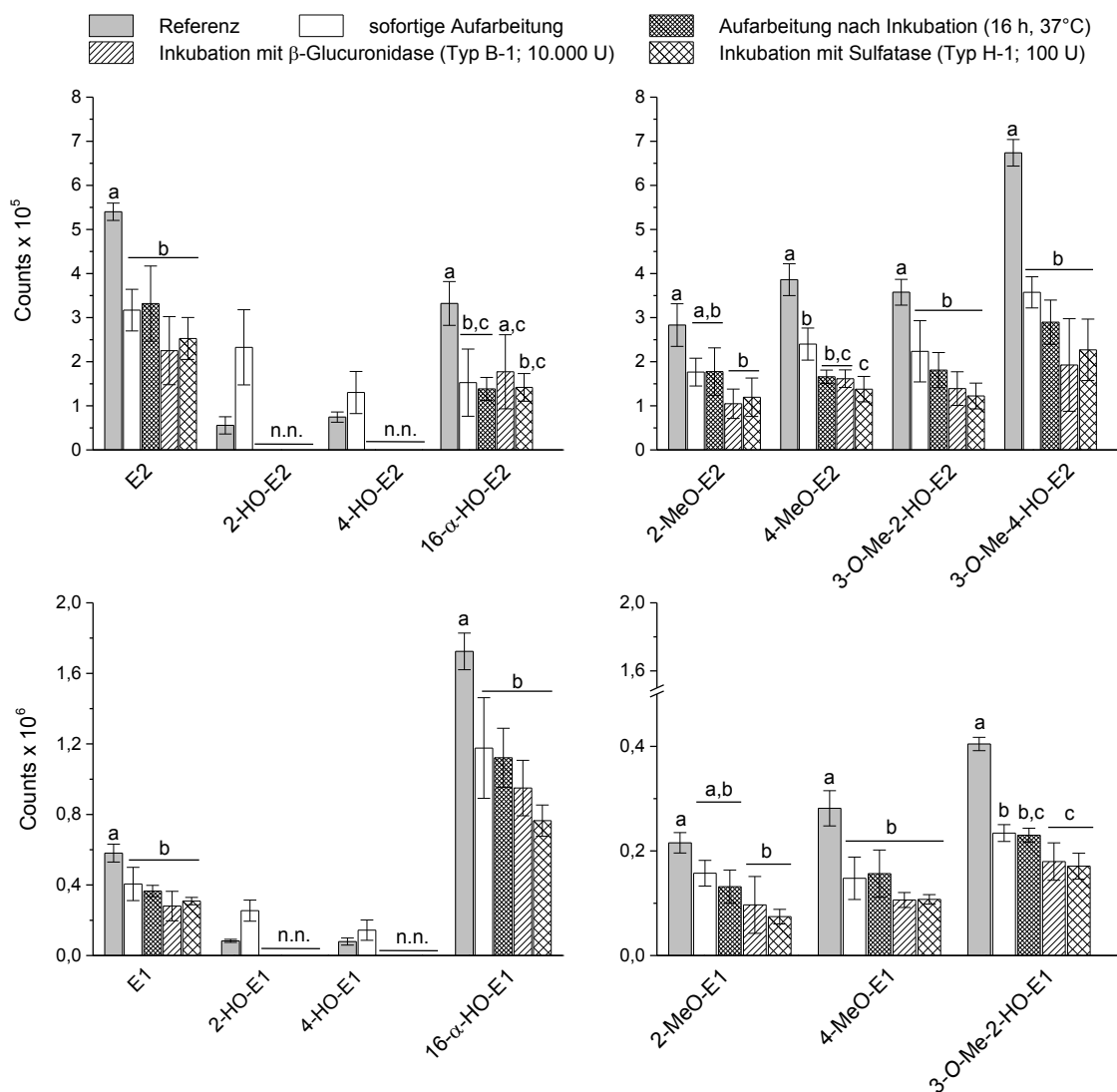


Abb. 31: Absolute PF von E2- und E1-Metaboliten nach Aufreinigung mittels SPE beziehungsweise Inkubation. Testansätze bestehend aus Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer E1-, E2-Metabolitenmischung wurden mit Chloroform extrahiert, die organische Phase bis zur Trockene evaporiert, anschließend in Phosphat-Puffer (20 % MeOH) aufgenommen und mittels SPE aufgereinigt. Die 85% MeOH-Fraktion wurde eluiert, bis zur Trockene evaporiert und im Anschluss derivatisiert. Testansätze, die einer Inkubation unterzogen wurden, sind für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad behandelt worden. Bei Enzymzusatz betrug die Sulfatase-Aktivität 100 U/Ansatz (Typ H-1). Bei einem Zusatz von β -Glucuronidase betrug die Aktivität 10.000 U/Ansatz (Typ B-1). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 4$ pg für E1, 2-/4-MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E1; E2, 2-/4-MeO-E2 = 5 pg; 2-/4-HO-E2, 2-/4-HO-E1, 16- α -HO-E2, 16- α -HO-E1, 3-O-Me-2/4-HO-E2 = 20 pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1. Rohdaten im Anhang, Tab. 87 und Tab. 88.

Entgegen 2- und 4-HO-E2 war für 16- α -HO-E2 bei allen Testansätzen keine Artefaktbildung zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen WFR waren ebenfalls nicht vorhanden (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Nach sofortiger Aufarbeitung war 16- α -HO-E2 zu $45,9 \pm 23,0\%$ in der organischen Phase, während nach Inkubation die WFR $41,6 \pm 7,8\%$ betrug (Abb. 31). Demnach war der Einfluss der Inkubation auf die WFR vernachlässigbar. Dieser Aspekt setzte sich bei 16- α -HO-E1 fort. Diesbezüglich lagen die WFR mit $68,2 \pm 16,5\%$ und $65,0 \pm 9,7\%$ ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 31), so dass ein signifikanter Analyt-Verlust durch die Inkubation ausgeschlossen wurde. Durch die Bindung an Enzymproteine waren die Verluste nach der Inkubation mit Enzymzusatz für beide Hydroxylierungsprodukte wesentlich größer. Demnach resultierte für 16- α -HO-E2 bei der Zugabe von β -Glucuronidase eine WFR von $53,4 \pm 25,3\%$ (Abb. 31). Nach der Inkubation mit Sulfatase war die WFR mit $42,7 \pm 9,4\%$ durchschnittlich noch um 10,7% kleiner (Abb. 31). Für 16- α -HO-E1 zeigte sich der Analyt-Verlust mit einer WFR von $55,1\% \pm 9,1\%$ beziehungsweise $44,3 \pm 5,1\%$ bei β -Glucuronidase- beziehungsweise Sulfatase-Zusatz wesentlich ausgeprägter, wobei jedoch ebenfalls bei allen Testansätzen kein signifikanter Unterschied zwischen den WFR beobachtet wurde (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Wiederfindung von E2- und E1-Methylierungsprodukten

Für 2-MeO-E2 resultierten ebenfalls bei allen Ansätzen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen WFR (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Bei den Ansätzen der sofortigen Aufarbeitung beziehungsweise der Aufarbeitung nach Inkubation lagen diese entsprechend der oben genannten Metabolite mit $62,3 \pm 11,1\%$ und $62,7 \pm 19,0\%$ in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 31). Bei der Inkubation mit β -Glucuronidase oder Sulfatase waren die WFR erheblich schlechter. Diesbezüglich war 2-MeO-E2 lediglich zu $36,9 \pm 11,7\%$ und $42,1 \pm 15,4\%$ in der organischen Phase (Abb. 31). Der durchschnittliche Verlust von 25,8% beziehungsweise 20,6% im Vergleich zu den Ansätzen, die nach Inkubation der SPE unterzogen wurden, ist ebenfalls auf die Bindung von 2-MeO-E2 an Enzymproteine zurückzuführen. Für 2-MeO-E1 waren ähnliche Ergebnisse zu beobachten. Die WFR betrug nach sofortiger Aufarbeitung beziehungsweise der Aufarbeitung nach Inkubation $73,0 \pm 11,4\%$ und $61,1 \pm 14,7\%$ (Abb. 31), während sich diese nach der Inkubation mit β -Glucuronidase oder Sulfatase auf $44,9 \pm 25,2\%$ und $34,5 \pm 6,5\%$ berechnete (Abb. 31). Für 4-MeO-E2 lag die WFR nach sofortiger Aufarbeitung bei $62,1 \pm 9,4\%$. Im Vergleich dazu resultierte nach Inkubation mit anschließender SPE eine WFR von $43,0 \pm 3,9\%$ (Abb. 31). Auch wenn diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zu beobachten war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), ist die WFR nach Inkubation durchschnittlich um 19,1% schlechter, so dass im Vergleich zu den oben genannten Metaboliten die Inkubationsbehandlung bei 4-MeO-E2 zu höheren Verlusten führte. Dieser Aspekt war ebenfalls auf 2-MeO-E1 und 3-O-Me-4-HO-E2 zu übertragen. Im Vergleich

zu den Ansätzen der sofortigen Aufarbeitung resultierten bei einer zusätzlichen Inkubationsbehandlung Analyt-Verlust über 10%, so dass diesbezüglich höhere Verluste zu berücksichtigen sind. Ferner resultierte nach Inkubationsbehandlung mit Sulfatase für 4-MeO-E2 eine WFR von $35,7 \pm 7,5\%$ (Abb. 31), wobei bezüglich der mit β -Glucuronidase behandelten Testansätze ($39,9 \pm 2,1\%$) als auch derjenigen, die nach Inkubation der SPE unterzogen wurden ($43,0 \pm 3,9\%$), keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied resultierte bei der Verwendung von Sulfatase im Vergleich zu den Testansätzen ohne Inkubationsbehandlung (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), so dass unter anderem am Beispiel von 4-MeO-E2 der Verlust von Analyten durch das Binden an Enzymproteine am stärksten verdeutlicht wurde. Für 4-MeO-E1 waren keine signifikanten Unterschiede zu verfolgen (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Die WFR betrug nach sofortiger Aufarbeitung beziehungsweise der Aufarbeitung nach Inkubation $52,5 \pm 14,4\%$ und $55,6 \pm 16,0\%$ (Abb. 31). Nach der Inkubation mit β -Glucuronidase oder Sulfatase berechnete sich diese auf $37,7 \pm 5,1\%$ und $38,1 \pm 3,2\%$ (Abb. 31).

Für 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 wurden ebenfalls zwischen allen Ansätzen keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Während entsprechend 4-MeO-E2 und 2-MeO-E1 für letzteren Metaboliten nach Inkubationsbehandlung im Vergleich zur sofortigen Aufarbeitung höhere Verluste beobachtet wurden ($53,0 \pm 5,2\%$ beziehungsweise $42,9 \pm 7,4\%$), waren diese für 3-O-Me-2-HO-E2 mit $55,1 \pm 6,8\%$ und $50,6 \pm 11,1\%$ vernachlässigbar (Abb. 31). Höhere Verluste resultierten wiederum bei Enzymzugabe. Diesbezüglich berechnete sich die WFR für 3-O-Me-4-HO-E2 bei β -Glucuronidase-Zusatz auf $28,6 \pm 15,6\%$. Bei der Verwendung von Sulfatase betrug diese $36,0 \pm 8,7\%$ (Abb. 31). Bei 3-O-Me-2-HO-E2 war der Verlust bei Enzymzugabe mit einer WFR von $38,9 \pm 10,7\%$ (β -Glucuronidase-Zusatz) und $37,3 \pm 3,0\%$ (Sulfatase-Zusatz) in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 31).

Für 3-O-Me-2-HO-E1 waren ohne Enzymbehandlung mit $59,4 \pm 1,4\%$ (sofortige Aufarbeitung) und $56,9 \pm 3,3\%$ (Aufarbeitung nach Inkubation) vergleichbare WFR zu beobachten, so dass ein signifikanter Analyt-Verlust durch die alleinige Inkubationsbehandlung ausgeschlossen wurde (Abb. 31). Bei der Verwendung von β -Glucuronidase ($44,4 \pm 8,8\%$) oder Sulfatase ($42,3 \pm 6,1\%$) resultierten im Vergleich zur sofortigen Aufarbeitung signifikant kleine WFR, so dass bei deren Verwendung ein signifikanter Verlust von 3-O-Me-2-HO-E1 durch das Binden an Enzymproteine zu berücksichtigen ist (Abb. 31, ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

Im Vergleich zur Referenzlösung, die ohne SPE aufgearbeitet wurde, waren für alle Testansätze von E1- und E2-Metaboliten signifikant kleinere PF zu beobachten (Abb. 31). Ausnahmen davon waren lediglich für 16- α -HO-E2, 2-MeO-E1 und 2-MeO-E2 sowie den E1-/E2-Catecholen zu verfolgen (Abb. 31), wobei für letztere signifikant größere PF infolge der

Oxidation von E1 und E2 zu den jeweiligen Catecholen zu verfolgen waren (Abb. 31). Der signifikante Analyt-Verlust der übrigen Metabolite war jeweils über den gesamten Aufarbeitungsprozess zu verfolgen, so dass dieser aufgrund der SPE resultierte. Durch eine unzureichende Protonierung der phenolischen OH-Gruppen von E1- und E2-Metaboliten kann die Bindung an die stationäre Phase sowie die Elution mit dem MeOH-Fließmittel nicht vollständig gewährleistet werden, was mit einem zusätzlichen Analyt-Verlust verbunden ist. Ferner kann der Analyt durch eine unzureichende Ansäuerung des Elutionsmittels mit FA nicht in der vollständig protonierten Form vorliegen, so dass der Analyt nur unvollständig von der Säule eluiert wird. Ein weiterer Aspekt, der bei der SPE zu größeren Verlusten führt, liegt in der Durchflussgeschwindigkeit des Elutionsmittels. Möglicherweise war diese mit 1 ml/min zu hoch beziehungsweise diskontinuierlich, wodurch eine unvollständige Elution des Analyten und daher ein höherer Analyt-Verlust resultierten. Da signifikante Analyt-Verluste für 2-MeO-E1 beziehungsweise 2-MeO-E2 bei den Ansätzen der sofortigen Aufarbeitung sowie der Aufarbeitung nach Inkubation auszuschließen sind und ebenfalls für 16- α -HO-E2 bei der Inkubation mit β -Glucuronidase keine signifikant kleineren PF resultierten (Abb. 31), kann der systematische Einfluss durch das Elutionsmittel ausgeschlossen werden, so dass wahrscheinlich eine unzureichende Protonierung der OH-Gruppen und eine zu hohe oder diskontinuierliche Elutionsgeschwindigkeit einen kritischen Einflussfaktor auf die WFR darstellen.

Abschließend ist festzuhalten, dass durch den Aufarbeitungsprozess signifikante Analyt-Verluste resultieren. Bei der Verwendung von β -Glucuronidase und Sulfatase sind diese auf die Bindung des Analyten an deren Proteinmatrix zurückzuführen. Wenn auch lediglich für 4-MeO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E1 im Vergleich zu den Ansätzen, die nach Inkubation der Aufarbeitung unterzogen wurden, signifikante Verluste resultierten, waren auch die WFR der übrigen E2- und E1-Metabolite maximal bis zu 25,8% (2-MeO-E2) beziehungsweise 17,9% (4-MeO-E1) schlechter (Abb. 31). Signifikant kleinere PF der Ansätze eines Metaboliten im Vergleich zur Referenz, die ohne SPE aufgereinigt wurde, verdeutlichten einen weiteren Analyt-Verlust im Rahmen der SPE. Da signifikante Analyt-Verluste für 2-MeO-E1 und 2-MeO-E2 bei den Ansätzen der sofortigen Aufarbeitung sowie der Aufarbeitung nach Inkubation diesbezüglich auszuschließen waren und ebenfalls für 16- α -HO-E2 nach der Inkubation für β -Glucuronidase keine signifikant kleineren PF resultierten (Abb. 31), wurden systematische Einflüsse des Elutionsmittels auf die WFR ausgeschlossen. Wahrscheinlich führte eine unzureichende Protonierung der OH-Gruppen und eine zu hohe oder diskontinuierliche Elutionsgeschwindigkeit zu einem signifikanten Analyt-Verlust. Die WFR der Ansätze nach sofortiger Aufarbeitung sowie der Aufarbeitung nach Inkubation lagen in einem vergleichbaren Bereich, so dass signifikante Verluste durch die reine Inkubationsbehandlung ausgeschlossen wurden. Größere Verluste resultierten in diesem Zusammenhang lediglich für 4-MeO-E2 sowie 2-MeO-

E1 und 3-O-Me-4-HO-E2. Tab. 32 gibt die einzelnen prozentualen WFR von E1- und E2-Metaboliten in den verschiedenen Aufarbeitungsansätzen wieder.

Tab. 32: Vergleich der prozentualen WFR von E1, E2 und deren Metaboliten in der organischen Phase nach sofortiger Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE, der Aufarbeitung nach Inkubation (16 h, 37°C) beziehungsweise nach Inkubation in Gegenwart von β -Glucuronidase (Typ B-1, 10.000 U) oder Sulfatase (Typ H-1, 100 U). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion), wobei jeweils die mittleren WFR und die Standardabweichung angegeben sind. n.n.: Nicht nachweisbar. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1. Rohdaten: Anhang, Tab. 87 und Tab. 88.

Analyt	sofortige Aufarbeitung WFR \pm STABW (%)	Aufarbeitung nach Inkubation WFR \pm STABW (%)	Aufarbeitung nach Inkubation (β -Glucuronidase) WFR \pm STABW (%)	Aufarbeitung nach Inkubation (Sulfatase) WFR \pm STABW (%)
E2	58,7 \pm 8,7	61,4 \pm 15,8	41,7 \pm 14,3	46,8 \pm 8,8
2-HO-E2	417,5 \pm 152,9	n.n.	n.n.	n.n.
4-HO-E2	175,0 \pm 64,2	n.n.	n.n.	n.n.
16- α -HO-E2	45,9 \pm 23,0	41,6 \pm 7,8	53,4 \pm 25,3	42,7 \pm 9,4
2-MeO-E2	62,3 \pm 11,1	62,8 \pm 19,0	37,0 \pm 11,7	42,2 \pm 15,4
4-MeO-E2	62,1 \pm 9,4	43,0 \pm 3,9	39,9 \pm 2,1	35,7 \pm 7,5
3-O-Me-2-HO-E2	55,1 \pm 6,8	50,6 \pm 11,1	38,9 \pm 10,7	37,3 \pm 3,0
3-O-Me-4-HO-E2	53,0 \pm 5,2	43,0 \pm 7,4	28,6 \pm 15,6	36,0 \pm 8,7
E1	68,9 \pm 16,3	63,0 \pm 5,5	48,3 \pm 14,4	53,1 \pm 3,6
2-HO-E1	306,2 \pm 71,9	n.n.	n.n.	n.n.
4-HO-E1	181,7 \pm 72,4	n.n.	n.n.	n.n.
16- α -HO-E1	68,2 \pm 16,5	65,0 \pm 9,7	55,1 \pm 9,1	44,3 \pm 5,1
2-MeO-E1	73,0 \pm 11,4	61,1 \pm 14,7	44,9 \pm 25,2	34,4 \pm 6,5
4-MeO-E1	52,5 \pm 14,4	55,6 \pm 16,0	37,7 \pm 5,1	38,1 \pm 3,2
3-O-Me-2-HO-E1	59,4 \pm 1,4	56,9 \pm 3,3	44,4 \pm 8,8	42,3 \pm 6,1

Um den Analyt-Verlust zu verringern, wurde im Folgenden die Erhöhung des Extraktionsvolumens auf die resultierende WFR untersucht. Dazu wurde der Versuchsansatz der sofortigen Aufarbeitung ebenfalls einer *zweifachen*- (4 ml) und *dreifachen* Chloroformextraktion (6 ml) unterzogen (Anhang, Tab. 89 und Tab. 90), wobei die Ergebnisse mit der *einfachen* Chloroformextraktion (2 ml) verglichen wurden.

Bei den E2-Metaboliten ging weder nach *zweifacher*- noch nach *dreifacher* Extraktion mit Chloroform signifikant mehr Analyt in die organische Phase über, so dass bezüglich der *einfachen* Extraktion mit 2 ml Chloroform keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen WFR resultierten (Anhang, Tab. 89 und Tab. 90).

Auch bei den E1-Metaboliten wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den WFR der verschiedenen Extraktionsvolumina beobachtet (Anhang, Tab. 89 und Tab. 90). Demnach

wurde auch mit doppeltem- beziehungsweise dreifachem Volumen Chloroform keine Erhöhung der WFR erzielt, so dass weder für E1- noch E2-Metabolite der Analyt-Verlust signifikant verringert wurde. Im Rahmen der Probenaufarbeitung wurde daher weiterhin ein Extraktionsvolumen von 2 ml verwendet.

5.3.6 Überprüfung kritischer Prozessschritte der Brustgewebsaufarbeitung bezüglich der Bildung und Eliminierung von Artefakten

Estrogene, insbesondere E2 und dessen reaktive Metabolite, 2- und 4-HO-E2, spielen eine entscheidende Rolle bei der Brustkrebsentstehung. Um den Zusammenhang zwischen Brustkrebs und dem Metabolitenprofil von E2 zu erklären, wird dieses in verschiedenen epidemiologischen Studien in weiblichem Brustgewebe bestimmt. In Kap. 5.3.4 wurde gezeigt, dass Catechol-Estrogene als oxidationsempfindlich zu bewerten sind, wodurch eine Artefaktbildung während der Brustgewebsaufarbeitung einen kritischen Einflussfaktor auf die Analysenergebnisse epidemiologischer Studien darstellt. Es war daher notwendig, die Aufarbeitung sowie einzelne Prozess-Schritte auf mögliche generierte Artefakte zu untersuchen.

5.3.6.1 Überprüfung der Oxidationsstabilität von E2-d₃ während der Aufarbeitung von Brustgewebe

Zur Untersuchung einer möglichen Artefaktbildung wurde E2-d₃ als ISTD verwendet, da es aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu E2 neben einem ähnlichen chromatographischen Verhalten auch ein vergleichbares Fragmentierungsmuster aufweist (Hübschmann, 2009). Im Zuge dessen ist bei einer Oxidation von E2-d₃ ebenfalls von einer Oxidation der undeuterten Analoga auszugehen.

Zur Überprüfung einer Artefaktbildung wurden 5 g homogenisiertes Brustgewebe in 12 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen und mit 50 pmol E2-d₃ dotiert. Zur Unterscheidung von freiem E2 beziehungsweise E2 aus Konjugaten wurde der Probenansatz ferner auf 6 Teilansätze mit jeweils 2 ml Homogenat aufgeteilt. Dabei wurden drei Ansätze für die Hydrolyse von E2-Konjugaten mit 10.000 U β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2) versetzt. Zudem sollte durch die Enzymzugabe überprüft werden, ob das zur Konjugat-spaltung verwendete Enzym β -Glucuronidase ein Einflussfaktor auf die Oxidation des ISTD darstellt. Die Bildung deuterierter Oxidationsprodukte wurde im Anschluss nach dem bisherigen publizierten Protokoll der Gewebeaufarbeitung überprüft (Rogen et al., 2003). Nach der Gewebeeinkubation für 16 h bei 37°C erfolgte diesbezüglich eine Entfettung der Probenansätze und Aufreinigung der wässrigen Phase mittels SPE (Kap. 4.2.17). Die im Zuge der Aufarbeitung möglichen generierten Oxidationsprodukte wurden nach der Derivatisierung

mittels GC/MS/MS im MRM-Modus bestimmt (Kap. 4.2.22). Dabei wurden die absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs, 507_373, für deuteriertes 2- und 4-HO-E2 ermittelt. Die Bestimmung der Menge deuterierter Catecholestrogene erfolgte anschließend anhand des PFV von deuteriertem 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E2 zum ISTD E2-d₃.

Überprüfung des deuterierten E2-Standards auf Verunreinigungen mit deuterierten Oxidationsprodukten

Um zunächst eine Verunreinigung des ISTD mit deuterierten Oxidationsprodukten auszuschließen, wurden 50 pmol E2-d₃ evaporiert, anschließend derivatisiert und mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert.

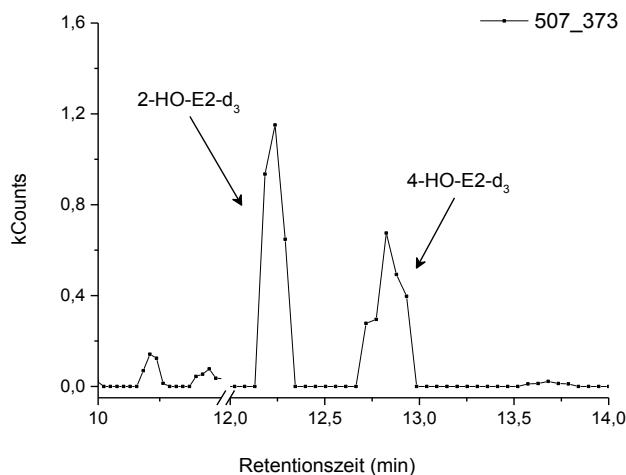


Abb. 32: Überprüfung des verwendeten E2-d₃-Standards auf Verunreinigungen mit deuterierten Oxidationsprodukten. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Dargestellt ist der extrahierte *Quantifier*-Übergang für deuteriertes 2- und 4-HO-E2; m ISTD/Säule = 1,7 pmol. Injektionsvolumen: 1 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Der extrahierte *Quantifier*-Übergang ging mit 1,2 kCounts für 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 0,7 kCounts für 4-HO-E2-d₃ vollständig im Hintergrundrauschen unter (Abb. 32), daher war eine Verunreinigung des verwendeten E2-d₃-Standards mit deuterierten Oxidationsprodukten auszuschließen.

Überprüfung des allgemein gültigen Protokolls bezüglich der Bildung von Artefakten

Alle Gewebeproben wurden zunächst vollständig dem bisher publizierten Protokoll der Aufarbeitung unterzogen (Rogen et al., 2003). Dabei wurde in allen Proben, unabhängig eines Zusatzes von β -Glucuronidase, 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ nachgewiesen (exemplarische Chromatogramme Abb. 33).

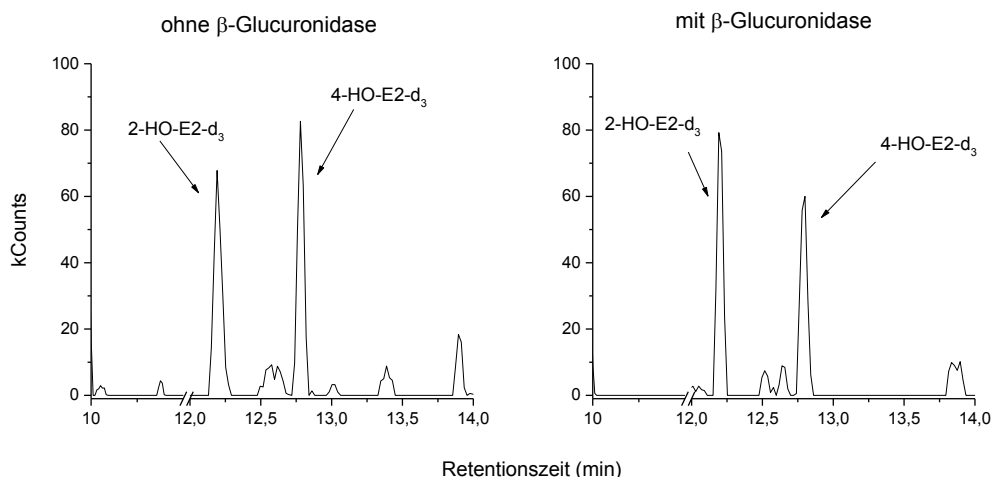


Abb. 33: Überprüfung der Aufarbeitungsmethode für humanes Brustgewebe auf die Bildung deuterierter Oxidationsprodukte. Dafür wurden 5 g homogenisiertes Brustgewebe in 12 ml *Sørensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen, mit dem ISTD (E2-d₃, n = 50 pmol) versetzt und auf 6 Teilansätze mit jeweils 2 ml Homogenat aufgeteilt. Für die Unterscheidung von E2 aus Konjugaten beziehungsweise freiem E2 wurden die Probenansätze mit und ohne β -Glucuronidase aus *helix pomatia* (Typ HP-2; 10.000 U) versetzt, für 16 h bei 37°C inkubiert, mit 3 ml Chloroform extrahiert und mittels SPE aufgereinigt. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt ist der extrahierte Quantifizierungsübergang für 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃; m_{ISTD/Säule} = 0,28 pmol. Injektionsvolumen: 1 μ l. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Während ohne β -Glucuronidase-Zusatz das PFV von 2-HO-E2-d₃ in einem Bereich von $0,08 \pm 0,02$ bis $0,11 \pm 0,02$ variierte, resultierte bei einem Zusatz von β -Glucuronidase ein PFV von $0,09 \pm 0,03$ bis $0,25 \pm 0,03$, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (Abb. 34; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$).

Dieser Trend setzte sich ebenfalls bei 4-HO-E2-d₃ fort. Diesbezüglich schwankte das PFV ohne β -Glucuronidase-Zusatz von $0,03 \pm 0,01$ bis $0,13 \pm 0,04$, während bei β -Glucuronidase-Zusatz ein PFV von $0,08 \pm 0,02$ bis $0,12 \pm 0,02$ resultierte. Die relativen PFV unterschieden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant voneinander (Abb. 34; Mittelwert t-Test, $p < 0,05$). Ein Einfluss der β -Glucuronidase auf die Oxidation von E2-d₃ war demnach auszuschließen (Abb. 34).

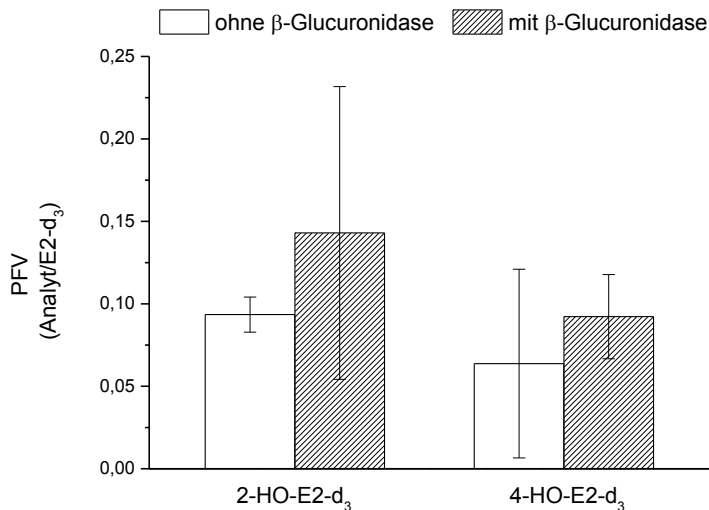


Abb. 34: Relative PFV von 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ nach Inkubation (16 h, 37°C) mit beziehungsweise ohne β -Glucuronidase-Zusatz (Typ HP-2; 10.000 U), Chloroformextraktion und SPE. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Dreifachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen; $m_{ISTD/S\ddot{a}ule} = 0,28$ pmol. Injektionsvolumen: 1 μ l. Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten im Anhang, Tab. 91.

Da jedoch bei allen Proben deuterierte Catechol-Estrogene nachzuweisen waren (Abb. 33) war die Verwendung des publizierten Analysenprotokolls zur Brustgewebsaufarbeitung nicht geeignet. Im Folgenden war es daher notwendig, den Aufarbeitungsschritt zu identifizieren, bei dem die ersten Oxidationsprodukte gebildet wurden. Dieser musste dann entsprechend modifiziert werden, um die Eliminierung der Artefakte zu gewährleisten.

Überprüfung kritischer Prozessschritte der Gewebeaufarbeitung auf die Bildung von Artefakten

Die Anwendung des gültigen Protokolls zur Gewebeaufarbeitung führte zu einer Oxidation des ISTD. Dieser Aspekt ist auch mit einer Oxidation von E2-Metaboliten verbunden, so dass die Richtigkeit der Analysenergebnisse infolge von Artefaktbildungen während der Probenaufarbeitung beeinträchtigt ist. Daher wurden im Anschluss einzelne kritische Prozess-Schritte der Gewebeaufarbeitung auf eine mögliche Artefaktbildung untersucht.

Zunächst wurde die Zugabe des ISTD zur Gewebematrix als mögliche Ursache für die Artefaktbildung überprüft, so dass direkt nach der Zugabe des ISTD zum Gewebematerial auf die Bildung von Oxidationsprodukten getestet wurde. Des Weiteren wurden die Gewebeeinkubation (16 h für 37°C) sowie die Entfettung mit Chloroform als kritische Prozess-Schritte gewertet und ebenfalls auf die Artefaktbildung überprüft.

Nach der Dotierung des Gewebematerials mit dem ISTD (E2-d₃, $n = 50$ pmol) wurde der Probenansatz über eine SPE-Säule aufgereinigt und anschließend mittels GC/MS/MS im

MRM-Modus analysiert. Die Zugabe des ISTD zum Gewebe wurde als Ursache für die Bildung von Oxidationsprodukten ausgeschlossen, da einerseits kein *Quantifier*-Übergang für 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₃ beobachtet wurde und andererseits, ging der extrahierte *Qualifier*-Übergang mit jeweils 4 kCounts vollständig im Hintergrundrauschen unter (exemplarisches Chromatogramm Abb. 35).

Bereits bei der Überprüfung auf Oxidationsprodukte im Anschluss an die Gewebeinkubation (16 h bei 37°C) waren deuterierte Oxidationsprodukte nachweisbar. In allen Probenansätzen, unabhängig des *β-Glucuronidase*-Zusatzes, die im Anschluss an die Inkubation mittels SPE aufgereinigt und analysiert wurden, war 2-HO-E2-d₃ nachzuweisen (exemplarisches Chromatogramm Abb. 35). Demnach stellte die Temperaturbehandlung bei 37°C über Nacht den Grund für die Oxidation dar.

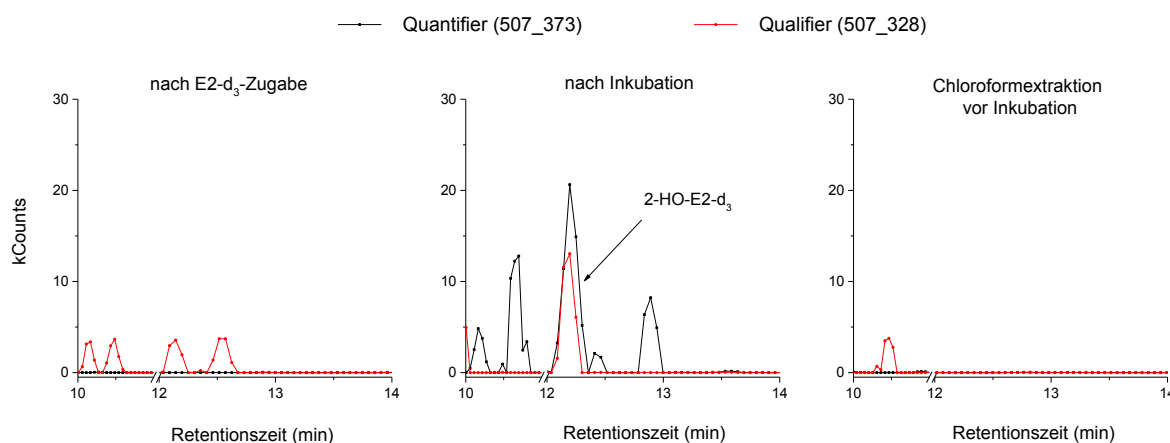


Abb. 35: Überprüfung kritischer Prozess-Schritte der Aufarbeitungsmethode für humanes Brustgewebe bezüglich der Bildung von Oxidationsprodukten. Dafür wurden Probenansätze direkt nach der Zugabe des ISTD sowie der Inkubation (16 h, 37°C) mittels SPE aufgereinigt und auf eine mögliche Artefaktbildung getestet. Weiterhin wurde die Entfettung mit Chloroform vor der Inkubation durchgeführt und ebenfalls auf eine Artefaktbildung überprüft. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Dargestellt ist der extrahierte *Quantifier*-Übergang für 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃; m ISTD/Säule = 0,28 pmol. Injektionsvolumen: 1 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Nach Palmiter (1974) sowie Greenberg und Penman (1966) wird die Extraktion mit Chloroform als eine effiziente Methode zur Proteindenaturierung beschrieben, so dass das ursprüngliche Protokoll geändert wurde. Die Chloroformextraktion ist vor der Hydrolyse durchzuführen, so dass bei Entfettung gleichzeitig eine Enzyminaktivierung von oxidierenden Enzymen, durch Denaturierungsprozesse erfolgen kann.

Bei diesen oxidierenden Enzymen handelt es sich einerseits um CYP1A1 und CYP1A2, welche die Hydroxylierung von E2 am C2 katalysieren und andererseits, um CYP1B1, welches für die C4 Hydroxylierung von E2 verantwortlich ist (Cavalieri et al., 2006).

In den untersuchten Probenansätzen wurde kein 4-HO-E2-d₃ nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür wurde von Shimada et al. (1996) sowie von Murray et al. (1997) be-

ziehungsweise McFadyen et al. (1999) beschrieben. Diesbezüglich wurde bei vorhandener CYP1B1 mRNA bei Enzyminaktivierung durch Entfettung kein Protein nachgewiesen. Aufgrund fehlender Translationsprozesse wurde kein CYP1B1 gebildet, so dass infolge der fehlenden Aktivität kein 4-HO-E2 gebildet beziehungsweise die Oxidation zum 4-HO-E2-d₃ unterbunden wurde.

In allen Probenansätzen die nach der Aufnahme in *Sørensen* Phosphat-Puffer mit Chloroform extrahiert und im Anschluss der Inkubation unterzogen wurden, waren keine Artefakte mehr nachweisbar. Demnach wurden Enzyme, welche die Oxidation begünstigen durch die gleichzeitige Entfettung inaktiviert (exemplarisches Chromatogramm Abb. 35).

5.3.6.2 Überprüfung der Anwendbarkeit des modifizierten Protokolls im Rahmen optimierter Extraktionsbedingungen

In Kap. 5.3.3 wurde gezeigt, dass E1- und E2-Metabolite bei der Extraktion mit Chloroform bis zu 90% in die organische Phase übergehen. Bei den Vorversuchen zur Überprüfung des allgemein gültigen Protokolls bezüglich einer möglichen Artefaktbildung (Kap. 5.3.6.1) wurde die organische Phase verworfen und folglich die wässrige Phase nach Extraktion der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Demnach sind maximal 10% des ISTD weiter aufgearbeitet worden, so dass eventuell dessen Menge, die weiter oxidiert wurde, zu gering war und daher in den oben genannten Optimierungsversuchen keine Oxidationsprodukte von E2-d₃ nachzuweisen waren. Aus diesem Grund war zu überprüfen, ob die in wässriger Phase erzielten Ergebnisse, der Artefaktbildung während der Inkubation sowie deren Eliminierung durch Enzyminaktivierung bei Extraktion, ebenfalls bei der Verwendung der organischen Phase nach Chloroformextraktion resultieren.

In Kap. 5.3.5 wurden Standardlösungen bestehend aus *Sørensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) und einer undeuterten E1-/E2-Metaboliten-Referenzmischung unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten unterzogen. Unter anderem wurden diese zunächst einer Inkubation für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad unterzogen, wobei letztere mit beziehungsweise ohne Enzymzusatz von β -Glucuronidase (Typ B-1) oder Sulfatase (Typ H-1) erfolgte. Nach anschließender Extraktion mit Chloroform wurde die organische Phase über eine SPE-Säule aufgereinigt und mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert, wobei weder 2- und 4-HO-E2 noch 2- und 4-HO-E1 nachzuweisen waren. Diesbezüglich erfolgte die Extraktion ebenfalls erst im Anschluss der Inkubationsbehandlung, so dass auch hierbei während der Temperatur- und Enzymbehandlung eine Oxidation des Standards über die Semichinone zu den entsprechenden Chinonen stattfand (Cavalieri et al., 2006; Rogen et al., 2003). Demnach ist sowohl bei der Aufarbeitung der wässrigen Phase als auch der organischen Phase von einer Oxidation des Standards auszugehen, sofern die Inkubation vor der Chloroformextraktion durchgeführt wird.

In Standardlösungen kann aufgrund der fehlenden oxidierenden Enzyme eine Inaktivierung letzterer durch eine gleichzeitige Extraktion nicht überprüft werden. Daher wurde Brustgewebe den optimierten Bedingungen der Probenaufarbeitung unterzogen und anschließend auf eine mögliche Artefaktbildung überprüft. Um dabei nicht nur deuterierte Oxidationsprodukte ausgehend von E2-d₃ zu erfassen, wurde ebenfalls E1-d₄ als ISTD verwendet. Demnach konnte neben 2-/4-HO-E1-d₄ zusätzlich E1-d₂ sowie 2-HO-E1-d₂ und 4-HO-E1-d₂ detektiert werden, welche infolge einer möglichen Oxidation des E2-d₃-Standards an C17 resultieren (Abb. 36).

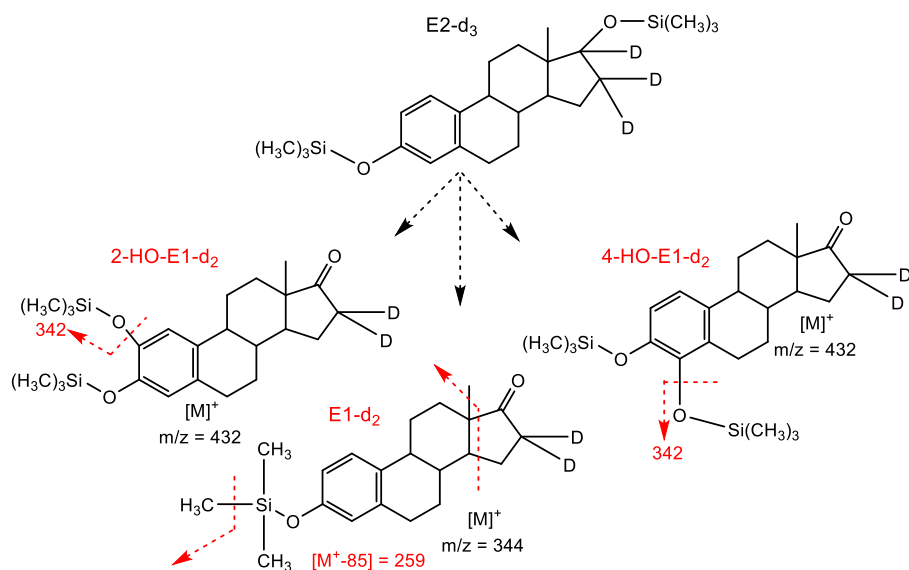


Abb. 36: Mögliche Fragmentierungspositionen der d₂-TMS-Derivate, welche bei der Oxidation von E2-d₃ an C17 resultieren.

Zur Untersuchung einer möglichen Artefaktbildung wurden 200 mg Brustgewebe in 2 ml *Sörensen* Phosphat-Puffer aufgenommen und mit 240 pg E2-d₃ beziehungsweise 225 pg E1-d₄ dotiert. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich in Standardlösungen eine Methode zur Bestimmung von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten entwickelt wurde und auf deren Anwendung in Brustgewebe verzichtet wurde, wurden die Probenansätze ohne Inkubation mit *β-Glucuronidase* oder Sulfatase sofort mit Chloroform extrahiert. Nach dem Evaporieren der Chloroformphase bis zur Trockene erfolgte eine Aufnahme des Rückstandes in 2 ml Phosphat-Puffer (20% MeOH) sowie die Aufreinigung über eine SPE-Säule (Kap. 4.2.20). Die im Verlauf der Aufarbeitung möglichen generierten Oxidationsprodukte wurden nach der Derivatisierung mittels GC/MS/MS im MRM-Modus bestimmt (Kap. 4.2.23.2). Dabei wurden die absoluten PF der extrahierten *Quantifier*-Übergänge für 2-/4HO-E2-d₃ (507_373), 2-/4HO-E2-d₄ (434_345), E1-d₂ (344_259), und 2-/4-HO-E1-d₂ (432_342) ermittelt.

Überprüfung des deuterierten E1-Standards auf Verunreinigungen mit deuterierten Oxidationsprodukten

Um ebenfalls eine Verunreinigung von E1-d₄ mit deuterierten Oxidationsprodukten auszuschließen, wurden 225 pg E1-d₄ evaporiert, derivatisiert und anschließend mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert.

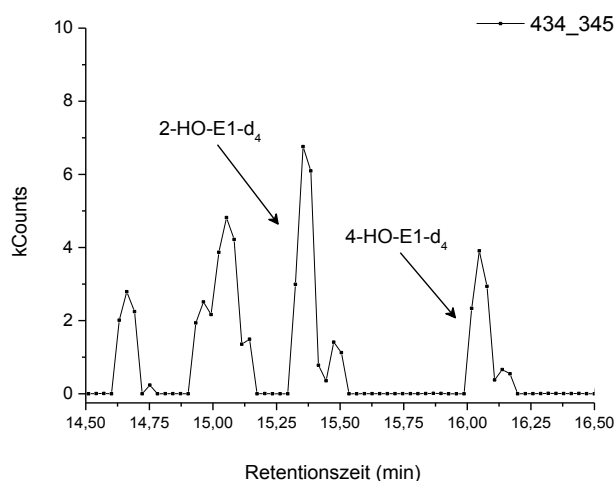


Abb. 37: Überprüfung des verwendeten E1-d₄-Standards auf Verunreinigungen mit deuterierten Oxidationsprodukten. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt ist der extrahierte *Quantifier*-Übergang für deuteriertes 2- und 4-HO-E1; $m_{\text{ISTD/Säule}} = 15 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 2 μl . Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

Der extrahierte *Quantifier*-Übergang ging mit 7 kCounts für 2-HO-E1-d₄ beziehungsweise 4 kCounts für 4-HO-E1-d₄ vollständig im Hintergrundrauschen unter (Abb. 37). Daher war eine Verunreinigung von E1-d₄ mit deuterierten Oxidationsprodukten analog E2-d₃ auszuschließen (Kap. 5.3.6.1).

Überprüfung des optimierten Protokolls der Gewebeaufarbeitung bezüglich der Bildung von Artefakten

Für 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ resultierten für den jeweiligen extrahierten *Quantifier*-Übergang absolute PF unter 1 kCounts. Bei 2-HO-E1-d₄ und 4-HO-E1-d₄ gingen die *Quantifier*-Übergänge mit 1 kCount und 7 kCount ebenfalls vollständig im Hintergrundrauschen unter, so dass diese nicht nachzuweisen waren (exemplarisches Chromatogramm Abb. 38). Ähnliche Ergebnisse wurden für E1-d₂ und 2-HO-E1-d₂ beziehungsweise 4-HO-E1-d₂ beobachtet. Da auch diese nicht nachzuweisen waren, wurden in allen Probenansätzen weder deuterierte Oxidationsprodukte von E2-d₃ beziehungsweise E1-d₄ noch dessen d₂-Analoge beobachtet (exemplarisches Chromatogramm Abb. 38).

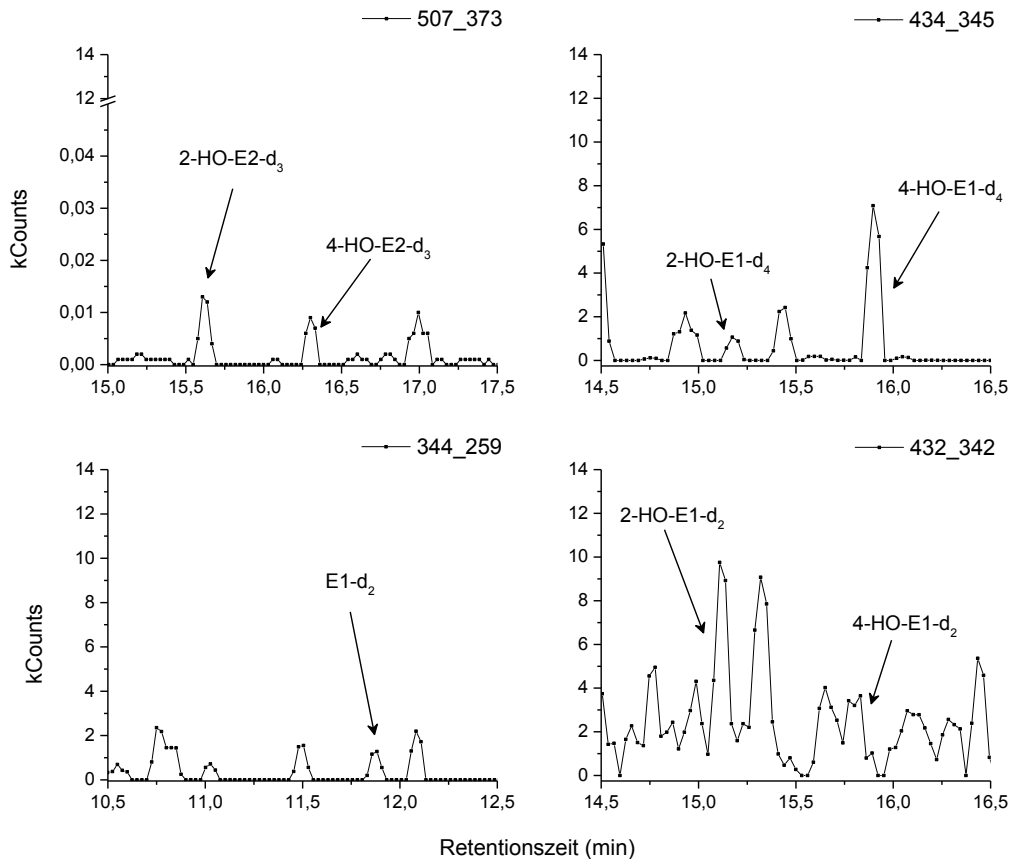


Abb. 38: Überprüfung des optimierten Protokolls zur Gewebeaufarbeitung auf die Bildung deuterierter Oxidationsprodukte. Dafür wurden 200 mg homogenisiertes Brustgewebe in 2 ml Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen, mit dem ISTD versetzt (E1-d₄, 225 pg; E2-d₃, 240 pg), mit Chloroform extrahiert und mittels SPE aufgereinigt. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt ist der extrahierte Quantifizier-Übergang für 2-/4HO-E2-d₃ (507_373), 2-/4HO-E2-d₄ (434_345), E1-d₂ (344_259), und 2-/4-HO-E1-d₂ (432_342); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 15 \text{ pg}$ für E1-d₄, 16 pg für E2-d₃. Injektionsvolumen: 2 μl . Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

In Kap. 5.3.4 wurde gezeigt, dass in Standardlösungen bei sofortiger Chloroformextraktion und anschließender Aufreinigung mittels SPE Catechol-Estrogene von E1 und E2 durch deren Oxidation beziehungsweise Umwandlung generiert werden. Bei der Übertragung dieses Versuchs auf Brustgewebe wurden keine deuterierten Oxidationsprodukte nachgewiesen (exemplarische Chromatogramme Abb. 38).

Nach Singh et al. (2005) wird im gesunden Brustgewebe eine erhöhte Aktivität deaktivierender Enzyme (COMT und NQO1) gegenüber der Aktivität aktivierender beziehungsweise oxidierender Enzyme (CYP19, CYP1B1, CYP1A1 und CYP1A2) beschrieben. Durch die gesteigerte COMT-Aktivität erfolgt eine erhöhte Methylierung der Catechol-Estrogene und daher eine verminderte Oxidation derer zu den entsprechenden Chinonen, wobei diese wiederum durch die erhöhte NQO1-Aktivität verstärkt zu den Catechol-Estrogenen reduziert werden. Im gesunden Brustgewebe überwiegen daher Entgiftungs- und Reduktionsprozesse, da durch die verminderte Aktivität aktivierender beziehungsweise oxidierender Enzyme we-

niger Catechol-Estrogene gebildet- und zu den jeweiligen Chinonen weiteroxidiert werden können. Bei der sofortigen Extraktion der Probenansätze mit Chloroform wurden die verbleibenden oxidierenden Enzyme inaktiviert, so dass aufgrund dessen und infolge des oben genannten geringeren Oxidationseinflusses, im weiteren Verlauf der Aufarbeitung eine Artefaktbildung ausgehend von E2-d₃ beziehungsweise E1-d₄ unterbunden wurde.

Für E1-d₄ und E2-d₃ resultierten infolge der Aufarbeitung signifikante Analyt-Verluste. Deren WFR berechneten sich lediglich auf $26,4 \pm 8,3\%$ beziehungsweise $29,2 \pm 6,0 \%$ (Abb. 39). Dennoch war ein vollständiger Verlust des jeweiligen ISTD auszuschließen, so dass ebenfalls mögliche generierte Oxidationsprodukte nachzuweisen waren.

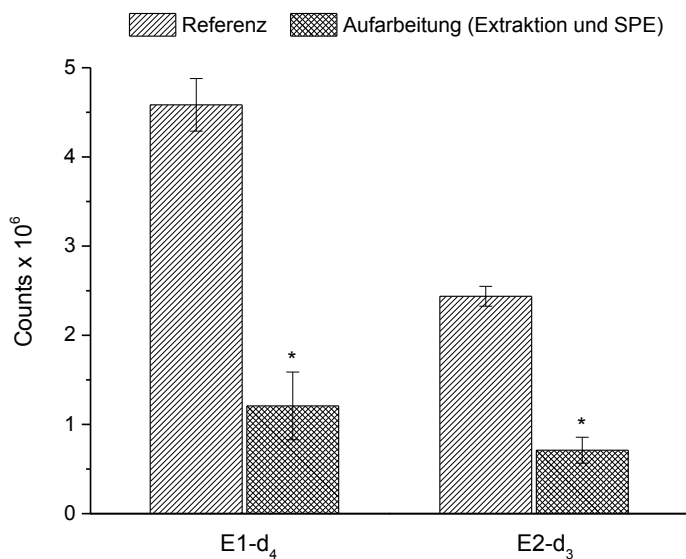


Abb. 39: Absolute PF von E1-d₄ und E2-d₃ ohne beziehungsweise mit Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE. Es wurden 200 mg Brustgewebe in 2 ml Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen, mit dem ISTD versetzt (E1-d₄, 225 pg; E2-d₃, 240 pg) und sofort der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 15 \text{ pg}$ für E1, 16 pg für E2. Injektionsvolumen: 2 μl . Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 92.

Abschließend ist festzuhalten, dass eine Aufarbeitungsmethode für humanes Brustgewebe entwickelt wurde, welche frei von Oxidationseinflüssen ist. Jedoch ist insbesondere in weiterführenden Arbeiten bei der Bestimmung des E2-Anteils aus Glucuroniden und Sulfaten darauf zu achten, dass die Extraktion vor der Konjugathydrolyse über Nacht erfolgt (Abb. 40), da infolge der Temperaturbehandlung die Inaktivierung der restlichen oxidierenden Enzyme unterbunden wird. Daher wäre eine Artefaktbildung trotz der geringeren Oxidationseinflüsse im Brustgewebe nicht auszuschließen.

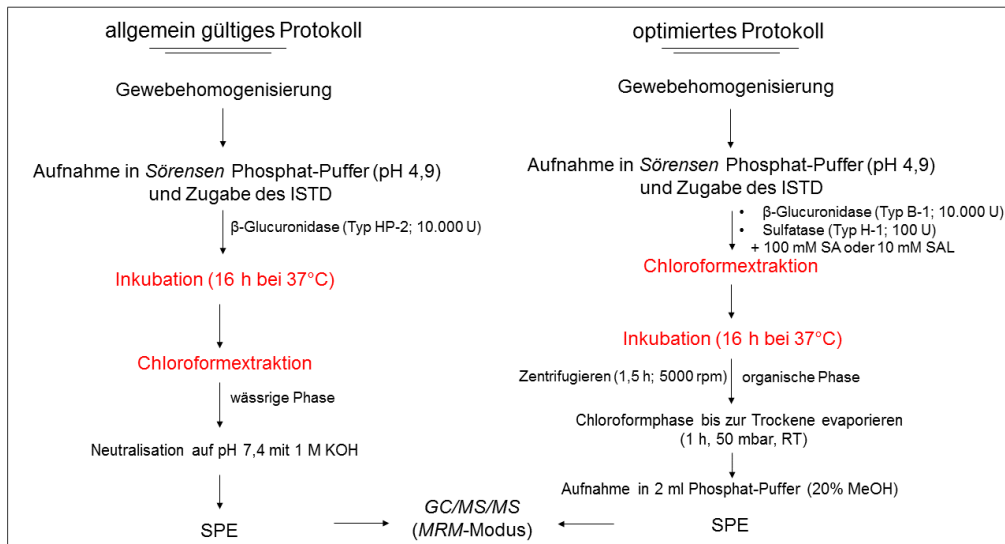


Abb. 40: Vergleich der Aufarbeitungsschritte für humanes Brustdrüsengewebe bezüglich des allgemein gültigen- und des optimierten Protokolls in Hinblick der Eliminierung von Oxidationsprodukten.

5.4 Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten über deuterierte interne Standards

Für die Quantifizierung von E1, E2 sowie deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten im Brustgewebe waren interne Standards notwendig. Bei deren Auswahl war zu berücksichtigen, dass diese ein ähnliches chromatographisches Verhalten wie die Analyten aufweisen und in der zu analysierenden Probe nicht enthalten sein dürfen. Demnach wurden die jeweiligen isotonen-markierten Analoga von E1- und E2-Metaboliten herangezogen, da diese nahezu identische physikalisch-chemische Eigenschaften besitzen (Hübschmann, 2009; Wieling, 2002) und folglich neben ihrer strukturellen Ähnlichkeit (Wang et al., 2007) ebenso ein vergleichbares Fragmentierungsmuster (Li et al., 1996; Liu et al., 1995) sowie ein ähnliches chromatographisches Verhalten (zusammengefasst von Mulvana, 2010; O'Halloran und Ilett, 2008) wie die Analyten aufweisen und sich außerdem vom jeweiligen Analyten gut trennen lassen (Vogesser und Seger, 2010; Xu et al., 2008). Infolge dessen weisen deuterierte Standards einen den jeweiligen Analyten vergleichbaren Response auf, obwohl sie in der zu analysierenden Probe nicht enthalten sind.

In extrahepatischem Gewebe, wie zum Beispiel der Brust, stellen E1 und E2 die beiden potentesten und gleichzeitig am häufigsten vorkommenden Estrogene dar. Beide befinden sich in einem metabolischen Gleichgewicht, welches durch die 17 β -HSD1 katalysiert wird (Rogen et al., 2003). Durch CYP1A1 und CYP1B1 werden diese zu 2-/4-HO-E1 und 2-/4-HO-E2 beziehungsweise 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 oxidiert und insbesondere COMT zu 2-/4-

MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E1 und 2-/4-MeO-E2 sowie 3-O-Me-2-/4-HO-E2 entgiftet (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011).

Da im gesunden Brustgewebe unter anderem die COMT-Aktivität gegenüber der Aktivität von CYP1A1 beziehungsweise CYP1A2 und CYP1B1 erhöht ist und daher die Inaktivierung der Catechol-Estrogene zu den Methyl-Catecholen überwiegt (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011; Mitrunen und Hirvonen, 2003), war die Bildung Letzterer zu erwarten. Mittels COMT wird 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E2 vorrangig zu 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 und in geringerem Umfang zu 3-O-Me-2-HO-E2 beziehungsweise 3-O-Me-4-HO-E2 methyliert (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990). Dies ist ebenfalls auf 2-MeO-E1 und 4-MeO-E1 zu übertragen, so dass sowohl 3-O-Me-2-HO-E1 und 3-O-Me-4-HO-E1 als auch 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 Nebenprodukte der Methylierung darstellen. Während infolge einer verminderten CYP1B1-Aktivität in der gesunden Brustdrüse geringere Gehalte von 4-HO-E1 beziehungsweise 4-HO-E2 zu erwarten sind, wurden diesbezüglich für 2-HO-E1 beziehungsweise 2-HO-E2 keine Unterschiede zwischen gesunden und tumorösen Gewebe beobachtet (Rogan et al., 2003). Letzterer Aspekt war ebenfalls auch auf die Gehalte von 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 zu übertragen, so dass im gesunden Brustgewebe folglich neben E1 und E2 alle hydroxylierten und methylierten Metabolite zu erwarten waren. Aus diesem Grund wurde zur Quantifizierung von E1, 2-/4-HO-E1, 16- α -HO-E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-/4-HO-E1 sowie E2, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2, 2-/4-MeO-E2 und 3-MeO-2-/4-HO-E2 ein Standardgemisch der deuterierten Analoga, ausgehend von dreifach deuteriertem E2 beziehungsweise vierfach deuteriertem E1, verwendet (Kap. 4.1.6). Um die Verwendbarkeit der deuterierten Referenzmischungen zu gewährleisten, mussten diese über den gesamten Mess-Zeitraum eine gleichbleibende Stabilität aufweisen. Daher wurden zu jeder Probenserie zwei frisch hergestellte deuterierte Referenzen ohne Aufarbeitung im *MRM*-Modus analysiert, wobei die extrahierten *Quantifier*-Übergänge als Maß für die Lagerungsstabilität herangezogen wurden.

5.4.1 *Synthese deuterierter Referenzsubstanzen*

Zur Quantifizierung von E1, 2-/4-HO-E1, 2-/4-MeO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E1 sowie E2, 2-/4-HO-E2 und 2-/4-MeO-E2 im Brustgewebe wurde ein Standardgemisch der jeweiligen deuterierten Analoga benötigt. Während E1-d₄, E2-d₃, 2-/4-HO-E1-d₄, 16- α -HO-E2-d₃ und 16- α -HO-E2-d₅ käuflich erworben wurden, sind die weiteren hydroxylierten und methylierten deuterierten Referenzsubstanzen selbständig synthetisiert worden. Dabei wurden Letztere im AK Lehmann, durch Umsetzung der entsprechenden deuterierten Catechol-Estrogene mit COMT aus Rattenlebercytosol, hergestellt und anschließend zur Verfügung gestellt, während die Synthese von 2-/4-HO-E2-d₃ im Rahmen der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Christoph Peschke (2011) erfolgte.

Da bei den käuflich erworbenen Standards die Kontaminationsfreiheit gewährleistet war, wurde diesbezüglich auf eine zusätzliche Charakterisierung beziehungsweise Reinheitsüberprüfung verzichtet. Zur vollständigen Charakterisierung der synthetisierten Standards und um einen Überblick über deren eventuell enthaltene Kontaminations-Spuren zu erhalten, wurden diese zunächst im *MRM*-Modus bezüglich der deuterierten und undeuterierten *Quantifier*-Übergänge von E1, E2 sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite analysiert. Im Fall einer Oxidation von E2-d₃ an C17 entstehen die deuterierten d₂-Analoge von E1-Metaboliten, so dass ebenfalls deren *Quantifier*-Übergänge getestet wurden.

Dabei wurden die PF aller nachgewiesenen Analyte addiert, deren Summe gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen PF der Metabolite beziehungsweise nachgewiesener Kontaminanten darauf bezogen.

5.4.1.1 **Charakterisierung der E2-Methylether-Standards**

Methylcatechole von 2-HO-E2-d₃

Der synthetisierte 2-HO-E2-d₃-Methylether-Standard setzte sich aus 2-MeO-E2-d₃, 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ und 4-MeO-E1 zusammen (Abb. 41). Diesbezüglich machte 2-MeO-E2-d₃ mit 52,6% den größeren Anteil der gebildeten Methylcatechole aus, während der Anteil von 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ mit 40,1% über 10% kleiner war. Auch wenn der Anteil von 4-MeO-E1 mit 7,3% in der Metabolitenmischung gering war, ist dessen Vorhandensein durch die Umsetzungsreaktion nicht zu erklären. Demnach musste während des Syntheseprozesses eine Kontamination mit 4-MeO-E1 stattgefunden haben.

Infolge der strukturellen Ähnlichkeit von deuterierten und undeuterierten E2-Metaboliten können deren Reaktionen miteinander verglichen beziehungsweise aufeinander übertragen werden. Das PFV von 2-MeO-E2-d₃ zu 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ betrug 1,3. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem PFV von 1,5, welches im Rahmen der Dissertation von Daniela Martínez (2013) bei der Umsetzung von undeuteriertem 2-HO-E2 mit COMT aus Rattenlebercytosol resultierte. Anhand dieses Ergebnisses und da in Kap. 5.1.5 gezeigt wurde, dass der Response von 2-MeO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E2 bei der Analyse mittels *GC/MS/MS* in einem vergleichbaren Bereich liegt, ist von einer bevorzugten Methylierung an Position 2 auszugehen. Von Roy et al. (1990) wurde in diesem Zusammenhang für das PFV von 2-MeO-E2 zu 3-O-Me-2-HO-E2 ein Wert von 1,5 ermittelt, so dass auch diesbezüglich die bevorzugte Methylierung von 2-HO-E2 an Position 2 bestätigt wurde. Neben 4-MeO-E1 und den beiden erwarteten, deuterierten E2-Methylierungsprodukten waren weder *Quantifier*-Massenspuren von E1, E2 sowie deren hydroxylierte oder weitere methylierte Metabolite nachweisbar, noch waren die entsprechenden deuterierten Analoga beziehungsweise d₂-Analoge von E1-Metaboliten, infolge einer Oxidation von E2-d₃, zu detektieren.

Im Rahmen der Quantifizierung ist eine Kontamination mit undeuterten Metaboliten als schwierig zu beurteilen, da hierbei eine gesonderte Betrachtung bezüglich der Metaboliten, die aus der Referenz stammen beziehungsweise in der Probe enthalten sind, erfolgen muss (Kap. 5.4.7).

Methylcatechole von 4-HO-E2-d₃

Der 4-HO-E2-d₃-Methylether-Standard setzte sich aus 4-MeO-E2-d₃ und 3-O-Me-4-HO-E2-d₃, 2-MeO-E2-d₃ und 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ sowie 2-MeO-E1, 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 zusammen (Abb. 41). Der Anteil Letzterer war mit 3,5%, 0,5% und 2,0% zwar sehr gering, dennoch ist deren Bildung durch die Umsetzungsreaktion nicht zu erklären, so dass während des Syntheseprozesses eine Kontamination mit undeuterten E1-Methylierungsprodukten stattgefunden haben muss. Ebenfalls wurde die Bildung von 2-MeO-E2-d₃ und 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ nicht erwartet, da 4-HO-E2 mittels COMT zu 4-MeO-E2 und in geringerem Umfang zu 3-O-Me-4-HO-E2 methyliert wird (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990). Möglicherweise enthielt der für die Umsetzung verwendete 4-HO-E2-d₃-Standard Kontaminations-Spuren von 2-HO-E2-d₃, so dass auch 2-MeO-E2-d₃ beziehungsweise 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ gebildet wurden.

Während für 4-MeO-E2-d₃ mit 62,6% der größte Anteil an der Summe der gebildeten Methylcatechole beobachtet wurde, war der Anteil von 2-MeO-E2-d₃ (13,1%) und 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ (9,1%) beziehungsweise 3-O-Me-4-HO-E2-d₃ (9,2%) wesentlich kleiner. Für das PVF von 4-MeO-E2-d₃ zu 3-O-Me-4-HO-E2-d₃ resultierte ein Wert von 6,8. Im Rahmen der Dissertation von Daniela Martínez (2013) wurde bei der Umsetzung von undeutertem 4-HO-E2 mit COMT aus Rattenlebercytosol ein PVF von 6,3 beobachtet. Da diese Ergebnisse annähernd übereinstimmen und auch in Kap. 5.1.5 gezeigt wurde, dass 4-MeO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 einen vergleichbaren Response bei der Analyse mittels GC/MS/MS besitzen, ist von einer bevorzugten Methylierung an Position 4 gegenüber Position 3 auszugehen. Die geringere Methylierung an Position 3 wurde auch von Roy et al. (1990) beobachtet, wobei das PVF von 4-MeO-E2 zu 3-O-Me-4-HO-E2 diesbezüglich 6,1 betrug. Neben den oben genannten deuterierten E2- beziehungsweise undeuterten E1-Methylierungsprodukten waren weder die *Quantifier*-Massenspuren von E1, E2 sowie deren hydroxylierte oder weitere methylierte Metabolite nachweisbar, noch waren die entsprechenden deuterierten Analoga beziehungsweise d₂-Analoga von E1-Metaboliten zu detektieren.

Da neben 4-MeO-E2 ebenfalls 2-MeO-E2 im Brustgewebe quantifiziert werden sollte, war die Kontamination des 4-HO-E2-d₃-Methylether-Standards mit 2-MeO-E2-d₃ nicht als negativ zu bewerten. Dennoch musste sowohl diese Kontamination als auch die Verunreinigung mit un-

deuterierten E1-Metaboliten bei der Herstellung des Standardgemisches (Kap. 4.1.6) beziehungsweise im Rahmen der Quantifizierung (Kap. 5.4.7) berücksichtigt werden.

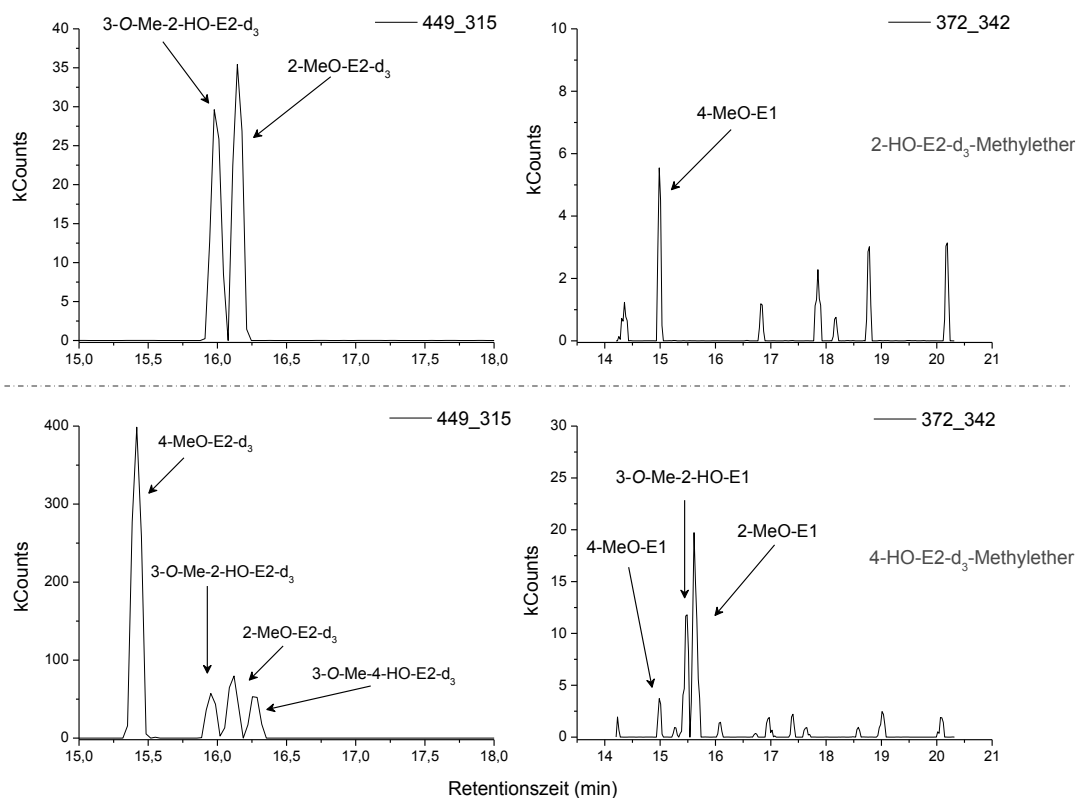


Abb. 41: Umsetzung von 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₃ mit COMT aus Rattenlebercytosol. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt sind die extrahierten deuterierten (449_315) beziehungsweise undeuterierten *Quantifier*-Massenspuren (372_342) der jeweiligen Reaktionsprodukte (Einfachinjektion einer 1:100 Verdünnung). Injektionsvolumen: 1 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

5.4.1.2 Charakterisierung des 2-HO-E2-d₃- und 4-HO-E2-d₃-Standards

2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ wurden nach der Synthese von Saeed et al. (2005) ausgehend von E2-d₃ synthetisiert (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Peschke, 2011).

