

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen  
eingereicht von Prof. Dr. med. N. von Ahsen

**Etablierung, Validierung und Anwendung einer  
gaschromatographisch-massenspektrometrischen  
Methode zur Analyse von Testosteron und 17 $\alpha$ -OH-  
Progesteron im Serum**

**Methodenvergleich der GC-NCI-MS-Methode mit dem Siemens ADVIA  
Centaur Immunoassay der Testosteronanalyse**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Liligret Valerie Schön

aus Münster

Göttingen 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 10.07.2010 bis zum 15.08.2012 im Centrum für Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Münster unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J.-R. Nofer und Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen erstellt.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. von Ahsen

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2013

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Formelverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Steroidhormone Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron.....	2
1.1.1 Struktur und chemische Eigenschaften .....	2
1.1.2 Biosynthese .....	3
1.1.3 Endokrine Steuerung der Biosynthese und Sekretion .....	5
1.1.4 Transport und Metabolismus .....	6
1.1.5 Physiologische Wirkungen.....	7
1.1.6 Häufige klinische Fragestellungen .....	8
1.2 Analytik der Steroidhormone .....	10
1.2.1 Geschichtlicher Überblick und aktueller Stand der Forschung.....	10
1.2.2 Immunoassay .....	15
1.2.2.1 Klassifizierung der Immunoassays .....	15
1.2.2.2 Immunoassays in der Steroidanalytik.....	15
1.2.2.3 Siemens Centaur ADVIA Testosteron Assay.....	16
1.2.2.4 Interferenzen und analytische Spezifität der Immunoassays.....	16
1.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	17
1.2.3.1 Gaschromatographische Trennung.....	17
1.2.3.2 Probenvorbereitung.....	19
1.2.3.3 Derivatisierungen in der Steroidanalytik .....	19
1.2.3.4 Massenspektrometrische Detektion.....	20
1.2.3.5 Identifizierung der Analyte.....	21
1.2.3.6 Quantitative Auswertung von GC/MS-Daten.....	22
1.3 Ziele der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Reagenzien.....	25
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	25
2.1.2 Reagenzien für die Derivatisierung.....	25
2.1.3 Herstellen der Standardlösungen für die Derivatisierung .....	25
2.2 Standardsubstanzen.....	26
2.2.1 Herstellung der Stamm- und Kalibrierlösungen.....	26
2.2.1.1 Herstellung der Stammlösungen.....	26
2.2.1.2 Herstellung der Kalibrierlösungen .....	27
2.2.2 Humanserum .....	27
2.2.2.1 Herstellung der Kalibrierproben .....	27
2.2.2.2 Herstellung der Kontrollproben.....	27
2.2.2.3 Herstellung der Validierungsproben .....	28
2.3 Labormaterialien und Geräte für die Probenaufarbeitung.....	28
2.3.1 Labormaterialien.....	28
2.3.2 Geräte.....	29
2.4 Analyseninstrumente.....	29

---

2.4.1	Gaschromatographie-Massenspektrometrie im NCI-Modus .....	29
2.4.2	Siemens ADVIA Centaur Immunoassay für Testosteron .....	29
2.4.3	Statistische Auswertung.....	29
3	Methodenentwicklung und Ergebnisse .....	30
3.1	Methodenentwicklung .....	30
3.1.1	Probenvorbereitung .....	30
3.1.1.1	Auswahl und Zugabe von internem Standard .....	31
3.1.1.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	31
3.1.1.3	Clean-up mittels Festphasenextraktion.....	33
3.1.2	Derivatisierung.....	34
3.1.2.1	Silylierung.....	35
3.1.2.2	Derivatisierung mit dem fluorierten Marker Pentafluorbenzylhydroxylamin- hydrochlorid .....	36
3.1.3	Mikromethode .....	37
3.1.4	Optimierung und Einrichtung der Geräteparameter und Analysebedingungen...37	
3.1.5	Erstellen von Massenspektren und Auswahl der Fragmentationen.....	38
3.1.6	Chromatographische Analyse im SIM-Modus.....	39
3.2	Ergebnisse der Methodenentwicklung.....	40
3.2.1	Probenvorbereitung .....	40
3.2.1.1	Interner Standard .....	40
3.2.1.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	40
3.2.1.3	Festphasenextraktion.....	42
3.2.2	Optimierte Derivatisierung für Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	43
3.2.3	Mikromethode .....	44
3.2.4	Optimierte Messbedingungen .....	45
3.2.5	Auswahl der Fragmentationen für die SIM-Analyse .....	46
3.2.5.1	Massenspektrum von Testosteron .....	46
3.2.5.2	Massenspektrum von Fragmentationen von 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron .....	47
3.2.6	Chromatographische Analyse im SIM-Modus.....	48
3.3	Optimierte Methode zur Bestimmung der Steroidhormone mit der GC-NCI-MS im Serum.....	49
3.3.1	Prinzip.....	49
3.3.2	Probenvorbereitung .....	49
3.3.2.1	Zugabe des internen Standards.....	49
3.3.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	50
3.3.2.3	Clean-up mittels Festphasenextraktion.....	50
3.3.3	Derivatisierung für Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron.....	50
3.3.4	Gaschromatographische Trennung und Massenspektrometrie.....	51
3.3.4.1	Analysebedingungen.....	51
3.3.4.2	Quantifizierung .....	52
3.3.4.3	Schematischer Überblick über die GC-NCI-MS Methode.....	52
3.4	Methodenvalidierung.....	52
3.4.1	Grundlagen der Methodenvalidierung .....	52
3.4.2	Linearität.....	53
3.4.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	54
3.4.4	Richtigkeit aus Wiederfindungsexperimenten.....	54
3.4.5	Präzision .....	55
3.4.5.1	Wiederholpräzision.....	55

---

3.4.5.2	Messpräzision .....	55
3.4.6	Festlegung des Arbeitsbereichs .....	56
3.4.7	Selektivität .....	56
3.4.8	Stabilität .....	56
3.5	Ergebnisse der Methodvalidierung.....	57
3.5.1	Linearität.....	57
3.5.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	58
3.5.3	Richtigkeit aus den Wiederfindungsexperimenten .....	59
3.5.4	Präzision .....	60
3.5.4.1	Wiederholpräzision.....	60
3.5.4.2	Messpräzision .....	61
3.5.5	Arbeitsbereich.....	62
3.5.6	Selektivität .....	62
3.5.7	Stabilität .....	63
3.6	Methodenvergleich der Testosteronanalyse zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und der GC-NCI-MS-Methode.....	64
4	Diskussion .....	71
4.1	Diskussion der Methode .....	71
4.1.1	Probenvorbereitung .....	71
4.1.2	Derivatisierung.....	72
4.1.3	Optimierung der Analysebedingungen .....	73
4.1.4	Mikromethode zur Analyse von Testosteron .....	73
4.1.5	Validierung .....	74
4.1.6	Mögliche Anwendungen der validierten Methoden.....	77
4.2	Vergleich der Testosteronanalyse mit der entwickelten GC-NCI-MS-Methode und dem Siemens ADVIA Centaur .....	79
4.2.1	Mögliche Ursachen für die Messdifferenzen der Analysenmethoden.....	83
4.2.2	Möglichkeiten zur Verbesserung der Verlässlichkeit und Genauigkeit von Testosteronanalysen .....	87
5	Zusammenfassung.....	90
6	Literaturverzeichnis .....	93
7	Anhang.....	102
7.1	Methodenvergleich der Testosteronanalyse zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und der GC-NCI-MS-Methode.....	102
7.2	Regressionsanalyse nach Passing und Bablok.....	103
7.3	Validierung .....	105
7.4	Analyse weiterer Steroidhormone.....	106
8	Abbildungsverzeichnis .....	108
9	Tabellenverzeichnis .....	110

## Abkürzungen und Formelverzeichnis

ACTH	Adrenocortiotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AK	Antikörper
BG	Bestimmungsgrenze
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
c	Konzentration
CIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
d	Deuterium
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GC-NCI-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie mit negativer chemischer Ionisation
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCl	Hydrochlorid
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HSD	Hydroxy-Steroiddehydrogenase
HVL	Hypophysenvorderlappen
IA	Immunoassay
ICH	International Conference on Harmonisation
IStd	Interner Standard
JCTLM	Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine
LC/MS/MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LDL	Low-density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LIA	Lumineszenz-Immunoassay
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. für <i>liquid liquid extraction</i> )
M	Mol
MeOH	Methanol
mg	Milligramm

---

min	Minute
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
MW	Mittelwert
m/z	Verhältnis Masse/ Ladung
ng	Nanogramm
NNR	Nebennierenrinde
NWG	Nachweisgrenze
17-OHP	17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
PFBH-HCl	Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radio-Immunoassay
Rilibäk	Richtlinien der Bundesärztekammer
RMP	Reference Measurement Procedure
RP	Umkehr-Phase (engl. für <i>reversed phase</i> )
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion (engl. für <i>solid phase extraction</i> )
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
tBME	tertiär-Butylmethylether
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TIC	Total Ion Current
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilylierung bzw. Trimethylsilyl-
VK	Variationskoeffizient
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

## 1 Einleitung

Die Analyse der Steroidhormone ist für viele medizinische Fragestellungen von besonderer Bedeutung. Dabei steht zunächst die Untersuchung der adrenalen oder gonadalen endokrinen Funktionen im Vordergrund (Stanczyk 2006 a; Singh 2010).  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron ist neben Androstendion der wichtigste Parameter zur Diagnostik des Adrenogenitalen Syndroms, eines der häufigsten enzymatischen Stoffwechseldefekte im Kindesalter (Wudy et al. 2000). Testosteron wird daneben auch im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitoring bei Tumorleiden, zum Monitoring einer Testosteron-Substitutionstherapie (Wheeler und Barnes 2008), oder zur Diagnostik der „androgen deficiency“ bestimmt (Demers 2010; Matsumoto 2002). Die veränderten Hormonkonzentrationen von Testosteron werden auch verstärkt im Zusammenhang mit dem Auftreten und der Ausprägung chronischer Krankheiten, wie z.B. der Koronaren Herzkrankheit (Laughlin et al. 2010; Ohlsson et al. 2011), des Diabetes mellitus (Ding et al. 2006) oder der Osteoporose (Fink et al. 2006), gesehen.

Die Steroidhormonanalytik ist eine große Herausforderung, da Steroidhormone nur im Spurenbereich in komplexen biologischen Matrices wie Serum nachweisbar sind. Außerdem liegen sie in einer großen Konzentrationsspanne neben einer Vielzahl strukturell sehr verwandter Moleküle und Metabolite vor. Diesen hohen analytischen Anforderungen versucht man seit der Einführung der ersten Methoden gerecht zu werden, und ihre Weiterentwicklung ist noch immer Gegenstand der Forschung.

In der Routineanalytik hat sich die Analyse mit automatisierten Immunoassays etabliert (Wheeler 2001). Diese sind jedoch anfällig für Kreuzreaktionen und weisen damit Defizite in der analytischen Spezifität und Sensitivität auf (Tate und Ward 2004). Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen sind Immunoassays unzuverlässig, wie z.B. zur Testosteronanalyse bei Frauen und Kindern (Herold und Fitzgerald 2003) oder zur Bestimmung von  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron Neugeborener (Wong et al. 1992). Aufgrund dieser Unzulänglichkeiten und Ungenauigkeiten der Immunoassays sind zunehmend massenspektrometrische Methoden in den Vordergrund gerückt.

Den hohen Anforderungen der Steroidhormonanalyse wird am besten mit den zeitaufwendigen, aber sehr sensitiven und spezifischen massenspektrometrischen Analysemethoden entsprochen. Gebräuchlich ist die Kopplung mit der Flüssigchromatographie, oder auch mit der Gaschromatographie, welche als Referenzmethode in der Steroidhormonanalytik gilt (Siekmann 1979; Lawson 1985; Wolthers und Kraan 1999).

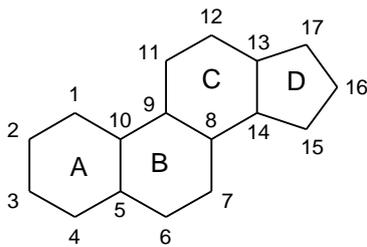
Die GC/MS zeichnet sich durch exzellente chromatographische Trennung einzelner Komponenten komplexer Stoffgemische, und durch anschließende Detektion mit dem Massenspektrometer, als Methode mit herausragender Sensitivität und Spezifität aus (Honour 2006). Dies ermöglicht eine zuverlässige Analyse auch von Proben mit sehr geringen Hormonkonzentrationen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll in Anlehnung an die GC-NCI-MS-Methode von Herold und Fitzgerald (Fitzgerald und Herold 1996) eine sensitive und leistungsfähige GC-NCI-MS-Methode zur Analyse von Testosteron etabliert werden. Gleichzeitig soll diese Methode zur Analyse von  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron erweitert werden. Anschließend soll die Methode mit dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay zur Testosteronanalyse verglichen werden. Aufgrund der beschriebenen Nachteile der Immunoassays soll damit eine verlässliche Analysenmethode etabliert werden, die als Referenzmethode fungiert und für Studien oder für die Routineanalytik in speziellen Fragestellungen zur Verfügung stehen kann.

## 1.1 Die Steroidhormone Testosteron und $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

### 1.1.1 Struktur und chemische Eigenschaften

Steroidhormone leiten sich vom Cholesterin ab und weisen als gemeinsames Grundgerüst den tetrazyklischen Kohlenwasserstoff Cyclopentanophenanthren auf (Miller und Auchus 2011) (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Der tetrazyklische Kohlenwasserstoff Cyclopentanophenanthren, als gemeinsames Grundgerüst der Steroidhormone.

Die Steroidhormone können nach ihrer Funktion in Mineralocorticoide, Glukocorticoide und Sexualhormone klassifiziert werden. Je nach Zahl der C-Atome im Kohlenstoffgrundgerüst kann man die Sexualhormone in Estrogene ( $C_{18}$ ), Androgene ( $C_{19}$ ) und Gestagene ( $C_{21}$ ) einteilen (Norman und Litwack 1997). Diese können je nach funktionellen Gruppen in weitere Klassen unterteilt werden. Die Polarität der lipophilen Hormone steigt mit der Anzahl ihrer Hydroxylgruppen (Norman und Litwack 1997).

17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron (17-OHP) zeichnet sich im Vergleich zu Cholesterin durch eine verkürzte Seitenkette des D-Rings an C<sub>17</sub> aus und weist damit das charakteristische C<sub>21</sub>-Grundgerüst der Gestagene auf. Weiterhin befindet sich, wie bei Testosteron, an C<sub>10</sub> und an C<sub>13</sub> eine Methylstruktur und an C<sub>3</sub> eine Ketogruppe (Abbildung 2). Testosteron weist wie alle Androgene ein Androstan-Grundgerüst (C<sub>19</sub>) auf. Die Seitenkette an C<sub>17</sub> wurde durch eine Hydroxylgruppe ersetzt (Abbildung 3). (Norman und Litwack 1997).

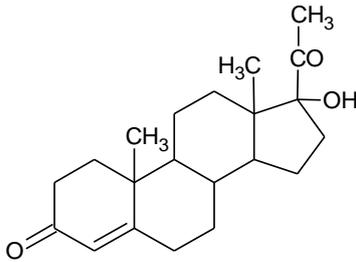


Abbildung 2 Strukturformel von 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

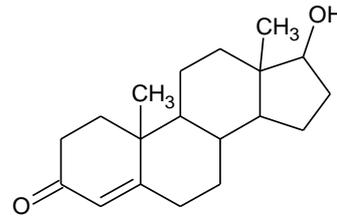


Abbildung 3 Strukturformel von Testosteron

### 1.1.2 Biosynthese

Gemeinsame Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Steroidhormone ist Cholesterin, das durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL aufgenommen wird (Gwynne und Strauss 1982), oder von den hormonproduzierenden Zellen selbst aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert werden kann (Mason und Rainey 1987). Da die steroidhormonproduzierenden Zellen keine Hormone speichern können, erfolgt ihre Biosynthese *de novo* (Miller 2002). Cholesterin, das als Cholesterinester gespeichert wird, kann dann bei Bedarf wieder freigesetzt werden: Indem übergeordnete hypophysäre glandotrope Hormone an einen G-Protein-assoziierten Rezeptor binden, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Aktivierung des Enzyms Cholesterinesterase steht (Miller 1988) (vgl. Abbildung 4, S.5). Dadurch freigesetztes Cholesterin wird über ein Transportprotein, das „Steroidogenic Acute Regulatory Protein“ (StAR) von der äußeren in die innere Mitochondrienmembran geschleust (Stocco und Clark 1996). Die an der Steroidhormonbiosynthese beteiligten Enzyme sind zum größten Teil Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) oder Cytochrom P 450 Enzyme, die Hydroxylierungen und Oxidationen katalysieren (Miller und Auchus 2011). Durch das Monoxygenaseenzym P450<sub>ssc</sub>, das sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet, wird die Seitenkette von Cholesterin verkürzt, so dass aus dem C<sub>27</sub>-Körper der C<sub>17</sub>-Körper Pregnenolon entsteht (Miller 1988). Pregnenolon ist Ausgangssubstanz für die weitere Synthese der Steroidhormone, die je nach enzymatischer Ausstattung der hormonproduzierenden Zelle im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet (Stocco und Clark

1996). Aus Pregnenolon kann über die  $3\beta$ -HSD Progesteron entstehen. Durch Hydroxylierung an C<sub>17</sub> durch die  $17\alpha$ -Reduktase entsteht aus Progesteron 17-OHP (Miller 1988). 17-OHP stellt eine wichtige Zwischenstufe in der Steroidhormonbiosynthese dar, da über verschiedene Synthesewege sowohl Glukocorticoide, 17-Ketosteroide, als auch die männlichen und weiblichen Sexualhormone gebildet werden können (Miller 2002; Stocco 2001).

Testosteron kann dabei über den sogenannten  $\Delta$ 4-Weg aus 17-OHP entstehen. Über die 17,20-Desmolase wird die Seitenkette von 17-OHP entfernt und so zunächst Androstendion gebildet, das durch Reduktion an C<sub>17</sub> über die  $17\beta$ -HSD in Testosteron umgewandelt werden kann (Miller und Auchus 2011). Beim Mann überwiegt jedoch der  $\Delta$ 5-Weg (Weinbauer et al. 2009). Auch hier stellt Pregnenolon die Ausgangssubstanz dar, aus der aber zunächst über die  $17\alpha$ -Hydroxylase  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon gebildet wird. Dieses wird zunächst in Dehydroepiandrosteron (DHEA) und dann über die  $3\beta$ -HSD in Androstendion umgewandelt (Miller 2002). Androstendion kann wiederum durch die  $17\beta$ -HSD zu Testosteron reduziert werden. Testosteron wird in einigen Geweben über die  $5\alpha$ -Reductase zu 5-Dihydrotestosteron (DHT) reduziert (Mooradian et al. 1987).

Die Sexualhormone werden vor allem in den Granulosa- und Thekazellen der Ovarien (Gruber et al. 2002), in den Leydig-Zwischenzellen der Testes, in der Zona reticularis der Nebennierenrinde als auch in der Plazenta gebildet (Miller und Auchus 2011). Zum kleineren Teil entstehen sie auch in der Leber oder in peripheren Geweben, wie dem ZNS oder im Fettgewebe (Weinbauer et al. 2009; Simpson et al. 1994). 17-OHP entsteht vor allem in der Zona fasciculata der NNR im Rahmen der Cortisolsynthese und in den Gonaden als Vorstufe der Sexualhormone (White und Speiser 2000; Miller und Auchus 2011).

Abbildung 4 zeigt einen schematischen Überblick über die beschriebene Synthese der Steroidhormone 17-OHP und Testosteron, wie sie z.B. in einer Leydig-Zwischenzelle stattfinden kann.

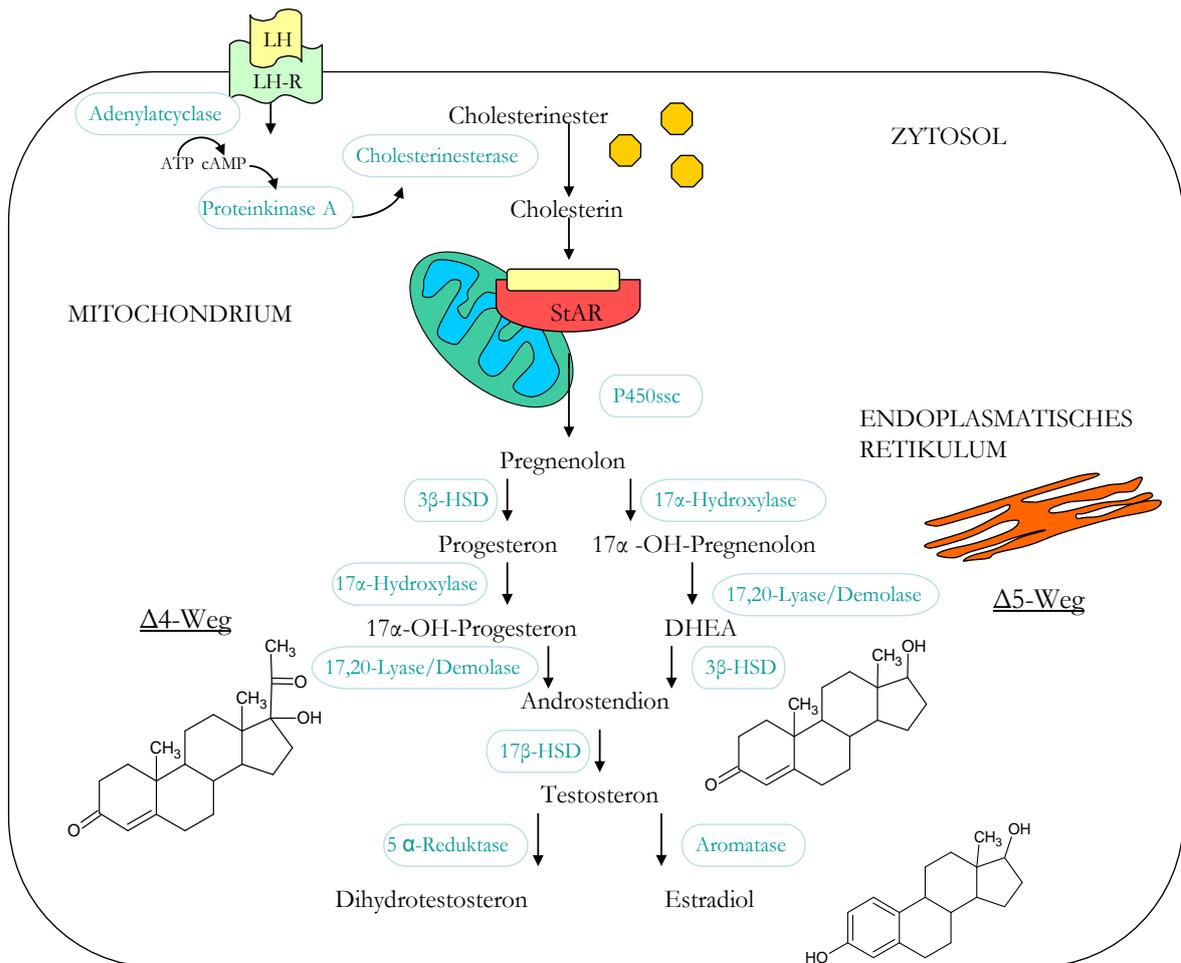


Abbildung 4 Schematischer Überblick über die Biosynthese von  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron und Testosteron in einer hormonproduzierenden Zelle. Die Steroidhormonbiosynthese kann durch übergeordnete Hormone wie LH induziert werden. Durch Rezeptorbindung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Aktivierung der Cholesterinesterase steht, die Cholesterin bereitstellt. Über das StAR-Protein gelangt Cholesterin ins Mitochondrium. Hier entsteht über die P450ssc Pregnenolon als Ausgangssubstanz für die weitere Steroidhormonbiosynthese. Dieses kann im Endoplasmatischen Retikulum durch eine Reihe enzymatischer Reaktionen zu Testosteron umgewandelt werden. Aus Testosteron kann sowohl  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron als auch  $17\beta$ -Estradiol entstehen.

### 1.1.3 Endokrine Steuerung der Biosynthese und Sekretion

Die Synthese und Sekretion der Steroidhormone wird durch das Hypothalamus-Hypophysen-System gesteuert. Dieser komplexe Regelkreis unterliegt Feedback-Mechanismen und erlaubt dadurch eine kontrollierte Steuerung der Produktion und Sekretion der Hormone (Stocco 2001; Miller und Auchus 2011).

Als übergeordnete Hormondrüse steuert der Hypothalamus durch pulsatile Sekretion von Corticotropin-Releasing-Hormon die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL). ACTH bewirkt wiederum die Hormonproduktion in der Nebennierenrinde (NNR) (Waterman und Simpson 1985). Dabei werden die Sexualhormone in der Zona reticularis gebildet.  $17\text{-OHP}$  entsteht als gemeinsame Vorstufe

vieler Steroidhormone sowohl in der Zona reticularis, aber vor allem in der Zona fasciculata als Zwischenstufe der Cortisolsynthese (Miller und Auchus 2011).

Des Weiteren steuert der Hypothalamus durch pulsatile Sekretion von Gonadoliberin (GnRH) die Freisetzung der Hormone LH und FSH aus dem HVL. Die hypophysäre Sekretion von LH und FSH bewirkt wiederum die Hormonproduktion in den Gonaden: LH stimuliert sowohl die Leydig-Zellen im Hoden als auch die Theka-Interna-Zellen der ovariellen Follikel zur Androgenbildung (Miller und Auchus 2011 ; Simpson et al. 1994). Die in den Thekazellen gebildeten Hormone Testosteron und Androstendion diffundieren in die Granulosazellen und werden hier unter dem Einfluss von FSH über die Aromatase-Reaktion in Estradiol und andere weniger wirksame Estrogene (Estron, Estratriol) umgewandelt (Simpson et al. 1994; Miller und Auchus 2011). 17-OHP entsteht als Hormonvorstufe der Androgene auch in den Testes und in den Thekazellen (Miller und Auchus 2011). Weiterhin entsteht 17-OHP in der Lutealphase im Corpus luteum (White und Speiser 2000).

#### **1.1.4 Transport und Metabolismus**

Der größte Teil der lipophilen Steroidhormone ist im Blut an Transportproteine gebunden, nur ein sehr geringer Teil der lipophilen Hormone liegt frei und damit als aktive Form im Blut vor. Testosteron wird im Blut von Albumin und dem Sexual-Hormon-bindenden Globulin (SHBG) gebunden (Dunn et al. 1981). 17-OHP wird ebenfalls an Albumin sowie am Corticosteroid bindenden Globulin (CBG) gebunden.

Die Plasmaspiegel der Hormone hängen dabei von der Bindung an Transportproteinen, der Tageszeit, dem Geschlecht und dem Alter ab, sowie von dem Menstruationszyklus oder von dem Vorliegen einer Schwangerschaft (Mooradian et al. 1987; Davison und Bell 2006).

Die Hormone können je nach enzymatischer Ausstattung der Zelle in andere Hormone umgewandelt werden. So können aus Testosteron sowohl Estradiol, Dihydrotestosteron oder Androstendion entstehen (Miller und Auchus 2011). Der Abbau der Steroidhormone findet hauptsächlich in der Leber statt. Hier erfolgen zahlreiche enzymatische Reaktionen der Biotransformation, wie Hydroxylierungen, Methylierungen, und Kopplungen der Hormone an Sulfat oder Glukuronsäure. Durch die zahlreichen Reaktionen entsteht eine Vielzahl an Steroidmetaboliten. Die konjugierten Hormone können mit der Galle oder im Harn ausgeschieden werden (Gruber et al. 2002).

### 1.1.5 Physiologische Wirkungen

Testosteron ist das wichtigste männliche Sexualhormon, welches beim Mann zu 95% aus den Leydig-Zwischenzellen der Testes und nur zu 5% aus der Zona reticularis der NNR abstammt (Mooradian et al. 1987). Bei der Frau wird Testosteron in der NNR und im Ovar gebildet (Davison und Bell 2006), in kleineren Mengen entsteht es auch durch Konversion von Androgenen in peripheren Geweben, wie z.B. dem Fettgewebe (Simpson et al. 1994). In einigen Geweben wie Muskulatur und Knochen stellt Testosteron die eigentliche Wirkform dar (Bhasin et al. 2001; Clarke und Khosla 2009). In anderen Zielgeweben, wie Prostata, Haut und Samenbläschen, wird Testosteron zu DHT umgewandelt, das aufgrund einer höheren Affinität zum Androgenrezeptor biologisch wirksamer ist (Miller und Auchus 2011).

Testosteron hat je nach Lebensphase und Geschlecht unterschiedliche Wirkungen. Als männliches Sexualhormon ist es für die Geschlechtsentwicklung und die Aufrechterhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale beim Mann verantwortlich. So steuert es in der Embryonalentwicklung und in der Pubertät die Differenzierung und Reifung der Geschlechtsorgane und der akzessorischen Drüsen (Wilson et al. 1981; Rogol 2002). Während der Pubertät steuert es außerdem die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale, wie die des männlichen Phänotyps (Rogol 2002). Des Weiteren hat Testosteron eine anabole Wirkung, führt so durch Hypertrophie der Muskelfibrillen zu einer erhöhten Muskelmasse sowie geringeren Fettmasse (Bhasin et al. 2001) und durch eine verstärkte Mineralisation der Knochen zu einer erhöhten Knochendichte (Clarke und Khosla 2009). Durch periphere Konversion zu DHT kommt es, je nach Empfindlichkeit der Haarfollikel, zum männlichen Behaarungstyp, in der Haut zu vermehrter Bildung von Talgdrüsen und zur Sebumproduktion (Mooradian et al. 1987). Dabei kommt es, je nach genetischen Faktoren, zirkulierenden Androgenspiegeln und Rezeptorausstattung der Zellen zu verschiedenen Ausprägungsgraden (Walker 2010). Im Erwachsenenalter steuert Testosteron die Aufrechterhaltung der männlichen Geschlechtsmerkmale, reguliert die Spermatogenese, das Sexualverhalten und die Potenz (Mooradian et al. 1987). Weiterhin steigert Testosteron durch vermehrte Erythropoetinbildung die Erythropoese (Mooradian et al. 1987), und es sind Wirkungen auf das ZNS beschrieben, in Bezug zum Antrieb, zu kognitiven Funktionen und zur Stimmungslage (Matsumoto 2002).

17-OHP wird als Zwischenstufe der meisten Steroidhormone gebildet und hat damit seine größte Bedeutung als Hormonvorstufe zur Beurteilung der adrenalen und ovariellen Steroidhormonsynthese. Dabei ist es der wichtigste Marker für das Adrenogenitale Syndrom (AGS), das zu einer Akkumulation von 17-OHP führt (Wudy et al. 2000).

Die Wirkungen der Steroidhormone werden über die Steroidhormonrezeptoren gesteuert. Diese fungieren meistens als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Dabei binden Testosteron und DHT an den Androgenrezeptor (AR) (Walker 2010). Der Hormon-Rezeptorkomplex bindet dann an spezifische DNA-Sequenzen und reguliert so die Biosynthese steroidabhängiger Proteine (Shang et al. 2002; Walker 2010). Diese Rezeptoren kommen ubiquitär vor, und ihre Wirkungen werden durch einen gewebespezifischen Besatz an regulierenden Proteinen, sogenannten Koaktivatoren, gesteuert (Walker 2010). Für Testosteron werden auch membrangebundene Rezeptoren beschrieben (Walker 2010).

### 1.1.6 Häufige klinische Fragestellungen

Klinische Fragestellungen, die bei Männern eine Testosteronanalyse einleiten, sind die Überprüfung der Funktion der Testes, z.B. bei Abklärung einer möglichen Infertilität oder bei klinischen Zeichen von Hypogonadismus. Weiterhin wird Testosteron im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) zur Überwachung einer Anti-Androgen-Therapie beim Prostata-Karzinom oder zum Monitoring einer Testosteron-Substitutionstherapie beim Hypogonadismus analysiert (Wheeler und Barnes 2008). Auch für Frauen ist die Testosteronanalyse wichtig, z.B. um Hyperandrogenämie zu diagnostizieren, die für klinische Symptome, wie Oligo- und Amenorrhoe, Akne, Alopezie oder Hirsutismus, verantwortlich sein können (Rosenfield und Lucky 1993; Stanczyk 2006 a). Die Ursachen für hyperandrogene Zustände sind vielfältig: Es könnte sich um ein Polyzystisches Ovarsyndrom (PCOS), um einen androgenproduzierenden ovariellen oder adrenalen Tumor, oder auch um ein late-onset AGS handeln. Bei Neugeborenen hat die Bestimmung der Testosteronkonzentration besondere Bedeutung, wenn das Geschlecht nach der Geburt nicht eindeutig differenziert werden kann. Es gibt eine Vielzahl möglicher Differentialdiagnosen, die sich hinter sexuellen Differenzierungsstörungen verbergen können, wie z.B. ein Androgen-Insensitivitäts-Syndrom, komplette gonadale Dysgenese, nicht deszendierte Testes oder auch das AGS (Fuqua et al. 1995; Tomlinson et al. 2004). Bei Kindern wird die Testosteronkonzentration bei einer verfrüht oder verspätet einsetzenden Pubertät bestimmt, oder auch um das AGS zu diagnostizieren (Wudy und Hartmann 2004). Außerdem ist die Hypoandrogenämie vermehrt in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Der sogenannten „androgen deficiency“ wird eine Vielzahl an Symptomen, wie Leistungsminderung, depressive Verstimmung, sexuelle Dysfunktion, Fatigue, verminderte Muskelmasse und Knochendichte, bei beiden Geschlechtern zugeschrieben (Demers 2010; Matsumoto 2002). Des Weiteren wird in Studien verstärkt der Zusammenhang der Testosteronkonzentration mit dem Auftreten und Schweregrad

chronischer Krankheiten wie Diabetes mellitus (Ding et al. 2006), Osteoporose (Fink et al. 2006) oder der Koronaren Herzkrankheit (Laughlin et al. 2010; Ohlsson et al. 2011) diskutiert. 17-OHP wird ebenfalls als sensitiver Marker für die In-vitro-Fertilisation eingesetzt (Hugues et al. 2010). Besondere Bedeutung hat 17-OHP jedoch als wichtigster Parameter für die Diagnostik des Adrenogenitalen Syndroms (AGS) (Wudy et al. 2000). Unter dem AGS fast man mehrere autosomal-rezessiv vererbte Enzymdefekte der Cortisolsynthese zusammen. Die Ursache liegt in über 90% der Fälle in einem Defekt der 21-Hydroxylase begründet (White und Speiser 2000). Cortisol kann von diesen Patienten, je nach Ausprägung des Enzymdefekts, nicht effizient synthetisiert werden. Dies führt zu einer vermehrten ACTH-Produktion und vermehrten Bildung der Cortisol-Vorstufen wie 17-OHP und 17-OH-Pregnenolon (Miller und Auchus 2011). Diese können wiederum zu Sexualhormonen wie Testosteron und Androstendion umgewandelt werden, was zu entsprechenden Symptomen bei den betroffenen Patienten führt (Speiser und White 2003).

Je nach Schweregrad des Enzymdefekts manifestiert sich das AGS in drei klinischen Varianten: Die klassischen Verlaufsformen treten mit einer Häufigkeit von ca. 1:16.000 auf (Therrell 2001). Dabei fällt die klassische Verlaufsform mit Salzverlustsyndrom im Neugeborenenalter auf. Hier kommt es durch den ausgeprägten Enzymdefekt zusätzlich zur verminderten Aldosteronsynthese. Diese Form ist besonders gefürchtet, denn durch Hyponatriämie, Hyperkaliämie und Erbrechen kann es zu gravierenden Stoffwechsellstörungen mit Azidose und Herzrhythmusstörungen kommen, die beim Neugeborenen letal sein können (Speiser und White 2003). Die Hyperandrogenämie verursacht beim Mädchen eine Virilisierung des äußeren Genitale und bei beiden Geschlechtern eine *Pseudopubertas praecox*. Mädchen fallen so bei der Geburt durch ein intersexuelles oder maskulines äußeres Genital auf, wobei die inneren Geschlechtsorgane weiblich sind (White und Speiser 2000).

Davon wird die klassische Verlaufsform ohne Salzverlust differenziert, bei der eine Restaktivität des Enzyms eine noch ausreichende Aldosteronsynthese erlaubt. Die Hyperandrogenämie führt bei Mädchen zu einer Virilisierung, die sich durch klinische Symptome wie Klitorishypertrophie, Hirsutismus, Akne, eine tiefe Stimme und Oligomenorrhoe oder Amenorrhoe äußern kann (Moran et al. 2000). Jungen sind meistens klinisch unauffällig, es kann aber bei beiden Geschlechtern durch einen verfrühten Epiphysenschluss zu Kleinwuchs kommen (White und Speiser 2000).

Weiterhin unterscheidet man die nicht-klassische Form, auch late-onset AGS, das in der weißen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 0,2 % auftritt (Speiser et al. 1985). Hier findet

sich eine Hyperandrogenämie bei normaler Cortisol- und Aldosteronsynthese. Das late-onset AGS kann klinisch asymptomatisch sein, oder bei Pubertätsbeginn oder im frühen Erwachsenenalter durch klinische Symptome der Hyperandrogenämie auffallen (White 2009). So sind Symptome wie Hirsutismus, Oligomenorrhoe und Akne häufig beschrieben (Moran et al. 2000).

Klinische Fragestellungen, die eine 17-OHP-Bestimmung einleiten, sind demnach bedrohliche Stoffwechsellstörungen bei Neugeborenen, sexuelle Differenzierungs- und Reifungsstörungen, sowie Abklärung von Virilisierung oder Infertilität mit Verdacht auf ein AGS. Differenzialdiagnostisch ist auch an das PCOS, an NNR- oder Ovarialtumoren zu denken, die ebenfalls eine Hyperandrogenämie verursachen können, wodurch Patienten mit erhöhten 17-OHP Konzentrationen auffallen können (Stanczyk 2006 a; Magnisali et al. 2008).

## **1.2 Analytik der Steroidhormone**

### **1.2.1 Geschichtlicher Überblick und aktueller Stand der Forschung**

Die erfolgreiche Analyse von unpolaren Steroiden mit der Gaschromatographie (GC) gelang 1960 (Sweeley und Horning 1960; Vandenheuvel und Horning 1960), acht Jahre nach der Erfindung des Gaschromatographen durch James und Martin (James und Martin 1952). 1957 wurde zum ersten Mal ein Massenspektrometer als Detektor für die GC verwendet (Holmes und Morrell 1957). Dies bildete die Grundlage, um die chemische Struktur von Steroidhormonen aufzuklären und neue Hormone oder ihre Metabolite in komplexen biologischen Matrices zu identifizieren. Mit der Optimierung von Derivatisierungstechniken und der Einführung der Kapillargaschromatographie durch Golay 1957 (Golay 1957), der Weiterentwicklung vor allem in den sechziger und siebziger Jahren, konnten auch polare Steroidhormone zuverlässig detektiert werden. So wurde bereits 1965 die Analyse von polaren Steroidhormonen im Serum mit der GC/MS durch Sjövall und Vihko beschrieben (Sjövall und Vihko 1965), gefolgt von Horning, der 1966 das erste umfangreiche Steroidprofil im Urin erstellte (Horning et al. 1966), und Siekmann und Breuer, die 1970 die erfolgreiche Messung zahlreicher Steroidhormone mit der ID-GC/MS beschrieben (Breuer et al. 1970).

