

Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lebensmittelkontaminante Acrylamid in Ratte und Mensch

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker
Franz Berger

Kaiserslautern, 2010

Für Stefanie

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2006 bis Juni 2009 im
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der
Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29.04.2010

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand und Herrn Dr. Matthias Baum für die
Überlassung des Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung
während der Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Acrylamid	3
2.1.1	Allgemeine Grundlagen	3
2.1.2	Expositionsquellen	3
2.1.3	Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln	4
2.1.4	Expositionsabschätzung	6
2.1.5	Reduzierung der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln	6
2.1.6	Toxikokinetik von Acrylamid	8
2.1.6.1	Aufnahme	8
2.1.6.2	Verteilung	9
2.1.6.3	Metabolismus	10
2.1.6.4	Ausscheidung	14
2.1.7	Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin im Hämoglobin	15
2.1.8	Toxikodynamik von Acrylamid	17
2.1.8.1	Neurotoxische Wirkungen	17
2.1.8.2	Entwicklungs- und reproduktionstoxische Wirkungen	17
2.1.8.3	Genotoxische und mutagene Wirkungen	18
2.1.8.3.1	Genotoxizität und Mutagenität in vitro	18
2.1.8.3.2	Genotoxizität in vivo	18
2.1.8.4	Kanzerogenität	19
2.2	Acrolein	21
2.2.1	Allgemeine Grundlagen	21
2.2.2	Expositionsquellen	21
2.2.3	Toxikokinetik von Acrolein	26
2.2.4	Toxikodynamik von Acrolein	28
2.2.4.1	Akute, subchronische und chronische Toxizität	28
2.2.4.2	Genotoxizität und Mutagenität	28
2.3	GC-MS und Prinzip der chemischen Ionisierung (CI)	29
2.4	HPLC-ESI-MS/MS und Prinzip der Elektrospray-Ionisierung (ESI)	30
2.5	Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer	31
3	PROBLEMSTELLUNG	34
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
4.1	Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit von Acrylamid in der Ratte... 37	
4.1.1	Fütterung von Pommes frites (PFG: geschnitten; PFR: rekonstituiert)	39
4.1.1.1	Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte	39
4.1.1.2	Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Pommes frites	44
4.1.1.3	Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites (PFG, PFR) bzw. Trinkwasser	48
4.1.1.4	Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid in Rattenserum nach Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites (PFG) bzw. Trinkwasser	50
4.1.2	Fütterung von Brotkruste (BK)	54
4.1.2.1	Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte	54
4.1.2.2	Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Brotkruste (BK)	56

4.1.2.3	Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Acrylamid über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser.....	59
4.1.3	Verabreichung von Lebkuchen (LK).....	61
4.1.3.1	Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte nach Verabreichung von Lebkuchen (LK)	61
4.1.3.2	Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Lebkuchen (LK).....	62
4.1.3.3	Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Lebkuchen (LK).....	63
4.2	Verabreichung der kumulativen Dosis aus den Fütterungsversuchen (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) bzw. 10 mg Acrylamid/kg KG als Einzeldosis über Trinkwasser (Schlundsonde)	65
4.2.1	Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte.....	65
4.2.2	Ausscheidung von AAMA, GAMA, Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin	67
4.3	Einfluss des Narkotisierungsmittels Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid	69
4.4	Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA im Rahmen der Rattenfütterungsstudie .	71
4.5	Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA nach Verabreichung von 0,05-10 mg Acrylamid/kg KG an Ratten.....	74
4.6	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Tierversuchen	76
4.7	Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid im Blut der Allgemeinbevölkerung mittels GC-MS	85
4.8	Bestimmung der Acrylamid-Mercaptursäuren im Urin von Probanden aus der Allgemeinbevölkerung.....	87
4.9	Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA in Urinproben der Allgemeinbevölkerung .	89
4.10	Etablierung einer HPLC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid im Blut der Allgemeinbevölkerung	91
4.11	Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“	95
4.11.1	Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid vor und 24 Stunden nach Acrylamid-Aufnahme mittels GC-MS.....	96
4.11.2	Kinetik der Acrylamid-Hämoglobin-Adduktbildung <i>in vivo</i>	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	METHODEN	108
6.1	Fütterungsstudie an der Ratte	108
6.1.1	Spezifikation der Acrylamid-haltigen Lebensmittel.....	108
6.1.2	Konditionierung der Tiere	111
6.1.3	Behandlung der Tiere in der Hauptstudie.....	112
6.1.4	Kumulative Dosis (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) und 10 mg Acrylamid/kg KG.....	113
6.1.5	Fütterungsversuch zur Bestimmung der Resorptionskinetik von Acrylamid und Glycidamid ...	114
6.1.6	Einfluss von Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid	114
6.2	Bestimmung von Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin Addukten im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“	115

6.3	Isolierung und Aufreinigung von Hämoglobin aus Human- und Rattenvollblut	117
6.4	Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mittels GC-MS118	
6.4.1	Hämoglobin-Derivatisierung und Flüssig-Flüssig-Extraktion der PFPTHs.....	118
6.4.2	GC-MS.....	119
6.5	HPLC-MS/MS.....	120
6.5.1	Allgemeines.....	120
6.5.1.1	Tuning und Kalibrierung.....	120
6.5.1.2	Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter.....	120
6.5.1.3	Quantifizierung der Analyte mittels isotope markierter interner Standards.....	122
6.5.1.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	122
6.5.2	Bestimmung der Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	123
6.5.2.1	Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS).....	123
6.5.2.2	Chromatographie der PFPTHs.....	126
6.5.2.3	Hämoglobin-Derivatisierung und Festphasenextraktion (SPE).....	127
6.5.2.4	Linearität/Kalibriergerade PFPTHs.....	127
6.5.2.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	127
6.5.2.6	Wiederfindung und Identifizierung von Matrixeffekten.....	128
6.5.3	Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid.....	129
6.5.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS).....	129
6.5.3.2	Chromatographie der Mercaptursäuren.....	133
6.5.3.3	Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Mercaptursäuren mittels Festphasenextraktion.....	133
6.5.3.4	Linearität/Kalibriergeraden.....	134
6.5.3.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen API 3200.....	134
6.5.3.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen API 2000.....	134
6.5.3.7	Wiederfindung der SPE-Methode.....	135
6.5.3.8	Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität.....	135
6.5.4	Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid.....	136
6.5.4.1	Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS).....	136
6.5.4.2	Chromatographie von Acrylamid und Glycidamid.....	139
6.5.4.3	Isolierung von Acrylamid und Glycidamid aus Rattenurin.....	140
6.5.4.4	Wiederfindung von Acrylamid und Glycidamid.....	140
6.5.4.5	Isolierung von Acrylamid und Glycidamid aus Rattenserum.....	140
6.5.4.6	Wiederfindung von Acrylamid und Glycidamid in Serumproben.....	141
6.5.4.7	Nachweisgrenze von Glycidamid in Rattenserum.....	141
6.5.4.8	Bestimmung von Acrylamid in der Standarddiät und im Lebkuchen.....	141
6.5.4.9	Linearität/ Kalibriergeraden.....	142
6.5.4.10	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	142
6.5.5	Bestimmung von HPMA (Hydroxypropyl-Mercaptursäure).....	143
6.5.5.1	Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS).....	143
6.5.5.2	Chromatographische Bedingungen.....	146
6.5.5.3	Isolierung von HPMA aus Urin.....	147
6.5.5.4	Linearität/ Kalibriergerade.....	147
6.5.5.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze HPMA.....	147
6.5.5.6	Wiederfindung der Festphasenextraktion sowie Tag-zu-Tag- und Lauf-zu-Lauf-Variabilität.....	147
6.6	Geräte.....	148
6.7	Chemikalien.....	149
6.8	Verbrauchsmaterialien.....	151
7	LITERATUR.....	152

8	ANHANG	164
8.1	Regressionsgeraden der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	164
8.1.1	AAValPFPTH	164
8.1.2	GAValPFPTH.....	164
8.1.3	AAMA (API 2000)	165
8.1.4	GAMA (API 2000).....	165
8.1.5	AAMA (API 3200)	166
8.1.6	GAMA (API 3200).....	166
8.1.7	Acrylamid	167
8.1.8	Glycidamid	167
8.1.9	HPMA	168
8.2	Kalibriergeraden/Linearität.....	169
8.2.1	AAValPFPTH	169
8.2.2	GAValPFPTH.....	169
8.2.3	AAMA.....	170
8.2.4	GAMA	170
8.2.5	Acrylamid	171
8.2.6	Glycidamid	171
8.2.7	HPMA	172
8.3	Verwendete Formeln	173

Abkürzungen

a	Jahr
AA	Acrylamid
AAD ₇ ValPFPTH	1-(2-Carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-D ₇ -3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
AAMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein
AAMA-SO	<i>N</i> -Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein-S-oxid
AUC	Area Under Curve
AAVal	<i>N</i> -(2-carbamoylethyl)valin
AAValPFPTH	1-(2-Carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
Abb.	Abbildung
acGAD ₇ ValPFPTH	<i>N</i> -(2,2-Dimethyl-4-oxazolidinonylmethyl)-(S)-5-isopropyl-D ₇ -3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
acGAValPFPTH	<i>N</i> -(2,2-Dimethyl-4-oxazolidinonylmethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
API	Atmospheric Pressure Ionisation
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
cps	counts per second
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
d	Tag
D ₃ -AAMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(2-carbamoylethyl-D ₃)cystein
D ₃ -GAMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl-D ₃)cystein
D ₃ -HPMA	<i>N</i> -Acetyl-D ₃ -S-(3-hydroxypropyl)cystein
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EH	Epoxidhydrolase
ESI	Electron Spray Ionisation
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
GA	Glycidamid
GAD ₇ ValPFPTH	1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-D ₇ -3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
GAMA-2	<i>N</i> -Acetyl-S-(R,S)-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein
GAMA-3	<i>N</i> -Acetyl-S-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein
GAVal	<i>N</i> -(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)valin

Abkürzungen

GAVaIPFPTH	1-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IS	interner Standard
kDa	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
n	Anzahl unabhängiger Versuche
<i>N</i> 3-GA-Ade	<i>N</i> 3-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)adenin
<i>N</i> 7-GA-Gua	<i>N</i> 7-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanin
ND	nicht detektierbar
NG	nicht gemessen
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NQ	nicht quantifizierbar
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PFITC	Pentafluorphenylisothiocyanat
PFPTH	Pentafluorphenylthiohydantoin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Q	Quadrupol
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction
v/v	Volumenverhältnis
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel
α -OH-Acrolein-dG	α -Hydroxy-1, <i>N</i> ² -propanodeoxyguanosin
γ -OH-Acrolein-dG	γ -Hydroxy-1, <i>N</i> ² -propanodeoxyguanosin

1 Einleitung

Acrylamid, eine als Industriechemikalie bekannte α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, entsteht bei der Zubereitung und Herstellung von kohlenhydratreichen Lebensmitteln [Tareke et al., 2002]. Als Vorläufersubstanzen konnten Aminosäuren (vorwiegend Asparagin) identifiziert werden, welche in Anwesenheit von reduzierenden Kohlenhydraten im Verlauf der Maillard-Reaktion Acrylamid freisetzen [Stadler et al., 2002; Mottram et al., 2002]. In Deutschland wird die mittlere Acrylamidaufnahme mit der Nahrung auf 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ geschätzt [Madle et al., 2003]. Acrylamid zeigt sowohl neurotoxische als auch reproduktionstoxische Wirkungen, für die ein NOAEL von 0,5 $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ bzw. 2 $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ festgelegt wurde [WHO, 2002]. In Langzeitstudien an Ratten und Mäusen wurden erhöhte Tumorinzidenzen an verschiedenen Organen festgestellt, daher wurde Acrylamid von der International Agency for Research on Cancer als „wahrscheinlich kanzerogen am Menschen“ eingestuft [IARC, 1994].

Acrylamid wird im Organismus durch oxidierende Cytochrom P450-Enzyme zu Glycidamid umgewandelt [Sumner et al., 1999]. Dieses metabolisch gebildete Glycidamid ist ein genotoxischer Stoff, der im Wesentlichen für die kanzerogene Wirkung von Acrylamid verantwortlich gemacht wird [Carere, 2006]. Glycidamid bildet Addukte mit der DNA, insbesondere mit dem *N7* des Guanins [Segeberäck et al., 1995].

Sowohl Acrylamid als auch Glycidamid reagieren mit nucleophilen Zentren in Makromolekülen wie z. B. dem endständigen Valin im Hämoglobin [Friedman, 2003]. Diese Hämoglobin-Addukte können als Langzeit-Biomarker einer chronischen Exposition mit Acrylamid herangezogen werden [Törnqvist et al., 2002]. Sowohl in Tier- als auch in Humanstudien konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Acrylamid-Hämoglobinaddukte gezeigt werden [Vikström et al., 2008; Fennell et al., 2005]. Einen Hauptentgiftungsweg für Acrylamid und metabolisch gebildetes Glycidamid stellt die Konjugation mit Glutathion dar. Im weiteren Verlauf führt die Umwandlung dieser Glutathion-Addukte zur Bildung der entsprechenden Mercaptursäuren AAMA und GAMA, welche über den Urin ausgeschieden werden [Fuhr et al., 2006; Sumner et al., 1992].

Die kanzerogene Wirkung von Acrylamid wurde in Tierversuchen beobachtet, bei denen die Verabreichung über Trinkwasser erfolgte [Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1995]. Dabei war die toxikologische Untersuchung mit isoliert verabreichtem Acrylamid grundsätzlich erforderlich, um stoffbezogene Aussagen zu dessen Schädigungspotential treffen zu können. Dadurch können Erkenntnisse zur Toxikokinetik und Toxikodynamik sowie zur Dosis-Wirkungsbeziehung gewonnen werden. Toxische Wirkungen, die in Tierexperimenten mit isoliert verabreichten Lebensmittel-Inhaltsstoffen beobachtet werden, müssen nicht

unbedingt in Art und Umfang bei Aufnahme im Lebensmittel in gleicher Weise auftreten. Lebensmittel sind in der Regel sehr komplex zusammengesetzt, so dass ein in Frage stehender Inhaltsstoff jeweils den Einflussmöglichkeiten zahlreicher anderer Stoffe ausgesetzt ist. Diese können in der Beeinflussung der Freisetzung und Resorption eines Stoffes sowie in Wechselwirkungen mit Lebensmittelinhaltsstoffen bestehen. Dadurch kann sich insbesondere die Bioverfügbarkeit bzw. die Wirkung des Inhaltsstoffes verändern. Darüber hinaus können Lebensmittelinhaltsstoffe die Metabolisierung und Ausscheidung eines Stoffes z. B. durch Aktivierung oder Inaktivierung von körpereigenen Enzymen oder Enzymen der Darmflora beeinflussen. Für eine differenziertere Risikobeurteilung muss daher untersucht werden, ob und in welcher Weise der natürliche Verbund im betreffenden Lebensmittel die Toxikokinetik bzw. Toxikodynamik des zu beurteilenden Inhaltsstoffes beeinflusst. [SKLM, 2006]

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Acrylamid

2.1.1 Allgemeine Grundlagen

Bei Acrylamid (2-Propenamid) handelt es sich bei Raumtemperatur um eine farblose kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 71,08 g/mol, welche in Wasser, Alkoholen und Aceton leicht löslich ist. Aufgrund seiner α,β -ungesättigten Carbonylstruktur neigt Acrylamid zur Polymerisation und zu Michael-artigen 1,4-Additionen mit Nucleophilen [Eisenbrand et al., 2006; Roempp online]. Die industrielle Produktion von Acrylamid liegt in der EU bei ca. 100000 t/a und wird nahezu vollständig zur Herstellung von Polyacrylamiden verwendet. Polyacrylamide werden vor allem in der Abwasser- und Mineralöl-Aufbereitung sowie in der Papier- und Zellstoffverarbeitung eingesetzt [BfR, 2003].

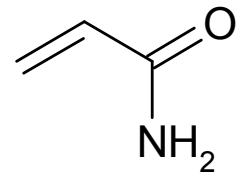


Abb. 2.1: Acrylamid

Acrylamid zeigt sowohl neurotoxische als auch reproduktionstoxische Eigenschaften und wurde von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als „wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft [IARC, 1994].