Während für 2-HO-E2-d₃ im MRM-Modus eine Reinheit von $97,2 \pm 0,2\%$ ermittelt wurde, berechnete sich die Reinheit von 4-HO-E2-d₃ auf $95,9 \pm 0,5\%$ (Tab. 33). Geringe Kontaminations-Spuren waren einerseits auf das jeweils andere deuterierte Catechol und auf 2-/4-HO-E1-d₂ zurückzuführen, wobei das Vorhandensein Letzterer verdeutlichte, dass bei der Synthese von 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ eine Oxidation von E2-d₃ zu den jeweiligen d₂-Analoge von E1 stattgefunden hatte. Andererseits wurden Verunreinigungen durch Substanzen mit einem $m/z = 450$ und $m/z = 505$ beobachtet (Abb. 42).

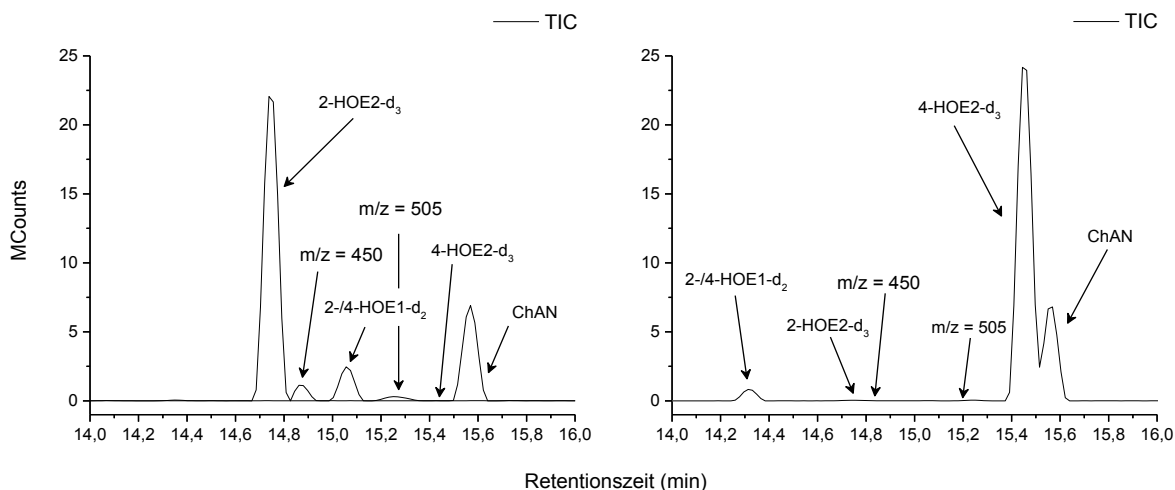


Abb. 42: Synthese von 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₃ ausgehend von E2-d₃. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Einfachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.), wobei das Totalionenchromatogramm (TIC) der jeweiligen Reaktionsprodukte und des Gerätestandards (ChAN) dargestellt sind; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 5 \text{ ng}$ für 2-/4-HO-E2-d₃; ChAN = 2 ng. Injektionsvolumen: 1 μl . Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Die Substanz mit $m/z = 505$ wurde als Nebenprodukt der Synthese von deuterierten beziehungsweise undeuterierten Catechol-Estrogenen gewertet, da ebenfalls bei der Synthese ausgehend von E2 bei gleicher t_R eine Verunreinigung mit $m/z = 502$ anstelle von $m/z = 505$ auftrat (Wissenschaftliche Abschlussarbeit Höfert, 2011). Eine genauere Charakterisierung dieser Substanz und der Substanz mit $m/z = 450$ wurde im Rahmen der Arbeit nicht vorgenommen. Die Kontamination von 2-HO-E2-d₃ im 4-HO-E2-d₃-Standard war wesentlich höher, als die Verunreinigung des 2-HO-E2-d₃-Standards mit 4-HO-E2-d₃ (Tab. 33), was möglicherweise auf die Bildung von 2-MeO-E2-d₃ und 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ bei der Umsetzung von 4-HO-E2-d₃ zurückzuführen ist (Kap. 5.4.1.1). Die maximalen Kontaminationen beider Standards schwankten lediglich zwischen 1 und 3 Prozent, so dass sowohl 2-HO-E2-d₃ als auch 4-HO-E2-d₃ für die Herstellung des Standardgemisches verwendet wurden.

Tab. 33 gibt die prozentualen Gehalte aller Kontaminationen in synthetisiertem 2- und 4-HO-E2-d₃ wieder.

Tab. 33: Vergleich der prozentualen Gehalte der Kontaminations-Spuren in synthetisiertem 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₃. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion), wobei jeweils die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichung angegeben sind. Rohdaten: Wissenschaftliche Abschlussarbeit Peschke, 2011.

Kontaminante	2-HO-E2-d ₃ MW ± STABW (%)	4-HO-E2-d ₃ MW ± STABW (%)
2-HO-E2-d ₃	-	0,24 ± 0,02
4-HO-E2-d ₃	0,05 ± 0,01	-
2-/4-HO-E1-d ₂	0,98 ± 0,06	3,17 ± 0,05
m/z = 450	0,29 ± 0,09	0,78 ± 0,08
m/z = 505	0,53 ± 0,11	0,18 ± 0,04

In den oben genannten Messungen wurde die Überprüfung einer Kontamination mit undeutertem 2-/4-HO-E2 nicht durchgeführt. Daher wurde der synthetisierte 2-HO-E2-d₃- beziehungsweise 4-HO-E2-d₃-Standard im Anschluss auf den Nachweis der beiden undeuterten Analoga getestet. Diesbezüglich wurde bei einer Absolutmenge von jeweils 10 pg/-Säule des jeweiligen deuterierten Standards weder 2-HO-E2 noch 4-HO-E2 nachgewiesen, so dass bei deren Verwendung eine zusätzliche Kontamination mit 2-/4-HO-E2 nicht zu berücksichtigen war.

5.4.1.3 Charakterisierung der E1-Methylether-Standards

Methylcatechole von 2-HO-E1-d₄

Bei der Umsetzung von 2-HO-E1-d₄ mit COMT aus Rattenlebercytosol wurden 2-MeO-E1-d₄ und 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ sowie 16-α-HO-E1-d₄ und 2-HO-E1-d₄ gebildet (Abb. 43). Während es sich bei den zwei Letzten um ein Nebenprodukt der Synthese beziehungsweise um die nicht umgesetzte Ausgangssubstanz handelte, wurde die Bildung von 2-MeO-E1-d₄ und 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ erwartet. Während für 2-HO-E1-d₄ mit 74,8% der größte Anteil an der Summe der PF resultierte, war der Anteil von 2-MeO-E1-d₄, 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ und 16-α-HO-E1-d₄ mit 19,2%, 5,2% beziehungsweise 0,9% erheblich kleiner.

Da analog zu 2-HO-E2 für 2-HO-E1 eine bevorzugte Methylierung an Position 2 beschrieben wird (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990), wurde für 2-MeO-E1-d₄ ein weitaus größerer Anteil gegenüber 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ erwartet. Das PFV von 2-MeO-E1-d₄ zu 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ betrug 3,7. Anhand dieses Ergebnisses und da in Kap. 5.1.5 gezeigt wurde, dass der Response von 2-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 bei der Analyse mittels GC/MS/MS in einem vergleichbaren Bereich liegt, ist von einer bevorzugten Methylierung an Position 2 gegenüber Position 3 auszugehen.

Neben den genannten Verbindungen waren keine weiteren deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metabolite nachzuweisen, wobei ebenfalls keine d_2 -Analoga von E1 detektiert wurden. Da im Brustgewebe neben 4-MeO-E1 auch 16- α -HO-E1 quantifiziert werden sollte, war die Kontamination mit 16- α -HO-E1- d_4 nicht als negativ zu bewerten, so dass der 2-HO-E1- d_4 -Methylether-Standard für die Herstellung des Standardgemisches (Kap. 4.1.6) verwendet wurde.

Methylcatechole von 4-HO-E1- d_4

Der 4-HO-E1- d_4 -Methylether-Standard setzte sich aus 4-MeO-E1- d_4 , E1- d_4 und 4-HO-E1- d_4 zusammen (Abb. 43). Während die Bildung von 4-MeO-E1- d_4 infolge der Umsetzung von 4-HO-E1- d_4 mit COMT aus Rattenlebercytosol zu erwarten war, stellten E1- d_4 und 4-HO-E1- d_4 Nebenprodukte der Synthese beziehungsweise nicht umgesetzte Ausgangssubstanz dar. Dabei war für 4-HO-E1- d_4 mit 97,3% der größte Anteil an der Summe der PF zu beobachten, während E1- d_4 und 4-MeO-E1- d_4 lediglich in Spuren zu 1,3% und 1,4% enthalten waren.

Da analog zu 4-HO-E2 ebenfalls für 4-HO-E1 eine bevorzugte Methylierung an Position 4 beschrieben wird (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990), wurde für 3-O-Me-4-HO-E1- d_4 durch die geringere 3-O-Methylierung ein erheblich kleinerer Anteil im Vergleich zu 4-MeO-E1- d_4 erwartet. Auch wenn 3-O-Me-4-HO-E1- d_4 in dem hergestellten Standard nicht nachgewiesen wurde (Abb. 43), deckt sich diese Beobachtung jedoch mit weiteren Untersuchungen, bei denen ebenfalls keine 3-O-Methylierung (Dawling et al., 2001; Goodman et al., 2002) oder lediglich ein sehr geringer Anteil von 3-O-Me-4-HO-E2 (Roy et al., 1990) resultierte.

Neben den oben genannten Verbindungen waren keine weiteren deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metabolite nachzuweisen, wobei gleichermaßen d_2 -Analoga von E1 nicht detektiert wurden. Da im Brustgewebe neben E1 ebenfalls 4-HO-E1 quantifiziert werden sollte, war die Kontamination mit den entsprechenden deuterierten Analoga nicht nachteilig zu bewerten, so dass der 4-HO-E1- d_4 -Methylether-Standard für die Herstellung des Standardgemisches (Kap. 4.1.6) verwendet wurde.

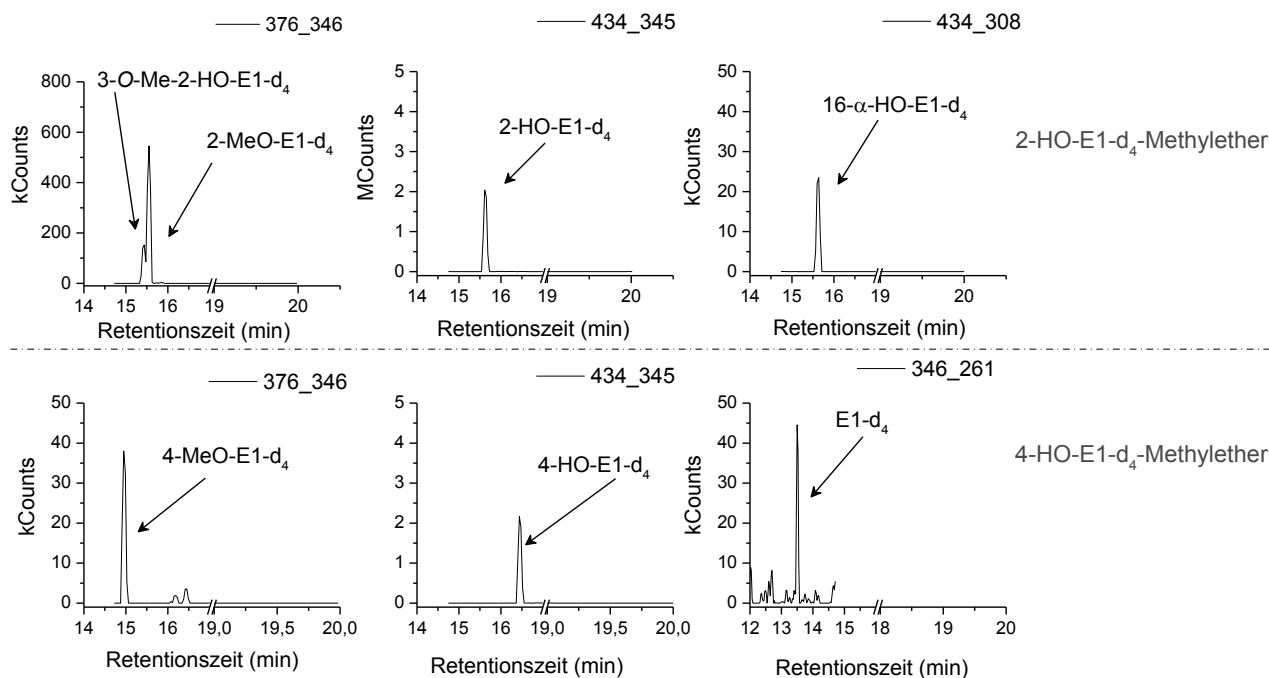


Abb. 43: Umsetzung von 2-HO-E1-d₄ beziehungsweise 4-HO-E1-d₄ mit COMT aus Rattenlebercytosol. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren (376_346, 434_345, 346_261 beziehungsweise 434_308) der jeweiligen Reaktionsprodukte (Einfachinjektion einer 1:100 Verdünnung). Injektionsvolumen: 1 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Bei der Herstellung der Standardgemische wurden die oben genannten absoluten PF der synthetisierten Metabolite sowie deren jeweiliger Response (Kap. 5.1.5) berücksichtigt. Die Mengen von Analyt und Standard sollten in einem vergleichbaren Bereich liegen, damit deren Response bei der GC/MS/MS-Analyse vergleichbar ist. Des Weiteren war zu beachten, dass sich eventuelle Konzentrationsänderungen eines Analyten, insbesondere durch Verluste im Rahmen der SPE oder durch Enzymbindung während der Konjugatspaltung (Kap. 5.3.5), ebenfalls auf den Standard auswirken.

Die zudotierten Mengen des ISTD sollten daher annähernd der Menge des Analyten entsprechen. Diesbezüglich war zu berücksichtigen, dass sowohl der 2-HO-E1-d₄-Methylether- als auch der 4-HO-E1-d₄-Methylether-Standard, infolge von nicht umgesetzter Ausgangssubstanz und durch die Entstehung von Nebenprodukten, bereits E1-d₄, 2-/4-HO-E1-d₄ und 16-α-HO-E1-d₄ enthielten. Demnach musste lediglich eine Zugabe von E2-d₃ und 16-α-HO-E2-d₃ sowie 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃ erfolgen, wobei zwei Referenzlösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung deuterierter Metabolite hergestellt wurden:

E2-d₃-Metaboliten-Referenzlösung

- E2-d₃
- 2-/4-MeO-E2-d₃
- 3-O-Me-2-/4-HO-E2-d₃
- 16-α-HO-E2-d₃

E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung

- E1-d₄
- 2-/4-MeO-E2-d₄
- 3-O-Me-2-HO-E1-d₄
- 16-α-HO-E1-d₄
- 2-/4-HO-E1-d₄
- 2-/4-HO-E2-d₃

Um den Volumenfehler bei der Zugabe der internen Standardlösungen so klein wie möglich zu halten, sollten die Probenansätze vor der Aufarbeitung jeweils mit 100 µl der beiden Metaboliten-Referenzlösungen dotiert werden. Um dabei einen Überblick über die resultierenden absoluten PF der deuterierten E1- und E2-Metabolite sowie enthaltener Kontaminationen der entsprechenden undeuterten Analoga zu erhalten, wurden beide Metaboliten-Referenzlösungen einer Charakterisierung unterzogen. Diesbezüglich wurden diese ebenfalls im *MRM*-Modus hinsichtlich der deuterierten und undeuterten *Quantifier*-Übergänge von E1, E2 sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite analysiert.

5.4.2 Charakterisierung der verwendeten E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung

5.4.2.1 E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung

In der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung waren neben den erwarteten deuterierten E1-Metaboliten und 2-/4-HO-E2-d₃ ebenfalls undeuterte E1- und E2-Catechole nachzuweisen (Abb. 44). Auch wenn bei der Überprüfung des verwendeten 2-/4-HO-E1-d₄-Methylether-Standards (Kap. 5.4.1.3) sowie von 2-/4-HO-E1-d₄ beziehungsweise 2-/4-HO-E2-d₃ eine Kontamination mit undeuterten E1- und E2-Hydroxylierungsprodukten ausgeschlossen wurde, ist das Vorhandensein der undeuterten E1- und E2-Catechole mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Verwendung der entsprechenden deuterierten Analoga zurückzuführen. Während bei der Überprüfung Letzterer lediglich eine Absolutmenge von jeweils 10 pg/Säule getestet wurde, war die Einspritzmenge bei 100 µl der hergestellten E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung für 2-/4-HO-E1-d₄ um den Faktor 20 beziehungsweise 36 und für 2-/4-HO-E2-d₃ gleichermaßen um den Faktor 117 größer (Kap. 4.1.6). Demnach waren Kontaminationen der undeuterten E1- und E2-Catechole erst bei größeren Einspritzmengen zu beobachten.

5.4.2.2 E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung

In der E2-d₃-Metaboliten-Referenzlösung waren neben E2-d₃ und dessen Methylierungsprodukten ebenfalls 16-α-HO-E2-d₃, E2 und E1-Methylierungsprodukte enthalten (Abb. 44). Während die Kontamination mit letzteren Metaboliten bereits bei der Überprüfung des 2-/4-

HO-E2-d₃-Methylether-Standards beobachtet wurde (Kap. 5.4.1.2), war die Kontamination mit undeuteriertem E2 bezüglich der vorherigen Versuche nicht zu erwarten. In Bezug auf die Herstellung des Referenzgemisches war eine Kontamination mit E2 am ehesten auf E2-d₃ zurückzuführen, so dass E2-d₃ nachfolgend auf eine Kontamination mit der entsprechenden undeuterten Analoga getestet wurde. Bereits bei einer Einspritzmenge von 5 pg waren Spuren von E2 nachzuweisen. Bei der Verwendung von 100 µl der hergestellten E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung war die Einspritzmenge um den Faktor 21 größer (Kap. 4.1.6), so dass E2-Kontaminationen um 50.000 Counts zu beobachten waren (Abb. 44; Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 1*). Da in 16-α-HO-E2-d₃ kein E2 nachzuweisen war, ist die E2-Kontamination der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung allein auf E2-d₃ zurückzuführen.

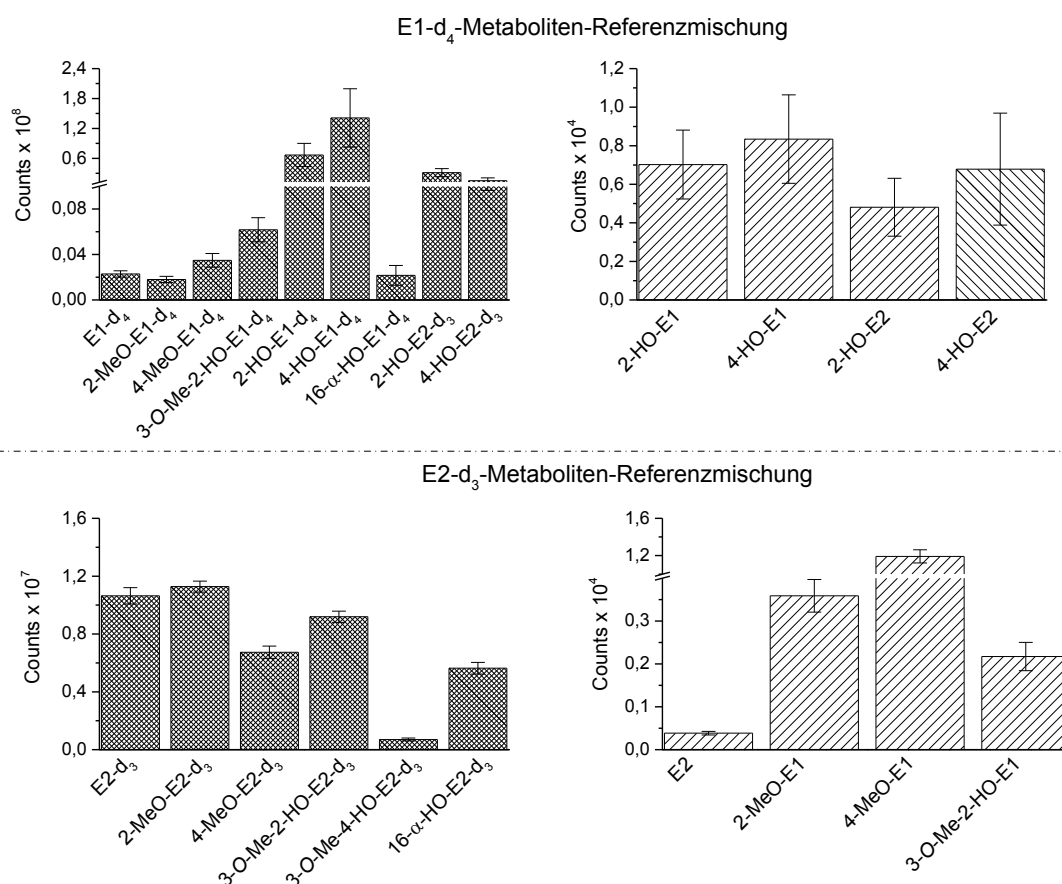


Abb. 44: Absolute PF der deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metabolite von jeweils 100 µl der hergestellten E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Messung mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Injektionsvolumen: 2 µl. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab 93 und Tab. 94.

Im Rahmen der Quantifizierung war demnach nicht nur eine Kontamination mit E1-Methylierungsprodukten zu berücksichtigen sondern ebenfalls eine Kontamination mit E1- und E2-

Catecholen sowie von E2. Tab. 34 gibt einen Überblick über die absoluten PF deuterierter beziehungsweise undeuterierter E1- und E2-Metabolite bei der Verwendung von 100 µl der E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Für die Bestimmung des durchschnittlichen Anteils eines deuterierten Metaboliten beziehungsweise einer undeuterierten Kontaminante an der jeweiligen Mischung wurden die mittleren PF aller nachgewiesenen Metabolite addiert, deren Summe gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelne PF des Metaboliten beziehungsweise der Kontaminante darauf bezogen.

Tab. 34: Absolute PF deuterierter beziehungsweise undeuterierter E1- und E2-Metabolite bei der Verwendung von 100 µl der hergestellten E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion), wobei jeweils die MW und die STABW angegeben sind. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: Anhang, Tab 93 und Tab. 94.

Analyt	PF (MW ± STABW)	durchschnittlicher Anteil/Mischung (%)
<i>E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung</i>		
E1-d ₄	2.286.700 ± 276.300	0,8
2-MeO-E1-d ₄	1.801.700 ± 271.000	0,7
4-MeO-E1-d ₄	3.485.700 ± 601.200	1,3
3-O-Me-2-HO-E1-d ₄	6.173.700 ± 1.064.400	2,3
2-HO-E1-d ₄	76.790.000 ± 23.181.400	24,7
4-HO-E1-d ₄	141.123.300 ± 58.490.192	52,1
16-α-HO-E1-d ₄	2.164.000 ± 8.750.000	0,8
2-HO-E1-d ₃	31.31.000 ± 8.069.700	11,6
4-HO-E1-d ₃	15.223.300 ± 5.585.000	5,6
2-HO-E1	70.200 ± 83.500	0,03
4-HO-E1	83.500 ± 23.000	0,03
2-HO-E2	48.100 ± 15.000	0,02
4-HO-E2	67.900 ± 29.100	0,03
<i>E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung</i>		
E2-d ₃	10.640.000 ± 563.205	23,1
2-MeO-E2-d ₃	11.280.000 ± 379.900	24,5
4-MeO-E2-d ₃	6.739.300 ± 425.500	14,7
3-O-Me-2-HO-E2-d ₃	9.194.300 ± 389.500	20,0
3-O-Me-4-HO-E2-d ₃	703.500 ± 104.400	1,5
16-α-HO-E2-d ₃	5.636.000 ± 402.800	12,3
E2	38.500 ± 4.200	0,08
2-MeO-E1	358.900 ± 38.000	0,8
4-MeO-E1	1.191.300 ± 71.200	2,6
3-O-Me-2-HO-E1	217.300 ± 33.000	0,5

5.4.3 Quantifizierung der E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung

Um E1- und E2-Metabolite im Brustgewebe zu quantifizieren, mussten die genauen Absolutmengen der entsprechenden deuterierten Analoga bestimmt werden, die bei der Dotierung der Probenansätze eingesetzt wurden. Metabolite, die selbstständig synthetisiert worden sind, konnten bei der Herstellung der Referenzmischungen nicht in definierten Mengen dazugegeben werden, so dass diese mittels Einpunktkalibrierung über die entsprechenden undeuterierten Analoga quantifiziert wurden. Dabei war zu beachten, dass die PF der undeuterierten Metabolite in einem vergleichbaren Bereich wie die entsprechenden deuterierten Analoga liegen, da der Linearitätsbereich der jeweiligen Metabolite nicht bestimmt wurde. Alle Probenansätze wurden vor der Aufarbeitung mit jeweils 100 µl der E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung versetzt, so dass ebenfalls bei der Quantifizierung Letzterer, jeweils 100 µl Referenzlösung verwendet wurden (Kap. 4.2.20). Nach dem Evaporieren bis zur Trockene erfolgte eine Derivatisierung in BSTFA + n-Heptan, wobei anschließend jeweils 2 µl des jeweiligen Reaktionsgemisches mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert wurden (Kap. 4.2.21). Die Absolutmengen deuterierter Metabolite, welche bei der Dotierung der Probenansätze mit jeweils 100 µl E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung eingesetzt wurden, sind Tab. 35 zu entnehmen.

Tab. 35: Übersicht der den Probenansätzen zudotierten Absolutmengen des jeweiligen deuterierten Metaboliten über 100 µl einer E1-d₄- sowie 100 µl einer E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung.

<i>E1-d₄-Metaboliten-Mischung (100 µl/Ansatz)</i>		
Analyt	m <i>Analyt/Ansatz</i>	m <i>Analyt/2 µl Injektionsvolumen</i>
E1-d ₄	224,3 pg	15,0 pg
2-HO-E1-d ₄	6213,3 pg	414,2 pg
2-HO-E2-d ₃	17600 pg	1173,3 pg
4-HO-E1-d ₄	10963 pg	730,2 pg
4-HO-E2-d ₃	17600 pg	1173,3 pg
16-α-HO-E1-d ₄	5724,7 pg	381,6 pg
2-MeO-E1-d ₄	10674,4 pg	711,6 pg
4-MeO-E1-d ₄	2061,5 pg	137,4 pg
3-O-Me-2-HO-E1-d ₄	1554,4 pg	103,6 pg
<i>E2-d₃-Metaboliten-Mischung (100 µl/Ansatz)</i>		
Metabolit	m <i>Analyt/Ansatz</i>	m <i>Analyt/2 µl Injektionsvolumen</i>
E2-d ₃	1600 pg	106,7 pg
16-α-HO-E1-d ₃	19600 pg	1306,7 pg
2-MeO-E2-d ₃	1983,7 pg	132,3 pg
4-MeO-E2-d ₃	831,8 pg	55,5 pg

5.4.4 Anpassung der Absolutmengen an den erwarteten Probengehalt von E1 und E2

Im Brustgewebe stellen E1 und E2 die beiden potentesten und gleichzeitig am häufigsten vorkommende Estrogene dar, so dass die zur Dotierung eingesetzten Absolutmengen der entsprechenden deuterierten Analoga auf die im Gewebe zu erwartenden PF von E1 und E2 angepasst wurden. Letztere waren im Brustgewebe lediglich in Konzentrationen im unteren pg-Bereich pro Gramm Gewebe enthalten (Kap. 5.6.1), so dass aufgrund dessen und infolge der Komplexität der Matrix WFR im Bereich von 50% für vertretbar befunden wurden (Kap. 5.5.2). Während in diesem Zusammenhang für E2 Gehalte von 0,23 bis 3,46 pmol/g Gewebe ermittelt wurden, waren diese für E1 mit 0,10 bis 9,93 pmol/g wesentlich höher. Infolge der oben genannten Aspekte waren für E2 PF zwischen 100.000 und 300.000 Counts zu erwarten (Abb. 45), wobei für E1 die PF aufgrund der höheren Probengehalte im Normalfall um den Faktor 10 größer waren (Abb. 45).

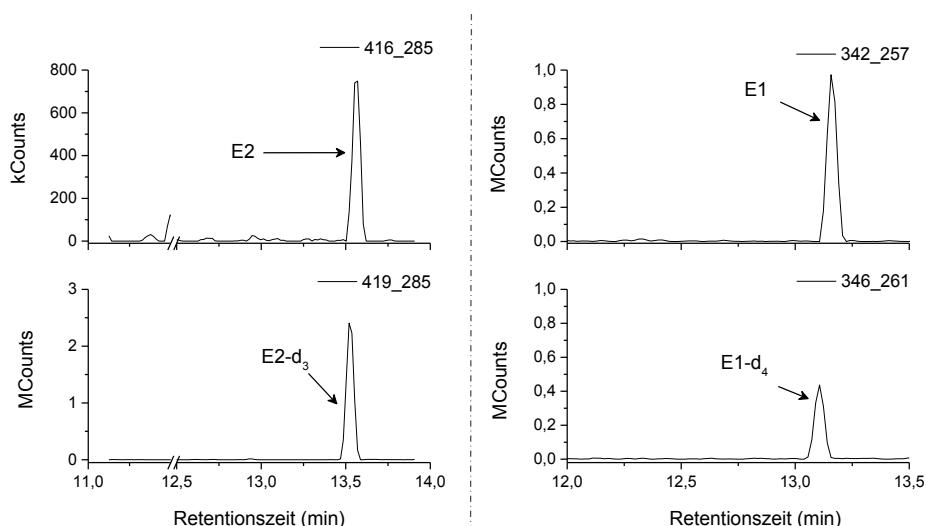


Abb. 45: Exemplarische Chromatogramme von E1, E2 sowie den entsprechenden deuterierten Analoga bezüglich der absoluten PF nach der Aufarbeitung von humanen Brustgewebe mit jeweils 100 µl einer E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Dabei wurden 200 mg homogenisiertes Brustgewebe in 2 ml Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen, unter anderem mit 1600 pg E2-d₃ beziehungsweise 224 pg E1-d₄ als ISTD versetzt, mit Chloroform extrahiert und mittels SPE aufgereinigt. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt ist der extrahierte Quantifier-Übergang für E2 (416_285), E2-d₃ (419_285), E1 (342_257) und E1-d₄ (346_261); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 15 \text{ pg}$ für E1-d₄, 107 pg für E2-d₃. Injektionsvolumen: 2 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

Damit der Response von Analyt und deuteriertem ISTD bei der Analyse mittels GC/MS/MS vergleichbar ist, sollte die Menge des zudotierten ISTD annähernd der Menge des Analyten entsprechen. Diesbezüglich würde im Idealfall für den RF ein Wert von 1 resultieren. Über 100 µl der d₄-E1- beziehungsweise d₃-E2-Metaboliten-Referenzmischung wurden die Proben-

ansätze mit einer Absolutmenge von 224 pg E1-d₄ und 1600 pg E2-d₃ dotiert. Diesbezüglich resultierten für E2-d₃ PF bis 5 MCount, während die PF für E1-d₄ bei maximal 1 MCount lagen (Abb. 45). Bei einer E2-PF um 250.000 Counts ergab sich daher ein RF von etwa 0,03. Für eine E1-PF um 3.000.000 Counts berechnete sich ein RF von etwa 2,3, wobei Letzterer in Hinblick der Quantifizierung von E1 noch in einem vertretbaren Bereich lag.

Bezüglich der zu erwartenden E2-PF war die Dotierung der Proben mit 1600 pg E2-d₃ viel zu hoch, so dass dessen eingesetzte Menge reduziert wurde. Auch wenn die Reduktion der E2-d₃-Menge auf ein-Zehntel ideal gewesen wäre, war dies nicht zu realisieren, da der Volumenfehler durch ein zu kleines pipettiertes Volumen zu groß geworden wäre. Daher wurde die E2-d₃-Menge auf ein-Siebtel reduziert. Demnach wurden alle Probenansätze anschließend mit 15 µl der d₃-E2-Metaboliten-Referenzmischung versetzt, so dass diesbezüglich eine Dotierung mit 240 pg E2-d₃ erfolgte (Tab. 36).

Tab. 36: Übersicht der den Probenansätzen zudotierten Absolutmengen des jeweiligen deuterierten Metaboliten über 15 µl einer E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung.

<i>E2-d₃-Metaboliten-Mischung (15 µl/Ansatz)</i>		
Analyt	m <i>Analyt/Ansatz</i>	m <i>Analyt/2 µl Injektionsvolumen</i>
E2-d ₃	240 pg	16 pg
16-α-HO-E1-d ₃	2940 pg	196 pg
2-MeO-E2-d ₃	297,6 pg	19,8 pg
4-MeO-E2-d ₃	124,8 pg	8,3 pg

Wie erwartet, resultierten bei der Verwendung einer Absolutmenge von 240 pg E2-d₃ pro Ansatz kleinere PF (Abb. 46), so dass der RF um den Faktor 10 auf etwa 0,2 erhöht wurde. Problematisch war die Volumenreduktion der d₃-E2-Metaboliten-Referenzmischung für 3-O-Me-4-HO-E2-d₃ zu bewerten, da diesbezüglich ebenfalls dessen Zugabemenge reduziert wurde. In Abhängigkeit der jeweiligen WFR war für diesen Metaboliten teilweise ein vollständiger Verlust beziehungsweise lediglich maximale PF um 50.000 Counts zu beobachten (Abb. 46). Aufgrund dessen und da es sich bei 3-O-Me-2-HO-E2-d₃ und 3-O-Me-4-HO-E2-d₃ nur um Nebenprodukte der Methylierung von 2-/4-HO-E2 handelt, wurden diese im Rahmen der Quantifizierung nicht berücksichtigt. Letzteres wurde ebenfalls auf 3-O-Me-4-HO-E1 übertragen, da sich dessen deuterierter Standard bei der Umsetzung von 4-HO-E1-d₄ mit COMT aus Rattenlebercytosol nicht gebildet hatte (Kap. 5.4.1.3).

Für die Quantifizierung von E1- und E2-Metaboliten wurden folglich 15 µl der E2-d₃- beziehungsweise 100 µl der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung verwendet.

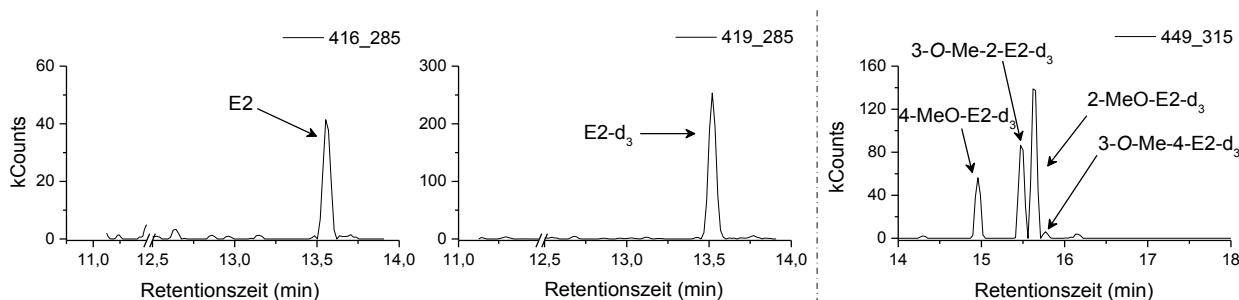


Abb. 46: Exemplarische Chromatogramme von E2, E2-d₃ sowie deuterierten E2-Methylierungsprodukten bezüglich der absoluten PF nach der Aufarbeitung von humanen Brustgewebe mit 15 µl einer E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Dabei wurden 200 mg homogenisiertes Brustgewebe in 2 ml *Sørensen* Phosphat-Puffer (pH 4,9) aufgenommen, unter anderem mit 240 pg E2-d₃ als ISTD versetzt, mit Chloroform extrahiert und mittels SPE aufgereinigt. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Dargestellt ist der extrahierte *Quantifier*-Übergang für E2 (416_285), E2-d₃ (419_285), 2-/4-MeO-E2-d₃ (449_315) und 3-O-Me-2-/4-HO-E2 (449_315); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 16 \text{ pg}$ für E2-d₃. Injektionsvolumen: 2 µl. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

5.4.5 Stabilität der E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung

Die hergestellte E1-d₄- und E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung musste eine gleichbleibende Stabilität aufweisen, da diese im Rahmen der Quantifizierung über mehrere Wochen verwendet werden sollte. Da insbesondere die Catechol-Estrogene, 2-HO-E2 und 4-HO-E2, in Hinblick ihrer Stabilität als schwierig zu beurteilen sind, weil diese leicht durch eine oxidative Zersetzung zu den entsprechenden Chinonen zerfallen (Gelbke et al., 1973), wurde zunächst deren Lösungsstabilität getestet. Um zu überprüfen, ob die oben genannten Aspekte auch auf 2-/4-HO-E1 zutreffen, wurden diese ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Dabei wurde einerseits die Stabilität der jeweiligen Urlösung betrachtet, welche in ACN mit 0,1% FA (FA; v/v) hergestellt und bei -24 °C in abgedunkelten Probenvials aufbewahrt wurde. Von dieser Urlösung wurde jeweils eine Verdünnung in ACN beziehungsweise ACN mit 0,1% FA (v/v) in einer Konzentration von 10 pg/µl hergestellt. Aus der Urlösung und den frisch hergestellten Verdünnungen wurde anschließend eine Analytmenge von 10 pg mittels GC/MS/MS im MRM-Modus analysiert, wobei die absoluten PF des jeweiligen extrahierten *Quantifier*-Übergangs ermittelt wurden. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied der mittleren PF zwischen der Urlösung und den unterschiedlich hergestellten Verdünnungen als Maß für die Lösungsstabilität herangezogen.

Infolge der strukturellen Ähnlichkeit von deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Catecholen kann deren Lösungsstabilität miteinander verglichen werden, so dass die nachfolgenden Ergebnisse ebenfalls auf deuterierte E1- und E2-Catechole übertragen wurden.

5.4.5.1 Vorversuche zur Lösungsstabilität von Catechol-Estrogenen

Bei Verdünnungen von 2-/4-HO-E1 beziehungsweise 2-/4-HO-E2, die in ACN hergestellt und bei - 24 °C im Gefrierschrank gelagert wurden, konnte bereits nach wenigen Tagen bis einigen Wochen beobachtet werden, dass sich deren Lösungen gelblich verfärbten. Dieser Farbumschlag wurde als erstes Anzeichen für einen Analytzerfall gedeutet, so dass ACN mit 0,1% FA versetzt wurde, um die phenolischen Hydroxygruppen von Catechol-Estrogenen zu deprotonieren und dadurch zu stabilisieren.

Zwischen der Urlösung und den Verdünnungen in ACN mit 0,1% FA wurde bei 2-HO-E1 und 4-HO-E1 sowie bei 2-HO-E2 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mittleren PF beobachtet (Abb. 47; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), wodurch verdeutlicht wurde, dass deren Stabilität bei der Herstellung von verdünnten Lösungen in ACN mit 0,1% FA gewährleistet werden konnte. Unterschiede davon resultierten für 4-HO-E2. Diesbezüglich waren im Vergleich zur Urlösung die mittleren PF für verdünnte Lösungen in ACN mit FA-Zusatz statistisch signifikant kleiner (Abb. 47; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$). Demnach muss für 4-HO-E2 eine stärkere Zersetzung eingetreten sein, da es unter diesen Bedingungen nicht ausreichend stabil blieb. Während 2-HO-E1 und 2-HO-E2 sowie 4-HO-E2 in ACN-Verdünnungen genauso stabil waren, wie bei einem Zusatz von 0,1 % FA (Abb. 47; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$), wurde für 4-HO-E1 in diesem Zusammenhang keine vergleichbare Stabilität beobachtet, da dessen mittlere PF in ACN signifikant kleiner waren, als bei einem Zusatz von FA (Abb. 47; ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$).

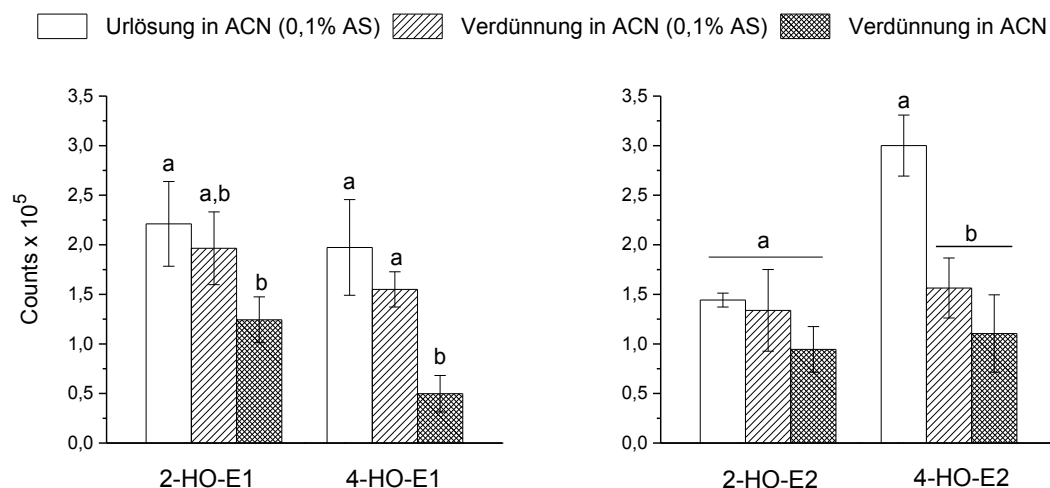


Abb. 47: Stabilität der Catechol-Estrogene hinsichtlich der jeweiligen Urlösung (Lagerung bei - 24°C, Abdunkelung der Probenials mit Aluminiumfolie) sowie daraus frisch hergestellter Verdünnungen in ACN beziehungsweise ACN mit 0,1% FA (v/v). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$ für 2-/4-HO-E1 und 2-/4-HO-E2. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten PF aus drei Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 95.

Auch wenn nur bei 4-HO-E2 die mittleren PF bei Verdünnungen mit ACN und 0,1% FA im Vergleich zur Umlösung signifikant kleiner waren, verdeutlichen die Ergebnisse, dass für E1- und E2-Catechole im Rahmen analytischer Zwecke stets frische Stammlösungen herzustellen sind, da sonst Stabilitätsverluste nicht zu vermeiden sind. Ist dies zum Beispiel aus Kostengründen nicht möglich, sind verdünnte Lösungen in ACN mit 0,1% FA herzustellen, da die Stabilität der Catechol-Estrogene in ACN am schlechtesten gewährleistet werden konnte (Abb. 47). Im Rahmen der Arbeit wurden daher alle weiteren Standardlösungen von 2-/4-HO-E1 und 2-/4-HO-E2 in ACN mit 0,1% FA hergestellt. Zugunsten der höheren Stabilität von Catechol-Estrogenen bei FA-Zusatz wurde dieser ebenfalls bei der Herstellung der E1-d₄- und E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung verwendet.

5.4.6 Stabilitätsüberprüfung der deuterierten Standardmischungen über den gesamten Messzeitraum

Um im Rahmen quantitativer Bestimmungen von E1- und E2-Metaboliten repräsentative Aussagen treffen zu können, wurden Standardlösungen der entsprechenden deuterierten Analoga mit unverändert hoher Qualität benötigt. Demnach musste die E1-d₄- beziehungsweise E2-d₃-Metabolitenmischung über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen (8.11.2014 bis 21.12.2014) eine gleichbleibende Stabilität aufweisen. In Anbetracht dessen, wurden bei jeder Probenserie aus zwei frisch hergestellten Referenzen (Kap. 4.2.20) die absoluten PF der extrahierten *Quantifier*-Übergänge aller deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metabolite ermittelt. Dabei wurde eine eventuelle Abnahme der absoluten PF deuterierter Metabolite als Maß für die Abnahme der Lagerungsstabilität herangezogen. Insbesondere waren die PF von 2-/4-HO-E2-d₃ und E2-d₃ zu betrachten, da aus Letzterem durch Oxidationseinflüsse die entsprechenden deuterierten Oxidationsprodukte, 2-HO-E2-d₃ und 4-HO-E2-d₃, gebildet werden (Kap. 5.3.6). Während für E2-d₃ eine Abnahme der mittleren PF zu verfolgen wäre, würde der Anteil von 2-/4-HO-E2-d₃ steigen. Dieser Aspekt ist ebenfalls auf E1-d₄ und 2-/4-HO-E1-d₄ zu übertragen, so dass auch deren PF näher betrachtet wurden. Da in Kap. 5.3.4 gezeigt wurde, dass die Oxidation von 2-/4-HO-E2 und 2-/4-HO-E1 zu den entsprechenden Chinonen zu einem vollständigen Verlust der Catechol-Estrogene führte, ist ebenfalls eine mögliche Abnahme von 2-/4-HO-E2 und 2-/4-HO-E1 aufgrund oxidativer Einflüsse zu berücksichtigen. Zudem ist der Verlauf beziehungsweise eine eventuelle Abnahme der PF von E2 zu beachten, da in Kap. 5.3.4 ebenfalls verdeutlicht wurde, dass unter anderem E2 durch Oxidation an der Doppelbindung von C2 beziehungsweise C4 des aromatischen A-Rings zu 2-HO-E1 und 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E1 und 4-HO-E2 umgewandelt werden kann. Demnach ist die Abnahme von E2 ebenfalls mit einer Zunahme der PF von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 verbunden.

Für E2-d₃, dessen Methylierungsprodukte und 16- α -HO-E2-d₃ waren über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen vergleichbare PF zu beobachten (Abb. 48), so dass eine gleichbleibende Qualität dieser Standards gewährleistet war. Höhere Schwankungen waren für den Großteil aller deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metabolite insbesondere am 6.12 und 7.12 sowie am 25.11 und 26.11 zu verfolgen. Diesbezüglich resultierten weitaus größere mittlere PF (Abb. 48 und Abb. 49), was mit einer erhöhten Geräteempfindlichkeit in diesen Messzeiträumen in Verbindung gebracht werden kann. Während an den übrigen Messtagen die Geräteempfindlichkeit durchschnittlich von 150.500 bis 202.600 Counts schwankte, war diese an den oben genannten Messtagen bis zu 17,2% höher, da mittlere PF von 201.700 bis 244.700 Counts beobachtet wurden (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 1 und Tab. 3*). Größere Schwankungen resultierten ebenfalls über den gesamten Messzeitraum für die mittleren PF der undeuterierten E2-Metabolite (Abb. 48). Diese waren am stärksten für 2-HO-E2 und 4-HO-E2 zu verfolgen (Abb. 48), so dass einerseits deren mögliche Oxidationsanfälligkeit durch die Reaktion zu den entsprechenden Chinonen und andererseits deren Bildung durch die Umwandlung von E2 näher betrachtet werden musste.

Für 2-HO-E2 waren am 8.11. mit durchschnittlich 47.700 Counts die kleinsten mittleren PF zu beobachten, während am 19.12 mit durchschnittlich 137.300 Counts das Maximum der mittleren PF resultierte (Abb. 48). Demnach war im Verlauf des Messzeitraums ein ansteigender Trend für 2-HO-E2 zu verfolgen, dessen Ursache möglicherweise in einer Umwandlung beziehungsweise Oxidation von E2 liegt. Um diesen Aspekt zu bestätigen, müsste entgegengesetzt der ansteigenden PF von 2-HO-E2 eine Abnahme von E2-PF zu beobachten sein, wobei deren Verlauf zweigeteilt betrachtet werden muss. Während vom Beginn an der Messungen bis zum 7.12 eine Probendotierung mit 1600 pg (\equiv 107 pg/Säule) erfolgte, wurde ab dem 11.12 die Zugabemenge auf 240 pg (\equiv 16 pg/Säule) reduziert (Abb. 48). Demnach müsste in beiden Zeiträumen eine Abnahme der mittleren PF von E2 zu verfolgen sein. Das war jedoch nicht ausschließlich der Fall. Während im ersten Zeitraum am 8.11. mit 29.800 Counts die kleinsten mittleren PF zu beobachten waren, resultierte am 26.11. mit 76.200 Counts das Maximum der mittleren PF (Abb. 48). Für E2 war daher in diesem Zeitraum ein ansteigender Trend zu verfolgen. Im darauf folgenden Zeitraum (30.11 bis 7.12) war eine Abnahme von E2 auf 39.800 Counts zu beobachten (Abb. 48). Die mittleren PF waren am 7.12 durchschnittlich um 47,8% kleiner als am 26.11, so dass die Umwandlung beziehungsweise Oxidation von E2 zu 2-HO-E2 eventuell nach dem 26.11 stattgefunden hatte. Zwischen dem 11.12 und dem 21.12 lagen die mittleren PF von E2 näherungsweise in einem vergleichbaren Bereich (Abb. 48). Demnach wurde auch bis zum Minimum der PF am 20.12 mit 16.800 Counts kein absteigender Trend beobachtet (Abb. 48).

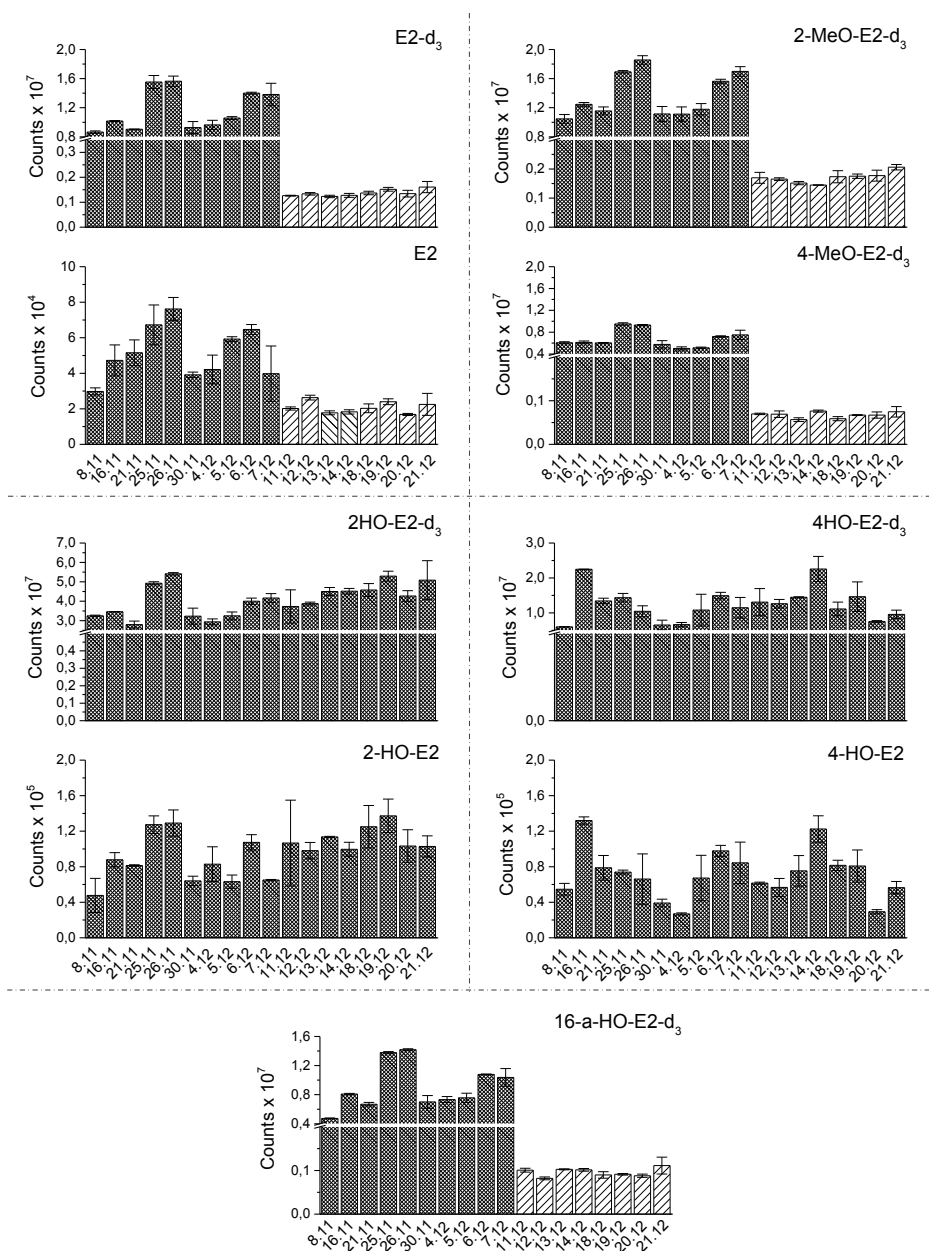


Abb. 48: Absolute PF der E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen. Dabei wurden zwei Referenzen bei jeder Probenreihe frisch hergestellt und deren absolute PF der extrahierten deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metabolite ermittelt, wobei vom 8.11.2014 bis 7.12.2014 jeweils 100 µl der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung verwendet wurden. Ab dem 11.12.2014 bis 21.12.2014 erfolgte eine Dotierung der Probenansätze mit 15 µl der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Von der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung wurden über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen 100 µl verwendet. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); Absolutmengen auf der Säule: Kap 4.1.6 beziehungsweise Kap. 5.4.3 und Kap. 5.4.4. Injektionsvolumen: 2 µl. Dargestellt sind Mittelwert und Range/2 aus 2 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 1 und Tab. 3.*

Da eine Abnahme von E2 lediglich vom 30.11 bis zum 7.12 zu verfolgen war und in dem übrigen Zeitraum ein ansteigender beziehungsweise gleichbleibender Trend resultierte (Abb.

48), kann die Oxidation beziehungsweise Umwandlung von E2 zu 2-HO-E2 nicht sicher bestätigt werden.

Für 4-HO-E2 war vom 16.11 mit einer mittleren PF von 132.000 Counts zunächst ein abnehmender Trend bis zum 4.12 zu verfolgen (Abb. 48). Diesbezüglich resultierte eine mittlere PF von 26.900 Counts (Abb. 48). Möglicherweise ist die Abnahme auf die Oxidation zu dem entsprechenden Chinon zurückzuführen. In Kap. 5.3.4 war dieser Aspekt mit einem vollständigen Verlust der Catechol-Estrogene verbunden, da jedoch auch nach dem 4.12 4-HO-E2 nachzuweisen war (Abb. 48), ist dessen Abnahme durch die Oxidation zum Chinon fragwürdig. Eventuell wurde aber durch eine gleichmäßige Oxidation der E2-Kontamination ständig 2-/4-HO-E2 nachgebildet, so dass bei einer Oxidation zu den Chinonen kein vollständiger Verlust von 4-HO-E2 zu erwarten war. Auch im weiteren Verlauf der Messzeit stiegen die mittleren PF bis zum 6.12 beziehungsweise 14.12 auf durchschnittlich 97.900 Counts und 122.500 Counts an (Abb. 48), was ebenfalls auf die Oxidation von E2 zu 4-HO-E2 zurückgeführt werden kann. Zwischenzeitlich (7.12 bis 12.12 beziehungsweise 18.12 bis 21.12) wurde 4-HO-E2 durch Oxidation zum entsprechenden Chinon wiederum verbraucht, wobei Letzteres durch die gleichmäßige Umwandlung von E2 zu 4-HO-E2 nicht vollständig erfolgen konnte (Abb. 48). Die Oxidation von E2 zu 4-HO-E2 ist relativ schwierig zu beurteilen, da eine gleichzeitige Abnahme von E2 nicht in allen der oben genannten Zeiträume zu beobachten war (Abb. 48). Da jedoch in der Zeit vom 30.11 bis 7.12 eine Abnahme von E2 zu verfolgen war und entgegengesetzt für 4-HO-E2 (4.12 bis 6.12) eine Zunahme der mittleren PF durch die eventuelle Bildung von 4-HO-E2 resultierte, war die Oxidation von E2 zu 4-HO-E2 in diesem Zeitraum möglich. Ab dem 11.12 bis 21.12 wurde ein gleichbleibender Trend für die PF von E2 beobachtet (Abb. 48), so dass auch die Oxidation von E2 zu 4-HO-E2 nicht sicher beziehungsweise nur zeitbegrenzt bestätigt werden kann.

Kontaminationen undeutlicher E2-Catechole waren lediglich in der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung vorhanden, so dass bei einer möglichen Umwandlung beziehungsweise Oxidation der E2-Kontamination zu 2-/4-HO-E2 ebenfalls deren Spuren in der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung nachzuweisen wären. Um diesen Aspekt unterstützend für die Vermutung einer Oxidation von E2 heranziehen zu können, hätte Letztere Mischung im Verlauf der Probenmessungen ebenfalls einzeln analysiert werden müssen. Da darauf jedoch verzichtet wurde, bleibt die Oxidation von E2 zu 2-/4-HO-E2 lediglich eine Vermutung.

Im Verlauf der Arbeit wurde eine erhöhte Messunsicherheit der GC/MS/MS im Bereich kleiner PF unter 100.000 Counts beobachtet. Im Rahmen der Analyse der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung wurden für 2-HO-E2 und 4-HO-E2 normalerweise PF im Bereich um 100.000 Counts erwartet, so dass die erhöhten Schwankungen zwischen den mittleren PF von 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E2 mit großer Wahrscheinlichkeit auf die erhöhte Messunsicherheit der GC/MS/MS hinsichtlich des resultierenden PF-Bereichs zurückzuführen sind.

Auch für 2-/4-HO-E2-d₃ waren über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen näherungsweise vergleichbare mittlere PF zu beobachten (Abb. 48), so dass eine Oxidation ausgehend von E2-d₃ ausgeschlossen wurde. Eine gleichbleibende Qualität resultierte daher auch für die deuterierten E2-Catechole.

Für E1-d₄ beziehungsweise 16- α -HO-E1-d₄ war über den gesamten Zeitraum der Messungen ein ansteigender Trend zu verfolgen. Während für E1-d₄ zu Beginn der Messungen (8.11) mittleren PF von 2.132.500 Counts zu beobachten waren, stiegen diese zum Ende (21.12) der Messungen auf 3.255.000 Counts an (Abb. 49). Möglicherweise ist die E2-Kontaminationen der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung im Verlauf der Probenmessungen zu E1 oxidiert worden. Da in Kap. 5.3.4 gezeigt wurde, dass E1 und E2 durch Luftsauerstoff zu 2-/4-HO-E2 beziehungsweise 2-/4-HO-E1 reagieren können, ist ebenfalls eine Oxidation von E2 zu E1 denkbar. Nach Shi et al. (2010) wurde in Gegenwart von Luftsauerstoff eine Oxidation von E2 zu E1 beobachtet, so dass ebenfalls eine Oxidation von E2 in der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung realistisch ist. Dieser Aspekt hätte über eine separate Analyse Letzterer im Verlauf der Probenmessungen bestätigt werden können, da die E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung nach der Herstellung analog der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung frei von E1-Kontaminationen war. Darauf wurde jedoch verzichtet, so dass die Oxidation von E2 zu E1 lediglich vermutet werden kann. Infolge einer Oxidation von E2 zu E1 hätte ein absteigender Trend der mittleren PF für E2 beobachtet werden müssen. Da dies lediglich zwischen dem 30.11 und dem 7.12 zu beobachten war, kann die Oxidation von E2 zu E1 lediglich zeitlich begrenzt bestätigt werden (Abb. 48), wobei die Markierung von E1-d₄ in diesem Zusammenhang nicht erklärt werden kann.

Für 16- α -HO-E1-d₄ wurden zu Beginn der Messungen (8.11) mittlere PF von 2.450.200 Counts beobachtet. Am Ende der Messungen (21.12) resultierten PF von 7.200.000 Counts, so dass diese durchschnittlich um 65,9% höher waren (Abb. 49). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Oxidation von E1-d₄ zu 16- α -HO-E1-d₄ im Verlauf der Probenmessungen. Da in Kap. 5.3.4 gezeigt wurde, dass E1 zu 2-/4-HO-E1 oxidiert werden kann, ist ebenfalls eine Oxidation zu 16- α -HO-E1-d₄ nicht auszuschließen.

Größere Schwankungen resultierten für deuterierte und undeuterierte E1-Catechole (Abb. 49), wobei für deren Beurteilung entsprechend der Catechole von E2 die erhöhte Oxidationsanfälligkeit beziehungsweise Bildung durch Umwandlung von E1 zu berücksichtigen ist. Besonders ausgeprägt waren die Schwankungen bei 4-HO-E1 und 4-HO-E1-d₄, wobei diese Ähnlichkeiten zu dem PF-Verlauf von 4-HO-E2 aufzeigten (Abb. 49).

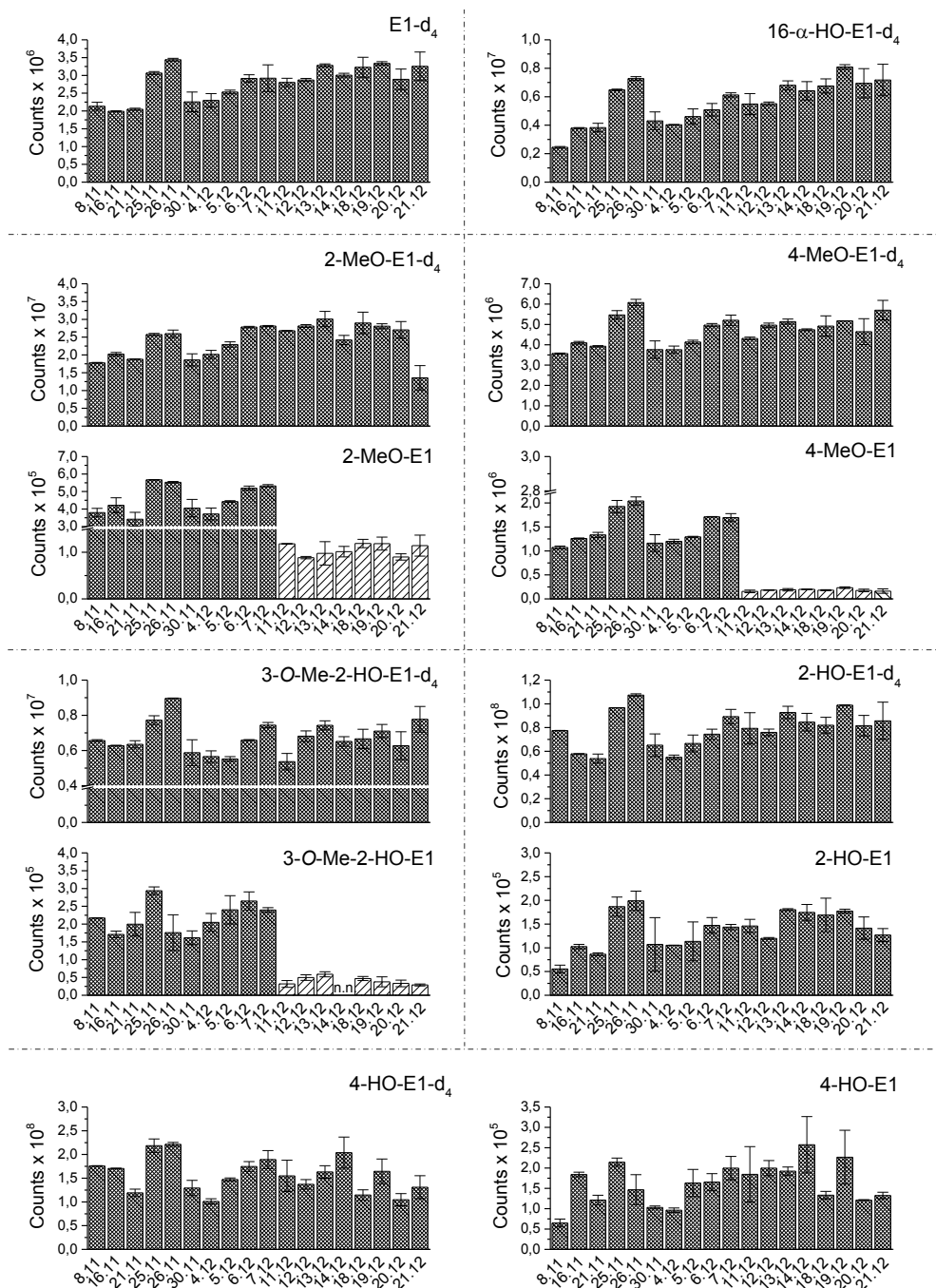


Abb. 49: Absolute PF der E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen. Dabei wurden zwei Referenzen bei jeder Probenserie frisch hergestellt und deren absolute PF der extrahierten deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metabolite ermittelt, wobei vom 8.11 bis 7.12.2014 jeweils 100 µl der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung verwendet wurden. Ab dem 11.12. bis 21.12.2014 erfolgte eine Dotierung der Probenansätze mit 15 µl der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Von der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung wurden über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen 100 µl verwendet. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); Absolutmengen auf der Säule: Kap. 4.1.6 beziehungsweise Kap. 5.4.3 und Kap. 5.4.4. Injektionsvolumen: 2 µl. Dargestellt sind Mittelwert und Range/2 aus 2 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 1 und Tab. 4.*

Auch bei diesen stiegen die mittleren PF mehrfach im Verlauf der Probenmessungen auf ein Maximum an, was durch die Oxidation von gebildetem E1 beziehungsweise E1-d₄ begründet werden kann (Abb. 49). Im Anschluss daran erfolgte wiederum eine Abnahme der PF, da die Oxidation zu den entsprechenden Chinonen folgte (Abb. 49). Analog der E2-Catechole können diese Vermutungen nicht sicher bestätigt werden, da einerseits die Bildung von E1 in der E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung nicht überprüft wurde und andererseits für E1-d₄ kein absteigender Trend der mittleren PF zu beobachten war (Abb. 49). Da im Allgemeinen bei der Analyse der E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung für 2-/4-HO-E1 ebenfalls PF um 100.000 Counts zu verfolgen waren, können deren Schwankungen auch auf die erhöhte Messunsicherheit der GC/MS/MS bei kleinen PF zurückgeführt werden.

Für deuterierte und undeuterierte E1-Methylierungsprodukte waren über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen vergleichbare PF zu beobachten (Abb. 49), so dass eine gleichbleibende Qualität Letzterer gewährleistet war.

Abschließend ist festzuhalten, dass für keinen der deuterierten Standards größere PF-Verluste zu beobachten waren. Demnach war sowohl für die E2-d₃- als auch die E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung eine gleichbleibende Qualität über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen vorhanden. Da Kontaminationen der undeuterierten Metabolite im Rahmen der Quantifizierung gesondert betrachtet wurden (Kap. 5.4.1.1), waren deren Schwankungen infolge möglicher Oxidationseinflüsse von geringerer Bedeutung. Eine vollständige Eliminierung oxidativer Zersetzungsprozesse ist nach Moon et al. (2011) bei der Zugabe von Ascorbinsäure möglich. Dabei blieben Standardlösungen von E1- und E2-Metaboliten bei vergleichbaren Lagerungsbedingungen (-24 °C) für 3 Monate stabil.

5.4.7 Grundlagen zur Berechnung der Probengehalte und der NWG von E2- und E1-Metaboliten im Brustgewebe

In den untersuchten Gewebespenden wurden weder 2-/4-MeO-E2 noch Catechol-Estrogene nachgewiesen (Kap. 5.6.1), so dass die jeweilige NWG berechnet wurde. Dabei war zu beachten, dass dies individuell für den jeweiligen Metaboliten erfolgen musste, da in Kap. 5.4.2 gezeigt wurde, dass die im Rahmen der Quantifizierung verwendete E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung neben unvermeidbaren Kontamination-Spuren von E2 ebenfalls Verunreinigungen von 2-/4-MeO-E1, 3-O-Me-2-HO-E1 sowie 2-/4-HO-E1 und 2-/4-HO-E2 aufzeigte.

Kontaminationen mit undeuterierten Metaboliten sind in Hinblick der Quantifizierung als schwierig zu beurteilen, da neben Metaboliten, die in der Probe enthalten sind ebenfalls Metabolite aus der Referenz stammend, berücksichtigt werden müssen. Im Rahmen der Quanti-

fizierung von 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 wurde vom jeweiligen Gesamtgehalt eines Metaboliten der entsprechende Gehalt aus der Referenz stammend abgezogen, so dass der Probeneigene Gehalt des Metaboliten resultierte (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation _Futh_ - 2015; Tab. 8*). Demnach wurde der eben genannte Aspekt ausreichend berücksichtigt, so dass die Richtigkeit der Analysenergebnisse in Hinblick der Gehalte von E1-Methylierungsprodukten gewährleistet war (Kap. 5.6.1). Wenn 2-/4-MeO-E1 oder 3-O-Me-2-HO-E1 in einer Probe nicht nachgewiesen wurden, würde im Vergleich zum Gesamtgehalt eines Metaboliten ein höherer Gehalt in der Referenz resultieren, so dass diesbezüglich der jeweilige Metabolit als nicht nachgewiesen betrachtet wurde. Für die Berechnung der NWG wurde die doppelte PF der Kontamination von 3-O-Me-2-HO-E1 aus der jeweiligen Referenz stammend herangezogen, so dass entweder eine PF von 100.000 Counts beziehungsweise 150.000 Counts verwendet wurde (Abb. 50).

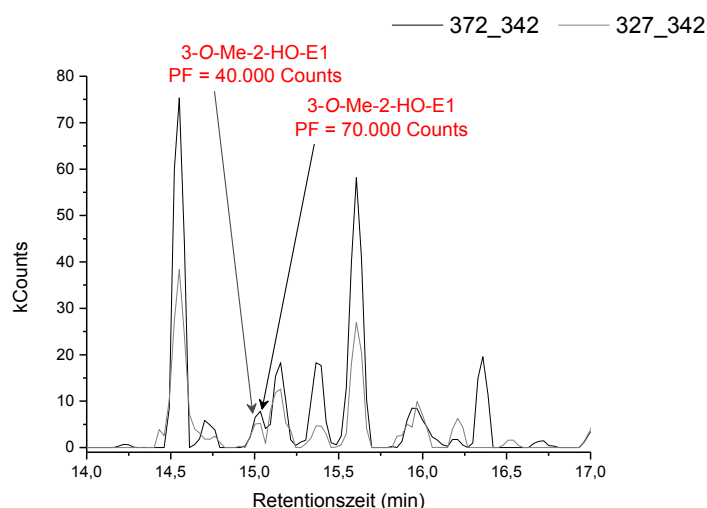


Abb. 50: Exemplarische Chromatogramme der maximalen beziehungsweise minimalen Verunreinigung vom 3-O-Me-2-HO-E1 in der Referenzlösung, wobei die entsprechenden *Quantifier*-Massenspuren (372_342) dargestellt sind. Für die Berechnung der NWG von 3-O-Me-2-HO-E1 wurde jeweils die doppelte PF der Kontaminations-Spur aus der Referenz herangezogen. Analyse mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen 4.2.23.2. Injektionsvolumen: 2 μ l. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation _Futh_ - 2015; Tab. 4*.

E1, 2-/4-MeO-E2, 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 waren in der E1-d₄-/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung nicht enthalten (Kap. 5.4.2), so dass von diesen bei der Quantifizierung kein zusätzlicher Kontaminations-Eintrag zu beachten war. Dabei wurden zunächst die PF des maximalen Rauschens der *Quantifier*-Massenspuren in einer zeitlichen Begrenzung von \pm 2,0 Minuten bezüglich der t_R des jeweiligen Metaboliten integriert und näherungsweise die doppelte PF zur Berechnung der NWG herangezogen (Abb. 51). In Abhängigkeit des jeweiligen Rauschens wurde für jede Probe auf diese Weise individuell die NWG von 2-MeO-E2, 4-MeO-E2 und 16- α -HO-E1 beziehungsweise 16- α -HO-E2 berechnet. Für 2-/4-MeO-E2

und 16- α -HO-E1 war im Verlauf der Probenmessungen ein relativ gleichmäßiges Hintergrundrauschen zu beobachten, so dass die PF, die zur Berechnung der NWG verwendet wurde, lediglich zwischen 25.000 Counts und 150.000 Counts beziehungsweise 25.000 Counts und 60.000 Counts variierten (Abb. 51; Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 8*). Für 16- α -HO-E2 waren die Schwankungsbreiten des Rauschens wesentlich größer. Hierbei stellten PF zwischen 100.000 Counts und 2.600.000 Counts die Grundlage zur Berechnung der NWG dar (Abb. 51; Rohdaten: *Dissertation_Futh_2015; Tab. 7*).