Die konsequente Weiterentwicklung und der Einsatz dieser Methode wurden jedoch durch die Einführung von Immunoassays zurück gedrängt. Der erste Immunoassay wurde durch Yalow und Berson entwickelt, mit dem Insulin unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{131}\text{I}$ -Insulin im Humanserum nachgewiesen werden konnte (Yalow und Berson 1960). Diese Entwicklung erfuhr in weiten Bereichen der Biochemie und Endokrinologie einen rasanten

Aufschwung, so dass zehn Jahre später mit dieser Methode zum ersten Mal ein Steroidhormon, nämlich Estradiol, im Plasma analysiert werden konnte (Abraham 1969). Kurz darauf wurden für weitere Steroidhormone, wie Testosteron (Furuyama et al. 1970; Nieschlag und Loriaux 1972; Collins et al. 1972; Dufau et al. 1972; Wang et al. 1974), Progesteron (Abraham et al. 1971) und 17-OHP (Barron et al. 1980), Radio-Immunoassays (RIAs) entwickelt. Mit den RIAs begann der rapide zunehmende Einsatz immunologischer Nachweisverfahren im medizinischen Bereich. Den konventionellen RIAs waren Extraktionsschritte vorgeschaltet, um die Hormone von den Bindungsproteinen zu lösen, und mögliche störende Interferenzen zu eliminieren (Matsumoto 2004). Durch einen weiteren chromatographischen Trennschritt wurden die überschüssigen radioaktiven Marker nach der Inkubation abgetrennt, bevor die gebundenen Marker quantifiziert werden konnten. Aufgrund der Trennschritte waren diese konventionellen RIAs recht spezifisch (Abraham et al. 1971), und durch Einsatz radioaktiver Marker sehr sensitiv, so dass die Hormone im Pikogramm-Bereich nachgewiesen werden konnten (Abraham et al. 1971). Des Weiteren waren sie sehr verlässlich, wenn sie gut validiert wurden (Stanczyk 2006 b). Jedoch waren zur Analyse große Probenvolumina erforderlich, und durch die Extraktions- und Trennschritte war die Analyse sehr zeitaufwendig. Außerdem brachte die Arbeit mit radioaktivem Material Schwierigkeiten mit sich, wie die Sicherheit in ihrer Handhabung, ihrer Lagerung, der begrenzten Haltbarkeit der radioaktiv markierten Substanzen und die Frage ihrer Entsorgung (Schall und Tenoso 1981).

Aufgrund dieser Nachteile wurden alternative Marker gesucht, mit denen diagnostisch wichtige Antigene immunologisch nachgewiesen werden konnten. 1971 konnten mit der Entwicklung des ELISA durch Engvall und Perlmann (Engvall und Perlmann 1971) sowie des Enzym-Immunoassays von van Weemen und Schuurs (van Weemen und Schuurs 1971) diese Probleme gelöst werden. Der immunologische Nachweis erfolgte jetzt mit Enzym-Markern, wobei nach Substratzugabe zum Enzym-markierten Antigen-Antikörper-Komplex das entstehende Reaktionsprodukt photometrisch gemessen werden konnte. So wurden die RIAs in der Steroidhormonanalytik ab den späten Siebzigern immer mehr durch Immunoassays ersetzt, die statt radioaktiver Markierungen Enzyme verwandten (Joyce et al. 1978; Hindawi et al. 1980). Kurz darauf kamen Immunoassays zum Einsatz, die als Tracer Moleküle verwandten, die Chemilumineszenz (Pratt et al. 1978; de Boever et al. 1984; Kohen et al. 1980) oder Fluoreszenz (Allman et al. 1981; Bertoft et al. 1984; Lövgren 1987; Eskola et al. 1985) zeigten.

Durch die Entdeckung der Hybridom-Technik durch Köhler und Milstein konnten monoklonale Antikörper (AK) in großen Mengen reproduzierbar und standardisiert produziert werden (Köhler und Milstein 1975). Dies hatte nicht nur entscheidende Folgen für die Antikörper-Spezifität und damit die Verlässlichkeit der Tests, sondern auch für ihre Sensitivität, so dass diese direkten manuellen Verfahren jetzt mit den RIAs konkurrieren konnten und erfolgreich kommerziell vertrieben wurden.

Um der steigenden Nachfrage gerecht zu werden, wurde kontinuierlich an der technischen Vereinfachung und Automatisierung der Verfahren gearbeitet. Seit ca. 15 Jahren werden zur Steroidhormonanalyse vorwiegend vollautomatisierte Immunoassays verwendet (Wheeler 2001). Es handelt sich meistens um heterogene Immunoassays, die auf Chemilumineszenz basieren (Wu 2006; Wheeler 2001). Da durch den automatisierten Einsatz dieser direkten Immunoassays in kurzer Zeit viele Proben mit kleinem Probenvolumen vermessen werden können, werden sie auch heute noch in der Routineanalytik bevorzugt eingesetzt. Damit ist die Steroidhormonanalytik nicht mehr spezialisierten Laboren vorbehalten, sondern konnte sich vielmehr als Routineanalytik etablieren.

Die Entwicklung, hin zu den kostengünstigen, zeiteffizienten und vollautomatisierten Immunoassays, birgt jedoch erhebliche Nachteile. In der Steroidhormonanalytik sind Defizite in der analytischen Spezifität der Verfahren beschrieben, die nicht nur zu ungenauen, sondern auch zu falschen Ergebnissen führen kann (Tomlinson et al. 2004; Hernández et al. 2011; Taieb et al. 2003) und damit nicht nur die klinische Diagnostik erschweren, sondern sogar zu Fehldiagnosen (Fuqua et al. 1995) und unnötigen diagnostischen Eingriffen führen kann. So wird für Testosteron-Analytik beschrieben, dass Immunoassays in höheren Konzentrationen, wie sie bei Männern physiologisch zu finden sind (3-10 ng/ml Serum), weitestgehend verlässliche Resultate liefern (Fitzgerald und Herold 1996; Wang 2004; Taieb et al. 2003; Stanczyk et al. 2003; Cawood et al. 2005). In niedrigen Konzentrationen, wie sie z.B. bei Frauen, Kindern (0,05-1,0 ng/ml) oder bei Männern im hypogonadalen Status vorliegen (< 2,5 ng/ml Serum), sind Immunoassays jedoch unzuverlässig (Taieb et al. 2003; Wang 2004; Fitzgerald und Herold 1996; Moal et al. 2007; Wudy et al. 1995; Stanczyk et al. 2003). Dabei werden die Hormonkonzentrationen bei Kindern, Frauen und insbesondere bei Neugeborenen meistens überschätzt (Fuqua et al. 1995; Herold und Fitzgerald 2003; Taieb et al. 2003; Moal et al. 2007; Wudy et al. 1995), aber auch unterschätzt bzw. nicht systematische Abweichungen im Vergleich zu Referenzmethoden beschrieben (Wang 2004; Cawood et al. 2005; Kane et al. 2007). Die Abweichungen werden sowohl bei manuellen konventionellen RIAs mit (Cawood et al. 2005; Moal et al. 2007; Taieb et al. 2003; Wang 2004) und ohne

Serum-Extraktionsschritte (Moal et al. 2007) beschrieben, als auch bei den automatisierten Immunoassays (Fitzgerald und Herold 1996; Moal et al. 2007; Taieb et al. 2003; Wang 2004).

Auch für die Analytik von anderen Steroidhormonen, wie Estradiol und 17-OHP, insbesondere bei Männern, Kindern und postmenopausalen Frauen, bei denen nur geringe Konzentrationen im Blut vorliegen, sind ähnliche Unzuverlässigkeiten der Assays beschrieben worden (Taieb et al. 2002; Lee et al. 2006; Wong et al. 1992). Damit ergibt sich das Bild, dass Immunoassays Steroidhormonkonzentrationen nicht mit der notwendigen Richtigkeit und Verlässlichkeit messen können. Die Suche nach den Ursachen dieser analytischen Defizite ist, insbesondere seit der Einführung der direkten Immunoassays, Gegenstand der Forschung. Dabei stehen sowohl Interferenzen (vgl. 1.2.2.4, S.16 und 4.2.1, S. 83) als auch mangelnde Validierung und Standardisierung der Analyseverfahren im Vordergrund (vgl. 4.2.2, S. 87).

So bahnbrechend und bedeutend der immunologische Hormonnachweis auch war, so wurden seine Grenzen mit der Zeit doch aufgedeckt, so dass die massenspektrometrischen Methoden erneut in den Vordergrund rückten. Als Goldstandard für die Trennung und Quantifizierung der Steroidhormone in biologischen Proben gilt die Massenspektrometrie, gekoppelt mit der Gaschromatographie (Siekmann 1979; Lawson et al. 1985). Durch die Trennung komplexer Stoffgemische in ihre einzelnen Komponenten und anschließende Detektion mit der Massenspektrometrie, können auch Proben mit sehr geringen Hormonkonzentrationen zuverlässig analysiert werden. Damit ist die Analyse von chemisch sehr ähnlichen Strukturen aus verschiedenen biologischen Matrices, wie Serum (Siekmann 1979; Magnisali et al. 2008; Taieb et al. 2003; Fitzgerald und Herold 1996), Plasma (Baba et al. 1979; Fuqua et al. 1995; Legrand et al. 1995; Wudy et al. 1995), Haaren (Choi und Chung 1999), Urin (Choi et al. 1999; Horning et al. 1966; Wudy et al. 2000), Fruchtwasser (Wudy et al. 1999), oder seltener auch aus Speichel und verschiedenen Geweben (Wolthers und Kraan 1999) möglich. Außerdem kann mit der GC/MS ein Steroidhormon-Profil erstellt werden, da mehrere Hormone aus einer Probe gleichzeitig erfasst werden können (Wudy und Hartmann 2004). Aufgrund ihrer herausragenden Spezifität ist sogar die Trennung von Stereoisomeren möglich (Stanczyk und Clarke 2010). Deswegen wurde vor allem mit der GC/MS die Struktur und das Vorkommen der Steroide sowie ihrer Metabolite aufgeklärt (Krone et al. 2010). Außerdem wird sie als Referenzmethode verwendet, um Immunoassays zu validieren und Referenzmaterialien, wie Kalibratoren, zu kontrollieren (Siekmann 1979). Auch für spezielle Fragestellungen und seltene Erkrankungen erweist sich die GC/MS als geeignete Diagnostik. So können durch die Analyse steroidaler Metabolite im Harn Dopingfälle im Sport überführt werden (Parr und Schänzer 2010). Besonderen Stellenwert nimmt die GC/MS in der Analytik von

enzymatischen Stoffwechseleffekten ein, wie z.B. dem AGS (Wudy et al. 2000; Caulfield et al. 2002). Insbesondere seltene enzymatische Defekte in der Steroidbiosynthese, wie z.B. die 5 $\alpha$ -Reduktase-Defizienz, die P450-Oxireductase-Defizienz (Shackleton et al. 2004) oder das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (Shackleton et al. 2007) konnten durch die GC/MS-Analytik aufgedeckt und erfolgreich diagnostiziert werden. Somit trägt die GC/MS mit ihrer herausragender Sensitivität und Spezifität zu verbesserten Diagnosemöglichkeiten bei. Jedoch ist die Analyse durch die GC/MS aufgrund der aufwendigen Probenaufarbeitung zeitaufwendig und durch den erhöhten Personalbedarf kostspielig.

In den letzten Jahren kommt es verstärkt zum Einsatz der Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) (Cawood et al. 2005; Rauh et al. 2006; Moal et al. 2007; Turpeinen et al. 2008; Shiraishi et al. 2008; Wang et al. 2008; Magnisali et al. 2011; Brandhorst et al. 2011). Durch Verbesserungen der Sensitivität können Steroidhormone zuverlässig quantifiziert werden. Die LC/MS/MS zeichnet sich im Vergleich zur GC/MS durch geringeres Probenvolumen von meist nur 100 bis 500  $\mu$ l sowie durch kürzere Probenvorbereitungszeiten aus, da eine vorgeschaltete Derivatisierung entfallen kann (Cawood et al. 2005; Wang 2004). Des Weiteren ist die LC/MS/MS leichter automatisierbar als die GC/MS (Krone et al. 2010; Sparkman et al. 2011). Allerdings ist die chromatographische Trennung im Vergleich zur GC/MS schlechter und es ist schwieriger, strukturell sehr ähnliche Komponenten voneinander zu trennen (Krone et al. 2010). So sind Matrixeffekte und „ion suppression“ ein häufiges Problem (Stanczyk und Clarke 2010). Damit können mit der LC/MS/MS nur eine begrenzte Anzahl von Analyten mit ausreichender Sensitivität und Spezifität nebeneinander gemessen und nur wenig Aussagen über die chemische Struktur der Analyten geliefert werden (Krone et al. 2010).

Aktuell wird zur Steroidhormonanalytik eine Vielzahl an Methoden verwendet, wobei in Forschungslaboratorien noch konventionelle RIAs eingesetzt werden (Matsumoto 2004), haben sich in der Routineanalytik vollautomatisierte Immunoassays etabliert (Rosner et al. 2007; Wheeler 2001). Aufgrund der mangelnden Spezifität der Immunoassays und der dadurch fragwürdigen Verlässlichkeit der Analysenergebnisse werden die Immunoassays in einigen Laboren durch massenspektrometrische Methoden wie GC/MS oder LC/MS/MS für spezielle Fragestellungen unterstützt oder sogar ersetzt. Eine Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse zwischen den Laboren wird jedoch durch mangelnde Standardisierung (Vesper und Botelho 2010) und fehlende einheitliche Richtlinien zur Analyse (Rosner und Vesper 2010) erschwert.

## 1.2.2 Immunoassay

### 1.2.2.1 Klassifizierung der Immunoassays

Immunoassays sind Analysemethoden, die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen. Ein Reaktionspartner ist dabei mit einer Markierung versehen, so dass dieser in der Antigen-Antikörper-Bindung quantifizierbar nachgewiesen werden kann (Thomas 2008).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den immunologischen Nachweis praktisch durchzuführen, und die Immunoassays zu klassifizieren. So unterscheidet man nicht-kompetitive Immunoassays von kompetitiven Immunoassays. Bei den kompetitiven Immunoassays konkurrieren z.B. die Antigene der Patientenprobe mit den markierten Antigenen des Testreagenzes um die Bindungsstellen der AK, die an eine feste Phase gebunden sind. Da die AK nur in begrenzter Menge vorhanden sind, und die zugegebene Menge des markierten Antigens konstant ist, konkurriert das markierte Antigen mit dem Antigen aus der Probe um die Bindung (Klee 2004). Bei nicht-kompetitiven Assays, wie z.B. dem ELISA, liegen die Fängerantikörper im Überschuss an einer festen Phase vor. Die Markierung des gebildeten Immunkomplexes erfolgt durch Zugabe eines markierten Zweitantikörpers. Weiterhin unterscheidet man heterogene Analyseverfahren, bei denen die Assay-Komponenten an einer festen Phase immobilisiert sind und durch einen zusätzlichen Waschschrift überschüssige Reaktionspartner vor der Messung entfernt werden müssen, von den homogenen Verfahren, bei denen kein Waschschrift notwendig ist (Thomas 2008). Je nach verwendeter Markierung und Detektion kann man die Immunoassays zusätzlich z.B. in Radio-Immunoassays (RIA), Enzymimmunoassays, Fluoreszenzimmunoassays und Lumineszenzimmunoassays (LIA) einteilen (Thomas 2008).

### 1.2.2.2 Immunoassays in der Steroidanalytik

In der Steroidanalytik werden in der Routineanalytik heute meist direkte, automatisierte LIAs mit einem chemilumineszierenden Tracer verwendet (Wheeler 2001; Rosner et al. 2007). Es handelt sich um heterogene, kompetitive Analyseverfahren: Das zugesetzte markierte Antigen, der sogenannte Tracer, ist mit einer Markierung versehen und konkurriert mit dem natürlichen Antigen, z.B. Testosteron aus dem Patientenserum, um die Bindungsstelle des Antikörpers. Nach einem Waschschrift und Entfernung der überschüssigen Reaktionspartner wird die Konzentration des Tracers in der Antigen-Antikörper-Bindung bestimmt. Somit wird ein Signal gemessen, welches sich umgekehrt proportional zur Analytkonzentration verhält. Die Tracer sind mit Molekülen versehen, wie Acridiniumester, Luminol oder Oxalaten, die nach Oxidation das Signal in Form von Licht aussenden (Thomas 2008).

### 1.2.2.3 Siemens Centaur ADVIA Testosteron Assay

Bei dem untersuchten Siemens Centaur ADVIA Immunoassay für Testosteron handelt es sich um einen heterogenen, kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay. Dabei konkurriert Testosteron aus der Patientenprobe mit Acridiniumester-markiertem Testosteron, um eine begrenzte Anzahl von polyklonalen Anti-Testosteron-Antikörpern vom Kaninchen. Diese AK sind an monoklonale Anti-Kaninchen-Antikörper der Maus gebunden, welche wiederum an paramagnetische Partikel gekoppelt sind. Nach der Inkubation wird überschüssiges Reagenz durch nachfolgende Waschschriffe entfernt. Die Chemilumineszenz des gebundenen Testosterons wird durch den Acridiniumester erzeugt, welcher nach Katalysation durch Zugabe von Säure und Base durch chemische Oxidation ein Signal in Form von Licht aussendet (Terrazas 2008).

Untersuchungen zur Spezifität des Assays zeigten Interferenzen mit DHT (5,4%), Androstendion (0,94%) und Methyltestosteron (0,68%). Außerdem wird auf Einschränkungen der Messgenauigkeit bei hämolytischen und ikterischen Serum hingewiesen sowie auf die Möglichkeit der Interferenz mit heterophilen Antikörpern (Terrazas 2008).

### 1.2.2.4 Interferenzen und analytische Spezifität der Immunoassays

Unter Interferenzen versteht man die Wirkung störender Substanzen in der Patientenprobe, die „Abweichungen des gemessenen vom wahren Wert hervorrufen“ (Thomas 2008). Sie können sowohl Analyt-abhängig als auch Analyt-unabhängig sein und zu einem falsch hohen oder falsch niedrigen Messergebnis führen (Tate und Ward 2004). Die interferierenden Substanzen können dabei die Bindungsaffinität des Antikörpers beeinflussen, wie z.B. Auto-AK (Torjesen und Bjøro 1996; Kuwahara et al. 1998) oder heterophile AK (Check et al. 1995). Heterophile Antikörper sind AK, die nach Kontakt mit tierischen Proteinen vom Immunsystem gebildet werden können (Klee 2004). Dabei sind die spezifischen Humanen-Anti-Maus-Antikörper selten, dagegen sind polyspezifische heterophile Antikörper mit geringer Affinität häufig zu beobachten (Klee 2004). Interferenzen können aber auch die messbare Analytkonzentration der Probe beeinflussen, wie z.B. Plasmaproteine, Medikamente, strukturell verwandte oder sehr ähnliche Moleküle, oder auch Faktoren wie lipämisches, hämolytisches oder ikterisches Serum (Tate und Ward 2004). Häufig fasst man „[...] die Summe der Wirkungen aller qualitativen und quantitativen Komponenten im System, ausgenommen derjenigen des Analyten“ (Thomas 2008, S.1932), auch als Matrixeffekte zusammen. Bei Immunoassays beruhen Interferenzen meist auf einem Mangel an Spezifität des Antikörpers, den sogenannten Kreuzreaktivitäten des Antikörpers. Darunter versteht man "das Unvermögen eines Antikörpers, fehlerfrei zwischen dem Analyten und einem Molekül

mit ähnlichen Epitopen zu unterscheiden" (Thomas 2008, S.1934). Gerade die Analyse von Steroidhormonen ist eine Herausforderung, da ihre Epitope vergleichsweise einfach sind und im Serum strukturell verwandte Moleküle, wie z.B. Hormonvorstufen, ihre Metabolite oder auch Medikamente, in unterschiedlichen Konzentrationen im Patientenserum vorhanden sein können. Außerdem wird der immunologische Nachweis der Steroidhormone dadurch erschwert, dass sie sehr kleine Moleküle sind. Da sie durch sterische Behinderung nicht durch zwei AK gebunden werden können, somit keine Sandwich-Assays möglich sind, muss man sich auf die Spezifität der monoklonalen AK in den kompetitiven Immunoassays verlassen (Thomas 2008).

Deshalb sind in der Steroidhormonanalytik Interferenzen ein bekanntes Problem. Dabei konnten oft ungenaue, wie auch falsche Analysenergebnisse auf interferierende Substanzen zurückgeführt werden, wie z.B. AK (Torjesen und Bjøro 1996; Kuwahara et al. 1998; Check et al. 1995). So konnte nachgewiesen werden, dass Autoantikörper gegen  $^{125}\text{I}$ -Testosteron bei einem RIA zu falsch hohen Testosteronwerten (Torjesen und Bjøro 1996) und heterophile AK zu falsch hohen Estradiol- und Progesteronwerten bei einem automatisierten Immunoassay führten (Check et al. 1995). In der Testosteronanalytik wurden ebenfalls Interferenzen durch Medikamente beschrieben, wie Danazol (Sharp et al. 1983; Sharp et al. 1981; Schwarz und Boyd 1982), oder durch den Progesteron-Rezeptor-Antagonisten RU486 (Tejada et al. 1998). Häufiger sind Interferenzen mit strukturell ähnlichen Molekülen wie Hormonvorstufen oder Metaboliten beschrieben, wie DHT (Wang et al. 2008) und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) (Heald et al. 2006; Warner et al. 2006; Middle 2007). Auch in 17-OHP-Assays konnten Interferenzen mit 17-Hydroxypregnenolon (Wong et al. 1992) oder in Estradiol IAs mit Estronsulfat nachgewiesen werden (Stanczyk et al. 2003).

Vor allem in „direkten“ (ohne Extraktion) Immunoassays sind diese Probleme beschrieben worden, denn ohne vorgeschaltete Serum-Extraktionsschritte können potentiell störende Matrixbestandteile nicht entfernt werden. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass sich die Interferenzen nach Extraktionsschritten, z.B. mit Diethylether (Torjesen und Bjøro 1996; Heald et al. 2006) vermindern (Warner et al. 2006). Jedoch ist es nicht immer möglich, die Ursache für falsche Ergebnisse zu finden.

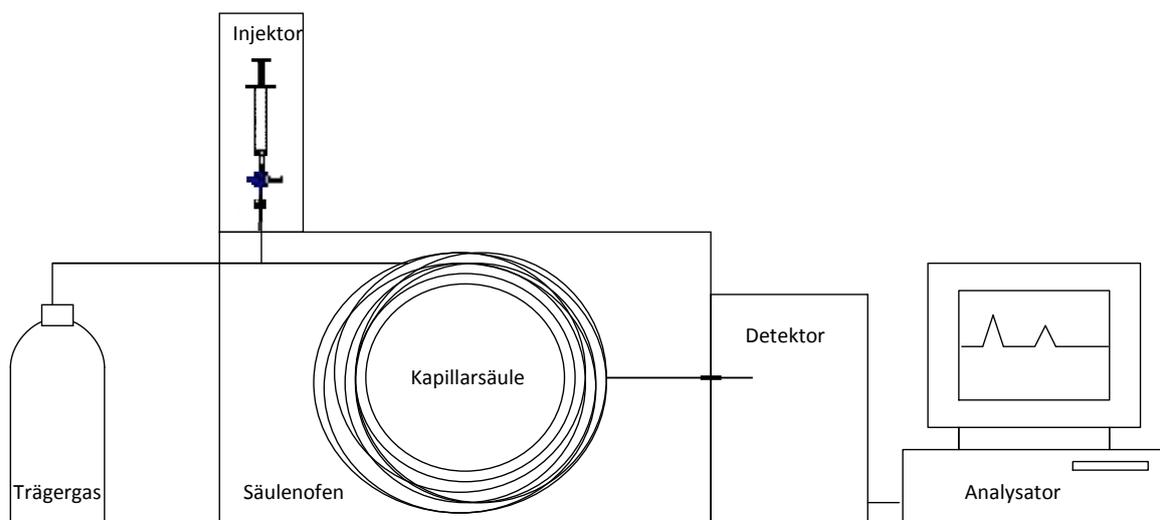
### **1.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

#### **1.2.3.1 Gaschromatographische Trennung**

Die Gaschromatographie ermöglicht die quantitative und qualitative Trennung von Stoffgemischen in ihre einzelnen Komponenten. Das Trennprinzip beruht auf einer

unterschiedlichen Verteilung der Komponenten zwischen einer gasförmigen mobilen Phase und einer flüssigen oder festen stationären Phase (Honour 2006). In der Kapillargaschromatographie ist die stationäre Phase ein dünner Flüssigkeitsfilm, der die Innenwand der Quarzglas Kapillare auskleidet. Die Probe wird am Anfang der Kapillarsäule über den Injektor verdampft und dann in einem inerten Trägergasstrom als mobile Phase durch die hochtemperierte Kapillarsäule transportiert. Je nach Affinität der Komponenten zu der stationären Phase und je nach Flüchtigkeit, baut sich ein Verteilungsgefälle der Stoffe beim Durchwandern der Säule auf. So verlassen die Stoffe zeitversetzt die Säule (Retentionszeit) und werden kontinuierlich von einem Detektor, z.B. einem Massenspektrometer registriert (Otto 2011).

Die wichtigsten Bestandteile eines Gaschromatographen sind der Injektor, über den die Probe aufgegeben und verdampft wird, der Säulenofen, in dem sich die Quarzglas Kapillare befindet und in dem die chromatographische Trennung mit einem festgelegten Temperaturprogramm stattfindet, und der Detektor, der in diesem Fall aus einem Massenspektrometer besteht (Schwedt 2008) (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen. Über den Injektor erfolgt die Probenaufgabe. In dem Säulenofen befindet sich die temperierte Kapillarsäule, in der die verdampfte Probe in einem Trägergasstrom transportiert- und chromatographisch in ihre Komponenten getrennt wird. Die chromatographische Trennung wird vom Detektor registriert und durch den Analysator ausgewertet und dargestellt.

Voraussetzung für die gaschromatographische Analyse ist jedoch, dass die Probe gasförmig vorliegt, unzersetzt verdampfbar ist, oder sich unter Zersetzung reproduzierbar verdampfen lässt (Knapp 1979). Aber auch nicht flüchtige Stoffe wie die Steroidhormone lassen sich durch Derivatisierung in flüchtige Stoffe überführen und sich so gaschromatographisch analysieren (Schulte 2007; McDonald et al. 2011).

### 1.2.3.2 Probenvorbereitung

Für die erfolgreiche Analyse mit der GC/MS sind Aufreinigungs- und Anreicherungs-schritte erforderlich, da die Steroidhormone nur im Spurenbereich in einer komplexen biologischen Matrix, wie Serum oder Plasma, vorliegen. Durch Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie einem nachgeschalteten Clean-up durch Gelchromatographie oder Festphasenextraktion werden sie von interferierenden Begleitsubstanzen getrennt und angereichert (Schulte 2007; Otto 2011; McDonald et al. 2011). Die klassische Trennung der lipophilen Steroidhormone von hydrophilen Serumbestandteilen erfolgt mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) (Wolthers und Kraan 1999). Die LLE kann mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wie Dichlormethan (Siekmann 1979; Stöckl et al. 1991), Dichlormethan-Ether (Turpeinen et al. 2008) Diethylether (Taieb et al. 2003; Legrand et al. 1995; Magnisali et al. 2008), verschiedenen methanolischen Lösungen, wie MeOH-Hexan (Cawood et al. 2005), Ethylacetat-Hexan (Wang et al. 2008; Shiraishi et al. 2008) oder Ethylacetat (Fitzgerald und Herold 1996; Lee et al. 2006), durchgeführt werden. Eine LLE ist auch an Extrelut-Säulen beschrieben worden (Legrand et al. 1995; Magnisali et al. 2008).

Durch die LLE werden hydrophile Substanzen abgetrennt, aber auch störende Matrixbestandteile mitextrahiert. Deswegen ist ein sogenanntes Clean-up als weiterer Aufreinigungsschritt notwendig, mit dem überschüssige Lipide und interferierende Matrixbestandteile abgetrennt werden können (Schulte 2007; Knapp 1979). Für die Steroidanalytik wird oft ein Clean-up durch Gelchromatographie beschrieben, mit der durch Nutzung eines Molsieb-effektes große Moleküle, wie Triglyceride und Phosphatide, extrahiert werden können. Ein solches Clean-up ist z.B. an Sephadex LH-20 Säulen (Stöckl et al. 1991; Siekmann 1979; Wudy et al. 1995) oder Lipidex-5000 Säulen beschrieben. Ein Clean-up kann auch als Festphasenextraktion an SPE-Säulen durch Adsorptionschromatographie an Umkehrphasen durchgeführt werden (Biancotto et al. 2002).

### 1.2.3.3 Derivatisierungen in der Steroidanalytik

Unter Derivatisierung versteht man die Überführung einer Substanz in eine verwandte Struktur, welches durch Reaktionen an den funktionellen Gruppen der Substanzen erreicht wird (Schulte 2007; McDonald et al. 2011).

Aufgrund der intramolekularen Wechselwirkungen ihrer polaren Hydroxylgruppen haben Steroidhormone hohe Siedepunkte und sind damit schwer verdampfbar (Knapp 1979). Die funktionellen Hydroxylgruppen begünstigen außerdem die Neigung zur Adsorption an der stationären Phase (Knapp 1979). Weiterhin sind sie thermisch instabil, ohne Derivatisierung

würden sie beim Einspritzen in den heißen Injektor pyrolysieren (Shackleton 1985). Durch die Derivatisierung kann aber die gaschromatographische Trennung schwer verdampfbarer, thermisch instabiler und polarer Stoffe, wie der Steroidhormone, ermöglicht werden (Schulte 2007; McDonald et al. 2011).

Außerdem werden Derivatisierungsreagenzien eingesetzt, um die Detektierbarkeit von Substanzen zu verbessern. Für die Analytik mit der GC-NCI-MS werden dazu signalvermittelnde Gruppen, wie Nitro- oder Halogensubstituenten, in die Substanzen eingefügt. Durch die eingefügten Fluoratome entstehen Fragmente höherer Massen, die stabiler sind und mit einer starken Intensität angezeigt werden können, da die Halogen-Atome einen hohen spezifischen NCI-Respons aufweisen (Budzikiewicz 1998). So wird die erforderliche Empfindlichkeit und Selektivität für die Detektion von Spurenkomponenten in komplexen biologischen Matrices ermöglicht.

Häufige Derivatisierungen der Steroidhormone sind Silylierungen zu Trimethylsilyl-Derivaten oder Acylierungen zu Fluoracylderivaten, aber auch Alkylierungen sind gebräuchlich. Dabei werden Protonen z.B. der Hydroxyl- oder Carbonylgruppe gegen unpolare Substituenten ausgetauscht.

Beliebte Silylierungsreagenzien sind N,O-Bis(trimethylsilyl) –trifluoracetamid (BSTFA) (Fitzgerald und Herold 1996; Hill et al. 2005) und N-Methyltrimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) (Magnisali et al. 2008; Lee et al. 2006) durch welche die Steroidhormone zu Trimethylsilyl-Ethern umgesetzt werden. Auch der Zusatz von Katalysatoren, wie Trimethylchlorsilan (TMCS) (Fitzgerald und Herold 1996) oder Reaktionsmischungen, wie z.B. BSTFA:TMCS (Fitzgerald und Herold 1996; Hill et al. 2005), wurde beschrieben.

Neben der Silylierung spielt die Alkylierung durch z.B. Pentafluorbenzylbromid (PFBB<sub>r</sub>) oder die Veresterung zu Perfluoracylaten eine große Rolle. Zur Acylierung wird häufig das Derivatisierungsreagenz Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) eingesetzt (Siekmann 1979; Taieb et al. 2003; Wudy et al. 1995; Stöckl et al. 1991; Choi und Chung 1999), aber auch andere fluorierte Marker, wie Pentafluorbuttersäureanhydrid (PFBA) (Legrand et al. 1995), Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) (Baba et al. 1979) oder Pentafluorbenzoylchlorid (PFBzCl) (Akre et al. 2004; Lee et al. 2006), sind gebräuchlich.

#### **1.2.3.4 Massenspektrometrische Detektion**

Der gaschromatographische Trennprozess kann mit verschiedenen Detektoren gekoppelt werden, wobei die Kopplung mit einem Massenspektrometer eine besonders sensitive Detektion mit herausragender Selektivität ermöglicht (Siekmann 1979).

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist die Ionisation von Molekülen zu spezifischen Molekülionen oder Fragmenten und ihre Auftrennung nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) im elektrischen Feld (Shackleton 1985). Die zu analysierende Substanz wird nach Verlassen der Säule über ein Verbindungsstück, das sogenannte Interface als konstanter Molekülstrahl in die Ionenquelle des Massenspektrometers geführt. In der Ionenquelle findet die Ionisation des Analyten statt, d.h. durch Beschuss mit energiereichen Elektronen werden Ionen erzeugt. Es gibt verschiedene Arten der Ionenerzeugung, wie die Elektronenstoß-Ionisation oder die Chemische Ionisation (McDonald et al. 2011). In dieser Arbeit wurden mit der Negativen Chemischen Ionisation (NCI) Ionen erzeugt. Dabei wird zunächst ein Reaktandgas, wie z.B. Methan, ionisiert. Die entstehenden Reaktandgasionen reagieren dann mit den Molekülionen, die ein Elektron abgeben. Diese sehr schonende Ionisation, bei der weniger Fragmente aber mehr Molekülionen entstehen, wird auch weiche Ionisation genannt (Horning 1977). Die durch Ionisation entstandenen Fragmente werden im Vakuum beschleunigt, als Ionenstrom gebündelt und dem Analysator zugeführt. In dem Analysator erfolgt die Massentrennung der Fragmente in einem elektromagnetischen Feld (Quadrupol-Analysator). Indem Empfänger, Verstärker und Detektor die erzeugten Ionen nach Häufigkeit und ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) registrieren, kann ein Massenspektrum erstellt werden (Honour 2006).

#### 1.2.3.5 Identifizierung der Analyte

Die Identifizierung der charakteristischen Molekül- und Fragmentionen der Substanzen erfolgt anhand ihrer Retentionszeiten und Massenzahlen (McDonald et al. 2011).

Die Substanzen zerfallen in der Ionisationskammer in charakteristische Fragmente, die genaue Informationen über die Struktur der Analyte liefern. Ihre Massenzahlen können ermittelt werden, indem man im Scan-Modus die Standardsubstanzen vermisst und den Total Ion Current (TIC) registriert (Shackleton 1985). Dabei werden alle Ionen in einem großen Massenbereich (z.B. 100-900  $m/z$ ) hintereinander gemessen, so dass das gesamte Fragmentierungsmuster erfasst wird. Man erhält das Massenspektrum, eine Darstellung der Massenzahlen der charakteristischen Fragmente nach relativer Intensität (Budzikiewicz 1998).

Die Identifizierung der Substanzen ist außerdem über die Retentionszeit möglich, also die Zeit, die eine Substanz zum Durchwandern der Säule von der Probenaufgabe bis zum Detektor benötigt (Otto 2011). Die Retentionszeit ist zum einen von der Art und Zahl der funktionellen Gruppen im Molekül und damit der unterschiedlichen Adsorption an der stationären Phase abhängig, und zum anderen von den chromatographischen Trennbedingungen, wie Art der Kapillarsäule, Trägergasstrom und der Temperatur im

Säulenofen (Schwedt 2008). Sind diese chromatographischen Parameter konstant, erhält man für die Substanzen reproduzierbare und unter den gewählten Bedingungen charakteristische Retentionszeiten, die zur Identifizierung herangezogen werden können (Schulte 2007).

#### 1.2.3.6 Quantitative Auswertung von GC/MS-Daten

Gerade im Bereich der Spurenanalytik nimmt die Quantifizierung durch die GC/MS eine herausragende Stellung ein, da durch sie Analysen im Pikogramm-Bereich ermöglicht werden.

Zur Quantifizierung werden substanzspezifische Fragmentationen oder auch Molekülionen des Massenspektrums herangezogen, die eine besonders hohe relative Intensität und eine möglichst hohe Massenzahl aufweisen (Shackleton 1985; Wolthers und Kraan 1999). Es wird dabei die Peakfläche dieser charakteristischen Ionen ausgewertet, deren Chromatogramm im Selected Ion Monitoring (SIM) gewonnen wird. Durch die Messung im SIM-Modus wird eine hohe Spezifität und niedrige Nachweisgrenze erreicht, indem man sich nur auf wenige Massen konzentriert (Sparkman et al. 2011; Shackleton 1985).

Die Peakfläche, die proportional zur Menge der zu analysierenden Substanz ist, stellt nur ein relatives Signal dar. Je nach Detektorschwankung-, Empfindlichkeit und Verlusten durch die Probenaufarbeitung kommt es nur zu begrenzt reproduzierbaren Peakflächen (Schulte 2007). Deswegen hat sich in der Spurenanalytik zur Quantifizierung des Analyten die Verwendung eines internen Standards (IStd) als Korrekturfaktor bewährt: Indem man den IStd gleich zu Beginn der Aufarbeitung der Probe zusetzt, wird sichergestellt, dass beide Substanzen gemeinsam die Probenaufarbeitung und Analyse durchlaufen und so etwaige Substanzverluste ausgeglichen werden (Wolthers und Kraan 1999; Shackleton 1985). Der IStd darf dabei nicht in der zu messenden Probe vorhanden sein, muss aber die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften wie der Analyt aufweisen, damit sich beide während der Probenaufarbeitung gleich verhalten (Wolthers und Kraan 1999). Durch Verwendung von deuterierten IStds, bei denen Protonen gegen Deuterium ausgetauscht sind, weisen Analyt und IStd gleiche Eigenschaften auf, können aber aufgrund der unterschiedlichen Massenzahl gaschromatographisch-massenspektrometrisch voneinander getrennt werden (Shackleton 1985).

Zur Quantifizierung wird vorausgesetzt, dass die Peakfläche zur eingespritzten Stoffmenge über einen gewissen Konzentrationsbereich proportional ist. Damit ist das Verhältnis der Konzentration des Analyten ( $C_a$ ) und des IStd ( $C_{istd}$ ) proportional zum Peakflächenverhältnis des Analyten ( $F_a$ ) und des IStds ( $F_{istd}$ ) (Schulte 2007):

$$\frac{Ca}{Cistd} = \frac{Fa}{Fistd}$$

Da die Konzentration des IStds bekannt ist, kann über die Peakflächenverhältnisse von Analyt und IStd die Konzentration des Analyten berechnet werden (Schulte 2007):

$$Ca = \frac{Fa}{Fistd} \times Cistd$$

Die Quantifizierung erfolgt über eine Kalibrierfunktion, anhand derer ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem gemessenen Signal (Peakfläche) und der Konzentration des Analyten in der Kalibrierprobe hergestellt werden kann. Dabei trägt man die Peakflächenverhältnisse ( $y$ ) von Analyt zu IStd gegen die Konzentration der Kalibrierprobe ( $x$ ) auf (Kromidas 1999):

$$y = ax + b$$

Die Steigung ( $a$ ) der Kalibrierfunktion ist dabei ein Empfindlichkeitsmaß der Analyse und ( $b$ ) der y-Achsenabschnitt.

Bei der Auswertung der Peakflächen der Chromatogramme ist darauf zu achten, dass die Peaks deutlich identifizierbar, und von anderen Peaks oder dem Untergrundrauschen abgetrennt sind (Schulte 2007; Otto 2011).

### 1.3 Ziele der Arbeit

- Im Rahmen dieser Arbeit soll -in Anlehnung an die GC-NCI-MS-Methode von Herold und Fitzgerald- eine sensitive und robuste GC-NCI-MS-Methode zur Analyse von Testosteron etabliert werden.
- Diese Methode soll zur Analyse von  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron erweitert werden.
- Dabei soll in allen Schritten der Methodenentwicklung das Ziel verfolgt werden, die Methode hinsichtlich Routinetauglichkeit, Zeitmanagement, Trennleistung, Empfindlichkeit und benötigtem Probenvolumen zu optimieren.
- Außerdem soll sie so aufgebaut werden, dass sie zur Analytik weiterer Steroidhormone, wie Aldosteron, Androstendion und Cortisol, ausgebaut werden kann. Damit soll die Grundlage geschaffen werden, ein Profil der Steroidhormone im Serum aus einer einzigen Probe zu gewinnen.