2.1.2 Expositionsquellen

1997 wurde während eines Tunnelbaus in Schweden ein Dichtungsmittel auf Acrylamid-Basis zur Verhinderung von Wassereintrüben eingesetzt. Durch unvollständige Polymerisation gelangten damals große Mengen Acrylamid in die Umwelt. Im Rahmen der Untersuchung von exponierten Arbeitern konnte auch bei der nicht exponierten Kontrollgruppe eine unerwartet hohe Acrylamidbelastung nachgewiesen werden. Später konnte gezeigt werden, dass kohlenhydratreiche, hocherhitzte Lebensmittel eine Expositionsquelle für Acrylamid darstellen [Tareke et al., 2000; 2002].

Eine weitere wichtige Expositionsquelle für Acrylamid ist Tabakrauch. Im Hauptstromrauch einer Zigarette können 1-2 μg Acrylamid enthalten sein [Smith et al., 2000]. Die Gehalte an Acrylamid-Metaboliten sind im Urin von Rauchern um den Faktor 4 höher als bei Nichtrauchern [Boettcher et al., 2005 a+b].

Die weiteren bekannten Expositionsquellen für Acrylamid resultieren vor allem aus der industriellen Verwendung von Polyacrylamiden, in denen monomeres Acrylamid enthalten sein kann. Nach der Trinkwasserverordnung muss der Acrylamidgehalt in Trinkwasser unter der Nachweisgrenze von 0,1 $\mu\text{g/l}$ liegen. Die tägliche Aufnahme von Acrylamid über

Trinkwasser wird auf 0,0036 µg/kg KG geschätzt und ist damit als vernachlässigbar gering zu bewerten [Smith et al., 2000]. Nach der Kosmetikverordnung dürfen kosmetische Mittel, die auf der Haut verbleiben, maximal 100 µg/kg monomeres Acrylamid enthalten. Bei sonstigen kosmetischen Mitteln liegt der Grenzwert bei 500 µg Acrylamid/kg. Da die tägliche Aufnahme von Acrylamid über kosmetische Mittel auf weniger als 1 ng/kg KG geschätzt wird, ist diese Expositionsquelle ebenfalls als vernachlässigbar zu betrachten [Van Landingham et al., 2004].

Der Beitrag einer endogenen Bildung von Acrylamid zur Gesamtexposition des Menschen ist ebenfalls als gering zu betrachten, da nach 48-stündigem Fasten eine Verringerung der Mercaptursäureausscheidung um ca. 90 % beobachtet wurde [Boettcher et al., 2006a]. Unter Berücksichtigung der relativ langen Halbwertszeiten (17-25 Stunden) der Acrylamid-Mercaptursäuren kann davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Teil der Acrylamid-Exposition bei nicht beruflich exponierten auf die Nahrung zurückzuführen ist.

2.1.3 Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln

Acrylamid wird vor allem in kohlenhydratreichen, stark erhitzten Lebensmitteln gebildet [Tareke et al., 2002]. Zu den besonders belasteten Lebensmitteln gehören Lebkuchen, Pommes frites, Kartoffelchips und Kaffee (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Acrylamidgehalte in verschiedenen Lebensmitteln [Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2008]

Warengruppe	Probenanzahl	Acrylamid [µg/kg] Minimum	Acrylamid [µg/kg] Median	Acrylamid [µg/kg] Maximum
Lebkuchen und Lebkuchenhaltiges Gebäck	96	< 20	121	1232
Spekulatius	27	< 20	118	361
Feine Backwaren, sonstige	5	< 20	73	992
Knäckebrötchen	4	140	283	388
Kartoffelchips	96	46	287	2365
Pommes frites, zubereitet	69	< 20	358	1276
Kaffee, geröstet	47	19	192	556
Kaffeeextrakt	34	181	709	1373
Kaffeersatz	22	77	520	920
Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder	6	< 20	19	94
Kinderkeks	22	< 20	27	169
Säuglings- und Kleinkindernahrungen	4	9	12	30

Es wurden verschiedene Mechanismen zur Bildung von Acrylamid diskutiert. So können Triacylglyceride bei höheren Temperaturen Glycerin freisetzen. Durch Dehydratisierung kann aus Glycerin Acrolein entstehen, welches durch weitere Oxidation über die Zwischenstufe Acrylsäure in Gegenwart einer Stickstoffquelle wie z. B. Asparagin in Acrylamid überführt werden kann. Acrylsäure als Precursor für Acrylamid kann darüber hinaus aus Aminosäuren sowie durch Pyrolyse von Glucose entstehen [Gertz, 2002; Grivas et al., 2002; Ehling et al., 2005].

Der quantitativ bedeutendste Mechanismus für die Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln ist die Reaktion von reduzierenden Kohlenhydraten mit Aminosäuren im Verlauf der Maillard-Reaktion. Dabei entstehen besonders in Anwesenheit von Asparagin hohe Acrylamidgehalte, wobei auch Glutamin und Methionin größere Mengen Acrylamid generieren können [Mottram et al., 2002; Stadler et al., 2002]. Bei der Reaktion von Asparagin mit reduzierenden Kohlenhydraten (Abb. 2.2) kommt es durch Dehydratisierung zur Bildung einer Schiff'schen Base, welche durch Decarboxylierung in die entsprechenden Azomethinylide umgesetzt wird.

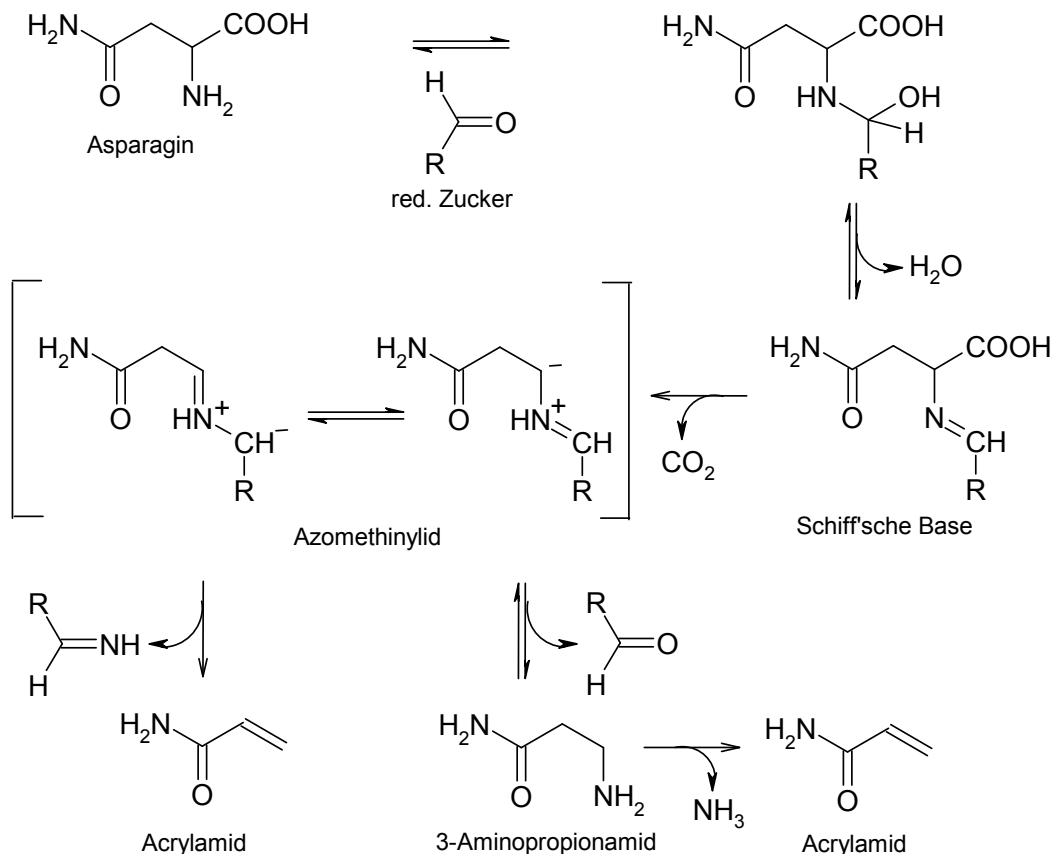


Abb. 2.2: Mechanismus der Acrylamid Bildung aus Asparagin und reduzierenden Kohlenhydraten; modifiziert nach [Zyzak et al., 2003]

Aus Azomethinyliden kann Acrylamid entweder direkt oder über die Zwischenstufe 3-Aminopropionamid freigesetzt werden [Zyzak et al., 2003]. 3-Aminopropionamid wird auch in

unverarbeiteten Lebensmitteln durch enzymatische Decarboxylierung von Asparagin gebildet und stellt einen wichtigen Precursor für die Bildung von Acrylamid dar [Granvogl und Schieberle, 2006].

2.1.4 Expositionsabschätzung

Durch die unterschiedlichen Gehalte der einzelnen Lebensmittelgruppen und individuellen Verzehrsgewohnheiten kann die Exposition gegenüber Acrylamid in der Allgemeinbevölkerung stark variieren. Das Bundesinstitut für Risikobewertung schätzt die mittlere tägliche Acrylamidaufnahme in Deutschland auf 0,6 µg/kg KG. Bei Bevölkerungsgruppen, die besonders hoch belastete Lebensmittel in großen Mengen konsumieren, kann die mittlere tägliche Exposition bis zu 3,4 µg/kg KG betragen [Madle et al., 2003]. Nach der Weltgesundheitsorganisation WHO liegt die durchschnittliche tägliche lebensmittelbedingte Acrylamid-Exposition bei 0,3-0,8 µg/kg KG [WHO, 2002]. Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) beziffert die tägliche Acrylamidaufnahme auf 0,4 µg/kg KG (95. Perzentil: 0,9 µg/kg KG), wobei die Bevölkerungsgruppe der 2-5 Jährigen mit durchschnittlich 1,1 µg/kg KG (90. Perzentil: 2,3 µg/kg KG) höher belastet ist [FDA, 2006]. In den USA sind 35 % und in den Niederlanden 46 % der Acrylamid-Gesamtaufnahme auf den Konsum von Pommes frites und Kartoffelchips zurückzuführen [Wilson et al., 2006]. Die Acrylamid-Aufnahme wird auf 0,019 µg/kg KG/d über Brot und 0,058 µg/kg KG/d über Pommes frites geschätzt [FDA, 2003].

2.1.5 Reduzierung der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln

Die Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln erfolgt im Wesentlichen aus Asparagin und reduzierenden Kohlenhydraten im Verlauf der Maillard-Reaktion (Kap. 2.1.3). Daher wird die Acrylamidkonzentration im Lebensmittel neben den Herstellungsbedingungen vor allem durch die vorhandene Menge an freiem Asparagin und reduzierenden Kohlenhydraten beeinflusst. Amrein et al. zeigten, dass die Acrylamid-Bildung in verschiedenen Kartoffelsorten mit der Konzentration an reduzierenden Kohlenhydraten korreliert, wobei relativ große Unterschiede zwischen den getesteten Genotypen beobachtet wurden [Amrein et al., 2003]. Dabei lagen die mittleren Asparagin-Gehalte der untersuchten Kartoffeln um den Faktor 6 bzw. 4 höher als die entsprechenden Glucose- bzw. Fructose-Gehalte, so dass die Konzentration an reduzierenden Kohlenhydraten der limitierende Faktor für die Entstehung von Acrylamid in Kartoffelprodukten darstellt. Darüber hinaus haben die Lagerungsbedingungen nach der Ernte einen wesentlichen Einfluss auf die Gehalte an reduzierenden Zuckern. So führte die Lagerung von Kartoffeln bei 4 °C zu einer Erhöhung der Gehalte an reduzierenden Kohlenhydraten, wohingegen die Lagerung bei höheren

Temperaturen (> 8 °C) zu einer Verringerung der entsprechenden Konzentrationen führte [Hertog et al., 1997; Amrein et al., 2004]. Nach Erhöhung der Lagerungstemperatur von 4 °C auf 15 °C wurde innerhalb von 3 Wochen eine Verringerung der Gehalte an reduzierenden Kohlenhydraten von 0,75 % auf 0,18 % der Trockenmasse beobachtet [De Wilde et al., 2005].

Da Kartoffelprodukte wesentlich zur täglichen Acrylamid-Aufnahme beitragen, wurde eine Reihe von verfahrenstechnologischen Ansätzen zur Reduzierung der Acrylamid-Gehalte entwickelt. So konnte durch Behandlung von Pommes frites mit Asparaginase eine Reduzierung der Acrylamid-Gehalte um 80 % erreicht werden [Heldt-Hansen et al., 2004]. Durch die Absenkung des pH-Wertes mit 1 %-iger Citronensäure wurde eine Erniedrigung der Acrylamid-Gehalte in Pommes frites um 53–80 % beobachtet [Pedreschi et al., 2006; Jung et al., 2003]. Durch Vorbehandlung mit Natriumchlorid-Lösung konnte die Acrylamid-Konzentration in Pommes frites um bis zu 40 % vermindert werden [Reimerdes und Franke, 2006; Kolek et al., 2006]. Generell können die Acrylamid-Gehalte von Pommes frites durch das Blanchieren und die Vortrocknung der Rohware und der damit verbundenen kürzeren Frittier-Zeit vermindert werden [Seal et al., 2008].

Im Gegensatz zu Kartoffelprodukten wurde bei Getreideprodukten keine Korrelation zwischen dem Acrylamid-Gehalt und der Konzentration an reduzierenden Kohlenhydraten beobachtet [Taeymans et al., 2004]. In Getreide scheint der Gehalt an freiem Asparagin der limitierende Faktor der Acrylamid-Bildung zu sein, da die Konzentration an Asparagin lediglich bei 3-8 % der entsprechenden Konzentration an reduzierenden Zuckern liegt. Bei Verwendung von Roggenmehl (634 mg Asparagin/kg) wurden im Vergleich zu Weizenmehl (172 mg Asparagin/kg) etwa um den Faktor 3 höhere Acrylamid-Gehalte in Backwaren beobachtet [Elmore et al., 2005]. Die Verwendung von Asparaginase bei der Teigherstellung führt zu einer Verringerung der Acrylamid-Gehalte um 36-75 % in der Brotkruste und mehr als 80 % in feinen Backwaren [FDA, 2007]. Durch Verwendung von Natriumbicarbonat anstelle von Ammoniumbicarbonat und Einsatz von Citronensäure wurde in feinen Backwaren, Lebkuchen und Knäckebrot eine Verringerung der Acrylamid-Gehalte um bis zu 70 % beobachtet [Graf et al., 2006]. Generell kann durch Erniedrigung der Backtemperatur und Verkürzung der Backzeit die Acrylamid-Bildung wesentlich reduziert werden [Seal et al., 2008].

2.1.6 Toxikokinetik von Acrylamid

2.1.6.1 Aufnahme

Die Aufnahme von Acrylamid kann sowohl dermal als auch inhalativ und oral erfolgen [Sumner et al. 2003]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen die orale Aufnahme von Bedeutung ist, wird diese nachfolgend näher beschrieben.

Miller et al. zeigten, dass nach oraler Verabreichung von 1, 10 und 100 mg ¹⁴C-Acrylamid/kg KG an F344-Ratten über Trinkwasser 53-64 % der gegebenen Dosis innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden werden. Nach 7 Tagen lagen die Dosisanteile der Urinmetabolite bei 65-82 %, wobei ca. 10 % der Gesamtradioaktivität in Muskeln und Haut gefunden wurden. Die Ausscheidungsmenge nach intravenöser Gabe von 10 mg ¹⁴C-Acrylamid/kg KG war mit derjenigen nach oraler Gabe vergleichbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Acrylamid nach oraler Verabreichung über Trinkwasser nahezu vollständig absorbiert wird [Miller et al., 1982].

Auch bei oraler Verabreichung über Lebensmittel scheint der größte Teil des gegebenen Acrylamids aufgenommen zu werden. Bjellaas et al. untersuchten die Gehalte an AAMA, GAMA und Glycidamid im 24-Stunden-Urin von Mäusen, denen 24-290 µg Acrylamid/kg KG über Knäckebrötchen verabreicht wurde, im Vergleich zur Ausscheidung nach subkutaner Injektion von 50, 500 und 5000 µg Acrylamid/kg KG. Dabei zeigte sich, dass bei Acrylamid-Aufnahme über Knäckebrötchen bzw. subkutane Injektion die Wiederfindung der gegebenen Dosis im Urin bei 55 % bzw. 54 % lag, woraus eine vergleichbare Bioverfügbarkeit abgeleitet werden kann [Bjellaas et al., 2007]. Aureli et al. bestimmten die Acrylamid-Hämoglobinaddukte im Blut von Schweinen, denen 0,8 und 8 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser sowie Schweinefutter (mit definiertem Acrylamid-Gehalt) verabreicht wurde. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in den AAVal-Gehalten der beiden Behandlungsgruppen festgestellt, was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit hindeutet [Aureli et al., 2007]. Im Gegensatz dazu berichteten Doerge et al. nach Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG über Acrylamid-dotierte Standarddiät eine im Vergleich zur intravenösen Gabe ca. 60 % verminderte Bioverfügbarkeit [Doerge et al. 2005, 2007]. Bei dieser Studie ist zu beachten, dass bei Dotierung der Standarddiät mit Acrylamid-haltigem Trinkwasser Reaktionen mit nukleophilen Bestandteilen der Futtermatrix nicht ausgeschlossen werden können, wodurch sich der Anteil des resorbierbaren Acrylamids reduzieren würde.