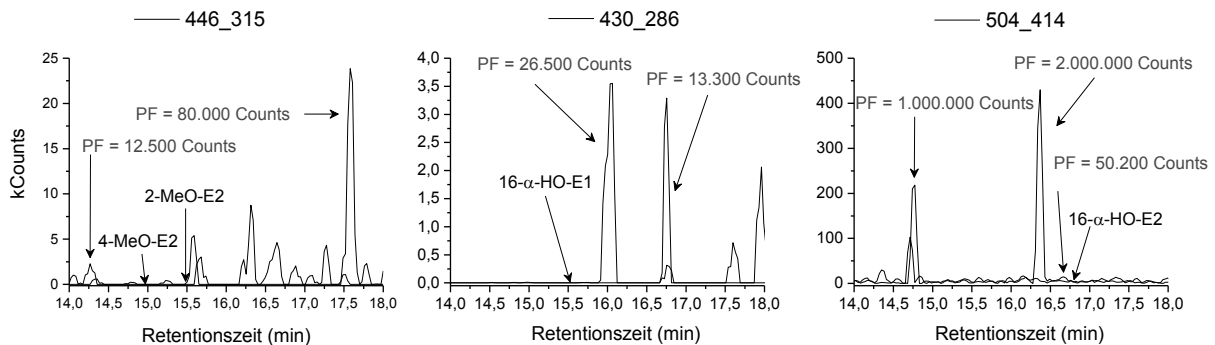


Abb. 51: Exemplarische Chromatogramme des maximalen beziehungsweise minimalen Rauschens der *Quantifier*-Massenspur von 2-/4-MeO-E2 (446_315), 16- α -HO-E1 (430_286) und 16- α -HO-E2 (504_414) in humanem Brustgewebe nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20). In keiner der untersuchten Gewebespenden wurde 2-/4-MeO-E2, 16- α -HO-E2 beziehungsweise 16- α -HO-E1 nachgewiesen, so dass jeweils das Maximum des Rauschens integriert wurde und näherungsweise dessen doppelte PF zur Berechnung der NWG verwendet worden ist. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen 4.2.23.2. Injektionsvolumen: 2 μ l. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 7 und Tab. 8*.

In Kap. 5.4.2 wurde gezeigt, dass der verwendete E2-d₃-Standard geringfügige E2-Kontaminationen besaß, so dass bei 1600 pg E2-d₃/Ansatz E2-Kontaminationen um 50.000 Counts zu beobachten waren. Um bei der Probenaufarbeitung eine zusätzliche Kontamination des Systems mit E2 auszuschließen, wurden jeweils zwei Blindwerte, bestehend aus Referenz und Sörensen Phosphat-Puffer (pH 4,9), analog der Probenreihen aufgearbeitet und auf eine Kontamination mit E2 getestet (Kap. 4.2.21). Dabei wurde wiederum die doppelte PF der unvermeidbaren E2-Kontamination aus den Blindwerten als Kriterium der Kontaminationsfreiheit festgelegt. In Anbetracht der oben genannten Ergebnisse ergab sich näherungsweise eine PF von 100.000 Counts, so dass diese für die Berechnung der NWG herangezogen wurde (Abb. 56). Wenn bei einem Blindwert E2-PF über 100.000 Counts beobachtet wurden, war von einer E2-Kontamination des Systems auszugehen. Diesbezüglich wurden die entsprechenden Probenreihen bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt und das gesamte System auf eine Kontamination mit E2 überprüft (Kap. 5.3.2). Im Verlauf der Probenmessungen wurde die Zugabemenge von E2-d₃ auf 240 pg/Ansatz reduziert (Kap. 5.4.4), was folglich auch mit einer Reduktion der E2-Kontamination verbunden war. Demnach resultierten im Blindwert E2-

Kontaminationen von näherungsweise 30.000 Counts (Abb. 52), so dass diesbezüglich bei der Berechnung der NWG eine PF < 60.000 Counts verwendet wurde.

E1 war in der E1-d₄/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung nicht enthalten (Kap. 5.4.2), so dass auch in den Blindwerten keine Kontamination von E1 vorhanden (Abb. 52). Da ebenfalls das Hintergrundrauschen relativ niedrig war, wurde im Vergleich zu E2 eine geringere PF < 50.000 Counts zur Berechnung der NWG herangezogen.

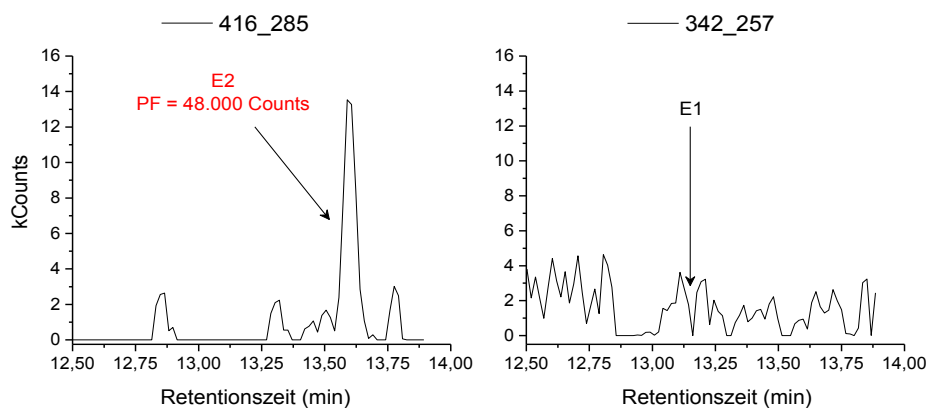


Abb. 52: Exemplarische Chromatogramme der *Quantifier*-Massenspur von E2 (416_285) und E1 (342_257) im Blindwert nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20). Während in allen Blindwert-Ansätzen unabhängig der Gewebedotierung (1600 pg E2-d₃/Ansatz beziehungsweise 240 pg E2-d₃/Ansatz) E2-Kontaminationen nachweisbar waren, wurde E1 in keinem der Blindwerte nachgewiesen. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen 4.2.23.2. Injektionsvolumen: 2 µl. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 2*.

2-/4-HO-E2 und 2-/4-HO-E1 waren ebenfalls als Kontamination in der E1-d₄/E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung enthalten, so dass die Berechnung der NWG analog von E2 erfolgte. Bei der Gewebedotierung (Kap. 4.2.20) mit 2-/4-HO-E2-d₃ resultierte im Blindwert eine Kontamination mit der jeweiligen undeuterten Analoga von näherungsweise 100.000 Counts (Abb. 53), so dass für die Berechnung der NWG jeweils eine PF von 200.000 Counts herangezogen wurde (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 3*). Die Kontaminationen von 2-HO-E1 beziehungsweise 4-HO-E1 waren im Blindwert allgemein etwas höher (Abb. 53; Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 4*), so dass diesbezüglich PF von 250.000 Counts und 350.000 Counts für die Berechnung der NWG verwendet wurden.

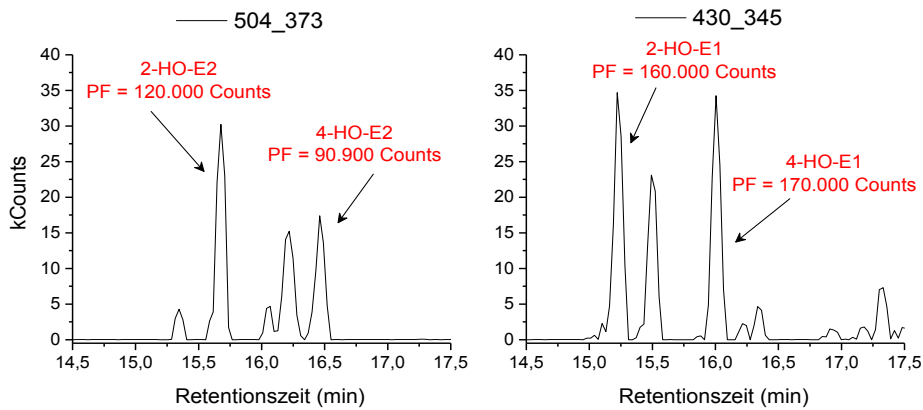


Abb. 53: Exemplarische Chromatogramme der *Quantifier*-Massenspur von 2-/4-HO-E2 (504_373) und 2-/4-HO-E1 (430_345) im Blindwert nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen 4.2.23.2 Injektionsvolumen: 2 μ l. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 3 und Tab. 4.*

5.5 E1- und E2-Metabolitenprofil im weiblichem Brustgewebe

Nur ungefähr 5% der Brustkrebsneuerkrankungen sind vermutlich mit familiär bedingten Mutationen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen, verbunden (Mitrunen und Hirvonen, 2003). Eine frühe erste Menarche, Nulliparität oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt gelten dem gegenüber ebenso als entscheidende Risikofaktoren wie ein späterer Eintritt in die Wechseljahre, starkes Übergewicht oder auch ein übermäßiger Konsum von Alkohol und Tabak. Ausgetragene Schwangerschaften in jungen Lebensjahren, mehrere Geburten sowie längere Stillzeiten scheinen im Gegensatz dazu das Brustkrebsrisiko zu verringern. Die Einnahme hormoneller Antikonzeptiva (Pille) ist mit einem vorübergehend leicht erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden. Eine HRT mit Estrogenen in Klimakterium und Postmenopause erhöht bei länger andauernder Anwendung das Brustkrebsrisiko (RKI, 2010).

Anhand dieser Risikofaktoren wird deutlich, dass weibliche Sexualhormone, insbesondere E2, einen entscheidenden Einfluss bei der hormonellen Kanzerogenese der Brust besitzen. Um die Anwendbarkeit der entwickelten Mess-Methode zu bewerten, wurde diese im Anschluss auf reale Proben übertragen. Um Empfindlichkeitsverluste bei der Analyse der Proben möglichst gering zu halten, wurde die Verwendbarkeit von *Qualifier* integrierten MRM-Methoden und damit verbunden der Nutzen des *Quantifier*-*Qualifier*-Verhältnisses gegenüber der ausschließlichen Berücksichtigung der intensiven *Quantifier*-Übergänge von E2- und E1-Metaboliten getestet. Um die Güte der Aufarbeitung zu beurteilen, wurde ferner die WFR von deuterierten E2- und E1-Metaboliten im Gewebe bestimmt. Dazu wurden deren PF mit und ohne Aufarbeitung ermittelt und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten wurden mittels Einpunktkalibrierung über die entsprechenden deu-

terierten Analoga bestimmt, wobei anschließend die Korrelationen zwischen E2 beziehungsweise E1 mit dem Menopausalstatus, BMI sowie Hormonsubstitutionen betrachtet wurden. Wenn E1, E2 oder deren hydroxylierte beziehungsweise methylierte Metabolite in einer Gewebespende nicht nachzuweisen waren, ist die entsprechende NWG berechnet worden.

5.5.1 Etablierung einer geeigneten Mess-Methode

Neben den charakteristischen *MRM*-Übergängen (Kap. 5.1.2) ist ebenfalls das *Quantifier/Qualifier*-Bildungsverhältnis (Kap. 5.1.5) substanzspezifisch, so dass dieses unterstützend bei der Identifizierung von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe herangezogen werden sollte. In die entwickelte *MRM*-Methode mussten folglich alle *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge der hydroxylierten und methylierten E1- und E2-Metabolite sowie deren deuterierter Analoga gleichermaßen integriert werden. Da hierbei infolge ähnlicher t_R der methylierten sowie hydroxylierten E1- und E2-Metabolite eine Vielzahl von Übergängen im zweiten *time-segment* hätten vereint werden müssen, wurden deren Massenübergänge zur Vermeidung einer zu hohen *scan-time* (Kap. 5.1.4) auf drei einzelne *MRM*-Methoden aufgeteilt (Kap. 4.2.23.2; *II_meCE_deuteriert_undeuteriert.mth*, *III_CE_deuteriert_undeuteriert.mth* und *IV_E3_16alpa-HOE1_deuteriert_undeuteriert.mth*). Im ersten *time-segment* befanden sich jeweils nur die *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge von deuteriertem beziehungsweise undeuteriertem E1 und E2, so dass diesbezüglich eine unnötige Erhöhung der *scan-time* nicht zu beachten war (Kap. 4.2.23.2).

Um alle *Quanti*- und *Qualifier*-Übergänge der hydroxylierten und methylierten E1- und E2-Metabolite sowie deren deuterierte Analoga in einer Gewebeprobe zu erfassen, musste diese mit drei verschiedenen *MRM*-Methoden analysiert werden, so dass in Hinblick des hohen Zeitaufwandes von ungefähr 65 Minuten für eine vollständige Analyse im Folgenden der Nutzen des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisses und damit verbunden die Anwendbarkeit der mit *Qualifier*-Übergängen integrierten *MRM*-Methoden getestet wurde. Dazu wurden 16 Gewebespenden analog Kap. 4.2.20 aufgearbeitet und nach Derivatisierung entsprechend der Methoden II bis IV im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.2). Anschließend wurden die PF des *Quanti*- und *Qualifiers* von E1- und E2-Metaboliten bestimmt, deren Quotienten berechnet und den jeweils ermittelten *Quantifier/Qualifier*-Verhältnissen in Standardlösungen gegenübergestellt (Kap. 5.1.5). Im Idealfall sollte der in Gewebematrix berechnete Quotient aus *Quantifier* zu *Qualifier* näherungsweise dem in Standardlösung entsprechen, wodurch die Identifizierung des jeweiligen Metaboliten und damit verbunden die Anwendbarkeit des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisses bestätigt wäre.

Im Rahmen der Methodenoptimierung (Kap. 5.1.3) wurde für den *Qualifier* von E1- und E2-Metaboliten durchschnittlich eine um den Faktor 1,1 bis 3,5 schlechtere Signalintensität als für den *Quantifier* beobachtet, so dass ebenfalls eine zeitsparende und in Hinblick der Quantifizierung sichere *MRM*-Methode getestet wurde, da diese nur die intensiveren *Quantifier*-Übergänge von deuterierten beziehungsweise undeuterierten E1- und E2-Metaboliten berücksichtigte (Kap. 4.2.23.2; *I_E1_E2_Metabolite_deutert_undeutert.mth*).

Aus jeder derivatisierten Probe erfolgten daher vier Injektionen mit einem Probenvolumen á 2 µl. Da bei Mehrfachinjektionen aus einem kleinen Probenvolumen signifikante Abnahmen der PF und damit verbundene signifikante Reduzierungen des Analyt-Gehaltes, aufgrund eines verminderten Injektionsvolumens, zwischen den einzelnen Messungen denkbar sind, musste dieser Aspekt im Weiteren berücksichtigt werden. Dazu wurden die PF des *Quantifiers* von E1-d₄ und E2-d₃ herangezogen, da nur deren Massenübergänge in jeder der mit *Qualifier*-Übergängen integrierten *MRM*-Methode (*MRM*-Methode I bis IV) vorhanden waren. Um zu überprüfen, ob sich mögliche Schwankungen der Injektionsmenge in kleineren Bereichen der PF stärker auswirken, wurden ebenfalls deren *Qualifier* aus den Methoden II bis IV in die Auswertung einbezogen. Eine signifikante Abnahme der mittleren PF des *Quali*- und *Quantifiers* von E1-d₄ und E2-d₃ wurde diesbezüglich als Maß für eine signifikante Reduktion der Analyt-Menge zwischen den einzelnen Methoden herangezogen.

Die Gewebeprobe wurden in aufsteigender Reihenfolge der *MRM*-Methoden analysiert, so dass zunächst durch Methode I jeweils die intensiven *Quantifier*-Übergänge deuterierter beziehungsweise undeuterierter E1- und E2-Metabolite erfasst wurden, wodurch eine zuverlässige Quantifizierung aller relevanten Metabolite gewährleistet war. Die Reihenfolge der zusätzlich mit *Qualifier* integrierten *MRM*-Methoden orientierte sich an der Bildung beziehungsweise dem Vorkommen methylierter und hydroxylierter E1- und E2-Metabolite im normalen Brustgewebe. Da in diesem unter anderem die COMT-Aktivität gegenüber der Aktivität von CYP1A1 beziehungsweise CYP1A2 und CYP1B1 erhöht ist, überwiegt die Inaktivierung der Catechol-Estrogene zu den Methyl-Catecholen (Mitrunen und Hirvonen, 2003; zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011), so dass neben E1 und E2 vorrangig die Bildung Letzterer zu erwarten war. Unter Berücksichtigung möglicher Analyt-Verluste infolge der mehrfachen Injektion aus einer Probe wurde daher als erstes das Vorhandensein von Methylierungsprodukten überprüft, während anschließend auf Catechol-Estrogene, gefolgt von 16- α -HO-E1 beziehungsweise 16- α -HO-E2 getestet wurde (*MRM*-Methode I → II → III → IV).

Exemplarisch werden im Folgenden die *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisse von E1 und E1-d₄ beziehungsweise E2 und E2-d₃ im Brustgewebe dargestellt sowie deren resultierende PF bei der Verwendung der Methoden I bis IV gegenübergestellt.

Quantifier/Qualifier-Verhältnis von E1 und E1-d₄ sowie E2 und E2-d₃

Unabhängig der Verwendung einer mit *Qualifier* integrierten *MRM*-Methode resultierte für E1 und E1-d₄ beziehungsweise E2 und E2-d₃ im Gewebe näherungsweise das gleiche *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis wie in Standardlösungen (Abb. 54), so dass die Identifizierung von E1 und E2 sowie deren jeweiliger deuterierter Analoga über die im Rahmen der Methodenentwicklung ermittelten Quotienten unterstützend möglich war (Kap. 5.1.5).

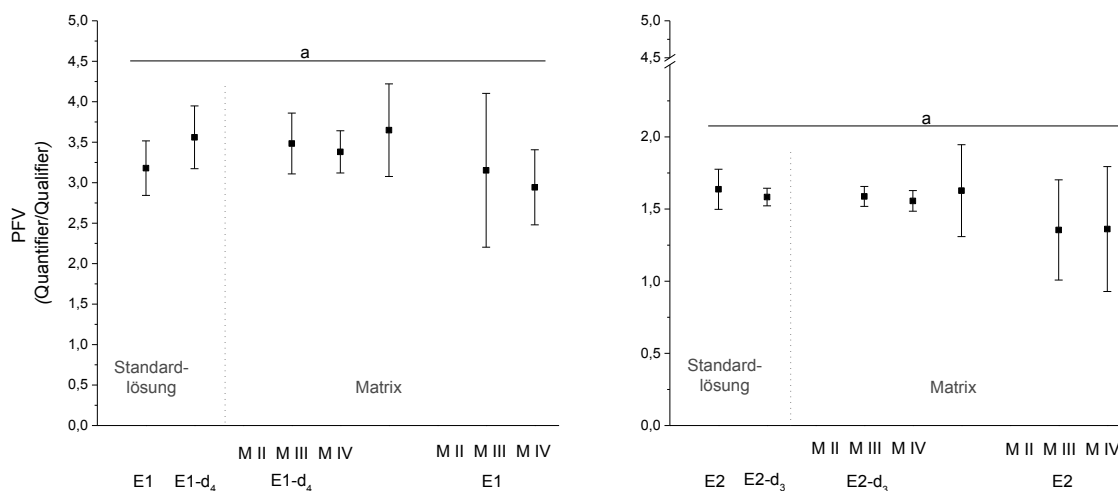


Abb. 54: *Quantifier/Qualifier*-Verhältnis von E1 und E1-d₄ sowie E2 und E2-d₃ nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE von 16 Realproben (Kap. 4.2.20) beziehungsweise der jeweils undeuterten Analoga in Standardlösungen. Analyse mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus unter Verwendung unterschiedlicher Messmethoden (M II *Quantifier/Qualifier*-Übergänge von deuterierten/undeuterten E1-/E2-Methyl-Catecholen, M III: *Quantifier/Qualifier*-Übergänge von deuterierten/undeuterten E1-/E2-Catechol-Estrogenen; M IV: *Quantifier/Qualifier*-Übergänge von 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2). Absolutmengen auf der Säule: Standardlösung m Analyt/Säule = 2 pg für E1, 2,5 pg für E2. Injektionsvolumen: 1 μ l. Gewebematrix: m Analyt/Säule = 15 pg für E1-d₄, E2-d₃ = 107 pg. Injektionsvolumen: 2 μ l. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 16 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA getestet (Scheffé Test, $p < 0,05$). Punkte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap.4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 71. sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5* (Tabellen mit der Angabe des *Qualifier*-Übergangs).

PF des *Quantifier*- und *Qualifier*s von E1-d₄ und E2-d₃

Sowohl für den *Quantifier* als auch den *Qualifier* von E1-d₄ war eine stetige Abnahme der mittleren PF zwischen den einzelnen Methoden zu beobachten. Während für den *Quantifier* die PF von 899.500 ± 430.150 Counts bis 660.820 ± 314.100 Counts variierten, schwankten diese für den *Qualifier* von 278.300 ± 91.900 Counts bis 216.700 ± 93.800 Counts (Abb. 55). Auch für die Massenübergänge von E2-d₃ war eine fortwährende Abnahme der mittleren PF von Methode I bis IV beziehungsweise II bis IV zu verfolgen. Die PF schwankten diesbezüglich von $4.109.800 \pm 1.962.000$ Counts bis $3.032.400 \pm 1.372.700$ Counts beziehungsweise von

2.362.200 ± 1.113.600 Counts bis 1.909.400 ± 881.300 Counts (Abb. 55). Auch wenn für beide Metabolite kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der PF festzustellen war (ANOVA, Scheffé Test, $p < 0,05$; Abb. 55), führte die Anwendung der mit *Qualifier*-Übergängen integrierten *MRM*-Methoden im Brustgewebe zu einer kontinuierlichen Abnahme der PF von *Quanti*- und *Qualifier*. Die damit verbundenen geringeren Analyt-Gehalte von E1 und E2 sind im Zuge der Verwendung der Methode II, III und IV ebenfalls auf deren methylierte und hydroxylierte Metabolite zu übertragen.

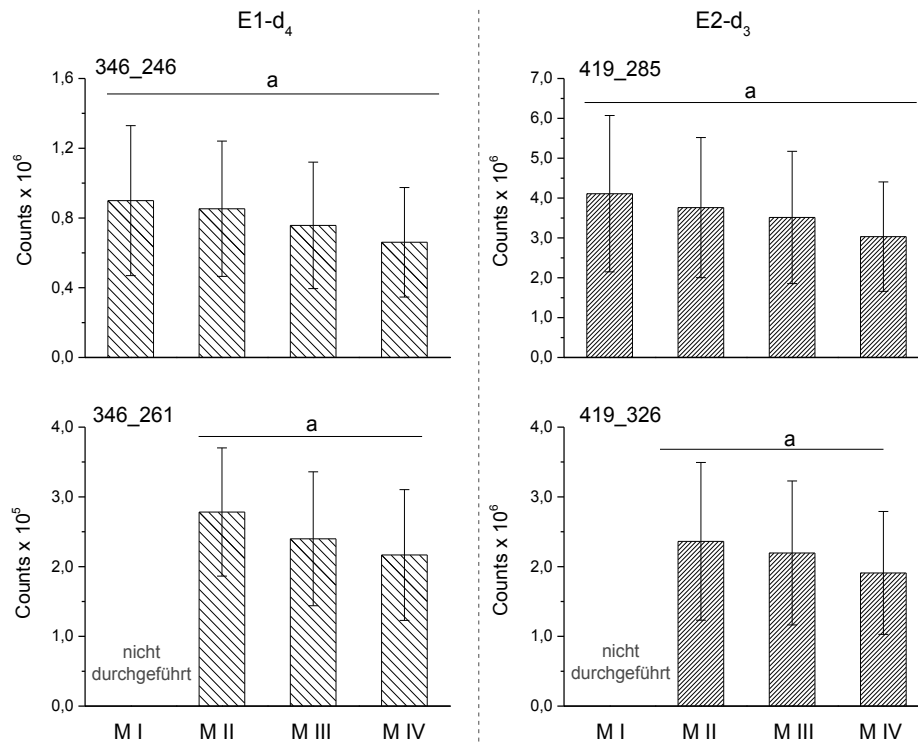


Abb. 55: PF des *Quanti*- (346_246 beziehungsweise 419_285) und *Qualifier*-Übergangs (346_261 beziehungsweise 419_326) von E1-d₄ und E2-d₃ nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE von 16 Realproben (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im *MRM*-Modus unter Verwendung unterschiedlicher Messmethoden (MI: *Quantifier*-Übergänge von deuterierten/undeuterierten E1- und E2-Metaboliten, MII *Quanti/Qualifier*-Übergänge von deuterierten/undeuterierten E1-/E2-Methyl-Catecholen, MIII: *Quanti/Qualifier*-Übergänge von deuterierten/undeuterierten E1-/E2-Catechol-Estrogenen; MIV: *Quanti/Qualifier*-Übergänge von 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2); $m_{\text{Analyt-Säule}} = 15 \text{ pg}$ für E1-d₄, E2-d₃ = 107 pg. Injektionsvolumen: 2 μl . Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 16 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA getestet (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 71. sowie *Daten-CD*, *Dissertation_Futh_2015*; Tab. 5 (Tabellen mit der Angabe des *Qualifier*-Übergangs).

Wie eingangs erwähnt, sind mögliche Ursachen für die abnehmende Empfindlichkeit zwischen den einzelnen Methoden auf ein abnehmendes Injektionsvolumen infolge der Mehrfachinjektionen zurückzuführen. Zudem wurden die Septen der Proben durch die viermalige In-

jektion aus einem Vial für Raumluft durchlässig, so dass einerseits das LM verdunstete und andererseits Luftfeuchtigkeit ungehindert auf die Proben einwirken konnte. Demnach war durch den Zutritt von Wasser ebenfalls eine Hydrolyse der TMS-Ether denkbar, da diese als hydrolyseempfindlich beschrieben werden und schon durch schwache Säuren oder Basen hydrolysieren (Kocienski, 2005). Dies würde erklären, warum die zweite Injektion jeweils die geringste Abweichung der mittleren PF im Vergleich zur Methode I zeigte und sich der Verlust an PF näherungsweise proportional zur Anzahl der Injektionen verhielt (Abb. 55). Möglicherweise wurde das verminderte Injektionsvolumen erst durch das Verdunsten von Heptan und der Hydrolyse der TMS-Derivate hervorgerufen, so dass die oben genannten Aspekte nicht getrennt sondern als Summe zu betrachten sind.

Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass bei Verwendung der mit *Qualifier* integrierten *MRM*-Methoden hohe Empfindlichkeitsverluste durch ein vermindertes Injektionsvolumen, infolge der Durchlässigkeit der Septen bei Mehrfachinjektionen, zu berücksichtigen sind.

Bei zusätzlicher Berücksichtigung der *Qualifier*-Übergänge von E1- und E2-Metaboliten nahmen im Vergleich zur Methode I die mittleren PF für den *Quantifier* von E1-d₄ und E2-d₃ über Methode II, III und IV durchschnittlich zwischen 5,2%, 15,8% und 26,5% beziehungsweise 8,5%, 14,5% und 26,2% ab. Da auch für deren *Qualifier*-Übergänge zwischen den Methoden II bis IV eine nahezu proportionale Abnahme der mittleren PF mit 13,8% und 22,1% beziehungsweise 7,0% und 19,2% zu verzeichnen war, wurden Letztere Methoden im Rahmen der Quantifizierung von E1 und E2 in weiteren Gewebespenden nicht mehr berücksichtigt. Auch wenn die Anwendbarkeit des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisses von E1 und E2 sowie deren deuterierter Analoga im Gewebe bestätigt wurde, konnte ein zusätzlicher Nutzen bei Verwendung der mit *Qualifier*-Übergängen integrierten *MRM*-Methoden nicht herausgestellt werden. Demnach zeigten lediglich 9 beziehungsweise 13 der getesteten Proben einen manuell integrierbaren *Qualifier* für E1 und E2 (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5. - Tabellen mit der Angabe des Qualifier-Übergangs*), deren hydroxylierte und methylierte Metabolite wurden mit Ausnahme der Methyl-Catechole von E1, infolge der hohen Aufarbeitungsverluste (Kap. 5.5.2) nicht nachgewiesen (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 6 bis Tab. 8.*). Die Anwendung der mit *Qualifier* integrierten *MRM*-Methoden II bis IV lieferten daher keine zusätzlichen Informationen, so dass diesbezüglich und aufgrund der hohen Empfindlichkeitsverluste bei der Quantifizierung weiterer Gewebeproben lediglich die *Quantifier*-Übergänge von deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metaboliten berücksichtigt wurden. Um alle hydroxylierten und methylierten E1- und E2-Metabolite in einer Probe zu erfassen, fand nur noch Methode *I_E1_E2_Metabolite_deutert_undeutert.mth* Anwendung, wobei alle Proben jeweils zweimal in randomisierter Weise mit dieser analysiert wurden. Für eine vollständige Probenanalyse waren demnach

zukünftig 45 Minuten notwendig, so dass ebenfalls die hohe Zeit-ersparnis bei Verzicht der zusätzlich mit *Qualifier*-Übergängen integrierten *MRM*-Methoden von Vorteil war.

5.5.2 Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten in Realproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 30 Brustgewebsproben auf den Gehalt von E1, E2 sowie den jeweiligen hydroxylierten und methylierten Metaboliten untersucht (Kap. 5.6.1). Dazu wurden die Probenansätze nach der Gewebedotierung mit den entsprechenden deuterierten Analoga zunächst einer Chloroformextraktion über Nacht unterzogen, um die Analyte aus der komplexen Probenmatrix freizusetzen (Kap. 4.2.20). Nach deren Aufreinigung beziehungsweise Aufkonzentrierung über eine SPE-Säule (Kap. 4.2.21) wurde die 85% MeOH-Fraktion bis zur Trockene evaporiert, derivatisiert, der *GC/MS/MS* zugeführt und im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.2). Um die Güte der Aufarbeitung zu beurteilen, wurde die WFR von deuteriertem E1, E2 sowie deren hydroxylierten und methylierten Metaboliten in den Probenansätzen bestimmt. Dazu wurden zu jeder Probenserie zwei Ansätze einer deuterierten Metabolitenmischung definierter Konzentration, bestehend aus E1-d₄, E2-d₃ sowie der deuterierten hydroxylierten und methylierten Metabolite, (Kap. 4.2.21) als Referenzpunkt bis zur Trockene evaporiert, derivatisiert und anschließend ebenfalls mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.2). Um die prozentuale WFR zu berechnen, wurden die MW der absoluten PF der deuterierten Referenzen gebildet, auf 100% gesetzt und mit den MW der entsprechenden absoluten PF deuterierter E1- und E2-Metabolite aus den Probenansätzen ins Verhältnis gesetzt.

Da in Kap. 5.3.4 bereits gezeigt wurde, dass signifikante Analyt-Verluste infolge einer Aufarbeitung mittels SPE nicht vermeidbar sind, wurde im Folgenden weiterhin ein eventueller Einfluss der Probenmatrix auf die prozentuale WFR untersucht. Dazu wurden die einzelnen absoluten PF der jeweiligen deuterierten E1- und E2-Metabolite aus den Probenansätzen den entsprechenden deuterierten Analoga aus den Blindwerten gegenübergestellt. Dabei verdeutlichte eine signifikant kleinere PF deuterierter Standards in den Proben eine signifikante Reduktion der Analytmenge beziehungsweise WFR infolge von Matrixeffekten.

Da im Verlauf der Arbeit im Rahmen der Gewebedotierung die Zugabemengen von E2-d₃, 2-/4-MeO-E2-d₃ und 16- α -HO-E2-d₃ reduziert wurden (Kap. 5.4.4), war es nicht möglich deren PF über den gesamten Zeitraum der Probenmessungen zu betrachten, so dass für diese Metabolite die Darstellung der PF über zwei Zeiträume erfolgte (8.11. bis 7.12.2014 und 11.12. bis 21.12.2014). Der Einfluss von Matrixeffekten wurde ebenfalls in Kap. 5.3.4 anhand von Testansätzen untersucht. Dabei führte die Aufarbeitung unter Zusatz von β -Glucuronidase oder Sulfatase zu einer signifikanten Erniedrigung der WFR, da der Großteil der Analyten an deren Enzymproteine gebunden wurde. Im Brustgewebe wird eine Vielzahl von Enzymen exprimiert, so dass Analyt-Verluste durch das Binden an Enzymproteine ebenfalls bei der

Aufarbeitung von Realproben denkbar sind. Da im gesunden Gewebe überwiegend Entgiftungs- und Reduktionsprozesse durch die COMT beziehungsweise NQO1 beschrieben sind (Singh et al., 2005), war neben dem Vorhandensein aktivierender Enzyme (CYP19, CYP1B1, CYP1A1 und CYP1A2) insbesondere die Bildung Letzterer zu erwarten, so dass Analyt-Verluste vorrangig durch das Binden an Proteine der COMT und NQO1 resultieren. Nach Palmiter (1974) sowie Greenberg und Penman (1966) wird die Extraktion mit Chloroform als eine effiziente Methode zur Proteindenaturierung beschrieben, so dass die Chloroformextraktion im Normalfall die derart gebundenen Enzyme freisetzen sollte. Wenn dies nicht vollständig erfolgt, sind diese Analyt-Verluste bei der Bewertung der WFR zu berücksichtigen.

Wiederfindung von E2-d₃ und E1-d₄

Für die Blindwerte resultierten für E2-d₃ und E1-d₄ WFR von 64,8 ± 15,9% beziehungsweise 69,1 ± 13,8%. In den Probenansätzen lagen diese bei 44,3 ± 14,8% (E2-d₃) und 39,2 ± 13,4% (E1-d₄). Auch wenn die WFR für E2-d₃ und E1-d₄ in den Blindwerten beziehungsweise Probenansätzen erwartungsgemäß in einem vergleichbaren Bereich lagen, resultierte nach der Aufarbeitung von Gewebe infolge des Matrixeinflusses ein statistisch signifikanter Analyt-Verlust (Mittelwert t-Test, p < 0,05; Abb. 56) von durchschnittlich 20,5% (E2-d₃) beziehungsweise 29,9% (E1-d₄).

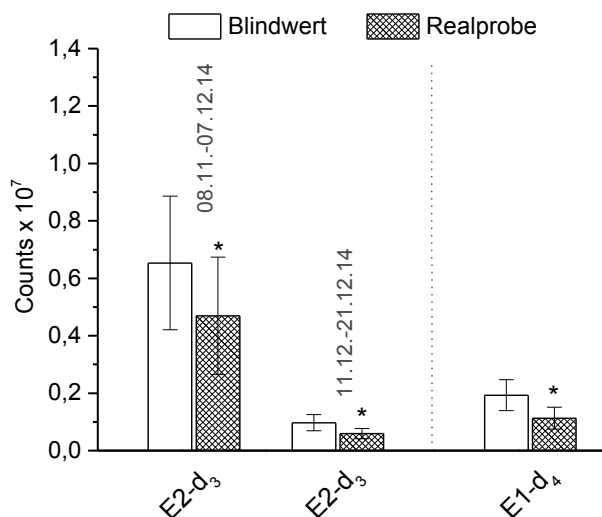


Abb. 56: Absolute PF von E2-d₃ und E1-d₄ nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE in 30 Realproben und 18 Blindwertserien (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 107$ pg beziehungsweise 16 pg für E2-d₃ (1./-2.Mess-Zeitraum), 15 pg für E1-d₄. Injektionsvolumen: 2 µl. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 33 beziehungsweise 18 unabhängigen Bestimmungen (Vierfach- beziehungsweise Zweifachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: p < 0,05) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 2 und Tab. 5.*

Wiederfindung von 2-/4-MeO-E2-d₃ 2-/4-MeO-E1-d₄ und 3-O-Me-2-HO-E1-d₄

Ähnliche Ergebnisse wurden für E1- und E2-Methylierungsprodukte beobachtet. Auch wenn die WFR ebenfalls in den Blindwerten ($67,4 \pm 16,0\%$ für 2-MeO-E2-d₃, $68,9 \pm 20,6\%$ für 4-MeO-E2-d₃, $64,0 \pm 14,7\%$ für 2-MeO-E1-d₄, $68,4 \pm 16,4\%$ für 4-MeO-E1-d₄ und $67,4 \pm 18,5\%$ für 3-O-Me-2-HO-E1-d₄) beziehungsweise Probenansätzen ($40,3 \pm 16,0\%$ für 2-MeO-E2-d₃, für $44,5 \pm 17,8\%$ für 4-MeO-E2-d₃, $31,5 \pm 12,0\%$ für 2-MeO-E1-d₄, $38,0 \pm 15,0\%$ für 4-MeO-E1-d₄ und $33,9 \pm 14,0\%$ für 3-O-Me-2-HO-E1-d₄) erwartungsgemäß in einem vergleichbaren Bereich lagen, resultierten bei der Aufarbeitung von Gewebe statistisch signifikant kleinere PF beziehungsweise WFR (Mittelwert t-Test, $p < 0,05$; Abb. 57). Während für 2-/4-MeO-E2-d₃ diesbezüglich durchschnittliche Analyt-Verluste von 27,1% beziehungsweise 23,9% zu berücksichtigen waren, lagen diese für 2-/4-MeO-E1-d₄ und 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ bei 32,5% beziehungsweise 30,4% sowie 33,5%.

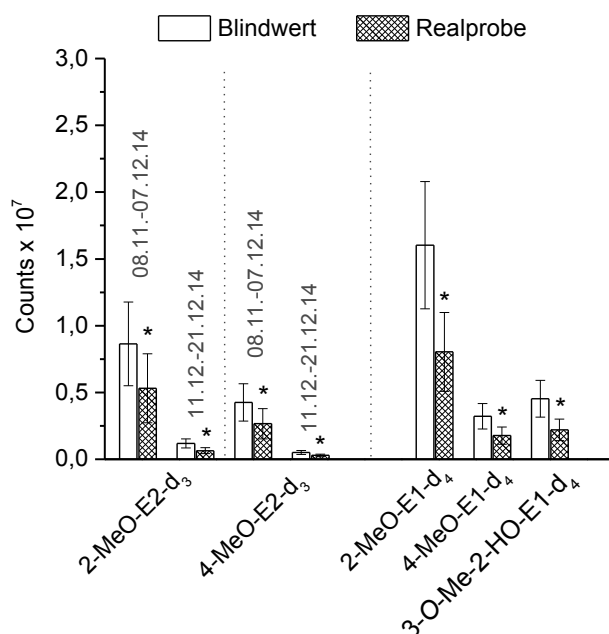


Abb. 57: Absolute PF von 2-/4-MeO-E2-d₃ und 2-/4-MeO-E1-d₄ sowie 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE in 30 Realproben und 18 Blindwertserien (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 132$ pg beziehungsweise 20 pg für 2-MeO-E2-d₃, 4-MeO-E2-d₃ = 55 pg beziehungsweise 8 pg (1./2.Mess-Zeitraum); 2-MeO-E1-d₄ = 712 pg, 4-MeO-E1-d₄ = 137 pg, 3-O-Me-2-HO-E1-d₄ = 104 pg. Injektionsvolumen: 2 μ l. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 33 beziehungsweise 18 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 3 und Tab. 4 sowie Tab. 7 und 8.*

Wiederfindung von 2-/4-HO-E2-d₃, 16-α-HO-E2-d₃, 2-/4-HO-E1-d₄ und 16-α-HO-E1-d₄

In Kap. 5.3.4 wurde gezeigt, dass in Standardlösungen von E1- und E2-Metaboliten bei sofortiger Extraktion mit Chloroform und anschließender Aufreinigung mittels SPE Catechol-Estrogene von E1 und E2 durch deren Oxidation beziehungsweise Umwandlung generiert werden. Dieser Aspekt war ebenfalls auf die im Rahmen der Probenaufarbeitung mitgeführten Blindwert-Ansätze zu übertragen, da insbesondere die WFR von 4-HO-E2-d₃ und 4-HO-E1-d₄ deutlich 100% überstiegen. Demnach resultierten für diese 162,7 ± 74,7% und 120,6 ± 46,0%. Die WFR der übrigen Catechol-Estrogene lagen in den Blindwerten bei 87,5 ± 22,7% und 79,0 ± 22,6% für 2-HO-E2-d₃ beziehungsweise 4-HO-E2-d₄ sowie 72,6 ± 22,1% und 91,1 ± 41,0% für 16-α-HO-E2-d₃ beziehungsweise 16-α-HO-E2-d₄.

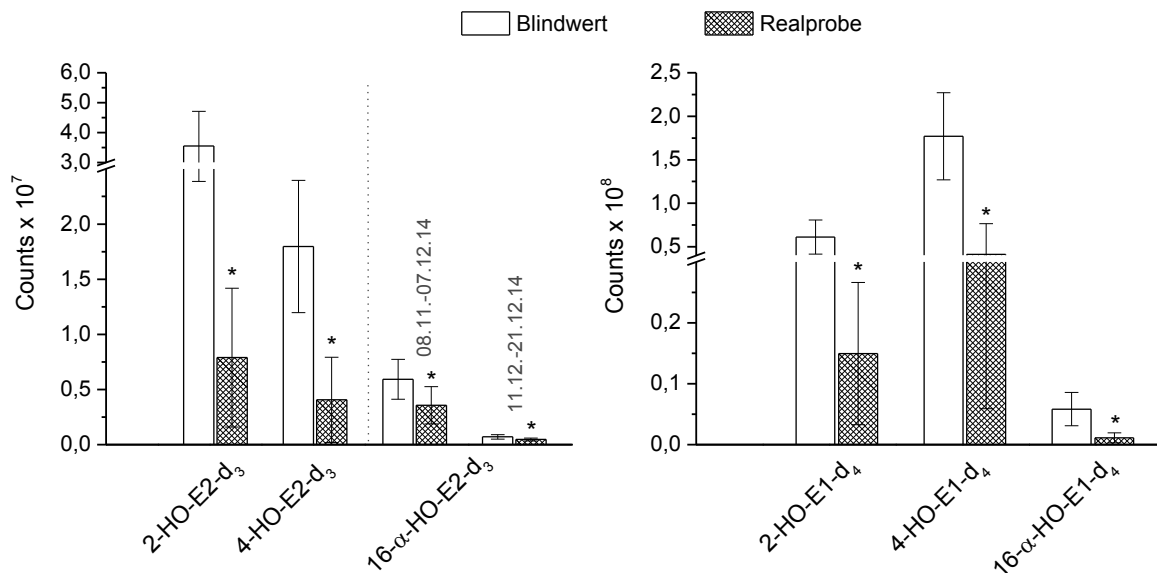


Abb. 58: Absolute PF von 2-/4-HO-E2-d₃ und 16-α-HO-E2-d₃ sowie 2-/4-HO-E1-d₄ und 16-α-HO-E1-d₄ nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE in 30 Realproben und 18 Blindwertserien (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 1173 \text{ pg}$ für 2-/4-HO-E2-d₃, 1307 pg beziehungsweise 196 pg für 16-α-HO-E2-d₃ (1./2.Mess-Zeitraum), 2-HO-E1-d₄ = 414 pg, 4-HO-E1-d₄ = 731 pg, 16-α-HO-E1-d₄ = 382 pg. Injektionsvolumen: 2 µl. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 33 beziehungsweise 18 unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD*, *Dissertation_Futh_2015*; *Tab. 3 und Tab. 4* sowie *Tab. 6 bis 8*.

In Kap. 5.3.6 wurde herausgestellt, dass bei sofortiger Extraktion von Probenansätzen mit Chloroform oxidierende Enzyme inaktiviert werden, so dass aufgrund dessen und infolge der verminderten Aktivität oxidierender Enzyme im Brustgewebe weniger Catechol-Estrogene gebildet und zu den jeweiligen Chinonen weiteroxidiert werden können. Eine enzymatische Artefaktbildung ausgehend von E2-d₃ beziehungsweise E1-d₄ war bei der Gewebeaufarbeitung demnach nicht zu erwarten. Eine Luftoxidation war jedoch nicht auszuschließen, da

bei sofortiger Extraktion von Standardlösungen von E1 und E2 und anschließender Aufreinigung mittels SPE Catechol-Estrogene von E1 und E2 generiert wurden (Kap. 5.3.4). Im Vergleich zu den Blindwerten resultierten in den Probenansätzen für E1- und E2-Catechole signifikant kleinere PF beziehungsweise WFR (Mittelwert t-Test, $p < 0,05$; Abb. 58). Diese verdeutlichten analog von E1, E2 und deren Methyl-Catecholen einen statistisch signifikanten Analyt-Verlust infolge von Matrixeinflüssen sowie die Eliminierung von Oxidationseinflüssen. Mit Ausnahme von 16- α -HO-E2-d₃ ($47,6 \pm 17,7\%$) und 16- α -HO-E2-d₄ ($19,2 \pm 15,3\%$) deren WFR stärker voneinander variierenden, lagen für 2-HO-E2-d₃ ($17,8 \pm 15,2\%$) und 2-HO-E1-d₄ ($19,3 \pm 15,3\%$) beziehungsweise 4-HO-E1-d₃ ($34,5 \pm 32,6\%$) und 4-HO-E1-d₄ ($28,6 \pm 25,0\%$) die WFR in einem vergleichbaren Bereich, wodurch gezeigt wurde, dass sich der Matrixeinfluss auch bei diesen Metaboliten gleichermaßen auswirkte. Auf die Angabe eines durchschnittlichen Analyt-Verlustes wurde bei E1- und E2-Hydroxylierungsprodukten verzichtet, da infolge der Artefaktbildung während der Aufarbeitung der Blindwert-Ansätze die Richtigkeit dieser Analyseergebnisse beeinträchtigt wäre.

Abschließend ist festzuhalten, dass bei der Aufarbeitung von Gewebe ein signifikanter Teil des Analyten verloren geht, so dass für die WFR von E1- und E2-Metaboliten durchschnittlich weniger als 50% resultierten. Wie eingangs erwähnt, ist zur Erklärung der WFR in Realproben neben dem unvermeidbaren Einfluss der SPE insbesondere der Analyt-Verlust durch das Binden an Enzymproteine heranzuziehen. Im Rahmen der Dissertation von Katja Schmalbach (2014) wurden in den 30 Gewebeproben die mRNA-Level unter anderem von der COMT, NQO1 sowie von CYP1A1 und CYP1B1 bestimmt. Dabei wurde für diese in allen Proben mRNA nachgewiesen. Demnach ist von deren Bildung und damit verbundener Aktivität in den untersuchten Gewebespenden auszugehen, so dass bei der Aufarbeitung von Realproben möglicherweise ein Großteil der deuterierten Standards durch das Binden an Enzymproteine verloren ging.

Ein weiterer Aspekt der im Rahmen der Aufarbeitung ebenfalls zu größeren Analyt-Verlusten führte, lag in der Extraktion des Gewebes mit Chloroform. Da hierbei bis zu 90% der Analyten in die organische Phase übergingen (Kap. 5.3.3), musste diese im Rahmen der weiteren Aufarbeitung herangezogen werden. Aufgrund des entfettenden Charakters von Chloroform beinhaltete die organische Phase neben E1- und E2-Metaboliten jedoch auch den gesamten Fettrückstand der Probe, der nach dem Evaporieren der organischen Phase (Kap. 4.2.20) als ölige, viskose Flüssigkeit zurückblieb. In Abhängigkeit der enthaltenen Menge an Fett wurde diese nicht immer vollständig von den Rändern der SPE-Säule gespült, so dass auch die Analyten nur unvollständig an die stationäre Phase binden konnten. Bei sehr fetthaltigen Proben erniedrigte sich die Durchflussgeschwindigkeit des Elutionsmittels bis auf 1 ml/5min, so dass infolge eines teilweisen Verstopfens der Säulen beziehungsweise einer diskontinuierlichen Tropfgeschwindigkeit E1- und E2-Metabolite ebenfalls nur unvollständig von der

Säule eluiert wurden. Auch wenn im Rahmen der Gewinnung von Gewebespenden eine vollständige Separierung von Fett- und Drüsengewebe priorisiert wurde, war dies nicht immer möglich, da Fett- und Drüsengewebe oftmals fließend beziehungsweise schwammartig ineinander übergingen.

Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass bei der Beurteilung der WFR von E1- und E2-Metaboliten in Realproben neben dem unvermeidbaren Einfluss der SPE (Kap. 5.3.5) starke Matrixeinflüsse zu berücksichtigen sind. Die WFR der deuterierten Standardkomponenten variierten in Gegenwart von Gewebe zwischen $17,8 \pm 15,2\%$ und $47,6 \pm 17,7\%$. Im Vergleich zur sofortigen Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 5.3.5) resultierten signifikant größere Analyt-Verluste für E1-d₄, 2-MeO-E1-d₄, 3-O-Me-2-HO-E1-d₄, 16- α -HO-E1-d₄ und 2-MeO-E2-d₃ wahrscheinlich infolge des hohen Fettgehaltes der Proben (Rohdaten: Anhang, Tab. 87 und Tab. 88 und *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5 und Tab. 7 bis 8*). Die Catechol-Estrogene von E1 und E2 wurden diesbezüglich nicht in die Betrachtung einbezogen, da diese in Standardlösungen von E1- und E2-Metaboliten bei sofortiger Extraktion mit Chloroform und anschließender Aufreinigung durch Luftoxidation von E1 und E2 generiert wurden (Kap. 5.3.5), so dass die Richtigkeit eines durchschnittlichen Analyt-Verlustes durch die Artefaktbildung beeinträchtigt wäre.

Matrixeinflüsse resultierten mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Binden der Analyten an Enzymproteine sowie aufgrund des hohen Fettgehaltes der Proben, so dass aufgrund dessen und infolge der Probenaufarbeitung mittels SPE durchschnittliche Analyt-Verluste um 50% für vertretbar befunden wurden. Möglicherweise war auch davon auszugehen, dass die Chloroformextraktion die über Proteinbindung gebundenen Analyte nicht vollständig freisetzen konnte.

5.6 Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten in Realproben

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Aufarbeitungs- und Mess-Methode zu bewerten, wurden diese im Anschluss auf reale Proben übertragen. Dafür wurde gesundes Brustdrüsengewebe von 30 Frauen, die sich aus rein kosmetischen Gründen einer Reduktions-Mammoplastik oder Bruststraffung unterzogen hatten verwendet und auf den Gehalt von E1, E2 sowie der jeweiligen hydroxylierten und methylierten Metabolite untersucht. Um den routinemäßigen Einsatz der Methode zu bewerten, wurden die ermittelten Gehalte mit den bisher publizierten Daten der Gewebekonzentrationen von E1, E2 sowie deren Metaboliten verglichen (Kap. 5.6.1), wobei ebenfalls Korrelationen zwischen ausgewählten Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren und den analysierten Gewebespiegeln untersucht wurden (Kap. 5.7).

Die Proben wurden nach der Homogenisierung mit den entsprechenden deuterierten Analoga dotiert (Kap. 4.2.20) und im Anschluss nach der Chloroformextraktion über eine SPE-Säule

aufgereinigt (Kap. 4.2.21). Die 85% MeOH-Fraktion wurde bis zur Trockene evaporiert, nach Derivatisierung der GC/MS/MS zugeführt und im MRM-Modus analysiert (Kap. 4.2.23.2).

Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination des Systems mit E2, wurden zu jeder aufgearbeiteten Probenserie jeweils zwei Blindwerte als Negativkontrolle mitgeführt. Diese wurden ohne Probenzusatz analog der Matrixproben aufgearbeitet (Kap. 4.2.20) und analysiert (Kap. 4.2.23.2).

Mittels Einpunktkalibrierung über die entsprechenden deuterierten Analoga wurden die Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten bestimmt. Anschließend wurden diese mit den publizierten Daten der Gewebekonzentrationen von E1, E2 und deren Metaboliten im gesunden Brustgewebe verglichen (Kap. 5.6.1) und Korrelationen zwischen den ermittelten Gehalten von E1- und E2-Metaboliten und ausgewählten Risikofaktoren betrachtet (Kap. 5.7). Wenn E1, E2 oder deren methylierte beziehungsweise hydroxylierte Metabolite in einer Gewebespende nicht nachgewiesen wurden, ist die jeweilige NWG berechnet worden (Kap. 5.4.7). Die zur Durchführung der Korrelationsanalysen benötigten Daten der Teilnehmerinnen wurden mit Hilfe eines Patientenbogens erhoben (Kap. 4.2.19). Hierbei wurde das Alter, der BMI, die Anzahl an Schwangerschaften, Alkoholkonsum und das Rauchverhalten der Spenderinnen sowie eventuelle Hormonsubstitutionen beziehungsweise die Einnahme von NEM erfasst (Anhang, Tab. 96), so dass ausschließlich diese Faktoren für die Korrelationsanalysen herangezogen wurden. Der Menopausalstatus der Probandinnen wurde begleitend im Rahmen der Dissertation von Katja Schmalbach (2014) bestimmt.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gehalte von E1- und E2-Metaboliten wurden zunächst mit den Angaben der zur Verfügung stehenden Literaturquellen verglichen und anschließend auf mögliche Korrelationen, insbesondere zwischen E2, E1, E1+E2 sowie dem Verhältnis zwischen E2 zu E1 mit dem Menopausalstatus, BMI und Hormonsubstitutionen getestet. Diesbezüglich wurden jeweils die mittleren Gehalte nachgewiesener Metabolite berechnet, wobei statistisch signifikante Unterschiede mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* berechnet wurden. Dieser dient der Überprüfung zweier unabhängiger Gruppen, die der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Eine Normalverteilung der Daten wird nicht vorausgesetzt und beide Gruppen müssen auch nicht den gleichen Umfang aufweisen, so dass dessen Anwendung geeignet war. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 festgelegt. Für die Korrelationsanalysen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* herangezogen. Dieser ist dimensionslos und kann nur Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Je näher die Werte an -1 beziehungsweise +1 heranreichen, desto stärker ist ein Zusammenhang. Während ein positiver Koeffizient einen gleichsinnigen, proportionalen Zusammenhang darstellt, kennzeichnet ein Negativer eine gegenteilige Bedeutung. Ein Korrelationskoeffizient < 0,50 deutet auf einen schwachen Zusammenhang hin. Korrelationskoeffizienten > 0,50 be-

ziehungswise $> 0,80$ geben im Gegensatz dazu einen deutlichen beziehungsweise starken Zusammenhang an (Sachs und Hedderich, 2006).

Da im Rahmen der Probenaufarbeitung keine Hydrolyse von gebundenem E1 oder E2 durchgeführt wurde (Kap. 4.2.20), beziehen sich die dargestellten Ergebnisse der Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten auf die frei vorliegenden Estrogene im Brustgewebe.

Eine Übersicht über die Daten der untersuchten Teilnehmerinnen sowie die ermittelten Gehalte von E1- und E2-Metaboliten befindet sich im Anhang (Tab. 96 bis Tab. 98). Alle Rohdaten der folgenden Kapitel (Kap. 5.6.1 bis Kap. 5.7.2) befinden sich auf der beiliegenden Daten-CD (*Dissertation_Futh_2015*).

5.6.1 Gewebekonzentration von E1- und E2-Metaboliten im Rahmen der analysierten Studienpopulation

In der Literatur existieren bisher nur weniger Angaben über die Gehalte von E1- und E2-Metaboliten im gesunden Brustgewebe sowie einem möglichen Zusammenhang zwischen den Brustkrebs begünstigenden Risikofaktoren und den natürlich vorkommenden Gewebespiegeln. Die meisten existierenden Studien verwendeten IA- beziehungsweise RIA- Methoden für die Estrogen-Analyse (zusammengefasst von Yaghjian und Colditz, 2011). Letztere fanden unter anderem bei van Landeghem et al. (1985) Anwendung. Unabhängig des Menopausalstatus variierten diesbezüglich die Gehalte von E2 und E1 im normalen Gewebe von prä- und postmenopausalen Frauen zwischen 0,2 und 2,6 pmol/g Gewebe beziehungsweise 0,2 und 3,3 pmol/g Gewebe (van Landeghem et al., 1985). Für die Gewebespiegel von E2 und E1 waren demnach relativ große Schwankungsbreiten zu erwarten, was ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Während die Gehalte von E2 in den 30 untersuchten Brustgewebeproben zwischen 0,23 bis 3,46 pmol/g Gewebe variierten, schwankten diese für E1 von 0,10 bis 9,93 pmol/g Gewebe (Abb. 59). Dabei lagen vier beziehungsweise fünf der Gewebespenden hinsichtlich der Gehalte für E2 und E1 unterhalb der NWG (0,50 pmol/g Gewebe beziehungsweise 0,20 pmol/g Gewebe). Für E2 resultierte durchschnittlich ein Gehalt von 0,79 pmol/g Gewebe, der mittlere Analyt-Gehalt von E1 war mit 1,46 pmol/g Gewebe nahezu doppelt so hoch (Abb. 59), wobei 22 der untersuchten Teilnehmerinnen im Vergleich zu E2 einen bis zu 90,5% höheren E1-Gehalt aufzeigten (Anhang, Tab. 97).

Zwischen den E2- und E1-Gehalten war kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb. 59; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, $p = 0,098$), wobei eine deutliche

Korrelation zwischen den Gehalten von E1 und E2 im Brustgewebe resultierte (Abb. 59; $R = 0,516$). Da über die 17β -HSD Typ 1 die Umwandlung von E1 zu E2 erfolgt, bedingt die Bildung von E2 das Vorhandensein von E1, wodurch eine Zunahme der Gehalte von E1 zwangsläufig auch mit einer Zunahme von E2 beziehungsweise höheren E2-Gehalten verbunden ist.

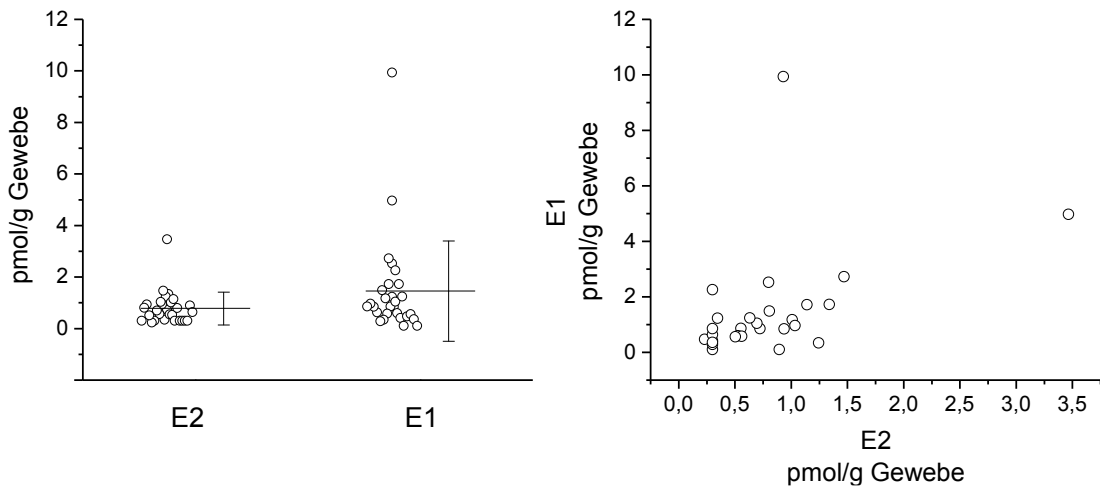


Abb. 59: E2- und E1-Gehalte im normalen Brustgewebe von 28 Realproben nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20) sowie der Korrelation der ermittelten Gehalte zueinander. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Dargestellt sind jeweils die einzelnen Gehalte von E1 und E2 (rechts) beziehungsweise die Mittelwertlinie und Standardabweichung aus 28 Bestimmungen (links). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Der Korrelationskoeffizient nach *Spearman* berechnete sich auf $R = 0,516$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5* und im Anhang, Tab. 97.

Auch in der Literatur sind höhere Gehalte für E1 im Vergleich zu E2 im normalen Brustgewebe beschrieben. Da die Gewebespiegel von E1 und E2 jedoch vom Menopausalstatus abhängige Unterschiede aufweisen (zusammengefasst von Yaghjyan und Colditz, 2011), sind diese in der Literatur differenziert für prä- und postmenopausale Frauen beschrieben. Demnach war es zur näheren Betrachtung der Gewebespiegel von E1 beziehungsweise E2 und zur Erklärung der höheren E1-Gehalte gegenüber den Gehalten von E2 notwendig, die untersuchten Teilnehmerinnen ebenfalls anhand ihres Menopausalstatus zu unterteilen. Zwei der Frauen konnten für diese Auswertung nicht berücksichtigt werden, da deren Menopausalstatus nicht bestimmt wurde. Von den übrigen Frauen waren 20 prämenopausal und 8 postmenopausal (Anhang, Tab. 96).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit resultierten für die Gehalte von E2 bei den untersuchten prä- und postmenopausalen Frauen mit $0,92 \pm 0,68$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $0,51 \pm 0,37$ pmol/g Gewebe nicht signifikant unterschiedliche Gehalte (Abb. 60; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, p -Wert = 0,056). Der E2-Gehalt postmenopausaler Frauen war jedoch

durchschnittlich um 44,6% geringer als der E2-Gehalt in der Prämenopause, so dass die Ergebnisse mit denen von Thijssen und Blankenstein (1989) publizierten Daten vergleichbar sind. Diesbezüglich wurde gesundes Brustgewebe von jeweils 8 prä- und postmenopausalen Frauen mittels RIA auf den E2-Gehalt analysiert, wobei in der Postmenopause durchschnittlich 66,7% geringere Gehalte festgestellt wurden (Tab. 37). Die von Thijssen und Blankenstein (1989) untersuchte Studienpopulation war hinsichtlich der postmenopausalen Frauen identisch. Die Anzahl untersuchter prämenopausaler Frauen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit sogar höher, so dass die ermittelten Ergebnisse nicht nur näherungsweise mit den Angaben von Thijssen und Blankenstein (1989) vergleichbar sind sondern diese bestätigen. Der Gewebespiegel von E2 weist demnach differenziert nach dem Menopausalstatus für postmenopausale Frauen kleinere Gehalte auf und ist daher auch mit den hormonellen Veränderungen des Serum E2-Gehalt in der Prä- und Postmenopause vergleichbar. Im Gegensatz zur Prämenopause stellen die Ovarien in der Postmenopause ihre Funktion fast vollständig ein, so dass die E2-Gehalte im Plasma um 90% sinken (Russo und Russo, 2004).

Für E1 resultierten bei den untersuchten prä- und postmenopausalen Frauen Gehalte von $1,70 \pm 2,30$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $0,97 \pm 0,74$ pmol/g Gewebe (Abb. 60). Auch wenn keine statistisch signifikanten Unterschiede vorhanden waren (Abb. 60; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Tests*, p-Wert = 0,595), sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten E1-Gehalte mit den Literaturquellen vergleichbar. Demnach war der mittlere E1-Gehalt in der Prämenopause um den Faktor 1,8 höher als in der Postmenopause, so dass sich der Trend größerer E1-Gehalte bei prämenopausalen Frauen deutlich herausstellte (Abb. 60).

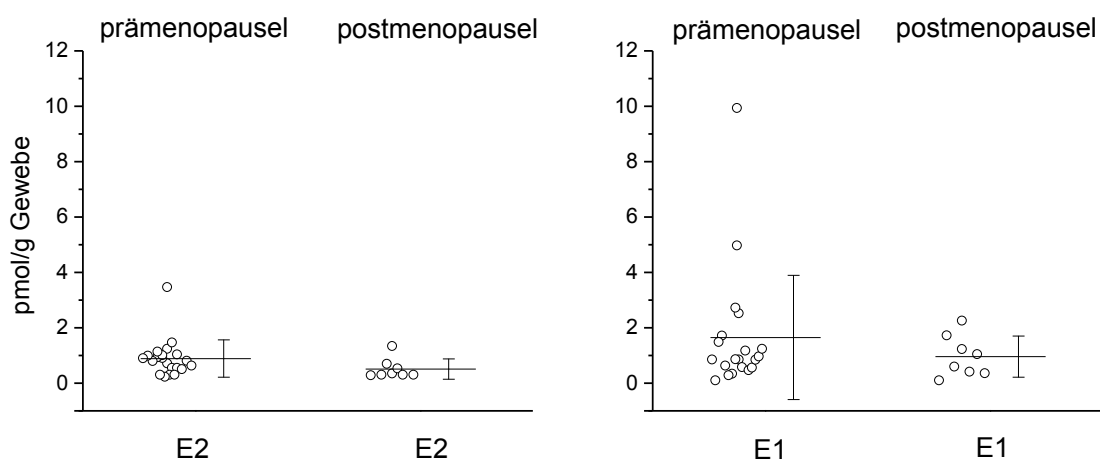


Abb. 60: E2- und E1-Gehalte im normalen Brustgewebe von 28 Realproben differenziert anhand des Menopausalstatus nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (Kap. 4.2.23.2). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5* und im Anhang, Tab. 97.

Signifikant größere E1-Gehalte in der Prämenopause wurden unter anderem von van Landeghem et al. (1985) beschrieben. Die hierbei untersuchte Studienpopulation war mit 73 prämenopausalen beziehungsweise 40 postmenopausalen Probandinnen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit weitaus größer, so dass signifikante Unterschiede zwischen den E1-Gehalten in der Prä- und Postmenopause wahrscheinlich erst bei einer größeren Studienpopulation deutlich werden. Die von van Landeghem et al. (1985) publizierten Daten können daher nur näherungsweise herangezogen werden.

Gleichermaßen waren in der Postmenopause die E1-Gehalte um den Faktor 2 höher als die Gehalte von E2 (Abb. 60). Entsprechend den Angaben von Chetrite et al. (1999) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei den postmenopausalen Frauen höhere Gehalte für E1 anstelle für E2 verfolgt (Abb. 60), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden war (Abb. 60; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, p-Wert = 0,155). Auch die von Chetrite et al. (1999) untersuchte Studienpopulation von 14 postmenopausalen Frauen war mit der im Rahmen der Arbeit analysierten Anzahl postmenopausaler Probandinnen vergleichbar, so dass diesbezüglich die Literatur bestätigt wurde.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Gewebespiegel von unkonjugiertem E1 und E2 prä- und postmenopausaler Frauen entsprechen nicht nur hinsichtlich der vom Menopausalstatus abhängigen hormonellen Veränderungen den Literaturangaben. Die Absolutgehalte in einem Gramm Gewebe waren näherungsweise in einem vergleichbaren Bereich mit den bisher publizierten Daten (Tab. 37).

Da E1 und E2 durch die 17 β -HSD Typ 1 ständig ineinander umgewandelt werden, wurden von Rogan et al., (2003) die Gehalte von freiem und gebundenem E1 und E2 im gesunden Gewebe als Summe betrachtet. Diesbezüglich wurde ein Gehalt von $4,1 \pm 3,0$ pmol/g Gewebe ermittelt (Tab. 37). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Summe von E1 und E2 ein Gehalt von $2,20 \pm 2,28$ pmol/g Gewebe berechnet. In Hinblick dessen, dass Letzterer lediglich die Summe aus freiem E2 und E1 darstellt und des Weiteren von Chetrite et al. (1999) beschrieben wurde, dass der Gehalt von E2 beziehungsweise E1 aus Sulfat-Konjugaten näherungsweise dem Gehalt von freiem E2 und E1 entspricht, ist auch dieses Ergebnis unter Voraussetzung einer vollständig Spaltung der Konjugate mit der Literatur vergleichbar.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tab. 37: Vergleich der im Rahmen der Arbeit ermittelten Gehalte von E2- und E1-Metaboliten im normalen Brustgewebe mit den bisher publizierten Daten, wobei jeweils die mittleren Gehalte (soweit vorhanden differenziert nach dem Menopausalstatus) und die Standardabweichung angegeben sind. Wenn Letztere in der Literatur nicht zur Verfügung stand, ist lediglich der mittlere Gehalt von E2 und E1 aufgeführt worden. Bis auf die Gehalte von Rogan et al. (2003) handelt es sich jeweils um die unkonjugierten E2- und E1-Metabolite; n.b.: nicht bestimmt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5.*

Literaturquelle	E2 (pmol/g Gewebe)		E1 (pmol/g Gewebe)	
	prämeno-pausal	postmeno-pausal	prämeno-pausal	postmeno-pausal
Dissertation Futh	0,92 ± 0,68	0,51 ± 0,37	1,70 ± 2,30	0,97 ± 0,74
Thijssen et al. (1987)	0,44	0,32	1,03	0,38
Thijssen und Blankenstein (1989)	0,48	0,19		
Reed et al. (1991)	n.b.	n.b.	n.b.	0,52 ± 0,46
Van Landeghem et al. (1995)	0,2 - 2,6		0,2 - 3,3	
Chetrite et al. (1999)	n.b.	0,63 ± 0,29	n.b.	0,75 ± 0,26
	pmol/g Gewebe			
	E1 + E2	2-MeO-E1(E2)	4-MeO-E1-(E2)	3-O-Me-2-HO-E1(E2)
Dissertation Futh	2,20 ± 2,28	1,79 ± 1,27	3,26 ± 2,82	0,43 ± 0,37
Rogan et al. (2003)	4,1 ± 3,0	3,5 ± 2,8	4,1 ± 2,6	n.b.
	E1-Methyl-Catechole (pmol/g Gewebe)			
	prämenopausal		postmenopausal	
Dissertation Futh	4,92 ± 3,97		5,91 ± 4,56	
	pmol/g Gewebe			
	2-MeO-E2		4-MeO-E2	
	< 0,31 ± 0,15		< 0,28 ± 0,14	
	pmol/g Gewebe			
	2-HO-E2	4-HO-E2	2-HO-E1	4-HO-E1
	< 9,79 ± 8,05	< 18,05 ± 16,13	< 5,27 ± 5,06	< 6,11 ± 6,98
	2-HO-E1(E2)		4-HO-E1(E2)	
Dissertation Futh/*Rogan et al. (2003)	5,4 ± 5,1		3,4 ± 2,7	
	pmol/g Gewebe			
	16-α-HO-E2	16-α-HO-E1	*16-α-HO-E1(E2)	
	< 20,60 ± 10,45	< 8,47 ± 7,43	< 2,8 ± 1,2	

Da im gesunden Gewebe unter anderem die COMT-Aktivität gegenüber der Aktivität von CYP1A1 beziehungsweise CYP1A2 und CYP1B1 erhöht ist und daher die Inaktivierung der Catechol-Estrogene zu den Methyl-Catecholen überwiegt (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011; Mitrunen und Hirvonen, 2003), war im Gewebe der untersuchten Frauen ebenfalls die Bildung von Methyl-Catecholen zu erwarten.

Diesbezüglich wurde 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 nachgewiesen (Abb. 61). Während 2- und 4-MeO-E1 in allen Gewebespenden nachgewiesen wurden, war 3-O-Me-2-HO-E1 lediglich in 14 der Proben nachzuweisen. Deren Gehalte berechneten sich auf $1,79 \pm 1,27$ pmol/g Gewebe und $3,26 \pm 2,82$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $0,43 \pm 0,37$ pmol/g Gewebe (Abb. 61; Tab. 37). In den übrigen Proben, in denen 3-O-Me-2-HO-E1 nicht nachgewiesen wurde, berechnete sich die NWG auf $< 1,81 \pm 0,90$ pmol/g Gewebe (Kap. 5.4.7). Angaben über die Gewebespiegel von E2- und E1-Metaboliten im normalen Gewebe existieren lediglich in der Studie von Rogan et al. (2003), wobei diesbezüglich wiederum die Summen aus freien und gebundenen methylierten beziehungsweise hydroxylierten E1- und E2-Metaboliten betrachtet wurden (Tab. 37). Mittels COMT wird 2-HO-E1 beziehungsweise 4-HO-E1 vorrangig zu 2-MeO-E1 und 4-MeO-E1 und in geringerem Umfang unter anderem zu 3-O-Me-2-HO-E1 methyliert (zusammengefasst von Zhu und Conney, 1998; Roy et al., 1990), so dass Letztes nur ein Nebenprodukt der Methylierung darstellt. Nach Rogan et al. (2003) resultierten für 4-MeO-E1(E2) höhere Gehalte als für 2-MeO-E1(E2) (Tab. 37), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet wurde. Da in den 30 untersuchten Realproben keine E2-Methylierungsprodukte nachweisbar waren (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation - Futh_2015; Tab. 7*), entsprach der Gehalt von 2-MeO-E1 beziehungsweise 4-MeO-E1 gleichermaßen der jeweiligen Summe aus E1- und E2-Methylierungsprodukten. Für 4-MeO-E1 resultierte im Vergleich zu 2-MeO-E1 durchschnittlich 45,1% höhere Gehalte (Abb. 61; Tab. 37), wobei kein signifikanter Unterschied vorhanden war (Abb. 61; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, p-Wert = 0,083). Des Weiteren waren die mittleren Gehalte von 2-MeO-E2 beziehungsweise 4-MeO-E1 signifikant größer als die von 3-O-Me-2-HO-E1 (Abb. 61; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, p-Wert = $5,398 \times 10^{-5}$ beziehungsweise p-Wert = $4,924 \times 10^{-6}$). Da 2- und 4-MeO-E1 auch in den untersuchten Gewebespenden die vorrangig gebildeten Methylierungsprodukte darstellten und 3-O-Me-2-HO-E1 lediglich ein Nebenprodukt der Methylierung war (Abb. 61; Tab. 37), sind auch die ermittelten Gewebespiegel von E1-Methylierungsprodukten mit der Literatur vergleichbar. Differenziert nach dem Menopausalstatus der Probandinnen resultierten bei den untersuchten prä- und postmenopausalen Frauen Gehalte von $4,92 \pm 3,97$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $5,91 \pm 4,56$ pmol/g Gewebe (Abb. 61), wobei 2-/4-MeO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E1 als Summe betrachtet wurden. Da hierbei kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden war (Abb. 61; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*, p-Wert = 0,741), scheint der Menopausalstatus auf die Methylierung von 2-HO-E1 beziehungsweise 4-HO-E1 keinen Einfluss zu haben.