- 
- Die Methode soll validiert werden, um sie zu charakterisieren und um zu überprüfen, ob die Analyten in einer biologischen Matrix reproduzierbar und verlässlich quantifiziert werden können.
  - Aufgrund der beschriebenen Nachteile der Immunoassays soll damit eine verlässliche Analysenmethode etabliert werden, die als Referenzmethode fungiert und auch für Studien zur Verfügung steht.
  - Abschließend soll die etablierte Methode zur Testosteronanalyse mit dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay verglichen werden, der im Centrum für Laboratoriumsmedizin zur Routinediagnostik eingesetzt wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie/ Lösungsmittel	Bezugsquelle	Produktnummer
Aceton	Roth, Karlsruhe	5025.1
Ethylacetat	Merck, KGaA, Darmstadt	9623
Destilliertes Wasser	Aus dem hauseigenen Netz	
Heptan	Sigma-Aldrich GmbH, München	H-9629
Methanol	Merck, KGaA, Darmstadt	1.06007.1000
Wasser für die HPLC	Merck, KGaA, Darmstadt	1.15333.1000
Methan	Westfalen-AG, Münster	230410/28307
	Reinheit 99,995 Vol%	
Helium	Air Liquide, 4.0	P0252S10R2A001
	Reinheit 99,996 Vol %	

#### 2.1.2 Reagenzien für die Derivatisierung

Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle	Produktnummer
O (2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylamin-hydrochlorid	PFBH-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Fluka 76735
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid	MSTFA	Machery-Nagel, Düren	701270.201
Trimethylchlorsilan	TMCS	Merck KGaA, Darmstadt	102333

#### 2.1.3 Herstellen der Standardlösungen für die Derivatisierung

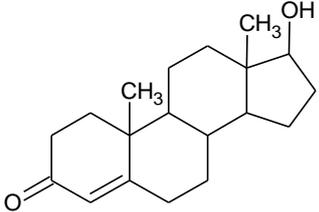
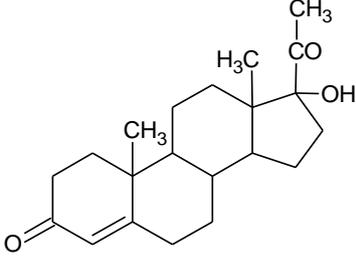
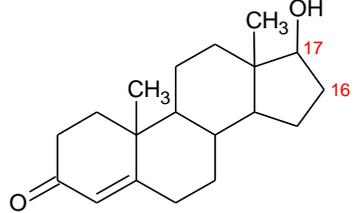
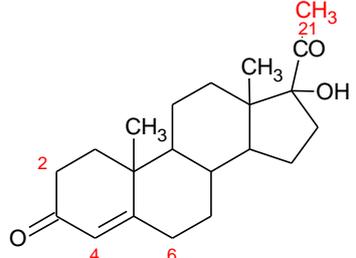
##### Florox-Lösung:

10 mg Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid werden in 10 ml Methanol gelöst.

##### MSTFA mit 1 % TMCS:

990  $\mu$ l MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid) werden mit 10  $\mu$ l TMCS (Trimethylchlorsilan) versetzt. Die Glasvials werden sofort verschlossen, um zu verhindern, dass Feuchtigkeit eindringt.

## 2.2 Standardsubstanzen

Referenzverbindung	Molmasse	Quelle /Produktnr.	Strukturformel
Testosteron (17 $\beta$ -Hydroxy-3-oxo-4-androstene)	288	Fluka 86500-25G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	
17 $\alpha$ -OH-Progesteron (17 $\alpha$ -Hydroxy-4-pregnene-3,20-dione)	330	Fluka 46337, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München	
Interner Standard	Molmasse	Quelle/ Produktnr.	Strukturformel
D3-Testosteron (17 $\beta$ -Hydroxyandrost-4-en-3-one-16,16,17-d3)	291	Sigma T-2655-10MG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
D8-17 $\alpha$ -OH-Progesteron (4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3,20-dione-2,2,4,6,6,21,21,21-d8)	338	D-5650, CDN Isotopes, Canada	

### 2.2.1 Herstellung der Stamm- und Kalibrierlösungen

#### 2.2.1.1 Herstellung der Stammlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden 5-10 mg der Standardsubstanzen mit einer Analysenwaage auf 0,1 mg genau eingewogen. In einem 12 ml Reagenzglas (Schraubkappe mit zusätzlich eingelegter PTFE-beschichteter Dichtung) wurden die Standardsubstanzen in Methanol (5-10 ml) gelöst, so dass die resultierende Konzentration der Stammlösung 1 mg/ml ergab. Von dieser Stammlösung wurden 100  $\mu$ l in einem weiteren Reagenzglas mit 9,9 ml Methanol verdünnt (1:100), so dass die Konzentration für die erste Verdünnung 10  $\mu$ g/ml

betrug. Es wurden weitere Verdünnungen hergestellt, indem jeweils 1 ml der vorherigen Verdünnung mit 9 ml Methanol aufgefüllt wurden. Damit ergaben sich Verdünnungen mit einer Konzentration der Standardsubstanz zwischen 10 µg/ml und 1 ng/ml. Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.1.2 Herstellung der Kalibrierlösungen

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen wurden entsprechende Mengen der Stammlösungen in Glasvials überführt und mit Methanol auf 1 ml aufgefüllt. Die so erhaltenen methanolischen Kalibrierlösungen haben eine aufsteigende Analytenkonzentration (z.B. Testosteron) und eine konstante Konzentration an IStd (z.B. D3-Testosteron).

## 2.2.2 Humanserum

Das verwendete Serum/Plasma zur Methodenentwicklung stammt aus dem Untersuchungsgut des Zentrallabors des Universitätsklinikums Münster. Die gesammelten Proben waren Restmaterialien aus der Krankenversorgung, die zur Entsorgung bereit standen. Sie wurden anonymisiert und nur nach Geschlecht und Alter kategorisiert.

### 2.2.2.1 Herstellung der Kalibrierproben

Die Kalibrierproben wurden nach dem Additionsverfahren hergestellt: Ein Poolserum wurde in 1 ml -Proben aliquotiert und mit 50 µl der entsprechenden Kalibrierlösung versetzt. Der ersten Kalibrierprobe wurde nur IStd zugefügt, den anderen IStd und Analyt in aufsteigender Konzentration. Damit enthielten die Kalibrierproben eine aufsteigende Konzentration an Analyten und einen konstanten Gehalt an IStd. Der gewünschte Arbeitsbereich wurde durch die Kalibrierproben abgedeckt. Da keine hormonfreien Proben (Nullseren) zur Verfügung standen, wurde Poolserum mit einem sehr geringen Gehalt des Analyten gesammelt. Die Konzentrationen der Kalibrierproben sind in Tabelle 1 beispielhaft für Testosteron aufgeführt.

**Tabelle 1 Konzentrationen von Analyt und internen Standard in den Kalibrierproben**

Kalibrierprobe	1	2	3	4	5	6	7	8
Konzentration Testosteron (ng/ml)	0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
Konzentration D3-Testosteron (ng/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

### 2.2.2.2 Herstellung der Kontrollproben

Zur Herstellung der Kontrollproben wurde ein Poolserum in je 1 ml Proben aliquotiert und mit je 50 µl IStd (5 ng/ml D3-Testosteron) versetzt. Die Proben wurden in Aliquoten zu 1 ml

im Gefrierschrank (-80°C) bis zur Aufarbeitung gelagert. Diese Kontrollproben dienen zur 1-Punkt-Kontrolle von Tag zu Tag.

### 2.2.2.3 Herstellung der Validierungsproben

Drei Poolserien unterschiedlicher Konzentrationen über den gesamten Arbeitsbereich wurden zu 1 ml Proben aliquotiert und mit je 50µl IStd versetzt.

## 2.3 Labormaterialien und Geräte für die Probenaufarbeitung

### 2.3.1 Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller	Produktnummer
Einmal-Kulturröhrchen	Duran Group GmbH, Wertheim	231721094
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen 4,5ml, aus Polypropylen	Sarstedt, Sarstedt Deutschland	57.512
Eindrückstopfen	Sarstedt, Sarstedt Deutschland	65.809
Autosamplergläser mit Spitzboden	Forche Chromatographie	VT 1100765
Kappen	Forche Chromatographie	CT 11 B 3070N
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg	
Direktverdränger-Pipetten	Rainin/Mettler-Toledo	
Pipettenaufsätze für Direktverdrängerpipette	Rainin/Mettler-Toledo	
Pipettenaufsätze (10µl, 50µl, 100µl, 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg	
SPE-Kartuschen, 1 ml, 50 mg Polymermaterial	Phenomenex	8 B-S100-TAK
Reagenzglas, 12 ml mit Schraubkappe	Schuett-Biotek/ Willers	193115010

### 2.3.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Produkt
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen	Genius
Festphasenextraktionsstation	J.T. Baker, Deventer, Niederlande	Baker-10-SPE-System
Festphasenextraktionsstation	Biotage GmbH, Düsseldorf	Vac Master, 121-1016
HLC Schüttel-Heizblock, temperaturkontrolliert, mit Vakuumaufsatz	HLC Biotech, Bovenden	MHR11 und HTM130
Überkopfschüttler	Heidolph, Schwabach	Typ Reax 2
Vortex-Mixer	Scientific Industries, New York, USA	Vortex-Genius
Zentrifuge	Sigma-Aldrich GmbH, München	3E-1

## 2.4 Analyseninstrumente

### 2.4.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie im NCI-Modus

GC	GCMS-QP 2010 Shimadzu
Autosampler	AOC-20s Shimadzu
Injektor	split-/splitless Injektor
Detektor	Massenselektiver Detektor mit NCI-Ionenquelle
Software	Shimadzu GCMSsolution, Version 2.3, Shimadzu Duisburg

### 2.4.2 Siemens ADVIA Centaur Immunoassay für Testosteron

Probenvolumen	15 µl
Probentyp	Serum
Sensitivität und Messbereich	0,1-15 ng/ml
Referenzbereich für Männer	2,41-8,27 ng/ml
Referenzbereich für Frauen	0,14 – 0,76 ng/ml

### 2.4.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Daten und Abbildungen wurden für die Validierung mit Hilfe der Software „Methodenvalidierung in der Analytik MVA“ (MVA 2001) sowie mit Hilfe des Programms STATISTICA (Stat Soft 2011) erstellt, die für den Methodenvergleich mit der Software Medcalc (Medcalc 2012).

## 3 Methodenentwicklung und Ergebnisse

### 3.1 Methodenentwicklung

Zur Analytik der Steroidhormone stand ein Gaschromatograph zur Verfügung, gekoppelt mit einem Massenspektrometer. Mit der GC-NCI-MS wurde im Rahmen dieser Arbeit eine analytische Methode zur Quantifizierung von Testosteron und 17-OHP etabliert. Ausgangsbasis für den Aufbau der Methode war die von Fitzgerald und Herold beschriebene Methode zur Bestimmung von Testosteron im Serum oder Plasma mit der GC-NCI-MS (Fitzgerald und Herold 1996). Mit dieser Methode konnte aus 1 ml Serum oder Plasma Testosteron zwischen 0,199 ng/ml (0,69 nmol/l) und 19,97 ng/ml (69,3 nmol/l) quantifiziert werden. Die Probenvorbereitung umfasste die Zugabe von 1 ng/ml D3-Testosteron als IStd und eine LLE mit 3 ml Ethylacetat. Die Derivatisierung zu Pentafluorbenzylderivaten erfolgte mit Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid (PFB-HCl) gelöst in Pyridin (Florox-Lösung). Die anschließende Silylierung erfolgte mit BSTFA, welches mit TMCS (10 mg/l) versetzt wurde. Mit einem Injektionsvolumen von 0,1 µl am GC, konnten mit der NCI-MS die spezifischen Massenzahlen der Testosteronderivate bei 535 und 538 detektiert werden. Diese Methode wurde zum einen verändert, da sie so nicht nachvollzogen werden konnte, und zum anderen optimiert und zur Analyse weiterer Steroidhormone erweitert.

Im Folgenden soll ein Überblick über die einzelnen Schritte der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode gegeben werden. Außerdem soll dargestellt werden, wie versucht wurde, die Methode hinsichtlich Trennleistung, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Messzeit zu optimieren und für die Analyse weiterer Steroidhormone auszubauen.

#### 3.1.1 Probenvorbereitung

Da die Steroidhormone in einer komplexen biologischen Matrix, wie Serum oder Plasma, vorliegen und andere Substanzen, wie Proteine, die Detektion stören würden, müssen sie zunächst von den interferierenden Begleitstoffen getrennt werden. Außerdem ist ein Anreicherungsschritt notwendig, da die Steroidhormone nur im Spurenbereich im Serum vorkommen. Diese Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte erfolgen mit der Flüssig-Flüssig- und mit der Festphasenextraktion. Um die Analyten auch sicher quantifizieren zu können, wird der Probe gleich zu Beginn der Probenaufarbeitung IStd zugesetzt.

### 3.1.1.1 Auswahl und Zugabe von internem Standard

Als IStd wurden Deuterium-markierte Hormone verwendet. Bei der Auswahl des IStds ist darauf zu achten, dass er mindestens drei Massen höher ist, um nicht aufgrund des Vorhandenseins von natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffisotopen mit dem Derivat des Analyten zu interferieren (Shackleton 1985; Wolthers und Kraan 1999). Der für die jeweilige Analyse ausgewählte IStd wies je 3-8 deuterierte Protonen auf (vgl. 2.2, S.26). Damit weist der IStd die gleichen Eigenschaften wie der Analyt auf, aber eine sichere Abtrennung ist durch die unterschiedliche Massenzahl möglich. Der IStd wurde gleich zu Beginn der Probenaufarbeitung hinzugefügt, so dass sichergestellt wird, dass der IStd alle Probenaufarbeitungsschritte gemeinsam mit dem Analyt durchläuft und etwaige Substanzverluste, die während der Extraktion und Derivatisierung entstehen, ausgeglichen werden können (vgl. 1.2.3.6, S.22). Zur Analyse wurde der Probe ähnliche Konzentrationen des IStd zugegeben, wie sie auch im Serum zu erwarten sind (für Testosteron z.B. 5 ng/ml).

Es wurde untersucht, ob sich Methanol zum Lösen und Aufbewahren des IStds eignet. Bezüglich der Stabilität des IStds wurden verschiedene Methanolkonzentrationen (33%, 66% und 100%) getestet, in denen der IStd gelöst und zu den Proben hinzugegeben wurde. Außerdem wurde überprüft, in welchen Volumina (50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ ) der methanolische IStd zum Serum hinzugegeben werden kann, ohne dass eine Proteinfällung auftritt.

Des Weiteren wurde überprüft, ob ein zusätzlicher Inkubationsschritt notwendig ist, damit sich ein Gleichgewicht zwischen den freien und proteingebundenen Hormonen und dem IStd einstellt. Dazu wurde nach Zugabe des IStds die Probe zunächst gründlich mit dem Vortex-Mixer gemischt, um sicherzustellen, dass sich der IStd homogen im Serum verteilt. Dann wurde die Probe über 15 s, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Ferner wurde erprobt, ob sich bei der Analyse der Substanzen Differenzen ergeben, wenn Plasma statt Serum verwendet wird. Dazu wurden Plasma- und Serumproben gleicher Patienten analysiert.

### 3.1.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) beruht auf dem Prinzip der Verteilung einer Substanz zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen (Schwedt 2008). Durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels zum Serum, können die lipophilen Steroidhormone von den hydrophilen Serumbestandteilen getrennt werden: Nach ausgiebigem Schütteln und anschließendem Zentrifugieren erhält man eine proteinfreie, lipophile Phase, welche die

Steroidhormone und andere Lipide enthält. Dieser Überstand wird in ein weiteres Reagenzröhrchen überführt und so von der hydrophilen Phase getrennt.

Zur Optimierung der LLE wurden folgende Lösungsmittel durch qualitativen, und zum Teil auch quantitativen Vergleich der Chromatogramme in Bezug auf Extraktionsausbeute, Anzeigeempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit getestet: Methanol, Ethylacetat, Dichlormethan / Ethylether, tert-Butylmethylether (tBME) und Dichlormethan.

- a) Nach folgendem Schema (Tabelle 2) wurde mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen (33%, 50%, 66%) extrahiert.

Ansatz 33 % MeOH	Ansatz 50 % MeOH	Ansatz 66 % MeOH
100 µl IStd V.2 + 1 ml Serum	100 µl IStd V.2 + 1 ml Serum	100 µl IStd V.2 + 1 ml Serum
vortexen	vortexen	vortexen
+ 1 ml MeOH	+ 1 ml MeOH	+ 2 ml MeOH
vortexen	vortexen	Vortexen
+ 1 ml ZnSO <sub>4</sub>	+ 10 µl ZnSO <sub>4</sub> 2 M	+ 10 µl ZnSO <sub>4</sub> 2 M
Vortexen	Vortexen	Vortexen
5 min bei 3000 rpm zentrifugieren	5 min bei 3000 rpm zentrifugieren	5 min bei 3000 rpm zentrifugieren
	+ 1 ml H <sub>2</sub> O, schwenken	2 ml H <sub>2</sub> O, schwenken

**Tabelle 2 Unterschiedliche Ansätze der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol**

Durch die zusätzliche Gabe von Zinksulfat (ZnSO<sub>4</sub>) wurden Restproteine gefällt.

- b) Analog zur Ausgangsmethode (Fitzgerald und Herold 1996) wurde mit Ethylacetat extrahiert:

50 µl / 100 µl IStd + 1 ml Serum, vortexen, + 3 ml Ethylacetat, 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues Probengefäß dekantieren, bei 47°C eindampfen

- c) Des weiteren wurde analog zur Methode von Turpeinen et al. (Turpeinen et al. 2008) die Extraktion mit Dichlormethan/ Ethylether (60:40) getestet:

500 µl Serum + 5 ml Dichlormethan/Ethylether (60:40), 5 min vortexen, 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, obere Phase mit Pipette abnehmen, bei 47 °C im Vakuum-Evaporator verdampfen, Rückstand in 350 µl 30% MeOH aufnehmen

- d) Basierend auf der Methode von Siekmann (Siekmann 1979) wurde mit Dichlormethan extrahiert:

50 µl /100 µl IStd + 1 ml Serum, vortexen, + 3 ml Dichlormethan, 10 min Überkopfschüttler, 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, untere Phase abnehmen, erneut zentrifugieren, untere Phase abnehmen, bei 10 °C verdampfen

e) Außerdem wurde die Extraktion mit tert-Butylmethylether (tBME) erprobt:

50 µl IS, 1 ml Serum, vortexen, + 3 ml tBME + 100 µl 0,2 M ZnSO<sub>4</sub>, 10 min Überkopfschüttler, 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, obere Phase dekantieren, bei 25 °C verdampfen

Die Extraktionen erfolgten durch Zugabe von 1-3 ml Lösungsmittel zu 1 ml Serum mit 50 µl IStd. Es wurde untersucht, ob sich eine höhere Extraktionsausbeute durch mehrmaliges Ausschütteln erzielen lässt. Hierzu wurden in mehreren Ansätzen Proben verglichen, die einmal, zweimal und dreimal mit Lösungsmittel ausgeschüttelt wurden. Auch wurde überprüft, ob die Extraktionen durch unterschiedliche Arten des Schüttelns, durch stufenweise Zugabe oder durch Zugabe des Lösungsmittels in „einem Schuss“, durch Vortexen oder durch den Überkopfschüttler beeinflusst werden. Zum Vergleich der unterschiedlichen Ansätze und Lösungsmittel wurden die Chromatogramme quantitativ ausgewertet.

Nachdem die Lösungsmittel zugegeben wurden, wurde 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, die organische Phase in ein Probengefäß überführt und je nach Siedepunkt des Lösungsmittels im Vakuum-Evaporator eingedampft. Der zurückbleibende Lipidtropfen wurde mit 1 ml 50 % Methanol wieder aufgenommen.

Da durch die LLE störende Matrixbestandteile mitextrahiert wurden, ist ein weiterer Aufreinigungsschritt erforderlich. Der gewonnene proteinfreie Überstand wird durch ein Clean-up mittels Festphasenextraktion (SPE) von überschüssigen Lipiden und störenden Matrixbestandteilen gereinigt.

### 3.1.1.3 Clean-up mittels Festphasenextraktion

Das Prinzip der SPE beruht auf der Wechselwirkung zwischen der stationären Phase, dem Adsorbens mit dem Analyten: Beim Durchlaufen der flüssigen mobilen Phase durch die stationäre Phase werden die Analyte im Adsorbens zurückgehalten und damit angereichert (Schwedt 2008). Dazu werden die Festphasenextraktionskartuschen zunächst mit organischen Lösungen konditioniert und dann mit der Probe beladen. Nach der Anreicherung folgt ein Waschschritt und schließlich die Elution der aufgereinigten und aufkonzentrierten Probe. Das Eluat enthält die Steroidhormone und andere Serumlipide in konzentrierter Form.

Zur Optimierung der Festphasenextraktion wurden verschiedene SPE-Säulen getestet. Für die Auswahl der Säulen sind die chemische Struktur und Eigenschaften der Analyte zu beachten, damit das Adsorbens für die Analyte eine hohe Selektivität aufweist und so störende Matrixbestandteile abgetrennt werden können (Schwedt 2008). Außerdem ist die Kapazität der Säule zu beachten (Schwedt 2008). Es wurden Reversed Phase (RP)- Säulen mit 30 und 50 mg Adsorbens getestet. Das Adsorbens dieser RP 18 Säulen ist ein Kieselgel, das chemisch gebundene C<sub>18</sub> Reste enthält und somit unpolare, lipophile Stoffe bindet (Schwedt 2008). Hier erfolgt die Aufreinigung des Extraktes, damit weitere hydrophile, polare Serumbestandteile aber vor allem auch andere lipophile Bestandteile, wie Triglyceride, abgetrennt werden. Für die Selektivität eines chromatographischen Trennvorgangs ist weiterhin die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase bedeutend (Otto 2011), so dass hier insbesondere beim Waschen und bei der Elution auf eine konstante und langsame Flussgeschwindigkeit geachtet wurde.

Die Konditionierung erfolgte durch Aufgabe von methanolischen Lösungen. Nach der Probenaufgabe erfolgte ein Waschschriff. Damit bei diesem Waschschriff möglichst viele unerwünschte Matrixbestandteile entfernt werden, aber möglichst wenig Analyt herausgewaschen wird, wurden unterschiedliche Methanol-Konzentrationen (30%, 40%, 50%) getestet. Das Eluat wurde durch Zugabe von 1 ml 100% Methanol in Glasvials aufgefangen. Gerade bei der Elution und dem Waschschriff wurde auf eine langsame Tropfgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/min geachtet.

Nach erfolgter Extraktion wurde das Eluat im Vakuum-Evaporator eingedampft, damit Wasserrückstände die nun folgende hydrolyseempfindliche Derivatisierungsreaktion nicht stören.

Die Säulen wurden auch in Bezug auf Blindwerte getestet, um ein möglichst geringes Untergrundrauschen und damit eine hohe Nachweisgrenze zu erzielen. Dabei wurden die Säulen wie gewohnt konditioniert, mit 50% MeOH Lösung beladen und wie gewohnt gewaschen, eluiert und schließlich die aufgereinigte Probe derivatisiert.

### **3.1.2 Derivatisierung**

Im Folgenden werden die einzelnen Derivatisierungsreaktionen im Zuge der Methodenentwicklung näher beleuchtet. Außerdem soll dargestellt werden, wie versucht wurde, die Derivatisierungsprozeduren hinsichtlich der Inkubationszeiten sowie ihrer Routinetauglichkeit zu optimieren.

### 3.1.2.1 Silylierung

Durch die Silylierung wird das Proton der Hydroxylgruppe gegen eine Trimethylsilylgruppe ausgetauscht, es bildet sich dabei ein Trimethylsilylderivat (Knapp 1979):



Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden MSTFA und HFBA als Silylierungsreagenzien getestet. Als besonders geeignet erwies sich die Silylierung mit MSTFA (Abbildung 6). Es wurde versucht, die Derivatisierung durch Variationen der Derivatisierungsdauer (5, 10, 30 und 60 min) und der Inkubationstemperatur (Raumtemperatur, 70°C, 80°C) zu optimieren.

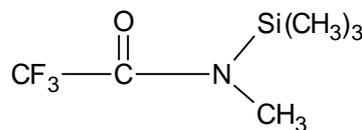


Abbildung 6 Strukturformel des Silylierungsreagenzes MSTFA

Da die Derivatisierungsreagenzien sehr hydrolyseempfindlich sind (Knapp 1979), wurden außerdem silanisierte Glasvials für die Derivatisierungsreaktion erprobt. Da die Derivatisierungsreaktion eine Gleichgewichtsreaktion ist, wurden die Derivatisierungsreagenzien im Reagenzüberschuss zu den Proben hinzugegeben (Schulte 2007). Dadurch konnte eine vollständige und reproduzierbare Umsetzung zu den Derivaten gewährleistet werden. Der Reagenzüberschuss stört nicht, da die Derivatisierungsreagenzien sehr flüchtig sind, die Trennsäule vor den Analyten passieren und damit die gaschromatographische Trennung nicht behindern (Schulte 2007).

Weiterhin wurde überprüft, ob sich durch Zusatz des Silylierungsmittels TMCS (Abbildung 7) als chemischen Katalysator (Knapp 1979) die Umsetzung verbessern lässt. Dazu wurde die Derivatisierung mit MSTFA als alleiniges Reagenz, sowie unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an TMCS (1 %, 5%, 10%), verglichen.

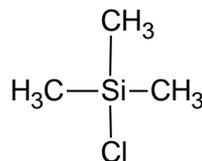


Abbildung 7 Strukturformel des chemischen Katalysators Trimethylchlorsilan (TMCS)

Folgende Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Derivatisierung von Testosteron mit MSTFA unter Bildung eines Trimethylsilylderivats:

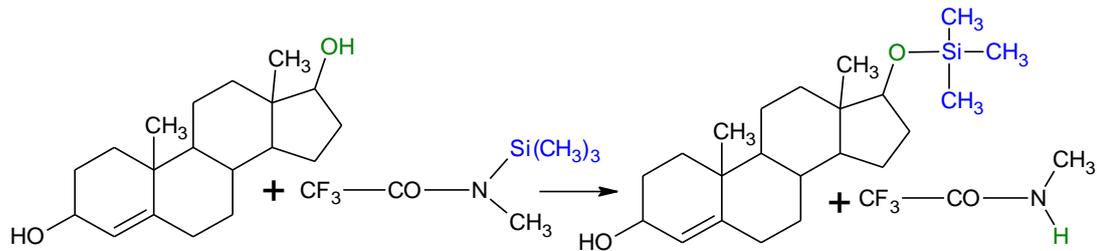


Abbildung 8 Derivatisierung von Testosteron mit MSTFA zu einem Trimethylsilylderivat

### 3.1.2.2 Derivatisierung mit dem fluorierten Marker Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid

Zur Verbesserung der Detektierbarkeit der Hormone mit der NCI/MS werden in die Substanzen signalvermittelnde Gruppen eingefügt. Durch eingefügte Fluoratome wird die erforderliche Empfindlichkeit und Selektivität in der Detektion erreicht (vgl. 1.2.3.3, S.19).

Um fluorierte Marker zur spezifischen Detektion einzufügen, wurde analog zur Ausgangsmethode Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid (PFBH-HCl, Abbildung 9) zur Oximierung verwendet (Fitzgerald und Herold 1996). Das PFBH-HCl wurde in Methanol gelöst (Florox-Lösung).

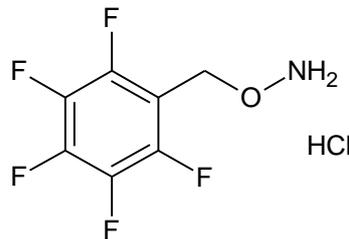


Abbildung 9 Strukturformel von Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid (PFBH-HCl)

PFBH-HCl reagiert mit den Carbonylverbindungen zu den entsprechenden Oximen (Knapp 1979). Abbildung 10 zeigt die schematische Reaktion von Testosteron mit dem Derivatisierungsreagenz PFBH-HCl.

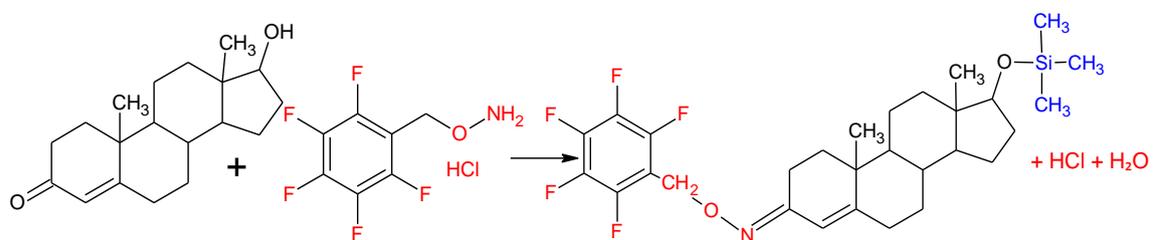


Abbildung 10 Testosteron reagiert mit PFBH-HCl zu dem entsprechenden Oxim

Auch hier wurde versucht, die Derivatisierungsreaktion durch Änderung verschiedener Parameter zu optimieren, wie Derivatisierungsdauer (10, 30, 60 und 180 min) und

Inkubationstemperatur (Raumtemperatur, 70°C, 80°C). Außerdem wurde der Zeitpunkt der Zugabe der Derivatisierungsreagenzien getestet.

### 3.1.3 Mikromethode

Auch in der Pädiatrie gibt es viele klinische Fragestellungen, die eine Steroidhormonanalyse erfordern (vgl. 1.1.6, S.8). Bei Kindern ergibt sich jedoch die Schwierigkeit, eine große Menge an Untersuchungsmaterial zu gewinnen. Daher wurde während der Methodenentwicklung versucht, die Testosteronanalyse auch mit einem Ausgangsvolumen von 100 µl durchzuführen.

Dazu wurden auf allen Ebenen der Probenaufarbeitung die einzelnen Aufarbeitungsschritte an das Ausgangsvolumen angepasst. Zu 100 µl Serum wurde in einem Zentrifugenröhrchen 5 µl an IStd hinzugegeben und die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde mit 300 µl Ethylacetat durchgeführt. Das Eluat der aufgereinigten Probe aus der Festphasenextraktion wurde in 30 µl Florox-Lösung bzw. 30 µl MSTFA/TMCS aufgenommen. Dadurch resultiert zwar ein größerer Reagenzüberschuss gegenüber der eigentlichen Methode, der aber aus genannten Gründen keine Auswirkung auf die Analyse hat (vgl. 3.1.2.1, S.35). Vielmehr kann so gewährleistet werden, dass die vorher eingedampfte Probe auch vollständig wieder aufgenommen wird. Statt 1 µl wurden 3 µl in den Gaschromatographen injiziert, um eine ausreichende Anzeigeempfindlichkeit zu erzielen. Anschließend wurden in einem Methodenvergleich die Testosteronkonzentrationen, die mit der Mikromethode ermittelt werden konnten, mit denen der „Makromethode“ verglichen.

### 3.1.4 Optimierung und Einrichtung der Geräteparameter und Analysebedingungen

Auch durch Variationen der Analysebedingungen lässt sich die Methode hinsichtlich Trennleistung, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Messzeit optimieren.

Wesentlichen Einfluss auf die Trennleistung, Retentionszeit und die Peakform nimmt die Temperatur im Injektor und im Säulenofen, mit der die chromatographische Analyse durchgeführt wird. Durch die Temperatur werden die Adsorptionsvorgänge der Analyten an der stationären Phase und damit die Trennung der Komponenten beeinflusst. Ein Temperaturprogramm bietet sich vor allem bei der Analyse von Stoffgemischen an, deren Komponenten unterschiedliche Siedepunkte aufweisen und sich so voneinander trennen lassen (Schulte 2007).

Die Probe wird splitlos, d.h. bei geschlossenem Splitventil in den Injektor gegeben. Die Injektortemperatur muss dabei hoch genug sein, um ein vollständiges Verdampfen der Probe zu gewährleisten. Es entsteht eine Probenwolke, die durch das Trägergas aus dem Injektor gespült wird. Es besteht dabei die Gefahr, dass sich die Probenwolke vorzeitig in der Kapillarsäule verteilt, und es zu einer Bandenverbreiterung kommt. Durch ein geeignetes Temperaturprogramm im Säulenofen wird aber die Refokussierung der Probe am Anfang der Kapillarsäule erreicht. Dazu wird eine Ausgangstemperatur festgelegt, die unterhalb der Siedepunkte der Steroidhormone liegt. Dies führt zu einer Kondensation der Probe und damit zu einer schmalen Probenbande am Anfang der Kapillarsäule. Durch kontinuierliche Steigerung der Temperatur bis zu einer Zieltemperatur wird, je nach Siedepunkt und Wechselwirkung mit der stationären Phase, ein zeitversetztes Durchwandern der Substanzen durch die Säule ermöglicht (Sparkman et al. 2011).

Im Bereich der massenspektrometrischen Detektion wurde auf eine Scan-Rate von 2-2,5 scans/s geachtet, damit genug Datenpunkte vorhanden sind, um die Peakflächen sicher zu rekonstruieren.

Durch verschiedene Variationen wurde versucht, die Empfindlichkeit der Analyse zu steigern. Um eine höhere Anzeigeempfindlichkeit zu erreichen, wurde das Probenendvolumen minimiert und die Probe stärker aufkonzentriert. So wurde mit nur 30 µl Florox anstelle von 100 µl Florox derivatisiert. Anschließend wurde die eingedampfte Probe mit 50 µl MSTFA/TMCS silyliert, ohne Zusatz von 50µl Heptan. Damit konnte eine stärkere Aufkonzentrierung und ein geringeres Probenendvolumen erreicht werden. Hierfür wurden unterschiedliche Glasvials getestet, um eine Injektion aus nur 50 µl Probenendvolumen zu ermöglichen. Weiterhin wurde versucht, durch Injektion unterschiedlich großer Volumina (1 - 3 µl) die Empfindlichkeit der Analyse zu steigern.

### 3.1.5 Erstellen von Massenspektren und Auswahl der Fragmentionen

Die Analyte können anhand der Massenzahl ihrer Fragmentionen oder ihrer Molekülionen und anhand ihrer charakteristischen Retentionszeiten identifiziert werden (vgl. 1.2.3.5).

Um die Massenspektren der Analyte zu erhalten, wurde eine hohe Konzentration der Stammlösung (1 µg/ml) aufgearbeitet, um eine ausreichend hohe Empfindlichkeit zu gewährleisten, da die Extraktion und damit die Aufkonzentrierungsschritte entfallen. Es wurden 50 µl der gewählten methanolischen Stammlösung derivatisiert und mit der GC-NCI-MS im Scan-Modus analysiert. Damit wird im TIC das gesamte Fragmentierungsmuster des gewählten Massenbereichs (100-900 m/z) erfasst.

Für die Quantifizierung wird das Fragmentation (Quantifizierung) ausgewählt, das eine möglichst hohe Massenzahl und eine hohe relative Intensität aufweist. Je höher die Massenzahl des Fragmentations, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Fragmente anderer Substanzen mit dem untersuchten Signal interferieren (Wolthers und Kraan 1999). Da jedoch Fragmente mit hoher Massenzahl eine geringe Stabilität aufweisen, ist die relative Intensität des resultierenden Signals in der Regel geringer. Somit wird ein Kompromiss zwischen der Spezifität des Fragmentations und der Sensitivität der Analyse gesucht (Otto 2011). Neben dem Quantifizierung kann, zur qualitativen Absicherung, nach gleichen Kriterien als weiteres Fragmentation ein Referenzion ausgesucht werden.

### 3.1.6 Chromatographische Analyse im SIM-Modus

Nachdem charakteristische Fragmentationen ausgesucht wurden, konnten die Proben im SIM-Modus analysiert werden. Dafür wurden stärkere Verdünnungen der Stammlösungen aufgearbeitet, und zwar in Konzentrationsbereichen, die auch in Serumproben zu erwarten sind (für Testosteron 5 ng/ml Serum). Da man sich auf wenige Massen konzentriert, kann eine viel höhere Empfindlichkeit gewährleistet werden (Sparkman et al. 2011). Wenn die Empfindlichkeit der Methode zu dieser Analyse ausreicht, kann anschließend überprüft werden, ob sich die Methode auch zum Nachweis der Analyte im Serum eignet. Dazu wurde 1 ml Serum aufgearbeitet und analysiert. Dadurch konnte überprüft werden, ob die Substanzen auch im Serum sicher identifizierbar sind. Indirekt auch, ob die Extraktionsmaßnahmen erfolgreich waren: Zum einen kann durch die Probenmatrix eine Verschiebung der Retentionszeit resultieren, zum anderen kann durch Koelution störender Substanzen Fremdpeaks auftreten, die eine sichere Peakidentifizierung verhindern.

Weiterhin wurde die Möglichkeit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Steroidhormone aus einer Serumprobe untersucht. Sind die Massenzahlen und die Retentionszeiten bekannt, kann mittels der Software ein spezielles Programm generiert werden, dass je nach Zeitfenster nur bestimmte Massenzahlen vermisst. Indem man in einem Zeitfenster möglichst wenige Massen misst, wird die Empfindlichkeit der Analyse beibehalten (Sparkman et al. 2011).

## 3.2 Ergebnisse der Methodenentwicklung

### 3.2.1 Probenvorbereitung

#### 3.2.1.1 Interner Standard

Der IStd zeigte in 100 % MeOH die größte Stabilität, wurde in 1 ml Mengen aliquotiert und im Kühlschrank bei + 4°C gelagert. Bei Zugabe von 100 µl IStd war eine Proteinfällung im Serum zu beobachten, so dass das zugegebene Volumen des IStds auf 50 µl reduziert wurde. Hinsichtlich der Extraktionsausbeute und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass eine Inkubation des IStds mit der Probe nicht notwendig ist. Als Untersuchungsmaterial kann sowohl Serum, als auch Plasma verwendet werden.

#### 3.2.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Ergebnisse der LLE beruhen auf Mehrfachbestimmungen ( $n > 4$ ) eines Poolserums. Es wurden beispielhafte Chromatogramme ausgewählt. In den Chromatogrammen von Testosteron und 17-OHP sind jeweils zwei Peaks für die Analyten und ihrer IStds zu sehen. Dies ist durch die Bildung und Trennung von Stereoisomeren zu erklären, die chromatographisch voneinander getrennt werden.

Bei den Extraktionsversuchen mit Methanol (vgl. 3.1.2 a) ergab sich im 66% MeOH Ansatz die höchste Empfindlichkeit und beste Reproduzierbarkeit im Vergleich zum 33% und 50% MeOH Ansatz. In der folgenden Abbildung 11 wird der höhere spezifische Respons durch die LLE mit dem 66% MeOH Ansatz deutlich.