Fuhr et al. bestimmten die Gehalte von Acrylamid, Glycidamid, AAMA und GAMA im Urin von Probanden nach Aufnahme von 0,94 mg Acrylamid über Kartoffelchips. Dabei wurden nach 72 Stunden ca. 60 % der Acrylamid-Dosis im Urin gefunden [Fuhr et al., 2006]. Nach Aufnahme von 1 mg D₃-Acrylamid über Trinkwasser lagen die Dosisanteile von AAMA und

GAMA bei 57 % [Boettcher et al., 2006]. Dies deutet darauf hin, dass der größte Teil des aufgenommenen Acrylamids resorbiert wird und dass die Lebensmittelmatrix keinen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Acrylamid hat. In einer weiteren Humanstudie untersuchten Fennel et al. die Gehalte an Acrylamid und dessen Metaboliten im Urin nach Verabreichung von 0,5, 1 und 3 mg Acrylamid/kg KG in Trinkwasser. Dabei wurden innerhalb von 24 Stunden ca. 34 % der aufgenommenen Dosis über den Urin ausgeschieden. Da beim Menschen nach Gabe von Acrylamid auch über den Zeitraum von 24 Stunden hinaus eine Ausscheidung von Mercaptursäuren zu erwarten ist und ein Teil des aufgenommenen Acrylamids an Hämoglobin oder auch andere Proteine bindet, liegt der aufgenommene Anteil vermutlich höher als 34 % [Fennel et al., 2005].

2.1.6.2 Verteilung

Die Verteilung von Acrylamid im Organismus wurde von Miller et al. nach intravenöser Verabreichung von 10 mg ¹⁴C-Acrylamid/kg KG an männlichen F344-Ratten untersucht. Eine Stunde nach Gabe der ¹⁴C-Acrylamid Dosis wurde der größte Teil der Gesamtradioaktivität in Muskeln (48 %), Haut (15 %) sowie Leber (7 %) und Blut (12 %) gemessen. Eine Akkumulation der Radioaktivität wurde lediglich in den Erythrocyten beobachtet, was vermutlich auf die Bildung von Hb-Addukten zurückzuführen ist. Weniger als 1 % der Gesamtradioaktivität wurden im Gehirn bzw. Zentralnervensystem nachgewiesen [Miller et al., 1982].

Nach oraler Gabe von 1 mg ¹⁴C-Acrylamid/kg KG an Beagle-Hunde wurden 6 Stunden nach der Applikation die höchsten Anteile an der verabreichten Gesamtradioaktivität in Muskeln (ca. 35 %) und Leber (ca. 14 %) gemessen. Im Gehirn wurden weniger als 1 % der Gesamtradioaktivität nachgewiesen [Ikeda et al., 1987].

In Studien mit trächtigen Hunden, Schweinen und Ratten wurde gezeigt, dass Acrylamid die Placenta-Schranke überwinden kann [Marlowe et al., 1986; Ikeda et al., 1983; 1985]. Von Sörgel et al. wurden in Frauenmilch Acrylamid-Gehalte von bis zu 19 µg/l nachgewiesen [Sörgel et al., 2002].

In einer Reihe weiterer Tierstudien wurde gezeigt, dass sich Acrylamid schnell und unabhängig vom Expositionsweg auf alle Gewebe verteilt [Barber et al., 2001; Kadry et al., 1999; Sumner et al., 2003; Hashimoto und Aldridge, 1970].

2.1.6.3 Metabolismus

Der Metabolismus von Acrylamid umfasst sowohl Reaktionswege der Giftung als auch der Entgiftung (Abb. 2.3).

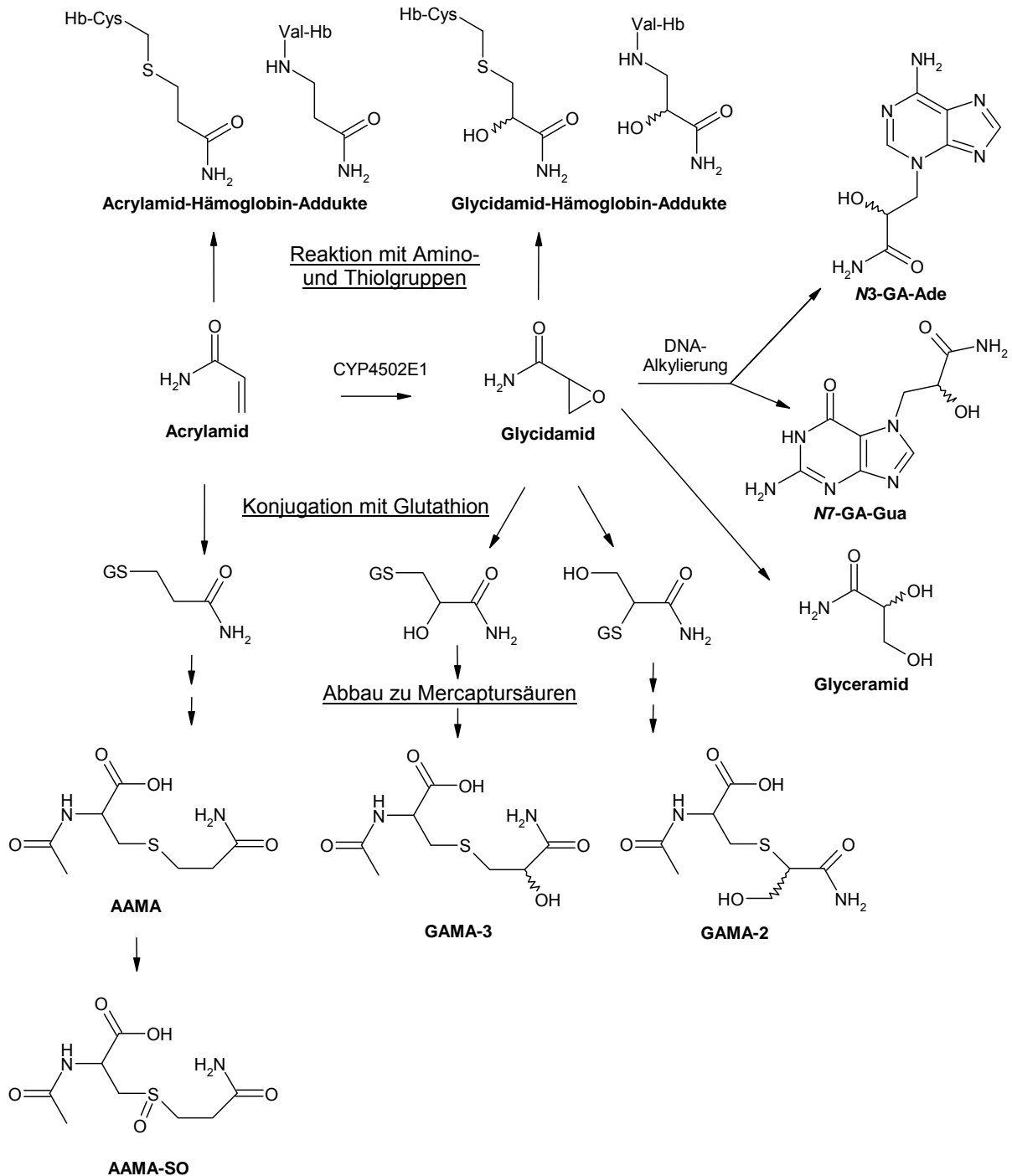


Abb. 2.3: Metabolismus von Acrylamid; modifiziert nach [Sumner et al., 1992; Friedman 2003; Fennell et al., 2005]; *N3-GA-Ade*: *N3*-Glycidamid-Adenin, *N7-GA-Gua*: *N7*-Glycidamid-Guanin, AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure, GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure, AAMA-SO: Acrylamid-Mercaptursäure-Sulfoxid

Ein Teil des aufgenommenen Acrylamids wird durch Cytochrom P450 2E1 (CYP450 2E1) zum Glycidamid epoxidiert. Die Tatsache, dass primär CYP450 2E1 für diese Reaktion verantwortlich ist, wurde in Tierstudien mit CYP450 2E1-Knockout Mäusen gezeigt, in deren Urin keine Glycidamid-Metabolite nachweisbar waren [Sumner et al., 1999]. Aktuelle Humanstudien belegen die wesentliche, jedoch nicht ausschließliche Beteiligung von CYP450 2E1, da die Hemmung des Enzyms mit Disulfiram lediglich zu einer Verringerung der Glycidamid-Metabolite im Urin um 50-60 % führte [Doroshenko et al., 2009]. Glycidamid scheint einen wesentlichen Beitrag zur kanzerogenen Wirkung von Acrylamid zu leisten, da es durch Bildung von DNA-Addukten direkt genotoxisch wirkt [Gamboa da Costa et al., 2003; Besaratinia und Pfeifer, 2005]. Für Acrylamid konnten lediglich unter drastischen *in vitro* Bedingungen DNA-Addukte mit dem N1 des Adenins und N7 des Guanins nachgewiesen werden [Solomon et al., 1985]. Bei N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanin (N7-GA-Gua) handelt es sich um das Glycidamid-DNA-Addukt mit der quantitativ größten Bedeutung [Segeberäck et al., 1995]. Daneben konnte nach Verabreichung von 50 mg Acrylamid/kg KG an Mäuse auch N3-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)adenin (N3-GA-Ade) nachgewiesen werden, wobei die Gehalte um den Faktor 50-100 unter denen des N7-GA-Gua lagen [Gamboa da Costa et al., 2003]. N7-GA-Gua und N3-GA-Ade verfügen über promutagene Eigenschaften, da sie einer spontanen Depurinierung unterliegen können [Besaratinia und Pfeifer, 2005].

Sowohl Acrylamid als auch Glycidamid neigen aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften zur Reaktion mit nukleophilen Zentren in Makromolekülen wie z. B. den Sulfhydryl- und Aminogruppen im Hämoglobin und Serumalbumin [Friedman, 2003]. Die irreversible Bindung an die Blutproteine Albumin und Hämoglobin spielt neben der Reaktion mit Glutathion eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Acrylamid und Glycidamid, da daraus eine geringere systemische Verfügbarkeit resultiert [Ramsey et al., 1984; Barber et al., 2001].

Im Rahmen des Phase-II Fremdstoffmetabolismus werden Acrylamid und Glycidamid an Glutathion gebunden und im weiteren Verlauf als Mercaptursäuren ausgeschieden (Abb. 2.4).

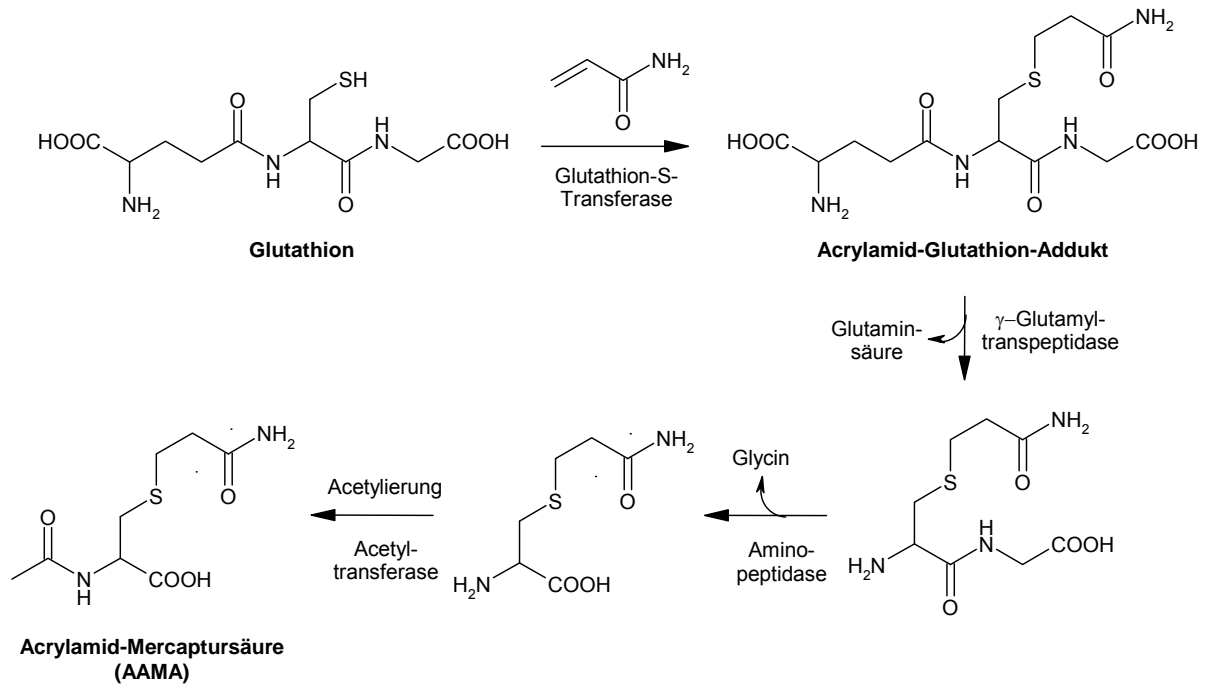


Abb. 2.4: Mechanismus der Mercaptursäure-Bildung am Beispiel Acrylamid, modifiziert nach [Forth et al., 1996]

Dieser Metabolisierungsweg ist für die Detoxifizierung von Acrylamid und Glycidamid in Maus, Ratte und Mensch von wesentlicher Bedeutung, da bis zu 60 % einer verabreichten Acrylamid-Dosis in Form der Mercaptursäuren ausgeschieden werden [Fennell et al., 2005; Fuhr et al., 2006; Bjellaas et al., 2007].

Unterschiede in der Toxikokinetik zwischen Maus, Ratte und Mensch wurden sowohl beim oxidativen Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid als auch bei der Konjugation von Acrylamid und Glycidamid mit GSH und der Epoxidhydrilase vermittelten Hydrolyse von Glycidamid beobachtet. Nach oraler Applikation von 50 mg bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG an B6C3F₁-Mäuse waren 55 % bzw. 81 % der Gesamtmetabolite im Urin auf Glycidamid zurückzuführen [Sumner et al., 1992; Doerge et al., 2007]. Nach Verabreichung von 3 mg ¹³C₃-Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten stammten 41 % der Metabolite im Urin von Glycidamid [Fennell und Friedman, 2005]. Im Vergleich dazu waren nach Gabe von 3 mg ¹³C₃-Acrylamid/kg KG an freiwillige männliche Probanden lediglich 14 % der Urinmetabolite Glycidamid zuzuordnen [Fennell et al., 2005]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Effektivität der oxidativen Umwandlung von Acrylamid zu Glycidamid in der Reihenfolge Maus > Ratte > Mensch abnimmt. Nach Applikation von 50 mg ¹³C₃-Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten lagen die Anteile der Glycidamid-Metabolite an den ausgeschiedenen Urinmetaboliten bei 28 %, was im Vergleich zur Dosis von 3 mg ¹³C₃-Acrylamid/kg KG erniedrigt ist und auf eine Sättigung des oxidativen Metabolismus hindeutet [Sumner et al., 1992]. Nach Gabe von 0,5, 1 und 3 mg ¹³C₃-Acrylamid/kg KG an freiwillige männliche Probanden wurden hingegen keine dosisabhängigen Unterschiede in der

Metabolitenverteilung festgestellt [Fennell et al., 2006]. Da bisher keine höheren Dosen an Menschen verabreicht wurden, kann zur Belastbarkeit des oxidativen Metabolismus beim Menschen keine endgültige Aussage getroffen werden.