Da in der Literatur bisher keine Angaben über die Gehalte von E1- und E2-Methylierungsprodukten differenziert nach dem Menopausalstatus existieren, kann hierbei kein Vergleich mit der Literatur erfolgen.

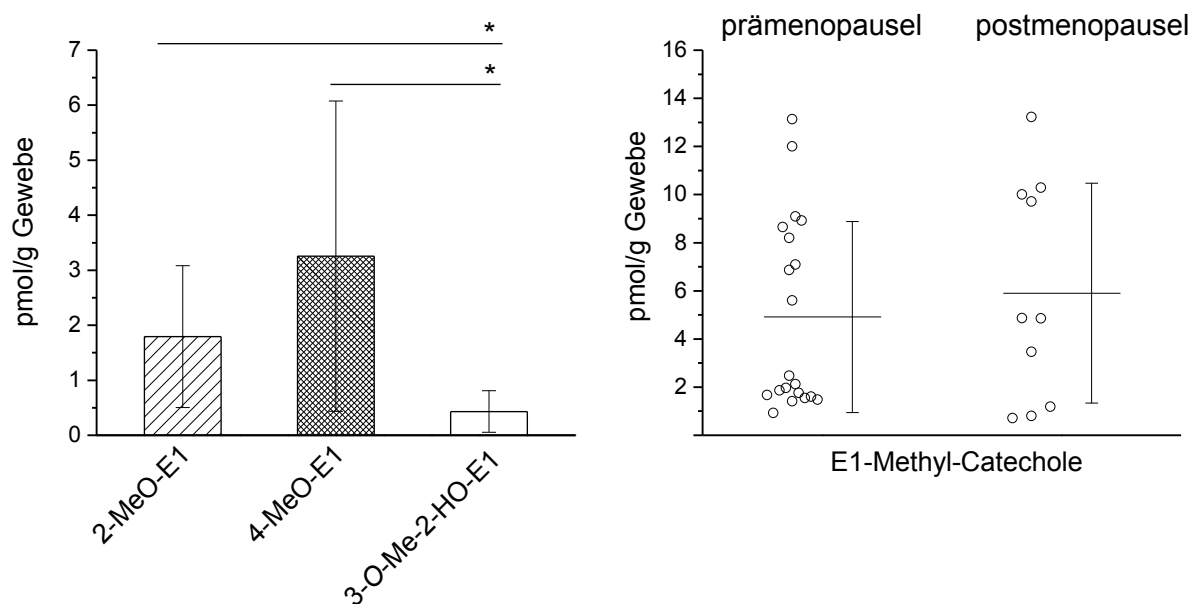


Abb. 61: Gehalte von 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 im normalen Brustgewebe von 28 Realproben nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20) sowie deren Gehalte differenziert nach dem Menopausalstatus der Probandinnen, wobei 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 hierbei als Summe betrachtet wurden. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (Kap. 4.2.23.2). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 28 Bestimmungen (links) sowie die einzelnen Gehalte der E1-Methyl-Catechole beziehungsweise die Mittelwertlinie und Standardabweichung aus 28 Bestimmungen (rechts). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 8* und im Anhang, Tab. 98.

Die NWG für 2-MeO-E2 beziehungsweise 4-MeO-E2 berechneten sich auf $< 0,31 \pm 0,15$ pmol/g Gewebe und $< 0,28 \pm 0,14$ pmol/g Gewebe (Kap. 5.4.7; Tab. 37). Nach Rogan et al. (2003) liegen die minimal zu erwartenden Gehalte von 2-MeO-E1(E2) beziehungsweise 4-MeO-E1(E2) im gesunden Gewebe durchschnittlich bei 0,7 pmol/g Gewebe und 1,5 pmol/g Gewebe. Die NWG lag diesbezüglich bei der Analyse mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bei näherungsweise 1 pmol/g Gewebe. Auch wenn die Gehalte von E2- und E1-Methylierungsprodukten hierbei als Summe betrachtet wurden, können die nach Rogan et al. (2003) ermittelten Gehalte unterstützend zur Beurteilung der NWG herangezogen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit berechneten NWG von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 waren um den Faktor 2,3 und 5,4 kleiner als die nach Rogan et al. (2003) angegebenen minimalen Gehalte. Im Zuge dessen wurden im Vergleich zur Literatur um den Faktor 3,2 beziehungsweise 3,6 niedrigere NWG für 2- und 4-MeO-E2 erzielt, so dass die verwendete Mess-Methode für den Nachweis und die Quantifizierung von 2-/4-MeO-E2 und auch 3-O-Me-2-HO-E1 ausreichend empfindlich genug war. Demnach ist davon auszugehen, dass in dem untersuchten Gewebe keine beziehungsweise nur eine sehr geringere, nicht nachweisbare Methylierung von 2- und 4-HO-E2 erfolgte.

Aufgrund einer verminderten CYP1B1-Aktivität werden im gesunden Brustgewebe im Vergleich zu tumorösen Gewebe geringere Gehalte von 4-HO-E1 beziehungsweise 4-HO-E1 erwartet. Für 2-HO-E1 und 2-HO-E2 wurden diesbezüglich keine Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Gewebe beobachtet. Letzteres war ebenfalls auf die Gehalte von 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 zu übertragen, so dass im gesunden Brustgewebe auch alle hydroxylierten Metabolite von E1 und E2 zu erwarten waren (Rogen et al., 2003).

In den untersuchten Gewebespenden wurden jedoch keine E1- und E2-Hydroxylierungsprodukte nachgewiesen (Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 6*). Diesbezüglich berechnete sich die NWG von 2- und 4-HO-E1 auf $< 5,27 \pm 5,06$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $< 6,11 \pm 6,98$ pmol/g Gewebe (Kap. 5.4.7; Tab. 37). Für 2-HO-E2 beziehungsweise 4-HO-E2 resultierte eine NWG von $< 9,79 \pm 8,05$ pmol/g Gewebe und $< 18,05 \pm 16,13$ pmol/g Gewebe (Kap. 5.4.7; Tab. 37). Für 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 resultierte jeweils die schlechteste NWG. Diese berechnete sich auf $< 20,60 \pm 10,45$ pmol/g Gewebe beziehungsweise $< 8,47 \pm 7,43$ pmol/g Gewebe (Kap. 5.4.7; Tab. 37). Nach Rogan et al. (2003) liegen die minimal zu erwartenden Gehalte von 2-HO-E1(E2) beziehungsweise 4-HO-E1(E2) durchschnittlich bei 0,3 pmol/g Gewebe und 0,7 pmol/g Gewebe. Für 16- α -HO-E1(E2) ist ein mittlerer Minimalgehalt von 1,6 pmol/g Gewebe angegeben. Analog der E1- und E2-Methylierungsprodukte lag die NWG der entsprechenden hydroxylierten Metabolite bei näherungsweise 1 pmol/g Gewebe. Für die Beurteilung der NWG wurden die Gehalte der E1- und E2-Catechole analog der Literatur wiederum als Summe betrachtet. Entgegen den E2-Methylierungsprodukten waren die berechneten NWG wesentlich schlechter (Tab. 37). Im Vergleich zur Literatur waren diese für 2-HO-E1(E2) beziehungsweise 4-HO-E1(E2) im Mittel um den Faktor 50,2 und 34,5 größer, als die durchschnittlichen Minimalgehalte der Literatur. Ein ähnliches Ergebnis resultierte für 16- α -HO-E1(E2). Diesbezüglich war die berechnete NWG um den Faktor 18,2 größer als der nach Rogan et al. (2003) angegebene Minimalgehalt. Die verwendete Mess-Methode war daher für den Nachweis und die Quantifizierung von E1- und E2-Catecholen nicht ausreichend empfindlich genug. Für diese resultierten im Vergleich zur Literatur um den Faktor 5 und 21 schlechtere NWG, so dass infolge dessen keine Aussage getroffen werden konnte, ob in dem untersuchten Gewebe Catechol-Estrogene gebildet wurden. Für die Analyse von Catechol-Estrogenen sind daher in der Literatur bereits angewandte empfindlichere flüssigchromatographische Methoden heranzuziehen.

5.7 Korrelationsanalysen

Im Folgenden werden mögliche Korrelationen zwischen den in Kap. 5.6.1 dargestellten Gewebespiegeln von E1- und E2-Metaboliten und den im Rahmen der Arbeit erhobenen Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren diskutiert.

Die Einnahme von Wirkstoffen, die wie Estrogene wirken, beinhaltet einerseits die Aufnahme von Hormonen als Antikonzeptiva und andererseits eine HRT als Ersatztherapie beziehungsweise postmenopausal sowie eine Supplementierung durch NEM (Tab. 38). Mittels Patientenbogen wurden ebenfalls die Rauch- und Trinkgewohnheiten der Frauen erfasst. Hinsichtlich des Alkoholkonsums sollte die Menge/Woche und die Art der konsumierten Getränke angegeben werden. Da es in der Regel schwierig ist die Häufigkeit des eigenen Alkoholkonsums einzuordnen, waren die Angaben der Teilnehmerinnen sehr weitreichend. Die Trinkgewohnheiten wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit in unterschiedliche Kategorien der Häufigkeit eingeteilt (Tab. 38). Bei der Erfassung der Rauchgewohnheiten sollten die Anzahl der Zigaretten/Tag und die Jahre des Zigarettenkonsums angegeben werden. Wenn eine Nichtraucherin in einem früheren Lebensabschnitt Zigaretten konsumierte, sollten auch hier die täglich konsumierten Zigaretten angegeben werden. Da die Teilnehmerinnen ihr Rauchverhalten teilweise sehr allgemein formulierten, ohne eine konkrete Anzahl täglich konsumierter Zigaretten beziehungsweise die Jahre des Zigarettenkonsums zu nennen, wurden die Teilnehmerinnen lediglich in Raucherinnen und Nichtraucherinnen unterschieden (Tab. 38).

Das durchschnittliche Alter der 30 untersuchten Probandinnen betrug 41 Jahre. Die Anzahl von prämeno- und postmenopausalen Frauen war nicht ausgeglichen, da lediglich 29% der Teilnehmerinnen als postmenopausal eingestuft wurden (Tab. 38). Dies hatte zu Folge, dass die im Rahmen der Korrelationsanalysen untersuchten Gruppen, zum Beispiel postmenopausale Frauen mit E2-Supplementierung (Kap. 5.7.1) mit nur einer Probandin für eine statistische Auswertung viel zu klein waren. Auf eine weitere Auswertung wurde daher verzichtet. Des Weiteren gab lediglich eine Studienteilnehmerin die Einnahme von NEM an (Tab. 38), weshalb auch hier beschlossen wurde, NEM nicht mit in die Auswertungen einfließen zu lassen. Auch das Rauchverhalten wurde aufgrund der begrenzten Probenanzahl nicht berücksichtigt, da lediglich 7 der untersuchten Teilnehmerinnen regelmäßig rauchten (Tab. 38). Infolge der vielfältigen Trinkgewohnheiten der Probandinnen (Tab. 38) würde sich auch die statistische Auswertung schwierig gestalten, so dass auch Alkohol als Einflussfaktor nicht in die Bewertung einbezogen wurde. Da mit den Korrelationsanalysen ebenfalls die Anwendbarkeit der entwickelten Aufarbeitungs- und Mess-Methode beurteilt werden sollte, wurden lediglich in der Literatur bereits gesicherte Korrelationen zwischen den Gewebespiegeln von E2 beziehungsweise E1 und den Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren betrachtet. Für den Risikofaktor Schwangerschaft existiert lediglich eine Literaturquelle, die den Zusammenhang zwischen der Anzahl von Schwangerschaften sowie der Länge der Stilldauer und den Gehalten von unkonjugiertem E2 beziehungsweise E1 im Serum beschreibt (zusammengefasst von Yaghjyan und Colditz, 2011; Ernster et al., 1987). Für Brustgewebe

gibt es diesbezüglich bislang keine Literaturangaben, so dass im Folgenden nur Korrelationen zwischen den analysierten Gehalten von E1 und E2 mit dem Menopausalstatus, Hormonsubstitutionen sowie dem BMI betrachtet wurden.

Tab. 38: Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten der Teilnehmerinnen (unabhängig des Menopausalstatus), wobei Mittelwert und Standardabweichung, die Anzahl (n) an zutreffenden Frauen oder auch die Spannweite angegeben wurden. Die Angaben in Klammern entsprechen dem jeweiligen prozentualen Anteil bezogen auf die Gesamtzahl der Teilnehmerinnen in einer Gruppe.

Alter (Jahre)	Spannweite				
	18 - 57				
Menopausalstatus (n)	prämenopausal 20 (71%)		postmenopausal 8 (29%)		
BMI (kg/m ²)	MW ± STABW 25,4 ± 2,5	< 25 14 (47%)	25 - 29,9 15 (50%)	≥ 30 1 (3%)	
Schwangerschaften (n)	keine Angabe 3 (10%)	0 12 (40%)	1 4 (13%)	2 8 (27%)	3 3 (10%)
HRT/Kontrazeptiva (n)	keine Einnahme 23 (77%)		Einnahme 7 (23%)		
NEM (n)	keine Einnahme 29 (97%)		Einnahme 1 (3%)		
Alkoholkonsum	n (Probandinnen)				
1 Glas Wein/Tag	2 (7%)				
1 - 3 Gläser Wein/Woche	4 (13%)				
3 Gläser Wein/Woche und maximal 2 Gläser andere alkoholische Getränke	2 (7%)				
Ein- bis Zweimal im Monat	2 (7%)				
selten	5 (17%)				
kein Alkoholkonsum	12 (40%)				
keine Angabe	3 (10%)				
Rauchverhalten (n)	Nichtraucherinnen 23 (77%)		Raucherinnen 7 (23%)		

5.7.1 E2-Supplementierung

Nur 8 der Teilnehmerinnen gaben an, dass sie zum Zeitpunkt der Untersuchung Arzneimittel mit estrogener Wirkung einnahmen (Tab. 38). Mit Ausnahme von einer Probandin handelte es sich dabei um prämenopausale Frauen, bei diesen hormonelle Kontrazeptiva als Verhütungsmittel (Pille, Verhütungsring oder Hormonspirale) zum Einsatz kamen.

Unabhängig davon, ob der Menopausalstatus der Frauen berücksichtigt wurde (Tab. 39; Abb. 62) oder nicht (Anhang, Abb. 101), zeigten die Gehalte von E2, E1 sowie deren Summe und der Quotient von E2 zu E1 beziehungsweise E1 zu E2 beim Vergleich mit beziehungsweise ohne E2-Supplementierung keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Tab. 39, Abb. 62). Diesbezüglich musste im Rahmen der postmenopausalen Frauen auf eine statistische

Auswertung verzichtet werden, da infolge von nur einer Probandin mit HRT nicht genügend Daten vorlagen.

Tab. 39: Zusammenfassung der Gehalte von E2 und E1 sowie deren Summe und der Quotient von E2 zu E1 beziehungsweise E1 zu E2 im Vergleich mit beziehungsweise ohne E2-Supplementierung differenziert für prä- und postmenopausale Frauen beziehungsweise ohne Berücksichtigung des Menopausalstatus. Mit Ausnahme bei E2/E1 sind jeweils die mittleren Gehalte in pmol/g Gewebe und die Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Bei den postmenopausalen Frauen konnten aufgrund fehlender Daten in der Gruppe mit E2-Supplementierung keine p-Werte berechnet werden. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5.*

alle Frauen				
	ohne E2-Suppl. (MW ± STABW)		mit E2-Suppl. (MW ± STABW)	
E2	0,82 ± 0,70		0,68 ± 0,29	
	p-Wert = 0,959			
E1	1,19 ± 1,10		2,26 ± 3,47	
	p-Wert = 0,894			
E1+E2	1,96 ± 1,72		2,94 ± 3,59	
	p-Wert = 0,740			
E2/E1	0,95 ± 0,82		1,74 ± 3,20	
	p-Wert = 0,490			
E1/E2	1,69 ± 1,55		3,07 ± 3,55	
	p-Wert = 0,490			
	prämenopausal		postmenopausal	
E1/E2	1,88 ± 2,23		2,29 ± 2,46	
	ohne E2-Suppl.	mit E2-Suppl.	ohne E2-Suppl.	mit E2-Suppl.
	MW ± STABW		MW ± STABW	
E2	0,96 ± 0,78	0,74 ± 0,28	0,54 ± 0,39	0,35
	p-Wert = 0,458			
E1	1,32 ± 1,23	2,43 ± 3,77	0,93 ± 0,80	1,23
	p-Wert = -			
	ohne E2-Suppl. (MW ± STABW)		ohne E2-Suppl. (MW ± STABW)	
E1+E2	2,19 ± 1,96	3,17 ± 3,88	1,46 ± 1,02	1,58
	p-Wert = 1,000			
E2/E1	0,92 ± 0,81	1,98 ± 3,43	1,00 ± 0,92	0,28
	p-Wert = -			
E1/E2	1,47 ± 0,63	2,99 ± 3,88	2,11 ± 0,63	3,53
	p-Wert = -			

Bisher existiert nur eine Literaturquelle von O'Brien et al. (1997), bei der unter anderem für die Korrelationsanalysen zwischen dem Menopausalstatus mit beziehungsweise ohne E2-Supplementierung und dem E2- und E1-Gehalt im Brustgewebe mittels RIA jeweils der freie Gehalt bestimmt wurde, so dass diese Ergebnisse für einen Vergleich mit den hier dargestellten Korrelationen herangezogen werden.

Nach O'Brien et al. (1997) waren die E1-Gehalte im Brustgewebe prämenopausaler Frauen ungefähr um den Faktor 2 bis 4 höher, als im Gewebe postmenopausaler Frauen. Dieser Aspekt wurde bereits in Kap. 5.6.1 diskutiert und wurde ebenfalls bei den untersuchten prä- und postmenopausalen Frauen bestätigt, da der E1-Gehalt in der Prämenopause fast doppelt so hoch war, wie in der Postmenopause (Tab. 37; Seite 196). Gleichermaßen werden für E2 bei prämenopausalen Frauen höhere Gehalte beschrieben, wobei diese näherungsweise um den Faktor 7 bis 9 höher sind, als bei postmenopausalen Frauen (O'Brien et al., 1997). Bei den untersuchten prämenopausalen Frauen war der E2-Gehalt ungefähr um den Faktor 2 höher, als bei den postmenopausalen Frauen (Tab. 37; Seite 196), so dass dieses Ergebnis näherungsweise mit der Literatur übereinstimmt. Bei der Anwendung einer HRT resultierte nach O'Brien et al. (1997) für E1 ein signifikant höherer Gehalt. Auch im Rahmen der Arbeit wurde für die postmenopausale Frau mit HRT ein höherer E1-Gehalt gegenüber den postmenopausalen Frauen ohne HRT ermittelt (Tab. 39, Seite 202). Eine Aussage über einen möglichen signifikanten Unterschied zwischen den E1-Gehalten mit beziehungsweise ohne HRT-Behandlung in der Postmenopause konnte jedoch nicht getroffen werden, da weitere Daten postmenopausaler Frauen mit HRT nicht vorlagen. Gleichermaßen wurde bei HRT-Anwendung ein höherer E2-Gehalt beobachtet, der sich jedoch nicht statistisch signifikant von dem E2-Gehalt postmenopausaler Frauen ohne HRT unterscheidet (O'Brien et al., 1997). Der E2-Gehalt der untersuchten postmenopausalen Frau war kleiner, als der durchschnittliche E2-Gehalt ohne HRT-Anwendung (Tab. 39, Seite 202; Abb. 62), wobei auch hierbei keine weitere Interpretation aufgrund fehlender Daten erfolgte.

Das Verhältnis von E1 zu E2 ist in postmenopausalen Frauen signifikant höher als in der prämenopausalen Frau (O'Brien et al., 1997). Bei den untersuchten Probandinnen war das Verhältnis von E1 zu E2 bei den untersuchten postmenopausalen Frauen durchschnittlich um den Faktor 1,2 höher (Tab. 39, Seite 202; Abb. 62). Auch wenn kein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (Tab. 39; Seite 202; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*), stimmte dieses Ergebnis näherungsweise mit der Literatur überein. Während die Einnahme oraler Kontrazeptiva infolge der Unterdrückung des Eisprungs ferner zu einer Erhöhung dieses Verhältnisses gegenüber prämenopausalen Frauen ohne E2-Supplementierung führt (Gaspard et al., 1984), scheint die Anwendung einer HRT in der Postmenopause diesbezüglich keinen Einfluss zu besitzen, da sich das Verhältnis von E1 zu E2 mit beziehungsweise ohne HRT nicht voneinander unterscheidet (O'Brien et al., 1997). Auch wenn die Einnahme oraler Kontrazeptiva nicht zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Verhältnisses von E1 zu E2 führte, war dieses bei den prämenopausalen Frauen mit E2-Supplementierung um den Faktor 1,6 größer, so dass die Literatur und das im Rahmen der Arbeit ermittelte Ergebnis näherungsweise übereinstimmen (Tab. 39, Seite 202; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*).

Ob die E2-Supplementierung in der Postmenopause wirklich keinen Einfluss auf das Verhältnis von E1 zu E2 hat, kann mit den verfügbaren Daten nicht näher untersucht werden. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva führte in der Prämenopause zu niedrigeren E1- und E2-Gehalten (O'Brien et al., 1997), wobei hinsichtlich des E1-Gehaltes sogar ein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten war (O'Brien et al., 1997). Dieser Aspekt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt. Während für E2 bei der Einnahme oraler Kontrazeptiva zwar durchschnittlich ein niedrigerer E2 Gehalt resultierte, war diesbezüglich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden (Tab. 39, Seite 202; Abb. 62; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*). Der Gehalt von E1 war durchschnittlich bei der Anwendung oraler Kontrazeptiva höher, als wenn keine E2-Supplementierung erfolgte (Tab. 39, Seite 202; Abb. 62). Da sich die in der Literatur beschriebenen kleineren beziehungsweise signifikant kleineren E1- und E2-Gehalte bei prämenopausalen Frauen nur auf die Anwendung oraler Kontrazeptiva der Kombination Ethinylestradiol (EE2) und Levonorgestrel beziehen (Gaspard et al., 1984), sind bei der Verwendung anderer Verhütungsmittel hormonelle Veränderungen denkbar, die von den in der Literatur beschriebenen Gewebespiegeln von E1 und E2 prämenopausaler Frauen abweichen. Diesbezüglich gaben zwei der untersuchten prämenopausalen Frauen die Verwendung eines Verhütungsrings an, welcher in der Regel eine Kombination von EE2 und Etonogestrel darstellt. Zwei weitere Frauen verwendeten eine Spirale beziehungsweise Hormonspirale. Während bei Letzteren kleine Mengen Gestagen abgegeben werden, ist die Wirksamkeit einer Spirale rein mechanisch beziehungsweise durch die Abgabe von Kupferionen bedingt. Angaben darüber, welcher dieser beiden Wirkmechanismen zur Anwendung kam, lagen nicht vor. Bei der Anwendung von oralen Kontrazeptiva wurde lediglich einmal die Kombination von EE2 und Levonorgestrel angegeben, so dass bei den untersuchten prämenopausalen Frauen hauptsächlich andere Hormonkombinationen verwendet wurden, was möglicherweise zu einer Erhöhung des E1-Gehaltes bei E2-Supplementierung führte (Tab. 39, Seite 202). Da die von Gaspard et al. (1984) analysierte Studienpopulation von 40 prämenopausalen Frauen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wesentlich höher war, können dessen Ergebnisse jedoch nur näherungsweise herangezogen werden.

Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass die Gewebespiegel von E2 und E1 differenziert nach dem Menopausalstatus mit beziehungsweise ohne E2-Supplementierung näherungsweise mit den Literaturangaben übereinstimmen. Auch wenn die Aussagekraft der Ergebnisse aufgrund der wenigen Daten hinsichtlich der postmenopausalen Frauen mit E2-Supplementierung stark eingeschränkt ist, zeigen diese, dass der E2- und E1-Gehalt vom Menopausalstatus nicht signifikant beeinflusst wird und ebenfalls von einer Hormonsubstitution

durch hormonelle Kontrazeptiva und möglicherweise HRT unabhängig ist (Tab. 39, Seite 202; Abb. 62).

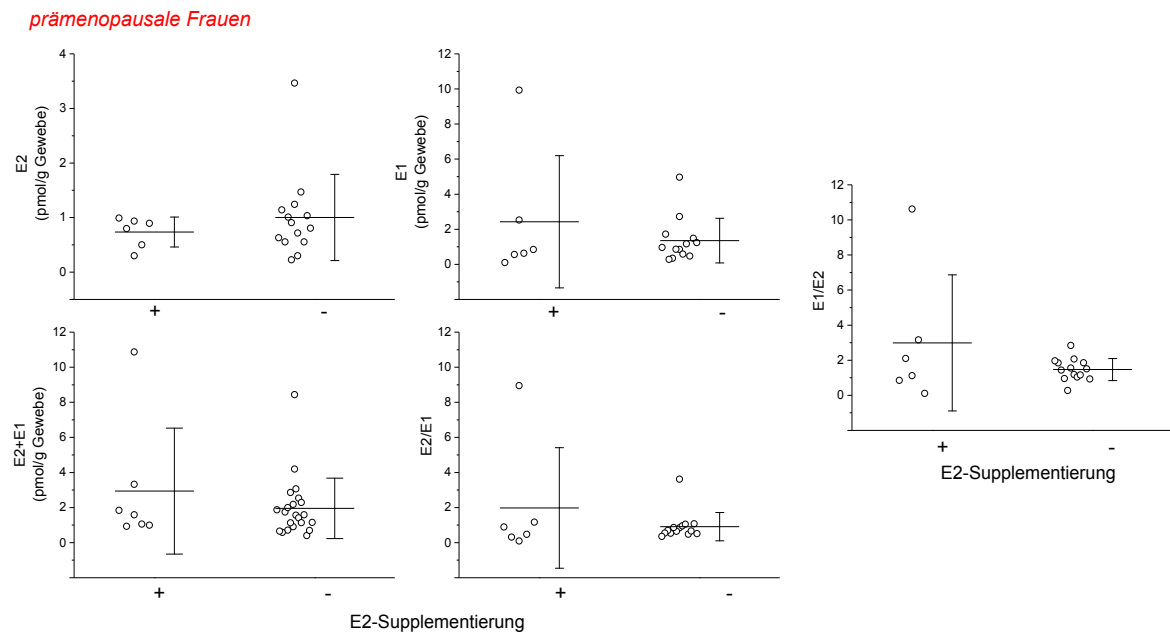


Abb. 62: Gehalte von E2 und E1 sowie deren Summe und der Quotient von E2 zu E1 beziehungsweise E1 zu E2 im Vergleich mit (+) und ohne (-) E2-Supplementierung für prämenopausale Frauen. Auf die Darstellung der postmenopausalen Frauen wurde aufgrund fehlender Daten verzichtet. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Dargestellt sind jeweils die einzelnen Gehalte sowie die Mittelwertlinie und die Standardabweichung aus 28 Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5*.

5.7.2 Body-Mass-Index

Der BMI ist ein Maß für die Bewertung des Körpergewichtes eines Menschen in Relation zu seiner Körpergröße und dient demnach indirekt zur Abschätzung der Fettmasse (Hawighorst und Emons, 2006).

Nach der Gewichtsklassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) besteht bei einem BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2 Normalgewicht. Unterhalb beziehungsweise oberhalb dieser Grenzen resultiert Untergewicht ($< 18,5 \text{ kg/m}^2$) beziehungsweise Übergewicht ($\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$). Wird bei einer Person ein höherer Index berechnet, so wird diese als adipös eingestuft. Der Adipositas wird zusätzlich in drei Schweregrade unterteilt: Bis 29,9 kg/m^2 besteht Präadipositas, zwischen 30,0 und 34,9 kg/m^2 Adipositas Grad I, bis 39,9 kg/m^2 Grad II und ab einem BMI von 40 kg/m^2 resultiert extremer Adipositas beziehungsweise Adipositas Grad III (Vainio et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten über das Gewicht

und die Größe der Probandinnen wurden, soweit vorhanden, in den BMI umgerechnet und anschließend in die oben genannten Gruppen der WHO kategorisiert.

Der BMI der untersuchten Teilnehmerinnen variierte zwischen 20,0 und 31,8. Während 14 Frauen normalgewichtig waren, besaßen 16 Übergewicht beziehungsweise Adipositas. Der mittlere BMI aller Probandinnen betrug 25,4, so dass es sich um präadipöse Frauen handelte (Tab. 38, Seite 201). Da der Zusammenhang zwischen Körpergewicht und dem Brustkrebsrisiko vom Menopausalstatus abhängige Unterschiede aufweist (Vainio et al., 2002), wurden die Teilnehmerinnen für die nachfolgenden Korrelationsanalysen in prä- und postmenopausale Frauen unterteilt, so dass mögliche Korrelationen zwischen dem BMI und den in Kap. 5.6.1 diskutierten Gewebespiegeln von E2 und E1 differenziert nach dem Menopausalstatus betrachtet wurden. Da hierbei prä- und postmenopausale Frauen unabhängig einer E2-Supplementierung erfasst wurden, erfolgte ebenfalls die Betrachtung einer möglichen Korrelation zwischen dem BMI und den E2- und E1-Gewebespiegeln differenziert nach dem Menopausalstatus mit beziehungsweise ohne Hormonsubstitution. Bei den postmenopausalen Frauen mit HRT konnte diese Überprüfung nicht durchgeführt werden, da lediglich eine der untersuchten Frauen eine HRT-Behandlung angab (Tab. 38, Seite 201).

Bei den postmenopausalen Frauen mit beziehungsweise ohne HRT-Behandlung resultierte zwischen dem BMI und dem Gehalt von E2 im Brustgewebe beziehungsweise dem Verhältnis von E2 zu E1 eine schwach positive Korrelation (Abb. 63). Diese Beobachtung stimmte mit dem in der Literatur beschriebenen Brustkrebsrisiko nach der Menopause überein, welches mit zunehmenden BMI beziehungsweise Gesamtfettgehalt ansteigt (Favero et al., 1998; Lahmann et al., 2003). In Kap. 2 wurde erläutert, dass Estrogene nach der Menopause hauptsächlich im Fett- und Muskelgewebe gebildet werden (Longcope et al., 1987; van Landeghem et al., 1985). Dabei werden Androgenvorstufen mit Hilfe der Aromatase zu Estrogenen umgewandelt (Reed und Purohit, 2011), so dass bei adipösen Frauen aufgrund des erhöhten Körperfettanteils höhere Mengen E2 synthetisiert werden, die auf das Brustgewebe einwirken können, so dass deren Brustkrebsrate zwischen 30 und 50% gesteigert ist (Hawighorst und Emons, 2006; Lahmann et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen dem E2-Gehalt im Brustgewebe und dem BMI sowie dem damit verbundenen Brustkrebsrisiko postmenopausaler adipöser Frauen ist demnach aus der Literatur bereits bekannt, so dass allen epidemiologischen Studien diesbezüglich übereinstimmende Angaben zu entnehmen sind (Hawighorst und Emons, 2006). Der Gehalt von freiem E2 beziehungsweise Albumin-gebundenem E2 nimmt mit ansteigendem BMI in der postmenopausalen Frau zu (Potischman et al., 1996).

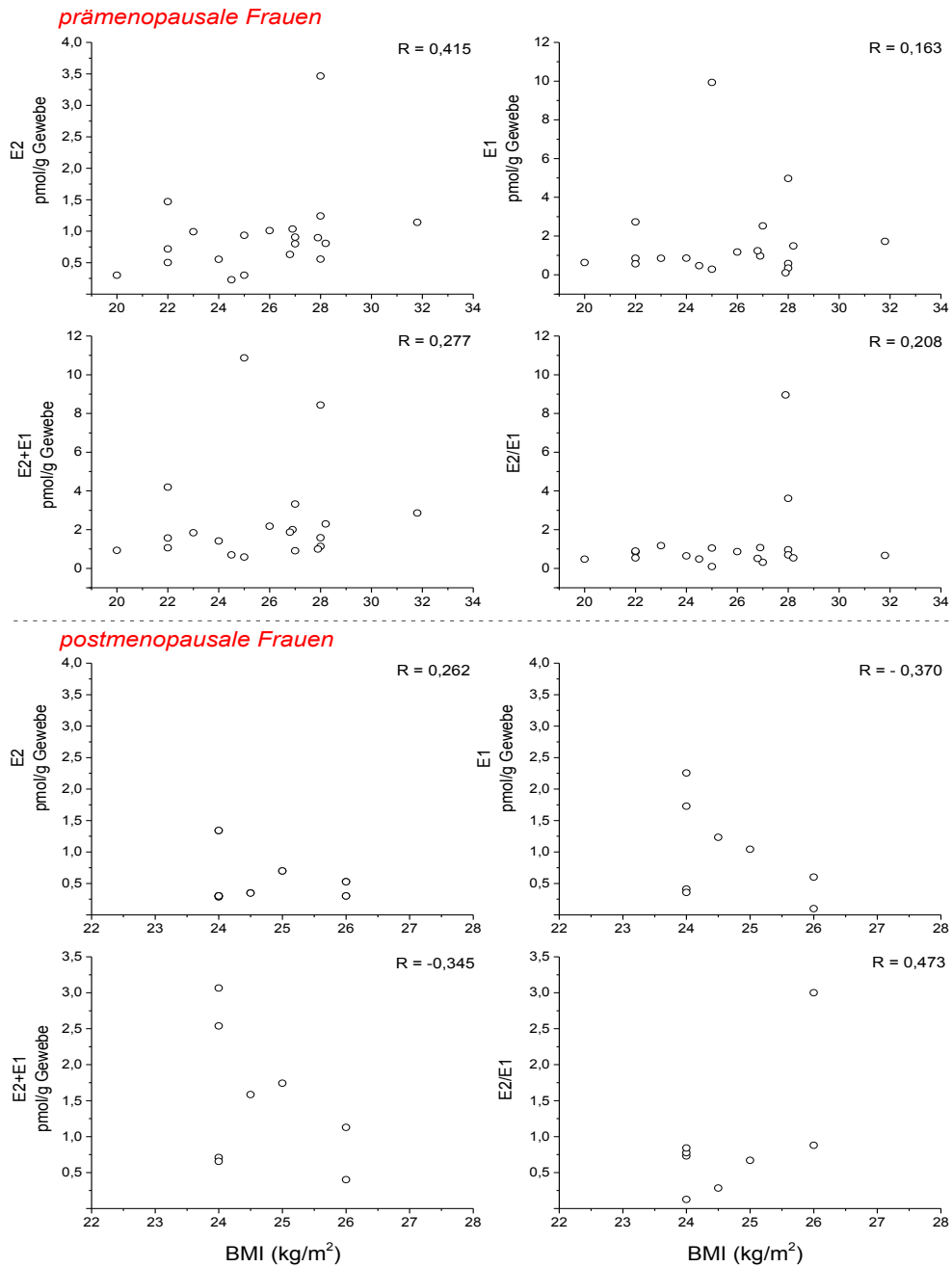


Abb. 63: Korrelation zwischen den Gehalten von E2, E1, deren Summe beziehungsweise dem Verhältnis von E2 zu E1 mit dem BMI anhand des Menopausalstatus der untersuchten Probandinnen. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Der Korrelationskoeffizient wurde jeweils nach Spearman berechnet. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 97 sowie Daten-CD, Dissertation_-Futh_2015; Tab. 5.

Während in der vorliegenden Arbeit zwischen dem BMI und dem E2-Gehalt im Brustgewebe nur eine schwach positive Korrelation beobachtet wurde (Abb. 63), wird diesbezüglich in der Literatur eine signifikante Korrelation beschrieben (E2 $R = 0,52$; O'Brien et al., 1997). Diese Diskrepanz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Anzahl der untersuchten postmenopausalen Frauen sehr gering war und diese insgesamt einen sehr ähnlichen BMI aufzeigten, welcher lediglich zwischen 24 und 26 variierte (Anhang, Tab. 96). Demnach war

der analysierte Bereich bezüglich einer möglichen Korrelation zwischen dem E2-Gehalt im Brustgewebe und dem BMI sehr eng begrenzt. Darüber hinaus lag der BMI der postmenopausalen Frauen im Mittel bei 24,7, so dass es sich um normalgewichtige Frauen handelte, bei denen aufgrund des geringeren Körperfettanteils geringere Mengen E2 synthetisiert wurden. Folglich konnte der in der Literatur für postmenopausale Frauen beschriebene Einfluss des Körperfettanteils auf den E2-Gehalt möglicherweise nicht stark genug zum Ausdruck kommen. Für die in der Literatur durchgeführten Korrelationsanalysen stand einerseits eine viel höhere Anzahl postmenopausaler Frauen zur Verfügung. Von O'Brien et al. (1997) wurden beispielsweise 19 Frauen ohne HRT- beziehungsweise 10 Frauen mit HRT-Behandlung untersucht, so dass andererseits bei den Ergebnissen eine größere Breite des BMI berücksichtigt wurde. Demnach variierte der BMI der postmenopausalen Frauen ohne HRT zwischen 27,5 und 46,2, während dieser mit HRT-Behandlung von 28,4 bis 29,9 schwankte (O'Brien et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 8 postmenopausale Frauen untersucht (Tab. 38, Seite 201), von denen lediglich eine Frau eine HRT-Behandlung angab. Auch für E1 werden in schwereren beziehungsweise adipösen postmenopausalen Frauen höhere Gehalte beschrieben, als in normalgewichtigen postmenopausalen Frauen (Potischman et al., 1996), so dass eine positive jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen dem BMI und dem E1-Gehalt resultiert (E1 R = 0,48; O'Brien et al., 1997). Für die Korrelation zwischen dem BMI und dem E1-Gehalt im Brustgewebe beziehungsweise der Summe von E2 und E1 resultierte in der vorliegenden Arbeit eine schwach inverse Korrelation (Abb. 63), so dass die Literatur hierbei nicht bestätigt wurde. Dieser Aspekt ist darauf zurückzuführen, dass bei den normalgewichtigen postmenopausalen Frauen infolge des geringeren Körperfettanteils auch eine verminderte Umwandlung von Androstendion in E1 und letztendlich in E2 erfolgte, so dass eine schwach negative Korrelation zwischen dem E1-Gehalt im Brustgewebe und dem BMI beziehungsweise der Summe von E1 und E2 resultierte (Abb. 63).

Bei den prämenopausalen Frauen sind die Zusammenhänge bisher noch unklar. In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass zwischen schweren und großen Frauen unterschieden werden muss. Prämenopausale Frauen mit hohem BMI scheinen ein geringeres Brustkrebsrisiko zu besitzen (Willet et al., 1985), als große, normalgewichtige Frauen (Stoll et al., 1994). In wieweit die Körpergröße mit dem E2- und E1-Gehalt korreliert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet werden, da nicht durchgängig bei allen Teilnehmerinnen die Angabe der Körpergröße zur Verfügung stand und oftmals lediglich der BMI auf den Patientenbögen vermerkt war. In der Literatur wird die Beziehung zwischen dem E2- beziehungsweise E1-Gehalt im Brustgewebe oder Plasma und dem BMI prämenopausaler Frauen kontrovers diskutiert. Diesbezüglich wurden von Cheraghi et al. (2012) 42 Fall-Kontroll-Studien ausgewertet, die bis April 2012 publiziert wurden und den Einfluss des BMI auf das

Brustkrebsrisiko in der Prämenopause untersucht hatten. Während in 24 Studien eine negative Korrelation beobachtet wurde, zeigten 18 Studien eine positive Beziehung. Im Vergleich zur Postmenopause, für diese einheitliche Ergebnisse beschrieben werden und das Brustkrebsrisiko mit ansteigendem BMI signifikant erhöht wird, verdeutlichen die oben genannten Auswertungen, dass ein zunehmender BMI in der Prämenopause auch das Brustkrebsrisiko reduzieren kann. Eine statistische Signifikanz wurde hierbei jedoch nicht festgestellt. Das leicht erniedrigte Brustkrebsrisiko bezieht sich auf prämenopausale Frauen mit einem hohen BMI $\geq 28,0 \text{ kg/m}^2$ (Hawighorst und Emons, 2006). Ursache dessen ist möglicherweise, dass ein erhöhter Anteil von Fettgewebe bei jungen Frauen zu einer verminderten der C2-Hydroxylierung bei gleichbleibender 16- α -Hydroxylierung führt (Schneider et al., 1982). Dieser Aspekt ist mit einem erhöhten Auftreten anovulatorischer Zyklen verbunden, die niedrigere Konzentrationen von zirkulierendem E2 und Progesteron im Blut hervorrufen (Hawighorst und Emons, 2006).

Auch Potischman et al. (1996) zeigten mittels RIA, dass der Gesamtgehalt von E2 im Blut mit zunehmenden BMI abnimmt. Lediglich für Albumin-gebundenes E2 resultierte eine Zunahme mit ansteigendem BMI in der prämenopausalen Frau, wobei jedoch auch hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (Potischman et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurden von Zumoff (1982) die Gehalte von E2 und E1 über 24 h im Plasma adipöser beziehungsweise normalgewichtiger Frauen mittels RIA untersucht. Dafür wurden 18 adipöse prämenopausale Frauen im Alter zwischen 20 und 44 Jahren herangezogen, deren Gewicht zwischen 53% und 218% oberhalb des Idealgewichts lag. Der Vergleich des E2- beziehungsweise E1-Gehaltes erfolgte mit 16 normalgewichtigen prämenopausalen Frauen, die zwischen 22 und 51 Jahre alt waren. Diesbezüglich waren die mittleren Plasma-Gehalte von E2 und E1 in adipösen Frauen höher, als in normalgewichtigen postmenopausalen Frauen, wobei wiederum keine statistisch signifikanten Unterschiede resultierten (Zumoff, 1982). In der Prämenopause sind folglich sowohl inverse als auch positive Korrelationen zwischen dem E2- beziehungsweise E1-Gehalt und dem BMI beschrieben. Das damit verbundene reduzierte beziehungsweise erhöhte Brustkrebsrisiko zeigte jedoch in keiner der bisher existierenden Studien eine statistische Signifikanz (O'Brien et al., 1997).

Um einen Vergleich mit den im Rahmen der Arbeit ermittelten Gehalten von E2 beziehungsweise E1 und dem in der Literatur beschriebenen erniedrigten Brustkrebsrisiko prämenopausaler adipöser Frauen durchführen zu können, wurden die untersuchten prämenopausalen Frauen hinsichtlich ihres BMI in zwei Gruppen, $\geq 28,0 \text{ kg/m}^2$ beziehungsweise $\leq 28,0 \text{ kg/m}^2$, unterteilt. Die E2- und E1-Gehalte waren in der Gruppe mit dem BMI $\geq 28,0 \text{ kg/m}^2$ durchschnittlich höher, als bei den normal- und übergewichtigen prämenopausalen Frauen (Abb. 64). Während bei den Frauen mit einem BMI $\geq 28,0 \text{ kg/m}^2$ ein mittlerer Gehalte von $1,44 \pm 1,16 \text{ pmol/g}$ Gewebe beziehungsweise $1,82 \pm 1,85 \text{ pmol/g}$ Gewebe resultierte, lagen die

Gehalte in der Gruppe der prämenopausalen Frauen mit einem BMI $\leq 28,0$ kg/m² für E2 beziehungsweise E1 bei $0,75 \pm 0,34$ pmol/g Gewebe und $1,65 \pm 0,34$ pmol/g Gewebe (Abb. 64). Auch wenn hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet wurden (Abb. 64; E2 R = 0,116; E1 R = 0,611; getestet mittels *Mann-Whitney-U-Test*), verdeutlichen die Ergebnisse, dass bei den adipösen prämenopausalen Frauen im Vergleich zu normal- und übergewichtigen Frauen kein geringeres Brustkrebsrisiko, infolge geringerer E2- und E1-Gehalte, bestand. Demnach wurde dieser Aspekt der Literatur nicht bestätigt.

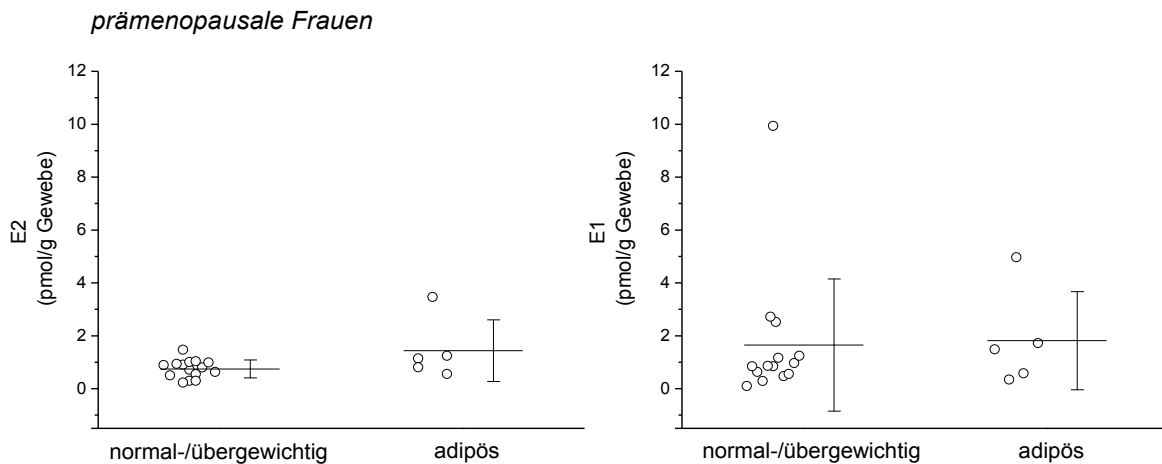


Abb. 64: E2- und E1-Gehalte im normalen Brustgewebe von 20 prämenopausalen Frauen nach Chloroformextraktion und Aufreinigung mittels SPE (Kap. 4.2.20). Analyse mittels GC/MS/MS im *MRM*-Modus. Die Kategorisierung der Frauen erfolgte unterhalb beziehungsweise oberhalb eines BMI von $\geq 28,0$ kg/m² in normal- und übergewichtig beziehungsweise adipös. Dargestellt sind jeweils die einzelnen Gehalte von E2 und E1 beziehungsweise die Mittelwertlinie und Standardabweichung aus 20 Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5*.

Des Weiteren resultierte bei den prämenopausalen Frauen unabhängig einer E2-Supplementierung sowohl zwischen dem Gehalt von E2, E1 sowie deren Summe und dem Verhältnis von E2 zu E1 beziehungsweise dem Verhältnis von E1 zu E2 und dem BMI eine positive Korrelation, welche jeweils weitaus stärker war als in der Postmenopause (Abb. 63, Seite 207). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der BMI nicht nur die E2- und E1-Gehalte in der postmenopausalen Frau beeinflusst sondern ebenfalls in der Prämenopause erheblichen Einfluss auf die Gehalte von E2 und E1 im Brustgewebe besitzt. Mit ansteigendem BMI resultierte eine Zunahme der E2- und E1-Gewebespiegel, was gleichermaßen mit einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos vor beziehungsweise nach der Menopause verbunden war (Abb. 63, Seite 207).

Welchen Einfluss eine HRT-Behandlung beziehungsweise die Einnahme oraler Kontrazeptiva auf die Korrelation zwischen dem BMI und den E2- und E1-Gewebespiegeln in der Prä- und Postmenopause besitzt, soll im Folgenden näher diskutiert werden. Auch das damit verbundene Brustkrebsrisiko der untersuchten Probandinnen wird diesbezüglich in die Betrachtung einbezogen. Für die Postmenopause werden bezüglich der Anwendung einer HRT folgende Auswirkungen auf die Beziehung zwischen dem BMI und den zirkulierenden Estrogenen beschrieben. Von Morimoto et al. (2002) wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu normalgewichtigen postmenopausalen Frauen, durch eine HRT das ohnehin schon erhöhte Brustkrebsrisiko adipöser postmenopausaler Frauen nicht weiter gesteigert wird. Diesbezüglich wurde bereits erwähnt, dass der Zusammenhang zwischen Adipositas und erhöhtem postmenopausalen Brustkrebsrisiko auf die gesteigerte periphere Übertragung von Androgenen in Estrogene im Fettgewebe zurückzuführen ist und dadurch höhere Gehalte von zirkulierendem E2 gegenüber schlanken Frauen resultieren, die mit einem erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert werden (Hankinson et al., 1998). Bei der Anwendung einer HRT wird der Gehalt von zirkulierendem E2 sowohl in schlanken als auch in übergewichtigen postmenopausalen Frauen künstlich erhöht, so dass die Übertragung von Androgenen in Estrogene im Fettgewebe vernachlässigbar ist. Demnach wird lediglich für postmenopausale Frauen, die noch nie eine HRT anwendeten, eine positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Brustkrebsrisiko beschrieben (Morimoto et al., 2002; Hankinson et al., 1998). Von O'Brien et al. (1997) wird diesbezüglich sogar eine signifikant positive Korrelation zwischen den E2- und E1-Gehalten im Brustgewebe und dem BMI postmenopausaler Frauen ohne HRT-Anwendung beschrieben. Auch wenn im Rahmen der Arbeit bei den postmenopausalen Frauen ohne E2-Supplementierung keine signifikant positive Korrelation zwischen den Gehalten von E2 beziehungsweise E1 und dem BMI beobachtet wurde, zeigen die Ergebnisse dennoch zwischen dem Gehalt von E2 beziehungsweise dem Verhältnis von E2 zu E1 und dem BMI eine schwache bis stark positive Korrelation (Abb. 65), so dass die Literaturangaben näherungsweise bestätigt wurden. Für die Beziehung zwischen dem BMI und dem E1-Gehalt beziehungsweise der Summe von E2 und E1 resultierte analog der Betrachtung postmenopausaler Frauen unabhängig einer HRT eine leicht inverse Korrelation (Abb. 65), was wiederum mit dem Normalgewicht der Frauen in Verbindung mit dem geringeren Körperfettanteil und der verminderten Umwandlung von Androstendion in E1 und letztendlich in E2 zu begründen ist. Bei den postmenopausalen Frauen mit HRT konnte kein Vergleich mit der Literatur erfolgen, da nur eine der untersuchten Frauen eine HRT angab.

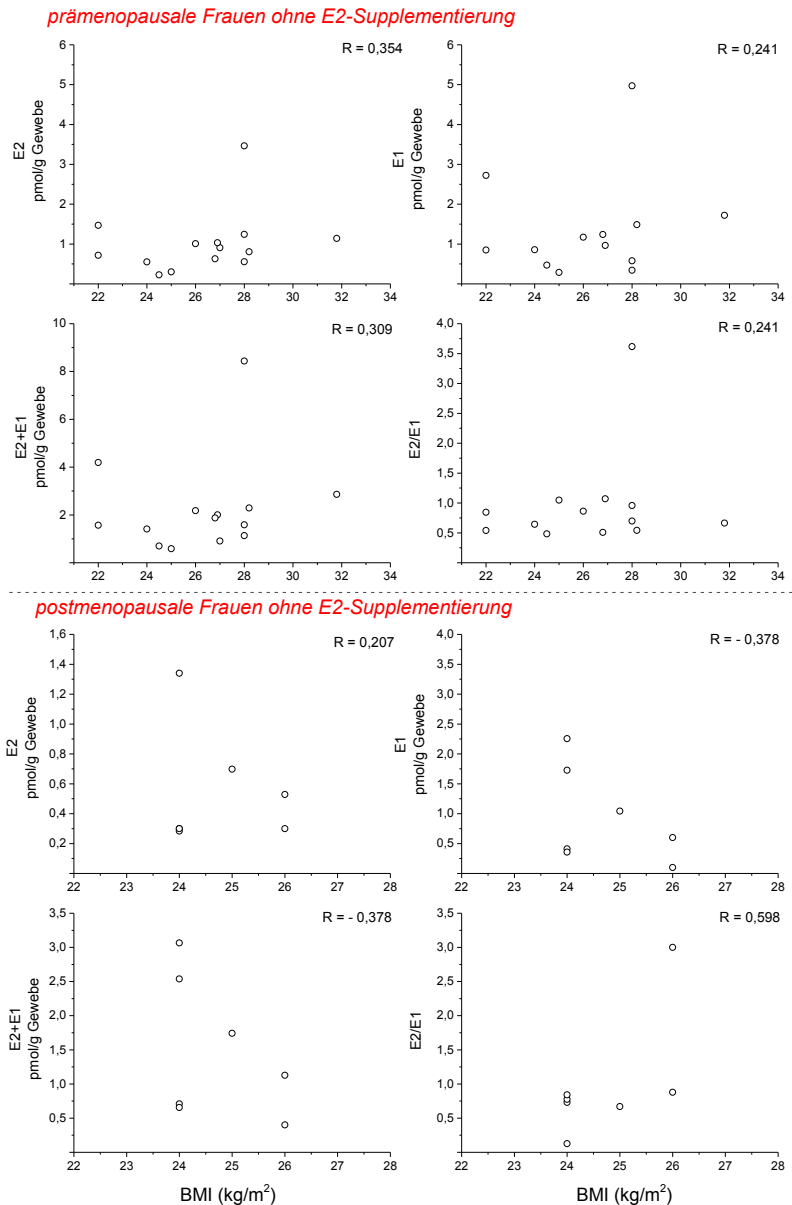


Abb. 65: Korrelation zwischen den Gehalten von E2, E1, deren Summe beziehungsweise dem Verhältnis von E2 zu E1 und dem BMI anhand des Menopausalstatus der untersuchten Probandinnen, wobei nur prä- und postmenopausale Frauen ohne E2-Supplementierung berücksichtigt wurden. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Der Korrelationskoeffizient wurde jeweils nach Spearman berechnet. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5.*

Eine differenzierte Betrachtung eines möglichen Einflusses oraler Kontrazeptiva auf die Korrelation zwischen dem BMI und dem E2- beziehungsweise E1-Gehalt ist bisher aus der Literatur nicht bekannt. Die Auswertung der Korrelationen zwischen dem BMI und dem E2- und E1-Gehalt prämenopausaler Frauen mit beziehungsweise ohne E2-Supplementierung bestätigte die bereits beschriebenen Ergebnisse aller prämenopausaler Frauen unabhängig der Einnahme möglicher Kontrazeptiva. Sowohl ohne als auch mit E2-Supplementierung resultierte eine schwach positive Korrelation zwischen dem Gehalt von E2, E1, deren Summe

sowie dem Verhältnis von E2 zu E1 und dem BMI (Abb. 65 und Abb. 66). Diesbezüglich war die Korrelation hinsichtlich des E2-Gehaltes sowie der Summe von E2 und E1 bei der Einnahme oraler Kontrazeptiva weitaus stärker als ohne E2-Supplementierung, während die Korrelation zwischen E1 und dem BMI fast zu vernachlässigen war (Abb. 66). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der BMI sowohl ohne als auch mit E2-Supplementierung insbesondere zu einem Anstieg des E2-Gehaltes führte. Demnach kann der Einfluss des BMI auf die E2- und E1-Gehalte im Brustgewebe der prämenopausalen Frau verallgemeinert werden, wonach ein ansteigender BMI ebenfalls eine Zunahme der Gewebespiegel von E2 und E1 bedingt, was wiederum ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nach sich zieht.

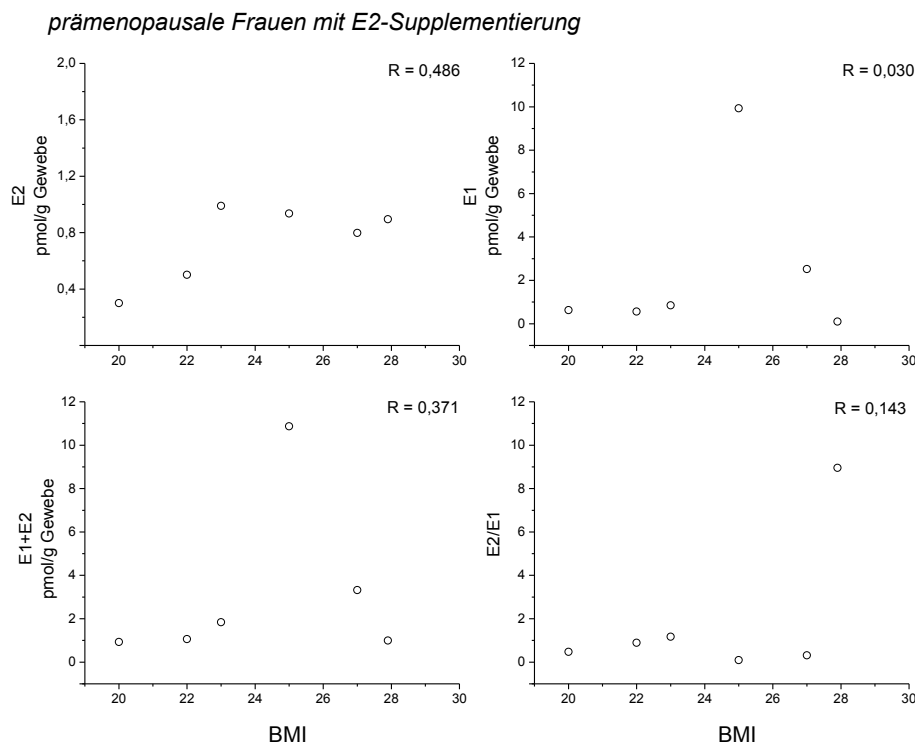


Abb. 66: Korrelation zwischen den Gehalten von E2, E1, deren Summe beziehungsweise dem Verhältnis von E2 zu E1 und dem BMI anhand des Menopausalstatus der untersuchten Probandinnen, wobei nur prämenopausale Frauen mit E2-Supplementierung berücksichtigt wurden. Analyse mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus. Der Korrelationskoeffizient wurde jeweils nach *Spearman* berechnet. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten im Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015*; Tab. 5.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Methode für die Quantifizierung von freiem 17 β -Estradiol, Estron sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite im Brustgewebe entwickelt. Aufgrund der geringen Probengehalte erforderte dies eine gezielte Isolierung der Analyte aus der Probenmatrix sowie eine effektive Aufreinigung und Aufkonzentrierung, so dass eine Extraktion mit anschließender Festphasenextraktion durchgeführt wurde. Zudem wurde eine empfindliche Mess-Methode etabliert, welche auf Grundlage einer *multi-reaction-monitoring*-Methode, mittels Gaschromatographie und gekoppelten *Triple*-Quadrupol-Massenspektrometer, entwickelt wurde. Die Anwendbarkeit der Aufarbeitungs- und Mess-Methode wurde überprüft, indem diese auf 30 Realproben übertragen wurde. Dabei sind die ermittelten Gehalte mit den publizierten Daten der Gewebekonzentrationen von 17 β -Estradiol, Estron und deren Metaboliten verglichen und Korrelationen mit ausgewählten Brustkrebs-begünstigenden Risikofaktoren betrachtet worden.

Um ein quantitatives Metabolitenprofil von 17 β -Estradiol, Estron und deren Metaboliten im Gewebe zu erstellen, wurden mit Hilfe einer *multi-reaction-monitoring*-Methode für alle Metabolite ein spezifischer *Quanti*- und *Qualifier*-Übergang etabliert. Durch die Optimierung der Ionisierungs- und Kollisionsenergien sowie der *Initial*-, *Transferline*- und Ionenquell-Temperatur beziehungsweise der *dwell-time* wurden Methoden- und Geräte-bedingte Empfindlichkeitsverluste so weit wie möglich reduziert, so dass maximale Signalintensitäten aller *Quanti*-Übergänge gewährleistet waren.

Zur gezielten Isolation sowie Aufreinigung und Anreicherung der Analyten, wurde eine Extraktion des Gewebes mit anschließender Festphasenextraktion durchgeführt. Während Catechol-Estrogene aufgrund ihrer geringen Stabilität in reinem Acetonitril weder in der organischen Phase nach Hexan- beziehungsweise Chloroformextraktion nachzuweisen waren, gingen 16- α -Hydroxyestradiol und -estron infolge ihrer höheren Polarität nur nach Extraktion mit Chloroform in die organische Phase über. Deren Wiederfindung sowie die von 17 β -Estradiol, Estron und den methylierten Metaboliten variierten nach Hexanextraktion in der organischen Phase zwischen $22,5 \pm 4,1\%$ und $69,1 \pm 12,4\%$. Nach der Extraktion mit Chloroform lagen die Wiederfindungen zwischen $33,3 \pm 17,2\%$ und $92,0 \pm 8,5\%$, so dass die organische Phase nach Chloroformextraktion verwendet wurde.

Um in weiterführenden Arbeiten 17 β -Estradiol aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten im Brustgewebe zu erfassen, wurden mit Hilfe der Modell-Substrate, 17 β -Estradiol-3-Glucuronid und 17 β -Estradiol-3-Sulfat, Vorarbeiten in Standardlösungen durchgeführt, um diese Konjugate vollständig zu spalten. Dabei wurde das freie 17 β -Estradiol im Gaschromatographen mit gekoppelten Flammenionisationsdetektor analysiert. Durch Verwendung von 10.000 U β -

Glucuronidase, aus *helix pomatia* sowie aus Rinderleber, wurde für 17 β -Estradiol-3-Glucuronid eine Spaltungsrate von $85,4 \pm 4,3\%$ beziehungsweise $84,6 \pm 4,3\%$ ermittelt, während 17 β -Estradiol-3-Sulfat mit 50 U Sulfatase aus *helix pomatia* zu $30,2 \pm 2,8\%$ gespalten wurde. Mittels gefriergetrockneter Sulfatase aus *helix pomatia* wurde die Sulfatase-Aktivität auf 100 U pro Ansatz erhöht, wobei die Spaltungseffizienz von 17 β -Estradiol-3-Sulfat nahezu verdoppelt wurde. Eine vollständige kompetitive Hemmung von 10.000 U β -*Glucuronidase* aus *helix pomatia* wurde mit 10 mM Saccharinsäure-1,4-Lacton sowie 100 mM Saccharinsäure erzielt.

Die Wiederfindungen variierten nach Inkubation mit β -*Glucuronidase* beziehungsweise Sulfatase für 17 β -Estradiol, Estron sowie deren Methyl-Catecholen und 16- α -Hydroxyestradiol und -estron zwischen $28,6 \pm 15,6\%$ und $55,1 \pm 9,1\%$ beziehungsweise $34,4 \pm 6,5\%$ und $53,1 \pm 3,6\%$. Nach sofortiger Aufarbeitung beziehungsweise der Aufarbeitung nach Inkubation ohne Enzymzusatz lagen die Wiederfindungen zwischen $52,5 \pm 14,4\%$ und $73,0 \pm 11,4\%$ beziehungsweise $41,6 \pm 7,8\%$ und $65,0 \pm 9,7\%$. Bei Letzteren Aufarbeitungen waren keine Verluste durch das Binden an Enzymproteine zu berücksichtigen, so dass diese auf hohe Analyt-Verluste allein bei der Festphasenextraktion hinwiesen. Da für die Gewebemengen von 17 β -Estradiol und Estron postmenopausaler Frauen zum Teil noch geringere Gehalte im Vergleich zur Prämenopause beschrieben sind (Thijssen und Blankenstein, 1989), war in Hinblick der Quantifizierung zu erwarten, dass 17 β -Estradiol und Estron aufgrund dieser hohen Analyt-Verluste und der ohnehin schon geringen Gehalte nicht in allen Gewebespenden zu erfassen sind.

Während die Wiederfindungen der Catechol-Estrogene nach sofortiger Aufarbeitung zwischen $175,0 \pm 64,2\%$ und $417,5 \pm 152,9\%$ schwankten, waren diese nach Temperaturbehandlung über Nacht beziehungsweise Enzymzusatz nicht mehr nachzuweisen. Es war daher von einer Oxidation des Standards während der Aufarbeitung auszugehen.

Bei der Überprüfung der Aufarbeitung auf generierte Artefakte war bereits nach der Gewebeeinkubation deuteriertes 2-Hydroxyestradiol nachweisbar, so dass die Inkubation bei 37°C über Nacht als kritischer Prozess-Schritt identifiziert wurde. Nach der Extraktion mit Chloroform waren deuterierte Catechol-Estrogene, ausgehend von deuteriertem 17 β -Estradiol beziehungsweise Estron, weder in der wässrigen- noch in der organischen Phase nachweisbar, so dass bei Entfettung des Gewebes gleichzeitig eine Inaktivierung oxidierender Enzyme erfolgte. Um eine Artefaktbildung während der Aufarbeitung zu vermeiden, musste die Extraktion daher vor der Inkubation erfolgen.

Zur Quantifizierung von 17 β -Estradiol, Estron sowie deren Metaboliten dienten zwei deuterierte Standardmischungen bestehend aus deuteriertem 17 β -Estradiol, 2-/4-Methoxyestradiol, 3-O-Methyl-2-/4-Hydroxyestradiol und 16- α -Hydroxyestradiol beziehungsweise deu-

teriertem Estron, 2-/4-Methoxyestron, 3-O-Methyl-2-Hydroxyestron, 16- α -Hydroxyestron, 2-/4-Hydroxyestradiol und -estron. Die Synthese der hydroxylierten und methylierten deuterierten Standards erfolgte im Arbeitskreis Lehmann, jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit. Über den gesamten Mess-Zeitraum resultierten für die einzelnen deuterierten Metabolite vergleichbare Peakflächen, so dass die Standardmischungen eine gleichbleibende Qualität aufzeigten.

Die Anwendbarkeit des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisses wurde für deuteriertes und undeuteriertes 17 β -Estradiol und Estron in Gegenwart von Gewebematrix bestätigt, da in Standardlösungen näherungsweise das gleiche Verhältnis resultierte. Bei zusätzlicher Verwendung der *Qualifier* war es zur vollständigen Erfassung des Metabolitenprofils in einer Gewebespende notwendig, alle *Quanti*- und *Qualifier* auf drei einzelne Mess-Methoden aufzuteilen. Bei Verwendung dieser drei *Qualifier*-integrierten Mess-Methoden resultierte eine kontinuierliche Abnahme zwischen den Peakflächen der *Quanti*- und *Qualifier* von deuteriertem und undeuteriertem 17 β -Estradiol und Estron, so dass für die Quantifizierung nur die Methode mit den intensiven *Quantifier*-Übergängen der Metabolite verwendet wurde.

Die Aufarbeitungsverluste der deuterierten Standardkomponenten variierten in Gegenwart von Gewebe zwischen 52,4% und 82,2%, was die Notwendigkeit von deuterierten internen Standards zeigte. Da bei Realproben ein starker Effekt von Matrixeinflüssen zu berücksichtigen ist, sind diese Verluste nicht allein auf den Einfluss der Festphasenextraktion zurückzuführen. Im Vergleich zur sofortigen Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion resultierten signifikant größere Analyt-Verluste für die deuterierten Analoga von Estron, 2-Methoxyestron, 3-O-Methyl-2-Hydroxyestron, 16- α -Hydroxyestron und 2-Methoxyestradiol wahrscheinlich infolge des hohen Fettgehaltes der Proben.

Während die Gehalte von 17 β -Estradiol von 0,23 bis 3,46 pmol/g Gewebe variierten, schwankten diese für Estron von 0,10 bis 9,93 pmol/g Gewebe. Vier beziehungsweise fünf der Proben lagen hinsichtlich der Gehalte für 17 β -Estradiol und Estron unterhalb der Nachweisgrenze (0,50 pmol/g Gewebe beziehungsweise 0,20 pmol/g Gewebe). Der mittlere Gehalt von Estron war mit 1,46 pmol/g Gewebe nahezu doppelt so hoch wie der von 17 β -Estradiol, wobei eine positive Korrelation zwischen den Gehalten von Estron und 17 β -Estradiol im Gewebe resultierte ($R = 0,516$). 2- und 4-Methoxyestron sowie 3-O-Methyl-2-Hydroxyestron wurden in allen beziehungsweise 14 Proben nachgewiesen. Die Gehalte berechneten sich auf $1,79 \pm 1,27$ pmol/g Gewebe und $3,26 \pm 2,86$ pmol/g Gewebe sowie $0,43 \pm 0,37$ pmol/g Gewebe. In den übrigen Proben resultierte für 3-O-Methyl-2-Hydroxyestron eine Nachweisgrenze von $< 1,81 \pm 0,90$ pmol/g Gewebe. Auch 2- und 4-Methoxyestradiol beziehungsweise Catechol-Estrogene wurden in keiner der Proben nachgewiesen. Für 2- und 4-Methoxyestradiol berechneten sich die Nachweisgrenzen auf $< 0,31 \pm 0,15$ pmol/g Gewebe sowie $< 0,28 \pm$

0,14 pmol/g Gewebe. Für die Catechol-Estrogene variierte diese zwischen $< 5,27 \pm 5,06$ pmol/g Gewebe und $< 20,60 \pm 10,45$ pmol/g Gewebe. Die ermittelten Gehalte von 17 β -Estradiol, Estron und den Methyl-Catecholen waren mit den bisher publizierten Daten der Gewebekonzentrationen von Estrogen-Metaboliten vergleichbar. Aufgrund dessen sowie infolge der niedrigen Nachweisgrenzen war die entwickelte Mess- und Aufarbeitungsmethode für die Quantifizierung von 17 β -Estradiol, Estron und deren Methyl-Catecholen ausreichend empfindlich genug. Nach Rogan et al. (2003) liegen die minimal zu erwartenden Gehalte für die Summe aus 2-Hydroxyestradiol und -estron beziehungsweise 4-Hydroxyestradiol und -estron mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und elektrochemischer Detektion durchschnittlich bei 0,3 pmol/g Gewebe und 0,7 pmol/g Gewebe. Für die Summe aus 16- α -Hydroxyestradiol und -estron liegt der Minimalgehalt durchschnittlich bei 1,6 pmol/g Gewebe. Im Vergleich dazu waren die berechneten Nachweisgrenzen der Catechol-Estrogene um den Faktor 18 bis 50 größer. Für den Nachweis und die Quantifizierung von Catechol-Estrogenen war die verwendete Mess-Methode daher nicht ausreichend empfindlich genug, so dass deren Anwendbarkeit für Catechol-Estrogene nicht bestätigt wurde.

Die Korrelationsanalysen verdeutlichten, dass die Gehalte von 17 β -Estradiol und Estron im Brustgewebe weder durch den Menopausalstatus noch durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder einer Hormonersatztherapie signifikant beeinflusst wurden. Zwischen dem *Body-Mass-Index* und dem Gehalt von 17 β -Estradiol wurde sowohl post- ($R = 0,262$) als auch prämenopausal ($R = 0,415$) eine positive, nicht signifikante Korrelation beobachtet. Letzterer Effekt war nach Literaturangaben nicht zu erwarten. Diesbezüglich geht ein hoher prämenopausaler *Body-Mass-Index* mit verringerten Estrogen-Gehalten einher und wird daher als protektiv hinsichtlich des Brustkrebsrisikos beschrieben (Hawighorst und Emons, 2006). Auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva führte in der Prämenopause zu einer positiven nicht signifikanten Korrelation ($R = 0,486$), so dass trotz der geringen Anzahl analysierter Gewebespenden der Einfluss des *Body-Mass-Index* und die Einnahme oraler Kontrazeptiva auf die Gehalte von 17 β -Estradiol in der prämenopausalen Frau deutlich wurden.

Die entwickelte Mess-Methode ermöglicht den routinemäßigen Einsatz für die Quantifizierung von freiem 17 β -Estradiol, Estron und deren Methyl-Catecholen in humanem Brustgewebe. Beim Vergleich der berechneten Nachweisgrenzen von Catechol-Estrogenen mit Literaturangaben wurde herausgestellt, dass empfindlichere flüssigchromatographische Methoden als Methode der Wahl bei deren Analytik heranzuziehen sind. Die Übertragung der in Standardlösungen durchgeführten Versuche zur enzymatischen Hydrolyse von Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten auf Gewebematrix stellt für weiterführende Arbeiten den entscheidenden Ansatzpunkt dar, um ein quantitatives Metabolitenprofil von freiem und gebundenem 17 β -Estradiol, Estron und den Metaboliten in Brustgewebe erstellen zu können.