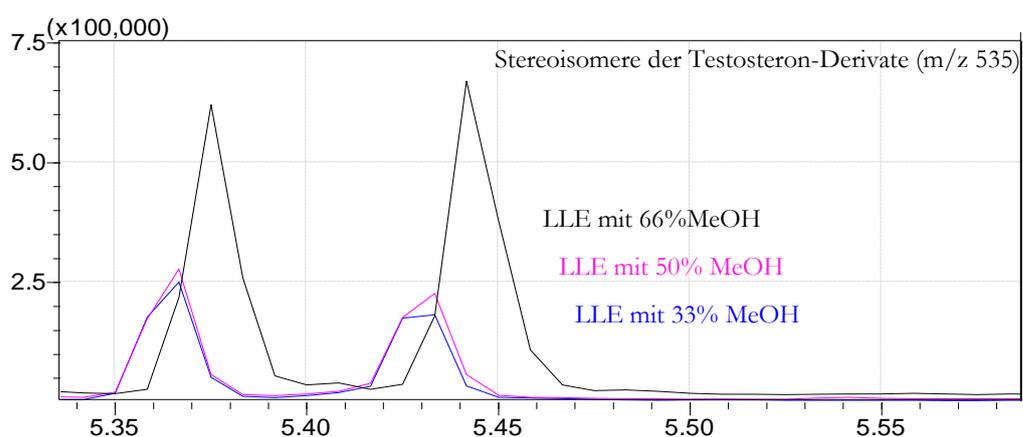
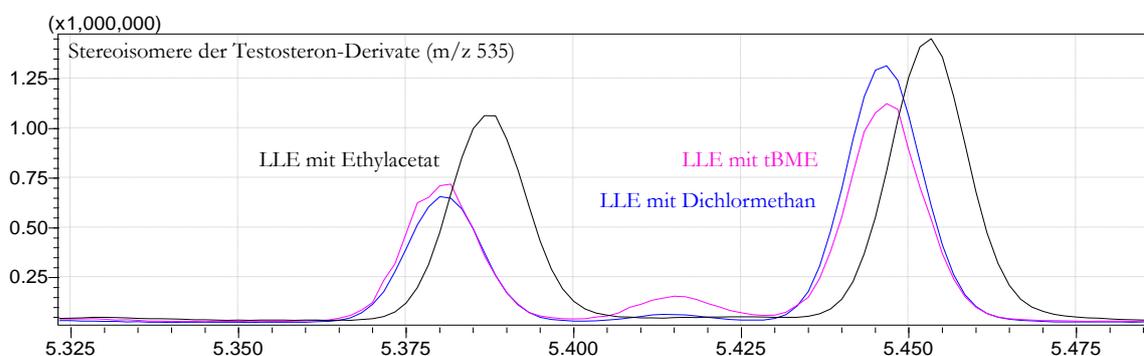


Abbildung 11 Vergleich der Chromatogramme einer Testosteron-Analyse aus derselben Serumprobe nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit verschiedenen methanolischen Ansätzen: 66% (schwarz), 50% (rosa), 33% (blau),  $n > 4$ ; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten; SIM (m/z 535).

Die LLE wurde außerdem mit Dichlormethan, Dichlormethan-Ethylether und tBME untersucht. Diese Extraktionsmethoden waren jedoch schlecht reproduzierbar und zeigten

stark variierende Wiederfindungsraten auf. Außerdem erwies sich die LLE als aufwendiger, so mussten die Phasen mit einer Pipette voneinander getrennt werden und die Eindampfschritte waren zeitintensiver. Folgende Abbildung 12 zeigt beispielhaft Chromatogramme derselben Serumprobe durch eine unterschiedliche LLE mit Ethylacetat (schwarz), Dichlormethan (blau) und tert-Butylmethylether (rosa).



**Abbildung 12** Vergleich der Chromatogramme einer Testosteronanalyse aus derselben Serumprobe nach LLE mit Dichlormethan (blau) und tert-Butylmethylether (rosa) und Ethylacetat (schwarz),  $n > 4$ ; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten; SIM ( $m/z$  535).

Analog zur Ausgangsmethode wurde mit Ethylacetat extrahiert (vgl. 3.1.2.b), wobei sich reproduzierbare Chromatogramme mit sehr guter Anzeigempfindlichkeit ergaben. Da die Extraktion mit 66% MeOH und Ethylacetat die reproduzierbarsten Ergebnisse mit sehr guter Wiederfindung ergaben, verglichen wir diese beiden Extraktionen miteinander. Im Vergleich der 66% Methanol-Lösung zu Ethylacetat ließen sich die Analyten Testosteron und 17-OHP mit Ethylacetat mit einem höheren spezifischen Respons extrahieren. Als exemplarisches Beispiel sind in Tabelle 3 die Peakflächen dargestellt, die sich durch Extraktion mit Ethylacetat und durch 66% Methanol-Lösung an derselben Probe ergeben haben. Dabei zeigt sich die bessere Anzeigempfindlichkeit durch Extraktion mit Ethylacetat.

**Tabelle 3** Vergleich der Anzeigempfindlichkeit (Peakfläche) der Derivate nach Extraktion mit Ethylacetat im Vergleich zu 66 % Methanol (MeOH)

Lösungsmittel	D3-Testosteron	Testosteron	D8-17-OHP	17-OHP
MeOH 66%	313 000	102 000	3700	700
Ethylacetat	413 000	148 000	10 200	2900

Das folgende Chromatogramm (Abbildung 13) verdeutlicht außerdem die bessere Anzeigempfindlichkeit durch die Extraktion mit Ethylacetat im Vergleich zur Extraktion mit 66% methanolischer Lösung. Damit zeigten sich die besten Resultate bezüglich der Extraktionsausbeute, Peaksymmetrie, Störsignale und Reproduzierbarkeit für die LLE mit 3 ml Ethylacetat.

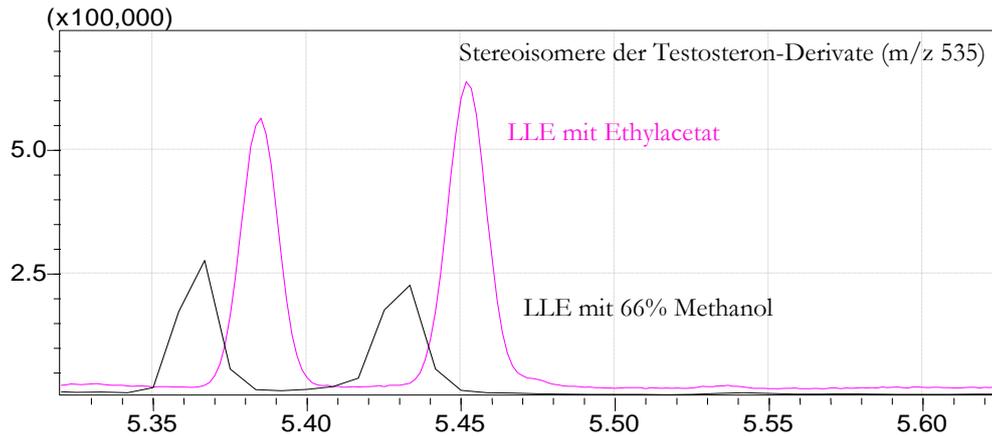


Abbildung 13 Vergleich der Chromatogramme einer Testosteronanalyse aus derselben Serumprobe nach Extraktion mit Ethylacetat (rosa) und 66 % Methanol (schwarz),  $n > 4$ ; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten; SIM ( $m/z$  535).

Durch mehrmaliges Ausschütteln konnte keine signifikante Verbesserung ( $< 10\%$ ) erzielt werden. Das Ausschütteln von 3 ml Ethylacetat, mit dem Überkopfschüttler über 10 min, erwies sich im Vergleich zum Vortex-Mixer als sehr praktikabel, da so mehrere Proben gleichzeitig ausgeschüttelt werden konnten. Nach dem Zentrifugieren ließ sich der gewonnene Überstand sehr leicht in ein weiteres Probengefäß dekantieren und im Vakuum-Evaporator zügig bei  $47^\circ\text{C}$  verdampfen.

### 3.2.1.3 Festphasenextraktion

Ohne vorgeschaltetes Clean-up mittels Festphasenextraktion waren keine Chromatogramme und Massenspektren zu erzielen, die eine Auswertung ermöglichen. Die Verwendung von Reversed Phase C18 Säulen erwiesen sich für die Anreicherung von Steroidhormonen als sehr geeignet. Die besten Resultate in Bezug auf Blindwerte haben sich mit den RP C18 Säulen mit 30 mg Polymermaterial gezeigt, so dass diese statt 50 mg benutzt wurden. Folgende Abbildung 14 zeigt beispielhaft Chromatogramme, die sich aus der Analyse aus Leermatrix im Zuge der Mikromethode im Massenbereich von Testosteron ergeben haben.

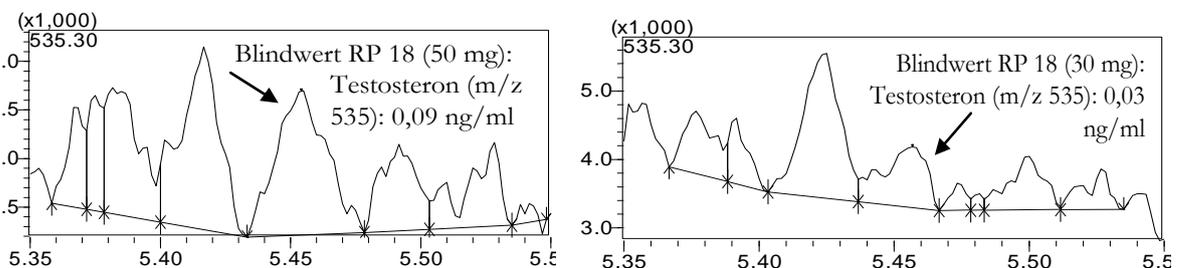


Abbildung 14 Chromatogramme nach Analyse einer Leermatrix zur Erfassung der Blindwerte der RP C18 Säulen,  $n > 4$ ; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten; SIM ( $m/z$  535.3). Blindwert von  $0,09$  ng/ml bei C18 Säulen mit 50 mg Polymermaterial (links) im Vergleich zum Blindwert von  $0,03$  ng/ml bei C18 Säulen mit 30 mg Polymermaterial (rechts).

Für die Aufreinigung ergab sich eine 50 % MeOH Lösung als ideale Waschlösung, mit der möglichst viele störende Interferenzen, aber möglichst wenig Analyt, herausgewaschen wurde. Das Eluat wurde durch Zugabe von 1 ml 100% MeOH Glasvials unter einem Druck von ca. 50 mbar mit einer Tropfgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgefangen.

### 3.2.2 Optimierte Derivatisierung für Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

Die Derivatisierung mit Florox-Lösung und anschließender Silylierung mit MSTFA erwies sich als sehr geeignet. Dabei hat sich ergeben, dass die Derivatisierung am besten stufenweise erfolgt, und die Derivatisierung mit Florox-Lösung der Derivatisierung mit MSTFA:TMCS vorgeschaltet sein sollte.

Es zeigte sich, dass die Silylierungsreagenzien sehr hydrolyseempfindlich sind. Um sicher zu gehen, dass aus der Festphasenextraktion keine Wasserrückstände vorhanden sind, wurde das Eluat aus der Festphasenextraktion zunächst bei 35°C verdampft. Anschließend wurde das Eluat mit 100  $\mu$ l Florox-Lösung unter kurzem vortexen gemischt.

Die Derivatisierung mit PFH-HCl durch Inkubation bei Raumtemperatur (60 min) war nicht ausreichend, aber eine Inkubation über 60 min bei 70°C oder über 30 min bei 80°C ergaben gute Resultate. Um die Messzeit zu minimieren, wurde bei 80°C über 30 min inkubiert. Für die anschließende Derivatisierung mit MSTFA:TMCS wurde die Probe bei 47°C im Vakuum-Evaporator eingedampft.

Für die Silylierung erwies sich ein 99:1 Gemisch aus MSTFA:TMCS (50  $\mu$ l von: 990 $\mu$ l MSTFA + 10 $\mu$ l TMCS) besonders geeignet, da die Hormone quantitativ reproduzierbar und am verlässlichsten umgesetzt werden konnten. TMCS als alleiniges Silylierungsmittel zeigte sich als schwaches Reagenz, aber als Zusatz ließen sich verbesserte Anzeigeempfindlichkeiten erzielen. Auch hier waren die Ergebnisse bei einer Inkubationstemperatur von 70°C für 20 min und 80°C für 10 min gleich, so dass wieder die kürzere Inkubationsdauer gewählt wurde.

Um möglichst kostengünstig arbeiten zu können, und das Volumen des benötigten Derivatisierungsreagenz zu minimieren, wurde die vorher eingedampfte Probe mit 50  $\mu$ l des MSTFA-TMCS-Gemisches (99:1) unter zusätzlicher Zugabe von 50  $\mu$ l Heptan als Lösungsmittel aufgenommen, und über 10 min bei 80°C inkubiert. Nach dem Abkühlen konnte die Probe direkt in die GC/MS injiziert werden.

Es konnten nach dieser Methode nicht nur Testosteron und 17-OHP derivatisiert werden, sondern auch die Steroidhormone Androstendion, Aldosteron und Cortisol (s. Anhang, S.105).

Die folgenden Abbildungen zeigen die gebildeten Derivate von Testosteron (Abbildung 15) und 17-OHP (Abbildung 16) nach beschriebener Derivatisierungsprozedur.

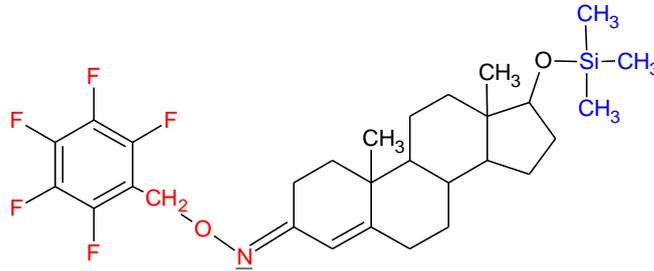


Abbildung 15 Ein Stereoisomer des durch die Derivatisierung mit Florox und MSTFA/TMCS gebildeten Derivats von Testosteron.

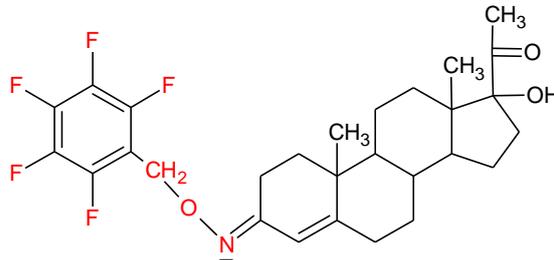


Abbildung 16 Ein Stereoisomer des durch die Derivatisierung mit Florox und MSTFA gebildeten Derivats von 17-OHP.

### 3.2.3 Mikromethode

Die Mikromethode wurde für die Testosteronanalyse aus 100  $\mu$ l Serum getestet. Um die beiden Methoden miteinander zu vergleichen, wurden acht unterschiedliche Serumproben getrennt aufgearbeitet, und sowohl mit der Ausgangs- als auch mit der Mikromethode analysiert. Die folgende Abbildung 17 zeigt den Vergleich der Chromatogramme, die nach Analyse derselben Probe durch die Makro- und Mikromethode gewonnen wurden. Für die Mikromethode ist eine geringere Anzeigeempfindlichkeit zu verzeichnen.

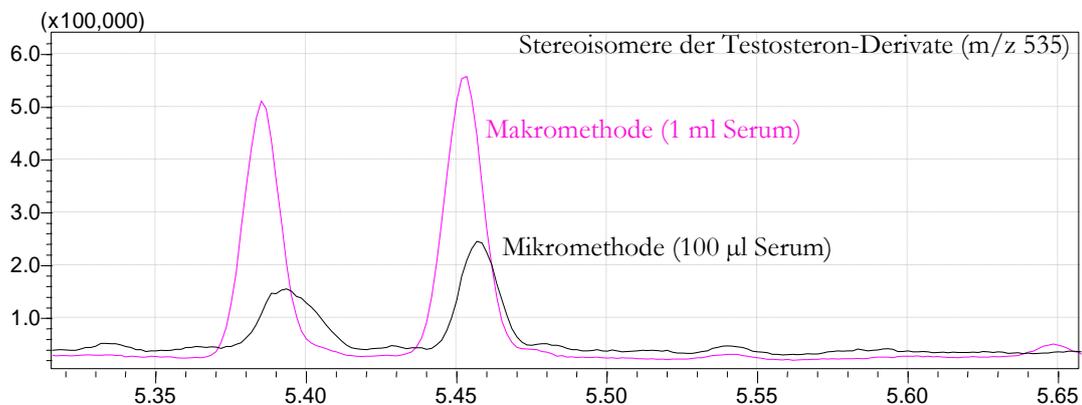
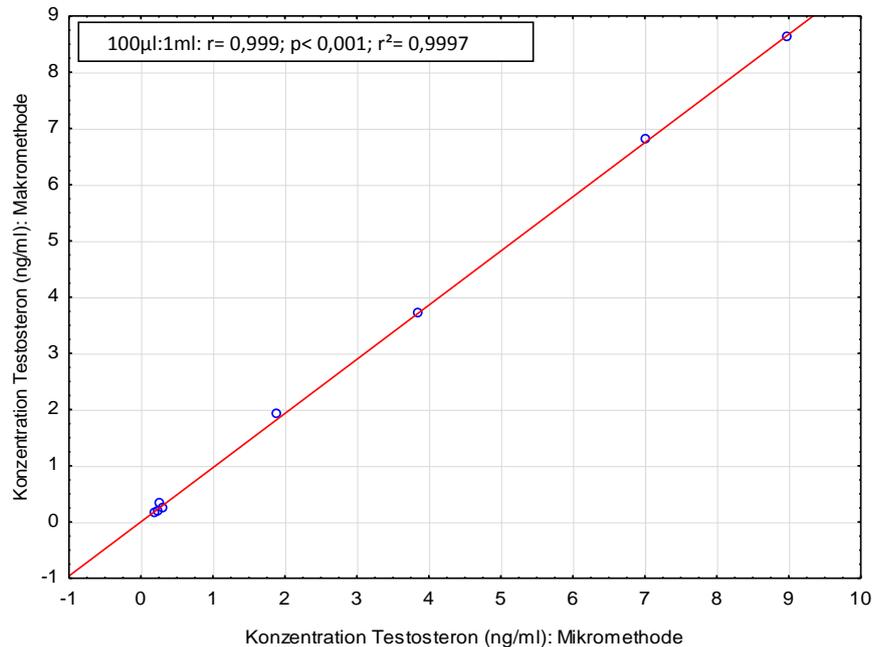


Abbildung 17 Beispielhafter Vergleich zweier Chromatogramme der Testosteronanalyse aus derselben Serumprobe durch die Mikromethode (schwarz) und der Makromethode (rosa); y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten; SIM (m/z 535).

Abbildung 18 zeigt den graphischen Vergleich der erzielten Analysenergebnisse, die in Tabelle 4 mit den absoluten Abweichungen (ng/ml) aufgelistet sind.



**Abbildung 18** Vergleich der ermittelten Testosteronkonzentrationen (ng/ml) acht unterschiedlicher Serumproben, die jeweils nach der Makro- (1 ml Serum) und der Mikromethode (100µl Serum) aufgearbeitet wurden.  $y = 0,004 + 0,9634x$ ,  $n = 8$ .

Aus der Abbildung 18 wird mit dem Korrelationskoeffizienten von 0,999 die sehr gute Übereinstimmung beider Methoden in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,15 ng/ml bis zu 8,62 ng/ml deutlich. Die absoluten Abweichungen der Messergebnisse betragen im Konzentrationsbereich  $< 1$  ng/ml maximal 0,06 ng/ml und im Konzentrationsbereich  $> 1$  ng/ml maximal 0,36 ng/ml.

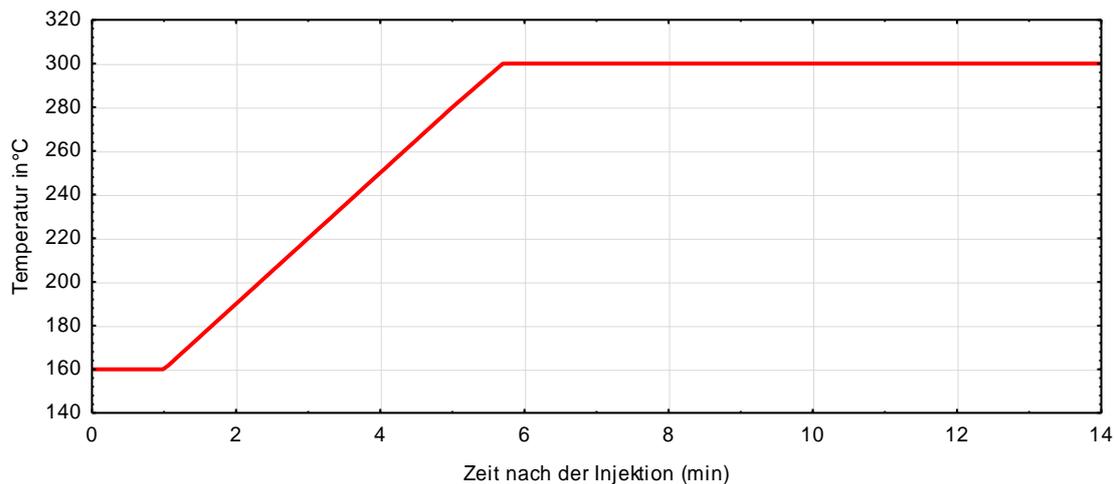
**Tabelle 4** Vergleich der Analysenergebnisse der Testosteronkonzentrationen (ng/ml) zwischen der Makro- und der Mikromethode und ihre absolute Abweichung (ng/ml) voneinander.

Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Makromethode	1,92	0,33	8,62	6,79	0,15	0,25	0,20	3,71
Mikromethode	1,90	0,27	8,98	7,01	0,20	0,31	0,24	3,86
Abweichung	0,02	0,06	0,36	0,22	0,05	0,06	0,04	0,15

### 3.2.4 Optimierte Messbedingungen

In den 300 °C heißen Injektor wurde 1µl der Probe splitlos eingespritzt, so dass die Probe vollständig verdampft und ihre Komponenten gasförmig vorliegen. Die Ausgangstemperatur im Säulenofen betrug 160°C und lag damit unter dem Siedepunkt der Derivate, so dass die Probe wieder kondensierte und am Säulenbeginn refokussiert wurde. Diese Ausgangstemperatur wurde für eine Minute gehalten und dann um 30°C/min bis auf 300°C gesteigert. Durch die Abbildung 19 wird das für die Analyse verwendete

Temperaturprogramm im Säulenofen veranschaulicht. Erst bei Erhöhung der Säulentemperatur beginnen die Probenkomponenten -je nach ihren Siedepunkten- auf der Säule zu wandern und erscheinen als schmale Peaks in den Chromatogrammen. Die Laufzeit des Temperaturprogramms betrug insgesamt 14 min. Im Massenspektrometer wurde eine Scan-Rate von 2,5 scans/s eingestellt, um die erforderlichen Datenpunkte für eine symmetrische Darstellung der Signale zu erhalten.



**Abbildung 19** Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse im Säulenofen mit einer Ausgangstemperatur von 160°C, einer Steigerung um 30°C/min bis auf 300°C und einer Laufzeit von insgesamt 14 Minuten.

Die Versuche zur Empfindlichkeitssteigerung der Analysen wurden für Testosteron durchgeführt. Durch die Aufkonzentrierung der Proben, das geringere Probenendvolumen und durch eine Steigerung des Injektionsvolumens, konnte eine Steigerung der Empfindlichkeit erzielt werden, jedoch nahm auch das Untergrundrauschen zu.

### 3.2.5 Auswahl der Fragmentationen für die SIM-Analyse

Die Fragmentationen wurden anhand der Massenspektren der Derivate ausgewählt, die im Scan-Modus gewonnen wurden (vgl. 3.2.5, S.46). Im Folgenden sind die Massenspektren der Derivate sowie ihr mögliches Fragmentierungsmuster schematisch aufgeführt.

#### 3.2.5.1 Massenspektrum von Testosteron

Für den Analyten Testosteron wurde zur Quantifizierung das Fragmentation mit der Massenzahl 535 ausgewählt, welches sich im Massenspektrum als das Fragmentation höchster Intensität und höchster Massenzahl darstellt (Abbildung 20). Analog dazu wurde für den IStd D3-Testosteron das Quantifizierung mit der Massenzahl 538 ausgewählt. Diese Fragmentationen können durch Abspaltung von Fluorwasserstoff: HF [-20] entstanden sein. Zur qualitativen Absicherung wurde für Testosteron das Referenzion mit der Massenzahl 505, und für D3-

Testosteron das Referenzion mit der Massenzahl 508 ausgewählt, die durch Abspaltung einer Ethylgruppe:  $C_2H_6$  [-30] entstanden sein können.

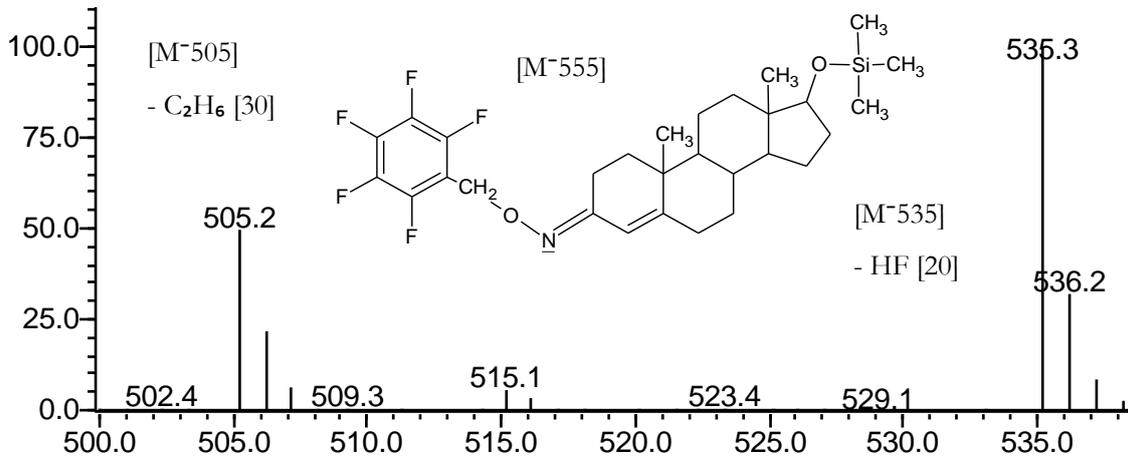


Abbildung 20 Massenspektrum und Strukturformel des gebildeten Derivats von Testosteron mit der Massenzahl 555. Das Fragmentation mit der Massenzahl 535 hat die höchste relative Intensität und die höchste Massenzahl und wurde als Quantifizierung ausgewählt. Das ausgewählte Referenzion hat die Massenzahl 505; y-Achse: Relative Signalintensität, x-Achse: Massenzahlen.

### 3.2.5.2 Massenspektrum von Fragmentationen von $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

Das Derivat von 17-OHP hat die Massenzahl 525 (Abbildung 21) und wird in die drei charakteristischen Fragmente mit den Massenzahlen 461, 331 und 300 gespalten. Das Fragmentation mit der Massenzahl 461 hat die höchste Massenzahl und wird zur Quantifizierung ausgewählt. Es kann durch Abspaltung von  $CH_3$  [-15],  $CO$  [-28] sowie  $H$  [-1] entstehen. Das gebildete Fragment mit der Massenzahl 300 hat die höchste Intensität und wird als Referenzion ausgewählt. Dieses kann durch Abspaltung des Pentafluorbenzyl-Gerüsts [-181], sowie  $CH_3$  [-15],  $CO$  [-28] und  $H$  [-1] entstanden sein.

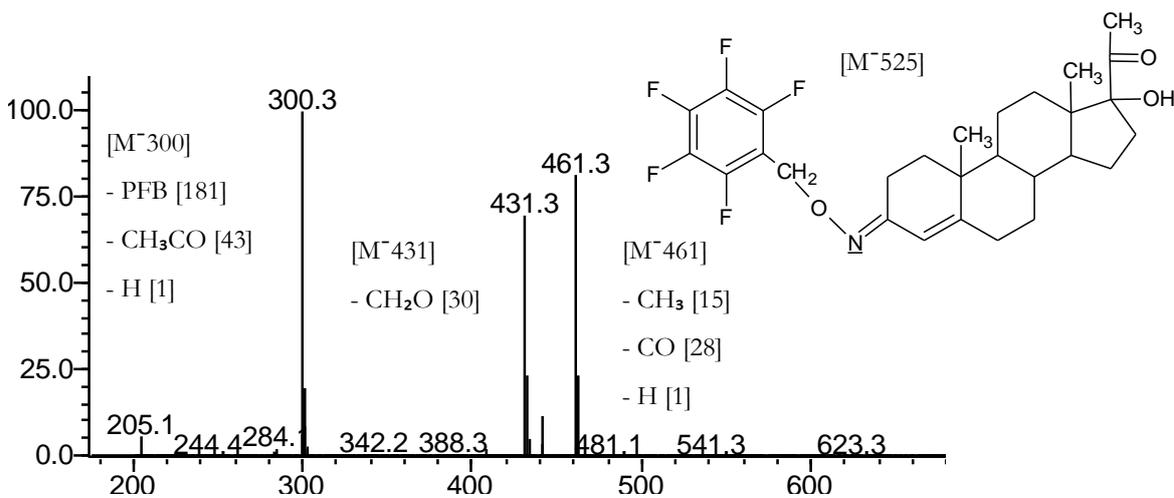


Abbildung 21 Massenspektrum und Strukturformel des gebildeten Derivats von  $17\alpha$ -OHP mit der Massenzahl 525. Während der Fragmentierung entsteht das Fragmentation mit der Massenzahl 461, das zur Quantifizierung ausgewählt wurde, das Fragmentation mit der Massenzahl 300, das als Referenzion fungiert, und ein weiteres Fragmentation mit der Massenzahl 431; y-Achse: Relative Signalintensität, x-Achse: Massenzahlen.

Die Massenspektren von Androstendion, Aldosteron und Cortisol können dem Anhang entnommen werden.

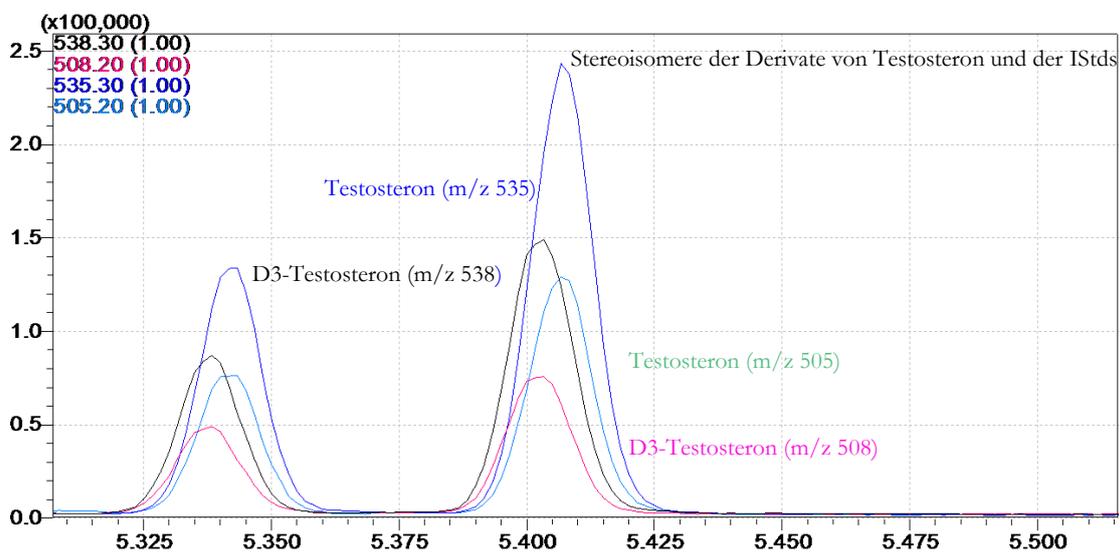
### 3.2.6 Chromatographische Analyse im SIM-Modus

Nachdem charakteristische Quantifizier- und Referenzionen ausgesucht wurden, konnten verdünnte Stammlösungen im SIM-Modus analysiert werden. Da die Empfindlichkeit der Methode ausreichte, wurden anschließend Serumproben aufgearbeitet und im SIM-Modus analysiert. In der Tabelle 5 sind die jeweiligen Retentionszeiten und die registrierten Massen der untersuchten Analyten im Überblick dargestellt.

**Tabelle 5 Retentionszeiten und registrierte Massen (m/z) der Derivate unter den beschriebenen Analysebedingungen**

Analyt	Retentionszeit (min)	Registrierte Massen (m/z)
Testosteron	5,34/5,40	535.5 /505.2
D3-Testosteron	5,34/5,40	538.3/508.2
17-OHP	5,32/5,38	461.4/300.4
D8-17-OHP	5,37/5,31	466.4/305.4

Folgende Abbildungen zeigen exemplarische Chromatogramme der Analyten Testosteron (Abbildung 22) und 17-OHP (Abbildung 23) sowie ihrer IStds, die aus Serumanalysen gewonnen wurden:



**Abbildung 22** Das aus einer Serumanalyse gewonnene Chromatogramm des Testosteron-Derivats (Quantifizierung m/z 535.3, Referenzion m/z 505.2) und des internen Standard D3-Testosteron (Quantifizierung m/z 538.3, Referenzionen m/z 508.2); y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten.

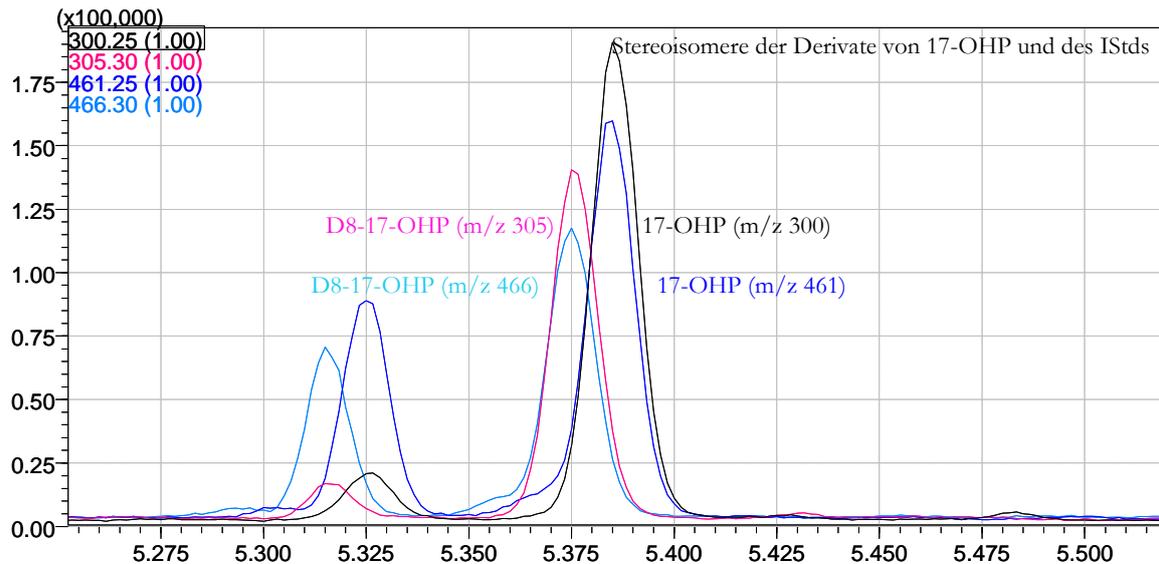


Abbildung 23 Das aus einer Serumanalyse gewonnene Chromatogramm des 17-OHP-Derivats (Quantifizierung m/z 461.25, Referenzion 300.25) sowie des internen Standard D8-17-OHP (Quantifizierung m/z 466.30, Referenzion 305.30); y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionzeit in Minuten.

Auch Androstendion, Aldosteron und Cortison konnten im Serum nachgewiesen werden (s. Anhang).

### 3.3 Optimierte Methode zur Bestimmung der Steroidhormone mit der GC-NCI-MS im Serum

#### 3.3.1 Prinzip

Die Hormone werden mit einem Teil der Lipide zunächst durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Der gewonnene Überstand wird durch Festphasen-Extraktion von den mitextrahierten Lipiden gereinigt, da diese die Trennung bei der Gaschromatographie und die Ionisation bei der MS negativ beeinflussen. Um die chromatographischen Eigenschaften zu verbessern und eine empfindliche und selektive Detektion mit der NCI-MS zu ermöglichen, werden durch die anschließende Derivatisierung die Hormone zu thermisch stabilen, unpolaren und leicht flüchtigen sowie halogenhaltigen Derivaten umgesetzt.

#### 3.3.2 Probenvorbereitung

##### 3.3.2.1 Zugabe des internen Standards

Es werden 50 µl IStd mit einer Direktverdrängerpipette und 1 ml Serum in ein Reagenz- und Zentrifugenröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird mit einem Eindrückstopfen verschlossen und 30 Sekunden mit einem Vortex-Mixer gemischt.

### 3.3.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zu der Probe werden 3 ml Ethylacetat mit einer Direktverdrängerpipette hinzugegeben. Die Probe wird 10 min mit dem Überkopfschüttler geschüttelt und anschließend 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Der gewonnene proteinfreie Überstand wird in ein Einmal-Kulturröhrchen dekantiert und im Heizblock über einem Vakuum-Evaporator verdampft. Der zurückbleibende Lipidtropfen wird mit 1 ml 50% MeOH aufgenommen.

### 3.3.2.3 Clean-up mittels Festphasenextraktion

Die SPE-Säulen werden auf der Festphasenextraktionsstation positioniert und unter Anlage eines leichten Vakuums folgendermaßen behandelt:

1. Konditionieren: Nacheinander werden je 1 ml MeOH, 5% MeOH und 50 % MeOH aufgegeben.
2. Laden: Aufgabe der Probenlösung auf die zuvor konditionierten Kartuschen
3. Waschen: Mit 1 ml 50% MeOH waschen
4. Elution: Unter Aufgabe von 1 ml 100% MeOH auf die Säule wird die Probe eluiert und in einem Glasvial aufgefangen. Zur Elution in die Glasvials wird wieder ein leichtes Vakuum angelegt (ca. 50 mbar, Tropfgeschwindigkeit ca. 0,5 ml /min). In dem Glasvial befinden sich jetzt in ca. 1 ml in MeOH gelöste, aufgereinigte und aufkonzentrierte Lipide aus der Serumprobe.

### 3.3.3 Derivatisierung für Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron

Das Eluat wird am Heizblock bei 35°C im Vakuum-Evaporator eingedampft.

Der Rückstand wird mit 100  $\mu$ l Florox-Lösung aufgenommen, das Glasvial wird sofort mit einer Schraubkappe verschlossen und 30 min bei 80°C inkubiert. Die Probe wird erneut am Heizblock im Vakuum-Evaporator bei 35°C eingedampft und der Rückstand wird mit 50  $\mu$ l Heptan und 50  $\mu$ l MSTFA/TMCS (99:1) aufgenommen, mit einer Schraubkappe verschlossen und 10 min bei 80°C inkubiert.

### 3.3.4 Gaschromatographische Trennung und Massenspektrometrie

#### 3.3.4.1 Analysebedingungen

Die Analysen wurden mit folgenden Parametern der GC-NCI-MS durchgeführt.

Injektor	Injektionsvolumen: 1 $\mu$ l Injektionsmodus: splitlos Injektortemperatur: 300°C
Kapillarsäule	Quarzkapillarsäule, Rtx-5 Sil MS (Restek) Länge: 15m Innendurchmesser: 0,25 $\mu$ m Filmdicke: 0,1 $\mu$ m
Trägergas	Helium, Fluss 2,21 ml /min (konstante Trägergasgeschwindigkeit (80,2 cm/s)
Reaktionsgas	Methan (3 bar)
Ofen-Temperaturprogramm	
Ausgangstemperatur	160°C für 1 min
Heizrate	30°C/ min auf 300°C
Laufzeit	15 min
Ionenquellentemperatur	200°C
Transferleitung	300°C
Ionisationsart	Negative Chemische Ionisation (NCI)
Ionisationsenergie	70 eV
Messrate	2,5 scans/s
Massenbereich	SIM: Für jeden Analyt charakteristische m/z Scan-Modus: 100-900 m/z (TIC)

Die Identifizierung der charakteristischen Molekül- und Fragmentionen der Substanzen erfolgt anhand ihrer Retentionszeiten und Massenzahlen (vgl. 1.2.3.5, S.21). Folgende Tabelle 6 zeigt die registrierten Massenzahlen der Analyte und ihrer dazugehörigen Retentionszeiten.