Nach oraler Gabe von 50 mg bzw. 100 µg $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid /kg KG an B6C3F₁-Mäuse lag der Anteil der Acrylamid-Mercaptursäure an den Gesamtmetaboliten im Urin bei 41 % bzw. 18 % [Sumner et al., 1992; Doerge et al., 2007]. Fennell und Friedman konnten nach Verabreichung von 3 mg $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten 59 % der Urinmetabolite auf die Konjugation von Acrylamid mit Glutathion zurückführen [Fennell und Friedman, 2005]. Im Vergleich dazu stammten nach Gabe der gleichen Dosis an männliche Probanden 86 % der Urinmetabolite aus der Konjugation von Acrylamid mit Glutathion [Fennell et al., 2005]. Darüber hinaus wurden 13 % der Urinmetabolite als das Sulfoxid der Acrylamid-Mercaptursäure (AAMA-SO) identifiziert, wobei dieser Metabolit bei Nagern nicht nachgewiesen wurde [Fennell und Friedman, 2005]. Die beim Menschen anhand der Mercaptursäure-Bildung beobachtete effektivere Entgiftung von Acrylamid (durch Kopplung mit GSH) könnte eine Erklärung für die im Vergleich zu Maus und Ratte verminderte Bildung von Glycidamid sein [Gargas et al., 2009].

Beim Menschen erfolgt die Entgiftung von Glycidamid neben der Bindung an Glutathion durch die vermutlich Epoxidhydrolase vermittelte Hydrolyse unter Bildung von 2,3-Dihydroxypropionamid (Glyceramid). So wurden nach Gabe einer Dosis von 3 mg $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid/kg KG 11 % der Urinmetabolite als Glyceramid identifiziert, wohingegen nach Verabreichung der entsprechenden Dosis an Ratten kein Glyceramid nachweisbar war. Im Gegensatz dazu lag beim Menschen der Anteil an GAMA mit weniger als 1 % der Gesamtmetabolite wesentlich geringer als der entsprechende Anteil bei der Ratte (ca. 41 %) [Fennell et al., 2005; 2006]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit *in vitro* Untersuchungen zum Metabolismus vergleichbarer Epoxide. Kedderis et al. untersuchten die Geschwindigkeit der Reaktion von 2-Cyanoethylenoxid, wobei es sich um den oxidativen Metaboliten von Acrylnitril handelt, mit Glutathion. Dabei zeigte sich, dass die Kopplung mit Glutathion in Rattenleber-Cytosol etwa 9 mal schneller verläuft als in humanem Leber-Cytosol [Kedderis et al., 1995]. Darüber hinaus war eine mikrosomale Epoxidhydrolase-Aktivität in Rattenleber nicht nachweisbar, wohingegen in der menschlichen Leber eine Aktivität von $V_{\max} = 3,34 \text{ nmol/g min}^{-1}$ bestimmt werden konnte [Kedderis und Batra, 1993]. Nach oraler Verabreichung von 50 mg $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid/kg KG an F344-Ratten und B6C3F₁-Mäusen lagen die Anteile von Glyceramid an den Gesamtmetaboliten im Urin bei 2 bzw. 5 %, was auf eine quantitativ geringe Bedeutung dieses Metaboliten in den untersuchten Spezies hindeutet [Sumner et al., 1992].

2.1.6.4 Ausscheidung

Die Ausscheidung von Acrylamid und seiner Metaboliten erfolgt überwiegend über den Harn [Miller et al., 1982; Sumner et al., 1992; Fennell et al., 2006; Boettcher et al., 2006a; Fuhr et al., 2006]. Miller et al. beobachteten in F344-Ratten eine biphasische Eliminationskinetik, wobei in der ersten Eliminationsphase die Halbwertszeit < 5 Stunden betrug, während die Halbwertszeit der zweiten Eliminationsphase bei < 8 Tagen lag. Nach 24 Stunden waren bereits 62 % der verabreichten Acrylamid-Dosis (10 mg 2,3-¹⁴C-Acrylamid/kg KG) über den Urin ausgeschieden. Nach 7 Tagen stiegen die Anteile der Urinmetabolite auf 71 %, wobei über diesen Zeitraum lediglich 6 % der Gesamtradioaktivität in den Fäces nachgewiesen wurde [Miller et al., 1982].

Nach Verabreichung von 13 µg D₃-Acrylamid/kg KG an einen freiwilligen Probanden wurden innerhalb von 46 Stunden 57 % der Dosis in Form der Mercaptursäuren AAMA und GAMA ausgeschieden. Die Eliminationskinetik zeigte einen biphasischen Verlauf mit Eliminations-Halbwertszeiten von 3,5 Stunden für AAMA und GAMA in der ersten Phase und mehr als 10 Stunden in der zweiten Phase [Boettcher et al., 2006a]. Fuhr et al. bestimmten die Gehalte an Acrylamid und Glycidamid sowie der entsprechenden Mercaptursäuren bei freiwilligen Probanden nach Aufnahme von 12,4 µg Acrylamid/kg KG über Kartoffelchips. Nach 72 Stunden lagen die mittleren Anteile der Urinmetabolite an der aufgenommenen Dosis bei 4 % für Acrylamid, 50 % für AAMA und 6 % für GAMA, wobei kein freies Glycidamid detektierbar war. Dabei wurden für Acrylamid, AAMA und GAMA mittlere Eliminationshalbwertszeiten von 2, 17 und 25 Stunden ermittelt [Fuhr et al., 2006].

Tab. 2.2: Ausscheidung von Acrylamid und dessen Metabolite im Urin von Maus, Ratte und Mensch nach oraler Verabreichung von Acrylamid über Trinkwasser (Angaben als prozentuale Dosisanteile); ^a: Sumner et al. 1992, ^b: Doerge et al. 2007, ^c: Sumner et al. 2003, ^d: Fennell et al. 2005, ^e: Fennell et al. 2006, ^f: Boettcher et al. 2006a; NQ: detektierbar, nicht quantifiziert; NG: nicht gemessen; ND: nicht detektierbar; GAMA: GAMA-3 + GAMA-2

Spezies	Dosis mg/kg KG	AA	AAMA	AAMA-SO	GA	GAMA	Glyceramid
Maus	50 ^a	NQ	21	ND	9	17	3
	0,1 ^b	0,7	7	NG	16	16	NG
Ratte	50 ^a	NQ	34	ND	3	12	1
	50 ^c	NQ	42	ND	4	12	0,7
	3 ^d	NQ	29	ND	ND	21	ND
	0,1 ^b	2	31	NG	6	28	NG
Mensch	3 ^e	3	28	7	0,7	0,7	NG
	3 ^d	NG	22	4	0,8	ND	3
	1 ^e	5	34	9	0,6	0,8	NG
	0,5 ^e	5	31	8	0,4	0,8	NG
	0,013 ^f	NG	52	NG	NG	5	NG

2.1.7 Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin im Hämoglobin

Aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften reagieren sowohl Acrylamid als auch Glycidamid mit nukleophilen Zentren in Makromolekülen wie z. B. dem Hämoglobin [LoPachin et al., 2004]. Humanes Hämoglobin hat ein Molekulargewicht von ca. 64 kDa und besteht aus 4 Polypeptidketten, von denen jeweils 2 identisch sind. Das beim Erwachsenen vorherrschende Hämoglobin A besteht aus zwei α -Ketten mit je 141 Aminosäuren und zwei β -Ketten mit je 146 Aminosäuren [Stryer, 1991]. Jede dieser Polypeptidketten trägt am N-terminalen Ende die Aminosäure Valin, deren freie Aminogruppe ein nukleophiles Zentrum darstellt und leicht mit Elektrophilen wie Acrylamid oder Glycidamid reagiert. Neben dem N-terminalen Valin sind beim Menschen darüber hinaus Addukte mit His^{77,97} und Cys⁹³ der α -Peptidkette sowie His⁴⁵ der β -Peptidkette möglich [Badghisi und Liebler, 2002]. Humanes Hämoglobin verfügt lediglich über einen reaktiven Cysteinyln-Rest (Cys⁹³), dessen Reaktivität im Vergleich zur Thiolgruppe des Glutathions geringer ist. Im Gegensatz dazu beinhaltet das Hämoglobin-Molekül von Ratten drei reaktive Cysteinyln-Reste (Cys^{13,93,125}), wobei für Cys¹²⁵ im Erythrocyten eine im Vergleich zu Glutathion 30-fach höhere Reaktivität gezeigt wurde [Di Simplicio et al., 1998; Rossi et al., 2001].

Dem N-terminalen Valin kommt für das *in vivo*-Monitoring von Expositionen gegenüber elektrophilen Substanzen aus analytischer Sicht eine besondere Bedeutung zu. Mit Hilfe des modifizierten Edman-Abbaus lässt sich spezifisch die N-terminale, alkylierte Aminosäure abspalten [Mowrer et al., 1986]. Als Derivatisierungsreagenz wird häufig Pentafluorphenylisothiocyanat (PF₅PITC) verwendet, das mit der N-alkylierten endständigen Aminosäure zu einem Pentafluorphenylthiohydantoin reagiert. Abb. 2.5 zeigt die Umsetzung am Beispiel der Acrylamid- und Glycidamid-Valin-Addukte. Zur Verbesserung der gaschromatographischen Eigenschaften kann das entstehende GAValPF₅PTH mit Aceton umgesetzt werden, wodurch aus dem von Glycidamid stammenden Alkylrest ein Oxazolidinon-Derivat entsteht [Paulsson et al., 2003].

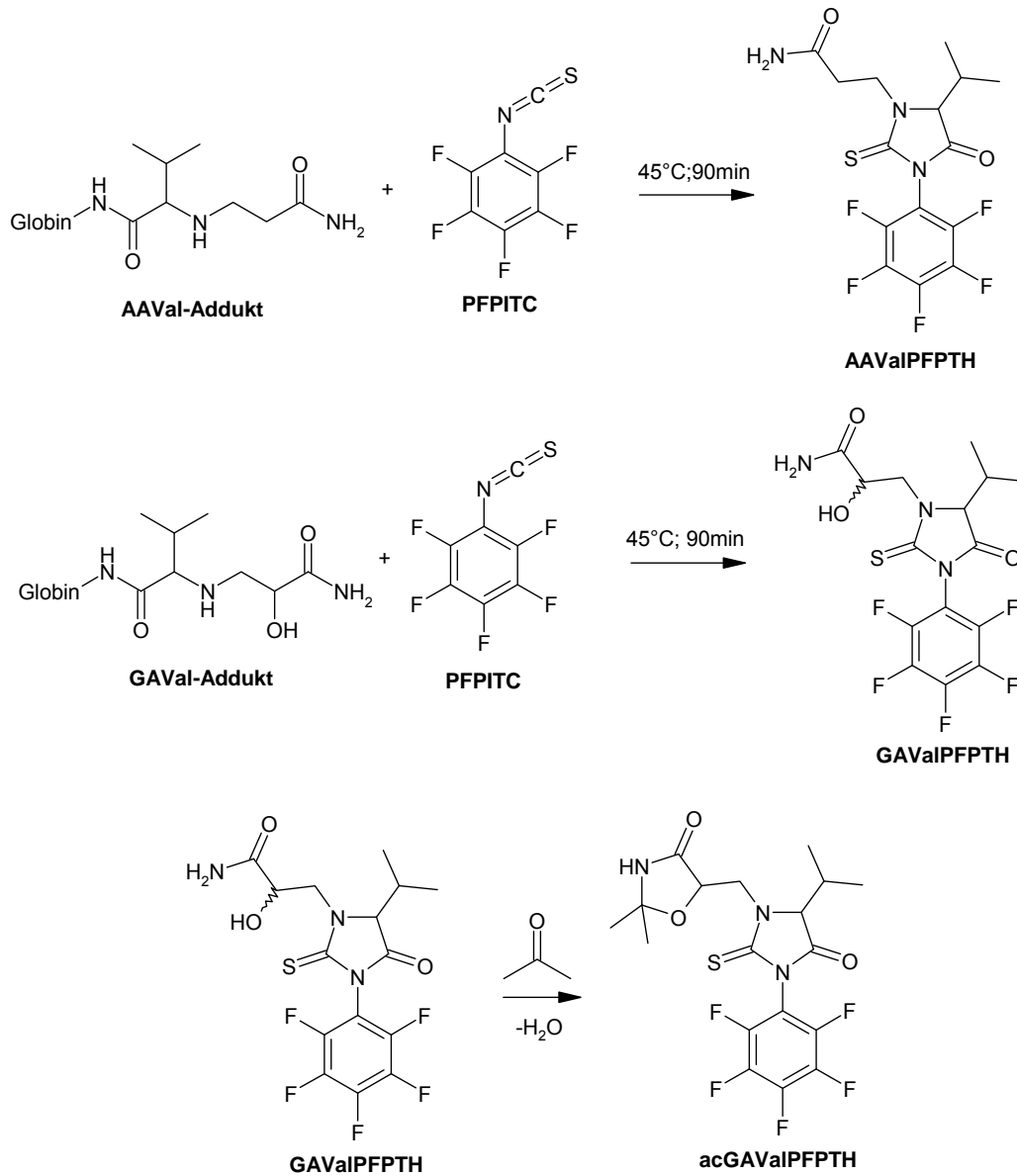


Abb. 2.5: Derivatisierung der Acrylamid- und Glycidamid-Valin-Addukte des Hämoglobins (AA/GAVal-Addukt) mit Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPITC) zu den entsprechenden Pentafluorphenylthiohydantoinen (PFPTH) sowie Umsetzung von GAVaIPFPTH mit Aceton; modifiziert nach [Rydberg et al. 2002; Paulsson et al., 2003]

2.1.8 Toxikodynamik von Acrylamid

2.1.8.1 Neurotoxische Wirkungen

Neurotoxische Wirkungen von Acrylamid wurden sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen beobachtet. Im Bereich höherer Dosierungen (20-50 mg Acrylamid/kg KG/d) wurde im Tierversuch vor allem das zentrale Nervensystem beeinträchtigt, was zu Ataxien bei Ratten, Hunden und Primaten führte [IPCS, 1999; Mc Collister et al., 1964; Thomann et al., 1974; Hopkins, 1970]. Im Bereich niedrigerer Dosierung scheint hingegen das periphere Nervensystem betroffen zu sein. Die Verabreichung von 5 bzw. 20 mg Acrylamid/kg KG/d an F344-Ratten führte zu peripheren Nervendegenerationen, die sich jedoch als voll reversibel erwiesen [Burek et al., 1980]. Nach Gabe von 2 mg Acrylamid/kg KG/d über 18 Monate an F344-Ratten wurden Degenerationen des Nervus tibialis beobachtet [Johnson et al., 1986]. In einer weiteren Langzeitstudie mit F344-Ratten wurden bei einer Dosis von 2 mg Acrylamid/kg KG/d über 18 Monate vermehrt Degenerationen des Nervus ischiadicus festgestellt [Friedman et al., 1995].

Beim Menschen wurden unter akuter Acrylamid-Einwirkung Ataxie, Tremor, Reflexstörungen, verwaschene Sprache und Verwirrheitszustände beobachtet [Auld und Bedwell, 1967]. Bei schwedischen Tunnelarbeitern, die einem acrylamidhaltigen Gemisch ausgesetzt waren, zeigten sich ebenfalls periphere Nervenstörungen, die jedoch größtenteils reversibel waren. Dabei korrelierten die AAVaI-Hb-Adduktgehalte mit dem Auftreten der neurotoxischen Symptome, wobei ein NOAEL von 510 pmol/g Hämoglobin abgeleitet wurde [Hagmar et al., 2001]. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen der neurotoxischen Wirkung von Acrylamid diskutiert, insbesondere die Inhibition des schnellen axonalen Transports auf der Basis von Kinesin-Motorproteinen sowie die direkte Hemmung der Neurotransmission [Sickles et al., 2002; LoPachin, 2002]. Als Ursache der neurotoxischen Wirkung kommt die Reaktion von Acrylamid und Glycidamid mit nukleophilen Zentren in den relevanten Makromolekülen in Betracht [Friedman, 2003]. Für die Neurotoxizität von Acrylamid wurde ein NOAEL von 0,5 mg/kg KG/Tag festgelegt [WHO, 2002].