7 SUMMARY

The aim of the present work was to develop a method for the quantification of free estradiol, estrone, catechol estrogens and methylation products in breast tissue. Due to trace amounts in the samples it was necessary to isolate the analytes from the sample matrix, purify and concentrate them prior to tissue extraction and solid phase extraction. Additionally, a sensitive method of measurement based on multi reaction monitoring using gas chromatography and triple quadrupole mass spectrometry was developed. The applicability of the sample preparation and measurement method was tested in 30 tissue samples by comparing the measured levels with published data concerning concentrations of estradiol, estrone and their metabolites in breast tissue. Also it was necessary to find possible correlations between the analytes concentrations and selected risk factors for breast cancer.

In order to develop a quantitative profile of estradiol, estrone and metabolites in tissue, qualifier and quantifier transitions were established using the multi reaction monitoring mode. By optimising the ionisation and collision energy, the initial, transferline and ion source temperatures and the dwell-time, it was possible to reduce the loss of sensitivity caused by both method and equipment and maximize the signal intensity of all quantifier transitions.

For the isolation, purification and concentration of the analytes a tissue extraction followed by a solid phase extraction was conducted. While catechol estrogens were not detected in the organic phase, following the hexane and the chloroform extraction, due to their low stability in acetonitrile, 16- α -hydroxyestradiol and 16- α -hydroxyestrone were found in the organic phase following the extraction with chloroform due to their greater polarity. Their recovery rate as well as that of estradiol, estrone and the methylation products varied between $22.5 \pm 4.1\%$ and $69.1 \pm 12.4\%$. Since the recovery rates varied between $33.3 \pm 17.2\%$ and $92.0 \pm 8.5\%$ after the chloroform extraction, the organic phase following chloroform extraction was used.

In order to measure estradiol of glucuronide- and sulfate conjugates in breast tissue as part of continuing research, we undertook some preliminary work in standard solutions with the help of model substrates, estradiol-3-glucuronid and estradiol-3-sulfate so as to fully split those conjugates. In doing so the free estradiol was analyzed via gas chromatography and detected with flame ionization detector. By using β -glucuronidase from *helix pomatia* and from bovine liver we reached a cleavage efficiency of $85.4 \pm 4.3\%$ or $84.6 \pm 4.3\%$ respectively for estradiol-3-glucuronid while it was $30.2 \pm 2.8\%$ for estradiol-3-sulfate with 50 U sulfatase from *helix pomatia*. By using freeze-dried sulfatase from *helix pomatia* it was possible to increase the sulfatase activity to 100 U per scale whereby the cleavage efficiency of estradiol-3-sulfate was nearly doubled. A complete competitive inhibition of 10.000 U β -glucuronidase from *helix pomatia* was achieved using 10 mM saccharinic acid-1.4-lacton and 100 mM saccharinic acid.

The recovery rate varied depending on incubation with β -glucuronidase or sulfatase for estradiol, estrone their methylcatechols and 16- α -hydroxyestradiol and -estrone between $28.6 \pm 15.6\%$ and $55.1 \pm 9.1\%$ or $34.4 \pm 6.5\%$ and $53.1 \pm 3.6\%$ accordingly. Following immediate sample preparation or a sample preparation post incubation without the addition of enzymes, the recovery rate was $52.5 \pm 14.4\%$ and $73.0 \pm 11.4\%$ or $41.6 \pm 7.8\%$ and $65.0 \pm 9.7\%$. During the latter sample preparation there was no loss of analytes caused by the binding of enzyme proteins, but due to the solid phase extraction alone. Since the amount of traceable estradiol and estrone in tissue of postmenopausal is significantly less in comparison to that of premenopausal women (Thijssen and Blankenstein, 1989), we did not expect to detect them in all the tissue samples due to the significant analyte loss and the already relatively low deposits.

While the recovery rate of the catechol estrogens was found to fluctuate between $175.0 \pm 64.2\%$ and $417.5 \pm 152.9\%$ following immediate sample preparation, it was not possible to still detect them after overnight heat treatment or the addition of enzymes. An oxidation of the standard during the sample preparation can therefore be the logical assumption.

Upon inspection of the prepared samples for generated artefacts it was discovered that deuterated 2-hydroxyestradiol was detectable shortly after the tissue incubation time. The overnight incubation at 37°C was therefore the critical step of the process. Following the extraction with chloroform, the deuterated catechol estrogens were not detectable neither in the aqueous nor in the organic phase. Thus, a simultaneous deactivation of oxidizing enzymes occurred during the defatting of the tissue.

Two deuterated standard mixtures consisting of deuterated estradiol, 2-/4-methoxyestradiol, 3-O-methyl-2-/4-hydroxyestradiol and 16- α -hydroxyestradiol or deuterated estrone, 2-/4-methoxyestrone, 3-O-methyl-2-hydroxyestrone, 16- α -hydroxyestrone, 2-/4-hydroxyestradiol and -estrone provided the basis for the quantification of estradiol, estrone and their metabolites. The synthesis of the hydroxylated and methylated deuterated standards was conducted within the Lehmann work group although not as part of this work. The peak areas of the single deuterated metabolites were comparable throughout the measurement period indicating thus the quality of the standard mixture. The usability of the quantifier/qualifier ratio for deuterated and undeuterated estradiol and estrone in proximity to the tissue matrix was confirmed due to the ratio being approximately the same as part of a standard solution. With additional application of the qualifier it was necessary to subdivide all quantifier and qualifier into three methods of measurement in order to completely record the metabolite profile within the tissue matrix. As a result of those three qualifier-integrated methods we observed a continuous decrease among the peak areas of the qualifier and quantifier from deuterated and

undeuterated estradiol and estrone. This led to the conclusion to only use the method with intensive quantifier transition for the quantification.

The recovery rate of the deuterated standard components varied in proximity to the tissue between $17.8 \pm 15.2\%$ and $47.6 \pm 17.7\%$. Because actual tissue samples are subject to the effects of matrix influences those deficiencies cannot be attributed to the effects of the solid phase extraction alone. In comparison to immediate sample preparation using solid phase extraction the loss of analytes was significantly higher for the deuterated analogs from estrone, 2-methoxyestrone, 3-O-methyl-2-hydroxyestrone, 16- α -hydroxyestrone and 2-methoxyestradiol. This is probably due to the greater fat deposits in the samples.

While the levels of estradiol fluctuated between 0.23 and 3.46 pmol/g tissue, estrone levels varied between 0.10 to 9.93 pmol/g tissue. In 4 or rather 5 of the samples the levels of estradiol and estrone were below the limit of detection (0.50 and 0.20 pmol/g tissue respectively). Though the average levels of estrone were almost twice as high as those of estradiol at 1.46 pmol/g tissue, the result was a positive correlation to the levels of estrone and estradiol in the tissue ($R = 0.516$). 2- and 4-methoxyestrone and 3-O-methyl-2-hydroxyestrone were detected in all or in 14 samples. The levels calculated were 1.79 ± 1.27 pmol/g tissue and 3.26 ± 2.86 pmol/g tissue plus 0.43 ± 0.37 pmol/g tissue. The remaining samples contained levels of $< 1.81 \pm 0.90$ pmol/g tissue for 3-O-methyl-2-hydroxyestrone. Neither 2- and 4-methoxyestradiol nor catechol estrogens were identified in any of the samples. The calculated detection levels for 2-methoxyestradiol were $< 0.31 \pm 0.15$ pmol/g tissue and $< 0.28 \pm 0.14$ pmol/g tissue for 4-methoxyestradiol. For catechol estrogens these varied between $< 5.27 \pm 5.06$ pmol/g tissue and $< 20.60 \pm 10.45$ pmol/g tissue. The identified levels of estradiol, estrone and their methylcatechols were comparable to the published data concerning the concentration of estrogen-metabolites in tissue. Due to the low detection levels, the developed measurement and sample preparation method was considered sensitive enough for the quantification of estradiol, estrone and methylcatechols. According to Rogan et al. (2003) the minimum expected levels of the sum of 2-hydroxyestradiol and -estrone, 4-hydroxyestradiol and -estrone, using high performance liquid chromatography and electrochemical detection, are on average 0.3 pmol/g tissue and 0.7 pmol/g tissue. The minimum levels for the sum of 16- α -hydroxyestradiol and -estrone are on average 1.6 pmol/g tissue. In comparison, the detection levels for catechol-estrogens were 18 to 50 factors higher. The applied measurement method was not sensitive enough for the detection and the quantification of catecholestrogens. Hence, the applicability of this method for catechol estrogens in particular was not satisfactory.

The correlation analyze clarifies that the levels of estradiol and estrone in breast tissue were not significantly influenced either by the emergence of the menopause nor the intake of oral contraceptives or the treatment with hormone replacement therapy. A positive, not entirely

significant, correlation between the body mass index and the levels of estradiol was observed in both the pre ($R = 0.415$) and post ($R = 0.262$) menopausal state. The latter was not entirely expected based on literature and published research. Consequently, a higher body mass index in premenopausal women is proportional to lower levels of estrogens and can therefore be described as protective in relation to the risk of developing breast cancer (Hawighorst und Emons, 2006). Even the intake of oral contraceptives led to a positive, non-significant correlation ($R = 0.486$) meaning that despite the low number of sample tissue investigated, it was evident that both the body mass index and oral contraceptives have some influence on the levels of estradiol in premenopausal women.

The developed measurement method enabled a routine usage for the quantification of free estradiol, estrone and methylcatechols in human breast tissue. The comparison between the calculated detection levels of catechol estrogens and the published data led to the conclusion that liquid chromatographic methods are more sensitive. The transference of these methods and experiments conducted, such as for the enzymatic hydrolysis of glucuronide- and sulfate-conjugates on tissue matrix in standard solution, seem to offer a starting point for future research projects. Especially, for the purpose of establishing a quantitative metabolite profile of free and conjugated estradiol, estrone and their metabolites.

8 ANHANG

Optimierung der Ionisierungsenergie von E1 und E2-Metaboliten

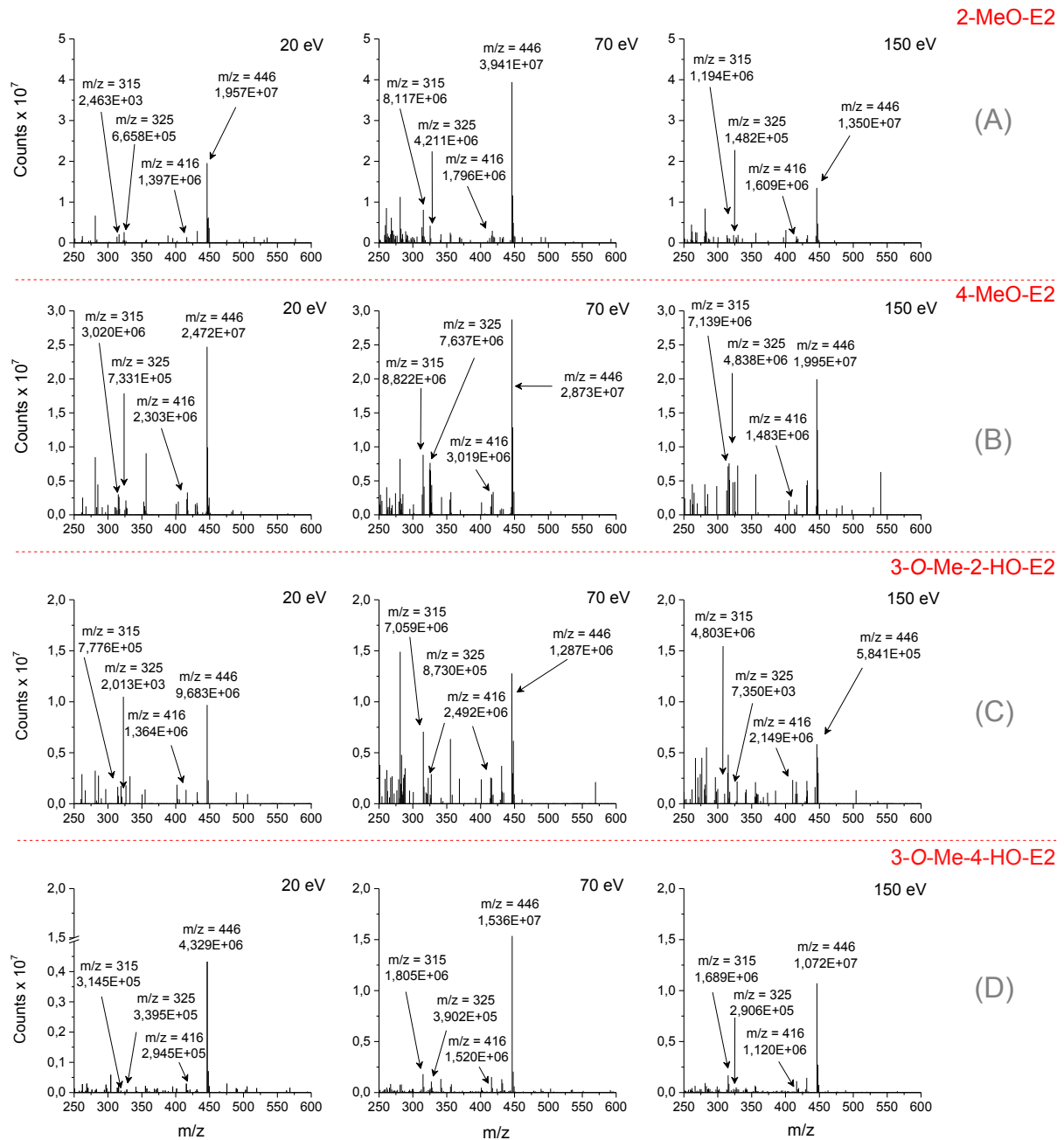


Abb. 67: Fullscan-Chromatogramme der TMS-Derivate von 2-MeO-E2 (A), 4-MeO-E2 (B), 3-O-Me-2-HO-E2 (C) und 3-O-Me-4-HO-E2 (D) aufgenommen im Intervall von $m/z = 250 - 600$ (*dwell-time*: 0,3 sec.). Analyse mittels GC/MS/MS bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV; $m_{\text{Analyten/Säule}} = 500 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Fragmente; $m/z = 446$, $m/z = 315$, $m/z = 325$ und $m/z = 416$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

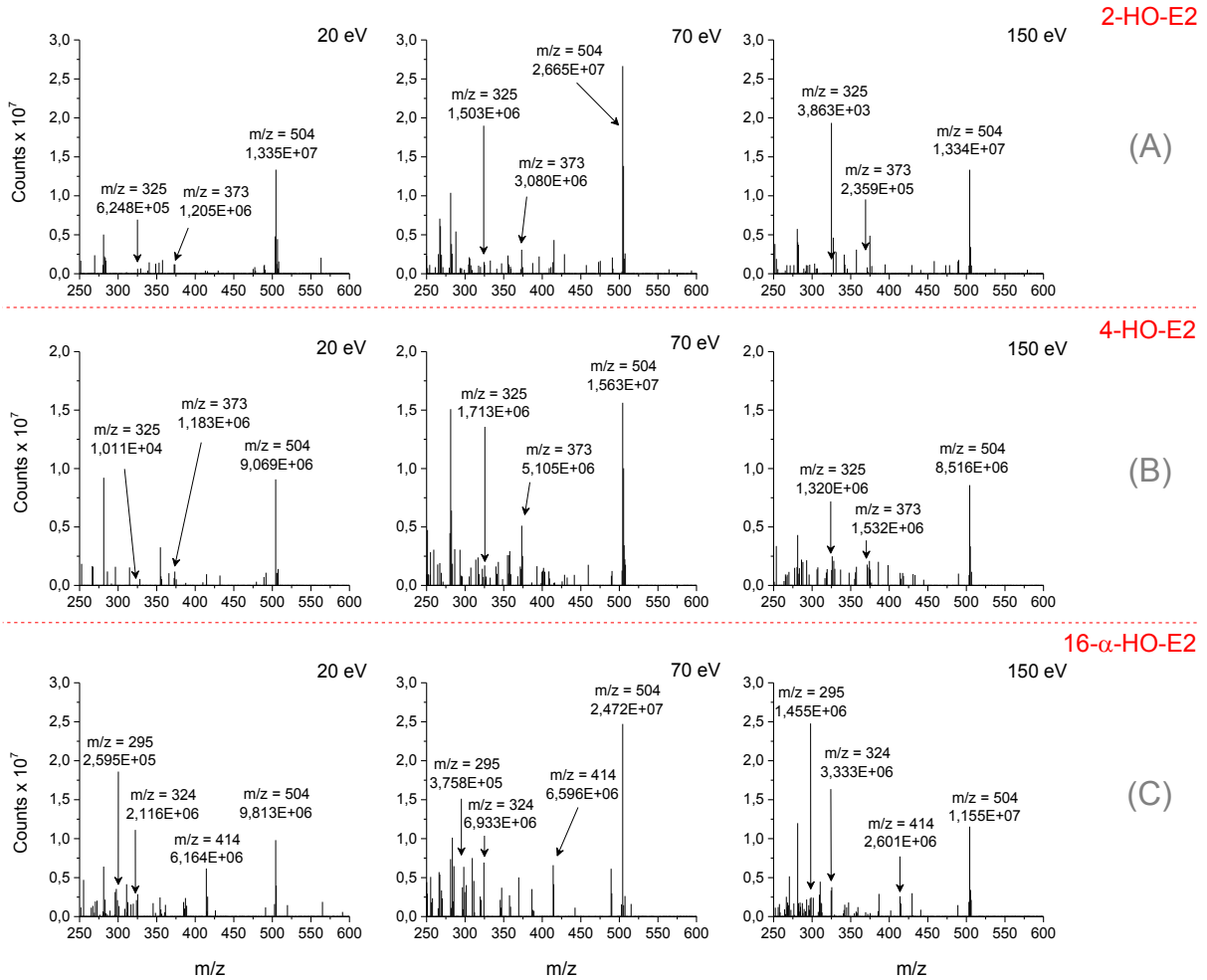


Abb. 68: *Fullscan*-Chromatogramme der TMS-Derivate von 2-HO-E2 (A), 4-HO-E2 (B) und 16- α -HO-E2 (C) aufgenommen im Intervall von $m/z = 250 - 600$ (*dwell-time*: 0,3 sec.). Analyse mittels *GC/MS/MS* bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV; $m_{\text{Analyten/Säule}} = 500$ μg . Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Fragmente; $m/z = 504$, $m/z = 325$ und $m/z = 373$ für 2-/4-HO-E2 und $m/z = 504$, $m/z = 414$, $m/z = 324$ und $m/z = 295$ für 16- α -HO-E2. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

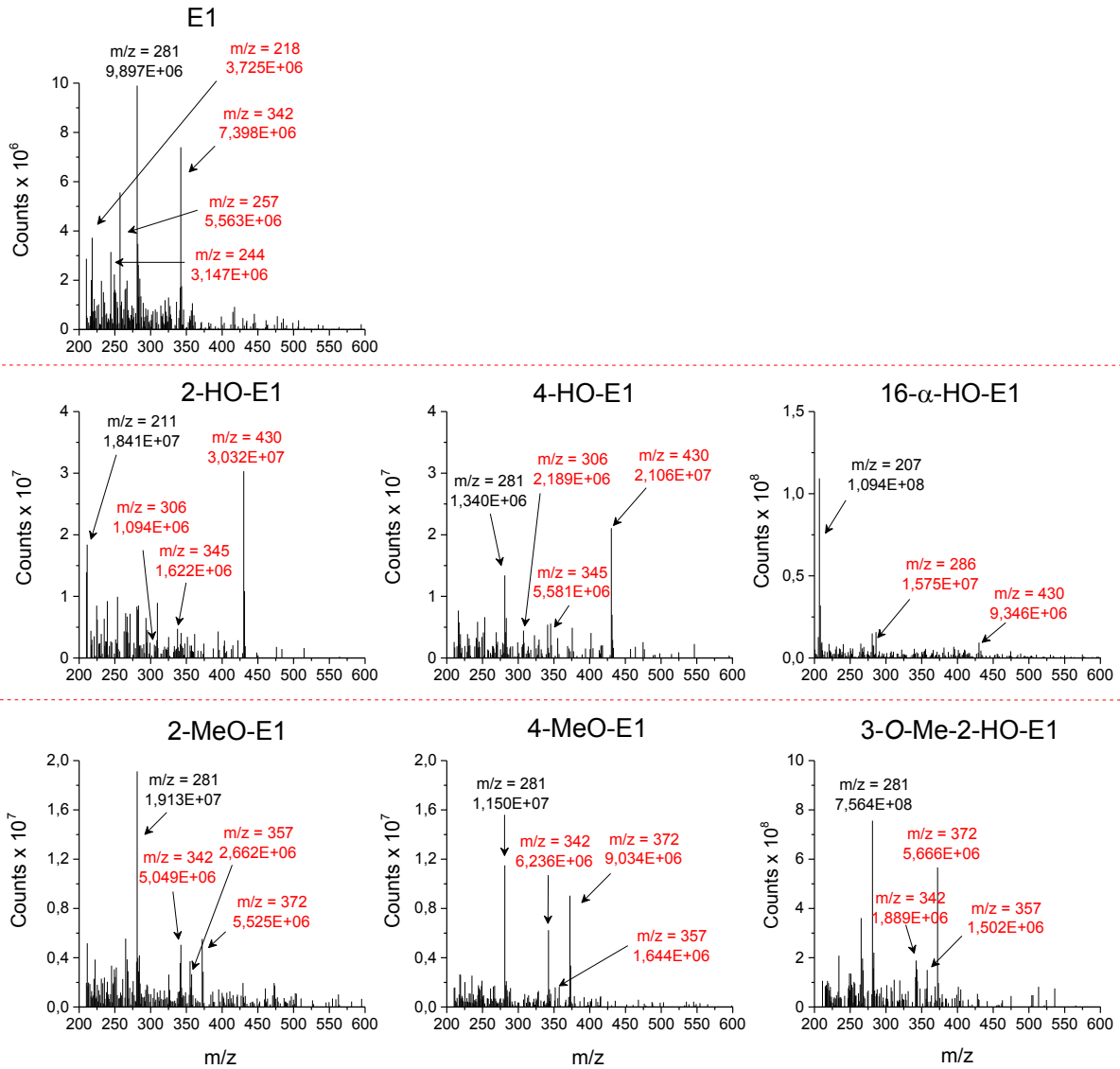


Abb. 69: Fullscan-Chromatogramme der TMS-Derivate von E1 (oben), E1-Hydroxylierungsprodukten (Mitte) und E1-Methylierungsprodukten (unten) aufgenommen im Intervall von $m/z = 250 - 600$ (*dwell-time*: 0,3 sec.). Analyse mittels GC/MS/MS bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV; m Analyten/Säule = 100 pg beziehungsweise 10 pg für 16- α -HO-E1. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Fragmente (rot hervorgehoben); $m/z = 342$, $m/z = 257$, $m/z = 244$ und $m/z = 218$ für E1 und $m/z = 430$, $m/z = 345$ und $m/z = 306$ für 2-/4-HO-E1 sowie $m/z = 430$ beziehungsweise $m/z = 286$ für 16- α -HO-E1 und $m/z = 372$, $m/z = 357$ sowie $m/z = 342$ für 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

ANHANG

Tab. 40: Absoluten PF (Counts) des M⁺ sowie charakteristischer Fragmente von E2-Metaboliten bei einer Ionisierungsenergie von 20 eV, 70 eV und 150 eV; m_{Analyt/Säule} = 500 pg. Injektionsvolumen: 1 µl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Analyt	M ⁺		charakteristische m/z		Ionisierungsenergie (eV)
	absolute PF (Counts)				
2-MeO-E2	446	416	315	325	20 70 150
	19.570.000	1.397.000	2.463	665.787	
	39.410.000	1.796.000	8.117.000	4.211.000	
4-MeO-E2	446	416	315	325	20 70 150
	24.720.000	2.303.000	3.020.000	733.125	
	28.730.000	3.019.000	8.822.000	7.637.000	
3-O-Me-2-HO-E2	446	416	315	325	20 70 150
	9.683.000	1.364.000	776.125	2.013	
	12.870.000	2.492.000	7.059.000	873.025	
3-O-Me-4-HO-E2	446	416	315	325	20 70 150
	4.329.000	294.500	314.480	33.950	
	15.360.000	1.520.120	1.805.000	390.220	
2-HO-E2	504	325	373		20 70 150
	13.350.000	624.787	1.205.000		
	26.650.000	1.503.000	3.080.000		
4-HO-E2	504	325	373		20 70 150
	9.069.000	10.110	1.183.000		
	15.630.000	1.713.000	5.105.000		
16-α-HO-E2	504	295	324	414	20 70 150
	9.813.000	259.538	2.116.000	6.164.000	
	24.720.000	3.758.000	6.933.000	6.596.000	
	11.550.000	1.455.000	3.333.000	2.601.000	

Tab. 41: Absolute PF (Counts) des M⁺ sowie charakteristischer Fragmente von E1-Metaboliten bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV; m_{Analyt/Säule} = 100 pg beziehungsweise 10 pg für 16-α-HO-E1 = 10 pg. Injektionsvolumen: 1 µl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Analyt	M ⁺		charakteristische m/z	
	absolute PF (Counts)			
E1	342	357	244	218
	7.398.000	5.563.000	3.147.000	3.725.000
2-MeO-E1	372	357	342	
	5.525.000	2.662.000	5.049.000	
4-MeO-E1	9.034.000	1.644.000	6.236.000	
3-O-Me-2-HO-E1	5.666.000	1.502.000	1.889.000	
2-HO-E1	430	345	306	
	30.320.000	1.622.000	1.094.000	
4-HO-E1	21.060.000	5.581.000	2.189.000	
16-α-HO-E1	430	286		
	9.346.000	15.750.000		

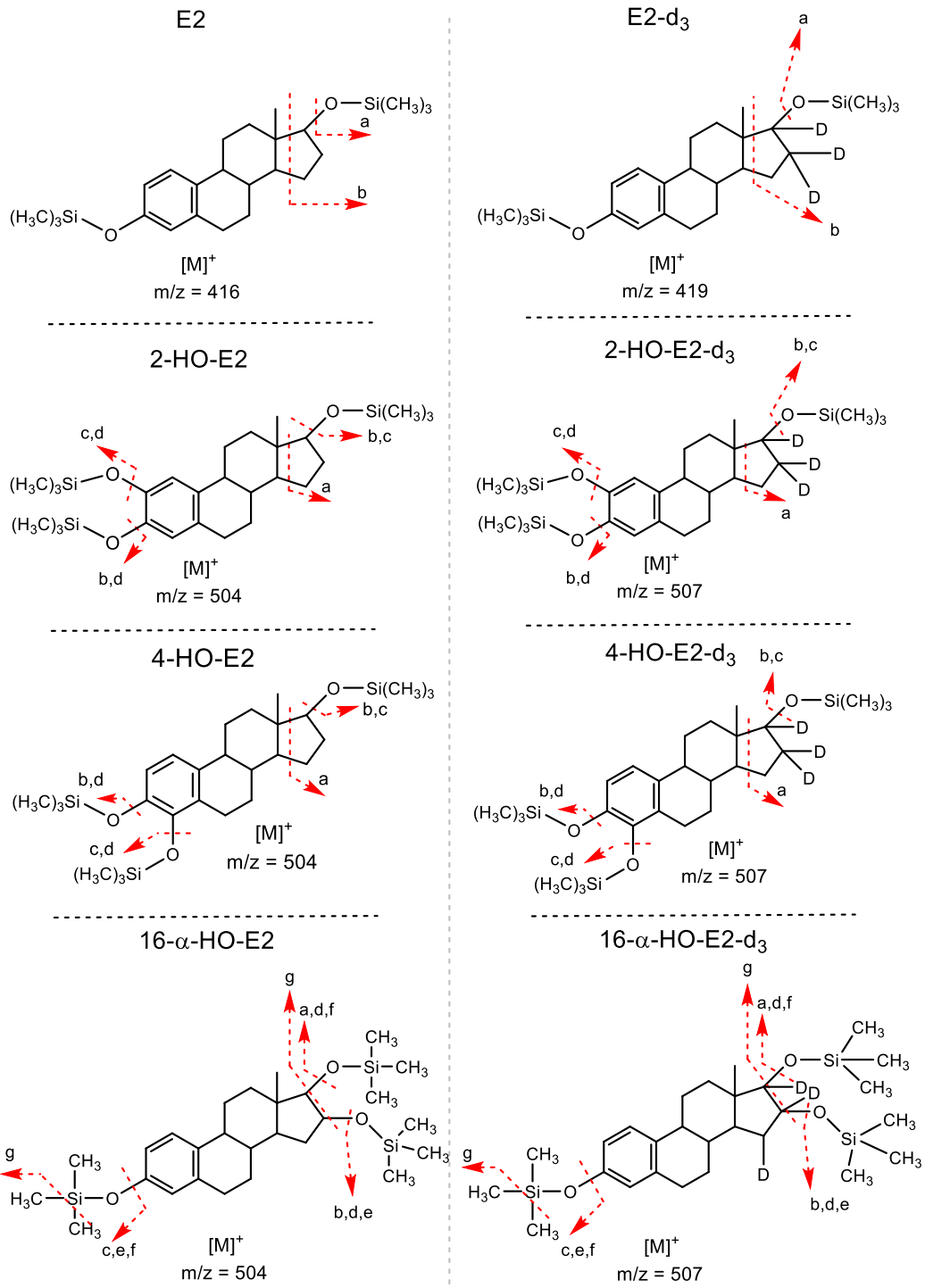


Abb. 70: Mögliche Fragmentierungspositionen der TMS-Derivate von E2, E2-Hydroxylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Tab. 42: Mögliche Fragmente beziehungsweise Massenübergänge der TMS-Derivate von E2, E2-Hydroxylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Analyt	Fragmentierungsposition	m/z	Δ (DA)	Fragment
E2	a	326	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	b	285	131	$[M-(CH_3)_3Si-O-C_6H_{14}]^+$
E2-d ₃	a	329	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	b	285	133	$[M-(CH_3)_3Si-O-D_3-C_6H_{14}]^+$
2-/4-HO-E2	a	373	130	$[M-(CH_3)_3Si-O-C_6H_{14}]^+$
	b	325	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	c	325	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	d	325	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
2-/4-HO-E2-d ₃	a	373	133	$[M-(CH_3)_3Si-O-D_3-C_6H_{14}]^+$
	b	328	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	c	328	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	d	328	179	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
16- α -HO-E2	a	414	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	b	414	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	c	414	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	d	324	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	e	324	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	f	324	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	g	295	210	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH+C_2H_6]^+$
16- α -HO-E2-d ₃	a	417	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	b	417	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	c	417	90	$[M-(CH_3)_3Si-OH]^+$
	d	327	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	e	327	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	f	327	180	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH]^+$
	g	295	210	$[M-2x(CH_3)_3Si-OH+C_2H_6]^+$

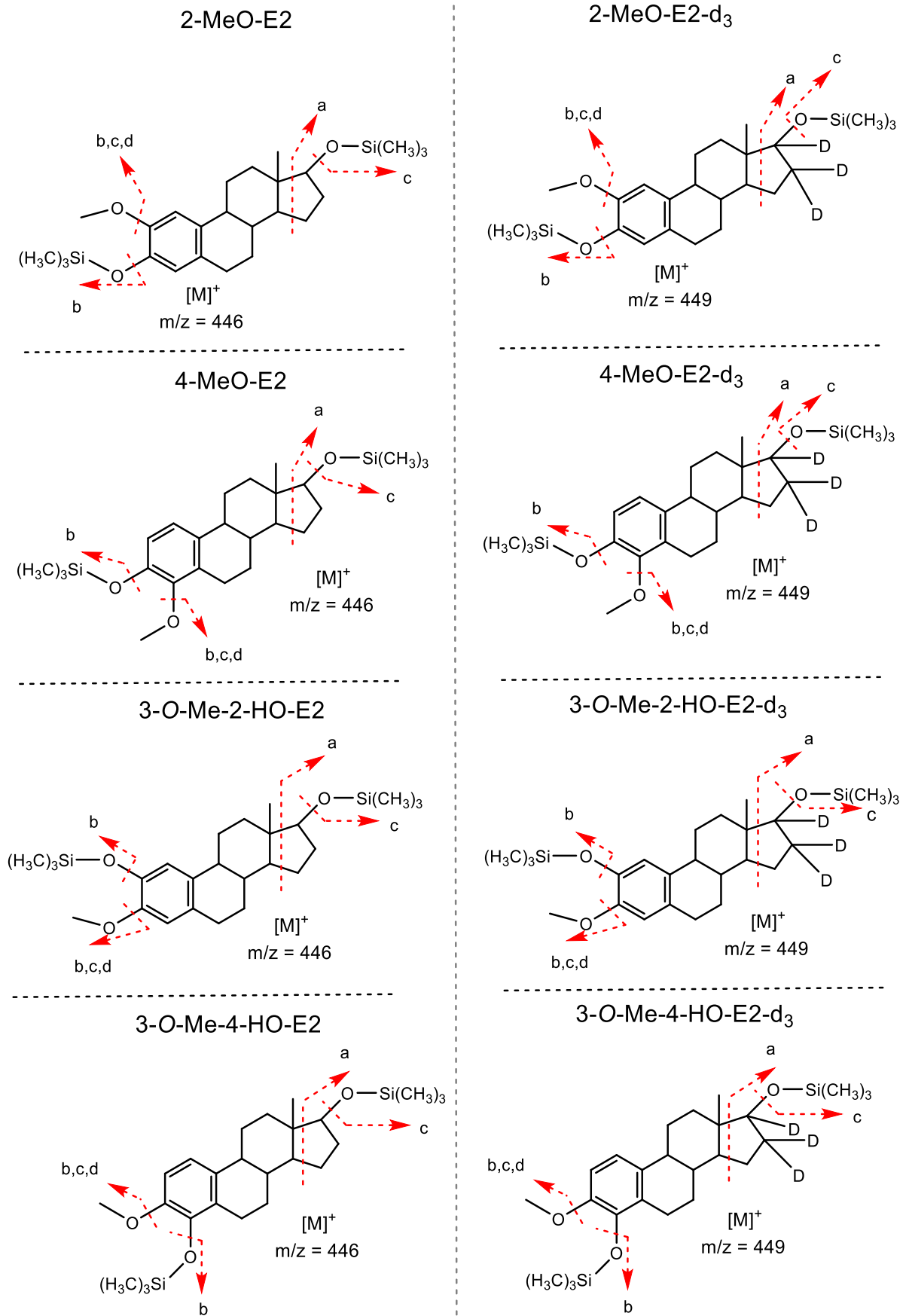


Abb. 71: Mögliche Fragmentierungspositionen der TMS-Derivate von E2-Methylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Tab. 43: Mögliche Fragmente beziehungsweise Massenübergänge der TMS-Derivate von E2-Methylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Analyt	Fragmentierungsposition	m/z	Δ (DA)	Fragment
2-/4-MeO-E2	a	315	130	$[M-(CH_3)_3Si-O-C_6H_{14}]^+$
sowie	b	325	121	$[M-(CH_3)_3Si-OH-CH_3O]^+$
3-O-Me-2-/4-HO-E2	c	325	121	$[M-(CH_3)_3Si-OH-CH_3O]^+$
	d	416	30	$[M-CH_3O]^+$
2-/4-MeO-E2-d ₃	a	315	133	$[M-(CH_3)_3Si-O-D_3-C_6H_{14}]^+$
sowie	b	328	121	$[M-(CH_3)_3Si-OH-CH_3O]^+$
3-O-Me-2-/4-HO-E2-d ₃	c	328	121	$[M-(CH_3)_3Si-OH-CH_3O]^+$
	d	419	30	$[M-CH_3O]^+$

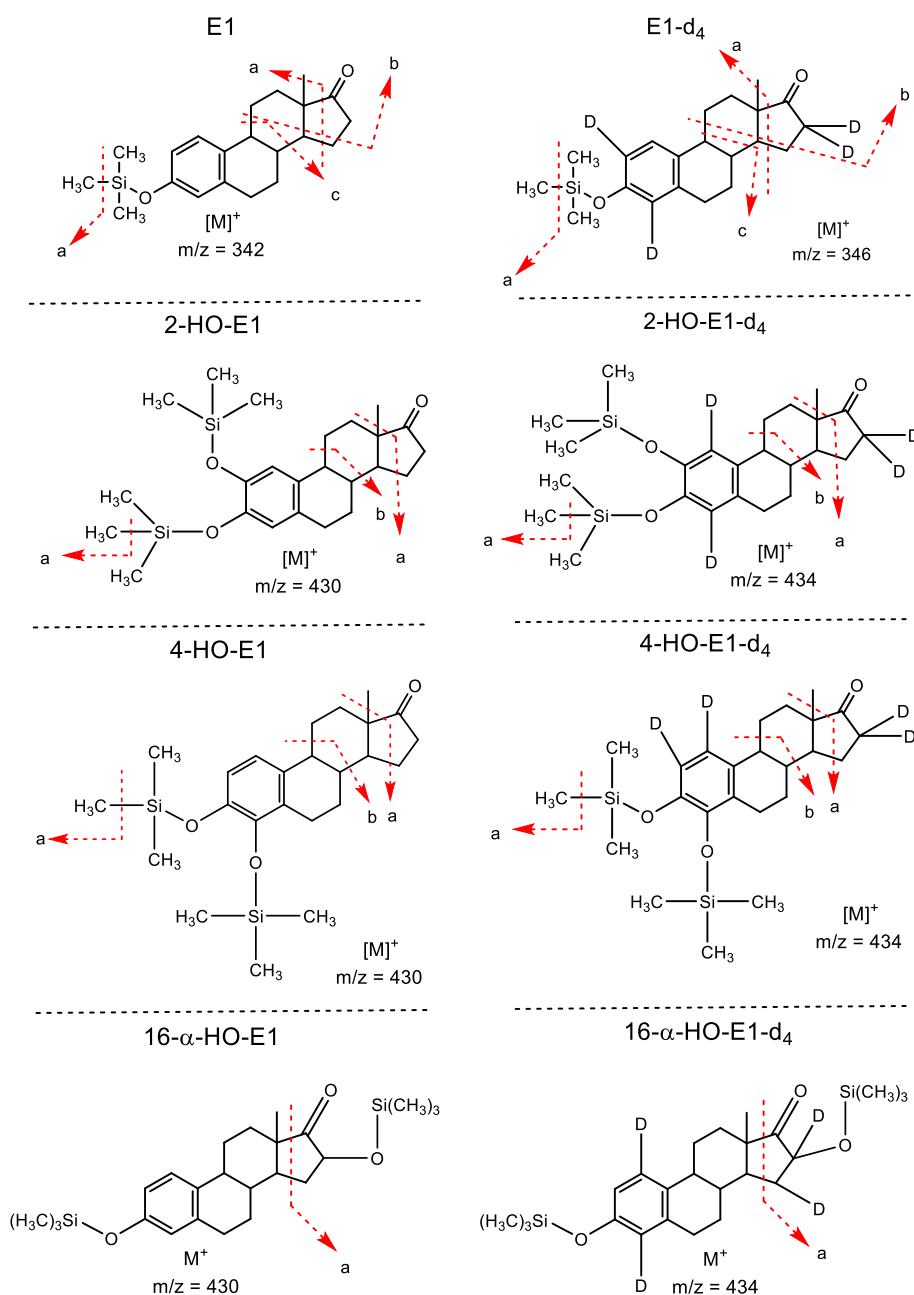


Abb. 72: Mögliche Fragmentierungspositionen der TMS-Derivate von E1, E1-Hydroxylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Tab. 44: Mögliche Fragmente beziehungsweise Massenübergänge der TMS-Derivate von E1, E1-Hydroxylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Analyt	Fragmentierungsposition	m/z	Δ (DA)	Fragment
E1	a	257	85	$[M-C_3H_4-O-2(CH_3)]^+$
	b	244	98	$[M-C_6H_9-O]^+$
	c	218	124	$[M-C_8H_{12}-O]^+$
E1-d ₄	a	261	85	$[M-C_3H_4-O-D_2-2(CH_3)]^+$
	b	246	100	$[M-D_2-C_6H_9-O]^+$
	c	220	126	$[M-D_2-C_8H_{12}-O]^+$
2-/4-HO-E1	a	345	85	$[M-C_3H_4-O-2(CH_3)]^+$
	b	306	124	$[M-C_8H_{12}-O]^+$
2-/4-HO-E2-d ₄	a	345	89	$[M-C_3H_4-O-D_2-2(CH_3)]^+$
	b	308	126	$[M-C_8H_{12}-D_2-O]^+$
16- α -HO-E1	a	286	144	$[M-(CH_3)_3-Si-O-C_6-H_{12}-O]^+$
16- α -HO-E2-d ₄	a	286	148	$[M-(CH_3)_3-Si-O-D_2-C_6-H_{12}-O]^+$

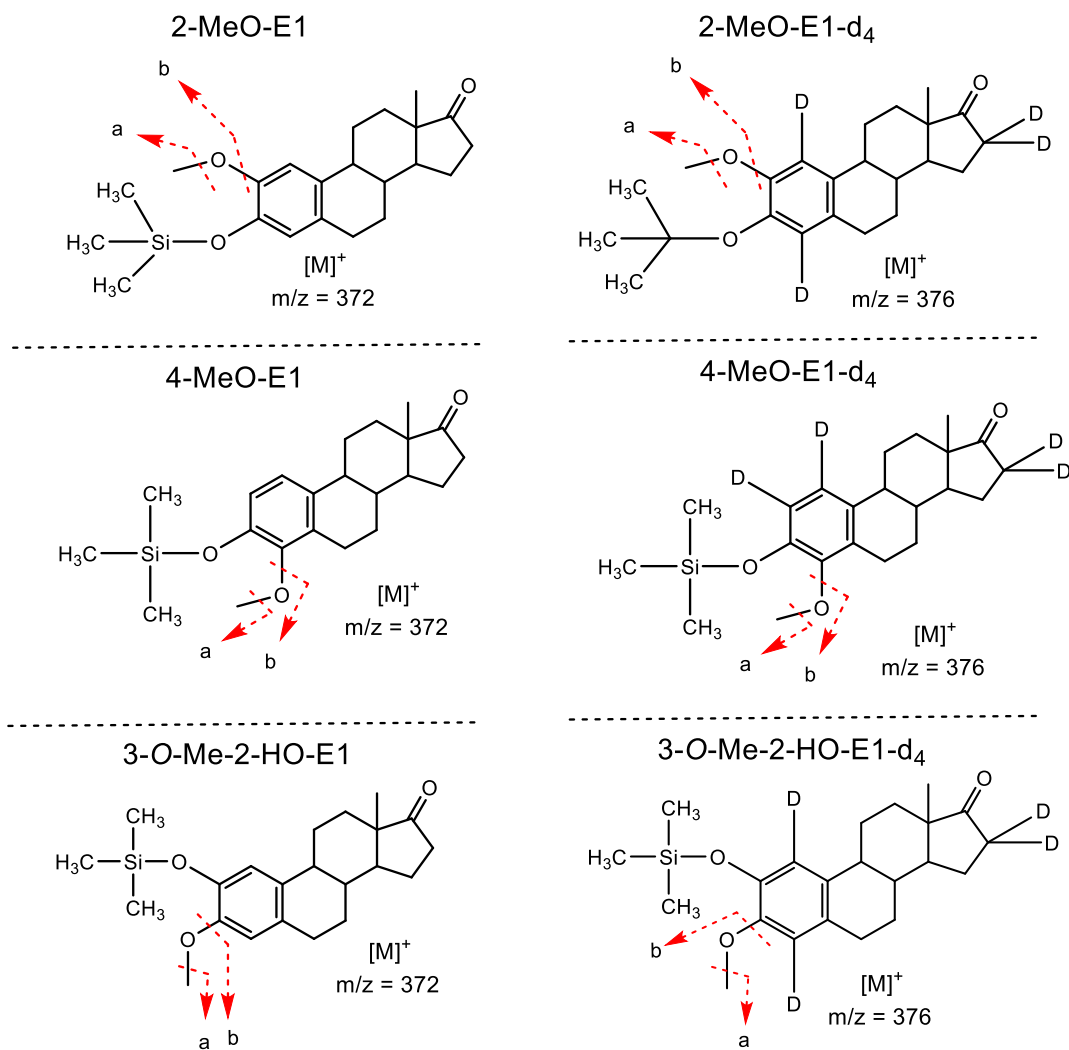


Abb. 73: Mögliche Fragmentierungspositionen der TMS-Derivate von E1-Methylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Tab. 45: Mögliche Fragmente beziehungsweise Massenübergänge der TMS-Derivate von E2-Methylierungsprodukten und den entsprechenden deuterierten Analoga.

Analyt	Fragmentierungsposition	m/z	Δ (DA)	Fragment
2-/4-MeO-E1	a	357	15	$[M-CH_3]^+$
sowie				
3-O-Me-2-HO-E1	b	342	30	$[M-CH_3O]^+$
2-/4-MeO-E1-d ₄	a	361	15	$[M-CH_3]^+$
sowie				
3-O-Me-2-HO-E1	b	346	30	$[M-CH_3O]^+$

Bestimmung der charakteristischen Tochterfragmente von E1- und E2-Metaboliten

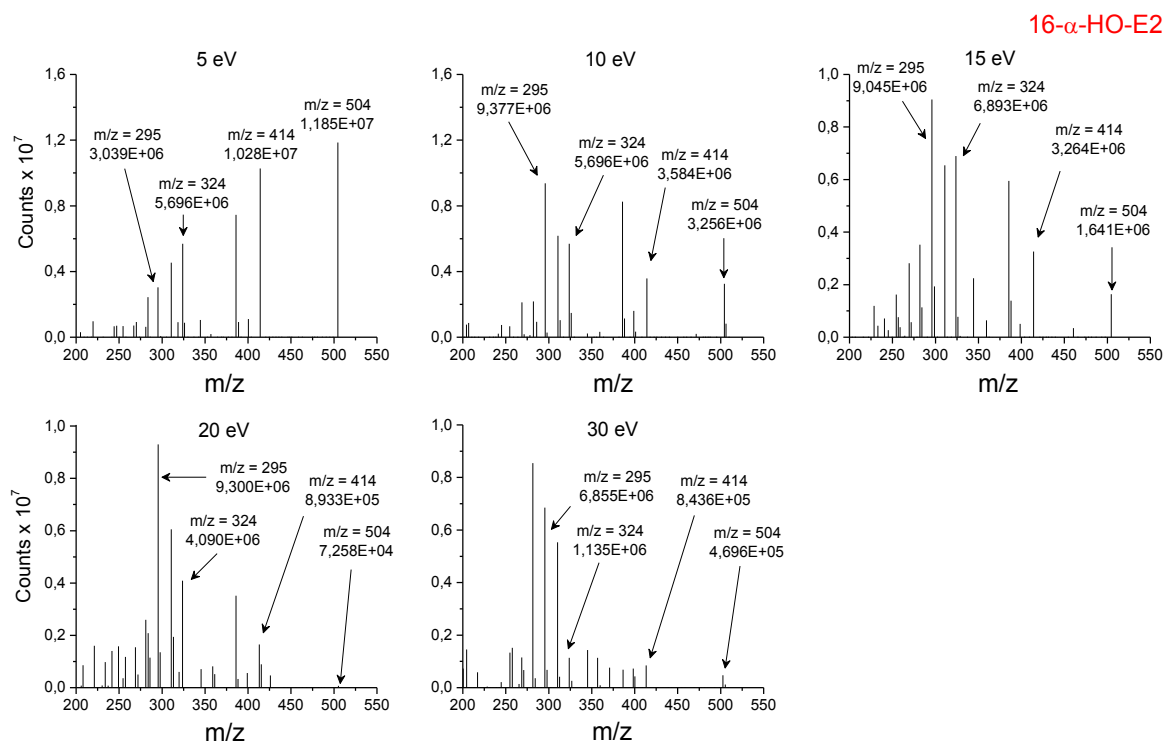


Abb. 74: Produktionspektren von 16- α -HO-E2 aufgenommen im Intervall von m/z = 504 > 200 - 450 (*dwell-time*: 0,5 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 100 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente m/z = 324, m/z = 414 und m/z = 295 sowie das *Precursorion* m/z = 504. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

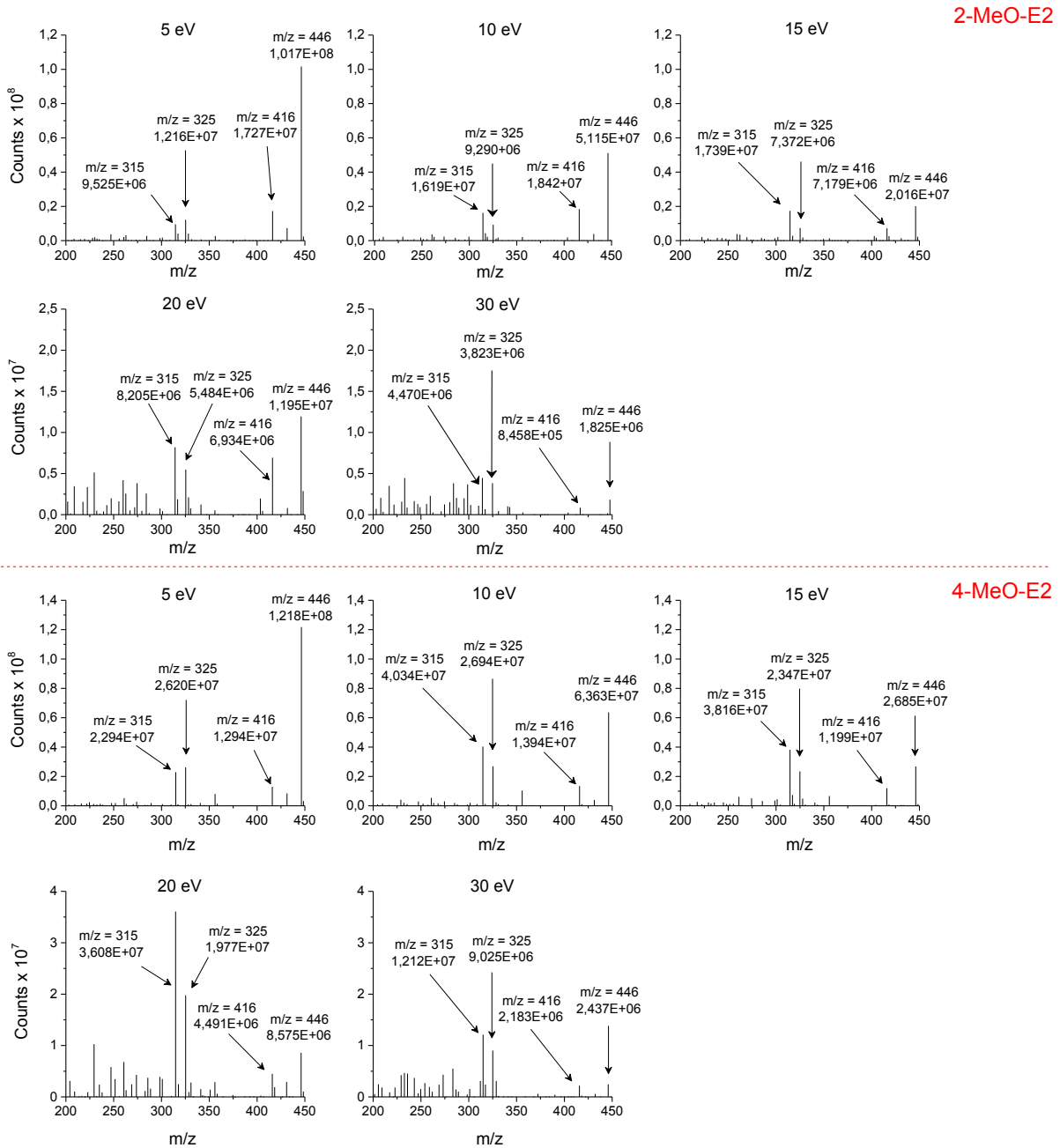


Abb. 75: Produktionspektren von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 aufgenommen im Intervall von $m/z = 446 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,5 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 100 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 315$, $m/z = 325$ und $m/z = 416$ sowie das *Precursorion* $m/z = 446$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

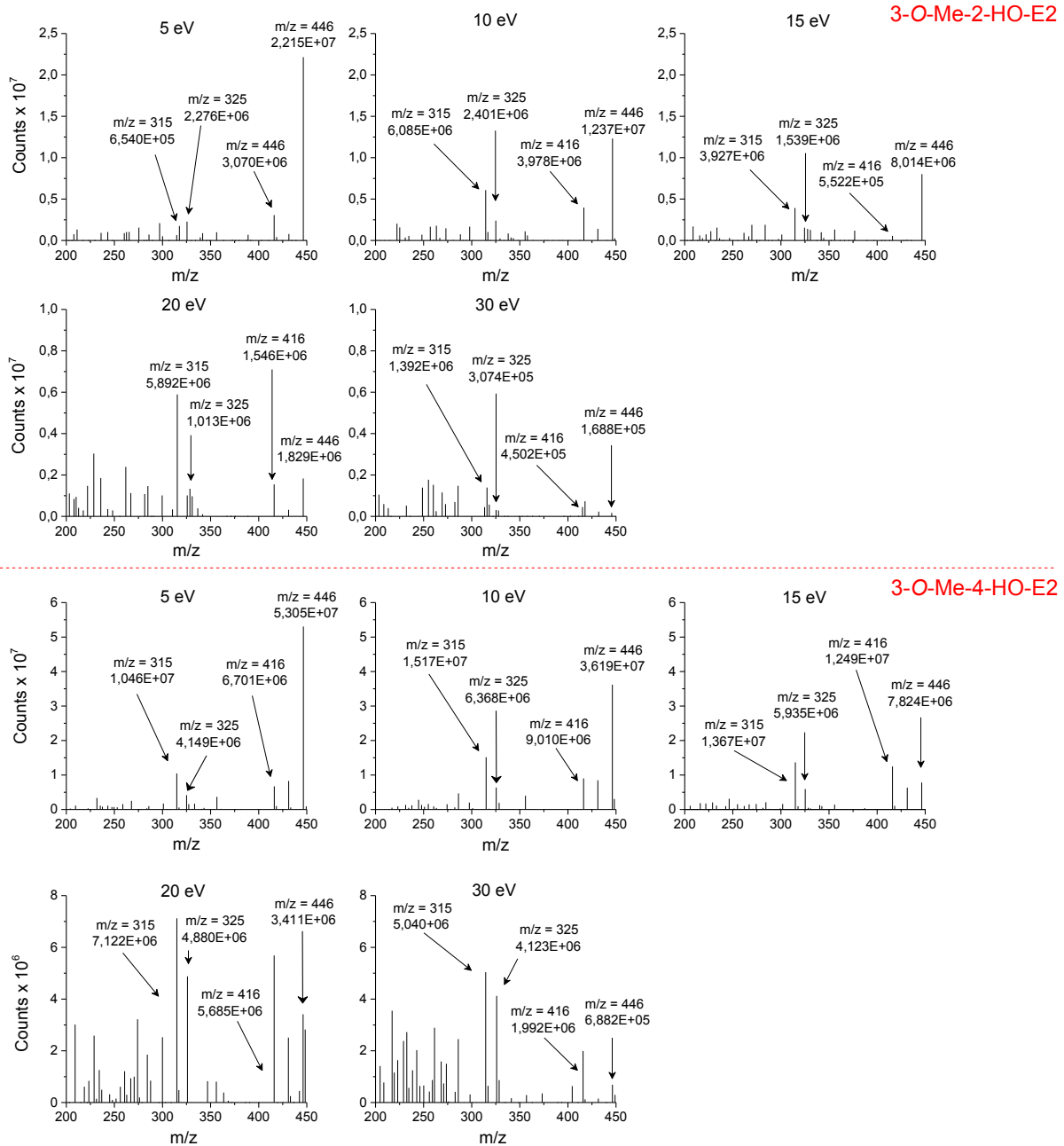


Abb. 76: Produktionspektren von 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 aufgenommen im Intervall von $m/z = 446 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,5 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 100 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 315$, $m/z = 325$ und $m/z = 416$ sowie das *Precursorion* $m/z = 446$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

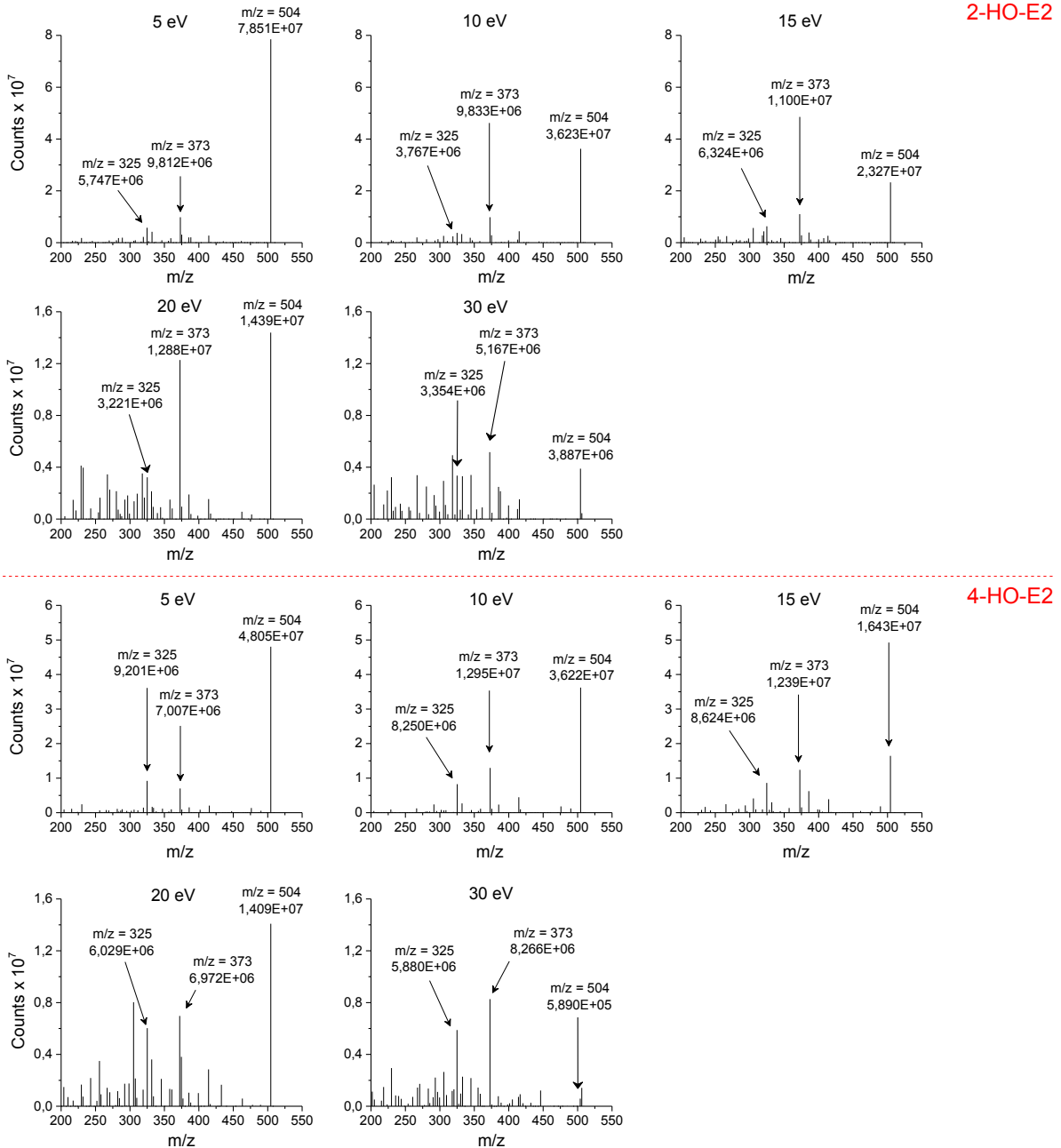


Abb. 77: Produktionspektren von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 aufgenommen im Intervall von $m/z = 504 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,5 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 100 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 325$, $m/z = 373$ und $m/z = 416$ sowie das *Precursorion* $m/z = 504$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E1

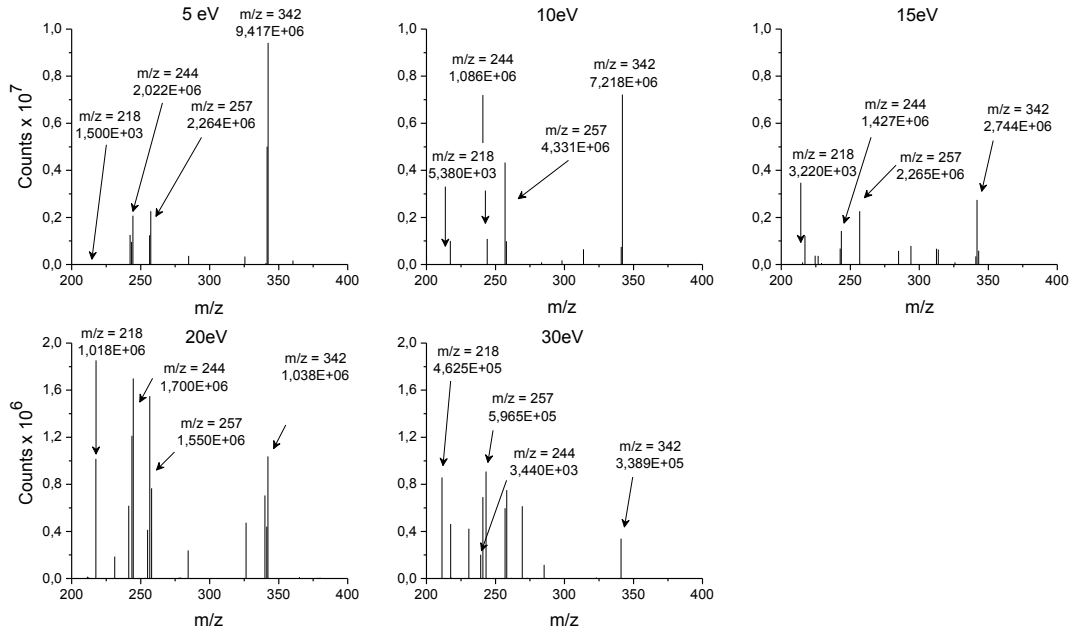


Abb. 78: Produktionspektren von E1 aufgenommen im Intervall von $m/z = 342 > 200 - 380$ (*dwell-time*: 0,25 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 257$, $m/z = 244$ und $m/z = 218$ sowie das *Precursorion* $m/z = 342$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

16- α -HO-E1

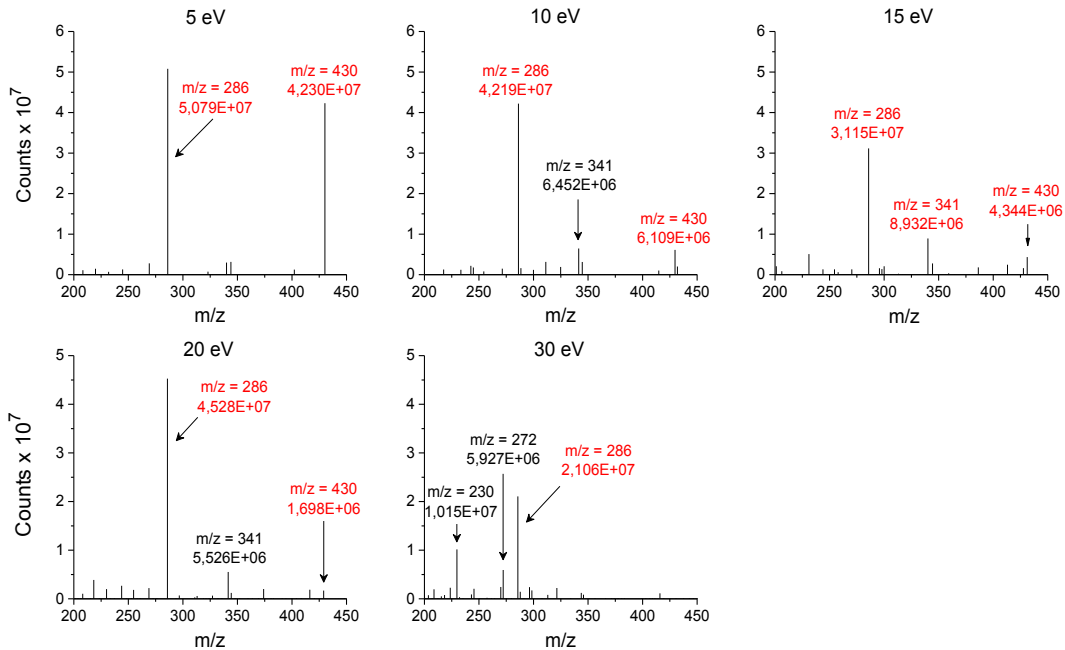


Abb. 79: Produktionspektren von 16- α -HO-E1 aufgenommen im Intervall von $m/z = 430 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,25 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 100 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PS der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 286$ sowie das *Precursorion* $m/z = 430$ (rot hervorgehoben). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

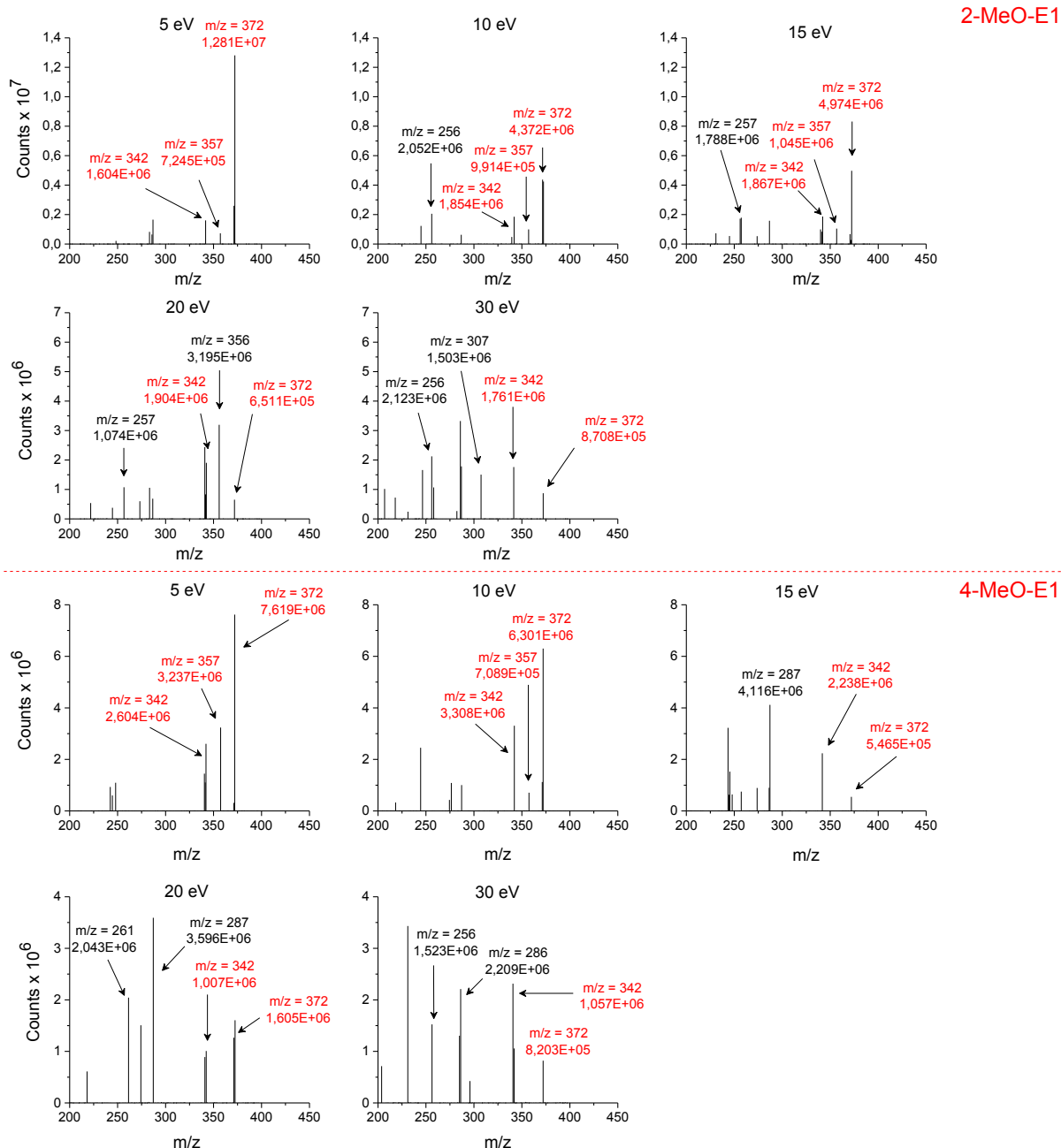


Abb. 80: Produktionspektren von 2-MeO-E1 und 4-MeO-E1 aufgenommen im Intervall von $m/z = 372 > 200 - 380$ (*dwell-time*: 0,25 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 342$ und $m/z = 357$ sowie das *Precursorion* $m/z = 372$ (rot hervorgehoben). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

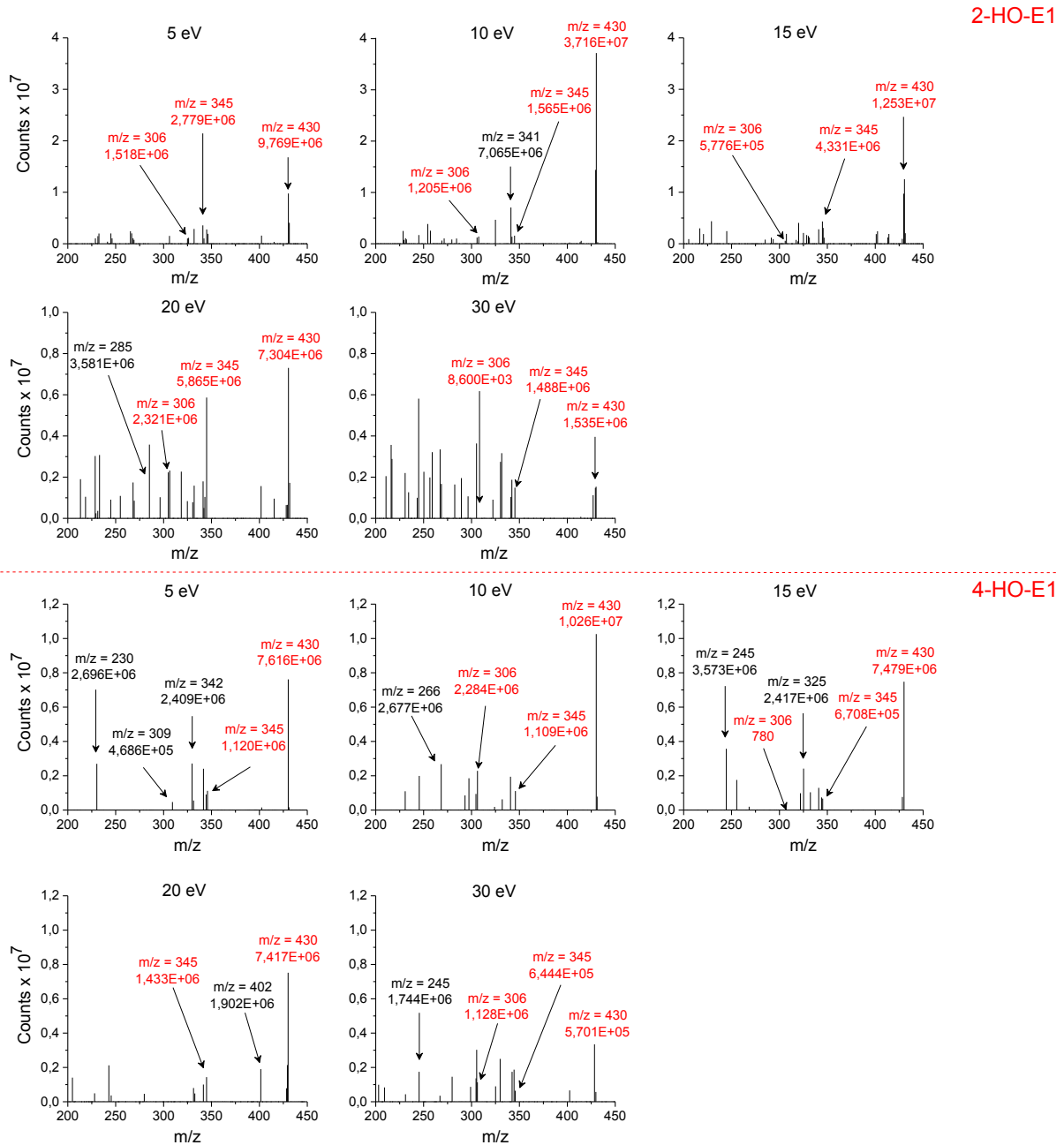


Abb. 81: Produktionspektren von 2-HO-E1 und 4-HO-E1 aufgenommen im Intervall von $m/z = 430 > 200 - 450$ (*dwell-time*: 0,25 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 50$ pg. Injektionsvolumen: 1 μ l. Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 345$ und $m/z = 306$ sowie das *Precursorion* $m/z = 430$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