**Tabelle 6** Registrierte Retentionszeiten (min) und Massenzahlen (m/z) der Analyten

Analyt	Retentionszeit (min)	Quantifizierung (m/z)	Referenzion (m/z)
Testosteron	5,335/ 5,405	535.5	505.2
D3-Testosteron	5,340/ 5,410	538.3	508.2
17-OHP	5,325/ 5,385	461.4	300.3
D8-17-OHP	5,315/ 5,365	466.4	305.3

### 3.3.4.2 Quantifizierung

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte anhand der Shimadzu GCsolution Software Version 2.3 (Shimadzu Corporation). Dabei wurden die Integrationsparameter für jeden Peak einzeln festgelegt, so dass die Software automatisch die Integration der Peakflächen übernommen hat. Der Analytgehalt wurde über die Kalibrierfunktion automatisch ausgerechnet.

### 3.3.4.3 Schematischer Überblick über die GC-NCI-MS Methode

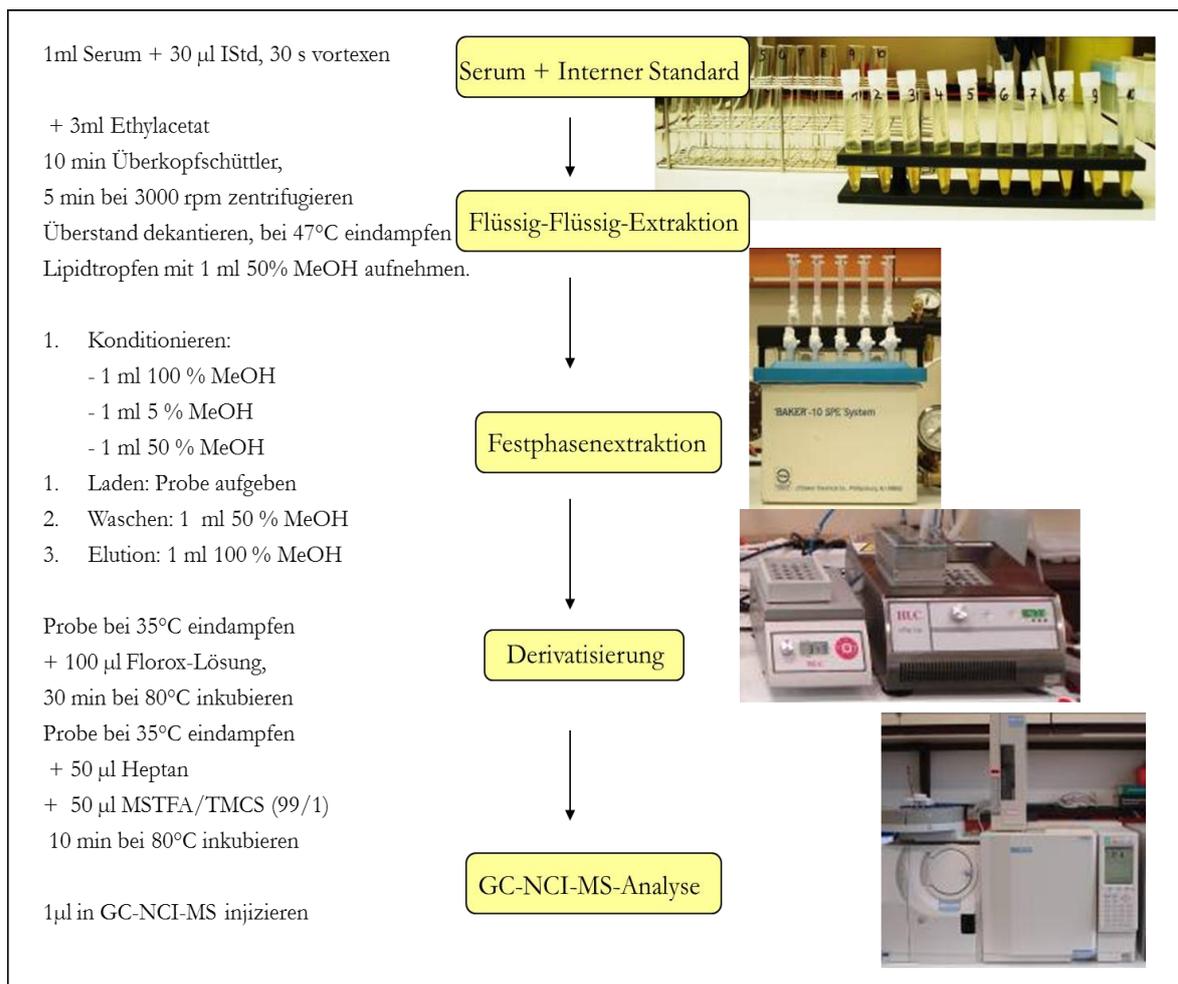


Abbildung 24 Schematischer Überblick über die GC-NCI-MS Methode zur Testosteron und 17-OHP im Serum.

## 3.4 Methodvalidierung

### 3.4.1 Grundlagen der Methodvalidierung

Die beschriebenen Methoden wurden einer Validierung unterzogen, um sie zu charakterisieren und zu überprüfen, ob sie den Anforderungen genügen. Es soll der Anwendungsbereich festgelegt werden und gezeigt werden, ob die Analyten in einer biologischen Matrix, wie

Serum oder Plasma, reproduzierbar und verlässlich quantifiziert werden können. So kann die Qualität der Analyseergebnisse überprüft und sichergestellt werden (Kromidas 1999).

In Anlehnung an die Validierungsrichtlinien „Validation of Analytical Procedures“ der „International Conference of Harmonization, ICH“ wurden die Kriterien Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Richtigkeit, Selektivität, Präzision und Stabilität bestimmt (ICH 2007).

### 3.4.2 Linearität

Unter Linearität versteht man die Fähigkeit einer Methode innerhalb eines gewählten Arbeitsbereichs Messergebnisse zu erzielen, die zur Konzentration des Analyten in der Probe direkt proportional sind (Kromidas 1999). Die Linearität soll über den gesamten Arbeitsbereich ermittelt werden. Die Angaben in der Literatur über die erforderlichen Messpunkte variieren stark, ein Minimum von fünf Konzentrationen wird dabei empfohlen (ICH 2007).

Die Kalibrierung wurde nach dem Additionsverfahren mit der Methode des internen Standards durchgeführt. Zur Herstellung der Kalibrierproben wurde eine bestimmte Menge der entsprechenden Kalibrierlösung zu Aliquoten an Poolserum hinzugegeben (vgl. 2.2.2.1, S.27). Die Kalibrierproben, die den gewählten Arbeitsbereich mit einer sieben- bis zehn-Punkt Kalibration abdecken, wurden wie gewohnt aufgearbeitet und an der GC/MS vermessen.

Zur Überprüfung der Linearität wurden die Kalibrierfunktionen herangezogen, anhand derer ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem gemessenen Signal (Peakfläche) und der Konzentration des Analyten in der Kalibrierprobe hergestellt werden kann (Kromidas 1999).

Indem man die Peakflächenverhältnisse von IStd zu Analyt gegen die Konzentration der Kalibrierprobe aufträgt, erhält man die Kalibrierfunktion (Kromidas 1999):

$$y = ax + b$$

y= Peakflächenverhältnis Analyt zu interner Standard

x= Konzentration der Kalibrierprobe

b= y-Achsenabschnitt

a= Steigung

Mittels der Kalibrierfunktion können die Linearität einer Methode und ihre analytischen Grenzen ermittelt werden (Kromidas 1999).

Nach zunächst optischer Beurteilung und anschließender linearer Regressionsanalyse mit Angabe der Regressionsfunktion und des Korrelationskoeffizienten kann überprüft werden,

ob ein linearer Zusammenhang zwischen den Peakflächen und der Konzentration besteht (Kromidas 1999). Den Kalibrierproben für Testosteron und 17-OHP wurde jeweils 5 ng/ml IStd zugesetzt. Folgende Tabelle 7 zeigt den gewählten Arbeitsbereich zur Bestimmung der Linearität der Analyten.

**Tabelle 7 Analytkonzentration in den Kalibrierproben zur Überprüfung der Linearität**

Analyt	Konzentration (ng/ml)							
Testosteron	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0
17-OHP	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	

### 3.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die ICH fordert für quantitative Analysen neben der Nachweisgrenze (NWG), der kleinsten qualitativ nachweisbaren Analytkonzentration, auch die Bestimmungsgrenze (BG), d.h. die kleinste Analytkonzentration, die mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit quantitativ erfasst werden kann (Kromidas 1999). Die Nachweisgrenze und die BG wurden aus der Messwertstreuung der Kalibriergeraden nach der DIN 32645 berechnet. Aus der Nachweisgrenze kann zusätzlich die Erfassungsgrenze errechnet werden. Das ist die geringste Konzentration des Analyten, die mit einer bestimmten statistischen Wahrscheinlichkeit detektiert werden kann (MVA 2001).

### 3.4.4 Richtigkeit aus Wiederfindungsexperimenten

Richtigkeit beschreibt die systematische Abweichung eines ermittelten Wertes von dem als richtig angesehenen Wert (Kromidas 1999). Bei Analysen aus komplexen biologischen Matrices bietet sich die Überprüfung der Richtigkeit aus Wiederfindungsexperimenten an. Durch die Wiederfindungsrate, dem Verhältnis zwischen dem gefundenen Messwert zur richtigen Analytkonzentration in der Probe, kann die gesamte Methode bewertet werden, und damit mögliche Auswirkungen der Probenaufarbeitung sowie Einflüsse der Matrix erkannt werden. (Kromidas 1999).

Zur Ermittlung der Wiederfindungsfunktion wurde ein homogenes Poolserum in Aliquoten aufgeteilt und mit einer konstanten Menge an IStd und einer aufsteigenden Menge an Analyt versetzt. Dieses Aufstockverfahren entspricht der Herstellung der Kalibrierproben. Da die Richtigkeit konzentrationsabhängig ist, wurden analog zu den Kalibrierproben, mehrere Proben aufsteigender Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden wie gewohnt aufgearbeitet und unter Doppelbestimmung mit der GC-NCI-MS analysiert.

Die gefundenen Konzentrationen (Ist-Werte) wurden gegen die aufgestockten Konzentrationen (Soll-Werte) aufgetragen. Die Wiederfindungsfunktion ergibt sich aus der Steigung und dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden, wobei die Steigung die Wiederfindungsrate darstellt (Kromidas 1999).

### 3.4.5 Präzision

Die Präzision beschreibt die Streuung von Messwerten um einen Mittelwert aufgrund zufälliger Fehler (Kromidas 1999). Dabei erhält man durch wiederholte Analyse einer homogenen Probe voneinander unabhängige Messergebnisse. Als Maß der Präzision kann dann der Variationskoeffizient aus dem Mittelwert und der Standardabweichung der erzielten Ergebnisse nach folgender Gleichung berechnet werden (Kromidas 1999):

$$VK = \frac{s}{x} \times 100$$

Da die Präzision von der Analytkonzentration abhängig ist, wurden mehrere Konzentrationsbereiche innerhalb des Arbeitsbereichs untersucht.

#### 3.4.5.1 Wiederholpräzision

Wiederholpräzision ist die Streuung von Messwerten die unter Wiederholbedingungen auftritt (Kromidas 1999): Dasselbe Probenmaterial wird durch denselben Untersucher mit demselben Verfahren im gleichen Labor mehrfach aufgearbeitet und analysiert.

Es wird die Intraassay-Präzision von der Interassay-Präzision unterschieden. Für die Intraassay-Präzision wurden neun Bestimmungen über den gesamten Arbeitsbereich durchgeführt: Drei Proben unterschiedlicher Konzentrationen wurden je dreimal aufgearbeitet und innerhalb einer Analysenserie gemessen. Dadurch kann die Streuung von Messwerten untersucht werden, die während der Probenaufarbeitung entstehen.

Die Interassay-Präzision ist die Streuung von Messwerten, die durch Aufarbeitung und Messung der Proben von Tag zu Tag entsteht. Zur Bestimmung der Interassay-Präzision wurden die Ergebnisse der Kontrollproben herangezogen. Dabei wurde an zehn verschiedenen Tagen ein Aliquot der Kontrollprobe zu der Probenserie mitanalysiert (vgl. 2.2.2.2, S.27).

#### 3.4.5.2 Messpräzision

Die Messpräzision gilt als Maß für Schwankung der Analysenergebnisse, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden (Kromidas 1999). Zur Untersuchung der

Messpräzision wurden jeweils zwei verschiedene Validierungsproben unterschiedlicher Konzentration mehrfach hintereinander gemessen.

### 3.4.6 Festlegung des Arbeitsbereichs

Nach der ICH beschreibt der Arbeitsbereich das Intervall zwischen der niedrigsten und der höchsten Analytkonzentration, für das ein akzeptables Maß an Linearität, Präzision und Richtigkeit experimentell überprüft wurde (ICH 2007). Der Arbeitsbereich, der aus der Linearität der Kalibriergeraden ermittelt werden kann, sollte so gewählt werden, dass er dem klinisch relevanten Bereich entspricht. Auch sollten mögliche pathologische Abweichungen im oberen, wie auch unteren Bereich miterfasst werden können.

### 3.4.7 Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz eindeutig zu identifizieren und von anderen Komponenten abzutrennen (Kromidas 1999). In der GC/MS wird die Selektivität durch spezifische Retentionszeiten und charakteristische Massenzahlen der Fragmentationen gewährleistet. Wichtig ist die Abwesenheit von Störsignalen zu den Retentionszeiten, zu denen die Analyten und der IStd eluieren. Dies kann durch die Analyse von Blindproben belegt werden (Kromidas 1999). Um Interferenzen aus der Probenaufarbeitung oder eventuelle Analyt-Rückstände im System zu detektieren, wurde Leermatrix (Wasser) ohne Analyt aufgearbeitet. Um zu überprüfen, ob sich keine Substanz im Serum wie der IStd verhält, wurde Serum ohne IStd aufgearbeitet und umgekehrt Wasser mit IStd, um zu zeigen, dass der IStd nicht zum Signal des Analyten beiträgt.

Außerdem wurden anhand der Massenspektren neben dem Fragmentation mit der höchsten Intensität Referenzionen herausgesucht, um die Spezifität der Peaks abzusichern.

Des Weiteren sichern konstante sowie übereinstimmende Peakflächenverhältnisse mit den in der Reinsubstanz nachgewiesenen Peakflächenverhältnissen, die Selektivität ab (Kromidas 1999).

### 3.4.8 Stabilität

Unter Stabilität versteht man die Fähigkeit einer Methode über einen längeren Zeitraum reproduzierbare Werte zu generieren (Kromidas 1999). Dafür wurden die Messergebnisse von Validierungsproben verglichen, die über einen Zeitraum von bis zu fünf bzw. 21 Tagen im Kühlschrank bei + 4°C gelagert wurden. Für Testosteron wurde die Stabilität der Proben

außerdem anhand der Kontrollproben untersucht, die im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

### 3.5 Ergebnisse der Methodenvalidierung

#### 3.5.1 Linearität

Die folgenden Abbildungen 25-26 zeigen die Kalibriergeraden für Testosteron und 17-OHP. Der lineare Zusammenhang zwischen den Peakflächenverhältnissen und der ermittelten Konzentrationen wird durch optische Beurteilung und lineare Regressionsanalyse deutlich.

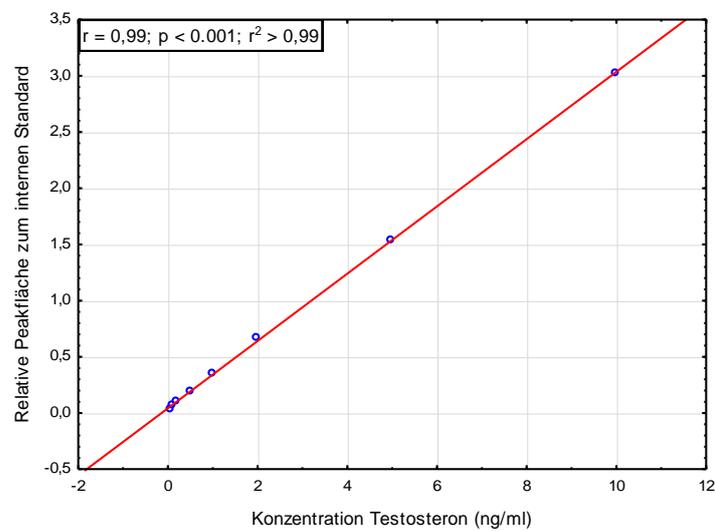


Abbildung 25 Kalibriergerade von Testosteron,  $y=0,0425+0,2994 x$ ,  $n=8$

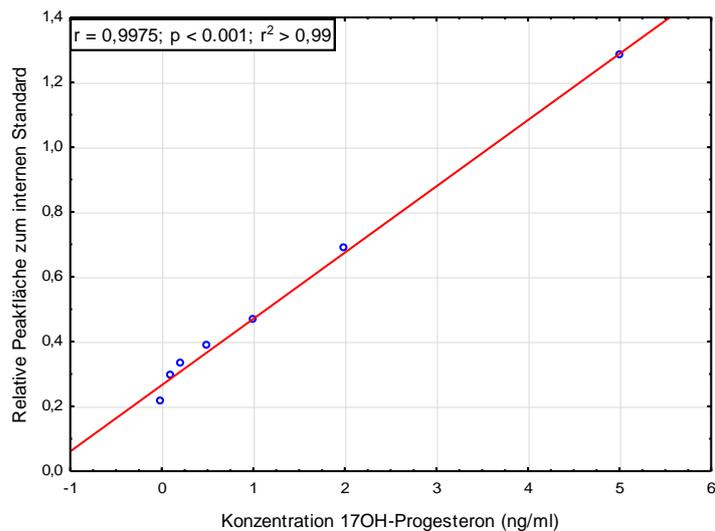


Abbildung 26 Kalibriergerade von 17-OH-Progesteron,  $y = 0,2657+0,205x$ ,  $n=7$

**Tabelle 8 Parameter der Kalibrierfunktion zur Ermittlung der Linearität von Testosteron**

Nr.	c Testosteron (ng/ml)	Fläche IStd	Fläche Analyt	Peakflächenverhältnis
1	0,04	158794	5689	0,0358
2	0,10	186535	12260	0,0657
3	0,20	160216	16033	0,1001
4	0,50	211557	40083	0,1895
5	1,0	203897	72685	0,3565
6	2,0	153472	101434	0,6609
7	5,0	168789	300263	1,5414
8	10,0	180800	547848	3,0301

Die Tabelle 8 zeigt exemplarisch die Parameter der Testosteronanalyse, die zur Ermittlung der Kalibriergeraden und damit des linearen Bereichs verwendet wurden. Die Parameter der Kalibrierfunktion für 17-OHP können dem Anhang entnommen werden.

Aus der Tabelle 9 werden der jeweilige Arbeitsbereich der untersuchten Analyten sowie die ermittelten Kalibrierfunktionen ersichtlich. Die Linearität der Analyse über den jeweiligen Konzentrationsbereich wird durch die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden deutlich, die für die Kalibrierung von Testosteron 0,999 und für OH- Progesteron 0,998 betragen.

**Tabelle 9 Arbeitsbereiche und Konzentrationen der Analyten zur Überprüfung der Linearität**

Analyt	Arbeitsbereich	Korrelationskoeffizient	Kalibrierfunktion
Testosteron	0,1 - 10 ng/ml	0,999	$y = 0,0425 + 0,299x$
17-OHP	0,1 – 5, 0 ng/ml	0,998	$y = 0,2657 + 0,205x$

### 3.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die folgende Tabelle 10 zeigt die ermittelten Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die Analyten Testosteron und 17-OHP.

**Tabelle 10 Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der Analyten nach DIN 32645**

Analyt	Nachweisgrenze	Erfassungsgrenze	Bestimmungsgrenze
Testosteron	0,039 ng/ml	0,078 ng/ml	0,148 ng/ml
17-OHP	0,133 ng/ml	0,267 ng/ml	0,503 ng/ml

Im Bereich der Nachweisgrenze kann sich, aufgrund störender Nebenpeaks oder dem Untergrundrauschen, die Schwierigkeit der korrekten Integration und Identifizierung der

zugehörigen Peaks ergeben. Folgende Abbildungen zeigen Chromatogramme von Testosteron (Abbildung 27) im Bereich der Nachweisgrenzen.

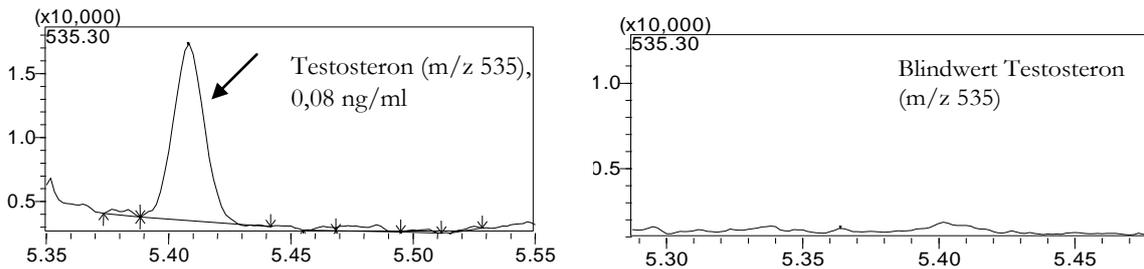


Abbildung 27 Chromatogramme des Testosteronderivats (m/z 535) im Bereich der Erfassungsgrenze (0,08 ng/ml) mit einer Signalthöhe von 17 000 (links) im Vergleich zum Blindwert: Leermatrix (rechts); y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

### 3.5.3 Richtigkeit aus den Wiederfindungsexperimenten

Aus den Wiederfindungsexperimenten hat sich für Testosteron die Wiederfindungsfunktion  $y = 0,051 + 1,008 x$  ergeben (Abbildung 28). Die Steigung gibt die Wiederfindungsrate des Analyten an und beträgt damit für Testosteron 101 %. Die relative Verfahrensstandardabweichung beträgt 1,03% und der Korrelationskoeffizient 1,000.

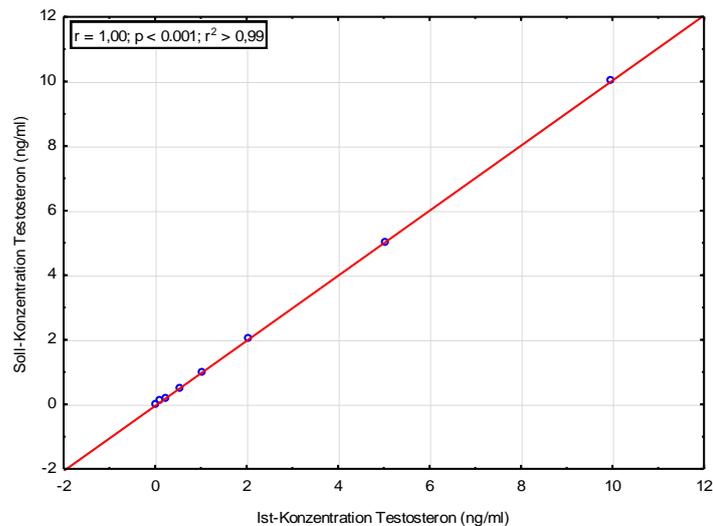


Abbildung 28 Regressionsgerade von Testosteron im Serum nach dem Standard-Additionsverfahren mit der Wiederfindungsfunktion  $y = 0,051 + 1,008 x$ ,  $n = 8$

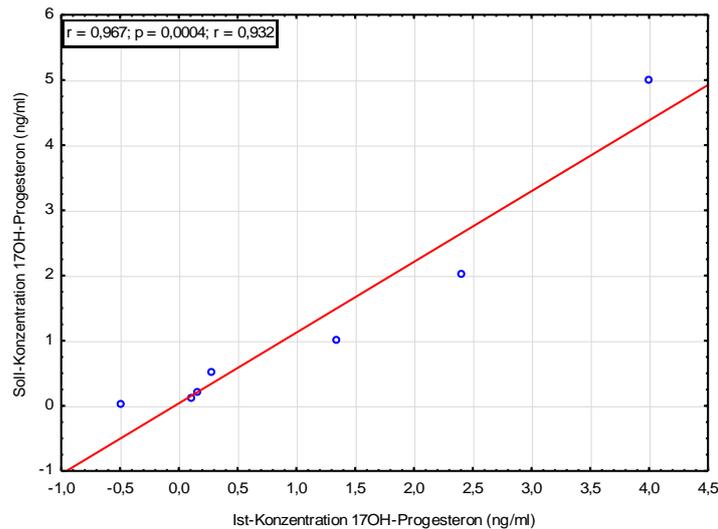


Abbildung 29 Regressionsgerade von 17-OHP im Serum nach dem Standard-Additionsverfahren mit der Wiederfindungsfunktion  $y=0,0381+1,0857x$ ,  $n=7$

Tabelle 11 zeigt die Wiederfindungsfunktionen und die Wiederfindungsraten. Für Testosteron beträgt die Wiederfindungsrate 101 % und für 17-OHP 109 %.

Tabelle 11 Wiederfindungsfunktionen und Wiederfindungsraten der Analyte

Analyt	Wiederfindungsfunktion	Wiederfindungsrate
Testosteron	$y= 0,05 + 1,01x$	101 %
17-OHP	$y= 0,04 + 1,09x$	109 %

### 3.5.4 Präzision

#### 3.5.4.1 Wiederholpräzision

Die Analysenergebnisse zur Bestimmung der Intraassay-Präzision sind in Tabelle 12 dargestellt. Für die Testosteronanalyse ist die relative Abweichung der Messwerte vom Mittelwert im Konzentrationsbereich zwischen 0,140 ng/ml und 3,64 ng/ml mit einem VK zwischen 0,56 % und 1,7 % sehr gering. Für die Analyse von 17-OHP konnte im Konzentrationsbereich unter 0,2 ng/ml ein VK von 12% und für den Konzentrationsbereich über 2 ng/ml ein VK zwischen 8,5 und 11 % festgestellt werden. Damit liegen die relativen Abweichungen von den Mittelwerten unter denen, die von den Richtlinien der Bundesärztekammer (Rilibäk) gefordert werden (17-22 %) (Bundesärztekammer 2008).

**Tabelle 12** Analysenergebnisse jeweils drei voneinander getrennt aufgearbeiteten Serumproben unterschiedlicher Konzentrationen (ng/ml) zur Ermittlung der Intraassay-Präzision von Testosteron und 17-OHP.

Probe	Testosteron			17-OHP		
	c 1	c 2	c 3	c 1	c 2	c 3
1	0,173	0,140	3,63	0,17	2,41	5,47
2	0,167	0,143	3,63	0,21	1,97	6,00
3	0,173	0,137	3,67	0,23	2,10	4,51
MW	0,171	0,140	3,64	0,203	2,16	5,32
SD	0,0028	0,0024	0,020	0,025	0,18	0,62
VK (%)	1,6	1,7	0,56	12	8,5	11

Für die Testosteronanalyse wurde die Interassay-Präzision aus den Kontrollproben bestimmt, die an 10 unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und vermessen wurden. Aus den ermittelten Analysenergebnissen (Tabelle 13) konnte ein Variationskoeffizient von 2,5% als Maß für die Streuung von Messwerten, die von Tag zu Tag entstehen, ermittelt werden.

**Tabelle 13** Ermittelte Testosteronkonzentrationen (ng/ml) aus den Kontrollproben an zehn Tagen, zur Ermittlung der Interassay-Präzision.

Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD	VK
c (ng/ml)	1,92	1,90	2,06	1,98	2,02	2,00	1,94	1,90	1,98	1,99	1,97	0,05	2,50

### 3.5.4.2 Messpräzision

Die Schwankungen der Analysenergebnisse, die durch die GC-NCI-MS hervorgerufen werden, sind in Tabelle 14 dargestellt. Für Testosteron beträgt der VK im Konzentrationsbereich von 0,18 ng/ml 4,3% und im Konzentrationsbereich von 3,6 ng/ml 0,44%. Auch für 17-OHP konnte eine geringe mittlere Abweichung der Messwerte vom Mittelwert festgestellt werden. Im Konzentrationsbereich von 0,22 ng/ml beträgt der VK 14,5% und bei 2,2 ng/ml 3,8%.

**Tabelle 14** Analysenergebnisse (ng/ml) von Testosteron und 17-OHP von zwei Proben unterschiedlicher Konzentrationen, die jeweils zehnmal hintereinander vermessen wurden, zur Ermittlung der Messpräzision.

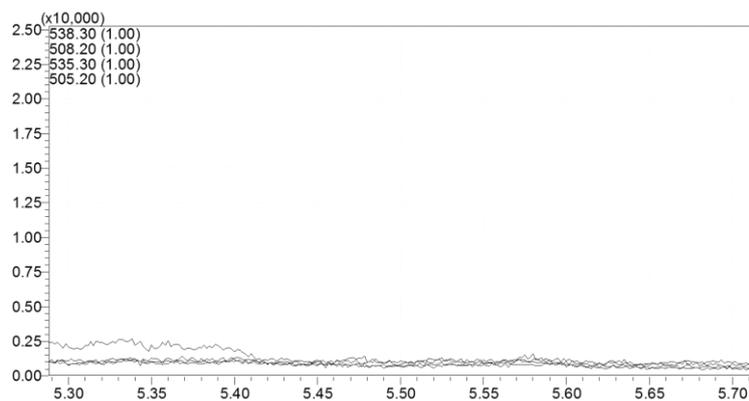
Testosteron	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD	VK
c 1 (ng/ml)	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18	0,18	0,007	3,9
c 2 (ng/ml)	3,64	3,65	3,67	3,66	3,63	3,68	3,68	3,65	3,65	3,68	3,66	0,016	0,44
17-OHP													
c 1 (ng/ml)	0,20	0,24	0,18	0,25	0,21	0,16	0,27	0,22	0,24	0,21	0,218	0,032	14,5
c 2 (ng/ml)	2,10	2,32	2,15	2,19	2,28	2,41	2,23	2,18	2,20	2,27	2,23	0,085	3,8

### 3.5.5 Arbeitsbereich

Unter Berücksichtigung der ermittelten Linearitäts-, Präzisions-, und Richtigkeitsparameter ergibt sich für die Testosteron-Analyse ein Arbeitsbereich von 0,15 ng/ml bis 10,0 ng/ml. Für 17-OHP liegt der Arbeitsbereich zwischen 0,50 und 5,0 ng/ml.

### 3.5.6 Selektivität

Zur Untersuchung der Selektivität der Methode wurden Blindproben analysiert, um die Anwesenheit von Störsignalen zu den charakteristischen Retentionszeiten auszuschließen. Zunächst wurde Wasser (Leermatrix) ohne Zugabe von IStd oder Analyt wie gewohnt aufgearbeitet und analysiert (Abbildung 30). Dazu wurde die Probe folgend den charakteristischen Massenspuren der Analyte vermessen. Es wird ersichtlich, dass keine Fremdpeaks zu den Retentionszeiten von Testosteron (5,34 / 5,40) eluieren.



**Abbildung 30** Chromatogramm einer Leermatrix nach Analyse der charakteristischen Massen der Derivate von Testosteron (m/z 505, 535) und D3-Testosteron (m/z 508, 538) im SIM; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

Auch bei 17-OHP waren keinen interferierenden Peaks auszumachen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass keine Rückstände aus der Probenaufarbeitung oder mögliche Verschleppungen des Analyten, wie z.B. aus dem Injektor, der Kapillarsäule oder der Ionenkammer, zu Störsignalen führen. Des Weiteren wurde Serum ohne Zugabe von IStd aufgearbeitet, um zu zeigen, dass im Serum keine Substanz vorkommt, die sich wie der IStd verhält.

Weiterhin wurde nur Wasser mit IStd der entsprechenden Analyte aufgearbeitet und analysiert. Das folgende Chromatogramm von Testosteron zeigt exemplarisch, dass der IStd D3-Testosteron „frei“ von dem Analyten Testosteron ist (m/z 505.2, 535.3), und nicht zum Testosteron Peak beiträgt (Abbildung 31). Somit konnte belegt werden, dass sich im Serum keine Substanz so verhält, wie der zu analysierende Analyt.

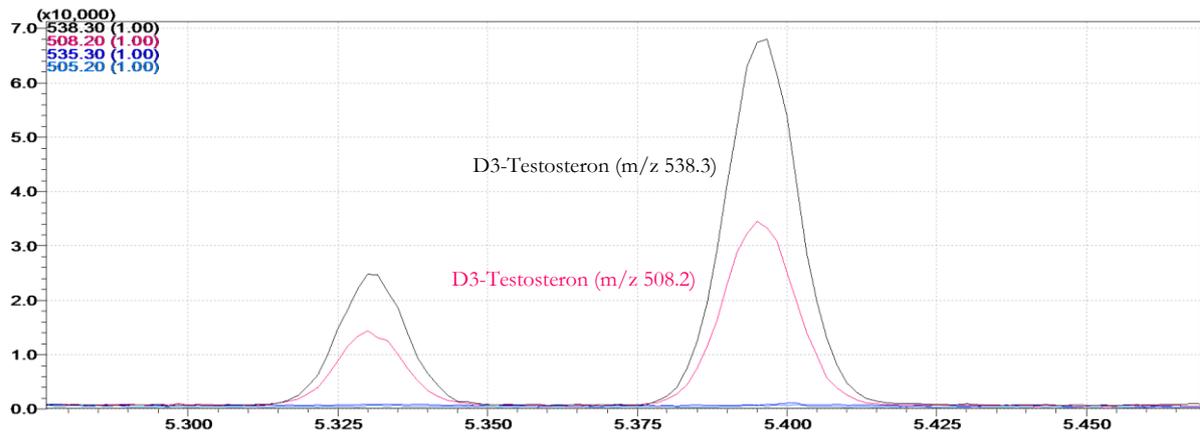


Abbildung 31 Chromatogramm einer Leermatrix-Probe mit D3-Testosteron als internen Standard (m/z 508.2, rosa und m/z 538.3, schwarz). Der interne Standard trägt nicht zum Peak des Analyten Testosteron bei (m/z 505.2, 535.3); y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

Es wird deutlich, dass die Peaks eindeutig den Substanzen zuzuordnen sind und keine Koelutionen durch interferierende Substanzen auftreten. Die Chromatogramme zeigen außerdem, dass die Peaks basisliniengerecht voneinander getrennt werden können.

### 3.5.7 Stabilität

Für Testosteron kann die Stabilität der Analyseergebnisse über die Zeit zum einen durch die Kontrollproben belegt werden (vgl. 2.2.2.2, S.27). Diese wurden zur Überprüfung der Kalibrierung aus einem Serumpool hergestellt, aliquotiert, mit IStd versetzt, und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Aus den Messergebnissen dieser Proben, die über einen Zeitraum von einem Monat nacheinander aufgetaut und analysiert wurden, war keine Drift zu erkennen.

Im Rahmen der Methodenentwicklung hat sich für Testosteron außerdem gezeigt, dass die aufgearbeiteten Proben auch bei Raumtemperatur stabil sind. So wurden die Kalibrierproben in mehreren Serien hintereinander ohne relevante Abweichungen der Analyseergebnisse gemessen. Weiterhin ergab sich, dass die Validierungsproben bis zu 21 Tagen ohne nennenswerte Verluste der Analytkonzentration im Kühlschrank ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt und nochmals vermessen werden können. Aus der folgenden Tabelle 15 wird deutlich, dass über den genannten Zeitraum die relative Streuung der Analyseergebnisse um den Mittelwert maximal 6,30 % beträgt und keine Drift vorliegt.

**Tabelle 15** Analysenergebnisse (ng/ml) der aufgearbeiteten Validierungsproben von Testosteron und 17-OHP, die im Kühlschrank bei + 4°C über einen Zeitraum von 5 bzw. 21 Tagen gelagert wurden, zur Ermittlung der Stabilität.

Tag	Testosteron (ng/ml)			17-OHP (ng/ml)		
	c 1	c 2	c 3	c 1	c 2	c 3
1	0,173	0,143	3,633	0,74	1,97	3,00
2	0,183	0,140	3,737	0,50	1,53	2,41
3	0,183	0,140	3,823			
5	0,180	0,160	3,740	0,17	1,06	1,34
21	0,177	0,133	3,620			
MW	0,179	0,143	3,711	0,340	1,52	2,25
SD	0,004	0,009	0,075	0,21	0,37	0,69
VK (%)	2,20	6,30	2,00	62	24	31

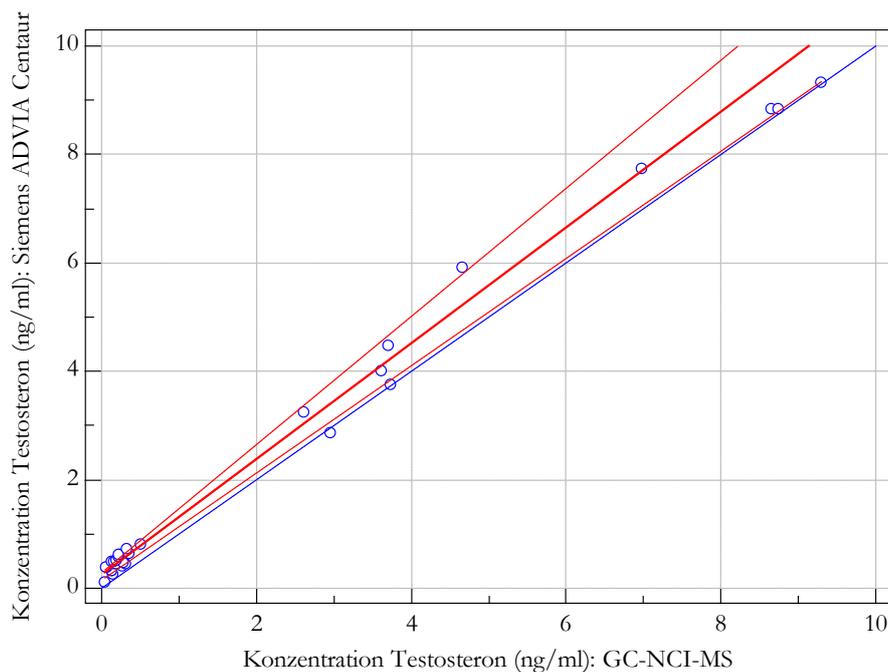
Für 17-OHP wurde die Stabilität anhand der Validierungsproben untersucht, die über einen Zeitraum von fünf Tagen im Kühlschrank bei + 4°C gelagert wurden. Bei 17-OHP ist eine deutliche Drift der Analysenergebnisse zu erkennen, die Konzentrationen nehmen über die Tage stark ab. Die relativen Abweichungen der Messwerte um die Mittelwerte betragen zwischen 24% und 62%. Damit müssen die aufgearbeiteten Proben noch am gleichen Tag vermessen werden.

### 3.6 Methodenvergleich der Testosteronanalyse zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und der GC-NCI-MS-Methode

Spätestens seit der rasanten Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Methoden und der zunehmenden Automatisierung der IAs steht die Frage nach der Verlässlichkeit und Genauigkeit der Analysenergebnisse im Blickpunkt der Forschung. Dabei konnten durch massenspektrometrische Methoden, die in der Steroidhormonanalytik als Goldstandard gelten, Defizite in der analytischen Spezifität und Sensitivität vieler IAs aufgedeckt werden. So ist insbesondere die zuverlässige Testosteronanalyse in niedrigen Konzentrationen, wie sie bei Kindern, Frauen oder auch hypogonadalen Männern gefunden werden, eine Herausforderung (vgl. 1.2.1, S.10). Dabei wurde bereits postuliert, dass durch Raten der Testosteronkonzentrationen zuverlässigere Werte generiert werden könnten, als durch die Analyse mit IAs (Herold und Fitzgerald 2003). In dieser Arbeit soll daher die Leistungsfähigkeit der beschriebenen GC-NCI-MS-Methode, im Vergleich zum Siemens Centaur ADVIA Immunoassay, der im Centrum für Laboratoriumsmedizin in Münster zur Routineanalytik eingesetzt wird, verglichen werden.