2.1.8.2 Entwicklungs- und reproduktionstoxische Wirkungen

Bei Ratten führten 50-200 ppm Acrylamid im Trinkwasser über den Zeitraum von 70 Tagen zu einer Verringerung der Spermienbeweglichkeit, des Geburtsgewichts und der Gewichtszunahme während der Lactationsperiode sowie zu Störungen des Paarungsverhaltens [Zenick et al., 1986]. In einer weiteren Studie wurde nach Verabreichung von 5-20 mg Acrylamid/kg KG ebenfalls eine Verringerung des Geburtsgewichts und der Anzahl der Nachkommen sowie Anomalien in der Spermienanatomie und Beweglichkeit

beobachtet [Wise et al., 1995]. Auch in einer Studie mit Mäusen wurde nach Gabe von 45 mg Acrylamid/kg KG/d während der Trächtigkeit eine Verringerung der Geburtsgewichte festgestellt [Field et al., 1990]. Darüber hinaus führte die dermale Exposition mit Acrylamid bei Mäusen zu Chromosomenschäden in Keimzellen [Gutierrez-Espeleta et al., 1992]. Der molekulare Mechanismus der reproduktions- und entwicklungstoxischen Wirkungen bei den männlichen Tieren liegt vermutlich in der Alkylierung von Protaminen und Motorproteinen der Spermien, außerdem wird eine GSH-Depletion und DNA-Schädigung in den Hoden diskutiert [Tyl und Friedman, 2003; Dearfield et al., 1995].

Für die Reproduktionstoxizität von Acrylamid wurde ein NOAEL von 2 mg/kg KG/d festgelegt [WHO, 2002].

2.1.8.3 Genotoxische und mutagene Wirkungen

2.1.8.3.1 Genotoxizität und Mutagenität in vitro

Acrylamid induziert im Ames-Test mit den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 und *Escherichia Coli* WP2uvrA⁻ sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung keine Genmutationen. Im Gegensatz dazu zeigt Glycidamid im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA 100 und TA 1535 mit und ohne metabolische Aktivierung positive Ergebnisse [Hashimoto und Tanii, 1985; Tsuda et al., 1993]. Tsuda et al. untersuchten darüber hinaus das mutagene Potential von Acrylamid im HPRT-Test mit V79-Zellen, wobei bis zur höchsten getesteten Konzentration von 7 mM kein Anstieg in der Mutationsrate beobachtet wurde [Tsuda et al., 1993]. In früheren Arbeiten im Arbeitskreis wurde gezeigt, dass Acrylamid im HPRT-Test mit V79-Zellen bis zu einer Konzentration von 10 mM negative Ergebnisse zeigt. Dagegen führte Glycidamid bereits ab einer Konzentration von 0,8 mM zu Mutationen. Im Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) mit humanen Lymphocyten zeigte Acrylamid nach vierstündiger Inkubationszeit mit bis zu 6 mM keine Effekte, wohingegen Glycidamid bereits ab Konzentrationen von 0,3 mM zu einem Anstieg der DNA-Strangbrüche führte [Baum et al., 2005]. Bei Erhöhung der Sensitivität des Comet Assays durch das bakterielle DNA-Reparatur-Enzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) induziert Glycidamid in humanen Lymphocyten bei ebenfalls vierstündiger Inkubation bereits ab 10 µM DNA-Strangbrüche [Thielen et al., 2006].

2.1.8.3.2 Genotoxizität in vivo

Nach wiederholter Verabreichung von 1-30 mg Acrylamid/kg KG/d über 7 Tage an CBA-Mäuse wurde bereits bei der niedrigsten Dosis ein Anstieg der Mikrokern-Bildung in Knochenmarkszellen beobachtet. Die niedrigen DNA-Gehalte der Mikrokerne deuteten nicht auf die Anwesenheit vollständiger Chromosomen hin, so dass für die genotoxische Wirkung von Acrylamid vermutlich ein klastogener Mechanismus in Frage kommt [Abramsson-

Zetterberg, 2003]. In einer weiteren Studie wurde nach Gabe von 1,5-6 mg Glycidamid/kg KG an CBA-Mäuse eine dosisabhängige Zunahme von Mikrokernen in Knochenmarkszellen beobachtet. Dabei wurde eine ähnliche Mikrokernfrequenz pro Einheit der *in vivo* Dosis gefunden wie bei einer vorausgegangenen Studie, bei der die Tiere mit Acrylamid behandelt wurden und Glycidamid als Metabolit entstand. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Glycidamid einen wesentlichen Beitrag zur Genotoxizität von Acrylamid leistet [Paulsson et al., 2003b; Paulsson et al., 2002].

Acrylamid zeigte im dominanten Letaltest an Mäusen und Ratten positive Ergebnisse [Chapin et al., 1995; Tyl et al., 2000]. Bei der Prüfung auf außerplanmäßige DNA-Synthese (UDS-Assay) waren die Ergebnisse in Spermatozyten von Mäusen und Ratten positiv und in Ratten-Hepatocyten negativ [Sega et al., 1990; Butterworth et al., 1992].

2.1.8.4 Kanzerogenität

Die kanzerogene Wirkung von Acrylamid wurde in Studien mit Mäusen und Ratten untersucht. Nach oraler bzw. intraperitonealer Gabe von 1–30 mg Acrylamid/kg KG/d an A/J-Mäuse wurde ein dosisabhängiger Anstieg von Lungenadenomen festgestellt [Bull et al., 1984]. Nach Verabreichung von 0,01–2 mg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser an F344-Ratten wurden nach einer maximalen Behandlungszeit von 24 Monaten bei den männlichen Tieren ab einer Dosis von 2 mg Acrylamid/kg KG/d eine signifikante Erhöhung der Schilddrüsentumore sowie ab 0,5 mg Acrylamid/kg KG/d peritoneale Mesotheliome in der Hodenregion beobachtet. Bei den weiblichen Tieren wurden in der höchsten Dosisgruppe Tumore der Schilddrüse, Brustdrüse, Zentralnervensystem, Mundhöhle und Uterus festgestellt [Johnson et al., 1986]. In einer weiteren Studie mit Fischer 344 Ratten mit Dosen von bis zu 3 mg Acrylamid/kg KG/d wurden nach 2-jähriger Behandlungszeit ebenfalls Tumore der Schilddrüse (ab 1 mg Acrylamid/kg KG/d) in beiden Geschlechtern sowie peritestikuläre Mesotheliome in den männlichen Tieren (ab 2 mg Acrylamid/kg KG/d), Tumore der Brustdrüse und Fibroadenome in den weiblichen Tieren (ab 1 mg Acrylamid/kg KG/d) festgestellt [Friedman et al., 1995].

Zur Untersuchung der kanzerogenen Wirkung von Acrylamid am Menschen wurden eine Reihe von epidemiologischen Studien durchgeführt. In Kohortenstudien mit exponierten Arbeitern wurde im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung keine signifikante Erhöhung der Tumorinzidenz beobachtet [Collins et al., 1989; Marsh et al., 1999; Sobel et al., 1986]. Darüber hinaus konnte in Studien mit der Allgemeinbevölkerung keine statistisch signifikante Korrelation zwischen erhöhten Acrylamid-Gehalten in der Nahrung und dem Auftreten von Tumorerkrankungen gezeigt werden [Mucci et al., 2003, 2004, 2005, 2006; Pelucchi et al., 2006]. Allerdings ist die statistische Aussagekraft dieser Studien aufgrund der geringen

Größe der Kohorten sowie Defiziten bei der Erhebung der Exposition und Berücksichtigung von Störfaktoren als kritisch zu bewerten [Carere, 2006].

Für die im Tierversuch kanzerogene Wirkung von Acrylamid werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Aufgrund der DNA-alkylierenden Wirkung von Glycidamid gilt ein genotoxischer Mechanismus als sehr wahrscheinlich. Darüber hinaus könnten die häufig in hormonabhängigen Organen aufgetretenen Tumore auf Störungen des endokrinen Systems zurückgeführt werden. Da sowohl Acrylamid als auch Glycidamid eine hohe Reaktivität gegenüber nukleophilen Zentren in Makromolekülen zeigen, könnten durch Beeinflussung von z. B. Enzymen oder Rezeptoren zelluläre Funktionen beeinträchtigt werden [Carere, 2006].

2.2 Acrolein

2.2.1 Allgemeine Grundlagen

Bei Acrolein (2-Propenal; $M_R=56,06$ g/mol) handelt es sich um eine farblose bis gelbliche, bei Raumtemperatur leichtbewegliche und brennbare Flüssigkeit von stechendem Geruch. Als α,β -ungesättigte Carbonylverbindung neigt Acrolein sehr leicht zu Polymerisations- bzw. Additionsreaktionen und ist daher in reinem Zustand wenig stabil.

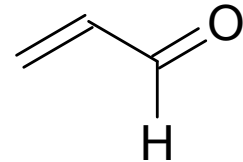


Abb. 2.6: Acrolein

Acrolein ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Herstellung von Acrylsäure und Polymeren. [Eisenbrand et al., 2006; Roempp online]

2.2.2 Expositionsquellen

Eine Hauptexpositionsquelle für Acrolein stellt die Atmosphäre dar. Durch unvollständige Verbrennungsprozesse enthält Luft durchschnittlich $14,3 \mu\text{g Acrolein}/\text{m}^3$ [EPA, 2003]. Bei einem mittleren Atemvolumen des Menschen von ca. $20 \text{ m}^3/24 \text{ h}$ entspricht dies einer Acrolein-Exposition von $286 \mu\text{g}/\text{d}$ [ECHA, 2008].

Im Hauptstromrauch von Zigaretten konnten $56\text{-}118 \mu\text{g Acrolein}$ nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Acrolein-Bildung mit steigendem Glycerin- und Zuckergehalt des Tabaks erhöht [Carmines und Gaworski, 2005; Talhout et al., 2006].

Auch Lebensmittel sind eine Expositionsquelle für Acrolein. Himbeeren, Trauben, Erdbeeren und Brombeeren enthalten $10\text{-}50 \mu\text{g Acrolein}/\text{kg}$. Höhere Konzentrationen sind in Käse ($290\text{-}1300 \mu\text{g Acrolein}/\text{kg}$) sowie Rotwein (bis zu $3800 \mu\text{g Acrolein}/\text{kg}$) enthalten [Eisenbrand et al., 2006].

In überhitzten Speisefetten kann Acrolein durch Dehydratisierung von Glycerin sowie Lipidperoxidation entstehen [Esterbauer et al., 1991]. Dabei kann durch β -Spaltung von Fettsäurehydroperoxiden Acrolein freigesetzt werden (Abb. 2.7).

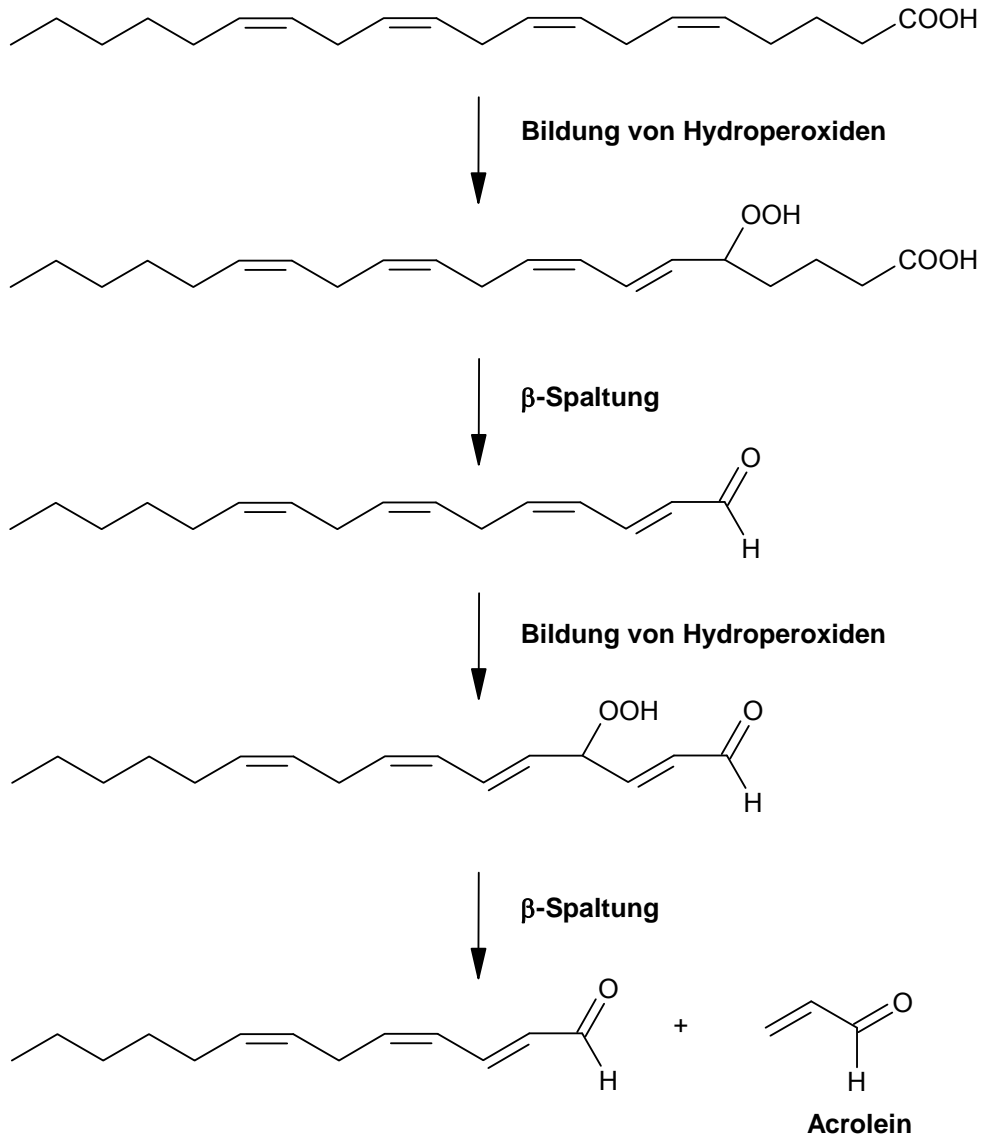


Abb. 2.7: Postulierter Mechanismus der Bildung von Acrolein aus Arachidonsäure; modifiziert nach [Esterbauer et al., 1991]

In erhitzten Lebensmitteln kann die thermische Zersetzung von Aminosäuren wie Methionin und Threonin zur Bildung von Acrolein führen. Dabei wird Methionin durch Strecker-Abbau in Methional überführt. Aus Methional kann durch Retro-Michael-Addition Methanthiol und Acrolein entstehen. Des Weiteren führt die Oxidation von Methional zum Methionalsulfoxid, welches in Methylsulfensäure und Acrolein gespalten werden kann [Ballance, 1961; Mottram et al., 2002; Stevens und Maier, 2008]. Threonin bildet über den Strecker-Abbau 2-Hydroxypropanal, dessen Dehydratisierung wie in Abb. 2.8 gezeigt zum Acrolein führt [Li und Ho, 2005].