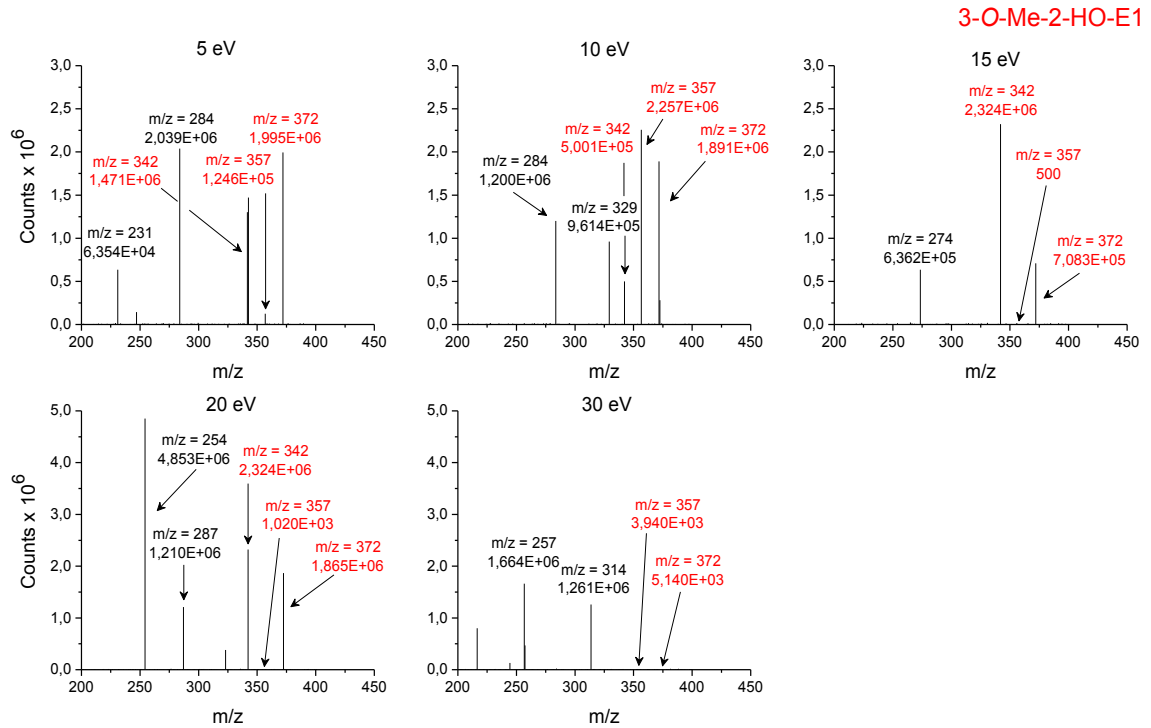


Abb. 82: Produktionspektren von 3-O-Me-2-HO-E1 aufgenommen im Intervall von $m/z = 372 > 200 - 380$ (*dwell-time*: 0,25 sec.) mittels GC/MS/MS bei einer CE von 5 eV, 10 eV und 15 eV sowie 20 eV und 30 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Dargestellt sind jeweils die absoluten PF der charakteristischen Tochterfragmente $m/z = 342$ und $m/z = 357$ sowie das *Precursorion* $m/z = 372$ (rot hervorgehoben). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Screening der Kollisionsenergien von E1- und E2-Metaboliten

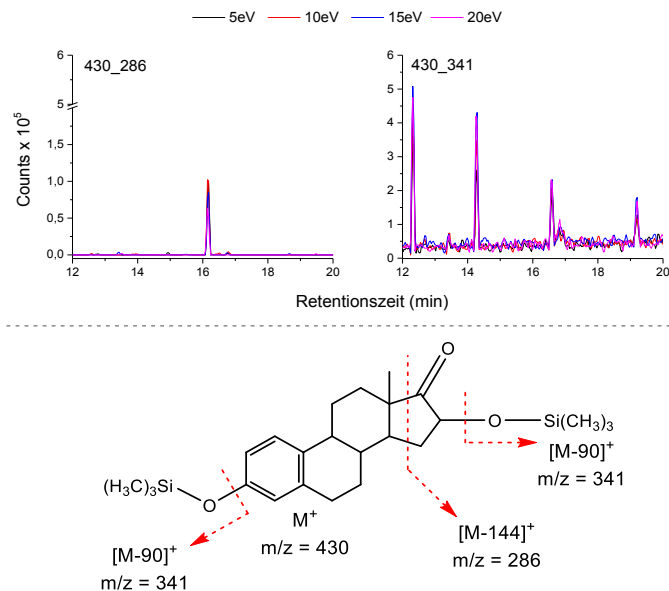


Abb. 83: *Screening* der CE zur Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von 16- α -HO-E1 sowie mögliche Fragmentierungspositionen und daraus resultierende Fragmente beziehungsweise Massenübergänge. Messung mittels GC/MS/MS im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des *Quantifiers* (430_286) und des *Übergangs* 430_341 bei einer Kollisionsenergie von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 5 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

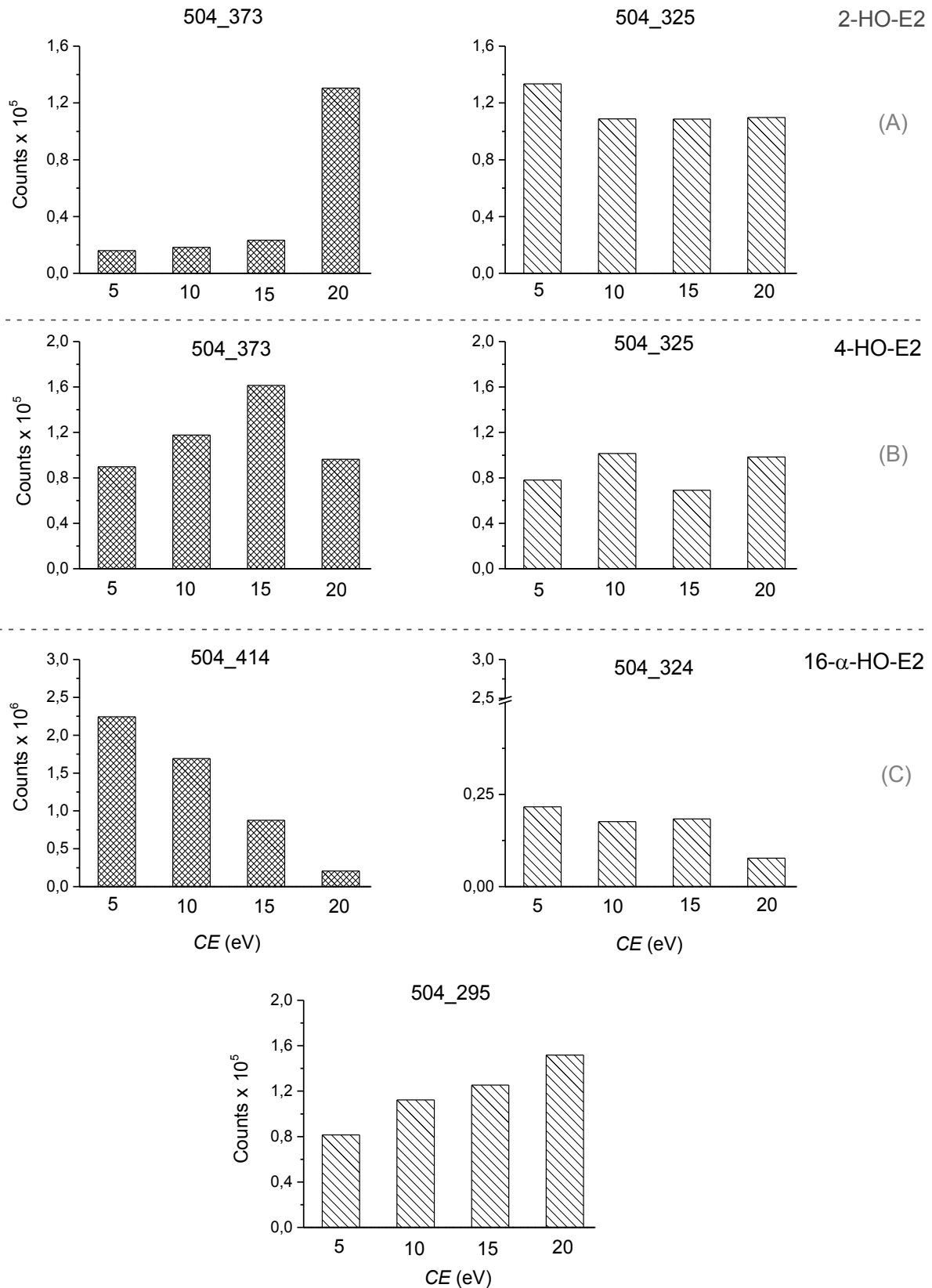


Abb. 84: Screening der CE zur Optimierung des Quantifier- und Qualifier-Übergangs von E2-Hydroxylierungsprodukten gemessen mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwel-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des Quantifier- (504_373 beziehungsweise 504_414) und Qualifier-Übergangs (504_325, 504_324 beziehungsweise 504_295) bei einer CE von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

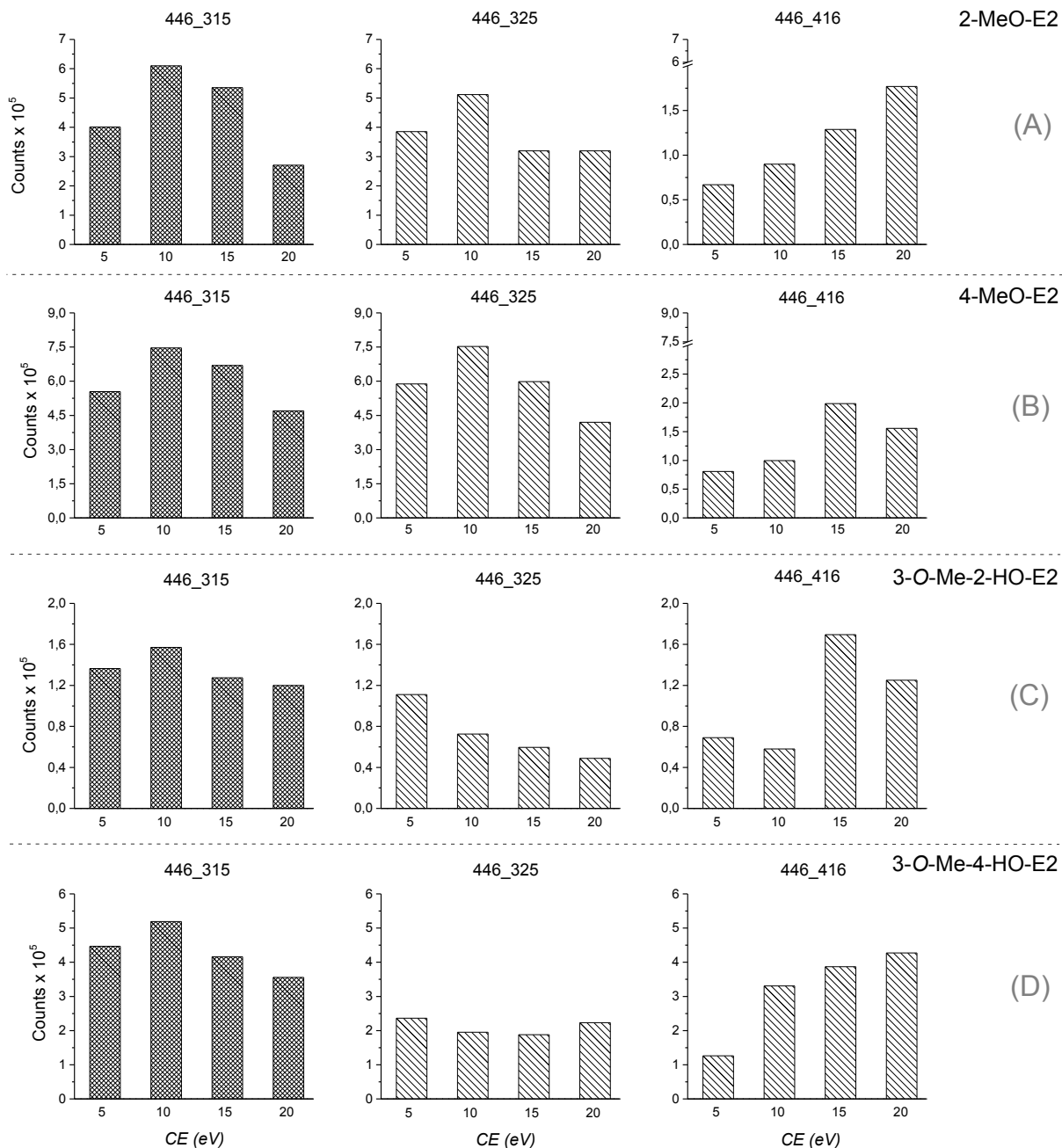


Abb. 85: Screening der CE zur Optimierung des Quantifier- und Qualifier-Übergangs von 2-MeO-E2, 4-MeO-E2, 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-4-HO-E2 gemessen mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwel-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des Quantifier- (446_315) und Qualifier-Übergangs (446_325 beziehungsweise 446_416) bei einer Kollisionsenergie von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

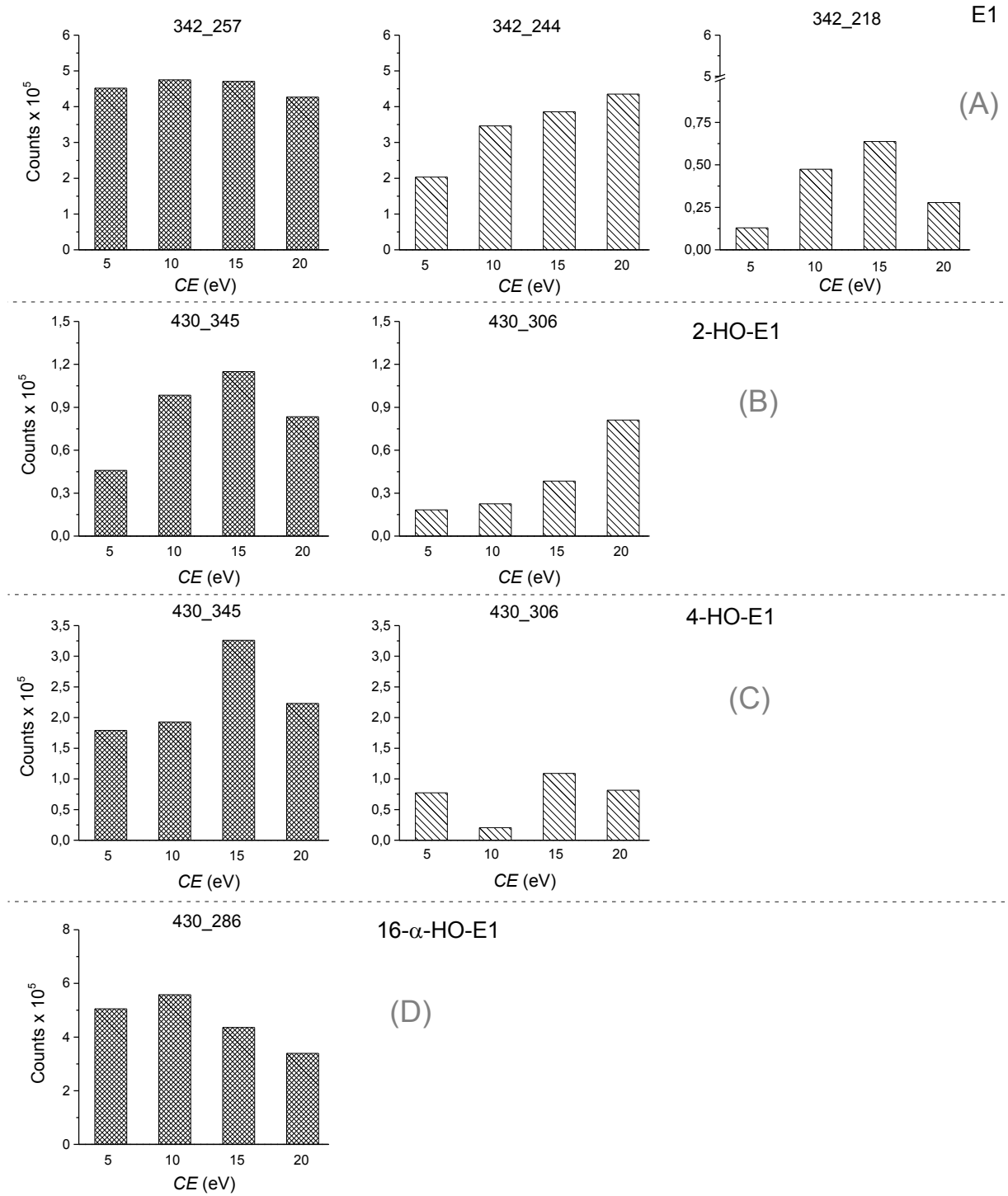


Abb. 86: Screening der CE zur Optimierung des Quantifier- und Qualifier-Übergangs von E1, 2-HO-E1, 4-HO-E1 und 16- α -HO-E1 gemessen mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des Quantifier- (342_257, 430_345 beziehungsweise 430_286) und Qualifier-Übergangs (342_244, 342_218 beziehungsweise 430_306) bei einer CE von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2$ pg für E1, 10 pg für 2-/4-HO-E1 und 5 pg für 16- α -HO-E1. Injektionsvolumen: 1 μ l (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

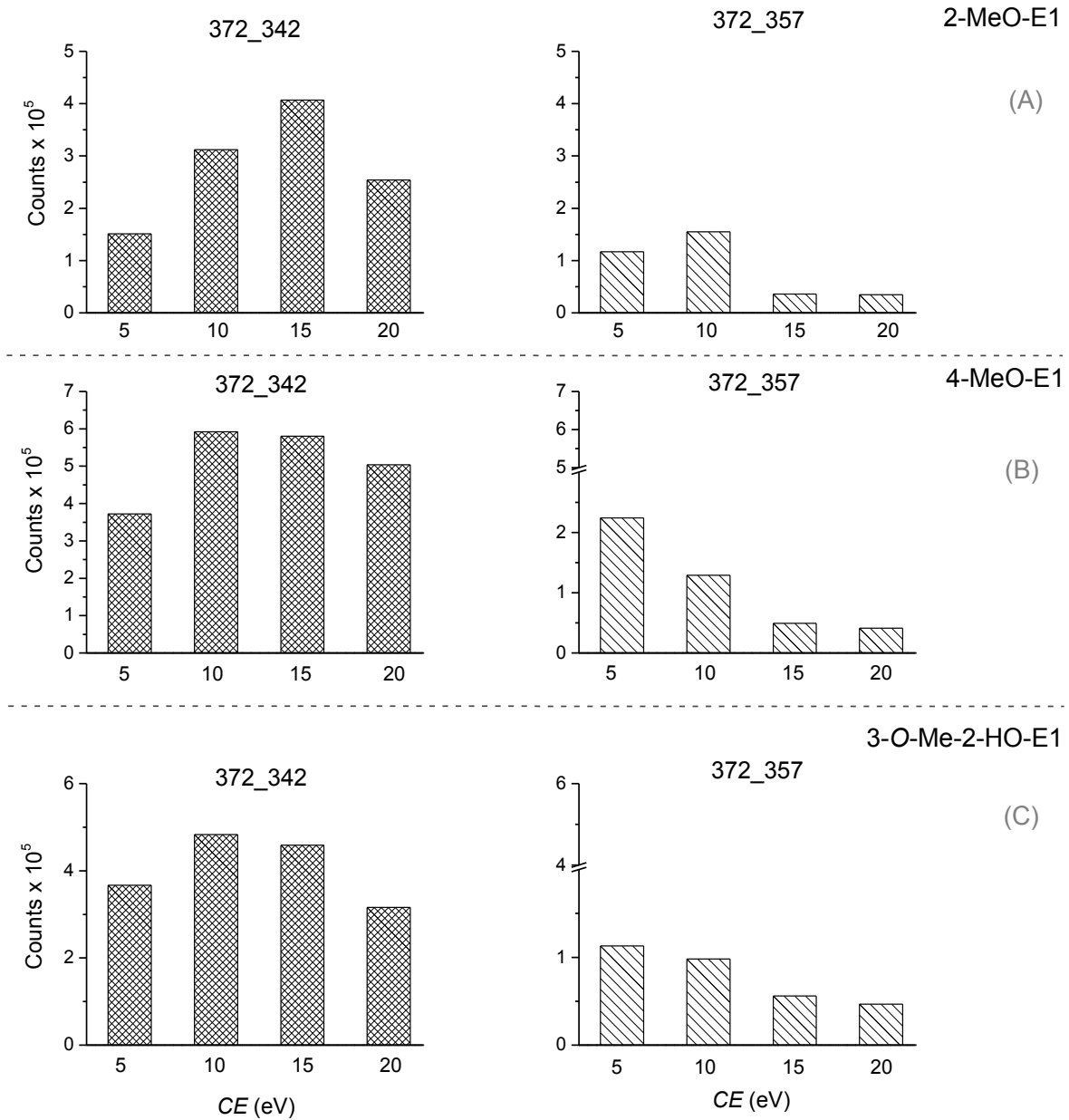


Abb. 87: Screening der CE zur Optimierung des Quantifier- und Qualifier-Übergangs von 2-MeO-E1, 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 gemessen mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,5 sec.). Dargestellt sind die absoluten PF des Quantifier- (372_342) und Qualifier-Übergangs (372_357) bei einer CE von 5 eV, 10 eV, 15 eV und 20 eV; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für 2-MeO-E1, 4 pg für 4-MeO-E1 und 5 pg für 3-O-Me-2-HO-E1. Injektionsvolumen: 1 μl (Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Fine-tuning der Kollisionsenergien von E1- und E2-Metaboliten

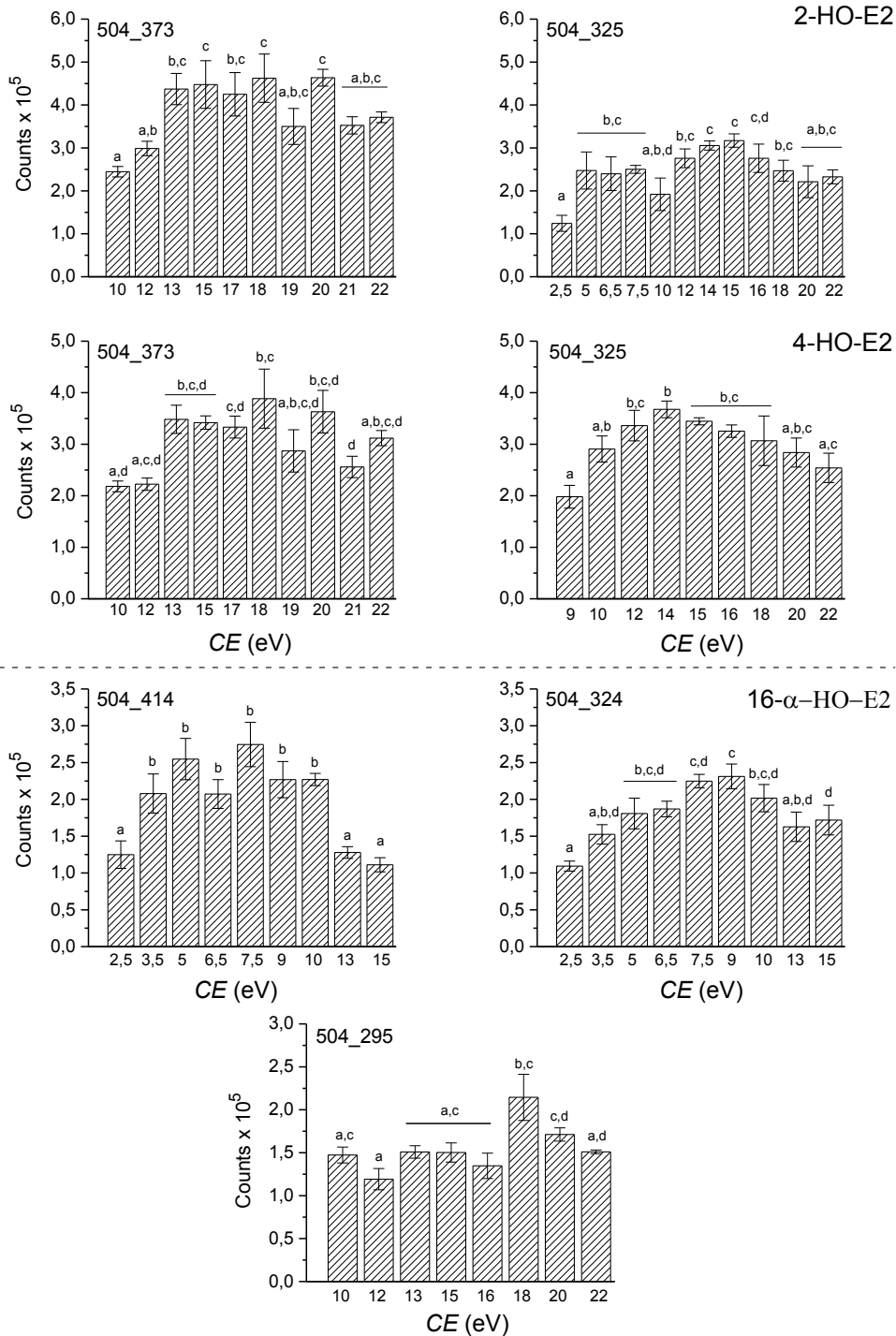


Abb. 88: Optimierung des *Quantifier*- und des *Qualifier*-Übergangs von E2-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der CE, gemessen mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachinjektion), im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind die absolute PF des *Quantifier*- (504_373 beziehungsweise 504_414) sowie des *Qualifier*-Übergangs (504_325, 504_324 beziehungsweise 504_295) bei einer unterschiedlichen CE, $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 46 und Tab. 47.

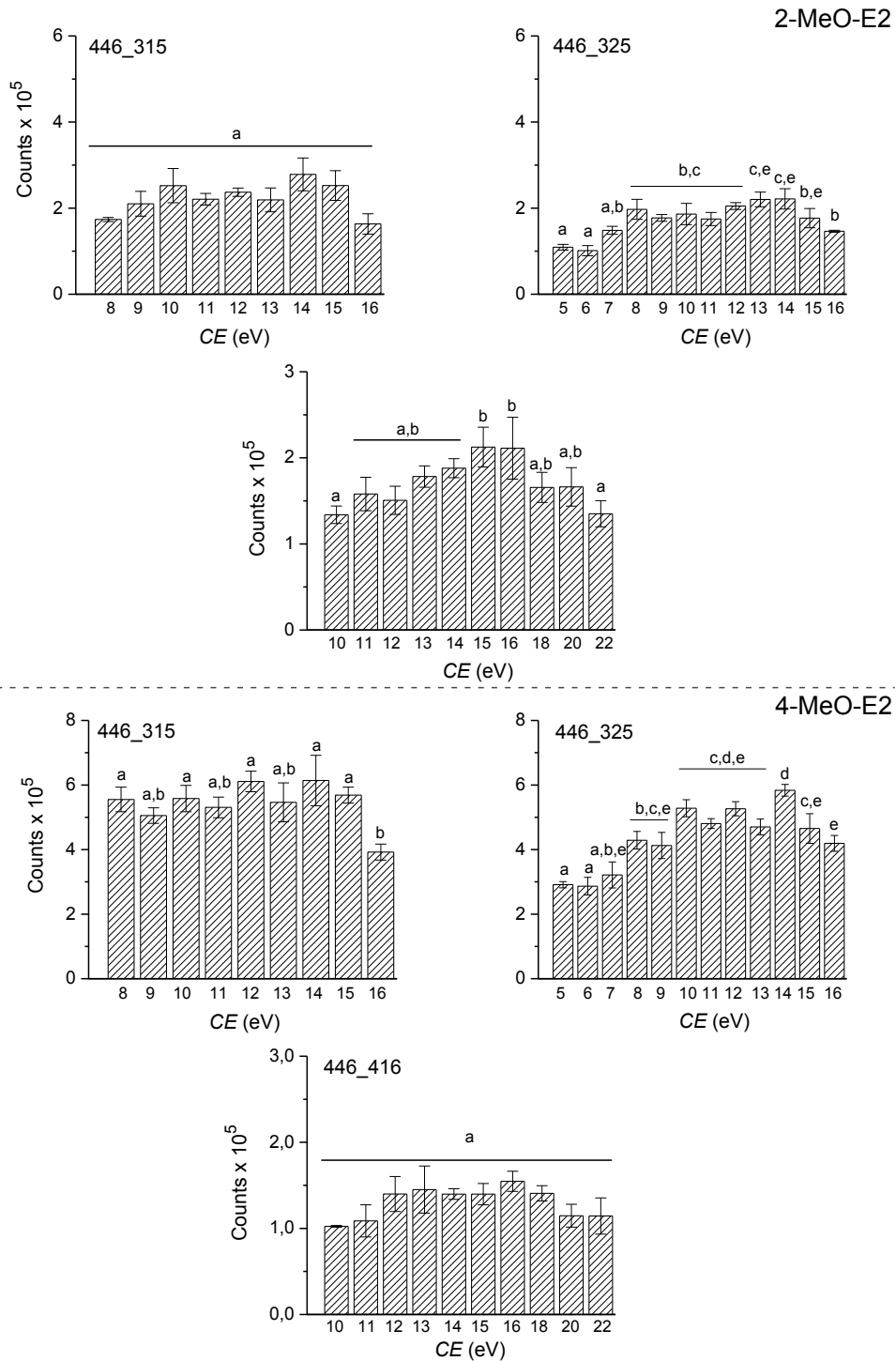


Abb. 89: Optimierung des *Quantifier*- und des *Qualifier*-Übergangs von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 bezüglich der CE, gemessen mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (446_315) sowie des *Qualifier*-Übergangs (446_325 beziehungsweise 446_416) bei einer unterschiedlichen CE; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2,5 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 48 und Tab. 49.

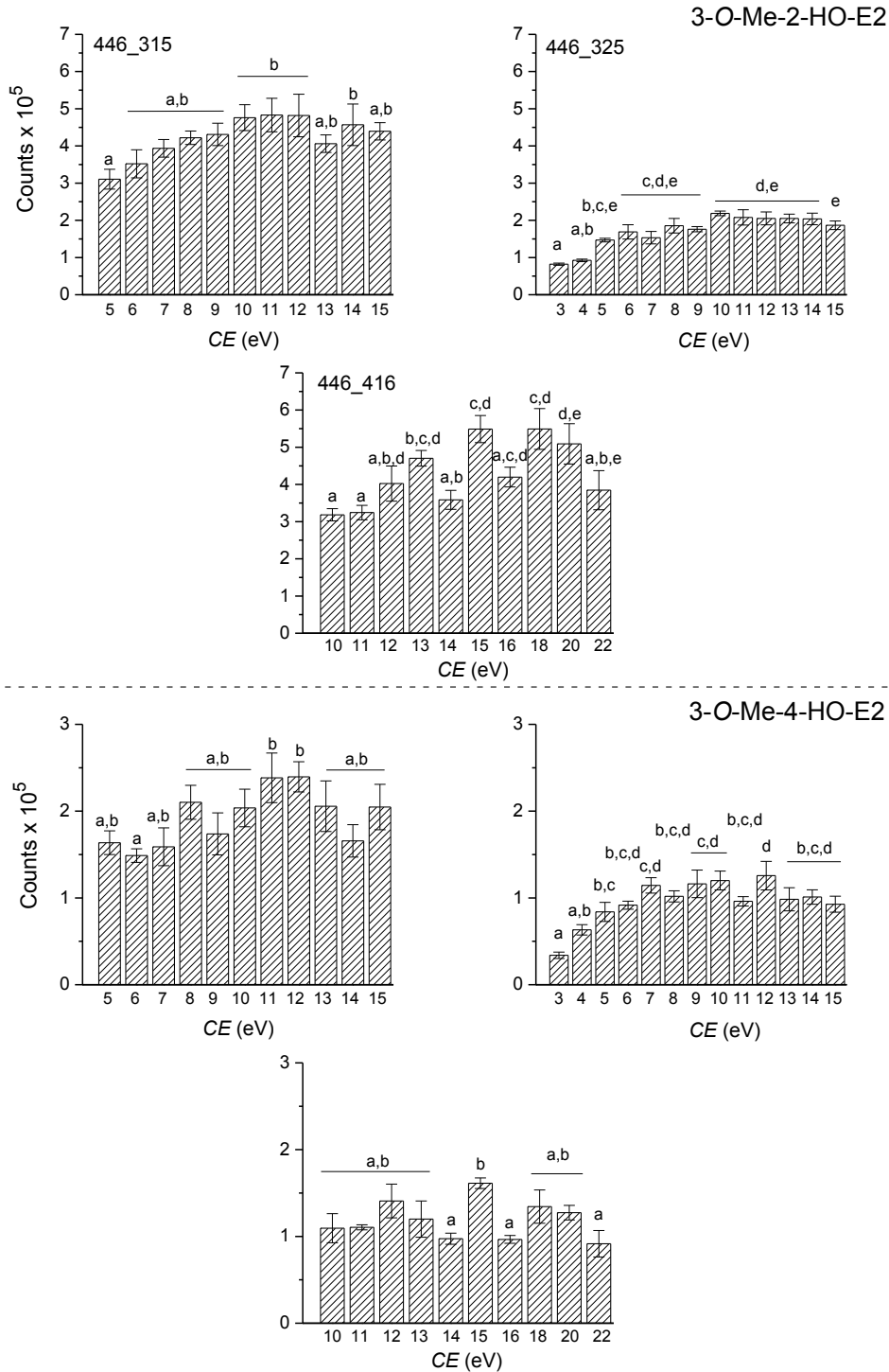


Abb. 90: Optimierung des *Quantifier*- und des *Qualifier*-Übergangs von 3-O-Me-2-HO-E2 und 3-O-Me-2-HO-E2 bezüglich der *CE*, gemessen mittels *GC/MS/MS* (jeweils Zweifachinjektion) im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (446_315) sowie des *Qualifier*-Übergangs (446_325 beziehungsweise 446_416) bei einer unterschiedlichen *CE*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 49 und Tab. 50.

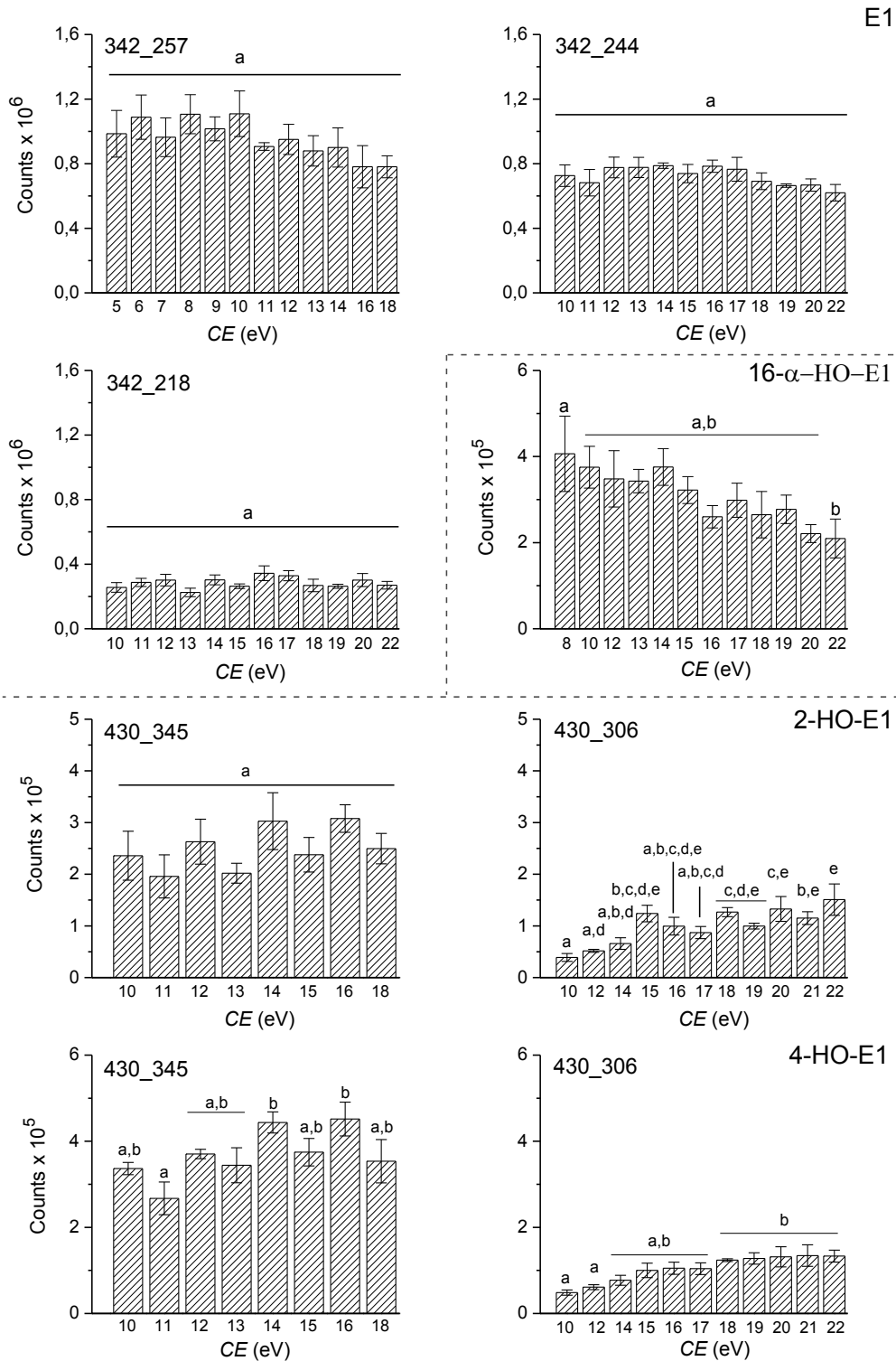


Abb. 91: Optimierung des *Quantifier*- und des *Qualifier*-Übergangs von E1 und E1-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der CE, gemessen mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (342_257, 430_286 beziehungsweise 430_345) sowie des *Qualifier*-Übergangs (342_244, 342_218 beziehungsweise 430_306) bei einer unterschiedlichen CE; $m_{\text{Analyt-Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E1, 5 pg für 16- α -HO-E1 und 10 pg für 2-/4-HO-E1. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 51 - Tab. 53.

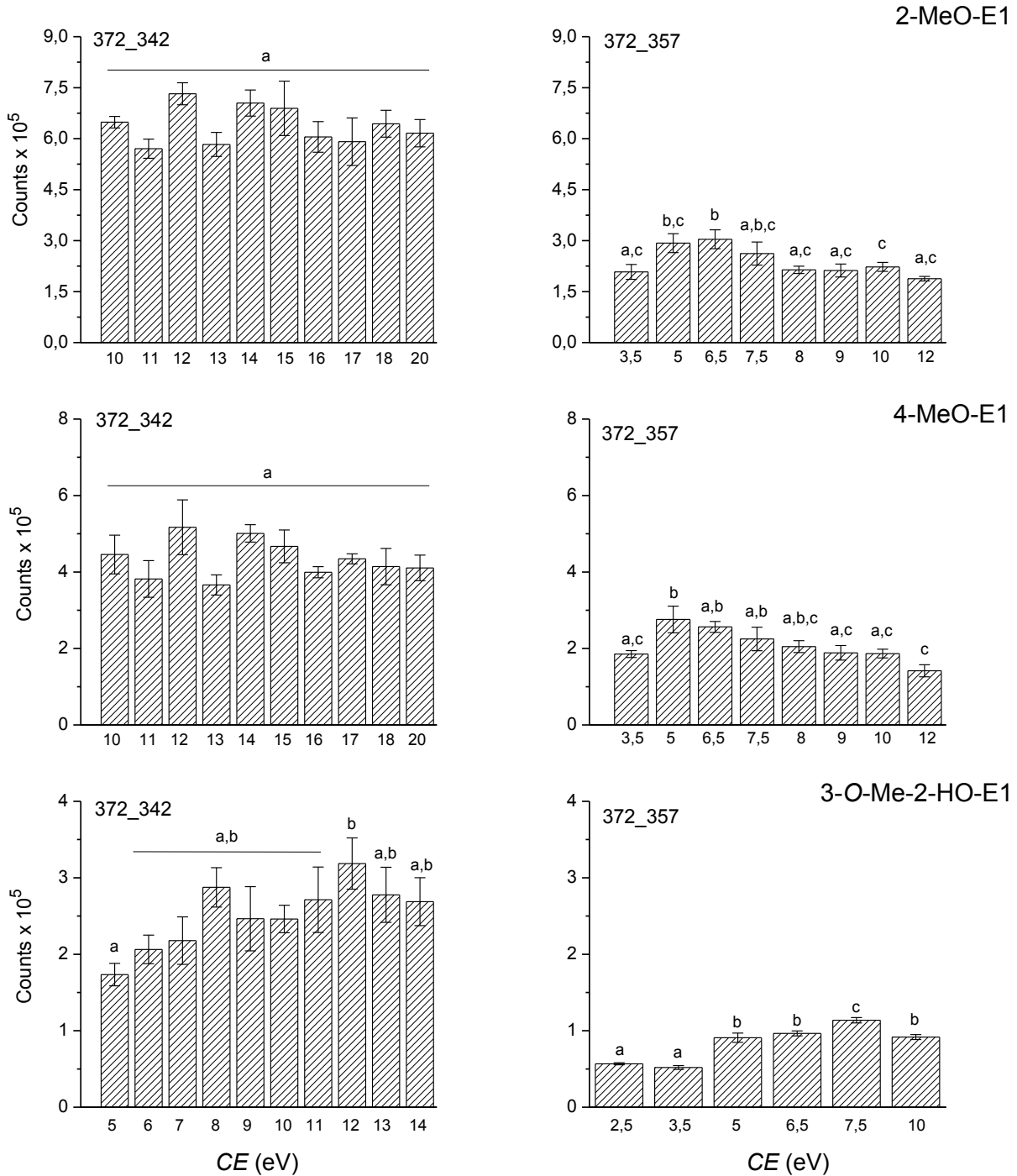


Abb. 92: Optimierung des *Quantifier*- und des *Qualifier*-Übergangs von E1-Methylierungsprodukten bezüglich der *CE*, gemessen mittels *GC/MS/MS* (jeweils Zweifachinjektion) im *MRM*-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (372_342) sowie des *Qualifier*-Übergangs (372_357) bei einer unterschiedlichen *CE*; $m_{\text{Analyt-Säule}} = 2 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 53 - Tab. 54.

ANHANG

Tab. 46: Rohdaten zur Optimierung der CE des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von E2 und 2-HO-E2. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des Übergangs 416_285 (Q) und 416_326 (q) von 2,5 pg E2 beziehungsweise 504_373 (Q) und 504_325 (q) für 10 pg 2-HO-E2. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

CE (eV)	E2 (416_285)			CE (eV)	E2 (416_326)		
10	1.030.000	896.115	843.835	5	485.134	433.734	491.585
	996.128	898.508	887.083		434.360	357.694	456.299
11	1.169.000	863.337	930.704	6	630.308	589.906	467.903
	904.560	941.659	946.439		559.492	455.798	640.487
12	893.548	1.019.000	897.679	7	732.382	551.981	510.572
	905.530	857.176	848.578		484.960	564.296	611.076
13	1.022.000	932.149	914.173	8	592.197	554.283	579.531
	1.509000	857.484	1.091.000		528.829	448.968	563.428
14	1.113.000	826.455	837.803	9	618.614	470.631	551.065
	900.237	854.626	1.066.000		482.100	498.007	610.647
15	1.019.000	819.800	898.346	10	587.328	522.829	574.305
	829.397	777.834	797.692		484.854	519.084	537.003
16	932.822	796.115	1.041.000	11	571.605	432.904	502.641
	910.969	738.898	748.094		399.528	412.786	519.220
18	939.788	760.391	811.480	12	529.982	395.160	545.839
	823.524	774.413	834.036		439.386	443.757	385.323
19	717.573	910.278	783.226	13	473.447	405.684	357.466
	719.378	735.210	685.445		369.403	399.435	432.935
20	855.035	843.480	746.555	14	457.479	387.048	385.585
	633.572	626.922	709.961		360.536	408.724	343.896
				15	282.343	263.219	408.060
					289.698	375.447	286.514
CE (eV)	2-HO-E2 (504_373)			CE (eV)	2-HO-E2 (504_325)		
10	248.215	270.043	260.703	2,5	116.500	139.514	141.572
	214.187	225.126	249.388		112.594	152.129	83.675
12	318.677	297.399	343.416	5	246.113	225.323	230.872
	254.690	286.162	292.149		347.489	207.387	227.170
13	497.425	409.796	401.556	6,5	329.325	228.482	218.368
	450.199	392.658	471.199		239.010	223.171	200.799
15	439.337	434.379	538.906	7,5	328.140	282.277	253.140
	369.685	422.191	481.578		191.592	215.312	230.050
17	412.264	385.991	397.303	10	235.581	160.965	212.725
	549.337	378.669	426.623		233.778	163.832	145.661
18	522.771	499.483	470.713	12	279.389	273.698	258.720
	470.466	502.290	324.377		230.957	273.669	338.803
19	403.327	363.869	382.135	14	321.290	410.749	321.152
	375.314	248.166	327.117		267.177	220.016	293.558
20	483.877	452.556	467.628	15	332.315	368.292	273.799
	488.698	451.189	437.708		337.636	245.008	345.744
21	462.827	401.446	347.969	16	272.046	261.207	308.108
	282.402	304.055	316.766		341.466	221.286	251.034
22	316.862	370.914	324.682	18	222.261	217.049	223.652
	444.476	381.709	389.766		292.107	311.662	214.270
				20	221.791	204.231	190.858
					306.153	201.271	203.298
				22	220.848	227.477	268.689
					260.418	200.749	218.352

ANHANG

Tab. 47: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 4-HO-E2 und 16- α -HO-E2. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des Übergangs 504_373 (Q) und 504_325 (q) von 10 pg 4-HO-E2 beziehungsweise 504_414 (Q), 504_325 (q) sowie 504_295 für 10 pg 16- α -HO-E2. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	4-HO-E2 (504_373)			<i>CE</i> (eV)	4-HO-E2 (504_325)		
10	237.904	204.515	214.244	9	236.900	198.598	194.868
	217.315	209.445	225.715		192.531	147.349	218.079
12	247.115	224.160	194.605	10	295.480	292.012	235.828
	214.047	193.234	261.335		331.481	298.231	291.402
13	395.582	315.969	370.681	12	377.973	344.534	396.990
	341.119	318.180	348.192		257.335	296.309	343.558
15	284.626	342.494	373.709	14	305.333	357.796	389.546
	369.275	355.511	325.915		459.781	381.784	311.394
17	328.391	379.635	306.675	15	378.921	409.854	339.212
	372.584	300.220	312.180		300.104	273.800	365.659
18	346.207	394.095	453.679	16	384.017	357.368	309.520
	305.031	408.404	422.684		291.109	269.530	340.410
19	318.903	235.627	344.515	18	369.031	352.739	281.926
	295.213	243.819	284.254		352.926	186.458	297.027
20	425.816	372.648	347.281	20	258.110	333.124	281.392
	320.811	424.189	287.881		257.431	294.207	279.015
21	281.392	267.039	302.018	22	303.324	192.790	290.652
	211.750	215.973	257.190		229.834	250.176	257.673
22	369.184	303.412	290.064	/			
	253.289	350.223	304.747	/			
<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E2 (504_414)			<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E2 (504_324)		
2,5	149.979	153.548	135.516	2,5	128.078	119.391	118.994
	120.124	119.061	71.238		105.966	94.326	89.340
3,5	269.874	207.903	210.053	3,5	160.665	167.454	215.446
	188.154	225.447	146.061		133.699	118.069	119.605
5	297.114	245.517	305.619	5	168.435	238.312	214.303
	232.164	200.654	247.436		164.421	171.258	127.819
6,5	252.800	195.392	212.625	6,5	183.104	177.070	178.128
	177.844	247.871	157.481		200.694	172.608	210.255
7,5	389.046	270.496	285.972	7,5	259.833	250.686	228.248
	226.704	228.268	247.154		200.831	209.276	200.217
9	259.000	189.441	244.796	9	264.348	214.002	212.266
	226.532	207.581	233.772		236.609	232.651	227.336
10	263.665	232.474	242.866	10	222.505	186.843	192.106
	180.231	240.684	201.882		213.392	224.317	170.785
13	136.890	149.567	124.405	13	148.118	200.066	169.144
	132.070	110.398	113.654		144.783	169.994	144.384
15	116.195	114.610	173.162	15	205.836	218.087	156.383
	91.581	100.392	70.847		177.693	126.875	146.695
<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E2 (504_295)			<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E2 (504_295)		
10	165.735	140.949	158.415	16	152.170	164.430	115.642
	142.974	132.719	143.043		118.671	133.939	123.503
12	162.485	151.392	120.017	18	223.228	202.820	244.050
	100.916	86.543	93.816		261.238	174.333	181.210
13	173.046	166.769	157.938	20	193.899	170.174	146.402
	141.010	138.594	127.894		164.382	157.387	195.003
15	156.277	162.177	125.190	22	177.964	173.666	177.520
	164.977	141.039	151.696		129.045	126.076	121.844

Tab. 48: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier-*Übergangs (q) von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_315 (Q) und 446_325 (q) von 2,5 pg 2-MeO-E2 beziehungsweise 4-MeO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	2-MeO-E2 (446_315)			<i>CE</i> (eV)	2-MeO-E2 (446_325)		
8	197.629	153.357	173.354	5	116.763	137.292	70.490
	139.118	200.515	177.882		97.037	95.859	137.598
9	245.010	199.614	225.626	6	122.569	130.304	144.395
	234.030	164.064	192.380		91.234	88.140	30.960
10	228.152	302.887	270.458	7	115.349	89.123	190.327
	191.405	274.074	247.195		176.284	192.286	127.423
11	264.742	193.921	212.843	8	184.818	188.328	227.037
	197.117	217.135	239.003		157.360	220.850	204.801
12	227.721	217.871	225.395	9	170.841	197.439	196.914
	237.985	278.306	235.137		191.740	167.629	139.809
13	188.714	186.786	282.000	10	146.171	194.480	160.847
	214.166	223.862	220.463		181.744	231.628	202.862
14	226.027	302.294	305.248	11	187.710	216.335	201.899
	274.023	224.650	338.054		157.946	165.347	119.337
15	287.421	258.633	217.065	12	265.190	229.765	236.687
	251.896	291.590	208.591		127.149	194.091	176.570
16	176.140	107.659	53.715	13	241.416	229.150	253.095
	199.724	214.071	228.054		220.449	172.126	235.020
				14	216.982	186.795	253.095
					176.836	259.933	235.020
				15	136.037	178.263	177.274
					180.177	224.750	163.657
				16	161.073	134.141	141.801
					127.193	157.887	155.616
<i>CE</i> (eV)	4-MeO-E2 (446_315)			<i>CE</i> (eV)	4-MeO-E2 (446_325)		
8	597.870	591.652	575.820	5	322.808	333.747	275.676
	427.033	579.641	559.645		261.170	228.704	325.407
9	541.970	499.589	598.221	6	284.746	311.526	274.500
	491.012	455.694	445.396		228.434	308.135	312.103
10	565.385	617.027	571.055	7	341.397	346.613	308.627
	616.556	524.277	453.804		356.898	333.715	241.925
11	594.839	500.382	527.079	8	374.161	455.890	350.069
	516.157	488.958	556.095		488.263	454.169	450.863
12	576.444	615.248	712.218	9	401.953	371.480	476.752
	605.707	572.908	583.010		417.277	376.377	432.357
13	557.816	579.199	508.213	10	542.701	625.708	472.015
	673.716	455.963	503.111		481.899	491.646	555.135
14	562.162	574.424	700.680	11	512.548	492.137	437.266
	558.113	581.882	706.274		467.727	485.590	488.658
15	553.931	663.062	557.657	12	569.474	568.798	497.020
	622.750	418.846	596.512		533.809	460.261	529.073
16	450.921	384.336	472.936	13	458.052	584.739	416.513
	345.542	345.442	353.592		461.787	410.921	488.783
				14	593.037	616.131	570.790
					601.932	510.180	610.032
				15	382.391	507.735	519.376
					443.790	490.917	447.739
				16	450.921	384.336	472.936
					345.542	507.674	353.592

ANHANG

Tab. 49: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_416 von 2,5 pg 2- beziehungsweise 4-MeO-E2 sowie des Übergangs 446_315 (Q) und 446_325 (q) von 10 pg 3-O-Me-2-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	2-MeO-E2 (446_416)			<i>CE</i> (eV)	4-MeO-E2 (446_416)		
10	163.191	141.012	129.517	10	114.041	102.982	80.712
	123.258	105.175	140.901		88.734	101.262	126.274
11	156.857	111.687	164.321	11	127.451	137.321	154.891
	133.707	185.239	196.452		59.921	163.671	50.917
12	150.182	146.093	104.910	12	118.414	190.760	127.812
	178.980	163.491	160.156		144.154	135.501	122.852
13	195.409	139.919	197.489	13	168.829	111.924	160.003
	189.784	202.993	144.045		183.962	139.574	106.068
14	210.229	195.366	222.551	14	99.447	136.298	193.630
	169.554	156.740	173.348		166.073	151.637	92.307
15	202.814	203.091	185.041	15	164.836	126.672	154.775
	213.070	180.889	289.994		118.924	126.400	147.159
16	181.730	210.399	227.378	16	138.834	173.213	167.897
	158.594	262.823	226.433		180.512	152.800	114.784
18	160.982	136.029	218.761	18	160.949	171.221	106.573
	154.554	170.952	152.613		139.581	106.880	158.916
20	217.030	169.814	134.520	20	167.669	85.066	105.625
	158.466	165.949	151.785		92.027	124.832	113.048
22	142.205	146.324	109.826	22	118.339	98.903	83.222
	162.534	111.045	138.482		154.183	89.904	141.745
<i>CE</i> (eV)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_315)			<i>CE</i> (eV)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_325)		
5	233.540	180.830	167.182	3	37.818	53.240	47.144
	111.989	115.076	173.169		26.321	9.778	29.261
6	155.461	170.912	157.619	4	52.481	90.369	111.534
	128.745	143.869	136.406		77.104	22.844	25.084
7	158.488	130.359	121.111	5	72.713	102.379	81.117
	176.580	219.744	147.251		75.862	89.440	82.153
8	220.782	178.061	222.544	6	95.438	100.107	97.097
	210.918	198.848	230.158		79.208	82.203	95.941
9	147.293	176.920	209.890	7	111.311	105.984	98.505
	151.082	218.310	139.235		133.938	103.924	132.992
10	192.733	217.833	247.641	8	94.469	118.835	76.231
	173.296	185.857	204.740		94.552	93.719	133.160
11	227.865	215.036	200.482	9	128.549	100.878	77.178
	299.952	199.935	287.235		127.700	95.586	167.665
12	258.913	228.181	197.089	10	95.348	79.382	107.728
	247.896	262.187	243.014		163.608	165.558	108.583
13	245.803	176.611	265.521	11	98.050	117.847	77.445
	171.874	173.528	200.797		81.799	81.338	120.153
14	182.951	178.105	119.382	12	93.408	128.976	60.091
	181.604	160.968	171.590		181.254	136.865	153.561
15	190.935	236.498	226.886	13	75.344	113.493	85.706
	163.785	178.196	232.158		107.866	66.325	141.826
				14	116.700	99.323	105.259
					96.444	83.555	105.052
				15	97.553	107.490	63.251
					70.213	97.020	121.020

ANHANG

Tab. 50: Rohdaten zur Optimierung der CE des *Quantitativ*- (Q) und *Qualitativ*-Übergangs (q) von 10 pg 3-O-Me-2-HO-E2 und 10 pg 3-O-Me-4-HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_416 von 3-O-Me-2-HO-E2 sowie des Übergangs 446_315 (Q) und 446_325 (q) von 3-O-Me-4-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

CE (eV)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_416)			CE (eV)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_416)		
10	161.809	126.570	57.186	16	116.740	137.407	87.723
	89.737	94.292	127.393		80.532	61.925	94.985
11	151.517	109.019	109.100	18	130.139	122.225	146.507
	72.941	115.239	105.271		125.922	116.148	165.297
12	115.873	122.602	107.880	20	144.511	139.866	137.345
	207.330	153.121	138.185		100.702	105.223	136.833
13	130.309	97.038	111.263	22	91.460	105.633	98.271
	145.661	97.024	138.643		56.671	98.798	98.289
14	123.003	77.474	66.411				
	85.976	113.602	117.723				
15	110.546	176.943	172.421				
	225.774	135.845	146.405				
CE (eV)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_315)			CE (eV)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_325)		
5	291.208	307.953	342.052	3	105.625	62.730	97.725
	345.897	253.941	322.397		65.076	96.112	64.840
6	418.742	313.727	404.172	4	109.109	111.218	76.373
	304.175	307.145	364.305		81.725	65.982	109.930
7	435.387	427.668	389.690	5	90.307	136.933	202.636
	340.203	411.459	357.187		200.892	148.797	101.696
8	448.504	399.491	396.196	6	146.198	147.698	178.401
	391.751	410.461	485.939		156.941	183.176	201.082
9	358.572	440.748	467.619	7	160.415	176.606	212.763
	451.903	406.959	460.316		133.307	105.006	131.718
10	563.675	437.845	514.155	8	196.986	196.556	202.306
	451.216	439.401	449.759		152.717	150.466	213.613
11	417.513	494.042	532.648	9	158.588	165.521	191.992
	444.669	530.923	478.205		178.591	199.026	162.974
12	376.869	459.286	571.777	10	229.537	246.912	185.880
	531.734	428.124	523.619		195.702	190.125	264.005
13	436.467	468.394	386.037	11	208.659	253.158	206.089
	322.826	381.014	442.009		169.272	206.308	203.411
14	369.099	496.145	526.487	12	181.254	205.193	214.264
	415.940	477.403	456.347		255.564	166.151	208.824
15	463.820	393.434	473.340	13	246.329	209.394	215.228
	468.485	456.658	380.580		148.145	227.708	182.846
				14	194.409	230.091	184.620
					246.572	171.328	195.476
				15	202.477	178.014	213.537
					162.341	177.451	186.189
CE (eV)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_416)			CE (eV)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_416)		
10	334.886	269.778	288.737	16	333.766	478.278	438.289
	301.715	334.307	380.950		502.168	415.715	349.904
11	358.958	301.147	328.522	18	528.652	542.348	404.204
	270.078	322.522	365.230		602.387	645.283	571.536
12	470.911	352.448	343.818	20	571.329	465.687	447.742
	432.786	363.168	451.139		571.326	478.068	520.148
13	463.787	453.705	522.840	22	459.555	355.635	368.876
	430.765	496.986	453.880		382.652	292.772	447.889
14	370.547	376.625	349.886				
	395.256	287.820	371.700				
15	655.808	555.221	558.882				
	500.572	461.157	561.505				

ANHANG

Tab. 51: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2 pg E1. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des Übergangs 342_257 (Q) sowie des Übergangs 342_244 (q) und 342_218 (q) E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	E1 (342_257)			<i>CE</i> (eV)	E1 (342_244)		
5	1.091.000	947.562	926.138	10	789.778	691.714	737.950
	1.208.000	913.844	825.385		801.976	633.381	700.873
6	1.110.000	1.056.000	1.067.000	11	749.530	627.817	643.282
	1.383.000	969.413	943.866		774.525	567.899	730.179
7	1.145.000	872.955	954.018	12	801.571	711.507	837.234
	1.052.000	975.457	783.195		784.856	699.943	823.177
8	1.295.000	1.070.000	990.407	13	915.103	718.860	882.711
	1.172.000	1.115.000	995.988		776.554	729.287	637.647
9	1.061.000	910.176	907.365	14	781.322	751.879	782.599
	1.140.000	1.062.000	1.015.000		816.472	841.504	753.772
10	1.217.000	1.046.000	911.661	15	718.136	723.972	851.489
	1.310.000	1.108.000	1.062.000		750.757	645.095	743.435
11	902.484	1.007.000	840.033	16	747.908	748.207	854.708
	916.941	848.647	922.516		802.429	754.849	797.354
12	957.773	843.836	905.284	17	768.890	743.165	926.449
	1.145.000	1.020.000	829.048		774.612	633.457	745.264
13	841.535	1.017.000	855.369	18	762.427	585.786	785.794
	854.842	953.251	753.307		638.631	684.561	689.548
14	860.396	747.787	841.930	19	607.090	693.115	697.857
	1.219.000	937.936	795.223		697.920	644.416	646.620
16	935.398	757.549	677.630	20	684.600	700.453	667.768
	918.366	728.162	669.867		660.807	554.241	737.711
18	776.162	769.730	794.867	22	687.762	597.817	666.580
	927.114	661.463	756.214		630.290	527.090	611.206
<i>CE</i> (eV)	E1 (342_218)			<i>CE</i> (eV)	E1 (342_218)		
10	225.283	224.593	314.051	16	308.509	402.961	398.583
	285.266	228.983	258.913		274.398	321.918	355.617
11	250.958	344.919	329.414	17	392.468	326.948	310.190
	278.759	218.341	300.324		320.463	342.147	279.353
12	324.481	262.882	313.960	18	276.100	300.243	290.175
	360.740	312.047	235.831		243.082	169.696	330.543
13	266.216	266.002	216.885	19	268.021	318.725	275.679
	170.479	241.276	187.487		229.470	222.107	265.944
14	357.298	248.193	357.081	20	253.240	300.518	312.833
	299.359	290.473	264.550		290.095	271.844	382.001
15	267.161	265.317	283.471	22	321.275	277.106	317.304
	290.374	257.824	216.645		244.168	207.839	250.700

ANHANG

Tab. 52: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier-*Übergangs (q) von 10 pg 2-HO-E1 und 10 pg 4-HO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 430_345 (Q) sowie des Übergangs 430_306 (q) von 2-/4-HO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	2-HO-E1 (430_345)			<i>CE</i> (eV)	2-HO-E1 (430_306)		
10	328.864	211.322	157.791	10	36.462	22.859	49.759
	251.294	217.504	248.061		48.490	37.405	38.315
11	189.491	226.785	133.257	12	56.161	49.314	56.132
	253.373	209.490	162.026		43.951	50.766	53.765
12	346.948	192.543	229.592	14	70.667	76.077	67.500
	275.870	262.414	270.612		56.075	36.203	88.488
13	178.521	171.184	247.164	15	174.663	158.066	99.898
	200.097	213.788	201.282		78.296	118.995	114.014
14	342.931	379.244	255.876	16	103.142	123.444	89.566
	274.292	329.743	234.226		62.023	110.347	108.359
15	265.831	298.308	205.979	17	91.175	102.948	90.641
	260.316	202.253	193.589		59.381	71.471	106.773
16	373.456	305.304	337.088	18	155.065	105.630	145.887
	236.232	260.205	334.796		98.882	130.183	125.029
18	310.075	224.452	298.408	19	77.596	103.722	106.705
	218.509	206.940	238.882		112.959	91.672	105.134
				20	191.724	148.242	103.544
					129.429	93.401	130.576
				21	100.490	125.610	136.787
					108.300	98.893	120.380
				22	191.042	114.329	153.366
					170.805	126.062	149.910
<i>CE</i> (eV)	4-HO-E1 (430_345)			<i>CE</i> (eV)	4-HO-E1 (430_306)		
10	311.583	356.860	386.297	10	53.663	41.999	35.638
	355.148	347.446	261.998		55.813	43.285	60.398
11	309.196	266.248	315.179	12	54.884	49.243	70.255
	185.371	220.741	307.335		54.816	82.476	55.071
12	359.797	346.971	423.563	14	106.917	62.394	85.128
	363.244	386.865	341.777		73.794	74.801	60.170
13	293.441	417.156	345.945	15	69.112	130.934	131.636
	303.369	334.913	370.351		92.266	90.190	86.309
14	361.936	476.119	513.403	16	115.312	117.058	85.140
	491.400	388.597	429.906		70.936	86.082	155.966
15	331.423	331.898	467.137	17	97.924	99.192	158.122
	361.854	404.042	351.322		90.222	98.113	80.882
16	487.569	416.835	516.863	18	84.233	120.755	154.520
	485.612	401.488	401.126		166.858	119.544	97.409
18	308.725	337.792	474.112	19	138.687	113.731	147.230
	307.980	351.745	341.178		140.984	113.572	112.273
				20	119.948	138.338	177.999
					105.540	110.398	137.367
				21	136.001	153.268	92.431
					90.180	170.532	164.591
				22	114.369	161.350	123.497
					132.913	137.037	130.372

Tab. 53: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quantifiers* (Q) von 5 pg 16- α -HO-E1 sowie des *Quantifier* (Q) und *Qualifiers* (q) von 2 pg 2-MeO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 430_286 (Q) sowie des Übergangs 372_342 (Q) und 372_357 (q). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E1 (430_286)			<i>CE</i> (eV)	16-α-HO-E1 (430_286)		
8	361.241	532.299	330.481	16	207.438	333.359	210.372
	422.401	468.222	323.525		316.803	236.620	256.024
10	400.159	485.762	295.028	17	390.053	332.339	308.609
	385.165	339.653	345.682		288.416	259.686	211.348
12	376.407	371.532	284.431	18	371.948	168.722	302.607
	429.615	359.839	266.937		275.137	266.592	204.654
13	368.899	470.084	363.524	19	363.027	312.642	213.872
	333.488	259.689	261.554		267.198	195.046	312.266
14	400.219	435.681	350.943	20	214.532	211.411	220.298
	288.414	413.022	366.220		275.017	211.787	193.009
15	341.476	447.526	262.392	22	307.310	167.591	152.654
	343.003	228.128	309.602		215.792	193.995	220.155
<i>CE</i> (eV)	2-MeO-E1 (372_342)			<i>CE</i> (eV)	2-MeO-E1 (372_357)		
10	595.931	675.161	694.663	3,5	151.507	239.729	202.911
	688.482	595.799	640.813		285.961	125.970	242.072
11	540.425	611.507	571.732	5	268.346	248.256	303.837
	535.362	555.521	608.228		276.512	314.028	344.430
12	780.313	616.949	767.892	6,5	315.628	305.373	332.310
	744.595	778.984	704.023		315.118	238.913	315.670
13	530.426	648.354	643.618	7,5	300.273	332.076	299.605
	557.677	578.516	538.815		146.141	240.667	252.585
14	697.223	656.053	733.191	8	228.002	238.312	216.912
	772.483	666.721	702.624		175.589	205.291	220.515
15	578.093	769.144	690.776	9	178.726	212.232	201.771
	617.051	719.046	761.198		212.949	202.884	264.003
16	590.491	518.705	641.655	10	201.589	185.730	258.268
	626.492	598.022	654.961		248.945	230.795	210.656
17	654.026	532.336	648.791	12	202.853	145.033	182.116
	630.465	490.435	590.015		166.998	221.600	208.956
18	682.272	631.803	564.269				
	620.698	726.267	637.901				
20	647.675	711.447	591.795				
	500.577	528.928	716.524				

Tab. 54: Rohdaten zur Optimierung der *CE* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2 pg 4-MeO-E1 und 2 pg 3-O-Me-2-HO-E1. Aufgeführt sind absoluten PPF (Counts) des Übergangs 372_342 (Q) sowie des Übergangs 372_357 (q) von 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

<i>CE</i> (eV)	4-MeO-E1 (372_342)			<i>CE</i> (eV)	4-MeO-E1 (372_357)		
10	420.556	505.431	383.363	3,5	243.358	249.133	200.320
	398.567	501.797	465.033		130.820	137.687	151.160
11	413.875	384.784	411.216	5	301.075	263.601	248.445
	335.470	290.603	454.627		260.372	352.436	229.407
12	594.068	439.785	527.890	6,5	265.728	291.212	246.713
	537.273	429.691	573.757		279.942	202.301	252.822
13	366.950	354.171	429.958	7,5	263.160	222.690	209.129
	315.488	373.143	357.484		257.409	196.073	200.958
14	519.172	565.135	468.981	8	267.841	177.057	246.102
	535.134	408.255	509.099		168.690	198.928	170.389

ANHANG

15	528.366 417.592	441.319 401.876	521.721 491.532	9	173.406 159.746	217.875 183.007	193.060 204.332
16	367.282 398.131	387.067 426.046	433.597 384.288	10	138.874 224.031	239.670 159.579	138.431 218.842
17	419.541 448.673	467.508 375.604	449.477 445.914	12	112.747 159.361	150.253 108.953	211.722 107.419
18	353.431 417.706	369.397 406.548	530.078 408.147				
20	435.673 327.915	437.230 457.220	426.016 380.213				
<i>CE (eV)</i>	3-O-Me-2-HO-E1 (372_342)			<i>CE (eV)</i>	3-O-Me-2-HO-E1 (372_357)		
5	168.170 209.668	174.673 168.710	140.578 178.728	2,5	85.776 30.788	85.796 26.593	50.185 61.480
6	198.480 256.270	171.359 228.252	195.463 188.189	3,5	45.767 63.695	40.539 62.069	54.711 44.980
7	218.029 273.766	218.988 227.067	184.804 184.281	5	97.073 97.131	84.737 95.918	81.269 88.770
8	284.519 311.897	306.490 305.959	284.996 231.210	6,5	69.088 116.593	115.051 82.082	83.646 112.556
9	271.457 318.024	264.772 172.827	214.672 236.972	7,5	92.055 139.601	116.764 102.439	114.468 116.922
10	216.767 316.355	209.650 268.353	219.148 246.470	10	103.522 87.293	107.252 73.589	100.219 78.459
11	343.961 294.486	194.812 279.265	239.197 275.846				
12	342.150 369.614	348.338 233.483	271.281 346.867				
13	307.310 277.131	268.725 204.559	284.087 324.477				
14	311.653 290.367	299.067 234.855	231.116 245.824				

Optimierung der dwell-time von E1- und E2-Metaboliten

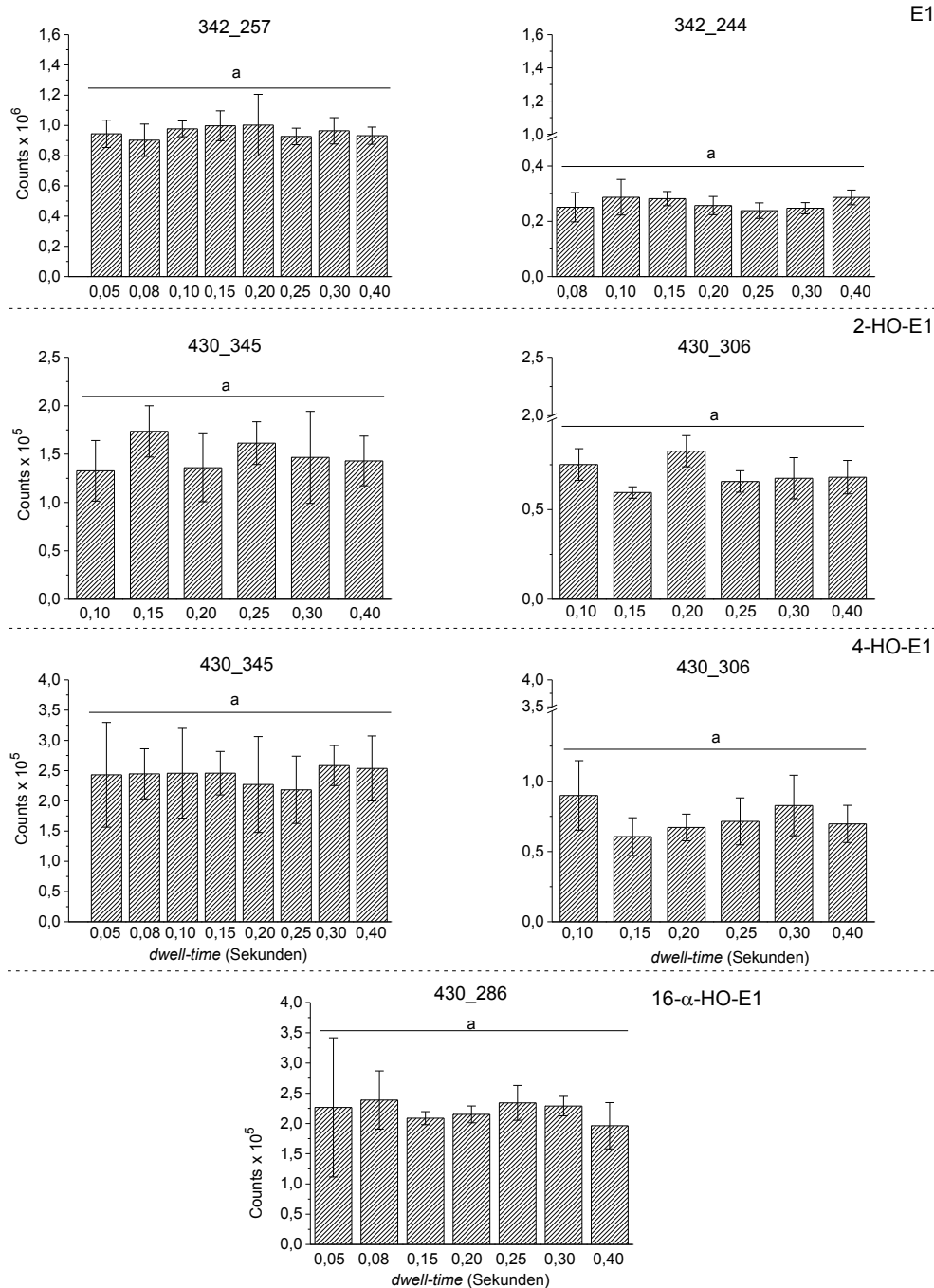


Abb. 93: Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E1 und E1-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachmessung) im MRM-Modus. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (342_257, 430_345 und 430_286) und *Qualifier*-Übergangs (342_244 und 430_306) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; m Analyt/Säule = 1 pg für E1; 10 pg für 2-/4-HO-E1; 5 pg für 16-α-HO-E1. Injektionsvolumen: 1 µl. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, p < 0,05). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 63 - Tab. 65.