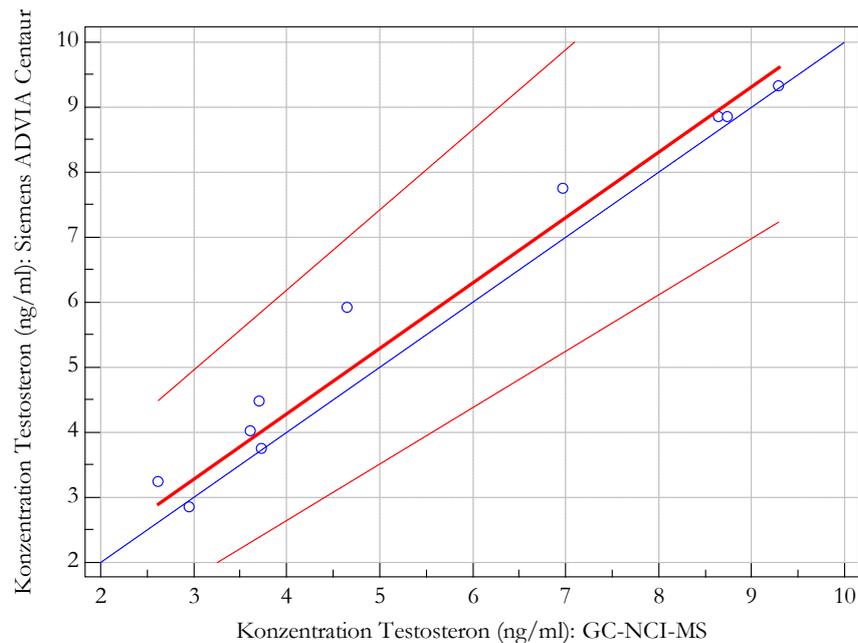
Für den Methodenvergleich wurden 30 Serumproben sowohl mit der GC-NCI-MS als auch mit dem Siemens ADVIA Centaur IA gemessen. Dabei wurden zehn Proben von Männern analysiert, bei denen hohe Testosteronkonzentrationen ( $> 2,5$  ng/ml) erwartet wurden. Des Weiteren wurden zwanzig Proben von Frauen und Kindern analysiert, bei denen niedrige Testosteronkonzentrationen ( $< 1$  ng/ml) erwartet wurden. Die Analysenergebnisse können der Tabelle 17 im Anhang entnommen werden.

Zur Überprüfung der Übereinstimmung der untersuchten Methoden wurde die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok durchgeführt. Dabei ergibt sich die Regressionsgleichung  $y = 1,067x + 0,251$  (Abbildung 32). Mit dem Korrelationskoeffizienten von 0,99 ist eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden gegeben. Dabei ist die y-Achse um 0,251 verschoben. Mit der GC-NCI-MS werden damit niedrigere Werte gemessen. Es stellt sich jedoch aufgrund der beschriebenen Literatur die Frage, ob beide Methoden sowohl im höheren, als auch im niedrigen Konzentrationsbereich gut miteinander übereinstimmen.



**Abbildung 32** Regressionsanalyse nach Passing-Bablok: Vergleich der ermittelten Testosteronkonzentrationen (ng/ml) zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und der GC-NCI-MS-Methode für 30 Serumproben. Die rote Linie zeigt die Regressionsgerade mit  $y = 1,067x + 0,251$ , die dünnen roten Linien die Grenzen des 95% Konfidenzintervalls, die blaue Linie die Idealfunktion mit  $y = x$ .

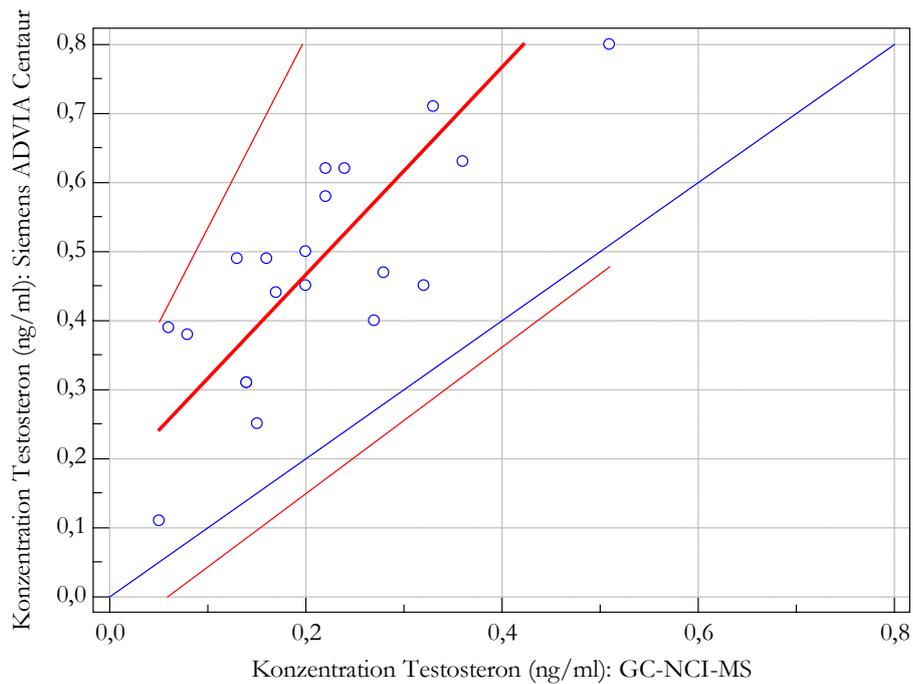
Dafür wurden die Analysenergebnisse getrennt nach Frauen und nach Männern verglichen. Zunächst wurde die Übereinstimmung im hohen Konzentrationsbereich untersucht, wobei die Analysenergebnisse der zehn Serumproben von Männern verglichen wurden (Abbildung 33).



**Abbildung 33 Regressionsanalyse nach Passing-Bablok: Vergleich der ermittelten Testosteronkonzentrationen (ng/ml) von zehn Serumproben im hohen Konzentrationsbereich (2-10 ng/ml) zwischen dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay und der GC-NCI-MS-Methode. Die rote Linie zeigt die Regressionsgerade mit  $y = 1,005x + 0,262$ , die dünnen roten Linien die Grenzen des 95% Konfidenzintervalls, die blaue Linie die Idealfunktion mit  $y=x$ .**

Die Testosteronkonzentrationen in den zehn untersuchten Serumproben von Männern betragen nach der GC-NCI-MS zwischen 2,62 und 9,29 ng/ml, bzw. nach dem Siemens ADVIA Centaur IA zwischen 2,85 und 9,33 ng/ml (vgl. Tab.16, S.69). Die Übereinstimmung beider Methoden in dem untersuchten Konzentrationsbereich wird mit der Gleichung der Regressionsgerade  $y= 1,005x + 0,262$  deutlich. Der Zusammenhang der Analysenmethoden ist mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,97 höchst signifikant.

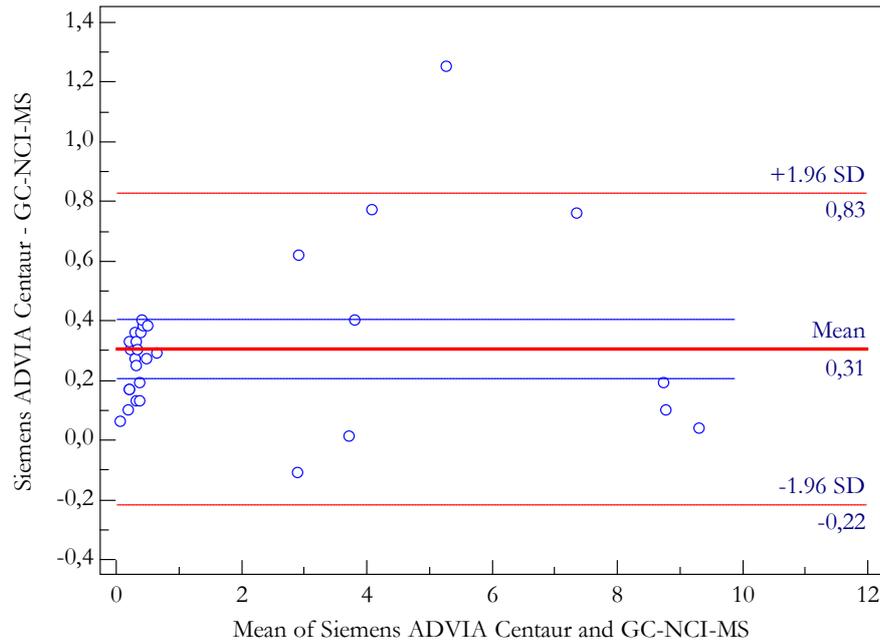
Betrachtet man die graphische Darstellung des Methodenvergleichs der erzielten Testosteronkonzentrationen der 20 Serumproben von Frauen und Kindern, ergibt sich dagegen ein anderes Bild (Abbildung 34). Mit der GC-NCI-MS wurden Testosteronkonzentrationen zwischen 0,05 und 0,51 ng/ml erzielt, mit dem Siemens ADVIA Centaur IA Werte zwischen 0,11 und 0,80 ng/ml (vgl. Tab. 16, S.69). Die Gleichung der Regressionsgerade beträgt  $y=1,500x + 0,168$ . Mit dem Korrelationskoeffizienten von 0,77 ist keine gute Übereinstimmung beider Methoden gewährleistet. Auch hier werden mit dem Siemens ADVIA Centaur höhere Testosteronkonzentrationen ermittelt, als mit der GC-NCI-MS-Methode.



**Abbildung 34** Regressionanalyse nach Passing-Bablok: Vergleich von 20 Serumproben von Frauen und Kindern im niedrigen Konzentrationsbereich (< 1 ng/ml) zwischen dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay und der GC-NCI-MS-Methode. Die rote Linie zeigt die Regressionsgerade mit  $y = 1,500x + 0,168$ ; die dünnen roten Linien die Grenzen des 95% Konfidenzintervalls, die blaue Linie die Idealfunktion mit  $y=x$ .

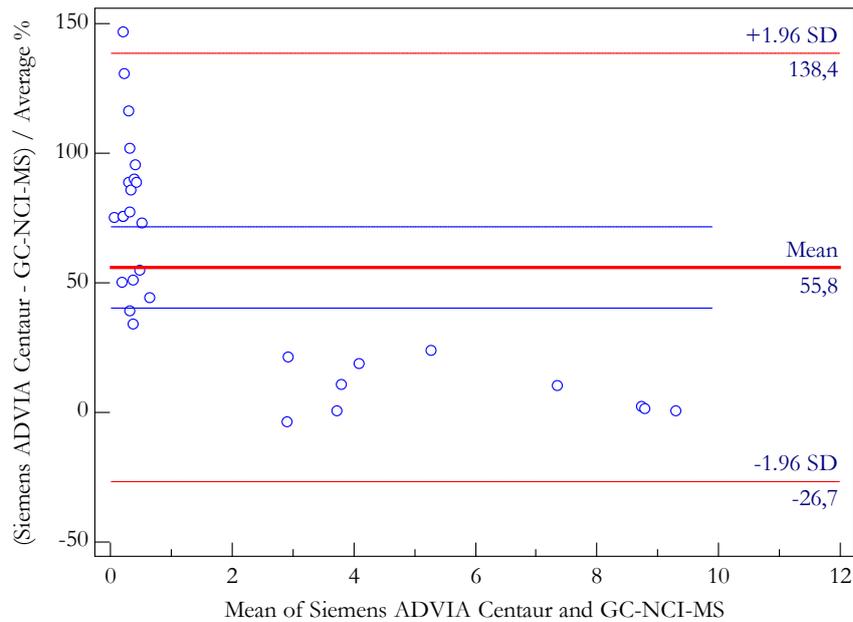
Die Abweichungen der ermittelten Testosteronkonzentrationen im Methodenvergleich können außerdem durch die Bland-Altman-Darstellungen verdeutlicht werden. Hierbei wird die absolute (Abbildung 35) oder relative Differenz (Abbildung 36) der unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen anhand der verschiedenen Methoden für jeden Patienten berechnet (y-Achse) und gegen den Mittelwert der beiden Messungen (x-Achse) graphisch aufgetragen. Die Mittelwerte stellen dabei eine Schätzung des wahren unbekanntes Wertes dar.

Abbildung 35 zeigt dabei, dass in die Differenz der ermittelten Testosteronkonzentrationen im Mittel um 0,31 ng/ml vom geschätzten wahren Wert abweichen. Dieser Mittelwert repräsentiert den „bias“, den Grad der Abweichungen der Methoden zueinander. Dabei ist in niedrigen Testosteronkonzentrationen die maximale absolute Differenz zwischen den beiden Analysenmethoden mit 0,38 ng/ml geringer als mit 1,27 ng/ml bei hohen Testosteronkonzentrationen.



**Abbildung 35** Bland-Altman-Schaubild zur Beurteilung der Übereinstimmung beider untersuchten Messmethoden. Die absolute Differenz der Testosteronkonzentrationen (ng/ml; y-Achse) ist gegen den jeweiligen Mittelwert beider Messmethoden (ng/ml; x-Achse) aufgetragen. Die mittlere Linie (Mean) zeigt den Mittelwert der Differenzen (ng/ml), die dünnen roten Linien zeigen die untere und obere Standardabweichung.

Jedoch sind die Testosteronkonzentrationen in den Serumproben der Frauen im Vergleich zu denen der Männer sehr niedrig (0,05-0,51 ng/ml) und damit ist die relative Messdifferenz ausschlaggebender. So betragen die relativen Differenzen der Analysenmethoden zum geschätzten wahren Wert zwischen -3,8 % und 146,7 % (Abbildung 36). Dabei wird deutlich, dass die relativen Abweichungen vom Mittelwert in den niedrigen Konzentrationen besonders hoch sind und außerdem eine große Streuung aufweisen, im Vergleich zu den relativen Differenzen zwischen -3,8 und 23,7 % bei den Testosteronkonzentrationen von Männern. Somit ist die Varianz der Ergebnisse von der Höhe der Messwerte abhängig. Des Weiteren kann kein systematischer Messfehler nachgewiesen werden.



**Abbildung 36 Bland-Altman Schaubild zur Beurteilung der Übereinstimmung beider untersuchten Messmethoden. Die relative Differenz der Testosteronkonzentrationen (%; y-Achse) ist gegen den Mittelwert beider Messmethoden (ng/ml; x-Achse) aufgetragen. Die mittlere Linie (Mean) zeigt den Mittelwert der Differenzen, die dünnen roten Linien zeigen die untere und obere Standardabweichung.**

Da massenspektrometrische Methoden als Referenzmethoden gesehen werden, sind außerdem die Abweichungen der Ergebnisse des IA in Bezug zur GC-NCI-MS und nicht nur zum geschätzten wahren Wert interessant. Dabei beträgt die relative Differenz der Messergebnisse im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 40,6 und 550 % (vgl. Tab. 16 und Tab. 17, S.102). Im Mittel werden bei den niedrigen Testosteronkonzentrationen mit dem IA um 158,9% höhere Werte erzielt. Im Gegensatz dazu beträgt die relative Abweichung der Messergebnisse im hohen Konzentrationsbereich nur zwischen -3,7 und 26,8 %, wobei hier mit dem IA im Mittel um 9,4% höhere Konzentrationen gemessen werden.

**Tabelle 16 Überblick über die ermittelten absoluten und relativen Messdifferenzen der Testosteronkonzentrationen zwischen dem Siemens ADVIA Centaur (IA) und der GC-NCI-MS-Methode.**

Testosteronkonzentrationen	Männer (ng/ml)		Frauen und Kinder (ng/ml)	
	GC-NCI-MS	IA	GC-NCI-MS	IA
Messbereich (ng/ml)	2,62 - 9,29	2,85 - 9,33	0,05 - 0,51	0,11 - 0,80
Absolute Messdifferenz (ng/ml)	0,01 - 1,25		0,04 - 0,40	
	Mittelwert: 0,40		Mittelwert: 0,26	
Relative Messdifferenz (%)	-3,7 - 26,8		40,6 - 550	
	Mittelwert: 9,4		Mittelwert: 158,9	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Methodenvergleich eine gute Übereinstimmung beider Analysenverfahren im hohen Konzentrationsbereich (>2ng/ml) festgestellt werden konnte, im Gegensatz zum niedrigen Konzentrationsbereich (< 1 ng/ml). Dabei ist im

---

niedrigen Konzentrationsbereich die große Streuung der Differenzen zwischen 40,6 und 550% auffällig, wobei durch den Siemens ADVIA Centaur IA im Mittel um 158,9% höhere Konzentrationen ermittelt werden als mit der GC-NCI-MS Methode.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Etablierung und Validierung einer GC-NCI-MS Methode zur quantitativen Analyse von Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron im humanen Serum beschrieben. Im Folgenden werden die etablierten Methoden zur Analyse von Testosteron und 17-OHP unter Berücksichtigung der Literatur, der Validierungsergebnisse und möglicher Anwendungen diskutiert.

Im zweiten Teil der Diskussion wird auf den Methodenvergleich der Testosteronanalyse zwischen der GC-NCI-MS-Methode und dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay eingegangen.

### 4.1 Diskussion der Methode

#### 4.1.1 Probenvorbereitung

Für die Analyse wurden analog zur Ausgangsmethode (Fitzgerald und Herold 1996) 1 ml Serum verwendet. In anderen GC/MS-Methoden zur Testosteronanalyse werden Probenvolumina von 500  $\mu$ l für Serum von Männern (Legrand et al. 1995; Wudy et al. 1992) und 2 ml für Serum von Frauen (Taieb et al. 2003) und Kindern (Wudy et al. 1992) beschrieben. Es wurde jedoch eine Methode angestrebt, die für Männer und Frauen möglichst einheitlich sein sollte, und für mehrere Steroidhormone verwendet werden kann. Da die Sexualhormone in Pikogramm-Konzentrationen im Serum vorliegen können, sollte das Probenvolumen zunächst nicht weiter minimiert werden, um auch im niedrigen Konzentrationsbereich eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen.

In der Literatur ist eine Vielzahl von - zum Teil sehr komplizierten - LLE (Taieb et al. 2003; Wu et al. 2002) beschrieben (vgl. 1.2.3.2, S. 19). Dabei hat sich im Rahmen der Versuche zur Optimierung der LLE Ethylacetat (Fitzgerald und Herold 1996) als einfaches und sehr geeignetes Lösungsmittel herausgestellt. Für alle untersuchten Hormone war der höchste spezifische Respons zu verzeichnen und in Anbetracht dessen, dass eine Methode gefunden werden soll, die für mehrere Steroidhormone möglichst gleich sein soll, schien es damit als sehr geeignet. Es zeigte sich als sehr selektives Lösungsmittel, mit dem wenig Wasser aus dem Serum extrahiert wird, ganz im Gegensatz zu Methanol, mit dem der wässrige Anteil des Serums sowie polare Serumkomponenten, wie Aminosäuren und Phosphatide, mitextrahiert werden. Im Vergleich zur Extraktion mit Methanol war die Verwendung von Ethylacetat außerdem einfacher, da die Zugabe von Zinksulfat entfiel, um zusätzlich Restproteine zu

fällen. Außerdem konnte die obere Phase einfach dekantiert werden, wogegen bei den LLE mit Dichlormethan (Siekmann 1979), Dichlormethan-Ethylether (Turpeinen et al. 2008) oder tBME die verschiedenen Phasen dagegen mit einer Pipette voneinander getrennt werden mussten. Auch ließ sich die aufgereinigte Probe in Ethylacetat zügig verdampfen.

In der Ausgangsmethode wurde kein Clean-up durch Festphasen- oder Gelfiltration beschrieben (Fitzgerald und Herold 1996). Bei der hier beschriebenen Methode ist das Clean-up notwendig, um störende Matrixbestandteile und überschüssige Lipide entfernen zu können und um eine weitere Aufkonzentrierung der Analyten zu erreichen. Auch in anderen Methoden ist eine Clean-up beschrieben, welches meistens mit der Gelchromatographie, z.B. anhand Sephadex LH-20 Säulen (Stöckl et al. 1991; Siekmann 1979; Wudy et al. 1992) durchgeführt wird.

Die Aufreinigungs- und Anreicherungsschritte waren sehr effektiv, dies kommt durch ein nur geringes Untergrundrauschen und die Abwesenheit von störenden Nebenpeaks zum Ausdruck.

#### **4.1.2 Derivatisierung**

Durch die Derivatisierung konnten thermisch stabile und unpolare Derivate der Hormone gebildet werden, die im Massenspektrometer in stabile Fragmente ionisiert werden konnten. In der Steroidhormonanalytik werden zur Analytik mit der GC-NCI-MS fluoridierte Marker, wie HFBA (Siekmann 1979; Taieb et al. 2003; Wudy et al. 1995; Wu et al. 2002) und PFBA (Legrand et al. 1995), eingesetzt, welche die Detektierbarkeit durch die NCI-MS verbessern (vgl. 1.2.3.2, S.19). Wir derivatisierten analog zur Ausgangsmethode (Fitzgerald und Herold 1996) mit PFBH-HCl, welches statt in Pyridin in Methanol gelöst wurde (Florox-Lösung), um bei der Derivatisierung entstehendes HCl abzufangen. So konnten nicht nur Testosteron und 17-OHP, sondern auch andere Steroidhormone, wie Cortisol, Androstendion und Aldosteron, derivatisiert werden. Dabei zeigten sich in den Chromatogrammen von Testosteron und 17-OHP zwei Peaks. Dies ist durch die Bildung von Stereoisomeren zu erklären. Für beide Hormone wurde der zweite Peak ausgewählt, der sich durch eine größere Anzeigeempfindlichkeit und damit durch eine verlässlichere Quantifizierung auszeichnete. Fitzgerald und Herold konnten Testosteron und seinen IStd bei den gleichen Massenzahlen nachweisen und detektierten ebenfalls zwei Peaks in den Chromatogrammen.

Durch die Derivatisierungen entstanden stabile Fragment- bzw. Molekülionen, die mit hoher relativer Intensität und hohen Massenzahlen registriert werden konnten. Neben dem

Quantifizierung wurde außerdem jeweils ein Referenzstandard zur qualitativen Absicherung ausgewählt.

### 4.1.3 Optimierung der Analysebedingungen

Durch das Temperaturprogramm der chromatographischen Analyse konnte eine empfindliche und reproduzierbare chromatographische Trennung der Analyten erfolgen. Dabei konnten die Analyten basisliniengerecht voneinander getrennt werden. Sie eluieren zu unterschiedlichen Retentionszeiten, was eine Analyse mehrerer Hormone nebeneinander aus einer Probe in einem Analysendurchlauf ermöglicht. Mit der Scan-Rate von 2-2,5 scans/s konnten die Peakflächen sicher rekonstruiert werden. Die Versuche zur Steigerung der Empfindlichkeit der Analyse, wie Minimierung des Probenendvolumens und Steigerung des Injektionsvolumens, brachten eine lineare Steigerung des spezifischen Responses mit sich, dabei nahm jedoch auch das Untergrundrauschen zu. Da gerade für die Analyse geringer Konzentrationen eine deutliche Basislinientrennung und damit ein minimales Untergrundrauschen notwendig ist, wurde die Derivatisierung wie beschrieben durchgeführt, und das Injektionsvolumen von 1  $\mu$ l beibehalten.

### 4.1.4 Mikromethode zur Analyse von Testosteron

In der Pädiatrie ist es oft schwierig, große Serummengen zu gewinnen. Die Analyse der Steroidhormone wird aber hier für viele Fragenstellungen notwendig, z.B. wenn das Geschlecht nach der Geburt nicht eindeutig identifiziert werden kann (Tomlinson et al. 2004; Fuqua et al. 1995), wenn Abweichungen der normalen Pubertätsentwicklung (Wudy und Hartmann 2004) auftreten oder auch zur Diagnose des AGS (Wudy et al. 1995; Rauh et al. 2006). Daher wurde versucht, analog zur „Makromethode“ für Testosteron eine Mikromethode einzuführen, bei der das benötigte Untersuchungsvolumen auf 100  $\mu$ l minimiert werden kann (vgl. 3.2.3, S.44). Solche niedrigen Probenvolumina sind meist nur bei massenspektrometrischen Methoden beschrieben, die mit der Flüssigchromatographie gekoppelt sind (Rauh et al. 2006). Es wurden die einzelnen Schritte der Ausgangsmethode an das geringere Ausgangsvolumen angepasst. Anschließend wurden mehrere Serumproben über einen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich getrennt voneinander aufgearbeitet und mit beiden Methoden analysiert. Es konnte eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Mikro- und Makromethode über den untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt werden ( $r^2=0,999$ ). Beim Vergleich der Chromatogramme konnte eine geringere Anzeigeempfindlichkeit der Mikromethode festgestellt werden, die auf das geringere

Probenvolumen zurückzuführen sein kann. Für eine gute Integration war die Anzeigeempfindlichkeit der Peaks jedoch ausreichend. Die Einführung einer Mikromethode erscheint aufgrund der beschriebenen Ergebnisse sehr gut möglich. Die Mikromethode müsste jedoch noch validiert werden, bevor sie zuverlässig eingesetzt werden kann. Die Mikromethode wurde zunächst nur für Testosteron getestet, besonders interessant wäre auch der Ausbau der Mikromethode zur Analyse von 17-OHP im Serum, um z.B. das AGS direkt nach der Geburt zuverlässig diagnostizieren zu können.

#### 4.1.5 Validierung

Die etablierten Methoden wurden entsprechend den Richtlinien der ICH (ICH 2007) validiert, um sie zu charakterisieren und um zu überprüfen, ob die Analyten im Serum verlässlich und reproduzierbar quantifiziert werden können.

Für die etablierte Testosteronmethode konnte die Linearität zwischen 0,1 ng/ml und 10,0 ng/ml nachgewiesen werden. Mit der BG von 0,148 ng/ml ergibt sich ein Arbeitsbereich von 0,148 ng/ml bis 10,0 ng/ml. Die BG betrug in der Ausgangsmethode 0,24 ng/ml (Fitzgerald und Herold 1996) und konnte damit sogar noch unterboten werden. Dies kann auf die zusätzliche Festphasenextraktion zurückgeführt werden, die eine zusätzliche Aufreinigung und Anreicherung ermöglicht. Des Weiteren führten Fitzgerald und Herold die Kalibrierung mit wässrigen Lösungen, die mit Albumin versetzt waren, anstelle von Serum durch. Da so störende Matrixeffekte umgangen werden, könnte die BG in diesen Kalibrationslösungen geringer als im Serum ausfallen. Die Vergleichbarkeit unserer Methode mit anderen Methoden ist dadurch erschwert, da oft nicht erläutert wird, wie die analytischen Grenzen ermittelt wurden oder anstelle der BG nur die NWG aufgezeigt wird. Es lässt sich feststellen, dass mit dem ermittelten Arbeitsbereich eine sensitive Analyse über den gesamten physiologischen Konzentrationsbereich möglich ist.

Die Linearität für die Analyse von 17-OHP konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0,1 ng/ml und 5,0 ng/ml mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,998 bestätigt werden. Dabei konnte unter Berücksichtigung der BG ein Arbeitsbereich von 0,5 ng/ml bis 5,0 ng/ml ermittelt werden. Magnisali et al., die die Linearität von 0,13-31,3 ng/ml überprüften, konnten mit einer GC/MS-Methode nach dem Signal-Rausch-Verhältnis eine BG von nur 0,1 ng/ml erzielen (Magnisali et al. 2008). Auch Rauh et al. konnten mit einer LC-MS/MS-Methode 17-OHP bis zu 0,1 ng/ml quantifizieren (Rauh et al. 2006). Physiologische Konzentrationen reichen von 0,05 ng/ml bei Säuglingen (Rauh et al. 2006) bis zu 5,0 ng/ml bei Frauen in der Lutealphase. Bei Patienten mit

klassischen AGS lassen sich Konzentration bis über 10 ng/ml nachweisen (Wudy et al. 2000). Um zusätzlich sehr geringe Hormonkonzentrationen bis 0,05 ng/ml quantifizieren zu können, müsste damit die Empfindlichkeit der Analyse verbessert werden. Pathologisch hohe Werte können zwar anhand der Methode erfasst werden, um sie jedoch zuverlässig quantifizieren zu können, müsste die Kalibration auf einen Konzentrationsbereich von ca. 20 ng/ml erweitert werden. Eine Möglichkeit wäre, wie Magnisali et al. (Magnisali et al. 2008) mit zwei Kalibrationskurven zu arbeiten. Da die analytischen Grenzen aus der Kalibriergerade errechnet werden, könnte durch eine Kalibrationsgerade im niedrigen Konzentrationsbereich bis 3 ng/ml eine niedrigere BG erreicht werden. Schließlich waren in sehr geringen Konzentrationen zum einen die Peaks zuverlässig identifizierbar und von Nebenpeaks gut abgrenzbar, und zum andern konnten auch in den Präzisionsstudien akzeptable Abweichungen festgestellt werden.

Die erzielte Wiederfindungsrate von 101 % für Testosteron belegt, dass die Probenaufarbeitung mit Hilfe des IStds reproduzierbar durchgeführt werden kann. Dies übertrifft die Richtigkeit vieler Methoden, so beträgt die Wiederfindungsrate beim Siemens Centaur zur Testosteronanalyse zwischen 86% und 108%. Für 17-OHP beträgt die ermittelte Wiederfindungsrate 108 %. Um die Richtigkeit der Analyse zu bestätigen, kann außerdem ein zertifiziertes Referenzmaterial vermessen werden, wie es z.B. vom „National Institute of Standards and Technology“ (NIST) vertrieben wird. Denn obwohl die Methode hoch spezifisch ist, und Analytverluste durch Verwendung eines IStd korrigiert werden, lassen sich systematische Messfehler wie durch Fehler in der Kalibrierung, nicht vollständig ausschließen.

Die etablierte Testosteronanalyse zeigt sowohl im niedrigen als auch im höheren Konzentrationsbereich eine sehr gute Präzision. Im Rahmen der Bestimmung Wiederholpräzision ergab die Intraassay-Präzision in den Konzentrationen unter 0,18 ng/ml einen VK von maximal 1,70 % und in dem Konzentrationsbereich von 3,64 ng/ml einen VK von 0,56 %. Die Interassay-Präzision der Kontrollproben ergab einen VK von 2,50% und bestätigt die sehr gute Wiederholpräzision. Die Streuungen von Messwerten, die während der Probenaufarbeitung aufgrund zufälliger Fehler entstehen, sind damit sehr gering. Die Untersuchungen zur Messpräzision zeigen, mit einem VK von 3,9 % in der Konzentration von 0,18 ng/ml und einem VK von 0,44% bei 3,66 ng/ml, dass die Schwankungen der Analysenergebnisse, die durch die GC-NCI-MS hervorgerufen werden, ebenfalls sehr gering sind. Damit ist die Präzision für die Fragestellung ausreichend und übertrifft die vieler immunologischen Tests um ein Vielfaches.

Die Ergebnisse der Interassay-Präzision und der Messpräzision für 17-OHP zeigen im Vergleich zu Testosteron höhere Abweichungen, liegen aber weit unter denen, die von der Rilibäk gefordert werden (Bundesärztekammer 2008). Somit konnte hier nachgewiesen werden, dass die Schwankungen der Analysenergebnisse, die durch Abweichungen in der Probenaufarbeitung entstehen oder durch die GC-NCI-MS selbst hervorgerufen werden sowohl in niedrigen als auch in hohen Konzentrationen ein ausreichendes Maß an Präzision aufweisen.

Für die Testosteronanalyse konnte außerdem eine gute Stabilität der aufgearbeiteten Testosteronproben festgestellt werden. Eine erneute Analyse der aufgearbeiteten Proben nach Lagerung im Kühlschrank bei 4°C war sogar bis 21 Tage möglich. Damit kann die Methode über einen langen Zeitraum zuverlässige, reproduzierbare Werte generieren. Für eine Analyse von 17-OHP müssen die aufgearbeiteten Proben jedoch am gleichen Tag vermessen werden, da über einen Zeitraum von fünf Tagen erhebliche Verringerungen der ermittelten Konzentrationen festgestellt werden konnten. Die Proben sind jedoch ausreichend stabil, um sie am gleichen Tag mehrmals hintereinander zu messen, wie die Ergebnisse der Messpräzision zeigen.

Die etablierten Methoden zur Analyse von Testosteron und 17-OHP sind äußerst spezifisch. Durch die gewählten Analysebedingungen können sie mit der Gaschromatographie, je nach ihrer Flüchtigkeit sowie ihrer Affinität zur stationären Phase und dadurch resultierender unterschiedlicher Retentionszeiten, voneinander getrennt werden. Die Kopplung mit dem Massenspektrometer erlaubt die Fragmentierung zu charakteristischen Fragment- oder Molekülonen, so dass die untersuchten Hormone nach ihren charakteristischen  $m/z$  detektiert werden können. Durch die Analyse von Blindproben konnten Störsignale zu den Retentionszeiten, zu denen die Analyten und der IStd eluieren, ausgeschlossen werden. Weiterhin konnten dadurch Interferenzen aus der Probenaufarbeitung, aus dem Serum, oder Analytrückstände aus dem System, die in dem gleichen Massenbereich liegen, ausgeschlossen werden. Außerdem sicherte die Auswahl zusätzlicher Referenzen die Identität der Peaks ab. Des Weiteren konnte die Selektivität durch konstante Peakflächenverhältnisse bestätigt werden, die auch mit den Peakflächenverhältnissen in der Reinsubstanz übereinstimmten. Aufgrund der Selektivität der Methode konnten bis zu fünf Hormone parallel im Serum bestimmt werden. Dazu wurde mit der Software ein spezielles Programm generiert, das bei den charakteristischen Retentionszeiten im SIM-Modus die charakteristischen Fragmentationen vermisst. Indem man sich auf wenige Massen pro Zeitfenster konzentriert, konnte die Empfindlichkeit der Methode beibehalten werden.

#### 4.1.6 Mögliche Anwendungen der validierten Methoden

Die Validierung der Testosteronanalyse hat gezeigt, dass die Methode über den breiten Konzentrationsbereich zwischen 0,15 ng/ml und 10 ng/ml robust, präzise und spezifisch misst. Dadurch kommt eine Anwendung für jegliche klinische Fragestellung in Frage. Sowohl bei Frauen und Kindern, als auch bei hypogonadalen und eugonadalen Männern kann die Testosteronkonzentration zuverlässig quantifiziert werden. Dies bietet natürlich eine Alternative zu den Immunoassays, bei denen die Analysenergebnisse insbesondere in niedrigen Konzentrationen zweifelhaft sind (Taieb et al. 2003; Fitzgerald und Herold 1996; Wang 2004). Des Weiteren bietet die gezeigte Übereinstimmung zwischen der Mikro- und der Makromethode eine herausragende Möglichkeit, Testosteron in pädiatrischen Patienten mit einem Probenvolumen von nur 100 µl zu messen.

Die Validierung der Analyse von 17-OHP zeigt ebenfalls, dass die Analyse in dem untersuchten Arbeitsbereich präzise und spezifisch ist. Hier wäre der Ausbau einer Mikromethode sehr interessant, um zuverlässig das AGS bei Neugeborenen bestimmen zu können. In Deutschland und vielen anderen Ländern wird ein Neugeborenen-Screening auf das AGS durchgeführt, dabei werden die 17-OHP Konzentrationen meist mit immunologischen Methoden im Vollblut erfasst (White 2009). Die mangelnde analytische Spezifität der IAs führt jedoch besonders bei Neugeborenen zu Problemen (Makela und Ellis 1988), bei denen besonders große Abweichungen zwischen IAs und massenspektrometrischen Methoden gefunden werden (Wudy et al. 1995; Rauh et al. 2006). Gerade in den ersten Lebensstagen finden sich viele Hormonvorstufen im Serum, wie 17-OH-Pregnenolon, dessen Metabolit 17-OH-Pregnenolonsulfat, sowie auch mütterliche Steroide in hoher Konzentration (Wong et al. 1992), so dass es häufig zu falsch positiven Befunden kommt (White 2009). Deswegen können viele Labore 17-OHP nicht vor dem dritten Lebenstag zuverlässig bestimmen (Honour 2010). Die Bestimmung von 17-OHP kann mit einer Vielzahl an Methoden erfolgen, wobei hier die GC/MS auch als Goldstandard angesehen wird (Singh 2010). Dabei gibt es massenspektrometrische Methoden, mit denen 17-OHP auf mit Blutropfen getränkten Filterpapierstreifen (Magnisali et al. 2011) oder sogar pränatal aus dem Fruchtwasser analysiert werden kann (Wudy et al. 1999). Auch können Metabolite von 17-OHP im Urin (Wudy et al. 2000; Caulfield et al. 2002) nachgewiesen werden. Dabei gilt der Nachweis mit der GC/MS als spezifischer; das Urinprofil sollte eher als eine Bestätigungsanalyse beim Verdacht auf ein AGS durchgeführt werden (Wudy und Hartmann 2004). Der Ausbau der Mikromethode zur Analyse von 17-OHP wäre demnach sehr erstrebenswert, denn die zuverlässige und frühe Diagnostik des AGS vermindert die

Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten. Ältere Patienten, bei denen ein Serumvolumen von 1 ml gewonnen werden kann, könnten schon jetzt von der Methode profitieren. Erhöhte Spiegel von 17-OHP finden sich außerdem bei nicht-klassischen Formen des AGS, bei dem PCOS oder auch bei den selteneren Ovarial- oder NNR-Tumoren (vgl. 1.1.6, S.8).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die GC-NCI-MS-Methode von Herold und Fitzgerald (Fitzgerald und Herold 1996) eine robuste, spezifische und präzise GC-NCI-MS-Methode mit sehr guter Sensitivität zur Testosteronanalyse etabliert werden konnte. Des Weiteren konnte diese Methode zur quantitativen Analyse von  $17\alpha$ -OH-Progesteron erweitert werden. Dabei ermöglicht die vergleichsweise einfache Probenvorbereitung eine erfolgreiche Aufreinigung der Probe und Aufkonzentrierung der Analyten. Durch die Derivatisierung bildeten sich stabile Fragmentationen die zuverlässig detektiert und quantifiziert werden konnten. Die Kalibrierung für 17-OHP sollte sowohl in den unteren als auch in den oberen Konzentrationsbereich ausgeweitet werden, um die breite physiologische und pathologische Konzentrationsspanne zuverlässiger abdecken zu können. Die Wiederfindungsexperimente zeigen für Testosteron mit Wiederfindungsraten von 99% und 101% eine sehr gute Richtigkeit, die Richtigkeit von 17-OHP ist mit einer Wiederfindungsrate von 86% ausreichend. Um eine weitere Aussage bezüglich der Richtigkeit der Methoden machen zu können, und um sie auf systematische Fehler zu untersuchen, müsste standardisiertes Referenzmaterial analysiert und mit den ermittelten Ergebnissen verglichen werden.

Einen großen Fortschritt stellt die gezeigte Möglichkeit einer Einführung einer Mikromethode und damit der breiteren Einsetzbarkeit auch im pädiatrischen Bereich dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Methode zur gleichzeitigen Analyse weiterer Steroidhormone, wie Aldosteron, Androstendion und Cortisol, ausbaufähig ist. Auf lange Sicht könnte mit dieser Methode eine Vielzahl von Hormonen aus einer einzigen Serumprobe analysiert werden.

Die vorgestellte Methode ist zur Routineanalytik nicht unbedingt geeignet, da nicht ein so hoher Probendurchsatz möglich ist, wie er oftmals gefordert ist. So können Rauh et al. mit einer LC/MS/MS Methode bis zu 90 Proben an einem Tag vermessen (Rauh et al. 2006). Wenn jedoch verlässliche Werte gefordert werden, wie z.B. zur Diagnose des AGS, oder zweifelhafte Analysenergebnisse überprüft werden müssen, wie z.B. bei extrem erhöhten Testosteronwerten und dem Verdacht auf einen Testosteron-produzierenden Tumor, muss auf die zuverlässigeren massenspektrometrischen Methoden zurückgegriffen werden.