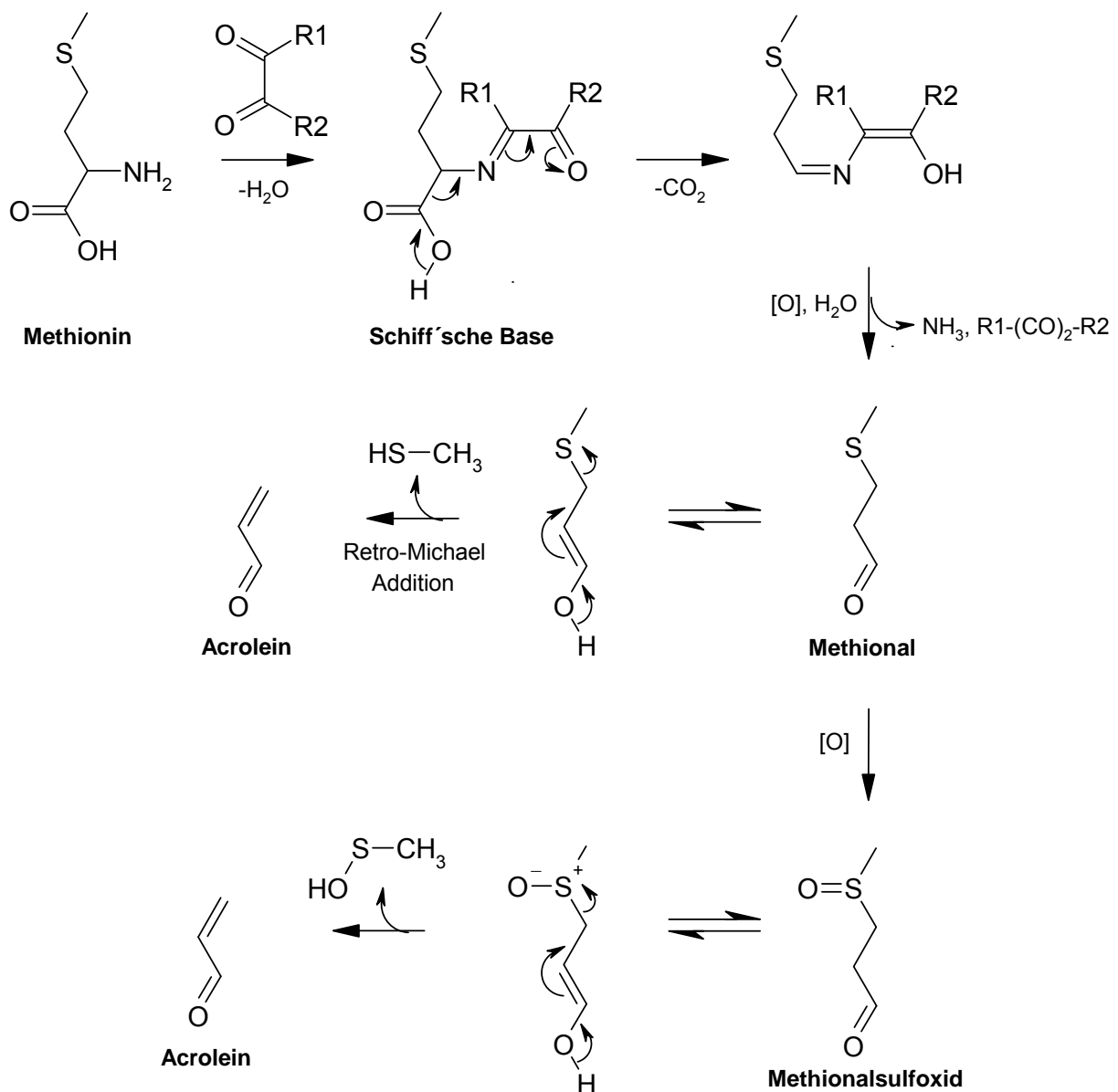


Abb. 2.8: Mechanismus zur Bildung von Acrolein aus Methionin; modifiziert nach [Stevens und Maier, 2008]

Bei der Zubereitung von kohlenhydrathaltigen Lebensmitteln kann Acrolein im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen [Yaylayan et al., 1999; Yaylayan und Keyhani, 2000]. Dabei führt die Enolisierung von Hydroxypropanon, welches z. B. durch 3,4-Retro-Aldol-Spaltung (3,4-RAS) aus 1-Desoxyglucoson entsteht, zu 2-Hydroxypropanal. Die Dehydratisierung von 2-Hydroxypropanal hat die Bildung von Acrolein zur Folge (Abb. 2.9).

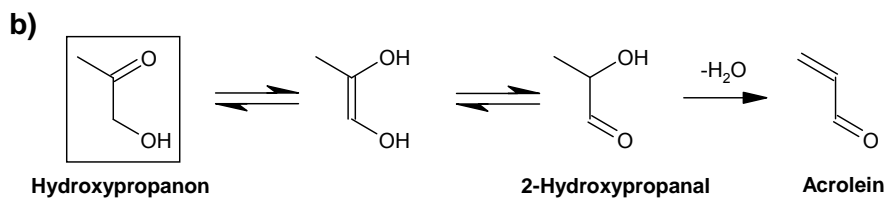
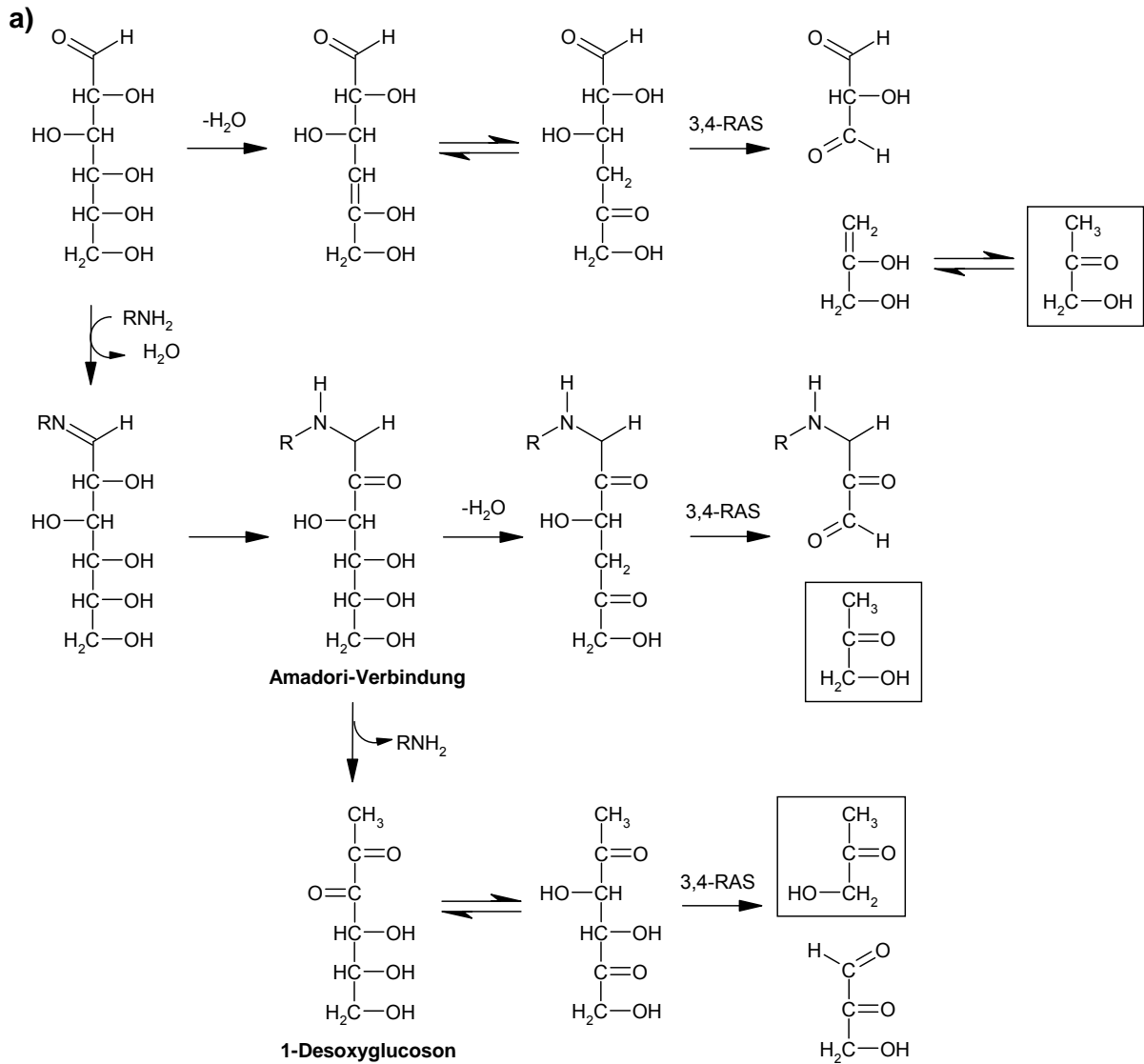


Abb. 2.9: Mechanismen zur Entstehung von a) Hydroxypropanon im Verlauf der Maillard-Reaktion und b) Acrolein aus Hydroxypropanon; RAS: Retro-Aldol-Spaltung; modifiziert nach [Yaylayan et al., 1999; Yaylayan und Keyhani, 2000; Stevens und Maier, 2008]

Eine wichtige endogene Expositionsquelle für Acrolein ist die Myeloperoxidase (MPO)-vermittelte Oxidation von Threonin. Dabei entsteht der Acrolein-Precursor 2-Hydroxypropanal (Abb. 2.10), welcher durch Dehydratisierung in Acrolein umgewandelt wird [Anderson et al., 1997]. Darüber hinaus führt der Aminooxidase (AO)-vermittelte Abbau von Spermin (Abb. 2.11) zur Bildung von Acrolein [Lee und Sayre, 1998; O'Brien et al., 2005].

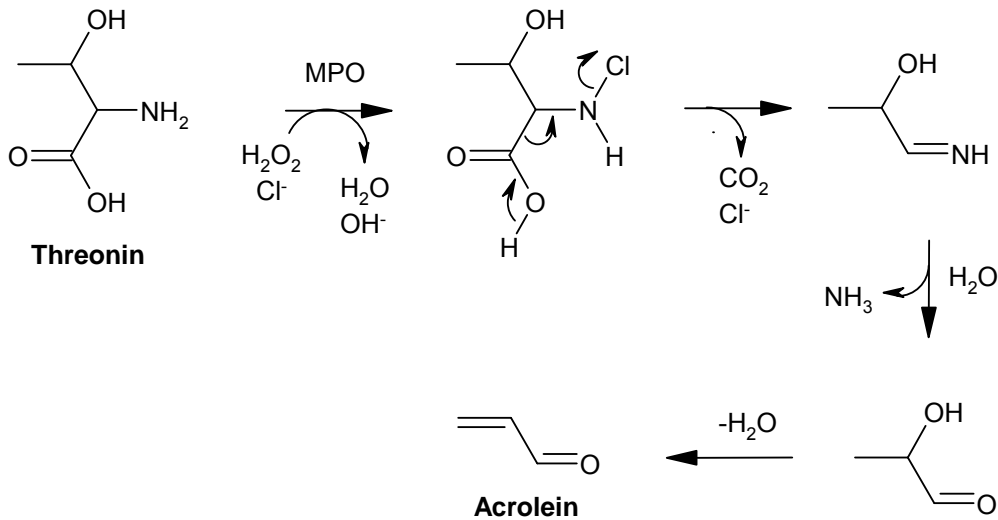


Abb. 2.10: Endogene Bildung von Acrolein durch Myeloperoxidase (MPO)-vermittelte Oxidation von Threonin [modifiziert nach Anderson et al., 1997; Stevens und Maier, 2008]

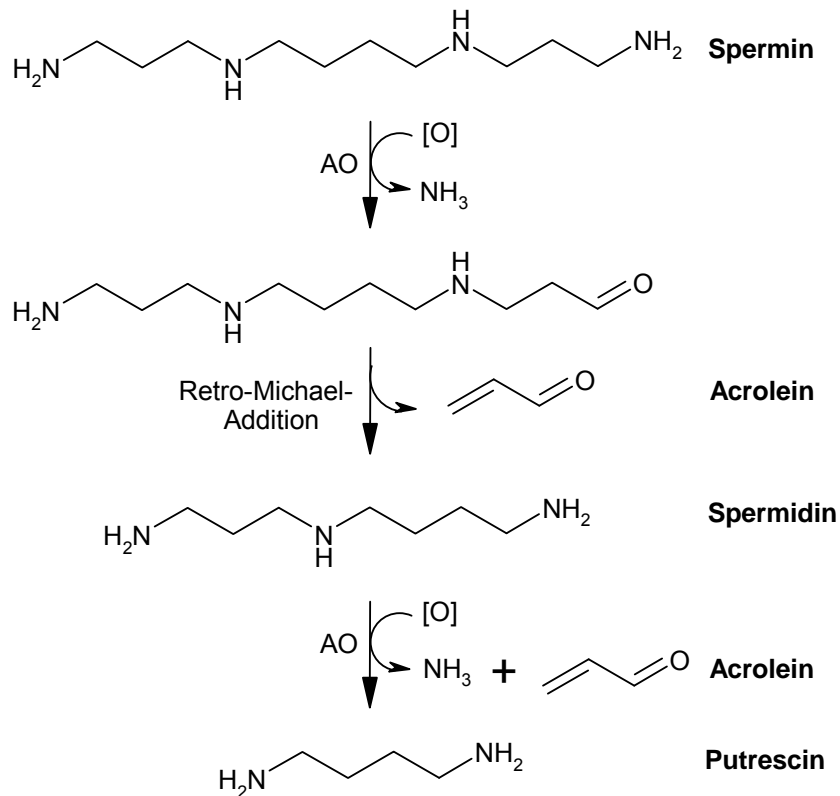


Abb. 2.11: Endogene Bildung von Acrolein durch Aminooxidase (AO)-vermittelten Abbau von Spermin; modifiziert nach [Stevens und Maier, 2008]

2.2.3 Toxikokinetik von Acrolein

Bei Acrolein handelt es sich um das stärkste Elektrophil unter den α,β -ungesättigten Aldehyden [Witz et al., 1987]. Absorbiertes Acrolein reagiert daher unmittelbar mit Thiol- sowie primären und sekundären Amino-Gruppen [Ghilarducci und Tjeerdema, 1995; Esterbauer et al., 1991], weswegen die systemische Verteilung von Acrolein als gering einzuschätzen ist [EPA, 2003]. Parent et al. zeigten, dass nach oraler Gabe von 2,5 mg ^{14}C -Acrolein/kg KG/d an Sprague Dawley Ratten 7 Tage nach der Dosierung weniger als 0,7 % der Gesamtradioaktivität im Gewebe gefunden wird [Parent et al., 1996].

Der Metabolismus von Acrolein ist in Abb. 2.12 gezeigt. Die wichtigste Metabolisierungsreaktion von Acrolein stellt die Konjugation mit GSH und der anschließende Abbau zur Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)cystein (OPMA) dar. Durch Reduktion der Aldehydgruppe entsteht *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein (HPMA), wobei es sich um den Hauptmetaboliten von Acrolein im Urin von Ratten handelt [Sanduja et al., 1989], während die Oxidation zur Bildung von *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)cystein (CEMA) führt. Durch die Michael-Addition von Wasser an Acrolein entsteht 3-Hydroxypropanal, das durch Oxidation in 3-Hydroxypropionsäure und anschließend in Malon- und Oxalsäure überführt wird. Die Bildung von Malon- und Oxalsäure ist vermutlich auf die Darmflora zurückzuführen, da diese Metabolite bei intravenöser Verabreichung nicht detektiert wurden [Parent et al., 1998]. Die enzymatische Epoxidierung von Acrolein führt zur Bildung von Glycidaldehyd, welcher überwiegend mit GSH konjugiert und als *N*-Acetyl-S-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)cystein ausgeschieden wird [Parent et al., 1998]. Darüber hinaus kann Glycidaldehyd über Epoxidhydrolase zum Glyceraldehyd hydrolisiert werden [Patel et al., 1980]. Durch Retro-Michael-Addition kann Acrolein aus OPMA bzw. OPMA-Sulfoxid erneut freigesetzt werden [Hashmi et al., 1992].

Parent et al. untersuchten den Metabolismus von Acrolein nach oraler Verabreichung von 2,5 mg 2,3- ^{14}C -Acrolein/kg KG an Sprague-Dawley Ratten. Dabei wurden durchschnittlich 57 % der verabreichten Gesamtradioaktivität nach 7 Tagen im Urin gefunden und die ausgeschiedenen Anteile von Oxalsäure, *N*-Acetyl-S-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)cystein, CEMA, HPMA und 3-Hydroxypropionsäure lagen bei 17-35 %, 8-18 %, 3-12 %, 23-41 % und 6-31 % der gemessenen Gesamtradioaktivität im Urin [Parent et al., 1996; 1998]. Nach oraler Gabe von 13 mg Acrolein/kg KG an männliche Sprague-Dawley Ratten wurden nach 24 Stunden mehr als 78 % der verabreichten Dosis als HPMA über den Urin ausgeschieden [Sanduja et al., 1989].

Acrolein kann als α,β -ungesättigte Carbonylverbindung leicht mit nucleophilen Stellen in Proteinen und der DNA reagieren, was zu genotoxischen Wirkungen führen kann. Wang et

al. zeigten, dass Acrolein DNA-Addukte mit Desoxyguanosin bildet, wobei das γ -OH-Acrolein-dG-Addukt überwiegt [Wang et al., 2008].