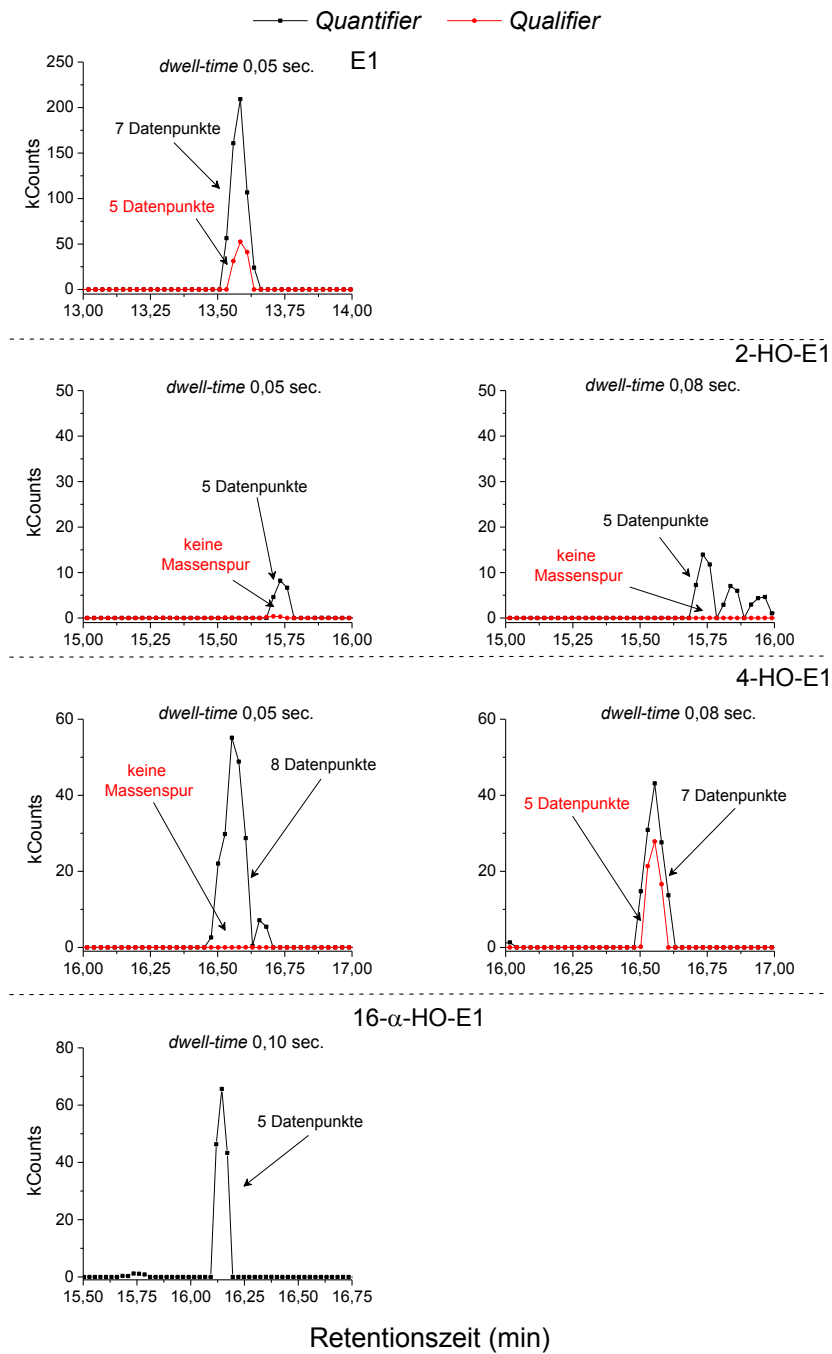


Abb. 94: Exemplarische Chromatogramme zur Optimierung des Quantifier- und Qualifier-Übergangs von E1 und E1-Hydroxylierungsprodukten bezüglich der dwell-time. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus. Dargestellt sind die extrahierten Quantifier- (schwarz) und Qualifier-Massenspuren (rot) bei einer unterschiedlich langen dwell-time; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 1 \text{ pg}$ für E1; 10 pg für 2-/4-HO-E1; 5 pg für 16- α -HO-E1. Injektionsvolumen: $1 \text{ }\mu\text{l}$. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

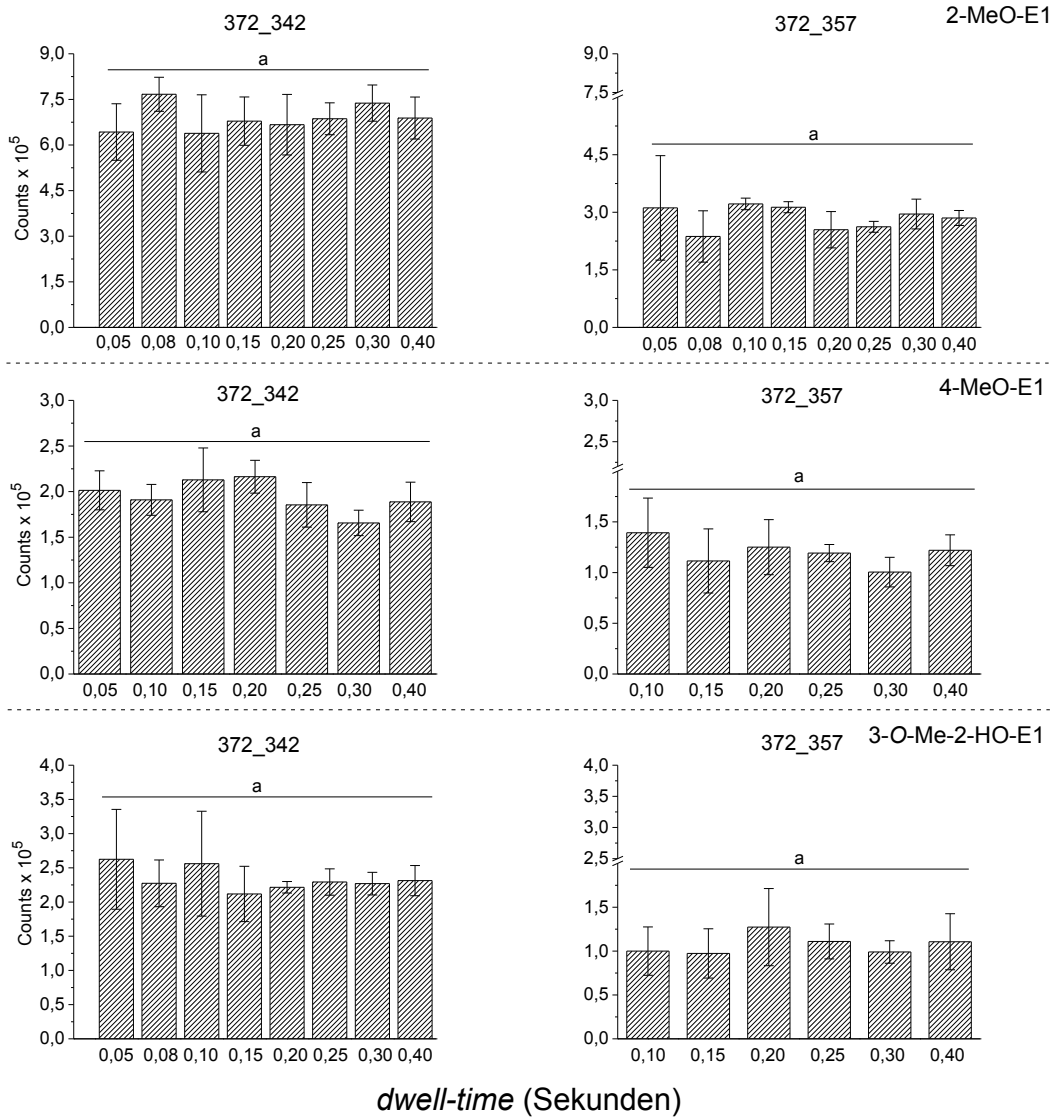


Abb. 95: Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von E1-Methylierungsprodukten bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels *GC/MS/MS* (jeweils Zweifachmessung) im *MRM*-Modus. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des *Quantifier*- (372_342) und *Qualifier*-Übergangs (372_357) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 66 - Tab. 68.

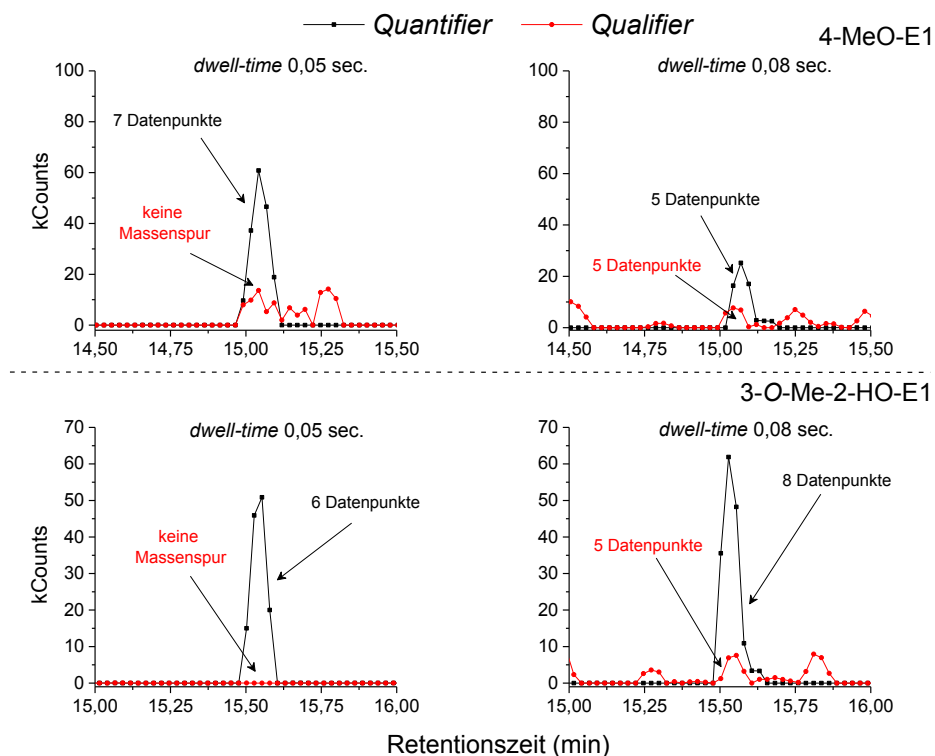


Abb. 96: Exemplarische Chromatogramme zur Optimierung des *Quantifier*- und *Qualifier*-Übergangs von 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 bezüglich der *dwell-time*. Analyse mittels GC/MS/MS im *MRM*-Modus. Dargestellt sind die extrahierten *Quantifier*- (schwarz) und *Qualifier*-Massenspuren (rot) bei einer unterschiedlich langen *dwell-time*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2$. Injektionsvolumen: 1 μl . Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

ANHANG

Tab. 55: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 416_285 (Q) sowie des Übergangs 416_326 (q) von 2 pg E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier E2 (416_285)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	135.159	5	215.533	7	270.053	6
M2	0,05	214.328	7	202.152	5	311.006	7
M1	0,08	340.697	6	138.546	7	286.781	7
M2	0,08	193.536	8	227.513	5	218.853	7
M1	0,10	193.260	6	259.450	7	235.058	7
M2	0,10	285.625	7	274.508	7	188.311	7
M1	0,15	209.181	7	248.647	6	248.075	6
M2	0,15	156.334	6	309.319	6	222.282	6
M1	0,20	268.074	7	204.814	7	272.093	6
M2	0,20	212.526	8	229.060	8	267.289	6
M1	0,25	210.955	7	268.369	6	243.025	6
M2	0,25	240.777	6	214.003	8	254.912	6
M1	0,30	126.346	7	225.556	7	203.274	7
M2	0,30	169.852	6	155.701	7	236.092	9
M1	0,40	200.999	8	219.612	7	247.723	7
M2	0,40	219.171	7	254.170	7	220.321	6
Qualifier E2 (416_326)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	107.244	5	156.031	5	190.636	6
M2	0,05	97.661	6	176.581	6	35.354	7
M1	0,08	118.349	7	263.407	7	186.010	6
M2	0,08	227.255	6	225.025	7	106.322	8
M1	0,10	245.064	8	152.863	7	136.861	7
M2	0,10	155.099	8	84.693	6	215.389	7
M1	0,15	145.226	6	123.970	6	178.852	7
M2	0,15	108.571	6	104.583	6	175.128	7
M1	0,20	183.458	6	122.816	6	151.067	8
M2	0,20	144.973	7	127.207	7	120.457	7
M1	0,25	138.571	6	109.345	7	112.073	7
M2	0,25	165.560	7	167.720	6	128.888	7
M1	0,30	222.205	6	127.676	7	147.206	7
M2	0,30	144.106	6	151.724	7	88.513	6
M1	0,40	158.425	6	132.101	7	178.654	9
M2	0,40	135.266	6	162.468	8	199.529	8

ANHANG

Tab. 56: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2-HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 504_373 (Q) sowie des Übergangs 504_325 (q) von 10 pg 2-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 2-HO-E2 (504_373)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	196.607	8	274.431	7	166.637	6
M2	0,05	163.042	6	197.278	7	233.098	9
M1	0,08	386.632	7	342.926	8	174.157	7
M2	0,08	182.752	8	166.294	8	169.058	8
M1	0,10	159.893	9	177.649	8	208.831	8
M2	0,10	198.229	9	276.269	9	159.262	7
M1	0,15	356.260	8	170.214	6	196.218	7
M2	0,15	248.574	7	215.109	7	234.178	7
M1	0,20	240.027	8	167.063	7	231.511	7
M2	0,20	234.837	7	165.057	7	231.562	7
M1	0,25	204.086	9	118.436	7	183.734	7
M2	0,25	214.835	7	169.580	7	241.407	7
M1	0,30	243.598	8	161.184	7	212.688	8
M2	0,30	207.978	7	144.272	6	185.459	7
M1	0,40	185.954	8	189.073	7	219.862	8
M2	0,40	182.377	6	199.097	6	220.642	8
Qualifier 2-HO-E2 (504_325)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	245.016	7	95.209	6	158.356	7
M2	0,05	147.347	6	71.204	5	165.523	7
M1	0,08	185.458	8	111.457	7	68.657	5
M2	0,08	141.122	6	94.381	7	232.268	7
M1	0,10	95.203	7	71.728	9	142.847	7
M2	0,10	201.224	8	115.861	6	130.468	6
M1	0,15	133.309	7	85.908	7	169.654	7
M2	0,15	181.597	8	113.009	8	89.156	7
M1	0,20	123.574	8	111.748	8	125.937	8
M2	0,20	160.843	9	107.191	7	118.996	6
M1	0,25	143.340	10	103.428	7	131.080	6
M2	0,25	131.896	10	105.869	7	141.594	8
M1	0,30	125.065	8	104.477	8	131.943	8
M2	0,30	150.871	7	117.571	9	138.217	8
M1	0,40	124.513	7	107.650	8	130.249	7
M2	0,40	124.221	8	124.239	9	139.649	10

ANHANG

Tab. 57: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 4-HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 504_373 (Q) sowie des Übergangs 504_325 (q) von 10 pg 4-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 4-HO-E2 (504_373)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	204.481	7	160.863	8	242.893	9
M2	0,05	163.020	6	121.932	6	169.390	7
M1	0,08	367.472	9	220.365	7	206.585	8
M2	0,08	60.028	7	197.382	6	250.517	9
M1	0,10	292.964	7	260.491	9	232.591	7
M2	0,10	272.242	8	229.584	8	236.025	7
M1	0,15	256.958	7	211.850	8	222.279	7
M2	0,15	263.373	7	228.802	6	244.497	7
M1	0,20	244.334	8	248.224	7	225.158	8
M2	0,20	265.420	9	175.376	6	295.044	7
M1	0,25	258.160	10	265.468	8	225.249	6
M2	0,25	271.104	8	226.759	7	269.030	7
M1	0,30	291.499	6	230.030	7	247.522	8
M2	0,30	239.118	8	244.837	8	246.177	8
M1	0,40	290.842	7	202.867	9	261.001	8
M2	0,40	204.626	8	210.630	7	266.959	8
Qualifier 4-HO-E2 (504_325)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	384.776	8	246.793	7	224.448	5
M2	0,05	207.264	7	207.267	7	86.982	7
M1	0,08	336.734	7	233.017	8	390.806	7
M2	0,08	184.106	7	134.839	9	338.096	8
M1	0,10	236.667	7	149.176	7	115.825	8
M2	0,10	241.662	8	149.583	7	193.503	5
M1	0,15	256.299	7	228.163	7	286.069	8
M2	0,15	265.503	6	207.887	8	223.302	7
M1	0,20	245.927	7	121.953	8	275.409	7
M2	0,20	173.712	7	198.536	7	213.373	7
M1	0,25	198.967	8	185.123	8	226.756	7
M2	0,25	233.525	8	219.376	8	206.770	7
M1	0,30	336.886	9	161.099	8	226.112	7
M2	0,30	237.299	7	183.071	8	175.129	7
M1	0,40	245.872	7	200.729	10	208.129	8
M2	0,40	219.912	7	239.046	7	223.585	7

ANHANG

Tab. 58: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 16- α -HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 504_373 (Q) sowie des Übergangs 504_325 (q) von 10 pg 16- α -HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 16-α-HO-E2 (504_414)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	202.356	5	300.827	8	177.216	6
M2	0,05	149.284	6	167.790	8	203.513	7
M1	0,08	243.274	7	228.065	8	258.875	7
M2	0,08	237.247	8	225.481	7	161.982	7
M1	0,10	241.714	8	256.414	8	231.829	9
M2	0,10	150.529	7	146.567	8	184.900	9
M1	0,15	200.072	7	180.255	8	220.066	7
M2	0,15	227.491	7	193.334	8	246.020	10
M1	0,20	147.063	7	234.167	7	227.846	7
M2	0,20	213.044	7	181.613	7	251.943	10
M1	0,25	161.679	8	196.830	7	193.642	8
M2	0,25	217.378	7	235.249	8	155.853	7
M1	0,30	211.773	7	227.553	9	228.669	8
M2	0,30	235.951	7	217.226	9	220.101	7
M1	0,40	207.025	7	169.049	8	211.257	9
M2	0,40	183.603	9	174.403	8	183.936	10
Qualifier 16-α-HO-E2 (504_324)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	166.910	7	159.778	7	48.430	5
M2	0,05	324.466	6	53.598	7	118.634	6
M1	0,08	88.220	9	257.074	10	151.872	5
M2	0,08	116.471	6	228.065	8	186.036	8
M1	0,10	176.612	6	227.037	7	163.958	7
M2	0,10	188.000	7	152.149	7	113.051	7
M1	0,15	150.706	7	195.932	9	129.077	7
M2	0,15	107.383	8	100.500	8	156.982	7
M1	0,20	183.679	10	181.273	8	110.863	10
M2	0,20	109.093	8	185.713	8	146.978	10
M1	0,25	200.876	8	195.020	9	198.117	8
M2	0,25	127.605	7	117.479	7	122.177	8
M1	0,30	214.154	7	199.195	9	147.458	7
M2	0,30	151.476	9	171.621	8	193.696	9
M1	0,40	168.836	8	179.111	8	152.755	8
M2	0,40	155.271	9	138.444	8	143.799	7

ANHANG

Tab. 59: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2-MeO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_315 (Q) sowie des Übergangs 446_325 (q) von 2,5 pg 2-MeO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 2-MeO-E2 (446_315)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	145.564	8	107.699	7	309.085	8
M2	0,05	162.922	7	229.477	7	166.817	5
M1	0,08	183.451	7	251.321	7	242.979	9
M2	0,08	264.824	8	160.878	7	154.533	10
M1	0,10	293.539	8	216.633	10	274.159	7
M2	0,10	168.230	7	290.810	8	286.052	8
M1	0,15	329.715	10	207.776	7	230.304	7
M2	0,15	249.758	8	263.869	8	238.302	8
M1	0,20	251.393	7	222.407	8	186.884	7
M2	0,20	269.730	7	214.738	7	218.185	7
M1	0,25	222.272	7	236.269	7	167.365	6
M2	0,25	265.490	8	264.026	7	246.556	7
M1	0,30	309.122	7	181.038	7	230.917	7
M2	0,30	200.007	8	180.177	6	222.411	7
M1	0,40	207.812	7	250.658	6	205.724	7
M2	0,40	210.679	7	190.615	6	205.899	6
Qualifier 2-MeO-E2 (446_325)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	95.346	7	124.370	7	144.101	7
M2	0,05	125.263	7	183.503	6	178.312	6
M1	0,08	137.003	6	158.147	7	145.412	9
M2	0,08	233.488	9	144.829	6	100.174	7
M1	0,10	133.035	6	222.918	7	155.229	7
M2	0,10	153.888	8	111.051	7	195.369	6
M1	0,15	119.548	7	192.497	8	122.641	7
M2	0,15	165.084	7	205.214	7	134.711	10
M1	0,20	169.335	8	236.515	9	124.163	7
M2	0,20	158.830	7	129.203	8	162.500	6
M1	0,25	114.490	6	181.233	6	127.527	7
M2	0,25	156.253	6	134.631	6	129.475	8
M1	0,30	165.640	6	159.282	7	117.197	8
M2	0,30	133.953	6	143.381	7	174.333	9
M1	0,40	197.443	6	137.604	8	166.477	7
M2	0,40	107.171	6	180.680	8	136.823	8

ANHANG

Tab. 60: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 4-MeO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_315 (Q) sowie des Übergangs 446_325 (q) von 2,5 pg 4-MeO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 4-MeO-E2 (446_315)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	427.967	8	410.875	6	550.665	7
M2	0,05	628.818	7	427.155	6	418.890	6
M1	0,08	494.686	7	447.203	7	483.141	7
M2	0,08	428.823	6	500.768	8	529.922	9
M1	0,10	507.984	9	431.229	10	578.876	6
M2	0,10	459.662	7	508.500	8	435.748	7
M1	0,15	594.931	8	470.165	8	402.612	7
M2	0,15	469.149	6	485.743	7	342.749	7
M1	0,20	507.562	8	449.009	8	561.242	7
M2	0,20	489.169	8	465.894	7	368.247	7
M1	0,25	396.185	7	458.263	8	571.070	7
M2	0,25	495.707	7	458.542	7	466.004	6
M1	0,30	530.443	8	488.611	7	550.440	6
M2	0,30	467.041	7	465.652	8	448.463	7
M1	0,40	510.568	7	487.502	8	455.256	7
M2	0,40	418.614	7	419.885	7	425.352	8
Qualifier 4-MeO-E2 (446_325)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	273.118	7	475.679	7	364.039	6
M2	0,05	304.069	6	438.749	7	453.419	7
M1	0,08	355.967	8	433.989	6	281.518	8
M2	0,08	278.353	6	335.956	6	365.285	7
M1	0,10	408.023	7	272.572	6	323.025	7
M2	0,10	327.865	7	265.445	7	382.252	8
M1	0,15	410.498	6	416.411	6	294.418	6
M2	0,15	494.018	8	323.750	7	290.804	8
M1	0,20	411.668	6	477.609	7	408.161	7
M2	0,20	384.767	6	332.759	7	271.803	9
M1	0,25	266.244	7	374.099	7	312.596	8
M2	0,25	257.366	8	357.651	7	351.564	8
M1	0,30	343.087	7	357.908	8	326.683	7
M2	0,30	364.478	7	383.843	7	282.756	7
M1	0,40	375.215	7	343.439	7	355.908	7
M2	0,40	357.094	7	376.901	7	340.795	7

ANHANG

Tab. 61: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 3-O-Me-2-HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_315 (Q) sowie des Übergangs 446_325 (q) von 10 pg 3-O-Me-2-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 3-O-Me-2-HO-E2 (446_315)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	233.709	7	139.870	7	131.012	9
M2	0,05	-	-	-	-	199.927	7
M1	0,08	105.458	6	94.304	7	126.434	6
M2	0,08	47.972	6	28.320	5	111.098	6
M1	0,10	71.441	7	154.513	6	95.988	6
M2	0,10	76.823	7	51.716	7	148.688	6
M1	0,15	49.269	7	133.294	7	46.776	8
M2	0,15	121.665	8	66.726	7	75.693	6
M1	0,20	79.719	7	78.250	8	84.201	8
M2	0,20	98.479	7	66.157	7	58.555	7
M1	0,25	77.089	6	90.442	8	132.036	7
M2	0,25	131.823	8	101.454	8	75.112	8
M1	0,30	105.022	7	86.680	8	134.506	7
M2	0,30	78.684	7	77.503	8	75.258	7
M1	0,40	113.129	8	75.382	6	87.263	6
M2	0,40	62.416	8	79.164	6	98.347	7
Qualifier 3-O-Me-2-HO-E2 (446_416)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	-	-	-	-	83.958	8
M2	0,05	-	-	127.391	6	-	-
M1	0,08	64.144	6	-	-	35.759	6
M2	0,08	71.433	5	-	-	45.956	6
M1	0,10	67.322	7	40.136	7	79.371	6
M2	0,10	66.173	6	40.014	6	43.771	6
M1	0,15	40.519	6	72.187	7	73.623	6
M2	0,15	83.887	6	21.566	6	36.559	7
M1	0,20	39.329	7	39.835	7	40.237	6
M2	0,20	36.243	7	38.122	5	78.669	9
M1	0,25	49.562	7	47.107	6	55.593	6
M2	0,25	36.094	9	64.084	7	58.617	7
M1	0,30	55.011	7	37.148	6	33.792	8
M2	0,30	49.527	7	46.302	8	50.461	7
M1	0,40	41.532	9	46.879	8	34.507	7
M2	0,40	59.626	8	57.872	7	45.575	7

ANHANG

Tab. 62: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 3-O-Me-4-HO-E2. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 446_315 (Q) sowie des Übergangs 446_325 (q) von 10 pg 3-O-Me-4-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 3-O-Me-4-HO-E2 (446_315)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	220.919	7	255.583	6	203.293	6
M2	0,05	287.069	7	203.061	8	321.177	8
M1	0,08	223.060	8	313.593	7	239.463	8
M2	0,08	264.466	7	169.391	8	243.230	7
M1	0,10	273.388	7	258.266	6	260.215	7
M2	0,10	291.828	6	386.777	8	275.386	8
M1	0,15	261.401	7	273.868	8	227.875	9
M2	0,15	180.994	8	266.905	7	249.019	7
M1	0,20	286.340	7	210.694	8	316.396	7
M2	0,20	235.395	7	246.421	7	292.118	7
M1	0,25	204.562	7	348.760	9	239.880	10
M2	0,25	265.749	7	247.214	8	308.543	8
M1	0,30	257.387	8	272.397	7	254.818	7
M2	0,30	270.960	7	210.057	7	246.222	6
M1	0,40	152.569	9	240.144	8	242.127	8
M2	0,40	186.742	7	287.891	8	243.972	8
Qualifier 3-O-Me-4-HO-E2 (446_416)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	233.252	8	128.165	6	334.447	8
M2	0,05	188.361	7	302.051	8	202.678	8
M1	0,08	92.757	6	192.615	7	112.181	7
M2	0,08	203.309	7	222.414	8	220.075	9
M1	0,10	160.794	6	200.058	7	194.382	8
M2	0,10	169.942	7	106.960	7	156.558	8
M1	0,15	175.318	7	279.321	9	194.345	8
M2	0,15	154.597	7	223.601	8	273.014	6
M1	0,20	151.558	7	205.788	6	221.670	6
M2	0,20	164.229	7	219.715	8	243.603	7
M1	0,25	190.759	8	209.351	7	125.863	6
M2	0,25	181.409	9	163.189	7	196.498	7
M1	0,30	172.840	9	225.800	7	203.340	7
M2	0,30	185.001	9	229.404	7	166.845	8
M1	0,40	166.419	7	166.684	7	199.184	7
M2	0,40	176.040	8	198.671	9	188.322	8

ANHANG

Tab. 63: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quantifier*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 342_257 (Q) sowie des Übergangs 342_244 (q) von 1 pg E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier E1 (342_257)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	998.491	9	777.142	7	1.192.000	7
M2	0,05	924.711	7	915.627	7	857.599	7
M1	0,08	1.200.000	7	957.768	7	1.060.000	7
M2	0,08	747.591	7	601.616	7	845.815	7
M1	0,10	940.903	7	794.825	9	979.182	7
M2	0,10	1.127.000	7	1.068.000	6	954.395	7
M1	0,15	1.067.000	7	832.927	7	987.724	7
M2	0,15	1.123.000	7	962.208	7	1.013.000	7
M1	0,20	1.173.000	7	875.895	7	890.252	8
M2	0,20	1.288.000	7	804.267	7	979.872	8
M1	0,25	961.346	7	873.040	7	937.412	7
M2	0,25	1.019.000	7	920.163	7	851.722	7
M1	0,30	978.988	7	864.486	7	933.160	7
M2	0,30	1.149.000	7	942.240	7	918.452	6
M1	0,40	959.331	7	842.782	7	968.888	7
M2	0,40	904.237	6	908.339	6	1.009.000	7
Qualifier E1 (342_244)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	375.455	7	354.306	6	307.983	6
M2	0,05	424.629	7	467.049	10	191.691	5
M1	0,08	326.533	7	237.956	7	202.002	7
M2	0,08	113.841	8	203.349	8	507.217	8
M1	0,10	399.727	6	211.116	8	176.381	8
M2	0,10	370.764	7	292.872	7	319.446	7
M1	0,15	343.770	7	260.142	7	243.832	7
M2	0,15	239.844	7	245.713	7	359.273	7
M1	0,20	247.993	9	234.655	7	195.757	6
M2	0,20	331.994	9	279.458	8	252.327	9
M1	0,25	228.770	7	231.699	9	270.132	8
M2	0,25	308.424	7	193.575	9	199.118	7
M1	0,30	252.962	7	273.293	6	177.058	7
M2	0,30	247.681	7	259.139	8	275.080	7
M1	0,40	325.810	7	320.410	7	305.691	6
M2	0,40	308.301	7	224.903	6	233.120	7

ANHANG

Tab. 64: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2-HO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 430_345 (Q) sowie des Übergangs 430_306 (q) von 10 pg 2-HO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 2-HO-E1 (430_345)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	79.026	5	254.629	6	210.834	7
M2	0,05	195.314	6	152.891	8	101.479	7
M1	0,08	39.411	5	126.171	9	50.774	5
M2	0,08	217.790	6	165.319	7	110.483	7
M1	0,10	91.521	6	128.035	7	119.551	8
M2	0,10	128.009	7	208.718	7	120.483	10
M1	0,15	174.258	7	206.499	7	176.398	8
M2	0,15	127.466	7	198.764	9	157.690	8
M1	0,20	175.970	9	155.520	8	110.358	8
M2	0,20	171.306	7	104.325	7	97.993	7
M1	0,25	164.195	8	154.858	7	190.431	7
M2	0,25	196.291	8	178.685	7	83.745	9
M1	0,30	185.538	7	151.437	6	76.032	7
M2	0,30	172.817	7	185.962	8	108.102	7
M1	0,40	141.553	7	166.854	7	124.970	7
M2	0,40	163.638	7	158.072	7	102.742	8
Qualifier 2-HO-E1 (430_306)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	-	-	49.473	6	86.065	7
M2	0,05	42.832	6	215.359	6	-	-
M1	0,08	-	-	31.486	7	-	-
M2	0,08	33.637	7	62.513	6	-	-
M1	0,10	98.686	6	80.418	8	74.221	7
M2	0,10	44.213	7	89.933	7	63.163	7
M1	0,15	27.585	8	63.225	7	49.330	8
M2	0,15	89.772	6	62.846	6	64.296	7
M1	0,20	48.087	6	57.344	6	93.155	7
M2	0,20	111.231	6	93.971	6	91.534	6
M1	0,25	65.763	9	72.888	8	37.441	6
M2	0,25	52.361	8	68.697	9	96.669	6
M1	0,30	56.593	9	77.165	8	67.473	7
M2	0,30	67.886	8	84.129	9	51.510	8
M1	0,40	70.767	9	66.571	6	59.436	8
M2	0,40	67.764	7	86.789	9	56.964	7

ANHANG

Tab. 65: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti-* (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 4-HO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 430_345 (Q) und 430_306 (q) von 10 pg 4-HO-E1 sowie des Übergangs 430_286 (Q) von 5 pg 16- α -HO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 4-HO-E1 (430_345)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	234.589	8	484.652	7	207.410	7
M2	0,05	288.369	8	153.298	8	90.188	7
M1	0,08	256.984	7	235.213	9	200.448	7
M2	0,08	176.189	7	349.305	9	249.931	6
M1	0,10	206.037	7	390.808	7	171.072	8
M2	0,10	381.262	8	175.583	7	149.383	8
M1	0,15	287.266	7	235.701	9	258.147	8
M2	0,15	286.746	8	206.597	10	200.262	9
M1	0,20	279.407	7	213.532	8	142.780	8
M2	0,20	316.327	8	269.983	8	140.140	8
M1	0,25	275.517	9	213.404	7	133.836	7
M2	0,25	246.480	8	263.397	7	177.030	8
M1	0,30	263.879	9	292.249	8	259.012	7
M2	0,30	305.610	8	246.124	7	183.261	7
M1	0,40	293.297	9	276.799	7	184.768	8
M2	0,40	328.734	7	213.824	7	224.078	7
Qualifier 4-HO-E1 (430_306)							
M1	0,05	133.188	8	81.505	8	97.817	6
M2	0,05	-	-	62.011	6	-	-
M1	0,08	79.656	6	44.549	7	91.378	5
M2	0,08	54.544	7	33.496	9	130.537	6
M1	0,10	101.644	6	142.154	7	90.045	10
M2	0,10	110.253	8	62.550	7	32.731	6
M1	0,15	31.302	8	55.400	6	104.520	8
M2	0,15	89.772	8	39.079	7	43.648	7
M1	0,20	60.059	6	101.064	9	78.798	7
M2	0,20	64.882	8	55.032	8	43.017	6
M1	0,25	123.483	10	68.040	9	59.051	7
M2	0,25	48.376	10	82.605	9	47.293	8
M1	0,30	70.004	8	68.410	7	47.571	9
M2	0,30	139.565	7	95.101	6	75.880	7
M1	0,40	78.888	8	70.503	7	54.328	7
M2	0,40	66.711	8	91.592	7	56.061	7
Quantifier 16-α-HO-E1 (430_286)							
M1	0,05	401.944	8	141.183	7	297.346	7
M2	0,05	279.382	7	79.862	8	160.102	8
M1	0,08	287.010	6	194.272	7	326.943	8
M2	0,08	229.984	9	173.613	8	221.154	6
M1	0,10	238.988	5	134.526	7	138.908	7
M2	0,10	127.922	9	144.362	7	168.001	6
M1	0,15	235.383	7	210.004	8	190.383	8
M2	0,15	159.573	6	209.935	7	247.487	7
M1	0,20	219.899	7	270.967	7	204.837	7
M2	0,20	237.336	8	160.522	8	196.987	9
M1	0,25	282.352	8	301.959	10	227.369	7
M2	0,25	169.761	7	230.248	8	193.237	9
M1	0,30	214.826	7	267.658	8	262.785	7
M2	0,30	233.210	8	225.894	7	168.523	7
M1	0,40	275.168	7	230.264	8	174.394	10
M2	0,40	178.271	7	187.605	7	132.217	7

ANHANG

Tab. 66: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti*- (Q) und *Qualifier*-Übergangs (q) von 2-MeO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 372_342 (Q) sowie des Übergangs 372_357 (q) von 2 pg 2-MeO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 2-MeO-E1 (372_342)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	714.398	7	680.682	7	767.761	8
M2	0,05	372.190	7	774.271	7	546.262	7
M1	0,08	664.683	7	801.512	7	887.568	7
M2	0,08	743.621	8	822.710	7	680.640	7
M1	0,10	534.499	8	849.769	8	602.402	7
M2	0,10	633.906	8	716.562	7	492.350	7
M1	0,15	735.196	7	783.812	9	662.185	9
M2	0,15	678.235	8	695.930	8	515.015	7
M1	0,20	619.154	8	673.679	7	584.765	8
M2	0,20	536.650	8	875.362	8	711.640	8
M1	0,25	636.641	7	684.539	8	764.120	7
M2	0,25	643.072	7	667.109	8	721.998	8
M1	0,30	806.394	8	791.187	7	880.729	8
M2	0,30	549.338	8	685.871	7	713.076	7
M1	0,40	588.942	7	716.440	7	697.286	7
M2	0,40	662.371	7	808.598	7	658.686	7
Qualifier 2-MeO-E1 (372_357)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	205.565	9	393.632	8	502.380	8
M2	0,05	149.285	9	220.917	8	397.160	9
M1	0,08	250.279	8	178.731	7	369.846	7
M2	0,08	127.885	6	238.519	6	257.236	6
M1	0,10	409.530	9	413.086	7	253.283	6
M2	0,10	216.242	9	265.361	12	373.220	6
M1	0,15	244.007	9	343.863	9	362.017	7
M2	0,15	366.248	10	315.867	7	247.320	6
M1	0,20	243.033	6	260.011	8	180.648	6
M2	0,20	310.515	8	313.720	7	219.956	7
M1	0,25	209.629	9	255.095	7	326.425	7
M2	0,25	282.120	7	283.832	8	216.324	9
M1	0,30	262.077	9	349.325	9	281.340	9
M2	0,30	329.353	9	319.135	7	231.572	11
M1	0,40	245.647	7	286.438	8	276.094	7
M2	0,40	281.697	10	317.263	7	303.665	8

ANHANG

Tab. 67: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti* (Q)- und *Qualifier*-Übergangs (q) von 4-MeO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 372_342 (Q) sowie des Übergangs 372_357 (q) von 2 pg 4-MeO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 4-MeO-E1 (372_342)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	94.838	10	193.106	6	263.144	7
M2	0,05	266.393	7	253.426	7	137.428	9
M1	0,08	102.499	5	166.196	6	118.429	9
M2	0,08	198.331	6	176.187	6	200.867	6
M1	0,10	115.585	7	298.309	7	164.153	6
M2	0,10	227.740	7	97.378	6	242.448	8
M1	0,15	177.311	7	220.530	6	254.441	8
M2	0,15	167.921	6	251.342	6	205.741	7
M1	0,20	259.570	7	193.953	8	203.858	6
M2	0,20	208.709	9	239.281	7	192.497	7
M1	0,25	128.570	8	155.249	7	247.069	6
M2	0,25	186.586	6	236.557	6	158.777	7
M1	0,30	139.892	7	172.993	8	157.482	7
M2	0,30	197.297	7	182.684	8	143.485	7
M1	0,40	159.418	6	194.933	7	194.131	8
M2	0,40	174.037	7	183.900	9	225.859	7
Qualifier 4-MeO-E1 (372_357)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	-	-	138.171	6	57.503	6
M2	0,05	-	-	140.681	6	137.557	6
M1	0,08	31.463	5	226.141	8	223.933	8
M2	0,08	121.055	10	222.156	11	196.697	6
M1	0,10	127.104	8	115.294	6	204.333	7
M2	0,10	119.566	8	116.768	7	152.651	8
M1	0,15	155.995	9	104.565	6	70.269	6
M2	0,15	134.572	8	108.326	6	95.138	11
M1	0,20	132.800	8	162.350	9	98.569	9
M2	0,20	103.264	8	147.722	6	105.754	7
M1	0,25	132.195	10	143.338	7	117.808	8
M2	0,25	124.434	9	92.049	7	105.545	6
M1	0,30	64.592	8	75.255	6	134.184	8
M2	0,30	122.153	7	106.332	7	100.305	7
M1	0,40	112.942	8	87.189	11	144.953	7
M2	0,40	107.246	7	146.299	10	133.229	9

ANHANG

Tab. 68: Rohdaten zur Optimierung der *dwell-time* des *Quanti* (Q)- und *Qualifier*-Übergangs (q) von 3-O-Me-2-HO-E1. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des Übergangs 372_342 (Q) sowie des Übergangs 372_357 (q) von 2 pg 3-O-Me-2-HO-E1. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Quantifier 3-O-Me-2-HO-E1 (372_342)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	315.110	7	202.799	6	206.254	8
M2	0,05	354.190	7	325.184	6	171.163	6
M1	0,08	248.087	6	251.281	8	119.353	7
M2	0,08	227.827	8	258.657	9	258.914	6
M1	0,10	246.250	8	256.153	10	204.088	9
M2	0,10	291.659	7	394.828	7	143.576	7
M1	0,15	259.569	9	152.339	8	185.708	8
M2	0,15	247.274	7	193.228	7	232.765	8
M1	0,20	201.222	8	220.763	8	178.383	10
M2	0,20	251.884	9	231.752	8	245.374	9
M1	0,25	232.509	8	246.359	7	202.993	10
M2	0,25	250.662	10	231.715	6	211.240	7
M1	0,30	270.266	7	213.285	7	218.522	9
M2	0,30	221.242	8	227.184	7	210.920	9
M1	0,40	245.547	6	244.299	8	195.404	7
M2	0,40	221.532	7	260.028	7	220.868	8
Qualifier 3-O-Me-2-HO-E1 (372_357)							
Messung	<i>dwell-time</i> (sec.)	Probe 1 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 2 (Counts)	Anzahl Datenpunkte	Probe 3 (Counts)	Anzahl Datenpunkte
M1	0,05	115.340	6	-	-	144.506	5
M2	0,05	321.529	7	169.898	6	160.153	8
M1	0,08	87.532	8	29.181	5	67.407	7
M2	0,08	194.784	8	96.106	6	63.190	8
M1	0,10	79.990	7	70.241	6	157.373	6
M2	0,10	148.107	9	66.233	7	77.921	6
M1	0,15	122.262	7	78.263	6	119.149	9
M2	0,15	119.366	7	54.290	7	90.687	8
M1	0,20	83.780	7	163.662	8	96.862	8
M2	0,20	254.085	8	99.791	7	65.656	6
M1	0,25	92.817	6	142.744	7	96.862	11
M2	0,25	173.956	6	65.194	8	65.656	7
M1	0,30	69.148	6	72.139	9	85.609	7
M2	0,30	158.399	8	112.538	8	96.107	9
M1	0,40	92.047	6	75.773	7	75.920	6
M2	0,40	174.412	7	72.482	7	173.152	7

Referenzspezifische Kenndaten von E1- und E2-Metaboliten

Tab 69: RT der entsprechenden *Quantifier*-Massenspur. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion, grau/schwarz hervorgehoben). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E2	E2-d₃	2-HO-E2	2-HO-E2-d₃	4-HO-E2	4-HO-E2-d₃	16-α-HO-E2	16-α-HO-E2-d₃
13,549	13,527	15,650	15,621	16,401	16,372	16,798	16,738
13,548	13,525	15,636	15,621	16,398	16,372	16,758	16,739
13,547	13,524	15,638	15,622	16,403	16,373	16,762	16,739
13,550	13,522	15,642	15,620	16,396	16,372	16,754	16,738
13,551	13,524	15,653	15,625	16,400	16,374	16,755	16,741
13,553	13,525	15,647	15,624	16,397	16,374	16,762	16,737
2-MeO-E2	2-MeO-E2-d₃	4-MeO-E2	4-MeO-E2-d₃	3-O-Me-2-HO-E2	3-O-Me-2-HO-E2-d₃	3-O-Me-4-HO-E2	3-O-Me-4-HO-E2-d₃
15,658	15,641	14,989	14,959	15,511	15,485	15,820	15,794
15,661	15,639	14,987	14,961	15,513	15,485	15,855	15,792
15,664	15,639	14,987	14,958	15,506	15,486	15,825	15,792
15,662	15,638	14,986	14,957	15,500	15,481	15,815	15,791
15,663	15,640	14,986	14,960	15,509	15,487	15,818	15,789
15,669	15,642	14,990	14,959	15,522	15,485	15,815	15,789
E1	E1-d₄	2-HO-E1	2-HO-E1-d₄	4-HO-E1	4-HO-E1-d₄	16-α-HO-E1	16-α-HO-E1-d₄
13,152	13,108	15,219	15,178	16,009	15,960	15,624	15,177
13,150	13,112	15,219	15,175	16,015	15,959	15,632	15,176
13,152	13,107	15,220	15,177	16,000	15,961	15,622	15,176
13,154	13,107	15,220	15,176	15,998	15,959	15,624	15,176
13,155	13,109	15,226	15,179	15,997	15,963	15,624	15,179
13,156	13,109	15,230	15,177	16,018	15,961	15,621	15,178
2-MeO-E1	2-MeO-E1-d₄	4-MeO-E1	4-MeO-E1-d₄	3-O-Me-2-HO-E1	3-O-Me-2-HO-E1-d₄		
15,153	15,101	14,562	14,511	15,032	14,977		
15,189	15,101	14,597	14,507	15,068	14,977		

Tab. 70: Absolute PF (Counts) von 5 pg E1, E2 sowie der hydroxylierten und methylierten Metabolite. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E2	E2-d₃	2-HO-E2	4-HO-E2	16-α-HO-E2	2-MeO-E2
347.832	306.799	284.988	88.455	71.017	265.979
374.114	305.172	198.591	89.010	109.836	193.962
399.162	351.963	178.087	83.980	110.218	215.973
4-MeO-E2	3-O-Me-2-HO-E2	3-O-Me-4-HO-E2	E1	2-HO-E1	4-HO-E1
212.777	43.264	134.037	512.851	153.918	105.952
188.232	30.427	151.874	510.786	147.626	106.395
238.865	58.874	134.500	388.697	144.314	164.750
16-α-HO-E1	2-MeO-E1	4-MeO-E1	3-O-Me-2-HO-E1		
240.355	220.184	153.490	225.772		
241.779	212.389	223.839	296.521		
260.622	142.938	197.397	225.037		

Tab. 71: Bestimmung des *Quantifier/Qualifier*-Verhältnisses von E1- und E2-Metaboliten. Aufgeführt sind die absoluten PF (Counts) des *Quantifier*- (rechts) und *Qualifier*-Übergangs (links); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E1, 2-/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1; $2,5 \text{ pg} = \text{E2}$ und 2-/4-MeO-E2; $10 \text{ pg} = 2\text{-}/4\text{-HO-E1}$, 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2 und 3-O-Me-2-/4-HO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion, grau/schwarz hervorgehoben). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E2 (416_285)	E2 (416_326)	2-HO-E2 (504_373)	2-HO-E2 (504_325)	4-HO-E2 (504_373)	4-HO-E2 (504_325)	16-α-HO-E2 (504_414)	16α-HO-E2 (504_324)
1.022.000	732.382	522.771	332.315	346.207	378.921	389.046	264.348
1.059.000	484.960	470.466	337.636	305.031	300.104	226.704	236.609
932.149	551.981	499.483	368.292	394.095	409.854	270.496	214.002
857.484	564.296	502.290	245.008	408.408	273.800	228.268	232.651
914.173	510.572	470.713	273.799	453.679	339.212	285.972	228.248
760.563	611.076	324.377	345.744	422.684	365.659	247.154	200.217
2-MeO-E2 (446_315)	2-MeO-E2 (446_325)	4-MeO-E2 (446_315)	4-MeO-E2 (446_325)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_315)	3-O-Me-2-HO-E2 (446_416)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_315)	3-O-Me-4-HO-E2 (446_416)
226.027	216.982	562.162	593.037	258.913	110.546	521.034	364.452
274.023	176.836	558.113	601.932	247.896	225.774	521.052	352.044
302.294	186.795	574.424	616.131	228.181	176.943	573.929	539.906
224.650	259.933	581.882	510.180	262.187	135.845	647.228	480.754
305.248	253.095	700.680	570.790	197.089	172.421	439.144	309.726
338.054	235.020	706.274	610.032	243.014	146.405	461.438	311.498
E1 (342_257)	E1 (342_244)	2-HO-E1 (430_345)	2-HO-E1 (430_306)	4-HO-E1 (430_345)	4-HO-E1 (430_306)		
1.217.000	781.322	373.456	191.042	487.569	114.369		
1.310.000	816.472	236.232	170.805	485.612	132.913		
1.046.000	751.879	305.304	114.329	416.835	161.350		
1.108.000	841.504	260.205	126.062	401.488	137.037		
911.661	782.599	337.088	153.366	516.863	123.497		
1.062.000	753.772	334.796	149.910	401.126	130.372		
2-MeO-E1 (372_342)	2-MeO-E1 (372_357)	4-MeO-E1 (372_342)	4-MeO-E1 (372_357)	3-O-Me-2-HO-E1 (372_342)	3-O-Me-2-HO-E1 (372_357)		
780.313	300.273	594.068	263.160	342.150	92.055		
744.595	146.141	537.273	257.409	369.614	139.601		
616.949	332.076	439.785	222.690	348.338	116.764		
778.984	240.667	429.691	196.073	233.483	102.439		
767.892	299.605	527.890	209.129	271.281	114.468		
704.023	252.585	573.757	200.958	346.867	116.922		

Optimierung der Ionenquell-Temperatur

Tab. 72: Optimierung der *Initial*-Temperatur des Temperaturprogrammes von E2-Metaboliten. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) des *Quantifier*-Übergangs von jeweils 10 pg E2, E2-d₃, 2- und 4-HO-E2 sowie 2- und 4-MeO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Initial-Temperatur	E2 (416 285)	E2-d₃ (419 285)	2-HO-E2 (504 373)	4-HO-E2 (504 373)	2-MeO-E2 (446 315)	4-MeO-E2 (446 315)
60°C	1.466.000	651.127	1.003.000	1.507.000	786.368	1.591.000
	1.563.000	515.586	1.066.000	1.469.000	759.645	1.529.000
	1.501.000	507.792	996.962	1.431.000	737.601	1.674.000
70°C	1.218.000	614.804	905.356	1.127.000	662.012	1.439.000
	1.243.000	449.946	832.706	1.274.000	752.427	1.259.000
	1.258.000	438.163	747.944	1.155.000	694.110	1.359.000
80°C	1.295.000	534.366	806.846	1.166.000	666.143	1.370.000
	1.282.000	414.409	847.234	1.207.000	644.105	1.118.000
	1.258.000	483.046	777.192	983.052	632.608	1.302.000
90°C	1.034.000	444.582	675.750	1.019.000	498.562	1.197.000
	1.095.000	362.225	659.463	907.048	544.736	992.706
	1.062.000	447.535	761.799	1.034.000	510.373	1.196.000
100°C	1.187.000	477.387	822.616	949.429	562.153	1.233.000
	1.097.000	440.557	732.543	1.022.000	512.298	1.082.000
	1.216.000	429.747	819.353	1.134.000	550.169	1.280.000

Tab. 73: Optimierung der *Transferline*-Temperatur des Temperaturprogrammes von E2-Metaboliten. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) des *Quantifier*-Übergangs von jeweils 10 pg E2, E2-d₃, 2- und 4-HO-E2 sowie 2- und 4-MeO-E2. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Transferline-Temperatur	E2 (416 285)	d₃-E2 (419 285)	2-HO-E2 (504 373)	4-HO-E2 (504 373)	2-MeO-E2 (446 315)	4-MeO-E2 (446 315)
240°C	1.163.000	665.345	274.322	222.550	488.026	813.867
	1.091.000	718.722	248.579	209.054	564.537	904.937
	1.056.000	607.460	298.397	175.136	403.157	788.083
250°C	1.349.000	740.577	352.671	216.690	512.502	830.711
	1.205.000	740.316	290.948	203.506	567.063	1.006000
	1.272.000	673.051	239.138	194.526	592.126	950.099
260°C	1.423.000	753.568	337.021	260.007	595.671	959.420
	1.507.000	905.585	339.919	243.133	631.373	1.149000
	1.216.000	744.379	369.756	220.738	665.125	1.025000
270°C	1.372.000	885.998	363.706	248.797	701.416	938.863
	1.530.000	880.001	355.677	275.795	646.702	1.033000
	1.488.000	797.085	315.623	284.368	648.484	1.095000
280°C	1.437.000	824.825	352.932	311.051	618.763	1.095000
	1.429.000	882.741	310.644	262.881	740.081	1.082000
	1.339.000	753.394	282.250	219.531	726.927	973.404
285°C	1.426.000	712.919	362.978	250.024	535.765	1.047000
	1.397.000	721.320	273.840	334.629	558.512	1.079000
	1.341.000	774.002	316.116	331.949	610.681	1.002000
290°C	1.176000	788.023	292.071	263.183	522.819	903.421
	1.333000	746.565	345.027	192.139	606.830	903.592
	1.035000	584.369	300.679	229.628	561.830	944.303
300°C	1.291.000	709.135	291.529	268.914	544.051	782.955
	1.260.000	762.145	305.849	231.031	649.995	927.694
	1.102.000	546.094	244.639	190.684	473.351	809.886

ANHANG

Tab. 74: Rohdaten zur Optimierung der Ionenquell-Temperatur des Temperaturprogrammes von E2-Metaboliten. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) des jeweiligen *Quantifier*-Übergangs von 10 pg E2 (416_285) sowie 10 pg E2-d₃ (419_285). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). /: nicht durchgeführt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

E2 (416_285)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	2.185.000	1.877.000	1.580.000	1.655.000	/	/	1.555.000
	2.109.000	1.951.000	1.942.000	1.801.000			1.944.000
	1.577.000	1.951.000	2.306.000	1.926.000			1.883.000
280°C	2.336.000	2.242.000	2.347.000	2.270.000	/	1.967.000	/
	2.371.000	2.093.000	2.096.000	1.935.000		1.903.000	
	1.980.000	1.980.000	2.086.000	1.985.000		1.739.000	
270°C	1.787.000	2.200.000	2.189.000	2.330.000	1.768000	/	/
	1.917.000	2.246.000	2.048.000	2.100.000	1.979000		
	2.298.000	2.135.000	2.523.000	2.316.000	2.153000		
260°C	2.677.000	2.400.000	2.272.000	1.969.000	/	/	/
	2.036.000	2.087.000	2.163.000	2.118.000			
	2.206.000	1.930.000	2.048.000	1.691.000			

E2-d₃ (419_285)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	1.138.000	1.005.000	1.012.000	866.782	/	/	956.948
	1.045.000	1.062.000	896.829	1.014.000			815.834
	1.082.000	1.116.000	1.279.000	918.621			995.774
280°C	1.396.000	1.152.000	1.382.000	1.204.000	/	1.041.000	/
	1.172.000	1.208.000	1.187.000	1.067.000		1.045.000	
	1.248.000	1.177.000	1.009.000	987.345		968.024	
270°C	1.018.000	1.092.000	1.005.000	1.228.000	949.529	/	/
	1.116.000	1.132.000	1.265.000	993.440	1.092.000		
	1.038.000	1.212.000	1.114.000	1.262.000	933.010		
260°C	1.218.000	1.171.000	1.085.000	1.083.000	/	/	/
	1.133.000	1.116.000	1.125.000	1.248.000			
	1.174.000	1.059.000	1.142.000	1.013.000			

Tab. 75: Rohdaten zur Optimierung der Ionenquell-Temperatur des Temperaturprogrammes von E2-Metaboliten. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) des jeweiligen *Quantifier*-Übergangs von 10 pg 2-HO-E2 (504_373) sowie 10 pg 4-HO-E2 (504_373). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). /: nicht durchgeführt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

2-HO-E2 (504_373)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	321.189	292.209	321.189	282.593	/	/	300.802
	288.347	208.704	288.347	237.328			309.836
	378.393	208704	378.393	299.899			421.377
280°C	408.003	428.695	456.452	460.011	/	348.438	/
	353.966	399.483	494.261	478.041		356.310	
	346.565	288.105	347.343	337.203		286.005	
270°C	353.549	280.341	288.586	354.045	409.158	/	/
	349.934	327.611	280.740	343.932	314.485		
	413.591	417.533	379.286	472.045	469.382		
260°C	242.719	326.210	427.489	554.982	/	/	/
	276.549	311.199	306.517	447.505			
	217.559	259.511	316.230	443.303			

ANHANG

4-HO-E2 (504_373)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	348.433	377.877	452.815	338.637			392.952
	298.775	331.485	388.454	310.848			401.896
	275.743	413.334	444.739	366.643			485059
280°C	415.091	435.224	521.477	498.344		354.903	
	468.661	385.404	473.227	426.463		337.235	
	339.938	326.264	366.191	371.028		361.201	
270°C	416.515	436.002	503.849	431.932	426.078		
	356.426	290.398	348.174	345.269	336.250		
	341.633	392.278	431.481	494.655	442.508		
260°C	434.957	410.416	396.397	444.514			
	504.871	433.838	459583	394.104			
	338.929	435.489	344.159	407.503			

Tab. 76: Rohdaten zur Optimierung der Ionenquell-Temperatur des Temperaturprogrammes von E2-Metaboliten. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) des jeweiligen *Quantifier*-Übergangs von 10 pg 2-MeO-E2 (446_315) sowie 10 pg 4-MeO-E2 (446_315). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). /: nicht durchgeführt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

2-MeO-E2 (446_315)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	776.259	752.066	994.195	743.834			919.181
	597.229	840.959	821.329	665.374			782.754
	532.077	738.694	1.046.000	783.280			796.711
280°C	900.767	946.198	980.353	982.609		924.388	
	1.017.000	918.456	930.238	1.011.000		1.020000	
	939.625	998.752	966.830	843.213		878.302	
270°C	720.407	871.079	947.184	993.536	718.602		
	791.092	763.336	902.578	891.393	776.624		
	822.815	813.871	897.192	1.059000	880.375		
260°C	881.948	1.009.000	961.719	947.996			
	985.830	749.399	843.355	968.014			
	940.540	708.787	825.157	951.223			

4-MeO-E2 (446_315)		Ionenquell-Temperatur					
<i>Transferline-Temperatur</i>	230°C	240°C	250°C	260°C	270°C	280°C	285°C
285°C	1.405.000	1.227.000	1.103.000	1.150.000			1.334.000
	1.075.000	1.049.000	1.243.000	1.073.000			1.060.000
	1.219.000	1.072.000	1.418.000	1.305.000			1.270.000
280°C	1.480.000	1.652.000	1.780.000	1.575.000		1.380.000	
	1.456.000	1.475.000	1.300.000	1.457.000		1.469.000	
	1.452.000	1.476.000	1.558.000	1.536.000		1.315.000	
270°C	1.307.000	1.462.000	1.585.000	1.479.000	1.116.000		
	1.279.000	1.301.000	1.421.000	1.205.000	1.478.000		
	1.218.000	1.291.000	1.469.000	1.626.000	1.566.000		
260°C	1.468.000	1.415.000	1.591.000	1.488.000			
	1.409.000	1.408.000	1.370.000	1.518.000			
	1.315.000	1.287.000	1.340.000	1.467.000			

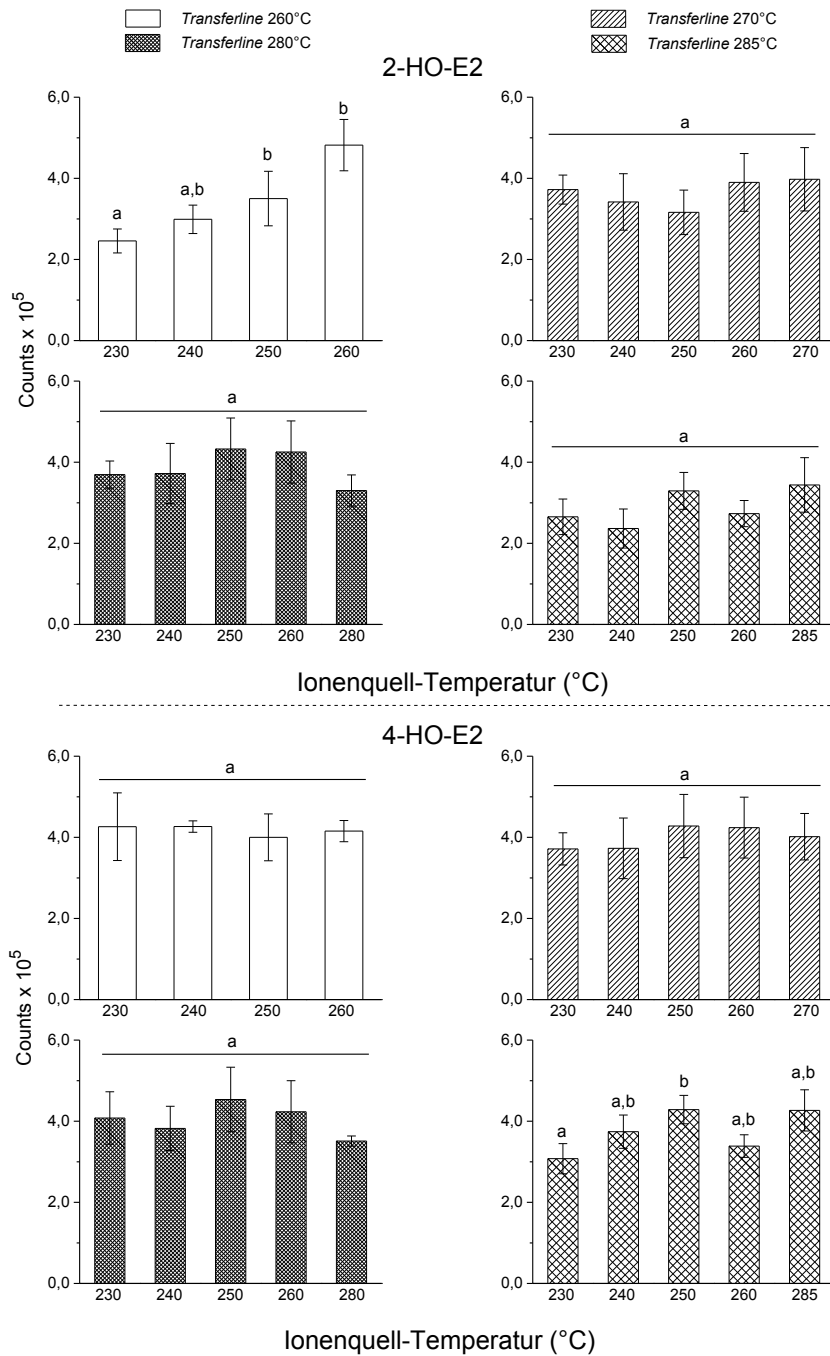


Abb. 97: Einfluss der Ionenquell- und *Transferline*-Temperatur auf die absolute PF von 2-HO-E2 und 4-HO-E2. Messung mittels GC/MS/MS (jeweils Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs (504_373) bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C bis 285°C und einer variierenden Ionenquell-Temperatur (230°C bis 285°C); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 75.

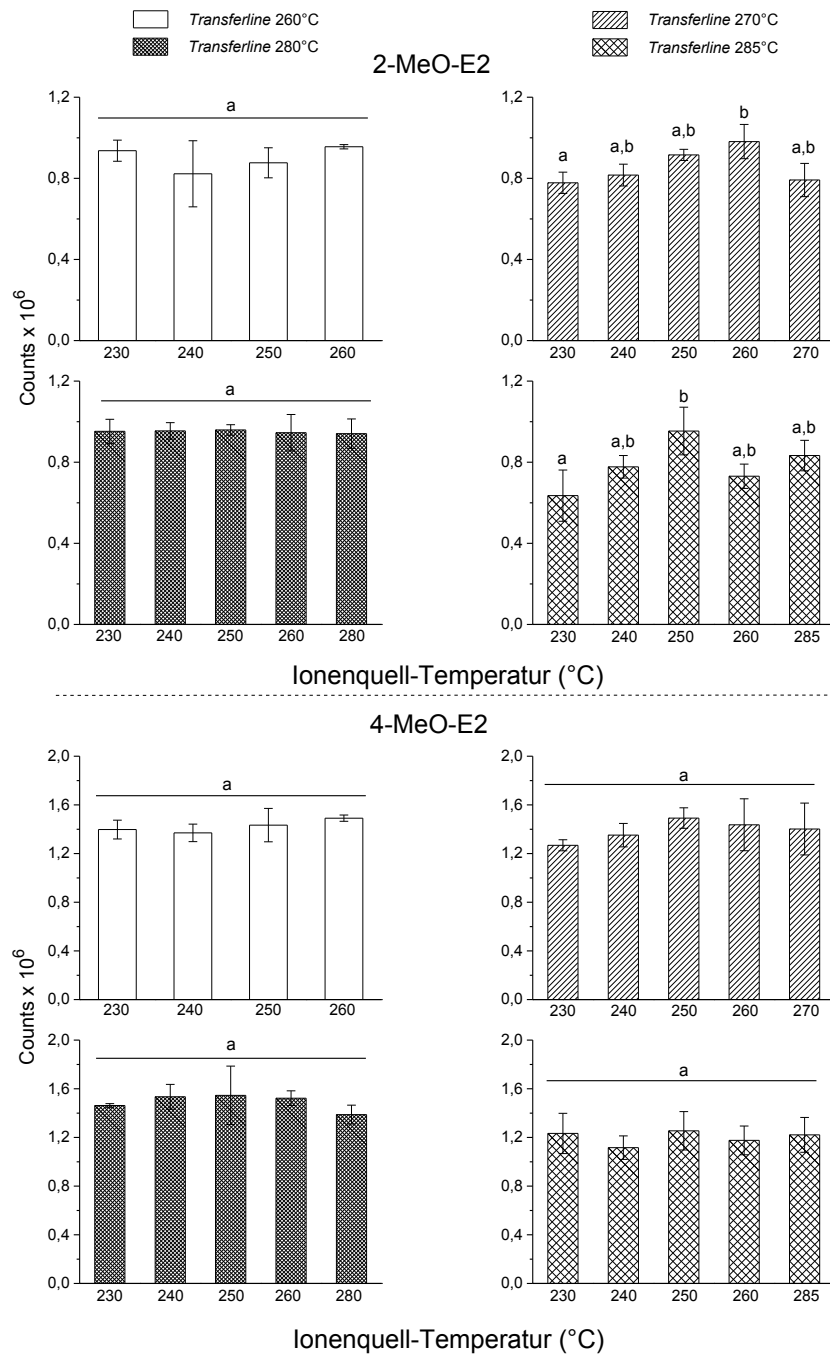


Abb. 98: Einfluss der Ionenquell- und *Transferline*-Temperatur auf die absolute PF von 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2. Messung mittels GC/MS/MS (jeweils Einfachmessung) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (aus drei unabhängigen Bestimmungen) der absoluten PF des extrahierten *Quantifier*-Übergangs (446_315) bei einer *Transferline*-Temperatur von 260°C bis 285°C und einer variierenden Ionenquell-Temperatur (230°C bis 285°C); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$. Injektionsvolumen: 1 μl . Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Rohdaten: Tab. 76.