## 4.2 Vergleich der Testosteronanalyse mit der entwickelten GC-NCI-MS-Methode und dem Siemens ADVIA Centaur

Die entwickelte GC-NCI-MS-Methode zur Testosteronanalyse wurde mit dem Siemens Centaur ADVIA Immunoassay verglichen. Um die Übereinstimmung der Messergebnisse in hohen Konzentrationen ( $>2$  ng/ml) zu untersuchen, wurden Testosteronkonzentrationen im Serum von zehn Männern mit beiden Methoden bestimmt und die Werte verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass beide Methoden in höheren Konzentrationen, wie sie bei Männern physiologisch zu finden sind, sehr gut miteinander übereinstimmen. Der Korrelationskoeffizient betrug in dem untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 2,62 und 9,29 ng/ml 0,973. Mit dem IA wurden im Mittel um 0,40 ng/ml (9,4 %) höhere Konzentrationen gemessen.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen einer der größten Studien zu diesem Thema: Taieb et al. verglichen die Testosteronanalyse von 55 Frauen, 50 Männern und 11 Kindern mit zehn verschiedenen kommerziell erhältlichen IAs und der ID/GC-MS als Referenzmethode. Die Analysenergebnisse der IAs stimmten mit denen der Referenzmethode gut überein. Die Korrelationskoeffizienten betrugen in dem Konzentrationsbereich zwischen 2,4 ng/ml – 16,7 ng/ml (8,2 bis 58 nmol/l) zwischen 0,86 und 0,97. Bei sieben von zehn der getesteten IAs wurden im Serum von Männern falsch niedrige Testosteronkonzentrationen gemessen, mit einer mittleren Abweichung von 12% (1,15 ng/ml = 4 nmol/l). Außerdem konnte eine große Interassay-Variabilität der untersuchten IAs untereinander sowie zur Referenzmethode festgestellt werden (Taieb et al. 2003).

Fitzgerald und Herold kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie verglichen erzielte Testosteronkonzentrationen in Seren von Frauen und Männern einer GC-NCI-MS-Methode mit dem automatisierten Ciba Corning Diagnostics ACS:180 Immunoassay (Fitzgerald und Herold 1996). Dabei zeigten die Testosteronkonzentrationen von Männern im Methodenvergleich eine gute Übereinstimmung ( $r^2=0.98$ ) zur Referenzmethode. Auch hier wurden geringere Konzentrationen gemessen, im Mittel um 0,35 ng/ml (1,2 nmol/l) (Fitzgerald und Herold 1996).

In weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass sowohl konventionelle RIAs, als auch kommerzielle manuelle oder automatisierte direkte IAs in hohen Konzentrationen, wie sie bei Männern physiologisch zu erwarten sind, weitestgehend verlässliche Resultate liefern (Stanczyk et al. 2003; Wang 2004; Cawood et al. 2005).

Es stellt sich jedoch die Frage, ob die IAs uneingeschränkt zur Testosteronanalyse von Männern genutzt werden können, um z.B. auch eugonadale von hypogonadalen Männern zu unterscheiden. Um Hypogonadismus diagnostizieren zu können, ist neben den klinischen Kriterien zusätzlich der laborchemische Nachweis erforderlich, dass die morgendliche Testosteronkonzentration unter dem Referenzbereich gesunder, junger Männer liegt (Wang 2004). Dabei ist der laborchemische Nachweis nach Vermeulen gegeben, wenn die Testosteronkonzentration mehr als zwei Standardabweichungen unter der Konzentration junger, gesunder Männer liegt (Vermeulen 2001). In einer großen Studie untersuchten Wang et. al. die Übereinstimmung der Testosteronergebnisse 60 eugonadaler und 60 hypogonadaler Männer zwischen einer LC-MS/MS Methode als Referenzmethode und vier automatisierten direkten IAs sowie zwei RIAs. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass die untersuchten IAs für die Testosteronanalyse von Männern genutzt werden können, auch wenn Abweichungen sowohl nach unten als nach oben bestehen. Sie betonen jedoch, dass die untersuchten IAs nur verlässlich seien, solange hohe Testosteronkonzentrationen vorliegen. Im Bereich unter 1 ng/ml könne nicht verlässlich oder reproduzierbar gemessen werden. Sie schlussfolgern jedoch, dass die Verlässlichkeit der Tests ausreiche, um Hypogonadismus zu diagnostizieren (Wang 2004). Dies ist jedoch nicht uneingeschränkt zutreffend. Aufgrund der mittleren Abweichungen der IAs im Vergleich zu Referenzmethoden kommen Schwierigkeiten auf, wenn der Patient sich an der Grenze zum Hypogonadismus bewegt. In unserem Vergleich wies kein Patient eine Hormonkonzentration in diesem Grenzbereich auf. Da in dem Konzentrationsbereich zwischen 2,6 und 10 ng/ml jedoch mittlere Abweichungen um 0,33 ng/ml auftraten, ist es durchaus möglich, dass grenzwertig hypogonadale Männer (<2,5 ng/ml) fälschlicherweise als eugonadal eingestuft werden könnten und umgekehrt. Zu dieser Beobachtung kamen Taieb et al., die Serumproben von Männern untersuchten, die sich an der Grenze zum Hypogonadismus bewegten. Dabei zeigten zwei von zehn untersuchten Immunoassays, der ACS:180 und der AutoDelfia, falsch hohe Werte und konnten damit nicht eindeutig eugonadale von hypogonadalen Männern unterscheiden (Taieb et al. 2003). Um die Verlässlichkeit des Siemens ADVIA Centaur in diesem Konzentrationsbereich zu ermitteln, der ebenfalls über den ACS:180 validiert wurde, sollte eine größere Patientenpopulation untersucht werden, um ausreichend Proben in diesem Bereich gewinnen und vergleichen zu können.

Um die Übereinstimmung beider Methoden im niedrigen Konzentrationsbereich (< 1 ng/ml) zu überprüfen, wurden Testosteronkonzentrationen von zwanzig Frauen und Kindern jeweils mit dem Siemens ADIVA Centaur Immunoassay der GC-NCI-MS gemessen. Bei dem Methodenvergleich zeigte sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,77 keine gute

Übereinstimmung der Messergebnisse in der untersuchten Konzentrationsspanne zwischen 0,05 ng/ml und 0,51 ng/ml. Außerdem war eine deutliche Streuung der Ergebnisse nachweisbar, wobei die Konzentrationen des IA im Vergleich zur GC-NCI-MS-Methode im Bereich zwischen 40,6 und 550% nach oben abwichen. Die mittlere Abweichung betrug 0,26 ng/ml (158,9%).

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen des Methodenvergleichs von Fitzgerald und Herold überein. Zwischen dem ACS:180 Immunoassay und der GC/MS ergab sich mit  $r^2=0,31$  ebenfalls eine geringe Übereinstimmung der Werte in Seren von Frauen und Kindern in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,10 – 0,75 ng/ml (0,35 und 2,6 nmol/l). Es wurde dabei eine mittlere Abweichung von 0,26 ng/ml (0,89 nmol/l) nach oben festgestellt (Fitzgerald und Herold 1996).

Auch Taieb et al. fanden in ihrer umfassenden Studien heraus, dass sieben von zehn IAs bei Frauen falsche Testosteronkonzentrationen ermitteln (Taieb et al. 2003). Dabei weichen die Ergebnisse im Konzentrationsbereich zwischen 0,17 – 2,07 ng/ml (0,6 und 7,2 nmol) im Mittel um den Faktor 2 (0,58 ng/ml = 2 nmol/l) voneinander ab. Es wurden aber auch Abweichungen bis um den Faktor 5 beschrieben. Weiterhin ergaben einige der untersuchten IAs bei hyperandrogenen Frauen mit Hirsutismus Konzentrationen innerhalb des Referenzbereichs (Taieb et al. 2003). Sie schlussfolgerten, dass keiner der untersuchten IAs zur Analyse von Frauen und Kindern geeignet sei, da die meisten nicht in der Lage seien, Frauen mit abnormalen hohen Testosteronwerten von gesunden Frauen zu unterscheiden und die Abweichungen zwischen 50 und 500 % keine verlässliche Analyse erlauben (Taieb et al. 2003).

Es gibt zahlreiche weitere Studien, in denen bestätigt wird, dass mit IAs in Konzentrationsbereichen unter 1 ng/ml (3,47 nmol/l) keine verlässlichen Ergebnisse zu erzielen sind und damit nicht zur Testosteronanalyse von Frauen oder Kindern geeignet sind (Wang 2004; Moal et al. 2007; Cawood et al. 2005; Stanczyk et al. 2003; Wudy et al. 1995). Dabei betonen Rosner et al., dass es anscheinend keine Studien gibt, die diesem Sachverhalt nachhaltig widersprechen können (Rosner et al. 2007).

Brandhorst et al. verglichen den neuen Elektrochemilumineszenz IA (Elecsys Testo II) mit seinem Vorgänger (Elecsys Testo) gegen eine LC/MS/MS-Methode. Sie konnten im Vergleich zum Vorgänger eine bessere Übereinstimmung der Werte bei Frauen im niedrigen Konzentrationsbereich feststellen. Auch sie empfehlen die Analyse mit dem IA aber nur, wenn keine massenspektrometrischen Alternativen zur Verfügung stehen (Brandhorst et al. 2011).

Es ist auffallend, dass die untersuchten Immunoassays in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen meistens falsch hoch messen (Wudy et al. 1995; Legrand et al. 1995; Taieb et al. 2003; Moal et al. 2007; Fuqua et al. 1995). Dies konnten wir auch in unserem Methodenvergleich feststellen, so wurde im niedrigen Konzentrationsbereich eine mittlere Abweichung von 158,9 % (0,26 ng/ml) nach oben auffällig. Wang konnte ebenfalls für den Siemens Centaur bestätigen, dass sowohl in höheren Konzentrationen, die nicht von klinischer Relevanz seien, als vor allem auch in niedrigen Konzentrationen unter 1 ng/ml mit einer mittleren Abweichung von 0,1 ng/ml zu hoch gemessen werde (Wang 2004). Jedoch sind in der Literatur auch falsch niedrige Werte bei beiden Geschlechtern beschrieben worden (Taieb et al. 2003; Fitzgerald und Herold 1996; Cawood et al. 2005) sowie unsystematische Abweichungen. Damit kann keine allgemeingültige Anleitung geliefert werden, um die Ergebnisse zu interpretieren (Kane et al. 2007).

Auch bei der Analyse der Testosteronkonzentrationen von Neugeborenen gibt es zahlreiche Fallbeispiele, die bestätigen, dass IAs oft falsche und unzuverlässige Ergebnisse produzieren (Wudy et al. 1995; Fuqua et al. 1995; Tomlinson et al. 2004). Fuqua et al. verglichen Testosteronkonzentrationen von Säuglingen mit einem direkten IA und einem RIA, dem sie Flüssig-Flüssig-Extraktion und Säulenchromatographie vorschalteten. Sie konnten feststellen, dass in den ersten drei Lebenswochen die Testosteronkonzentration mit dem direkten IA im Mittel 3,8fach überschätzt wird und schlussfolgerten, dass dies zu unnötigen medizinischen Eingriffen hätte führen können (Fuqua et al. 1995). Auch Tomlinson berichtet von einem 46 XY Säugling mit weiblichen Genitalien, bei dem falsch hohe Testosteronwerte (Bayer Immuno IA) zunächst auf die Diagnose des Kompletten- Androgen-Insensitivitäts-Syndrom hinwiesen. Jedoch war Monate später nach erneuter Analyse kein Testosteron mehr nachweisbar, so dass schließlich eine komplette Gonadendysgenese diagnostiziert wurde (Tomlinson et al. 2004). Solche Beispiele verdeutlichen die Notwendigkeit valider Analysen, denn gerade bei einem zweifelhaften klinischen Bild können laborchemische Fehldiagnosen überflüssige invasive Eingriffen mit sich bringen und so den Patienten unnötig gefährden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IAs für Testosteronanalysen in niedrigen Konzentrationsbereichen (<1 ng/ml / 3,47 nmol/l), wie sie bei Frauen, Kindern und Männern im hypogonadalen Status zu finden sind, nicht die notwendige Verlässlichkeit und Richtigkeit aufweisen. Durch die beschriebenen analytischen Defizite kam es in der Vergangenheit nicht nur zu ungenauen - sondern auch zu falschen Ergebnissen (Hernández et al. 2011; Tomlinson et al. 2004; Taieb et al. 2003), welche die klinische Diagnostik nicht nur erschwerten, sondern sogar zu Fehldiagnosen führten (Fuqua et al. 1995). Herold und

Fitzgerald gehen sogar so weit, die provokative These aufzustellen, dass Raten gleiche oder genauere Ergebnisse als die gebräuchlichen Immunoassays liefern würde, da diese das Ziel um 200-500% verfehlten. Damit sei Raten eine schnellere, kostengünstigere und bessere Alternative, bei der man den Patienten noch nicht einmal Blut abnehmen müsse (Herold und Fitzgerald 2003).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Abweichungen der Analysenergebnisse in unserem Methodenvergleich auf eine mangelnde analytische Spezifität des Siemens ADVIA Centaur zurückzuführen sind. Von einem systematischen Fehler kann nicht ausgegangen werden, da die ermittelten Testosteronkonzentrationen in einer Spanne zwischen 40,6-550 % voneinander abweichen.

#### **4.2.1 Mögliche Ursachen für die Messdifferenzen der Analysemethoden**

In der Vergangenheit konnten bereits ungenaue und falsche Analysenergebnisse auf eine mangelnde analytische Spezifität der IAs zurückgeführt werden (vgl. 1.2.2.4, S.16). Hierbei stehen Kreuzreaktionen der AK im Vordergrund. Im Serum findet sich eine Vielzahl von Androgenen und ihren Metaboliten, die dem Testosteron strukturell sehr ähnlich sind und deshalb mit den Bindungsstellen der AK in Kontakt treten können. So konnten bereits konjugierte, wie auch unkonjugierte Steroidmetabolite als Interferenzen nachgewiesen werden (Heald et al. 2006; Warner et al. 2006; Middle 2007).

Dabei ist DHEAS als konjugiertes, hydrophiles Androgen bedeutend, denn es kommt bei beiden Geschlechtern in hoher Konzentration vor. Bei Frauen wird es ausschließlich in der Nebenniere gebildet und ist mit 1000-3000 ng/ml in vielfach höherer Konzentration als Testosteron im Serum vorhanden (Stanczyk 2006 a). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass DHEAS mit dem direkten, automatisierten Abbott Architect Immunoassay interferiert, und so falsch hohe Testosteronwerte in Frauen erklären kann (Warner et al. 2006). Auch Heald et al. untersuchten mögliche Gründe von Interferenzen in Testosteron-IAs in Seren von Frauen. Sie verglichen Testosteronkonzentrationen des direkten, automatisierten Abbott Architect IA vor und nach einem dazwischen geschalteten Extraktionsschritt mit Diethylether und erhielten eine mittlere Interferenz von 0,4 ng/ml (1,4 nmol/l). Indem sie die Interferenzen in Korrelation zu der jeweiligen DHEAS Konzentration setzten, konnte sie einen unimodalen Zusammenhang feststellen, der insbesondere bei einer Konzentration über 0,69 ng/ml (2,4 nmol/l) zur Geltung komme (Heald et al. 2006). Diese Ergebnisse veranlassten Middle et al. zu einer groß angelegten Studie, in der sie diesen Zusammenhang für Proben von Männern und Frauen in weiteren direkten IAs, wie Roche Elecsys, Roche E

170 Modular und Beckmann Access bestätigen konnten (Middle 2007). Middle et al. konnten in ihrer Studie nur minimale Effekte von DHEAS auf die Testosteronkonzentration beim Siemens Centaur nachweisen (Middle 2007). Für den Siemens Centaur ADVIA IA ist für DHEAS eine Kreuzreaktivität von weniger als 0,1% angegeben (Terrazas 2008). Somit sind in unserem Methodenvergleich die Abweichungen nach oben dadurch nicht zu erklären. Das Fallbeispiel von Hancock et al. verdeutlicht jedoch, dass das Wissen über diese Interferenz von Bedeutung ist, wenn z.B. beim Methodenwechsel sehr unterschiedliche Konzentrationen gemessen werden: So erhielten sie bei einer Patientin mit einem NNR-Karzinom und dadurch verursachten Morbus Cushing mit dem Roche E170 Elecsys eine Testosteronkonzentration von 4,9 ng/ml (17 nmol/l), wobei der Siemens Centaur eine Konzentration von 2,36 ng/ml (8,2 nmol/l) ermittelte. Diese unterschiedlichen Ergebnisse konnten sie auf eine Interferenz von DHEAS mit dem Roche IAs zurückführen (Hancock et al. 2008).

Auch der Einfluss von unkonjugierten Steroiden, wie DHEA und Androstendion, wurde diskutiert (Stanczyk et al. 2003). Aber da unkonjugierte Steroide in geringerer Konzentration als konjugierte Steroide vorkommen (Stanczyk et al. 2003), scheinen sie als potentielle Interferenzen weniger Bedeutung zu haben. Ebenfalls ist denkbar, dass das synthetische Androgen Methyltestosteron, das z.B. bei einer Testosteron-Substitutionstherapie verabreicht wird, zu falschen Ergebnissen führen kann, da es der Struktur des Testosteron sehr ähnlich ist (Stanczyk et al. 2003). So ist auch für den Siemens ADVIA Centaur eine Kreuzreaktion mit Methyltestosteron (0,68%) beschrieben, aber auch mit DHT (5,4%), Androstendion (0,94 %), und im geringen Maße mit 17 $\beta$ - Estradiol (0,2%) (Terrazas 2008). DHT und Estradiol liegen meist in geringeren Konzentrationen im Serum vor. Androstendion kann mit den physiologischen Konzentrationen zwischen 0,3 und 3,5 ng/ml durchaus einen Einfluss auf die Ergebnisse des untersuchten IA zeigen.

Nicht nur durch strukturell verwandte Moleküle, sondern auch durch den Einfluss von Plasmaproteinen, wie dem SHBG, kann es zu Messabweichungen kommen. SHBG wird als potentielle Interferenz jedoch kontrovers diskutiert. Dabei konnte SHBG in direkten RIAs (ohne vorherige Extraktion) als Interferenz demaskiert werden (Luppa und Neumeier 1990; Slaats et al. 1987), wobei besonders die RIAs betroffen seien, die Tritium als Markierung verwenden (Masters und Hähnel 1989). Weiterhin stellten Masters et al. fest, dass die Testosteronkonzentrationen falsch hoch gemessen werden, wenn die Konzentration des SHBG niedrig ist. Da Hyperandrogenämie meist mit verminderten SHBG Werten auftritt, könnten in Proben dieser Patienten die Testosteron-Werte überschätzt werden (Boots et al. 1998). Bodlaender stellte jedoch fest, dass der von Slaats et al. und auch Masters und Hähnel

untersuchte „Cout A Count Testosteron RIA“ bereits überarbeitet sei, und SHBG keine interferierende Substanz sei (Bodlaender 1990).

Des Weiteren können heterophile AK die Bindungsaffinität des Antikörpers verändern, und so zu falsch hohen, wie auch zu falsch niedrigen Ergebnissen führen (vgl. 1.2.2.4, S.16). In der Testanleitung des Siemens Centaur wird auf die potentielle Interferenz mit heterophilen AK hingewiesen, besonders wenn der Patient viel Kontakt zu Tieren habe (Terrazas 2008). Aber auch hierdurch ließe sich höchstens ein Teil der Abweichungen erklären. Da Interferenzen patientenspezifisch sind, ist es sehr zeitaufwendig und mühsam, die genaue Ursache zu finden. Deshalb bleiben sie oftmals unerkannt (Ismail et al. 2002).

Vor allem die direkten IAs sind anfällig für Interferenzen, da sie auf vorgeschaltete Aufreinigungsschritte verzichten und somit potentiell interferierende Substanzen nicht entfernt werden können (Fitzgerald und Herold 1996; Taieb et al. 2003; Moal et al. 2007; Stanczyk et al. 2003; Kane et al. 2007). In einigen Fällen konnten Interferenzen durch vorgeschaltete Aufreinigungsschritte, wie Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether, entfernt oder vermindert werden (Torjesen und Bjøro 1996; Heald et al. 2006; Warner et al. 2006; Tomlinson et al. 2004; Hernández et al. 2011). So berichten Hernandez et al. von einer 51-jährigen postmenopausalen Frau, die mit einer extrem erhöhten Testosteronkonzentration von 5,76 ng/ml (Beckmann Coulter) auffiel. Im Vergleich dazu wurde das Patientenserum mit dem Roche Elecsys verglichen, wobei ein Wert von 0,30 ng/ml gemessen wurde. Interessanterweise konnte nach Extraktion der Probe mit Diethylether mit dem Beckmann Coulter ein vergleichbarer Wert von 0,26 ng/ml gemessen werden. Da andere Hormone, wie DHEAS, Androstendion, 17-OHP und auch das SHBG, im Referenzbereich waren, ist eine andere, unbekannte Interferenz anzunehmen (Hernández et al. 2011). Wenn wie hier die Interferenz durch einen Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritt entfernt werden kann, deutet dies auf eine hydrophile Substanz hin. Das unterstützt die These, dass als Interferenzen konjugierte Steroidmetabolite wahrscheinlich sind (Kane et al. 2007; Taieb et al. 2003; Herold und Fitzgerald 2003; Heald et al. 2006). Dabei betonen Heald et al., dass eine interferierende Substanz wie DHEAS sowohl im Serum bei Frauen, als auch bei Männern vorkommen kann, bei Frauen jedoch stärker ins Gewicht fällt, da sie nicht wie bei Männern durch hohe Testosteronkonzentrationen maskiert werden kann (Heald et al. 2006). Dies könnte in unserem Methodenvergleich die vergleichsweise gute Übereinstimmung der Analyseergebnisse im hohen Konzentrationsbereich im Vergleich zum niedrigen Konzentrationsbereich erklären.

Aufgrund dieser Beobachtungen werden von einigen Wissenschaftlern vorgeschaltete Extraktionsschritte für die Analyse von Säuglingen, Kindern (Fuqua et al. 1995) und Frauen vor der immunologischen Analyse gefordert (Fitzgerald und Herold 1996). Fehlende vorgeschaltete Extraktionsschritte sind jedoch keine ausreichende Erklärung für fehlerhafte Messungen, da sie nur die Abweichungen nach oben erklären, nicht aber nach unten. Außerdem zeigten Cawood et al. in ihrem Methodenvergleich, dass auch der untersuchte RIA mit vorgeschalteten Extraktionsschritten in der Mehrzahl der Fälle die Hormonkonzentration falsch hoch misst (Cawood et al. 2005). Ebenfalls betonen Fitzgerald und Herold, dass RIAs mit vorgeschalteten Aufreinigungsschritten nicht per se zuverlässig seien, so stimme ihre ID-GC/MS Methode in Seren von Frauen nicht mit dem von Wians et al. untersuchten RIA überein (Wians und Stuart 1997).

Neben den Defiziten der analytischen Spezifität der Immunoassays ist es möglich, dass eine mangelnde Sensitivität für einen Teil der Abweichungen verantwortlich ist. So bemängeln Taieb et al., dass die untere Bestimmungsgrenze bei vielen untersuchten Immunoassays nicht ausreicht, um niedrige Konzentrationen zuverlässig messen zu können (Taieb et al. 2002). Beim Siemens Centaur ist die BG mit 0,1 ng/ml angegeben.

Des Weiteren ist eine falsche Kalibrierung als Ursache nicht auszuschließen, besonders wenn ein systematischer Bias beobachtet wird. Fitzgerald und Herold vermuten z.B. eine falsche Kalibrierung, da sie die Kalibratorlösung mit ihrer GC-NCI-MS-Methode systematisch niedriger gemessen haben (Fitzgerald und Herold 1996). Nach Herstellerangaben konnte im Methodenvergleich zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und dem automatisierten ACS:180 in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 ng/ml bis 14,5 ng/ml eine gute Übereinstimmung der Analyseergebnisse mit  $r^2=0,99$  festgestellt werden. Dieser IA wird nach Fitzgerald und Herold von der Food and Drug Administration empfohlen, um eine wesentliche Übereinstimmung zwischen Analysemethoden zu demonstrieren (Herold und Fitzgerald 2003). Fitzgerald und Herold konnten jedoch zeigen, dass dieser in niedrigen Konzentrationen nicht verlässlich misst (Fitzgerald und Herold 1996). Wir konnten jedoch keine systematische Abweichung feststellen, insofern ist eine ungenaue Kalibrierung als alleinige Ursache unwahrscheinlich.

Es lässt sich feststellen, dass die beobachteten Abweichungen der Analyseergebnisse im niedrigen Konzentrationsbereich auf eine Vielzahl möglicher Ursachen zurückzuführen sein können. Dabei konnte eine mangelnde analytische Spezifität von IAs, die auf dem gleichen Testprinzip beruhen, wie der untersuchte Siemens ADVIA Centaur, in vielen Fallbeispielen aufgedeckt werden. Zum einen kommen Interferenzen durch heterophile AK oder strukturell

verwandte Moleküle in Frage, wie Androstendion oder konjugierte Steroidmetabolite. Zum anderen können die Abweichungen durch die Kalibrierung oder eine mangelnde Sensitivität im niedrigen Konzentrationsbereich begründet sein. Allerdings konnte kein systematischer Fehler beobachtet werden, vielmehr wichen die Testosteronkonzentrationen in einer Spanne zwischen 40% und 550% voneinander ab. Damit kommt eine abweichende Kalibrierung als alleinige Ursache nicht in Frage.

#### **4.2.2 Möglichkeiten zur Verbesserung der Verlässlichkeit und Genauigkeit von Testosteronanalysen**

Zur Testosteronanalyse steht eine Vielfalt an Methoden zur Verfügung, die von manuellen laboreigenen RIAs, über automatisierten LIAs für die Routineanalytik bis hin zur massenspektrometrischen Methoden reicht. Dabei haben massenspektrometrische Methoden, gekoppelt mit der Gaschromatographie, seit längerem den Stellenwert des Goldstandards (Siekmann 1979). Durch die Optimierungen bezüglich der Sensitivität gewinnt auch die LC/MS/MS zunehmend an Bedeutung und wird als Referenzmethode gesehen. Dabei ist es durch Entwicklungen der massenspektrometrischen Methoden möglich geworden, die Genauigkeit und Sensitivität von IAs im Pikogramm-Bereich zu evaluieren. So konnten durch diese Referenzmethoden die Grenzen sowohl der automatisierten IAs als auch der konventionellen RIAs in zahlreichen Studien aufgedeckt werden. Die massenspektrometrischen Methoden sind jedoch nur wenigen Laboren vorbehalten, so dass in der Routinenanalytik meistens IAs verwendet werden. Da in der Praxis somit viele unterschiedliche Methoden verwendet werden, ist die Vergleichbarkeit untereinander wichtig.

Die Vergleichbarkeit kann durch eine einheitliche Validierung verbessert werden (Moal et al. 2007; Taieb et al. 2003). Weiterhin gibt es auf Grund mangelnder Standardisierung und der Vielfalt an Methoden eine hohe Interassay-Variabilität und keine einheitlichen Referenzintervalle, um physiologische von pathologischen Konzentrationen trennen zu können (Stanczyk 2006b). Die Notwendigkeit der Standardisierung wurde bereits erkannt und wird forciert (Stanczyk et al. 2007; Vesper und Botelho 2010; Rosner und Vesper 2010). So wurde in der EU 2002 das Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) gegründet, das u.a. Referenzmaterialien zertifiziert. Indem zertifizierte Referenzmaterialien vertrieben werden, wie standardisierte Kalibrationslösungen, kann jedes Labor seine eigenen Methoden validieren. Außerdem werden Kontrollproben hergestellt, mit denen die Referenzlabore an externen Qualitätskontrollen teilnehmen können und damit eine Langzeit-Evaluation von Routinemethoden, wie den IAs, ermöglicht wird. In der EU werden

Methoden, die validierte Kalibratoren verwenden, als Reference Measurements Procedures (RMPs) bezeichnet (Shackleton 2010). Das JCTLM zertifiziert solche RMPs und listet außerdem die Referenzlabore (Siekmann 2007). IAs werden jedoch häufig nicht mit den genannten Referenzmethoden validiert. Vielmehr werden IAs zur Validierung anderer IAs herangezogen (Wians und Stuart 1997; Cawood et al. 2005), ohne dass diese selbst vorher gegen eine Referenzmethode validiert worden sind. So betonen auch Fitzgerald und Herold, dass nach Richtlinien der Food and Drug Administration der ACS:180 IA zur Validierung anderer IAs herangezogen werden kann, obwohl dieser nicht zur Testosteronanalyse in niedrigen Konzentrationen geeignet ist (Herold und Fitzgerald 2003). Dadurch bleiben Fehler in den Analysemethoden natürlich bestehen. Es ist jedoch zu beachten, dass auch die Referenzmethoden mit zertifizierten Kalibrationslösungen überprüft werden müssten, denn wie Vesper et al. feststellen, haben auch massenspektrometrische Methoden eine gewisse Interassay-Variabilität (Vesper und Thienpont 2009). Diese liege in den Unterschieden in den Probenaufarbeitungen, den Methoden, den verschiedenen Geräten und Materialien und Standardsubstanzen, begründet (Vesper et al. 2009). Dabei könnte durch eine einheitlichere Validierung mit zertifizierten Referenzmaterialien und mit Referenzmethoden die hohe Interassay-Variabilität aufgehoben und damit auch die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen verschiedener Laboratorien ermöglicht werden.

Um vergleichbare Referenzbereiche der Hormonkonzentrationen zu bekommen, müsste zunächst jedes Labor eigene Referenzbereiche, z.B. aufgrund statistischer Daten festlegen. Indem die Ergebnisse mehrerer Labore, die mit validierten Methoden messen, zusammengeschlossen werden, könnten so übergeordnete Referenzbereiche festgelegt werden (Rosner und Vesper 2010).

Bis die Standardisierung in der Steroidhormonanalytik Eingang gefunden hat, ist es aufgrund der beschriebenen Unzuverlässigkeiten der IAs zunächst wichtig, dass die Leistungsfähigkeit und Grenzen bisheriger Methoden bekannt sind. So dürfen Analyseergebnisse nicht einfach hingenommen werden, sondern müssen anhand des klinischen Bildes und der durchgeführten Methode hinterfragt werden. Laborchemische Fehldiagnosen können schließlich eine Gefahr für den Patienten darstellen, weil sie invasive Eingriffe oder Therapien zur Folge haben, oder auch weil Krankheiten aufgrund mangelnder Sensitivität oder Spezifität der Methoden unentdeckt bleiben können. Wenn Ergebnisse, die aufgrund des klinischen Bildes zweifelhaft erscheinen, oder wenn niedrige Konzentrationen erwartet werden, die eine hohe Sensitivität und Spezifität erfordern, sollte auf die zuverlässigeren Referenzmethoden zurückgegriffen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es von großer Bedeutung bei der Ermittlung von Befunden ist, dass die Grenzen bisheriger Analysen in Laboren und bei den auswertenden Personen bekannt sind. Des Weiteren ist eine Standardisierung in der Testosteronanalytik notwendig, um eine Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse unterschiedlicher Methoden erzielen zu können. Dies kann u.a. durch die Anerkennung von Referenzmethoden und Verfügbarkeit von zertifizierten Referenzmaterialien erreicht werden. Auch die in dieser Arbeit etablierte GC-NCI-MS-Methode sollte demnach mit standardisierten Kontrollproben und Kalibrationslösungen überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die GC-NCI-MS-Methode von Herold und Fitzgerald (Fitzgerald und Herold 1996) eine robuste, spezifische und präzise GC-NCI-MS-Methode mit sehr guter Sensitivität zur Testosteronanalyse etabliert. Diese konnte gleichzeitig zur quantitativen Analyse von  $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron erweitert werden.

Dabei wurde in allen Schritten der Methodenentwicklung das Ziel verfolgt, die Methode hinsichtlich Routinetauglichkeit, Zeitmanagement, Trennleistung, Empfindlichkeit und benötigten Probenvolumens zu optimieren. Eine vergleichsweise einfache Probenvorbereitung ermöglichte eine erfolgreiche Aufreinigung der Probe und Anreicherung der Analyten. So konnten die Hormone mit der etablierten Methode aus 1 ml Serum zuverlässig quantifiziert werden. Dazu wurde der Probe direkt am Anfang der Probenvorbereitung deuterierter IStd zugegeben. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass mögliche Analytverluste, die während der Probenvorbereitung entstehen, ausgeglichen werden.

Da die Steroidhormone nur in sehr geringen Konzentrationen in einer komplexen Matrix im Serum vorliegen, waren zunächst Anreicherungs- und Aufreinigungsschritte notwendig. Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion stellte sich Ethylacetat als sehr selektives Lösungsmittel heraus, mit dem für die untersuchten Hormone ein hoher spezifischer Respons zu verzeichnen war. Die Proben konnten durch ein Clean-up mit RP C18 SPE-Säulen weiter aufgereinigt und angereichert werden. Die untersuchten Steroidhormone konnten mit Pentafluorbenzylhydroxylamin-hydrochlorid und MSTFA/TMCS (99:1) zuverlässig derivatisiert werden. Dabei konnten stabile Fragment- bzw. Molekülonen generiert werden, die sich im Massenspektrometer mit hoher relativer Intensität detektieren ließen. Neben einer Quantifizierung wurde zusätzlich jeweils ein Referenzion zur qualitativen Absicherung ausgewählt. Durch ein geeignetes Temperaturprogramm im Säulenofen des Gaschromatographen ließen sich die Hormone zu unterschiedlichen Retentionszeiten und basisliniengerecht voneinander trennen. Die Aufreinigungs- und Anreicherungs-schritte stellten sich als sehr erfolgreich dar; so waren nur ein geringes Untergrundrauschen und keine störenden Nebenpeaks in den Chromatogrammen zu verzeichnen.

Daneben konnte für die Testosteronanalyse gezeigt werden, dass eine Minimierung des Untersuchungsvolumens auf nur 100  $\mu$ l möglich ist. Ein Methodenvergleich zwischen der Ausgangsmethode zur Testosteronanalyse aus 1 ml Serum und der adaptierten Mikromethode mit 100  $\mu$ l Serum hat eine sehr gute Übereinstimmung der ermittelten Analysenergebnisse mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,999 gezeigt.

Anschließend wurden die etablierten Methoden gemäß den Richtlinien der ICH einer Validierung unterzogen, um sie zu charakterisieren und zu überprüfen, ob die Analyten im Serum reproduzierbar und zuverlässig quantifiziert werden können. Für die Testosteronanalyse konnte in dem Arbeitsbereich zwischen 0,148 ng/ml und 10,0 ng/ml ein hohes Maß an Linearität, Präzision, Stabilität und Richtigkeit gezeigt werden. Auch für 17-OHP konnte in dem Arbeitsbereich von 0,5 ng/ml bis 5,0 ng/ml eine gute Linearität und Spezifität sowie eine ausreichende Präzision und Richtigkeit nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur Stabilität zeigten für 17-OHP, dass die aufgearbeiteten Proben noch am selben Tag vermessen werden müssen.

Anschließend wurde die etablierte Methode zur Testosteronanalyse mit dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay verglichen. Hier sollte aufgrund der vielseitig beschriebenen Ungenauigkeiten und Unzuverlässigkeiten der Immunoassays die Leistungsfähigkeit der Methoden verglichen werden. Dabei wurden zwanzig Proben von Frauen und zehn Proben von Männern mit beiden Methoden analysiert. In dem untersuchten Konzentrationsbereich von 2,62 ng/ml bis 9,29 ng/ml konnte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,97 eine sehr gute Übereinstimmung der Analysenergebnisse beider Methoden gezeigt werden. Im Gegensatz dazu fiel in dem Konzentrationsbereich von 0,05 ng/ml bis 0,51 ng/ml die geringe Übereinstimmung ( $r = 0,77$ ) der Messergebnisse auf. Dabei wurden mit einer breiten Streuung zwischen 40,6 % und 550 % mit dem untersuchten Immunoassay im Mittel um 158,9 % höhere Konzentrationen erzielt.

Dies spiegelt die aktuelle Problematik in der Testosteronanalytik wider. So konnten Messdifferenzen zwischen Referenzmethoden und den automatisierten Immunoassays, die in der Routinenanalytik gewöhnlich eingesetzt werden, meist auf eine mangelnde analytische Spezifität als auch ungenügende Validierung zurückgeführt werden. Es konnte dargestellt werden, dass auch in unserem Methodenvergleich Interferenzen möglich sind, durch z.B. Androstendion, konjugierte Steroidmetabolite oder heterophile AK, aufgrund einer mangelnden Spezifität der automatisierten Immunoassays und der in der Literatur beschriebenen Abweichungen. Jedoch wurden in den Serumproben keine weiteren Analyten oder AK analysiert. Des Weiteren wurde dargestellt, dass die Messabweichungen auf einer mangelnden Validierung oder Sensitivität in diesem sehr niedrigen Konzentrationsbereich beruhen können.

Die etablierten Methoden könnten noch weiter optimiert werden. So sollte die Kalibrierung für 17-OHP sowohl in den unteren als auch in den oberen Konzentrationsbereichen ausgeweitet werden, um die breite physiologische und pathologische Konzentrationsspanne zuverlässig abdecken zu können. Um neben den Wiederfindungsexperimenten eine weitere

Aussage bezüglich der Richtigkeit der Methode vornehmen zu können und um sie auf systematische Fehler hin zu untersuchen, müsste standardisiertes Referenzmaterial analysiert und mit den ermittelten Ergebnissen verglichen werden.

Einen großen Fortschritt stellt die gezeigte Möglichkeit einer Einführung einer Mikromethode und der damit breiteren Einsetzbarkeit gerade im Bereich der Pädiatrie dar. Hier wäre vor der Anwendung in der Routine zunächst eine Validierung notwendig. Weiterhin ist der Ausbau der Mikromethode zur Analyse von 17-OHP besonders erstrebenswert, um z.B. das AGS im Neugeborenenalter zuverlässig diagnostizieren zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Methode zur gleichzeitigen Analyse weiterer Steroidhormone, wie Aldosteron, Androstendion und Cortisol, ausbaufähig ist. Auf lange Sicht könnte mit dieser Methode damit eine Vielzahl von Hormonen aus einer einzigen Serumprobe analysiert werden. Hier wären zunächst die Überprüfung auf Linearität und eine Validierung anzustreben.