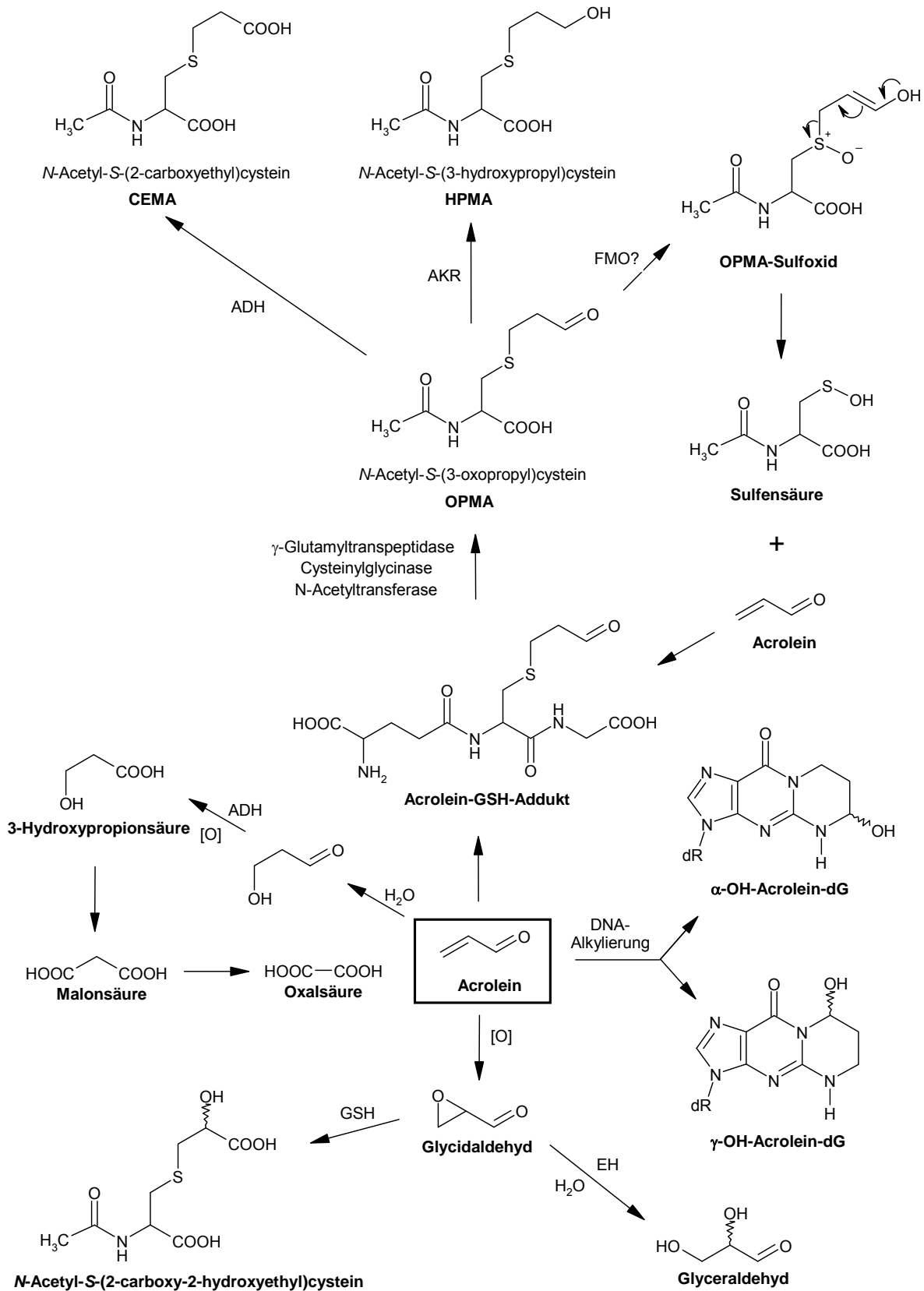


Abb. 2.12: Metabolismus von Acrolein; ADH: Aldehyd-Dehydrogenase, AKR: Aldo-Keto-Reduktase, FMO: Flavin-Monooxygenase, EH: Epoxid-Hydrolase, GSH: Glutathion

2.2.4 Toxikodynamik von Acrolein

2.2.4.1 Akute, subchronische und chronische Toxizität

Bei Ratten wurde für Acrolein eine orale LD₅₀ in einem Bereich von 39-56 mg/kg KG bestimmt [Smyth et al., 1951]. Bei Beagle-Hunden, die Acrolein über einen Dosisbereich von 0,1-2 mg/kg KG/d in Gelatinekapseln über 53 Wochen erhielten, trat dosisabhängig vermehrtes Erbrechen auf [Parent et al., 1992a]. Bei Ratten bewirkte die Verabreichung von Acrolein (0,05, 0,5 und 2,5 mg/kg KG/d) mittels Schlundsonde über 102 Wochen eine Abnahme der Kreatininphosphokinase im Serum aller Dosisgruppen und einen Anstieg der Mortalität in den beiden höheren Dosisgruppen. Andere Wirkungen, insbesondere eine erhöhte Tumorzinzidenz, wurden nicht beobachtet [Parent et al., 1992b]. Mäuse, denen Acrolein (0,5, 2 und 4,5 mg/kg KG/d) mit der Schlundsonde über 18 Monate verabreicht wurde, zeigten verminderte Körpergewichtszunahme und erhöhte Mortalität bei männlichen Tieren in der höchsten Dosisgruppe, aber ebenfalls keine erhöhte Tumorzinzidenz [Parent et al., 1991]. In einer weiteren Langzeitstudie an Ratten (100, 250 und 625 mg Acrolein/Trinkwasser über maximal 124 Wochen) wurde keine dosisbezogene signifikant erhöhte Tumorzinzidenz im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet [Lijinski und Reuber, 1987].

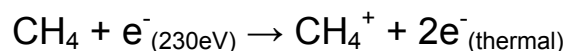
2.2.4.2 Genotoxizität und Mutagenität

Acrolein zeigte im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA 104 ohne externe metabolische Aktivierung mutagenes Potential [Marnett et al., 1985], ebenso mit *Salmonella typhimurium* TA 1535 nach metabolischer Aktivierung [Hales, 1982]. Mit *Escherichia coli* WP2 uvrA wurde ohne metabolische Aktivierung schwache Mutagenität beobachtet [Hemminki et al., 1980]. Bei Verwendung der *Salmonella typhimurium*-Stämme TA 98 und TA 100 wurde sowohl über positive als auch negative Ergebnisse berichtet [Haworth et al., 1983]. Acrolein induzierte *in vitro* in humanen Bronchialepithelzellen Schwester-Chromatid-Austausch-Ereignisse (SCEs) [Au et al., 1980] und DNA-Einzelstrangbrüche [Grafström et al., 1986, 1988]. Acrolein ist stark mutagen gegenüber isolierten Fibroblasten von Xeroderma pigmentosum-Patienten (mit defektem Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem), während in normalen humanen Fibroblasten keine Mutagenität beobachtet wurde [Curren et al., 1988].

2.3 GC-MS und Prinzip der chemischen Ionisierung (CI)

Das Prinzip der GC-MS eignet sich für die qualitative und quantitative Bestimmung von mittel- bis unpolaren Substanzen, welche über eine ausreichende thermische Stabilität und Flüchtigkeit verfügen. Bei der direkten Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer wird das Trägergas der GC-Säule über ein beheiztes Interface in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. Dabei gehören die Elektronenstoßionisation und die chemische Ionisation zu den am häufigsten verwendeten Ionisationstechniken.

Bei der Elektronenstoßionisation (EI) wird senkrecht zum Molekülstrom der Probe ein Elektronenstrahl von einer Glühkathode zu einer Anode hin beschleunigt. Bei der Wechselwirkung der Elektronen mit den Molekülen der Probe kann entweder die zur Abspaltung eines Elektrons notwendige Energie aufgenommen werden (Bildung von positiven Ionen) oder ein Elektron in ein unbesetztes Orbital gelangen (Bildung von negativen Ionen). Die entstehenden Molekülionen sind nur stabil, wenn die Wechselwirkung mit energiearmen (thermischen) Elektronen erfolgt. Bei höheren Elektronenenergien, wie sie jedoch für die EI-Ionenquelle typisch sind, kommt es zur Fragmentierung der Molekülionen, was zu komplexen Massenspektren sowie verminderter Sensitivität und Selektivität führt. Der Vorteil der chemischen Ionisation liegt in der praktisch ausschließlichen Bildung von Molekülionen durch die gezielte Unterdrückung der Fragmentierung. Dabei wird in eine modifizierte EI-Ionenquelle zusammen mit der zu analysierenden Substanz ein großer Überschuss eines Reaktantgases (z.B. Methan) eingebracht, das durch Elektronenbeschuss ionisiert wird:



Bei dieser Stoßionisation des Reaktantgases entstehen sekundäre Elektronen mit niedriger (thermischer) Energie, die auf Probenmoleküle mit ausreichend hoher Elektronenaffinität übertragen werden können. Durch Umsetzung der Analytmoleküle mit Derivatisierungsreagenzien, die eine hohe Elektronenaffinität besitzen, kann die Effektivität der Ionisierung gesteigert werden. [Budzikiewicz und Schäfer, 2005; Harrison, 1992]

2.4 HPLC-ESI-MS/MS und Prinzip der Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Die Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)-Systemen mit der Massenspektrometrie (MS) eignet sich für die qualitative und quantitative Bestimmung von polaren, schwer flüchtigen oder auch thermisch labilen Verbindungen. Im Gegensatz zur GC-MS müssen für die HPLC-MS Kopplung die Analyten aus der mobilen, flüssigen Phase in die Gasphase unter Hochvakuum (10^{-5} torr) überführt werden, was hohe Anforderungen an die HPLC-MS Kopplungssysteme (Interfaces) stellt. Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums, der Robustheit und hohen Empfindlichkeit für eine Vielzahl von polaren und mittelpolaren Analyten sind die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) und die Elektrospray Ionisation (ESI) die am häufigsten eingesetzten Kopplungstechniken für HPLC-MS [Niessen, 1998].

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) handelt es sich um eine sehr schonende Ionisierungsmethode. Dabei werden die aus der HPLC-Säule austretenden Probenmoleküle durch eine geladene Sprühkapillare geleitet. Bei Flussraten $> 50 \mu\text{l}/\text{min}$ wird zum Versprühen und Verdampfen des Fließmittels ein Hilfsgas („Vernebelungsgas“, z. B. Stickstoff) eingesetzt. Senkrecht zum Spray kann ein aufgeheizter Stickstoffstrom („Turbogas“) zugeführt werden, um die Verdampfung des Lösungsmittels und damit die Effizienz der Ionenbildung zu erhöhen. Durch Anlegen hoher Spannungen wird am Ende der Sprühkapillare ein Flüssigkeitskonus („Taylor-Cone“) gebildet, in welchem sich entsprechend der Feldrichtung positive oder negative Ionen ansammeln und aus dem schließlich geladene Tröpfchen entstehen (Abb. 2.13). Das Prinzip der „Ionenverdampfung“ besteht darin, dass Nebeltröpfchen erzeugt werden, die einen Überschuss an positiven oder negativen Ladungsträgern enthalten. Durch Verdampfung kommt es zu einem Verlust von neutralen Lösungsmittelmolekülen, wodurch die Oberflächenladung/ cm^2 wegen des kleiner werdenden Tröpfchenradius bis zu einem Grenzwert zunimmt, dem sogenannten „Rayleigh limit“, bei dem die Coulomb-Abstoßung der gleichsinnigen Ladungen die Oberflächenspannung übersteigt. Es kommt zum Zerfall in kleinere Tröpfchen, wobei sich dieser Prozess mehrfach wiederholen kann. Zuletzt bleiben nach dem „charged residue model“ entweder nur noch geladene Ionen zurück oder es kommt zum Austritt von Ionen aus dem Tropfen in die Gasphase („ion evaporation model“). Die Ionen treten bei Atmosphärendruck in die Gasphase über und werden durch ein elektrisch geladenes Linsensystem in das unter Hochvakuum stehende Massenspektrometer überführt, wobei Luft- und Lösungsmitteldämpfe abgesaugt werden. [Gaskell, 1997; Budzikiewicz und Schäfer, 2005]

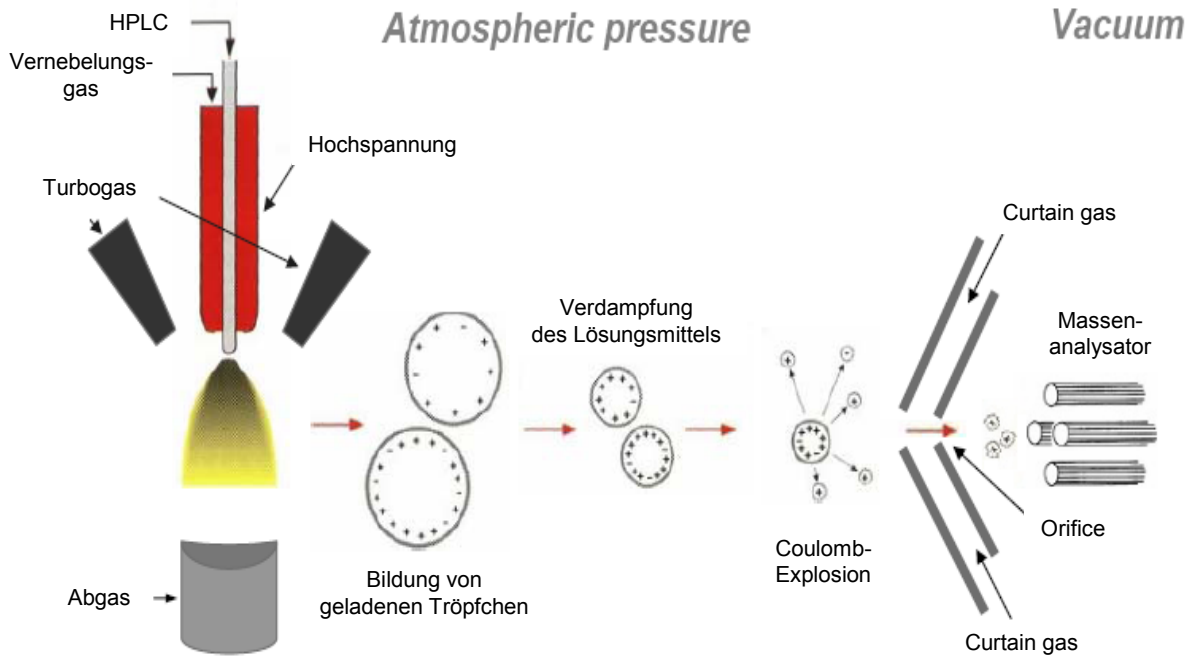


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisierung; modifiziert nach [Applied Biosystems, 2008]

2.5 Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben, von denen kreuzweise jeweils zwei miteinander leitend verbunden sind. Die Ionentrennung erfolgt durch Ablenkung mit Hilfe elektrischer Felder. Dabei wird an jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe eine Wechselspannung angelegt, so dass sich im Wechsel positive und negative Felder relativ zur Mittelachse aufbauen. Positive Ionen, die sich zwischen den Stäben befinden, werden während der positiven Phase zur Mittelachse und bei negativer Polarisierung zu den Stäben hin beschleunigt. Die seitliche Ablenkung der Ionen hängt von der angelegten Spannung, der Frequenz (Dauer der Einwirkung der alternierenden Felder) und der Masse der Ionen ab. Die Überlagerung der Wechselspannung von zwei gegenüberliegenden Stäben (A und C, Abb. 2.14) mit einer positiven Gleichspannung bewirkt eine generelle Ablenkung zur Mittelachse. Bei schweren Ionen überwiegt der Einfluss der Gleichspannung, während leichte Ionen bis zu einer bestimmten Masse so stark ausschlagen, dass sie die entgegengesetzt geladenen Stäbe treffen und entladen werden. An die Stäbe B und D wird eine im Vergleich zu A und C versetzte Wechselspannung und eine negative Gleichspannung angelegt; letztere bewirkt, dass Ionen über einer bestimmten Masse zu den Stäben hin abgelenkt werden, während bei niedrigen Massen das positive Feld der Wechselspannung ausreicht, die Ionen zur Mitte des Stabsystems zu beschleunigen.