Überprüfung der Extraktionseffizienz von Hexan und Chloroform

Tab. 77: Rohdaten zur prozentualen WFR von E1, E2 und deren Metaboliten nach Hexan (grau hervorgehoben)- beziehungsweise Chloroformextraktion (schwarz) in der organischen Phase. Aufgeführt sind jeweils die absoluten PF (Counts) der entsprechenden *Quantifier*-Massenspur; $m_{\text{Analyt-Säule}} = 2 \text{ pg}$ für E1, 2/4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1, E2, 2/4-MeO-E2 = 2,5 pg, 2/4-HO-E1, 2/4-HO-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E1 und 16- α -HO-E2 = 10 pg. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

E2 <i>m/z</i> (416_285)	2-HO-E2 <i>m/z</i> (504_373)	4-HO-E2 <i>m/z</i> (504_373)	16-α-HO-E2 <i>m/z</i> (504_414)	2-MeO-E2 <i>m/z</i> (446_315)	4-MeO-E2 <i>m/z</i> (446_315)	3-O-Me-2-HO-E2 <i>m/z</i> (446_315)	3-O-Me-4-HO-E2 <i>m/z</i> (446_315)
109.436	n.n.	n.n.	n.n.	113.888	122.664	64.945	270.600
262.878	n.n.	n.n.	43.779	136.305	118.815	119.178	189.700
75.833	n.n.	n.n.	n.n.	127.661	120.510	68.191	327.980
208.532	n.n.	n.n.	123.576	131.571	91.604	75.635	231.018
90.974	n.n.	n.n.	n.n.	88.671	67.322	90.524	160.512
228.865	n.n.	n.n.	69.759	142.541	132.481	86.238	317.750
<i>Referenz (≡ 100%)</i>							
408.840	40.025	n.n.	237.020	159.223	228.656	181.683	377.637

E1 <i>m/z</i> (342_257)	2-HO-E1 <i>m/z</i> (430_345)	4-HO-E1 <i>m/z</i> (430_345)	16-α-HO-E1 <i>m/z</i> (430_286)	2-MeO-E1 <i>m/z</i> (372_342)	4-MeO-E1 <i>m/z</i> (372_342)	3-O-Me-2-HO-E1 <i>m/z</i> (372_342)
413.747	n.n.	n.n.	n.n.	116.129	162.306	272.107
444.762	n.n.	n.n.	1.037000	207.336	118.535	285.544
392.424	n.n.	n.n.	n.n.	170.783	132.651	287.385
472.845	n.n.	n.n.	992.289	217.732	139.140	232.922
406.146	n.n.	n.n.	n.n.	146.170	159.522	172.209
472.926	n.n.	n.n.	922.350	181.561	171.111	291.888
<i>Referenz (≡ 100%)</i>						
608.405	82.451	46.810	1.552000	219.719	254.057	356.916

Quantifizierung von E2 aus Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten in Standardlösungen

Tab. 78: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der Säurehydrolyse von je 1 nmol E2, E2-3-G und E2-3-S in 1-fach *Sörensen* Phosphat-Puffer bei 37°C für 16 h mit 12 M HCl. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN
E2 ohne HCl (1 nmol)	1	5,70E+06	6,15E+06	1,08	4,85E+06
	2	6,41E+06	7,01E+06	1,09	4,72E+06
	3	7,09E+06	7,37E+06	1,04	5,13E+06
E2 mit HCl (1 nmol)	1	4,32E+06	4,94E+06	1,14	4,87E+06
	2	4,67E+06	4,84E+06	1,04	4,96E+06
	3	4,91E+06	5,24E+06	1,07	4,78E+06
E2-3-G ohne HCl (1 nmol)	1	5,78E+06	n.n.	-	4,77E+06
	2	6,20E+06	n.n.	-	4,59E+06
	3	6,78E+06	n.n.	-	4,95E+06
E2-3-G mit HCl (1 nmol)	1	4,76E+06	n.n.	-	4,74E+06
	2	5,32E+06	n.n.	-	4,85E+06
	3	5,45E+06	n.n.	-	4,87E+06
E2-3-S ohne HCl (1 nmol)	1	5,23E+06	n.n.	-	4,75E+06
	2	5,83E+06	n.n.	-	4,54E+06
	3	5,86E+06	n.n.	-	4,81E+06
E2-3-S mit HCl (1 nmol)	1	4,65E+06	1,19E+06	0,26	4,45E+06
	2	4,92E+06	1,74E+06	0,35	4,75E+06
	3	5,31E+06	1,37E+06	0,26	4,86E+06

ANHANG

Tab. 79: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der Säurehydrolyse von je 1 nmol E2-3-G und E2-3-S in 5-fach *Sørensen* Phosphat-Puffer bei 37°C für 16 h mit 12 M HCl. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN
E2 mit HCl (1 nmol)	1	1,59E+06	2,40E+06	1,5126	2,34E+06
	2	2,85E+06	4,24E+06	1,48926	2,28E+06
	3	2,31E+06	3,37E+06	1,46312	2,08E+06
E2-3-G mit HCl (1 nmol)	1	2,74E+06	n.n.	-	1,80E+06
	2	3,94E+06	n.n.	-	3,14E+06
	3	4,08E+06	n.n.	-	1,81E+06
E2-3-S mit HCl (1 nmol)	1	5,49E+06	1,18E+06	0,21565	4,08E+06
	2	2,68E+06	675463	0,25175	1,88E+06
	3	5,82E+06	1,29E+06	0,22222	3,85E+06
	4	3,33E+06	696902	0,20906	1,76E+06
	5	3,58E+06	810103	0,22624	1,83E+06
	6	3,36E+06	883835	0,26342	2,89E+06

Tab. 80: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der Säurehydrolyse von je 1 nmol E2-3-G und E2-3-S in 1-fach *Sørensen* Phosphat-Puffer bei 70°C für 16 h mit 12 M HCl. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN
E2 ohne HCl (1 nmol)	1	4,53E+06	6,16E+06	1,36017	4,06E+06
	2	4,56E+06	5,77E+06	1,26704	3,95E+06
	3	4,84E+06	6,39E+06	1,32193	3,93E+06
E2 mit HCl (1 nmol)	1	4,36E+06	4,96E+06	1,13569	3,85E+06
	2	3,95E+06	4,84E+06	1,22663	3,04E+06
	3	4,17E+06	4,24E+06	1,01557	3,80E+06
E2-3-G ohne HCl (1 nmol)	1	4,95E+06	n.n.		3,67E+06
	2	4,98E+06	n.n.		3,62E+06
	3	5,26E+06	n.n.		3,64E+06
E2-3-G mit HCl (1 nmol)	1	4,70E+06	n.n.		3,81E+06
	2	4,71E+06	n.n.		3,69E+06
	3	5,02E+06	n.n.		2,92E+06
E2-3-S ohne HCl (1 nmol)	1	5,51E+06	n.n.		3,72E+06
	2	5,27E+06	n.n.		3,85E+06
	3	5,55E+06	n.n.		3,87E+06
E2-3-S mit HCl (1 nmol)	1	2,60E+06	867767	0,33416	3,83E+06
	2	2,33E+06	817181	0,35134	3,69E+06
	3	1,50E+06	684811	0,45686	2,33E+06

Tab. 81: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der enzymatischen Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase (Typ HP-2) aus *helix pomatia* bezüglich E2-3-S sowie E2-3-G in Ansätzen mit beziehungsweise ohne Enzymzusatz (Typ HP-2). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN
E2 ohne Enzym (1 nmol)	1	2,10E+06	2,85E+06	1,36	1,71E+06
	2	3,29E+06	4,40E+06	1,34	2,22E+06
	3	2,67E+06	3,53E+06	1,32	1,94E+06
E2 HP-2 (1 nmol)	1	1,04E+06	1,29E+06	1,24	2,17E+06
	2	743363	766545	1,03	2,21E+06
	3	413265	521531	1,26	1,64E+06
E2-3-G ohne Enzym (1 nmol)	1	2,28E+06	n.n.		1,58E+06
	2	3,76E+06	n.n.		2,33E+06
	3	2,06E+06	n.n.		1,53E+06
E2-3-G HP-2 (1 nmol)	1	896671	932257	1,04	1,53E+06
	2	708806	637747	0,90	1,87E+06
	3	645995	525943	0,81	2,31E+06
E2-3-S ohne Enzym (1 nmol)	1	4,33E+06	n.n.		2,70E+06
	2	3,08E+06	n.n.		2,16E+06
	3	1,99E+06			1,34E+06
E2-3-S HP-2 (1 nmol) pH=4,9	1	712392	n.n.	0,40	1,40E+06
	2	55998	263158	0,47	1,52E+06
	3	268558	92516	0,34	1,25E+06
E2-3-S HP-2 (1 nmol) pH=6,2	1	3,02E+06	1,25E+06	0,41	2,75E+06
	2	712432	272196	0,38	1,30E+06
	3	535867	226819	0,42	1,50E+06

ANHANG

Tab. 82: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der enzymatischen Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase (Typ HP-2) aus *helix pomatia* sowie Typ B-1 aus Rinderleber bezüglich E2-3-S sowie E2-3-G. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN
E2 ohne Enzym (1 nmol)	1	4,21E+06	6,25E+06	1,49	3,42E+06
	2	4,39E+06	6,26E+06	1,43	3,65E+06
	3	5,25E+06	6,93E+06	1,32	3,69E+06
E2 HP-2 (1 nmol)	1	3,80E+06	5,03E+06	1,33	3,30E+06
	2	4,56E+06	6,15E+06	1,35	3,45E+06
	3	4,31E+06	5,97E+06	1,39	4,01E+06
E2 B-1 (1 nmol)	1	4,28E+06	5,97E+06	1,40	3,46E+06
	2	4,42E+06	6,14E+06	1,39	3,46E+06
	3	5,23E+06	6,92E+06	1,32	3,75E+06
E2-3-G ohne Enzym (1 nmol)	1	4,37E+06	n.n.		3,62E+06
	2	4,51E+06	n.n.		3,64E+06
	3	5,23E+06	n.n.		3,89E+06
E2-3-G mit HP-2 (1 nmol)	1	3,42E+06	4,09E+06	1,20	3,10E+06
	2	3,68E+06	4,18E+06	1,14	3,36E+06
	3	3,84E+06	4,36E+06	1,14	3,36E+06
E2-3-G mit B-1 (1 nmol)	1	4,95E+06	5,52E+06	1,12	3,79E+06
	2	4,42E+06	5,41E+06	1,22	3,52E+06
	3	4,52E+06	5,13E+06	1,13	3,40E+06
E2-3-S mit HP-2 (1 nmol)	1	3,82E+06	1,66E+06	0,43	3,49E+06
	2	4,04E+06	1,49E+06	0,37	3,41E+06
	3	4,31E+06	1,83E+06	0,42	3,91E+06

Tab. 83: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der enzymatischen Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase (Typ H-1) aus *helix pomatia* unter Verwendung von je 1 nmol E2, E2-3-G und E2-3-S in 1-fach Sørensen-Phosphatpuffer. Als ISTD diente je 1 nmol E1 unter Verwendung einer Sulfatase-Aktivität von 100 U/Ansatz. Die β -Glucuronidase-Aktivität betrug diesbezüglich 1872 U/Ansatz. Als β -Glucuronidase-Hemmer wurde SA in einer Konzentration von 100 mM verwendet. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF1 E2	PF2 E2	PF1 E1	PF2 E1
E2 ohne Enzym (1 nmol)	1	4,55E+06	4,17E+06	3,70E+06	3,51E+06
	2	4,73E+06	4,31E+06	3,83E+06	3,51E+06
	3	5,15E+06	5,02E+06	3,98E+06	3,95E+06
E2 mit H-1 (1 nmol)	1	3,32E+06	2,81E+06	2,84E+06	2,73E+06
	2	4,55E+06	4,03E+06	3,82E+06	3,48E+06
	3	4,25E+06	4,14E+06	3,42E+06	3,46E+06
E2 mit H-1, SA (1 nmol)	1	3,09E+06	3,07E+06	2,44E+06	2,43E+06
	2	4,48E+06	4,32E+06	3,16E+06	3,04E+06
	3	5,04E+06	5,50E+06	3,77E+06	4,23E+06
E2-3-G ohne Enzym (1 nmol)	1	n.n.	n.n.	2,62E+06	2,89E+06
	2	n.n.	n.n.	4,04E+06	3,87E+06
	3	n.n.	n.n.	4,01E+06	3,87E+06
E2-3-G mit H-1 (1 nmol)	1	3,19E+06	3,52E+06	3,05E+06	2,99E+06
	2	3,23E+06	3,19E+06	3,18E+06	2,99E+06
	3	4,16E+06	4,26E+06	3,57E+06	3,60E+06
E2-3-G mit H-1, SA (1 nmol)	1	n.n.	n.n.	2,38E+06	1,48E+06
	2	n.n.	n.n.	2,83E+06	3,17E+06
	3	n.n.	n.n.	3,51E+06	3,57E+06
E2-3-S ohne Enzym (1 nmol)	1	n.n.	n.n.	2,74E+06	2,72E+06
	2	n.n.	n.n.	3,90E+06	3,65E+06
	3	n.n.	n.n.	3,66E+06	4,18E+06
E2-3-S mit H-1 (1 nmol)	1	1,84E+06	1,73E+06	2,74E+06	2,56E+06
	2	2,09E+06	2,11E+06	3,18E+06	3,23E+06
	3	2,20E+06	2,75E+06	3,58E+06	3,50E+06
E2-3-S mit H-1, SA (1 nmol)	1	1,50E+06	1,72E+06	2,35E+06	2,47E+06
	2	1,97E+06	1,77E+06	2,52E+06	2,44E+06
	3	1,65E+06	1,64E+06	2,38E+06	2,47E+06

Tab. 84: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der enzymatischen Spaltungseffizienz von β -Glucuronidase und Sulfatase (Typ H-1) aus *helix pomatia* unter Verwendung von je 1 nmol E2 und E2-3-S in 1-fach Sørensen-Phosphatpuffer. Als ISTD diente je 1 nmol E1 unter Verwendung einer Sulfatase-Aktivität von 200 U/Ansatz. Die β -Glucuronidase-Aktivität betrug diesbezüglich 3744 U/Ansatz. Als β -Glucuronidase-Hemmer wurde SA in einer Konzentration von 100 mM verwendet. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Zweifachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF1 E2	PF2 E2	PF1 E1	PF2 E1
E2 mit H-1 (1 nmol)	1	1,95E+06	2,05E+06	1,78E+06	1,90E+06
	2	4,03E+06	4,30E+06	3,23E+06	3,18E+06
	3	3,12E+06	2,98E+06	2,63E+06	2,50E+06
E2 mit H-1, SA (1 nmol)	1	3,98E+06	3,89E+06	3,30E+06	3,28E+06
	2	3,23E+06	4,45E+06	2,32E+06	3,17E+06
	3	3,54E+06	3,03E+06	2,58E+06	2,33E+06
E2-3-S mit H-1 (1 nmol)	1	1,57E+06	1,79E+06	2,48E+06	2,49E+06
	2	2,36E+06	2,37E+06	3,26E+06	3,23E+06
	3	1,99E+06	2,19E+06	3,13E+06	3,09E+06
E2-3-S mit H-1, SA (1 nmol)	1	1,09E+06	1,06E+06	2,02E+06	1,75E+06
	2	1,19E+06	1,24E+06	1,70E+06	1,70E+06
	3	1,73E+06	1,85E+06	2,76E+06	2,61E+06

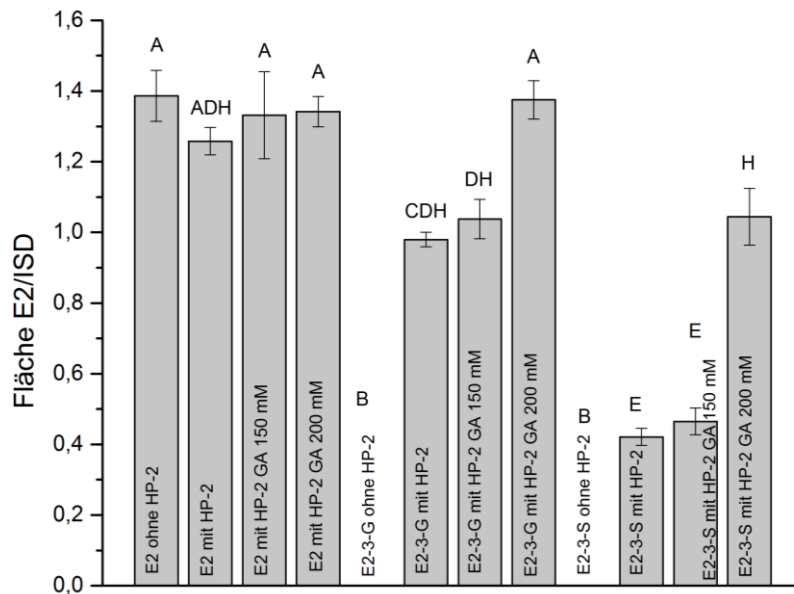


Abb. 99: Hemmwirkung von 150 mM beziehungsweise 200 mM GA auf 10.000 U β -Glucuronidase (Typ HP-2) aus *helix pomatia*. Inkubation für 16 h bei 37°C in 1-fach Sørensen Phosphatpuffer. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, $p < 0,05$). Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich in ihren Mittelwerten signifikant. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Tab. 85: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der Hemmwirkung von SAL, SA und GA auf β -Glucuronidase (Typ HP-2) aus *helix pomatia*. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	Ansatz	PF E1	PF E2	rel. Fläche	PF ChAN	S/N E2
E2 ohne HP-2 (1 nmol)	1	4,52E+06	6,10E+06	1,35	2,98E+06	15,2
	2	4,82E+06	6,08E+06	1,26	2,80E+06	14,3
	3	5,37E+06	6,71E+06	1,25	3,26E+06	13,6
E2 mit HP-2 (1 nmol)	1	3,80E+06	5,03E+06	1,33	3,30E+06	14,5
	2	4,56E+06	6,15E+06	1,35	3,45E+06	14,7
	3	4,31E+06	5,97E+06	1,39	4,01E+06	16,2
E2-3-G mit HP-2 (1 nmol)	1	4,39E+06	4,35E+06	0,99	2,82E+06	11,3
	2	4,42E+06	4,44E+06	1,00	2,78E+06	13,9
	3	4,97E+06	5,11E+06	1,02	2,53E+06	11
E2-3-G mit HP-2 SAL 10 mM (1 nmol)	1	2,69E+06	n.n.	-	2,85E+06	0,8
	2	3,84E+06	n.n.	-	2,82E+06	1,5
	3	3,16E+06	n.n.	-	2,87E+06	0,8
E2-3-G mit HP-2 SA 100 mM (1 nmol)	1	3,48E+06	n.n.	-	2,82E+06	0,2
	2	4,68E+06	n.n.	-	3,07E+06	0,5
	3	4,69E+06	n.n.	-	2,74E+06	0,1
E2-3-G mit HP-2 GA 500 mM (1 nmol)	1	3,43E+06	3,53E+06	1,02	2,83E+06	8,7
	2	3,80E+06	3,74E+06	0,98	2,58E+06	12,4
	3	2,65E+06	2,87E+06	1,08	2,80E+06	8,4

Tab. 86: Rohdaten (Counts) zur Überprüfung der enzymatischen Spaltungseffizienz von Sulfatase und β -Glucuronidase (Typ H-1) aus *helix pomatia* sowie β -Glucuronidase (Typ B-1) aus Rinderleber bezüglich der Substrate E2-3-G und E2-3-S in Substratmischungen. Verwendung fanden je 1 nmol E2, E2-3-G und E2-3-S in 1-fach Sörensen-Phosphatpuffer. Als ISTD diente je 1 nmol E1 unter Verwendung einer Sulfatase-Aktivität von 100 U/Ansatz bezüglich. Die β -Glucuronidase-Aktivität betrug diesbezüglich 1872 U/Ansatz. Als β -Glucuronidase-Hemmer wurde SA in einer Konzentration von 100 mM verwendet. Die β -Glucuronidase-Aktivität des Typs B-1 betrug jeweils 10.000 U/Ansatz. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

	PF E2	PF E1		PF E2	PF E1
E2 mit B-1 (1 nmol)	2,98E+06	2,77E+06	E2-3-G, E2-3-S ohne Enzym (1 nmol)	n.n.	3,04E+06
	3,69E+06	3,42E+06		n.n.	5,00E+06
	3,38E+06	3,64E+06		n.n.	4,61E+06
E2 ohne Enzym (1 nmol)	4,52E+06	3,42E+06	E2-3-G, E2-3-S + B-1 (1 nmol)	3,23E+06	3,28E+06
	3,42E+06	3,34E+06		3,77E+06	3,80E+06
	2,99E+06	2,62E+06		4,84E+06	4,71E+06

ANHANG

	PF E2	PF E1		PF E2	PF E1
E2 mit H-1 (1 nmol)	3,45E+06	2,94E+06	E2-3-G, E2-3-S + H-1, SA (1 nmol)	1,82E+06	2,67E+06
	3,02E+06	2,21E+06		3,03E+06	4,34E+06
	1,85E+06	1,78E+06		3,24E+06	4,25E+06
E2 mit H-1, SA (1 nmol)	3,30E+06	2,41E+06	/		
	2,91E+06	2,71E+06			
	3,01E+06	2,50E+06			
E2 mit B-1, SA (1 nmol)	3,07E+06	3,16E+06			
	4,63E+06	4,29E+06			
	3,98E+06	3,92E+06			

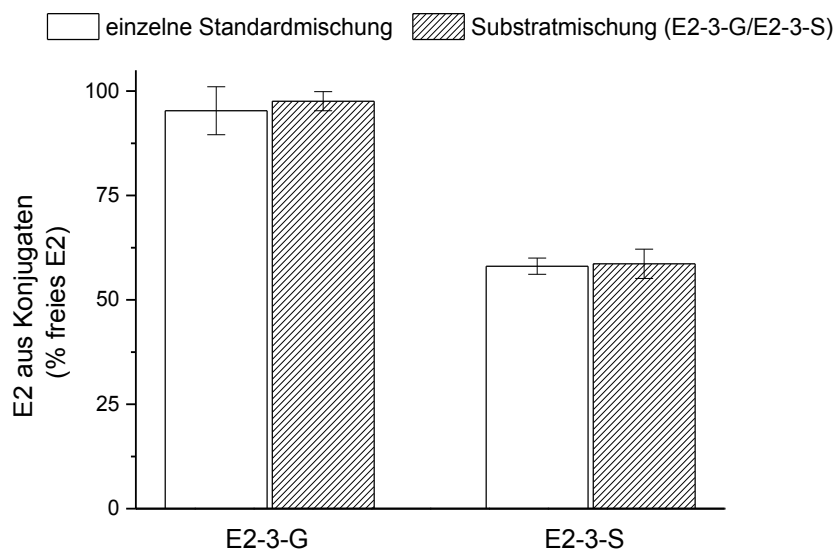


Abb. 100: Vergleich der enzymatischen Spaltungseffizienz von je 1 nmol E2-3-G und E2-3-S mit β -Glucuronidase und Sulfatase aus *helix pomatia* (Typ H-1) und reiner β -Glucuronidase aus Rinderleber (Typ B-1) in einzelnen Standardmischungen beziehungsweise Substratmischungen bestehend aus E2-3-G und E2-3-S. Als ISTD diente je 1 nmol E1 unter Verwendung einer β -Glucuronidase-Aktivität von 10.000 U/Ansatz. Bei Verwendung von Sulfatase (Typ H-1) betrug die Sulfatase-Aktivität 100 U/Ansatz. Die β -Glucuronidase-Aktivität betrug dabei 3744 U/Ansatz. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37°C im Schüttelwasserbad mit anschließender GC/FID-Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des gespaltenen E2 aus E2-3-S und E2-3-G aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfach- beziehungsweise Zweifachinjektion). Injektionsvolumen: 1 μ l. Signifikante Unterschiede wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22.

Einfluss der Festphasenextraktion und der enzymatischen Hydrolyse auf die Wiederfindung von E1- und E2-Metaboliten

Tab. 87: Rohdaten zur prozentualen WFR von E1-Metaboliten nach sofortiger Extraktion und SPE, der Aufarbeitung nach Inkubation (16 h, 37°C) beziehungsweise der Inkubation mit β -Glucuronidase (Typ B-1, 10.000 U) oder Sulfatase (Typ H-1, 100 U). Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des *Quantifiers*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 4 \text{ pg}$ für E1, 2-/4-MeO-E1 3-O-Me-2-HO-E1; 2-/4-HO-E1, 16- α -HO-E1 = 20 pg. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n: nicht nachweisbar. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

Testansatz	E1 (342_257)	2-HO-E1 (430_345)	4-HO-E1 (430_345)	16- α -HO-E1 (430_286)	2-MeO-E1 (372_342)	4-MeO-E1 (372_342)	3-O-Me-2-HO-E1 (372_342)
<i>Sofortige Aufarbeitung</i>							
P1	353.738	247.918	126.458	1.010.000	148.696	146.554	242.496
P2	365.593	198.449	97.465	1.014.000	138.391	107.847	244.529
P3	441.976	317.442	208.210	1.506.000	185.214	188.792	265.416
<i>Aufarbeitung nach Inkubation</i>							
P1	390.570	n.n.	n.n.	1.227.000	118.425	189.446	243.546
P2	329.548	n.n.	n.n.	928.398	108.733	105.084	217.158
P3	377.345	n.n.	n.n.	1.209.000	167.947	175.188	229.947
<i>Aufarbeitung nach Inkubation (β-Glucuronidase)</i>							
P1	228.327	n.n.	n.n.	907.636	34.466	90.877	179.075
P2	236.604	n.n.	n.n.	818.307	121.952	108.765	144.131
P3	376.949	n.n.	n.n.	1.124.000	134.096	118.993	215.710
<i>Aufarbeitung nach Inkubation (Sulfatase)</i>							
P1	331.953	n.n.	n.n.	746.815	80.799	114.337	181.430
P2	301.973	n.n.	n.n.	860.889	84.102	110.740	142.534
P3	291.681	n.n.	n.n.	686.305	58.523	97.070	188.707
<i>Referenzmischung ($\cong 100\%$)</i>							
P1	639.445	93.182	102.541	1.840.000	208.341	246.007	390.160
P2	553.746	78.229	67.634	1.639.000	200.674	285.668	408.642
P3	549.070	78.038	67.677	1.694.000	237.595	312.957	414.614

ANHANG

Tab. 88: Rohdaten zur prozentualen WFR von E2-Metaboliten nach sofortiger Extraktion und SPE, der Aufarbeitung nach Inkubation (16 h, 37°C) beziehungsweise der Inkubation mit β -Glucuronidase (Typ B-1, 10.000 U) oder Sulfatase (Typ H-1, 100 U). Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des *Quantifiers*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 5 \text{ pg}$ für E2, 2-/4-MeO-E2; 2-/4-HO-E2, 16- α -HO-E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2 = 20 pg. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). n.n.: nicht nachweisbar. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

Testansatz	E2 (416_285)	2-HO-E2 (504_373)	4-HO-E2 (504_373)	16- α -HO-E2 (504_414)	2-MeO-E2 (446_315)	4-MeO-E2 (446_315)	3-MeO-2-HO-E2 (446_315)	3-MeO-4-HO-E2 (446_315)
<i>Sofortige Aufarbeitung</i>								
P1	286.103	179.771	112.433	157.433	205.658	227.557	176.414	318.952
P2	293.682	187.152	93.811	74.010	143.041	211.367	191.164	364.728
P3	371.324	330.899	184.343	226.254	180.803	280.846	303.303	388.418
<i>Aufarbeitung nach Inkubation</i>								
P1	321.917	n.n.	n.n.	165.749	164.147	149.253	209.686	324.131
P2	251.949	n.n.	n.n.	113.980	131.934	170.133	135.555	232.298
P3	421.615	n.n.	n.n.	135.222	236.994	178.720	197.737	312.654
<i>Aufarbeitung nach Inkubation (β-Glucuronidase)</i>								
P1	168.601	n.n.	n.n.	170.476	92.661	155.320	131.442	78.929
P2	193.862	n.n.	n.n.	96.848	79.115	145.409	105.304	213.078
P3	313.135	n.n.	n.n.	264.539	142.246	183.860	180.461	285.948
<i>Aufarbeitung nach Inkubation (Sulfatase)</i>								
P1	306.537	n.n.	n.n.	170.458	112.788	156.557	144.053	307.189
P2	216.545	n.n.	n.n.	146.535	79.449	152.276	133.757	192.823
P3	235.000	n.n.	n.n.	108.430	165.938	104.608	89.141	181.009
<i>Referenzmischung ($\equiv 100\%$)</i>								
P1	517.374	33.217	87.588	380.946	315.142	397.256	330.233	641.158
P2	550.463	67.747	69.880	333.737	227.455	345.824	388.416	700.407
P3	552.238	66.176	65.762	281.656	306.757	415.460	354.239	680.067

ANHANG

Tab. 89: Rohdaten zur prozentualen WFR von E1- und E2-Metaboliten nach *zweifacher*- beziehungsweise *dreifacher* Chloroformextraktion und SPE. Aufgeführt sind absoluten PF (Counts) des *Quantifiers*; $m_{\text{Analyt/Säule}} = 4 \text{ pg}$ für E1, 2-/4-MeO-E1 3-O-Me-2-HO-E1; E2, 2-/4-MeO-E2 = 5 pg; 2-/4-HO-E1/E2, 16- α -HO-E1/E2, 3-O-Me-2-/4-HO-E2 = 20 pg. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

Testansatz	E2 (416_285)	2-HO-E2 (504_373)	4-HO-E2 (504_373)	16- α -HO-E2 (504_414)	2-MeO-E2 (446_315)	4-MeO-E2 (446_315)	3-MeO-2-HO-E2 (446_315)	3-MeO-4-HO-E2 (446_315)
<i>zweifache Chloroformextraktion</i>								
P1	514.401	166.135	88.410	383.715	446.649	660.140	251.501	1.141.500
P2	675.158	189.086	226.373	432.977	421.507	560.962	326.234	861.223
P3	717.131	197.762	45.611	374.503	600.669	591.348	345.917	1.172.500
<i>dreifache Chloroformextraktion</i>								
P1	552.116	141.891	133.820	211.282	358.395	463.160	276.949	836.701
P2	666.610	203.035	171.257	518.380	358.627	631.845	208.246	984.999
P3	510.899	112.115	143.650	393.739	518.391	633.032	289.597	1.093.500
<i>Referenzmischung</i>	1.193.000	65.735	69.859	831.049	667.070	844.638	605.526	1.655.667
Testansatz	E1 (342_257)	2-HO-E1 (430_345)	4-HO-E1 (430_345)	16- α -HO-E1 (430_286)	2-MeO-E1 (372_342)	4-MeO-E1 (372_342)	3-O-Me-2-HO-E1 (372_342)	
<i>zweifache Chloroformextraktion</i>								
P1	634.241	154.846	323.307	912.356	208.860	232.962	321.192	
P2	741.795	254.061	580.462	1.225.000	250.849	201.905	465.125	
P3	676.124	230.876	498.067	1.301.000	227.645	241.833	461.645	
<i>dreifache Chloroformextraktion</i>								
P1	646.092	178.733	257.628	1.139.000	164.321	174.079	403.580	
P2	627.722	252.945	359.450	1.385.000	277.590	205.035	322.804	
P3	659.005	194.690	323.307	1.191.000	237.067	273.798	358.403	
<i>Referenzmischung</i>	789.869	56.221	210.803	1.278.000	321.427	266.249	599.534	

ANHANG

Tab. 90: Vergleich der prozentualen WFR von E1- und E2-Metaboliten in der organischen Phase nach *einfacher*-, *zweifacher*- beziehungsweise *dreifacher* Chloroformextraktion und sofortiger Aufarbeitung mittels SPE. Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion), wobei jeweils die mittleren WFR und die STABW angegeben sind. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe von ANOVA ermittelt (Scheffé Test, Signifikanzniveau < 0,05). Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1.

Analyt	<i>einfach</i> Extraktion (A) WFR ± STABW	<i>zweifach</i> Extraktion (B) WFR ± STABW	<i>dreifach</i> Extraktion (C) WFR ± STABW	P-Wert (95%)
E2	58,7 ± 8,7	53,3 ± 9,0	48,3 ± 6,8	A B: 0,73247 C A: 0,36509 C B: 0,77077
2-HO-E2	417,5 ± 152,9	280,4 ± 24,9	231,8 ± 70,5	A B: 0,30450 C A: 0,14747 C B: 0,83672
4-HO-E2	175,0 ± 64,2	172,0 ± 135,2	214,1 ± 27,8	A B: 0,99912 C A: 0,86493 C B: 0,84567
16- α -HO-E2	45,9 ± 23,0	47,8 ± 3,8	45,1 ± 18,6	A B: 0,99145 C A: 0,99804 C B: 0,98147
2-MeO-E2	62,3 ± 11,1	73,4 ± 14,5	61,7 ± 13,8	A B: 0,61810 C A: 0,99842 C B: 0,58803
4-MeO-E2	62,1 ± 9,4	71,5 ± 6,0	68,2 ± 11,6	A B: 0,50448 C A: 0,73759 C B: 0,90937
3-O-Me-2-HO-E2	55,1 ± 6,8	50,8 ± 8,2	42,7 ± 7,2	A B: 0,62059 C A: 0,21628 C B: 0,63950
3-O-Me-4-HO-E2	53,0 ± 5,2	63,9 ± 10,4	58,7 ± 7,8	A B: 0,32415 C A: 0,70609 C B: 0,74072
E1	68,9 ± 16,3	86,6 ± 6,9	81,6 ± 2,0	A B: 0,21699 C A: 0,43052 C B: 0,83907
2-HO-E1	306,2 ± 71,9	379,3 ± 92,3	371,3 ± 69,5	A B: 0,55536 C A: 0,62113 C B: 0,99235
4-HO-E1	181,7 ± 72,4	221,6 ± 62,3	148,7 ± 24,5	A B: 0,70556 C A: 0,78499 C B: 0,35605
16- α -HO-E1	68,2 ± 16,5	89,7 ± 16,1	96,9 ± 10,1	A B: 0,27279 C A: 0,13120 C B: 0,83637
2-MeO-E1	73,0 ± 11,4	71,3 ± 6,5	70,4 ± 17,9	A B: 0,98595 C A: 0,96903 C B: 0,99656
4-MeO-E1	52,5 ± 14,4	84,7 ± 7,9	81,7 ± 19,2	A B: 0,09068 C A: 0,12317 C B: 0,96928
3-O-Me-2-HO-E1	59,4 ± 1,4	69,4 ± 13,7	60,3 ± 6,8	A B: 0,62781 C A: 0,97379 C B: 0,50710

Überprüfung kritischer Prozess-Schritte der Aufarbeitung auf die Bildung und Eliminierung von Artefakten

Tab. 91: Absolute PF (Counts) von 2-HO-E2-d₃, 4-HO-E2-d₃ und E2-d₃ nach Inkubation (16 h, 37°C) mit beziehungsweise ohne β -Glucuronidase-Zusatz (Typ HP-2; 10.000 U), Chloroform-extraktion und SPE. Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,50 sec.). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Dreifachinjektion); m_{ISTD/Säule} = 0,28 pmol. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22.

2-HO-E2-d₃	4-HO-E2-d₃	E2-d₃
Probe 1 (ohne β-Glucuronidase)		
186.171	427.546	3238000
263.864	271.685	3042000
388.513	497.553	2958000
Probe 2 (ohne β-Glucuronidase)		
308.565	77.024	3260000
282.461	96.112	3311900
175.604	115.961	3031000
Probe 3 (ohne β-Glucuronidase)		
347.106	88.401	3919000
382.032	137.427	3295000
400.845	94.782	3243000
2-HO-E2-d₃	4-HO-E2-d₃	E2-d₃
Probe 1 (mit β-Glucuronidase)		
64.571	84.455	838209
125.124	104.179	1066000
207.511	109.013	2992000
Probe 2 (mit β-Glucuronidase)		
255.760	249.264	2643000
253.669	217.261	2998000
292.141	174.366	2763000
Probe 3 (mit β-Glucuronidase)		
300.744	123.046	1194000
358.810	187.068	1306000
246.922	140.102	1179000

Tab. 92: Absolute PF von E1-d₄ und E2-d₃ ohne beziehungsweise mit Extraktion und Aufreinigung mittels SPE. Es wurden 200 mg Brustgewebe in 2 ml Sørensen Phosphat-Puffer (pH 4,9) auf-genommen, mit dem ISTD versetzt (E1-d₄, 225 pg; E2-d₃, 240 pg) und sofort der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Analyse mittels GC/MS/MS (jeweils Zweifachinjektion) im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.); m_{Analyt/Säule} = 15 pg für E1, 16 pg für E2. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

E2-d₃	E1-d₄	Referenz E2-d₃	Referenz E1-d₄
Probe 1			
882.668	1.560.000	2.392000	4.366.000
844.491	1.670.000	2.356.000	4.139.000
Probe 2			
597.714	1.004.000	2.524.000	5.005.000
551.052	721.822	2.607.000	4.628.000
Probe 3			
703.449	1.161.000	2.327.000	4.944.000
690.618	1.134.000	2.415.000	4.424.000

Charakterisierung der E2-d₃-/E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung

Tab 93: Absolute PF (Counts) der deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metabolite von 100 µl der hergestellten E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung. Messung mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwel-time*: 0,15 sec.). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

E2-d₃-Metaboliten-Referenzmischung	E2-d ₃ (419_285)	2-HO-E2-d ₃ (507_373)	4-HO-E2-d ₃ (507_373)	16-α-HO-E2-d ₃ (507_414)	2-MeO-E2-d ₃ (449_315)	4-MeO-E2-d ₃ (449_315)	
Mischung 1	1,128E+07	n.n.	n.n.	6,101E+06	1,171E+07	7,299E+06	
Mischung 2	1,042E+07	n.n.	n.n.	5,411E+06	1,099E+07	6,459E+06	
Mischung 3	1,022E+07	n.n.	n.n.	5,396E+06	1,114E+07	6,530E+06	
	E2 (416_285)	2-HO-E2 (504_373)	4-HO-E2 (504_373)	16-α-HO-E2 (504_414)	2-MeO-E2 (446_315)	4-MeO-E2 (446_315)	
Mischung 1	3,417E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
Mischung 2	4,259E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
Mischung 3	3,880E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
	E1-d ₄ (342_257)	2-HO-E1-d ₄ (430_345)	4-HO-E1-d ₄ (430_345)	16-α-HO-E1-d ₄ (430_286)	2-MeO-E1-d ₄ (372_342)	4-MeO-E1-d ₄ (372_342)	3-O-Me-2- HO-E1-d ₄ (372_342)
Mischung 1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Mischung 2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Mischung 3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	E1 (342_261)	2-HO-E1 (434_345)	4-HO-E1 (434_345)	16-α-HO-E1 (434_286)	2-MeO-E1 (376_346)	4-MeO-E1 (376_346)	3-O-Me-2- HO-E1-d ₄ (376_346)
Mischung 1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,274E+05	1,273E+06	2,537E+05
Mischung 2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,482E+05	1,159E+06	1,895E+05
Mischung 3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,011E+05	1,142E+06	2,088E+05

ANHANG

Tab. 94: Absolute PF (Counts) der deuterierten und undeuterierten E1- und E2-Metabolite von 100 µl der hergestellten E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung. Messung mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,15 sec.). Daten stammen aus drei unabhängigen Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion). Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

E1-d₄-Metaboliten-Referenzmischung	E2-d ₃ (419_285)	2-HO-E2-d ₃ (507_373)	4-HO-E2-d ₃ (507_373)	16-α-HO-E2-d ₃ (507_414)	2-MeO-E2-d ₃ (449_315)	4-MeO-E2-d ₃ (449_315)	
Mischung 1	n.n.	2,821E+07	1,215E+07	5,010E+06	n.n.	n.n.	
Mischung 2	n.n.	2,525E+07	1,185E+07	4,498E+06	n.n.	n.n.	
Mischung 3	n.n.	4,047E+07	2,167E+07	7,017E+06	n.n.	n.n.	
	E2 (416_285)	2-HO-E2 (504_373)	4-HO-E2 (504_373)	16-α-HO-E2 (504_414)	2-MeO-E2 (446_315)	4-MeO-E2 (446_315)	
Mischung 1	n.n.	6,211E+04	4,737E+04	n.n.	n.n.	n.n.	
Mischung 2	n.n.	3,224E+04	5,510E+04	n.n.	n.n.	n.n.	
Mischung 3	n.n.	4,994E+04	1,011E+05	n.n.	n.n.	n.n.	
	E1-d ₄ (342_257)	2-HO-E1-d ₄ (430_345)	4-HO-E1-d ₄ (430_345)	16-α-HO-E1-d ₄ (430_286)	2-MeO-E1-d ₄ (372_342)	4-MeO-E1-d ₄ (372_342)	3-O-Me-2-HO-E1-d ₄ (372_342)
Mischung 1	2,375E+06	6,003E+07	1,171E+08	1,742E+06	1,933E+06	3,648E+06	6,565E+06
Mischung 2	1,977E+06	4,774E+07	9,847E+07	1,580E+06	1,490E+06	2,820E+06	4,969E+06
Mischung 3	2,508E+06	9,260E+07	2,078E+08	3,170E+06	1,982E+06	3,989E+06	6,987E+06
	E1 (342_261)	2-HO-E1 (434_345)	4-HO-E1 (434_345)	16-α-HO-E1 (434_286)	2-MeO-E1 (376_346)	4-MeO-E1 (376_346)	3-O-Me-2-HO-E1-d ₄ (376_346)
Mischung 1	n.n.	8,774E+04	1,096E+05	n.n.	3,274E+05	1,273E+06	2,537E+05
Mischung 2	n.n.	5,199E+04	6,664E+04	n.n.	3,482E+05	1,159E+06	1,895E+05
Mischung 3	n.n.	7,100E+04	7,411E+04	n.n.	4,011E+05	1,142E+06	2,088E+05

Überprüfung der Lösungsstabilität von Catechol-Estrogenen

Tab. 95: Absolute PF (Counts) der Catechol-Estrogene nach Analyse aus der jeweiligen Urlösung (Lagerung bei - 24°C, Abdunkelung der Probenvials mit Aluminiumfolie) sowie aus frisch hergestellten Verdünnungen in ACN beziehungsweise ACN mit 0,1% FA (v/v). Analyse mittels GC/MS/MS im MRM-Modus (*dwell-time*: 0,25 sec.); $m_{\text{Analyt/Säule}} = 10 \text{ pg}$ für 2-/4-HO-E1 und 2-/4-HO-E2. Daten stammen aus drei Bestimmungen (jeweils Einfachinjektion. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2.

2-HO-E1	4-HO-E1	2-HO-E2	4-HO-E2
<i>Analyse aus Urlösung</i>			
208.593	249.554	138.732	267.180
268.701	154.294	152.111	88.548
185.998	188.091	141.889	87.309
<i>Analyse aus ACN-Verdünnung</i>			
150.581	57.244	114.536	155.622
115.688	63.290	99.450	88.548
106.836	28.735	69.363	87.309
<i>Analyse aus ACN-Verdünnung (0,1 % FA)</i>			
182.225	160.120	179.977	179.347
238.196	169.713	120.785	122.093
169.044	135.190	100.790	167.706

Gewebespiegel von E1- und E2-Metaboliten im Brustgewebe

Tab. 96: Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten der Teilnehmerinnen. Die Gewebespenden wurden entsprechend einem festgelegten Dokumentationssystem codiert, archiviert und anonym mit Hilfe eines Patientencodes übermittelt.

Frau	Patienten-code	Alter (Jahre)	BMI	Anzahl Schwangerschaften	Rauchverhalten	Alkoholkonsum	Einnahme AZM	Einnahme NEM	Menopausalstatus
0	-	41	22	keine Angabe	ja	nein	nein	nein	prämenopausal
1	14116	29	27	0	mein	nein	nein	nein	prämenopausal
2	21640	49	24,5	0	20 Zigaretten/Tag	1 Glas Wein/Tag	ja (Lafamme)	nein	postmenopausal
3	21545	30	24	1	7 - 10 Zigaretten/Tag	nein	nein	nein	prämenopausal
4	21870	18	25	0	mein	1x im Monat	ja (Quirum)	nein	prämenopausal
5	21982	51	26	3	mein	nein	nein	nein	postmenopausal
6	21912	51	28	0	mein	Bier, aber nicht regelmäßig	nein	nein	prämenopausal
7	19832	52	24	1	mein	nein	nein	ja (Phytostrol)	postmenopausal
8	22270	51	24	0	mein	nein	nein	nein	postmenopausal
9	22255	17	25	0	mein	gelegentlich	ja (Pille - Minisiton)	nein	prämenopausal
10	22342	51	28	2	mein	nein	nein	nein	prämenopausal
11	22037	51	25	2	mein	nein	nein	nein	postmenopausal
12	4322	42	27	3	mein	gelegentlich	ja (Hormonspirale)	nein	prämenopausal
13	22554	22	26	1	mein	nein	nein	nein	prämenopausal
14	546	49	26	2	mein	nein	nein	nein	postmenopausal
15	W003	53	25	2	mein	keine Angabe	nein	nein	prämenopausal
16	22727	27	22	0	seit 8 Jahren, 5 Zigaretten/Tag	1 Glas Wein/Woche	nein	nein	prämenopausal
17	-	23	24,5	0	nein	keine Angabe	nein	nein	prämenopausal

ANHANG

Frau	Patienten-code	Alter (Jahre)	BMI	Anzahl Schwanger-schaften	Rauch-verhalten	Alkoholkonsum	Einnahme AZM	Einnahme NEM	Menopausal-status
18	W001	35	28	3	nein	nein	nein	nein	prämenopausal
19	W002	57	23,4	keine Angabe	nein	keine Angabe	nein	nein	keine Angabe
20	S001	27	20	0	seit 12 Jahren, 25 Zigaretten/Tag	2 Flaschen Bier und 3 Gläser Wein/Woche	ja (Verhütungsring - Nuva Ring)	nein	prämenopausal
21	22548	22	22	0	seit 2005, 10 - 15 Zigaretten/Tag	2x im Monat (Softdrinks)	ja (Verhütungsring)	nein	prämenopausal
22	W004	51	30	0	nein	1 - 2 Wein- schorlen/Woche	nein	nein	prämenopausal
24	22960	56	24	2	nein	1 - 2 Bier/Woche, 1 - 2 Gläser Wein/Woche	nein	nein	postmenopausal
25	3363	47	31,8	0	nein	2 - 3 Gläser Wein/Woche	nein	nein	prämenopausal
26	22755	44	23	0	seit 27 Jahren nur im Urlaub	nur im Urlaub	ja (Spirale)	nein	prämenopausal
27	22717	54	24	2	nein	1 Glas Wein/Tag	nein	nein	postmenopausal
28	22916	44	28,2	2	nein	1 Glas Wein/Woche	nein	nein	prämenopausal
29	W005	32	26,9	1	nein	selten	nein	nein	prämenopausal
30	W006	30	27,9	2	nein	gelegentlich	ja	nein	prämenopausal
31	22886	54	24	keine Angabe	nein	1-2 Gläser Wein/Woche	nein	nein	keine Angabe
32	23352	33	26,8	0	nein	nein	nein	nein	prämenopausal
33	23528	18	26,1	0	ja (10 Zigaretten/Tag)	1 Flasche Asbach (Weinbrand)/Woche	ja (Cyprotrom)	nein	prämenopausal

ANHANG

Tab. 97: Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit ermittelten Gehalte von E2 und E1 in den untersuchten Gewebespenden, wobei jeweils die mittleren Gehalte angegeben sind. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5.*

Frau	Patienten- code	E2 (pmol/g Gewebe)	E1 (pmol/g Gewebe)	E2/E1	E1/E2	Summe E1 und E2 (pmol/g Gewebe)
0	-	0,717	0,850	0,844	1,186	1,567
1	14116	0,906	< 0,334	-	-	0,906
2	21640	0,350	1,233	0,284	3,526	1,583
3	21545	0,553	0,858	0,644	1,552	1,411
4	21870	0,936	9,932	0,094	10,616	10,867
5	21982	0,528	0,600	0,880	1,137	1,128
6	21912	0,555	0,580	0,957	1,045	1,135
7	19832	0,300	0,410	0,732	1,367	0,710
8	22270	1,340	1,727	0,776	1,289	3,066
9	22255	nicht analysiert				
10	22342	1,242	0,343	3,616	0,277	1,585
11	22037	0,698	1,043	0,669	1,495	1,741
12	4322	0,798	2,525	0,316	3,163	3,323
13	22554	1,009	1,170	0,862	1,159	2,179
14	546	0,300	0,100	3,000	0,333	0,400
15	W003	0,300	0,287	1,047	0,956	0,587
16	22727	1,469	2,723	0,539	1,854	4,192
17	-	0,227	0,470	0,484	2,068	0,697
18	W001	3,464	4,970	0,697	1,435	8,434
19	W002	< 0,486	< 0,274	-	-	-

ANHANG

Frau	Patienten- code	E2 (pmol/g Gewebe)	E1 (pmol/g Gewebe)	E2/E1	E1/E2	Summe E1 und E2 (pmol/g Gewebe)
20	S001	0,300	0,630	0,476	2,100	0,930
21	22548	0,501	0,560	0,895	1,117	1,061
22	W004	nicht analysiert				
24	22960	0,283	2,255	0,126	7,958	2,538
25	3363	1,141	1,720	0,663	1,508	2,861
26	22755	0,990	0,846	1,170	0,855	1,836
27	22717	0,300	0,357	0,841	1,189	0,657
28	22916	0,805	1,487	0,541	1,847	2,291
29	W005	1,034	0,967	1,070	0,935	2,001
30	W006	0,895	0,100	8,952	0,112	0,995
31	22886	0,300	0,853	0,352	2,844	1,153
32	23352	0,631	1,240	0,509	1,966	1,871
33	23528	nicht analysiert				

Tab. 98: Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit ermittelten Gehalte von 2-MeO-E1, 4-MeO-E1 und 3-O-Me-2-HO-E1 in den untersuchten Gewebespenden, wobei jeweils die mittleren Gehalte angegeben sind. Arbeitsbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.1. Rohdaten: *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 8.*

Frau	Patienten-code	2-MeO-E1 (pmol/g Gewebe)	4-MeO-E1 (pmol/g Gewebe)	3-O-Me-2-HO-E1 (pmol/g Gewebe)
0	-	0,670	0,594	< 0,637
1	14116	1,234	0,979	< 2,386
2	21640	3,316	6,004	0,388
3	21545	0,916	1,045	< 1,710
4	21870	5,127	3,840	0,121
5	21982	2,642	7,516	0,127
6	21912	0,295	1,463	< 2,013
7	19832	1,952	2,844	0,063
8	22270	2,412	6,999	0,597
9	22255	nicht analysiert		
10	22342	0,692	1,017	< 0,772
11	22037	3,687	8,591	0,941
12	4322	3,247	3,747	0,098
13	22554	3,248	8,403	1,475
14	546	1,651	4,862	0,610
15	W003	0,481	1,021	< 1,609
16	22727	2,732	4,922	0,545
17	-	2,041	6,197	0,688
18	W001	1,328	1,142	< 2,502
19	W002	1,969	1,501	< 3,783
20	S001	0,319	0,603	< 2,309
21	22548	0,617	0,655	< 0,834
22	W004	nicht analysiert		
24	22960	0,321	0,485	< 0,973
25	3363	3,378	7,844	0,777
26	22755	2,682	2,915	< 1,728
27	22717	0,330	0,376	< 3,478
28	22916	1,128	0,549	< 1,390
29	W005	2,262	4,096	0,513
30	W006	2,077	6,400	0,175
31	22886	0,162	0,460	< 1,489
32	23352	0,852	0,629	< 1,027
33	23528	nicht analysiert		

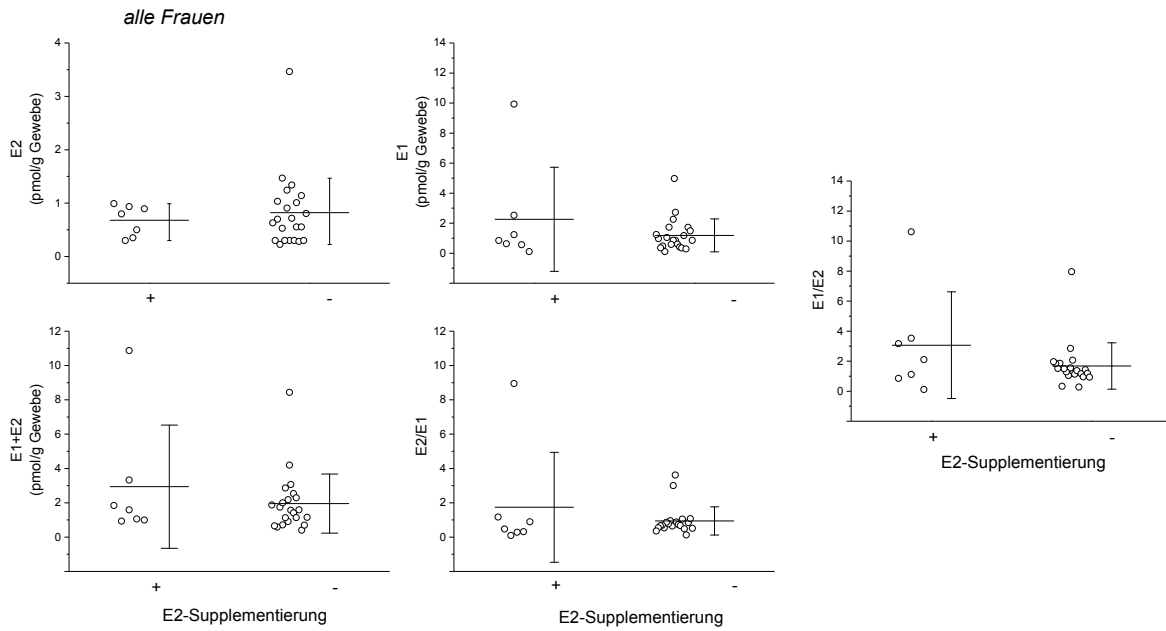


Abb. 101: Gehalte von E2 und E1 sowie deren Summe und Quotient von E2 zu E1 beziehungsweise E1 zu E2 im Vergleich mit (+) und ohne (-) E2-Supplementierung unabhängig des Menopausalstatus der Probandinnen. Analyse mittels *GC/MS/MS* im *MRM*-Modus. Dargestellt sind jeweils die einzelnen Gehalte sowie die Mittelwertlinie und die Standardabweichung aus 28 Bestimmungen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* (*: $p < 0,05$) ermittelt. Analysenbedingungen Kap. 4.2.22. Methodenbedingungen Kap. 4.2.23.2. Rohdaten: Anhang, Tab. 97 sowie *Daten-CD, Dissertation_Futh_2015; Tab. 5*.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Albero, B., C. Sanchez-Brunete, E. Miguel, R. A. Perez und J. L. Tadeo (2012). Determination of selected organic contaminants in soil by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry with in situ derivatization. *J Chromatogr A* **1248**: 9-17.
- Albert, C., M. Vallee, G. Beaudry, A. Belanger und D. W. Hum (1999). The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes. *Endocrinology* **140**(7): 3292-3302.
- Albin, N., L. Massaad, C. Toussaint, M. C. Mathieu, J. Morizet, O. Parise, A. Gouyette und G. G. Chabot (1993). Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res* **53**(15): 3541-3546.
- Andrew, R. (2001). Clinical measurement of steroid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **15**(1): 1-16.
- Baker, M. E. (2001). Evolution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action. *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 211-215.
- Belanger, A., J. Couture, S. Caron und R. Roy (1990). Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Ann N Y Acad Sci* **595**: 251-259.
- Blankenstein, M. A., J. van de Ven, I. Maitimu-Smeele, G. H. Donker, P. C. de Jong, J. Daroszewski, J. Szymczak, A. Milewicz und J. H. Thijssen (1999). Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**(1-6): 293-297.
- Braunersreuther, T. (2013). Etablierung einer GC-MS/MS-Methode zur Erfassung des Metabolitenprofils von Estrogenen in Plasmaproben. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Castagnetta, L. A., O. M. Granata, F. P. Arcuri, L. M. Polito, F. Rosati und G. P. Cartoni (1992). Gas chromatography/mass spectrometry of catechol estrogens. *Steroids* **57**(9): 437-443.
- Cavalieri, E. und E. Rogan (2006). Catechol quinones of estrogens in the initiation of breast, prostate, and other human cancers: keynote lecture. *Ann N Y Acad Sci* **1089**: 286-301.
- Cavalieri, E. L. und E. G. Rogan (2010). Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers. *Future Oncol* **6**(1): 75-91.
- Cavalieri, E. L. und E. G. Rogan (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**(3-5): 169-180.
- Cavalieri, E. L., D. E. Stack, P. D. Devanesan, R. Todorovic, I. Dwivedy, S. Higginbotham, S. L. Johansson, K. D. Patil, M. L. Gross, J. K. Gooden, R. Ramanathan, R. L. Cerny und E. G. Rogan (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10937-10942.
- Chakravarti, D., P. C. Mailander, K. M. Li, S. Higginbotham, H. L. Zhang, M. L. Gross, J. L. Meza, E. L. Cavalieri und E. G. Rogan (2001). Evidence that a burst of DNA

- depurination in SENCAR mouse skin induces error-prone repair and forms mutations in the H-ras gene. *Oncogene* **20**(55): 7945-7953.
- Cheraghi, Z., J. Poorolajal, T. Hashem, N. Esmailnasab und A. Doosti Irani (2012). Effect of body mass index on breast cancer during premenopausal and postmenopausal periods: a meta-analysis. *PLoS One* **7**(12): e51446.
- Chetrite, G. S., J. Cortes-Prieto, J. C. Philippe, F. Wright und J. R. Pasqualini (2000). Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* **72**(1-2): 23-27.
- Convert, O., C. Van Aerden, L. Debrauwer, E. Rathahao, H. Molines, F. Fournier, J. C. Tabet und A. Paris (2002). Reactions of estradiol-2,3-quinone with deoxyribonucleosides: possible insights in the reactivity of estrogen quinones with DNA. *Chem Res Toxicol* **15**(5): 754-764.
- Danson, S., T. H. Ward, J. Butler und M. Ranson (2004). DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* **30**(5): 437-449.
- Dawling, S., D. L. Hachey, N. Roodi und F. F. Parl (2004). In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol* **17**(9): 1258-1264.
- Dawling, S., N. Roodi, R. L. Mernaugh, X. Wang und F. F. Parl (2001). Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* **61**(18): 6716-6722.
- Debrauwer, L., E. Rathahao, I. Jouanin, A. Paris, G. Clodic, H. Molines, O. Convert, F. Fournier und J. C. Tabet (2003). Investigation of the regio- and stereo-selectivity of deoxyguanosine linkage to deuterated 2-hydroxyestradiol by using liquid chromatography/ESI-ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**(4): 364-372.
- Distler, W., Kast, K., Canzler, U (2010). Adipositas und Karzinogenese des Mammakarzinoms. *Gynäkologie* **43**:552-558.
- Ernster, V. L., M. R. Wrensch, N. L. Petrakis, E. B. King, R. Miike, J. Murai, W. H. Goodson, 3rd und P. K. Siiteri (1987). Benign and malignant breast disease: initial study results of serum and breast fluid analyses of endogenous estrogens. *J Natl Cancer Inst* **79**(5): 949-960.
- Favero, A., M. Parpinel und S. Franceschi (1998). Diet and risk of breast cancer: major findings from an Italian case-control study. *Biomed Pharmacother* **52**(3): 109-115.
- Folkerd, E. J., P. E. Lonning und M. Dowsett (2014). Interpreting plasma estrogen levels in breast cancer: caution needed. *J Clin Oncol* **32**(14): 1396-1400.
- Fussell, K. C., R. G. Udasin, P. J. Smith, M. A. Gallo und J. D. Laskin (2011). Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis* **32**(8): 1285-1293.
- Gaikwad, N. W. (2013). Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for profiling of steroid metabolome in human tissue. *Anal Chem* **85**(10): 4951-4960.

- Gaspard, U. J., M. Dubois, D. Gillain, P. Franchimont und J. Duvivier (1984). Ovarian-Function Is Effectively Inhibited by a Low-Dose Triphasic Oral-Contraceptive Containing Ethinylestradiol and Levonorgestrel. *Contraception* **29**(4): 305-318.
- Gelbke, H. P., O. Haupt und R. Knuppen (1973). A simple chemical method for the synthesis of catechol estrogens. *Steroids* **21**(2): 205-218.
- Giese, R. W. (2003). Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. *J Chromatogr A* **1000**(1-2): 401-412.
- Goodman, J. E., L. T. Jensen, P. He und J. D. Yager (2002). Characterization of human soluble high and low activity catechol-O-methyltransferase catalyzed catechol estrogen methylation. *Pharmacogenetics* **12**(7): 517-528.
- Greenberg, H. und S. Penman (1966). Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells. *J Mol Biol* **21**(3): 527-535.
- Gross, J. H. (2013). *Massenspektrometrie*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag DOI 10.1007/978-3-8274-2981-0_6.
- Guillemette, C., A. Belanger und J. Lepine (2004). Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Research* **6**(6): 246-254.
- Hankinson, S. E., W. C. Willett, J. E. Manson, G. A. Colditz, D. J. Hunter, D. Spiegelman, R. L. Barbieri und F. E. Speizer (1998). Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* **90**(17): 1292-1299.
- Hawighorst, T. und A. Emons (2006). Adipositas und Krebs. *Gynäkologe* **39**: 975-980.
- Hernando, M. D., M. Mezcua, M. J. Gomez, O. Malato, A. Aguera und A. R. Fernandez-Alba (2004). Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *J Chromatogr A* **1047**(1): 129-135.
- Hesse, M., H. Meier und B. Zeeh (2005). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag. **7., überarbeitete Auflage**.
- Höfert, N. (2011). Synthese von 2- und 4-Hydroxyestradiol sowie deren methylierten Metabolite zur Verwendung als Referenzen. Institut für Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Hoffmann, T. (2013). Quantifizierung des 17 β -Estradiol-Gehaltes in Pellets mittels HPLC-DAD sowie Quantifizierung des 17 β -Estradiol-Gehaltes in Plasmaproben weiblicher ACI-Ratten aus der Pellet-Studie mit einer geeigneten Quantifizierungsmethode. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Hoppen, H. O. und L. Siekmann (1974). Gas chromatography - mass spectrometry of catechol estrogens. *Steroids* **23**(1): 17-34.
- Huang, L., T. Hoffman und M. Vore (1998). Adenosine triphosphate-dependent transport of estradiol-17 β (beta-D-glucuronide) in membrane vesicles by MDR1 expressed in insect cells. *Hepatology* **28**(5): 1371-1377.

- Hübschmann, H.-J. (2009). Handbook of GC/MS - Fundamentals and Applications. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **Second, Completely Revised and Updated Edition.**
- IARC (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A review of human carcinogens. Part A: Pharmaceuticals. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, **100A**.
- Knapp, D. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley & Sons.
- Kocienski, P. J. (2005). Protecting Groups, Bd. 3. Thieme Medical Publishers. Stuttgart.
- Kromidas, S. und H.-J. Kuss (2008). Chromatogramme richtig integrieren und bewerten - Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Kushinsky, S. und M. Anderson (1974). Creepage of estrogens vs. loss by sorption on glassware. Clin Chem **20**(12): 1528-1534.
- Lahmann, P. H., L. Lissner, B. Gullberg, H. Olsson und G. Berglund (2003). A prospective study of adiposity and postmenopausal breast cancer risk: the Malmo Diet and Cancer Study. Int J Cancer **103**(2): 246-252.
- Levy, G. A., A. A. Mc und C. A. Marsh (1958). Purification of beta-glucuronidase from the preputial gland of the female rat. Biochem J **69**(1): 22-27.
- Li, S. W., V. T. Spaziano, W. H. Elliott und W. J. Burke (1996). Synthesis and Use of Deuterated 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde as an Internal Standard for Determination of Dopegal in Brain Tissue by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. BIOORGANIC CHEMISTRY **24**: 169–177.
- Li, Y., M. A. Trush und J. D. Yager (1994). DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. Carcinogenesis **15**(7): 1421-1427.
- Liehr, J. G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? Endocr Rev **21**(1): 40-54.
- Lippert, H. (2000). Lehrbuch Anatomie. München, Jena, Urban & Fischer Verlag. **5. Auflage.**
- Liu, R. H., G. Foster, E. J. Cone und S. D. Kumar (1995). Selecting an Appropriate Isotopic Internal Standard for Gas-Chromatography Mass-Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse - Pentobarbital Example. Journal of Forensic Sciences **40**(6): 983-989.
- Loe, D. W., K. C. Almquist, S. P. Cole und R. G. Deeley (1996). ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. J Biol Chem **271**(16): 9683-9689.
- Longcope, C., S. L. Hui und C. C. Johnston, Jr. (1987). Free estradiol, free testosterone, and sex hormone-binding globulin in perimenopausal women. J Clin Endocrinol Metab **64**(3): 513-518.
- Lux, M. P., P. A. Fasching und M. W. Beckmann (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. J Mol Med (Berl) **84**(1): 16-28.

- Makin, H. L. J., J. W. Honour, H. L. Shackleton und W. J. Griffiths (2010). General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. Steroid Analysis, Springer Science+Business Media B.V. DOI 10.1023/b135931_3.
- Martinez, D. (2013). Einfluss einer definierten Enzymausstattung auf die Mutagenität von 17 β -Estradiol und dessen Metaboliten. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- McFadyen, M. C., S. Breeman, S. Payne, C. Stirk, I. D. Miller, W. T. Melvin und G. I. Murray (1999). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1. *J Histochem Cytochem* **47**(11): 1457-1464.
- McNatty, K. P., A. Makris, C. DeGrazia, R. Osathanondh und K. J. Ryan (1979). The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **49**(5): 687-699.
- Miettinen, M., V. Isomaa, H. Peltoketo, D. Ghosh und P. Vihko (2000). Estrogen metabolism as a regulator of estrogen action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**(3): 259-270.
- Mitrunen, K. und A. Hirvonen (2003). Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res* **544**(1): 9-41.
- Moon, J. Y., K. J. Kim, M. H. Moon, B. C. Chung und M. H. Choi (2011). A novel GC-MS method in urinary estrogen analysis from postmenopausal women with osteoporosis. *J Lipid Res* **52**(8): 1595-1603.
- Morimoto, L. M., E. White, Z. Chen, R. T. Chlebowski, J. Hays, L. Kuller, A. M. Lopez, J. Manson, K. L. Margolis, P. C. Muti, M. L. Stefanick und A. McTiernan (2002). Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* **13**(8): 741-751.
- Mulvana, D. E. (2010). Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis* **2**(6): 1051-1072.
- Murray, G. I., M. C. Taylor, M. C. McFadyen, J. A. McKay, W. F. Greenlee, M. D. Burke und W. T. Melvin (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* **57**(14): 3026-3031.
- O'Brien, S. N., J. Anandjiwala und T. M. Price (1997). Differences in the estrogen content of breast adipose tissue in women by menopausal status and hormone use. *Obstet Gynecol* **90**(2): 244-248.
- O'Halloran, S. und K. F. Ilett (2008). Evaluation of a deuterium-labeled internal standard for the measurement of sirolimus by high-throughput HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **54**(8): 1386-1389.
- Palmiter, R. D. (1974). Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undergraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **13**(17): 3606-3615.

- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, C. Blacker, M. C. Feinstein, L. Delalonde, M. Talbi und C. Maloche (1996). Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* **81**(4): 1460-1464.
- Penman, S. (1966). RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J Mol Biol* **17**(1): 117-130.
- Peschke, C. (2011). Synthese von deuterierten 2- und 4-Hydroxyestradiol sowie entsprechender nicht-deuterierter Analoga mit nucleophilen Zellbestandteilen. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Potischman, N., C. A. Swanson, P. Siiteri und R. N. Hoover (1996). Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status. *Journal of the National Cancer Institute* **88**(11): 756-758.
- Raftogianis, R., C. Creveling, R. Weinshilboum und J. Weisz (2000). Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr*(27): 113-124.
- Reed, M. J., G. W. Aherne, M. W. Ghilchik, S. Patel und J. Chakraborty (1991). Concentrations of oestrone and 4-hydroxyandrostenedione in malignant and normal breast tissues. *Int J Cancer* **49**(4): 562-565.
- Reed, M. J. und A. Purohit (2001). Aromatase regulation and breast cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **54**(5): 563-571.
- RKI (2010). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin. Robert Koch-Institut (Hrsg.).
- RKI (2013). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. RKI, Berlin. Robert Koch-Institut (Hrsg.) **9. Ausgabe.**
- Rogan, E. G., A. F. Badawi, P. D. Devanesan, J. L. Meza, J. A. Edney, W. W. West, S. M. Higginbotham und E. L. Cavalieri (2003). Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis* **24**(4): 697-702.
- Rosner, W., S. E. Hankinson, P. M. Sluss, H. W. Vesper und M. E. Wierman (2013). Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* **98**(4): 1376-1387.
- Roy, D., J. Weisz und J. G. Liehr (1990). The O-methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**(3): 459-462.
- Ruder, H. J., L. Loriaux und M. B. Lipsett (1972). Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest* **51**(4): 1020-1033.
- Russo, I. H. und J. Russo (2004). *Molecular Basis of Breast Cancer - Prevention and Treatment.* Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- Sachs, L. und J. Hedderich (2006). *Angewandte Statistik - Methodensammlung mit R.* Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag. **Zwölfte, vollständig neu bearbeitete Auflage.**

- Saeed, M., M. Zahid, E. Rogan und E. Cavalieri (2005). Synthesis of the catechols of natural and synthetic estrogens by using 2-iodoxybenzoic acid (IBX) as the oxidizing agent. *Steroids* **70**(3): 173-178.
- Schmalbach, K. (2014). Identification of factors influencing 17beta-estradiol metabolism in female mammary gland. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Schneider, J., D. Kinne, A. Fracchia, V. Pierce, K. E. Anderson, H. L. Bradlow und J. Fishman (1982). Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(9): 3047-3051.
- Schober, M. (2011). Untersuchung des Einflusses des Isoflavons Genistein auf den 17β-Estradiol-Metabolismus von kultivierten MCF-7 Zellen mittels GC-MS/MS. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Shi, W., L. Wang, D. P. Rousseau und P. N. Lens (2010). Removal of estrone, 17alpha-ethinylestradiol, and 17beta-estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environ Sci Pollut Res Int* **17**(4): 824-833.
- Shimada, T., C. L. Hayes, H. Yamazaki, S. Amin, S. S. Hecht, F. P. Guengerich und T. R. Sutter (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **56**(13): 2979-2984.
- Siiteri, P. K. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* **45**(1 Suppl): 277-282.
- Singh, S., D. Chakravarti, J. A. Edney, R. R. Hollins, P. J. Johnson, W. W. West, S. M. Higginbotham, E. L. Cavalieri und E. G. Rogan (2005). Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma. *Oncol Rep* **14**(4): 1091-1096.
- Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chem Phys Lipids* **44**(2-4): 87-125.
- Stack, D. E., J. Byun, M. L. Gross, E. G. Rogan und E. L. Cavalieri (1996). Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides. *Chem Res Toxicol* **9**(5): 851-859.
- Stoll, B. A., L. J. Vatten und S. Kvinnsland (1994). Does Early Physical Maturity Influence Breast-Cancer Risk. *Acta Oncologica* **33**(2): 171-176.
- Taioli, E., A. Im, X. Xu, T. D. Veenstra, G. Ahrendt und S. Garte (2010). Comparison of estrogens and estrogen metabolites in human breast tissue and urine. *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 93.
- Tate, J. und G. Ward (2004). Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* **25**(2): 105-120.
- Thijssen, J. H. und M. A. Blankenstein (1989). Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25**(12): 1953-1959.

- Thijssen, J. H., M. A. Blankenstein, W. R. Miller und A. Milewicz (1987). Estrogens in tissues: uptake from the peripheral circulation or local production. *Steroids* **50**(1-3): 297-306.
- Thomson, C., C. Broadbent und H. Prest (2007). The 5975C Series MSDs: Guidance in Implementing High Ion Source Temperatures - Technical Overview. Agilent Technologies.
- Thorne, G. und S. Gaskell (1974). Evaluation of Smoothing Routines for the Optimization of Selected Ion Monitoring Data. *Biomedical and environmental mass spectrometry* **Bd. 13**: 605-609.
- Trontelj, J. (2012). Quantification of Glucuronide Metabolites in Biological Matrices by LC-MS/MS, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana Slovenia.
- Vainio, H., R. Kaaks und F. Bianchini (2002). Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev* **11 Suppl 2**: S94-100.
- van Landeghem, A. A., J. Poortman, M. Nabuurs und J. H. Thijssen (1985). Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* **45**(6): 2900-2906.
- Vermeulen, A., J. P. Deslypere, R. Paridaens, G. Leclercq, F. Roy und J. C. Heuson (1986). Aromatase, 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in postmenopausal women. *Eur J Cancer Clin Oncol* **22**(4): 515-525.
- Vogesser, M. und C. Seger (2010). Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem* **56**(8): 1234-1244.
- Wang, L. Q. und M. O. James (2005). Sulfotransferase 2A1 forms estradiol-17-sulfate and celecoxib switches the dominant product from estradiol-3-sulfate to estradiol-17-sulfate. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**(5): 367-374.
- Wang, S., M. Cyronak und E. Yang (2007). Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* **43**(2): 701-707.
- Wang, Z., E. R. Chandrasena, Y. Yuan, K. W. Peng, R. B. van Breemen, G. R. Thatcher und J. L. Bolton (2010). Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* **23**(8): 1365-1373.
- Watanabe, K., K. Takanashi und I. Yoshizawa (1989). Plasma estradiol 17-sulfate and 2-hydroxyestradiol 17-sulfate levels and their metabolic clearance rates in rats. *J Steroid Biochem* **32**(6): 823-827.
- Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia* **55**: S107-S113.
- Willett, W. C., M. L. Browne, C. Bain, R. J. Lipnick, M. J. Stampfer, B. Rosner, G. A. Colditz, C. H. Hennekens und F. E. Speizer (1985). Relative weight and risk of breast cancer among premenopausal women. *Am J Epidemiol* **122**(5): 731-740.

- Wood, M., M. Laloup, M. Ramirez Fernandez Mdel, K. M. Jenkins, M. S. Young, J. G. Ramaekers, G. De Boeck und N. Samyn (2005). Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* **150**(2-3): 227-238.
- Xu, Y. Z., H. R. Lin, A. C. Lua und C. Chen (2008). Determination of dimethoxyphenethylamine derivatives in urine by deuterium labeled internal standards. *Journal of the Serbian Chemical Society* **73**(12): 1223-1233.
- Yaghjian, L. und G. A. Colditz (2011). Estrogens in the breast tissue: a systematic review. *Cancer Causes Control* **22**(4): 529-540.
- Yoshizawa, I., K. Takanashi, K. Watanabe, T. Sato, H. Honjo, K. Tanaka, N. Sakuragi und S. Fujimoto (1992). The physiological role of estradiol 17-sulfate during pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8): 567-570.
- Zahid, M., E. Kohli, M. Saeed, E. Rogan und E. Cavalieri (2006). The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity. *Chem Res Toxicol* **19**(1): 164-172.
- Zhang, H. und J. Henion (1999). Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology. *Anal Chem* **71**(18): 3955-3964.
- Zhu, B. T. und A. H. Conney (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* **19**(1): 1-27.
- Zumoff, B. (1982). Relationship of obesity to blood estrogens. *Cancer Res* **42**(8 Suppl): 3289s-3294s.