Wenn niedrige Konzentrationen erwartet werden, wie Testosteronanalysen bei Frauen, oder wenn zweifelhafte Analysenergebnisse vorliegen, sollte demnach auf die verlässlichen massenspektrometrischen Referenzmethoden zurückgegriffen werden. Damit konnte in dieser Arbeit mit der Etablierung einer GC-NCI-MS-Methode zur Analyse von Testosteron und 17-OHP ein Beitrag geleistet werden, um Analysenergebnisse verlässlicher zu machen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham GE (1969): Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J Clin Endocrinol Metab* 29, 866–870
- Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinsky D, Odell WD (1971): Radio-Immunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 32, 619–624
- Allman BL, Short F, James VH (1981): Fluoroimmunoassay of progesterone in human serum or plasma. *Clin Chem* 27, 1176–1179
- Baba S, Shinohara Y, Kasuya Y (1979): Determination of plasma testosterone by mass fragmentography using testosterone-19-d<sub>3</sub> as an internal standard. Comparison with radioimmunoassay. *J Chromatogr A* 162, 529–537
- Barron JL, Kewley C, Millar RP, Gray P (1980): A radio-immunoassay of 17-alpha-hydroxyprogesterone. *S Afr Med J* 57, 497–500
- Bertoft E, Eskola JU, Nääntö V, Lövgren T (1984): Competitive solid-phase immunoassay of testosterone using time-resolved fluorescence. *FEBS Lett* 173, 213–216
- Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW (2001): Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 170, 27–38
- Biancotto G, Angeletti R, Traldi P, Silvestri M, Saccon M, Guidugli F (2002): Determination of 17beta-estradiol in bovine plasma: development of a highly sensitive technique by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry using negative chemical ionization. *J Mass Spectrom* 37, 1266–1271
- Bodlaender P (1990): No SHBG interference with the "Coat-A-Count Total Testosterone" direct RIA kit. *Clin Chem* 36, 173
- Boots LR, Potter S, Potter D, Azziz R (1998): Measurement of total serum testosterone levels using commercially available kits: high degree of between-kit variability. *Fertil Steril* 69, 286–292
- Brandhorst G, Streit F, Kratzsch J, Schiettecatte J, Roth HJ, Luppä PB, Körner A, Kiess W, Binder L, Oellerich M (2011): Multicenter evaluation of a new automated electrochemiluminescence immunoassay for the quantification of testosterone compared to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 44, 264–267
- Breuer H, Nocke L, Siekmann L (1970): Neue Methoden zur Bestimmung von Steroidhormonen. *Z Klin Chem Klin Biochem* 8, 329–338
- Budzikiewicz H: Massenspektrometrie. 4. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 1998
- Bundesärztekammer (2008): Bekanntmachungen: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 105: A-341 / B-305 / C-301, 341–355
- Caulfield MP, Lynn T, Gottschalk ME, Jones KL, Taylor NF, Malunowicz EM, Shackleton CHL, Reitz RE, Fisher DA (2002): The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3682–3690
- Cawood ML, Field HP, Ford CG, Gillingwater S, Kicman A, Cowan D, Barth JH (2005): Testosterone measurement by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: validation of a method for routine clinical practice. *Clin Chem* 51, 1472–1479

- Check JH, Ubelacker L, Lauer CC (1995): Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. *Gynecol Obstet Invest* 40, 139–140
- Choi MH, Chung BC (1999): GC-MS determination of steroids related to androgen biosynthesis in human hair with pentafluorophenyldimethylsilyl-trimethylsilyl derivatisation. *Analyst* 124, 1297–1300
- Choi MH, Chung BC, Lee W, Lee UC, Kim Y (1999): Determination of anabolic steroids by gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography/negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry with heptafluorobutyric anhydride derivatization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 376–380
- Clarke BL, Khosla S (2009): Androgens and bone. *Steroids* 74, 296-305
- Collins WP, Mansfield MD, Alladina NS, Sommerville IF (1972): Radioimmunoassay of plasma testosterone. *J Steroid Biochem* 3, 333–348
- Davison SL, Bell R (2006): Androgen physiology. *Semin Reprod Med* 24, 71–77
- de Boever J, Kohen F, Vandekerckhove D, van Maele G (1984): Solid-phase chemiluminescence immunoassay for progesterone in unextracted serum. *Clin Chem* 30, 1637–1641
- Demers LM (2008): Testosterone and estradiol assays: current and future trends. *Steroids* 73, 1333–1338
- Demers LM (2010): Androgen deficiency in women; role of accurate testosterone measurements. *Maturitas* 67, 39–45
- Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S (2006): Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 295, 1288-99
- Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T, Ryan D (1972): Radioimmunoassay of plasma testosterone. *Clin Chim Acta* 37, 109–116
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D (1981): Transport of steroid hormones: Binding of 21 endogenous steroids to both Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53, 58-68
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874
- Eskola JU, Nääntö V, Meurling L, Lövgren TN (1985): Direct solid-phase time-resolved immunofluorometric assay of cortisol in serum. *Clin Chem* 31, 1731–1734
- Fink HA, Ewing SK, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Taylor BC, Cauley JA, Orwoll ES (2006): Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3908-15
- Fitzgerald RL, Herold DA (1996): Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 42, 749–755
- Fuqua JS, Sher ES, Migeon CJ, Berkovitz GD (1995): Assay of plasma testosterone during the first six months of life: importance of chromatographic purification of steroids. *Clin Chem* 41, 1146–1149
- Furuyama S, Mayes DM, Nugent CA (1970): A radioimmunoassay for plasma testosterone. *Steroids* 16, 415–428
- Golay MJE (1957): Vapor Phase Chromatography and Telegrapher's Equation. *Anal Chem* 29, 928–932

- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002): Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* **346**, 340–352
- Gwynne JT, Strauss JF (1982): The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* **3**, 299–329
- Hancock S, Still RA, Fielding AM, Doran JF, Stephens JW (2008): A rare cause of Cushing's syndrome demonstrates analytical discrepancies between the Roche E170 and Bayer Centaur testosterone assays. *Ann Clin Biochem* **45**, 328–330
- Heald AH, Butterworth A, Kane JW, Borzomato J, Taylor NF, Layton T, Kilpatrick ES, Rudenski A (2006): Investigation into possible causes of interference in serum testosterone measurement in women. *Ann Clin Biochem* **43**, 189–195
- Hernández N, Mauri M, Alfayate R, Torregrosa ME, Chinchilla V (2011): A fifty-one-year-old woman with raised testosterone concentration. *Endocrinol Nutr* **58**, 50–51
- Herold DA, Fitzgerald RL (2003): Immunoassays for testosterone in women: Better than a Guess? *Clin Chem* **49**, 1250–1251
- Hill M, Havlíková H, Vrbíková J, Kancheva R, Kancheva L, Pouzar V, Cerný I, Stárka L (2005): The identification and simultaneous quantification of 7-hydroxylated metabolites of pregnenolone, dehydroepiandrosterone, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -androstenediol, and testosterone in human serum using gas chromatography-mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**, 187–200
- Hindawi RK, Gaskell SJ, Read GF, Riad-Fahmy D (1980): A simple direct solid-phase enzymeimmunoassay for cortisol in plasma. *Ann Clin Biochem* **17**, 53–59
- Holmes JC, Morrell FA (1957): Oscillographic Mass Spectrometric Monitoring of Gas Chromatography. *Appl Spectrosc* **11**, 86–87
- Honour JW (2006): Gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **324**, 53-74
- Honour JW (2010): Steroid Assays in Paediatric Endocrinology. *JCRPE* **2**, 1–16
- Horning MG, Knox KL, Dalgliesh CE, Horning EC (1966): Gas-liquid chromatographic study and estimation of several urinary aromatic acids. *Anal Biochem* **17**, 244–257
- Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Lin S, Oertli CU, Stillwell RN (1977): Development and use of analytical systems based on mass spectrometry. *Clin Chem* **23**, 13-21
- Hugues JN, Theron-Gerard L, Coussieu C, Pasquier M, Dewailly D, Cedrin-Durnerin I (2010): Assessment of theca cell function prior to controlled ovarian stimulation: The predictive value of serum basal/steroid levels. *Hum Reprod* **25**, 228-34
- ICH (2007): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), URL: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>, zuletzt geprüft am 20.05.2012
- Ismail AA, Barth JH (2001): Endocrinology of gynaecomastia. *Ann Clin Biochem* **38**, 596-607
- Ismail AA, Walker PL, Cawood ML, Barth JH (2002): Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem* **39**, 366–373
- James AT, Martin AJP (1952): Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J* **50**, 679–690
- Joyce BG, Wilson DW, Read GF, Riad-Fahmy R (1978): An improved enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Clin Chem* **24**, 2099–2102
- Kane J, Middle J, Cawood M (2007): Measurement of serum testosterone in women; what should we do? *Ann Clin Biochem* **44**, 5–15

- Klee (2004): Interferences in hormone immunoassays. *Clin Lab Med* 1, 1–18
- Knapp DR: Handbook of analytical derivatization reactions. Wiley, New York 1979
- Kohen F, Pazzagli M, Kim JB, Lindner HR (1980): An immunoassay for plasma cortisol based on chemiluminescence. *Steroids* 36, 421–437
- Köhler G, Milstein C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497
- Kromidas S: Validierung in der Analytik. (Die Praxis der instrumentellen Analytik). Wiley-VCH-Verlag, Weinheim 1999
- Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CHL (2010): Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 496–504
- Kuwahara A, Kamada M, Irahara M, Naka O, Yamashita T, Aono T (1998): Autoantibody against testosterone in a woman with hypergonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 14–16
- Laughlin GA, Goodell V, Barrett-Connor E (2010): Extremes of endogenous testosterone are associated with increased risk of incident coronary events in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 740–7
- Lawson A.M., Gaskell S.J., Holm M. (1985): International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Office for Reference Methods and Materials (ORMM). Methodological aspects on quantitative mass spectrometry used for accuracy control in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 23, 433–441
- Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, Vittinghoff E, Hanes V, Cauley JA, Chandler W, Settlege J, Beattie MS, Folkerd E et al. (2006): Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3791–3797
- Legrand C, Dousset B, Tronel H, Belleville F, Nabet P (1995): Measurement of plasma testosterone by gas chromatography-negative-ion mass spectrometry using pentafluoropropionic derivatives. *J Chromatogr B Biomed Appl* 663, 187–192
- Lövgren TN (1987): Time-resolved fluoroimmunoassay of steroid hormones. *J Steroid Biochem* 27, 47–51
- Luppa P, Neumeier D (1990): Effect of sex-hormone-binding globulin on no-extraction immunoassays for testosterone. *Clin Chem* 36, 172–173
- Magnisali P, Dracopoulou M, Mataragas M, Dacou-Voutetakis A, Moutsatsou P (2008): Routine method for the simultaneous quantification of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, cortisol, and pregnenolone in human serum of neonates using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1206, 166–177
- Magnisali P, Chalioti M, Livadara T, Mataragas M, Paliatsiou S, Malamitsi-Puchner A, Moutsatsou P (2011): Simultaneous quantification of 17 $\alpha$ -OH progesterone, 11-deoxycortisol,  $\Delta$ 4-androstenedione, cortisol and cortisone in newborn blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 1565–1572
- Makela SK, Ellis G (1988): Nonspecificity of a direct 17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. *Clin Chem* 34, 2070–2075

- Mason JI, Rainey WE (1987): Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 140–147
- Masters AM, Hähnel R (1989): Investigation of sex-hormone binding globulin interference in direct radioimmunoassays for testosterone and estradiol. *Clin Chem* 35, 979–984
- Matsumoto AM (2002): Andropause. Clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol* 57, 76–99
- Matsumoto AM (2004): Serum Testosterone Assays--Accuracy Matters. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 520–524
- McDonald JG, Matthew S, Auchus RJ (2011): Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. *Horm Cancer* 2, 324–332
- MedCalc Software bvba, Version 12.3.0, Mariakerke, Belgien 2011
- Middle JG (2007): Dehydroepiandrosterone sulphate interferes in many direct immunoassays for testosterone. *Ann Clin Biochem* 44, 173–177
- Miller WL (1988): Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9, 295–318
- Miller WL (2002): Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* 198, 7-14
- Miller WL, Auchus RJ (2011): The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 1, 81–151
- Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malthièry Y, Gallois Y (2007): Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta* 386, 12–19
- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG (1987): Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1, 1–28
- Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, Ibañez L, Knochenhauer ES, Marcondes JA, Mendonca BB, Pignatelli D, Pugeat M, Rohmer V, Speiser PW, Witchel SF (2000): 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 183, 1468-74
- MVA, Methoden-Validierung in der Analytik, Version 2.0, NOVIA GmbH, Frankfurt 2001
- Nieschlag E, Loriaux DL (1972): Radioimmunoassay for Plasma Testosterone. *Clin Chem Lab Med* 10, 164–168
- Norman AW, Litwack G: Hormones. 2. Auflage; Academic Press, San Diego 1997
- Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, Vandenput L, Mellström D, Tivesten A (2011): High Serum Testosterone Is Associated With Reduced Risk of Cardiovascular Events in Elderly Men The MrOS (Osteoporotic Fractures in Men) Study in Sweden. *J Am Coll Cardiol* 58, 1674–1681
- Otto M (2011): Analytische Chemie. 4. Auflage; Wiley-VCH Verlag & Co, Weinheim 2011
- Parr MK, Schänzer W (2010): Detection of the misuse of steroids in doping control. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 528–537
- Pratt JJ, Woldring MG, Villerius L (1978): Chemiluminescence-linked immunoassay. *J Immunol Methods* 21, 179–184

- Rauh M, Gröschl M, Rascher W, Dörr HG (2006): Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 71, 450–458
- Rogol AD (2002): Androgens and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 198, 25-9
- Rosenfield RL, Lucky AW (1993): Acne, hirsutism, and alopecia in adolescent girls. Clinical expressions of androgen excess. *Endocrinol Metab Clin North Am* 22, 507-32
- Rosner W, Vesper H (2010): Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 4542–4548
- Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H (2007): Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 405–413
- Schall RF, Tenoso HJ (1981): Alternatives to radioimmunoassay: labels and methods. *Clin Chem* 27, 1157–1164
- Schulte E: Flüssigchromatographie, Gaschromatographie und Probenvorbereitung. Kurze Einführung in die Praxis. Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster, Münster 2007
- Schwarz S, Boyd J (1982): Interference of danazol with the radioimmunoassay of steroid hormones. *J Steroid Biochem* 16, 823–826
- Schwedt G: Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis. 2. Auflage; Wiley-VCH Verlag & Co, Weinheim 2008
- Shackleton C (1985): Mass spectrometry: application to steroid and peptide research. *Endocr Rev* 6, 441–486
- Shackleton C (2010): Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 481–490
- Shackleton C, Marcos J, Arlt W, Hauffa BP (2004): Prenatal diagnosis of P450 oxidoreductase deficiency (ORD): a disorder causing low pregnancy estriol, maternal and fetal virilization, and the Antley-Bixler syndrome phenotype. *Am J Med Genet A* 2, 105–112
- Shackleton C, Marcos J, Palomaki GE, Craig WY, Kelley RI, Kratz LE, Haddow JE (2007): Dehydrosteroid measurements in maternal urine or serum for the prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *Am J Med Genet A* 18, 2129–2136
- Shang Y, Myers M, Brown M (2002): Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 9, 601-10
- Sharp AM, Fraser IS, Robertson S, Turtle JR (1981): Positive interference by danazol in a testosterone radioimmunoassay kit procedure. *Clin Chem* 27, 603–604
- Sharp AM, Fraser IS, Caterson ID (1983): Further studies on danazol interference in testosterone radioimmunoassays. *Clin Chem* 29, 141–143
- Shimadzu Corporation: GCsolution Software. Chromatography Workstation. Version 2.3, Shimadzu Duisburg, Duisburg o. J.
- Shiraishi S, Lee PWN, Leung A, Goh VHH, Swerdloff RS, Wang C (2008): Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 54, 1855–1863
- Siekmann L (1979): Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution--mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. *J Steroid Biochem* 11, 117–123

- Siekmann L (2007): Requirements for reference (calibration) laboratories in laboratory medicine. *Clin Biochem Rev* 28, 149–154
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. (1994): Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15, 342-55
- Singh RJ (2010): Quantitation of 17-OH-progesterone (OHPG) for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Methods Mol. Biol* 603, 271–277
- Sjövall J, Vihko R (1965): Determination of androsterone and dehydroepiandrosterone sulfates in human serum by gas-liquid chromatography. *Steroids* 6, 597–604
- Slaats EH, Kennedy JC, Kruijswijk H (1987): Interference of sex-hormone binding globulin in the "Coat-A-Count" testosterone no-extraction radioimmunoassay. *Clin Chem* 33, 300–302
- Sparkman OD, Penton Z, Kitson FG: Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide. 2. Auflage; Elsevier, Amsterdam 2011
- Speiser PW, White PC (2003): Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 349, 776-88
- Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI (1985): High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37, 650-67
- Stanczyk FZ (2006 a): Diagnosis of hyperandrogenism: biochemical criteria. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 177–191
- Stanczyk FZ (2006 b): Measurement of androgens in women. *Semin Reprod Med* 24, 78–85
- Stanczyk und Clarke 2010: Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 491–495
- Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S, Paulson RJ (2003): Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids* 68, 1173–1178
- Stanczyk FZ, Lee JS, RJ (2007): Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1713–1719
- Stat Soft I: STATISTICA. Data analysis software system. Stat Soft (Europe) GmbH, Hamburg 2011
- Stocco DM (2001): StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193–213
- Stocco DM, Clark BJ (1996): Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17, 221–244
- Stöckl D, Reinauer H, Thienpont LM, Leenheer AP de (1991): Determination of aldosterone in human serum by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry using a new heptafluorobutyryl derivative. *Biol Mass Spectrom* 20, 657–664
- Sweeley CC, Horning EC (1960): Microanalytical separation of steroids by gas chromatography. *Nature* 187, 144–145
- Taieb J, Benattar C, Birr AS, Lindenbaum A (2002): Limitations of steroid determination by direct immunoassay. *Clin Chem* 48, 583–585
- Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot M, Mathieu E, Queyrel N, Lacroix I, Somma-Delpero C, Boudou P (2003): Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem* 49, 1381–1395
- Tate J, Ward G (2004): Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 25, 105–120

- Tejada F, Cremades A, Monserrat F, Peñafiel R (1998): Interference of the antihormone RU486 in the determination of testosterone and estradiol by enzyme-immunoassay. *Clin Chim Acta* 275, 63–69
- Terrazas E (2008): ADVIA Centaur- und ADVIA Centaur XP-Testanleitung
- Therrell BL (2001): Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30, 15-30
- Thomas L: Labor und Diagnose. 7. Auflage; TH-Books-Verl.-Ges, Frankfurt/Main 2008
- Tomlinson C, Wallace AM, Ahmed SF (2004): Erroneous testosterone assay causing diagnostic confusion in a newborn infant with intersex anomalies. *Acta Paediatr* 93, 1004–1005
- Torjesen PA, Bjørø T (1996): Antibodies against [125I] testosterone in patient's serum: a problem for the laboratory and the patient. *Clin Chem* 42, 2047–2048
- Turpeinen U, Hämäläinen E, Stenman U (2008): Determination of aldosterone in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 862, 113–118
- Vandenheuvél WJ, Horning EC (1960): Gas chromatography of adrenal cortical steroid hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 3, 356–360
- van Weemen BK, Schuur AH (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232–236
- Vermeulen A (2001): Androgen replacement therapy in the aging male – a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2380-90
- Vesper HW, Thienpont LM (2009): Traceability in laboratory medicine. *Clin Chem* 55, 1067–1075
- Vesper HW, Botelho JC (2010): Standardization of testosterone measurements in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 513–519
- Vesper HW, Bhasin S, Wang C, Tai SS, Dodge LA, Singh RJ, Nelson J, Ohorodnik S, Clarke NJ, Salameh WA et al. (2009): Interlaboratory comparison study of serum total testosterone [corrected] measurements performed by mass spectrometry methods. *Steroids* 74, 498–503
- Walker WH (2010): Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Phil Trans R Soc B* 365, 1557-1569
- Wang C (2004): Measurement of Total Serum Testosterone in Adult Men: Comparison of Current Laboratory Methods Versus Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 534–543
- Wang C, Youatt G, O'Connor S, Dulmanis A, Hudson B (1974): A simple radioimmunoassay for plasma testosterone plus 5alpha-dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem* 5, 551–555
- Wang C, Shiraishi S, Leung A, Baravarian S, Hull L, Goh V, Lee PWN, Swerdloff RS (2008): Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid chromatography tandem mass spectrometry assay: Interference and comparison with established methods. *Steroids* 73, 1345–1352
- Warner MH, Kane JW, Atkin SL, Kilpatrick ES (2006): Dehydroepiandrosterone sulphate interferes with the Abbott Architect direct immunoassay for testosterone. *Ann Clin Biochem* 43, 196–199
- Waterman MR, Simpson ER (1985): Regulation of cytochromes P-450 involved in steroid hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol* 39, 81-9

- Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM: *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2009, 15-62
- Wheeler MJ (2001): Automated immunoassay analysers. *Ann Clin Biochem* 38, 217–229
- Wheeler MJ, Barnes SC (2008): Measurement of testosterone in the diagnosis of hypogonadism in the ageing male. *Clin Endocrinol* 69, 515–525
- White PC (2009): Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 5, 490–498
- White PC, Speiser PW (2000): Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21, 245–291
- Wians FH, Stuart J (1997): Ciba Corning ACS:180 direct total testosterone assay can be used on female sera. *Clin Chem* 43, 1466–1468
- Wilson JD, George FW, Griffin JE (1981): The hormonal control of sexual development. *Science* 20, 1278-84
- Wolthers BG, Kraan GP (1999): Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids. *J Chromatogr A* 843, 247–274
- Wong T, Shackleton CH, Covey TR, Ellis G (1992): Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem* 38, 1830–1837
- Wu H (2006): A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 369, 119–124
- Wu H, Ramsay C, Ozaeta P, Liu L, Aboleneen H (2002): Serum estradiol quantified by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Chem* 48, 364–366
- Wudy SA, Hartmann MF (2004): Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology. *Horm Metab Res* 36, 415–422
- Wudy SA, Wachter UA, Homoki J, Teller WM, Shackleton CH (1992): Androgen metabolism assessment by routine gas chromatography/mass spectrometry profiling of plasma steroids: Part 1, Unconjugated steroids. *Steroids* 57, 319–324
- Wudy SA, Wachter UA, Homoki J, Teller WM (1995): 17 alpha-hydroxyprogesterone, 4-androstenedione, and testosterone profiled by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry in plasma of children. *Pediatr Res* 38, 76–80
- Wudy SA, Dörr HG, Solleder C, Djalali M, Homoki J (1999): Profiling steroid hormones in amniotic fluid of midpregnancy by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry: reference values and concentrations in fetuses at risk for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2724–2728
- Wudy SA, Hartmann M, Homoki J (2000): Hormonal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in plasma and urine of neonates using benchtop gas chromatography-mass spectrometry. *J Endocrinol* 165, 679–683
- Yalow RS, Berson SA (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39, 1157–1175

## 7 Anhang

### 7.1 Methodenvergleich der Testosteronanalyse zwischen dem Siemens ADVIA Centaur und der GC-NCI-MS-Methode

Tabelle 17 Ermittelte Testosteronkonzentrationen (ng/ml) im Methodenvergleich der GC-NCI-MS-Methode (x) und dem Siemens ADVIA Centaur Immunoassay (y) sowie ihre absoluten (ng/ml) und relativen Abweichungen (%) voneinander.

Probennr.	Geschlecht	x (GC-NCI-MS)	y (Siemens Centaur)	x - y (ng/ml)	x-y/x (%)
1	w	0,05	0,11	0,06	120,0
2	w	0,15	0,25	0,10	66,7
3	w	0,14	0,31	0,17	127,9
4	w	0,14	0,31	0,17	118,3
5	w	0,08	0,38	0,30	375,0
6	w	0,06	0,39	0,33	550,0
7	w	0,27	0,40	0,13	49,3
8	w	0,17	0,44	0,27	158,8
9	w	0,32	0,45	0,13	40,6
10	w	0,20	0,45	0,25	125,0
11	w	0,28	0,47	0,19	67,3
12	w	0,13	0,49	0,36	276,9
13	w	0,16	0,49	0,33	206,3
14	w	0,20	0,50	0,30	150,0
15	w	0,22	0,58	0,36	163,6
16	w	0,24	0,62	0,38	158,3
17	w	0,22	0,62	0,40	181,8
18	w	0,35	0,63	0,28	77,0
19	w	0,33	0,71	0,38	115,2
20	w	0,51	0,80	0,29	56,9
21	m	2,96	2,85	-0,11	-3,7
22	m	2,62	3,24	0,62	23,7
23	m	3,73	3,74	0,01	0,3
24	m	3,61	4,01	0,40	11,1
25	m	3,71	4,48	0,77	20,8
26	m	4,66	5,91	1,25	26,8
27	m	6,98	7,74	0,76	10,9
28	m	8,65	8,84	0,19	2,2
29	m	8,74	8,84	0,10	1,1
30	m	9,29	9,33	0,04	120,0

## 7.2 Regressionsanalyse nach Passing und Bablok

**Tabelle 18 Vergleich der Messergebnisse im hohen und im niedrigen Konzentrationsbereich**

Variable X	Konzentration Testosteron (ng/ml): GC-NCI-MS	
Variable Y	Konzentration Testosteron (ng/ml): Siemens ADVIA Centaur	
Sample size	30	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,0500	0,1100
Highest value	9,2900	9,3300
Arithmetic mean	1,9727	2,2793
Median	0,2750	0,6000
Standard deviation	2,9283	2,9711
Standard error of the mean	0,5346	0,5424
<b>Regression equation: <math>y = 0,250743 + 1,067257 x</math></b>		
Systematic differences		
Intercept A	0,2507	
95% CI	0,1446 to 0,2841	
Proportional differences		
Slope B	1,0673	
95% CI	0,9906 to 1,1815	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	0,2239	
$\pm 1.96$ RSD Interval	-0,4389 to 0,4389	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,63)	

**Tabelle 19 Vergleich der Messergebnisse im hohen Konzentrationsbereich**

Variable X	Konzentration Testosteron (ng/ml): GC-NCI-MS	
Variable Y	Konzentration Testosteron (ng/ml): Siemens ADVIA Centaur	
Sample size	10	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	2,6200	2,8500
Highest value	9,2900	9,3300
Arithmetic mean	5,4950	5,8980
Median	4,1950	5,1950
Standard deviation	2,6318	2,5619
Standard error of the mean	0,8322	0,8101
<b>Regression equation: <math>y = 0,261924 + 1,005396 x</math></b>		
Systematic differences		
Intercept A	0,2619	
95% CI	-0,8219 to 1,2642	
Proportional differences		
Slope B	1,0054	
95% CI	0,8668 to 1,2308	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	0,3406	
$\pm 1.96$ RSD Interval	-0,6676 to 0,6676	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,28)	

**Tabelle 20 Vergleich der Messergebnisse im niedrigen Konzentrationsbereich**

Variable X	Konzentration Testosteron (ng/ml): GC-NCI-MS	
Variable Y	Konzentration Testosteron (ng/ml): Siemens ADVIA Centaur	
Sample size	20	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,05000	0,1100
Highest value	0,5100	0,8000
Arithmetic mean	0,2115	0,4700
Median	0,2000	0,4600
Standard deviation	0,1118	0,1624
Standard error of the mean	0,02501	0,03632

<b>Regression equation: <math>y = 0,167500 + 1,500000 x</math></b>	
Systematic differences	
Intercept A	0,1675
95% CI	-0,06250 to 0,2600
Proportional differences	
Slope B	1,500
95% CI	1,0588 to 2,7500
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	0,06359
$\pm 1.96$ RSD Interval	-0,1246 to 0,1246
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,36)

### 7.3 Validierung

**Tabelle 21 Parameter der Kalibriergeraden zur Ermittlung der Linearität von 17-OHP**

Nummer	17-OHP (ng/ml)	Peakflächenverhältnis
1	0,0	0,2129
2	0,1	0,2938
3	0,2	0,3318
4	0,5	0,3854
5	1,0	0,4684
6	2,0	0,6864
7	5,0	1,2809

## 7.4 Analyse weiterer Steroidhormone

Tabelle 22 Retentionszeiten (min) und registrierte Massenzahlen (m/z) weiterer untersuchter Steroidhormone

Analyt	Retentionszeit (min)	Registrierte Massen (m/z)
Aldosteron	8,52/8,78	655
D7-Aldosteron	8,47/8,77	662
Androstendion	6,66/6,8	656/494,8
Cortisol	8,6/8,95	625,4/715,5

### Chromatogramme und Massenspektren weiterer Steroidhormone

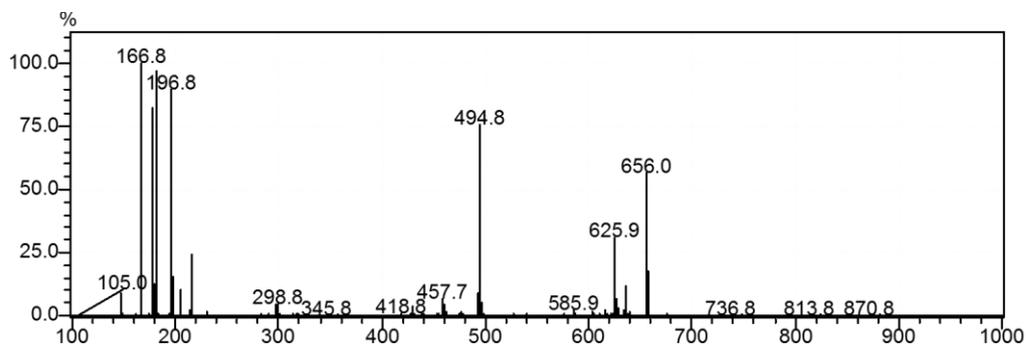


Abbildung 37 Massenspektrum des Derivats von Androstendion. Zur Analyse wurden die gebildeten Fragmentationen mit den Massenzahlen 494 und 656 ausgewählt; y- Achse: Relative Signalintensität, x- Achse: Massenzahlen.

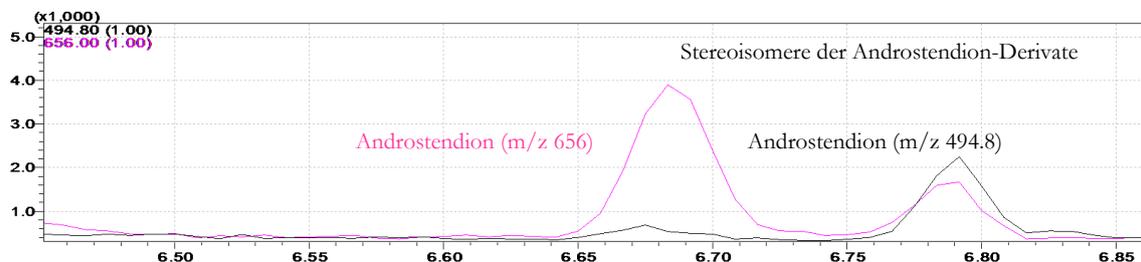


Abbildung 38 Das aus einer Serumanalyse gewonnene Chromatogramm des Androstendion-Derivats mit den Massenzahlen 494 und 656 der gebildeten Fragmentationen; y- Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

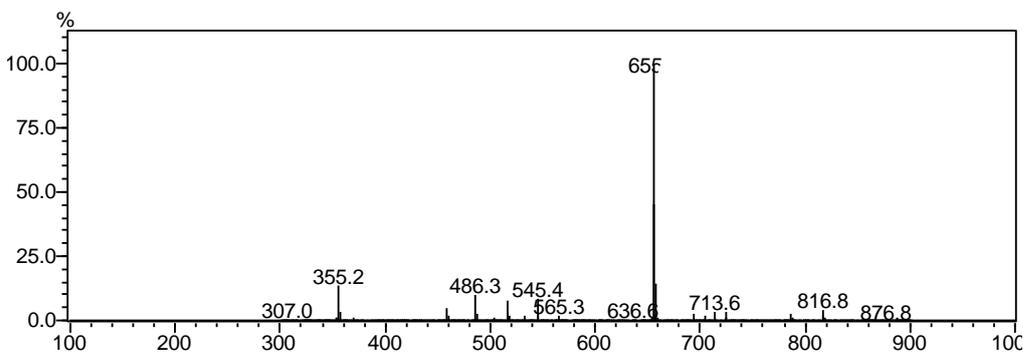


Abbildung 39 Massenspektrum des Derivats von Aldosteron. Zur Analyse wurde die Fragmentation mit der Massenzahl 655 ausgewählt; y- Achse: Relative Signalintensität, x-Achse: Massenzahlen.

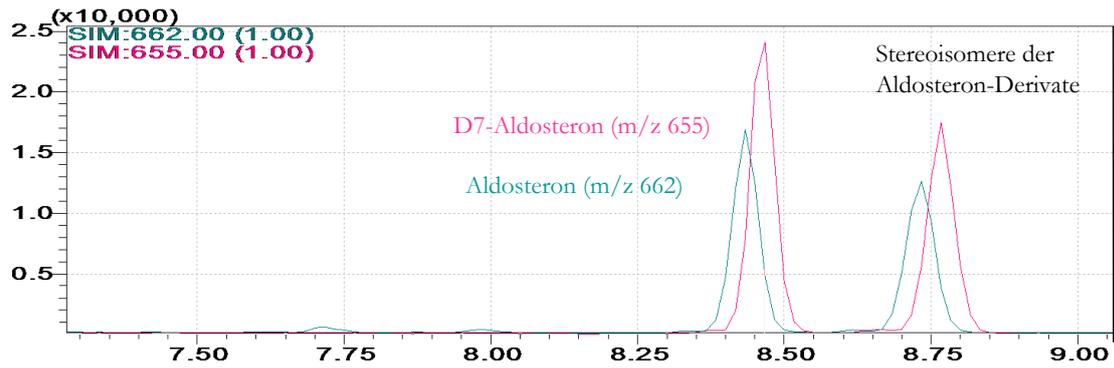


Abbildung 40 Das aus einer Serumanalyse gewonnene Chromatogramm der Aldosteron-Derivate mit dem Fragmention 655 (Analyt) und dem Fragmention 662 (IStd); y- Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

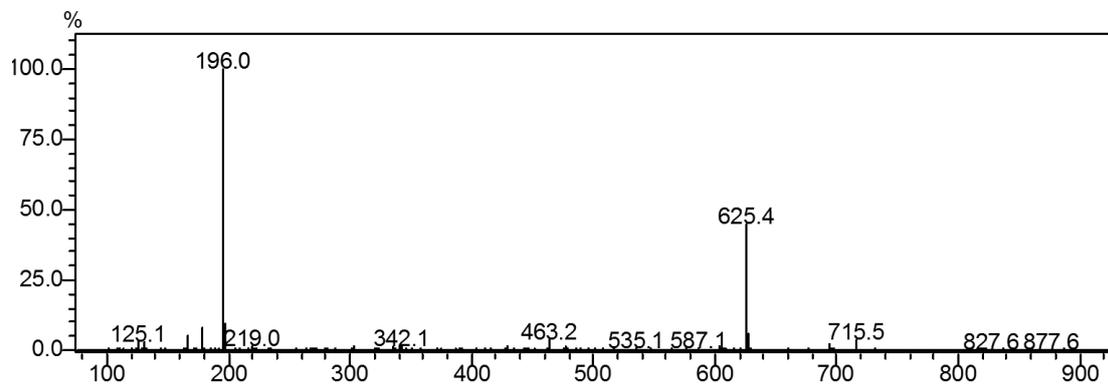


Abbildung 41 Massenspektrum des Derivats von Cortisol. Zur Analyse wurde das Fragmention mit der Massenzahl 625.4 ausgewählt; y- Achse: Relative Signalintensität, x-Achse: Massenzahlen.

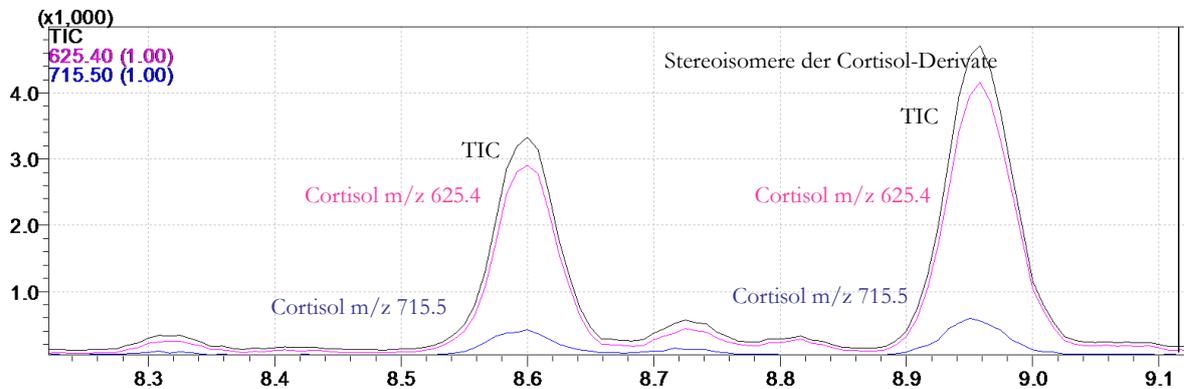


Abbildung 42 Chromatogramm des Cortisol-Derivats mit den Massenzahlen 524 und 715 der gebildeten Fragmentionen; y-Achse: Signalintensität, x-Achse: Retentionszeit in Minuten.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	2
Abbildung 2.....	3
Abbildung 3 .....	3
Abbildung 4.....	5
Abbildung 5.....	18
Abbildung 6.....	35
Abbildung 7.....	35
Abbildung 8.....	36
Abbildung 9.....	36
Abbildung 10.....	36
Abbildung 11.....	40
Abbildung 12.....	41
Abbildung 13.....	42
Abbildung 14.....	42
Abbildung 15.....	44
Abbildung 16.....	44
Abbildung 17.....	44
Abbildung 18.....	45
Abbildung 19.....	46
Abbildung 20.....	47
Abbildung 21.....	47
Abbildung 22.....	48
Abbildung 23.....	49
Abbildung 24.....	52
Abbildung 25.....	57
Abbildung 26.....	57
Abbildung 27.....	59
Abbildung 28.....	59
Abbildung 29.....	60
Abbildung 30.....	62
Abbildung 31.....	63
Abbildung 32.....	65
Abbildung 33.....	66
Abbildung 34.....	67

---

Abbildung 35.....	68
Abbildung 36.....	69
Abbildung 37.....	106
Abbildung 38.....	106
Abbildung 39.....	106
Abbildung 40.....	107
Abbildung 41.....	107
Abbildung 42.....	107

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	27
Tabelle 2.....	32
Tabelle 3.....	41
Tabelle 4.....	45
Tabelle 5.....	48
Tabelle 6.....	51
Tabelle 7.....	54
Tabelle 8.....	58
Tabelle 9.....	58
Tabelle 10 .....	58
Tabelle 11 .....	60
Tabelle 12 .....	61
Tabelle 13 .....	61
Tabelle 14. ....	61
Tabelle 15 .....	64
Tabelle 16 .....	69
Tabelle 17 .....	102
Tabelle 18 .....	103
Tabelle 19 .....	103
Tabelle 20 .....	104
Tabelle 21 .....	105
Tabelle 22 .....	105

## Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Manfred Fobker danken, für die interessante Themenstellung und die hervorragende Betreuung während der praktischen Arbeit wie auch bei der Niederschrift. Seine ständige Bereitschaft, mir bei Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, wie auch seine aufmunternde, zuversichtliche Art sowie freundliche Beharrlichkeit, haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beitragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Erhard Schulte für die unermüdliche, wertvolle Hilfe während der praktischen Arbeit, seine ansteckende Begeisterung und die anregenden Gespräche und Gedankenspiele. Mit ihm konnte ich diverse Rückschläge und unüberwindbar scheinende Herausforderungen mit Humor meistern.

Herrn Prof. Dr. med. J.-R. Nofer möchte ich für die Möglichkeit danken, die Arbeit im Centrum für Laboratoriumsmedizin in Münster durchführen zu können, auch für die intensive fachliche und stets freundliche Betreuung sowie Korrektur meiner Arbeit.

Ebenfalls geht mein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. med. N. von Ahsen, für die prompte Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen, für die zuverlässige wie auch freundliche Unterstützung und die vielen hilfreichen Rückmeldungen, insbesondere bei der Korrektur meiner Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Katharina Rosing danke ich für den wertvollen Austausch, den Zuspruch und auch für die gelungen Ablenkung in den Pausen zwischen den Experimenten.

Für die freundliche Aufnahme im Labor und Hilfe in praktischen Fragestellungen geht mein Dank an die MTLA des Centrums für Laboratoriumsmedizin Münster, insbesondere an Frau Renate Kwiotek, Frau Hilke Windheuser und Frau Elisabeth Palstring.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglichten, und durch die ich in ungezählten Gesprächen Zuversicht und Bestätigung erfahren habe.

Außerdem möchte ich all denen danken, die mich während dieser Zeit unterstützt und in den Zeiten der Niederschrift rund um die Uhr ertragen haben, hierzu zählen vor allem meine Mitbewohner Karoline Lange, Nils-Holger Schmidt und Theda Matthiesen sowie Helen Grete Orth, Friederike Kogel, Philipp Hansen und Johanna Fröhlich.