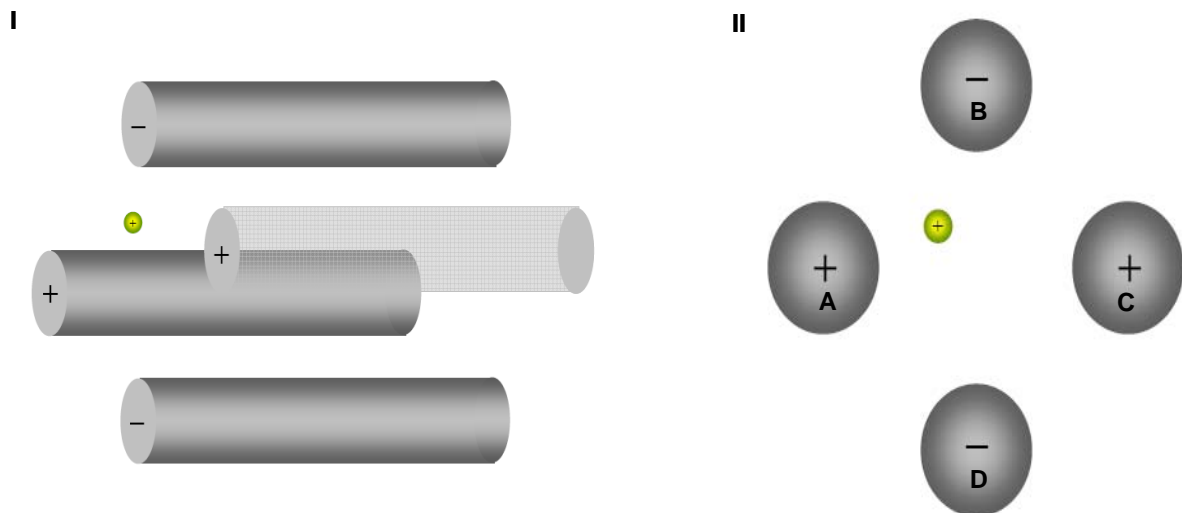


Abb. 2.14: Schematische Darstellung der Ionenbewegung im Quadrupol; I) Seitenansicht , II) Vorderansicht; modifiziert nach [Applied Biosystems, 2008]

Durch geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechsellspannungen wird erreicht, dass jeweils nur Ionen einer bestimmten Masse den Quadrupol passieren können. [Miller und Denton, 1986]

Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität aus, wobei mehrere Massenanalysatoren (Quadrupole) hintereinander angeordnet sind. Für die Spurenanalytik in komplexen Matrices wird häufig im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus gearbeitet (Abb. 2.15).

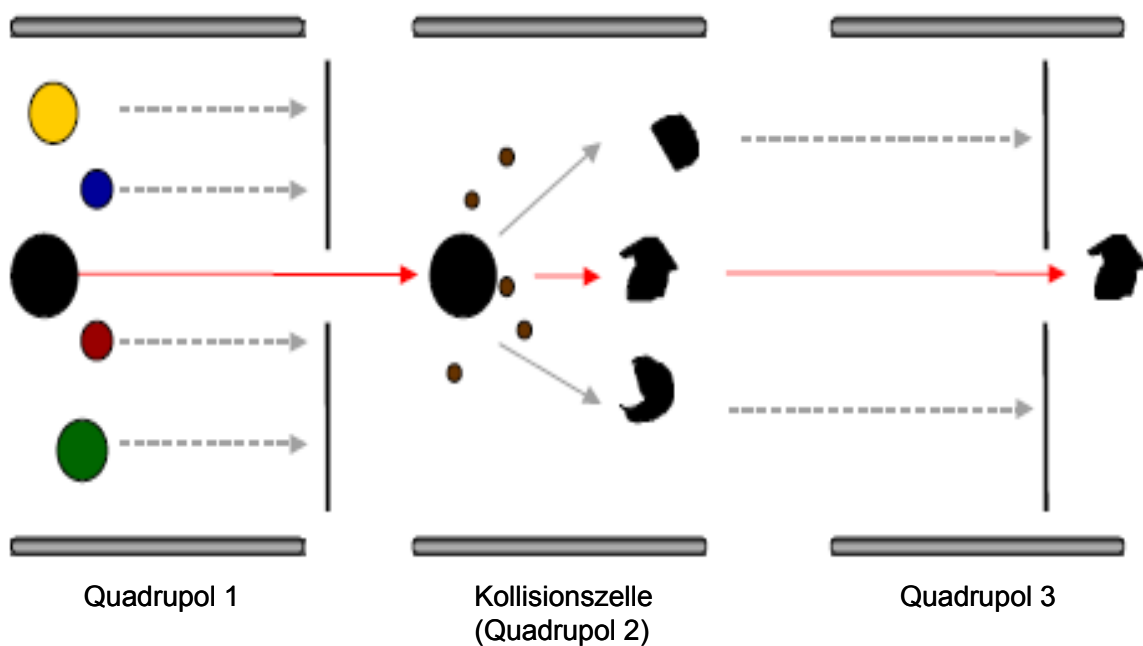


Abb. 2.15: Schematische Darstellung des Multiple Reaction Monitoring (MRM) [Applied Biosystems, 2008]

Dabei dient der erste Quadrupol zur Auswahl des zu untersuchenden Analytens, während der zweite Quadrupol nur mit einer Wechselspannung versorgt und als Kollisionszelle verwendet wird. Diese dient zur Erzeugung von spezifischen Fragmentationen aus dem Analyten und Fokussierung des Ionenstrahls, um insbesondere Streuverluste durch Coulomb-Abstoßung zu minimieren. Die erzeugten Fragmentationen werden anschließend im dritten Quadrupol selektiv analysiert. [Budzikiewicz und Schäfer, 2005]

3 Problemstellung

Die Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus Lebensmitteln und die Frage nach einer niedrigsten genotoxisch wirksamen Dosis im lebenden Organismus, sind derzeit zentrale offene Fragen für die Risikobewertung von Acrylamid. Für die Risikobewertung entscheidend ist der Abstand zwischen dieser niedrigsten biologisch aktiven Konzentration und jenen Konzentrationen, die unter ungünstigen Umständen im Organismus maximal erreicht werden können. Die Höhe der Glycidamid-Konzentration im Blut wird durch eine Reihe von Faktoren determiniert, insbesondere durch das Ausmaß der

- Freisetzung von Acrylamid aus Lebensmitteln im Verdauungstrakt,
- Aufnahme von Acrylamid durch die Darmwand,
- Acrylamid-Metabolisierung zu Glycidamid (vor allem in der Leber),
- Bindung von Acrylamid/Glycidamid an „unkritische“ Moleküle wie Blutproteine oder Glutathion.

Tierstudien zur Bioverfügbarkeit und zu biologischen Wirkungen (einschließlich Kanzerogenität) von Acrylamid wurden bisher fast ausschließlich durch orale Applikation von Acrylamid über Trinkwasser durchgeführt [Sumner et al., 1992; Fennell et al., 2005; Friedman et al., 1995; Johnson et al., 1986]. Es existieren nur wenige Studien zum Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit und daraus resultierende biologische Wirkungen, wobei stark unterschiedliche Matrixeffekte beobachtet wurden [Doerge et al., 2007; Bjellaas et al., 2007]. Zudem wurden Tierstudien in der Regel mit Dosierungen im Bereich von 1 mg/kg KG/d und darüber durchgeführt. In diesem Dosisbereich, der erheblich über jenem liegt, der bei Exposition über Lebensmittel zu erwarten ist, wurden genotoxische bzw. kanzerogene Wirkungen festgestellt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, im Tierversuch an der Ratte zu untersuchen, inwieweit spezifische Lebensmittelmatrices die Bioverfügbarkeit von Acrylamid beeinflussen. Lebkuchen als zuckerhaltiges, fettarmes und trockenes Lebensmittel auf Getreidebasis und Pommes frites (fett- und wasserreich; Kartoffelbasis) die entweder direkt aus der Kartoffel geschnitten (mit intakter Gewebestruktur) oder aus Kartoffelerzeugnissen „rekombiniert“ wurden, sowie Brotkruste sollen vergleichend getestet werden. Hierzu wurden durch geeignete Verfahren im Lebensmittel Acrylamidgehalte erzeugt, wie sie unter ungünstigen Herstellungsbedingungen zu erwarten sind. Die Lebensmittel werden an männliche Sprague-Dawley-Ratten verfüttert, wobei die tägliche Acrylamid-Dosis auf 100 µg/kg KG für Pommes frites und Lebkuchen bzw. 50 µg/kg KG für Brotkruste eingestellt werden soll. Änderungen in der Bioverfügbarkeit und biologischen Wirkung von Acrylamid sollen mit Biomarkern erfasst werden, die eine Bilanzierung der Acrylamid-Aufnahme und Ausscheidung über 24 Stunden sowie über den gesamten Expositionszeitraum ermöglichen. Weiterhin soll eine Abschätzung

des Ausmaßes der Biotransformation von Acrylamid zu Glycidamid ermöglicht werden. Als Bezugsgröße dient jeweils die Aufnahme von Acrylamid über Trinkwasser (Schlundsondierung).

Als kumulativer Langzeit-Expositionsbiomarker sollen Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin am Hämoglobin mit Hilfe einer im Arbeitskreis bereits etablierten GC-MS Methode bestimmt werden.

Einen Hauptentgiftungsweg für Acrylamid und Glycidamid stellt die Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion dar. Als Kurzzeit-Expositionsbiomarker für Aufnahme, Entgiftung und Ausscheidung von Acrylamid, sowie dessen Biotransformation zu Glycidamid im Organismus über einen Zeitraum von 24 Stunden sollen Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) als Abbauprodukte der Glutathionaddukte im Urin der Tiere bestimmt werden. Für die Ermittlung der Gesamtbilanz an Acrylamid-Ausscheidung aus dem Organismus soll zusätzlich die Acrylamid- und Glycidamid-Ausscheidung über den Urin erfasst werden. Dazu war die Entwicklung und Etablierung geeigneter HPLC-MS/MS- und Festphasenextraktions-Methoden notwendig.

Darüber hinaus sollen zur Untersuchung der Resorptionskinetik von Acrylamid bei Verabreichung über Lebensmittel über einen Zeitraum von 4 Stunden die Acrylamid- und Glycidamid-Gehalte in Rattenserum bestimmt werden.

Um die Acrylamid-Exposition aus der Bioverfügbarkeitsstudie mit der Belastung durch andere α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen zu vergleichen, soll durch eine geeignete HPLC-MS/MS- bzw. SPE-Methode zusätzlich die Exposition mit Acrolein über den Gehalt an *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein (HPMA) bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit liegt in der Untersuchung des Einflusses der CYP450 2E1-Aktivität auf die Bildung der Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte *in vivo*. Dies geschieht im Rahmen einer humanen Verzehrstudie, welche zum Ziel hat, die Rolle der CYP450 2E1-Aktivität bei der Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen zu charakterisieren. Dadurch soll die Basis für eine Risikoabschätzung nach Aufnahme von Acrylamid-haltigen Lebensmitteln verbessert werden. Dazu wird in einer klinischen Studie der Konzentrations-Zeit-Verlauf von Acrylamid und seinen Metaboliten Glycidamid, AAMA und GAMA in Plasma und Urin sowie von den Hb-Addukten nach Gabe Acrylamid-reicher Nahrung jeweils bei unbeeinflusster, gehemmter und induzierter CYP450 2E1-Aktivität bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Addukte im Blut der Probanden in 3 Studienabschnitten jeweils vor und 24 Stunden nach Aufnahme von Acrylamid über Lebensmittel mit Hilfe der im Arbeitskreis etablierten GC-MS Methode bestimmt. Dabei soll zunächst untersucht werden, ob eine einmalige Dosis von 15 μg Acrylamid/kg KG (1 mg Acrylamid absolut) mit den Biomarkern AAVal und GAVal zu

erfassen ist. Des Weiteren sollen mögliche Einflüsse der Hemmung von CYP450 2E1 durch Disulfiram bzw. der Induktion von CYP450 2E1 durch Vorbehandlung mit Ethanol auf die Hb-Addukt-Bildung identifiziert werden. Darüber hinaus soll gegebenenfalls durch die Entwicklung und Etablierung einer empfindlicheren HPLC-MS/MS- sowie einer effizienten Festphasenextraktions-Methode der zeitliche Verlauf der AAVal- und GAVal-Bildung untersucht werden.

Um die Anwendbarkeit der etablierten Methoden zu überprüfen und die Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen, werden die Hintergrundbelastungen an AAVal, GAVal, AAMA, GAMA und HPMA in Blut und Urinproben von Rauchern und Nichtrauchern aus der Allgemeinbevölkerung bestimmt.

Die wesentlichen Ziele der vorliegenden Arbeit liegen in der Untersuchung

- der Bioverfügbarkeit von Acrylamid in Abhängigkeit von der Lebensmittelmatrix,
- der Resorptionskinetik von Acrylamid bei Verabreichung über Lebensmittel,
- des Ausmaßes der Biotransformation von Acrylamid zu Glycidamid in Ratte und Mensch,
- des Einflusses der CYP450 2E1-Aktivität auf die Bildung der Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte *in vivo*.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit von Acrylamid in der Ratte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Bestandteil des FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie)-Projektes „Entwicklung und Anwendung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (AiF 209 ZBG) im Tierversuch an der Ratte untersucht, inwieweit spezifische Lebensmittelmatrices die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Acrylamid beeinflussen. Lebkuchen als zuckerhaltiges, fettarmes und trockenes Lebensmittel auf Getreidebasis und Pommes frites (fett- und wasserreich; Kartoffelbasis) die entweder direkt aus der Kartoffel geschnitten (mit intakter Gewebestruktur) oder aus Kartoffelerzeugnissen „rekombiniert“ wurden, sowie Brotkruste wurden an männliche Sprague Dawley-Ratten über 1, 3, 5, 7 und 9 Tage verfüttert und mit der Aufnahme von Acrylamid über Trinkwasser (Schlundsondierung) verglichen (Abb. 4.1). Die Herstellung der Lebensmittel erfolgte durch Projektpartner, die durch geeignete Verfahren Acrylamidgehalte erzeugten, wie sie unter ungünstigen Herstellungsbedingungen zu erwarten sind. Die Acrylamid-Gehalte lagen in der Brotkruste (BK) bei ca. 1400 µg/kg. In den geschnittenen (PFG) und rekonstituierten Pommes frites (PFR) wurden Acrylamid-Gehalte von ca. 2800 µg/kg generiert.

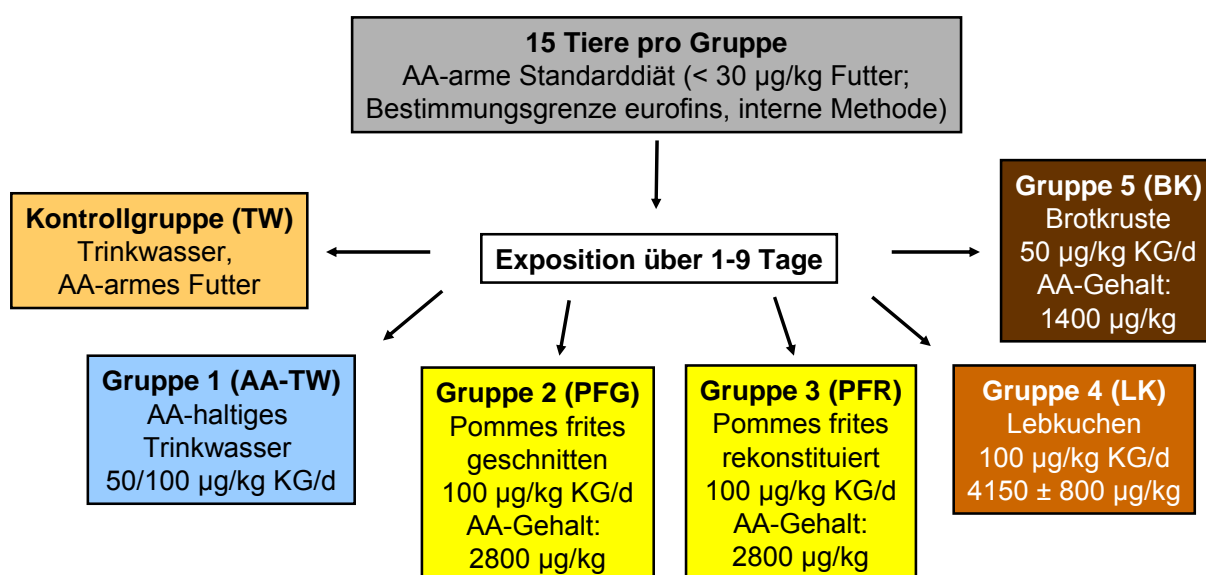


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Behandlungsgruppen

Im Falle der untersuchten Lebkuchen (LK) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mehrere Kontrollanalysen vorgenommen, wobei stark unterschiedliche Acrylamid-Gehalte (3180-6320 µg/kg; MW ± SD: 4150 ± 800 µg/kg; Kap. 6.1.1) gemessen wurden. Die Lebensmittel wurden an männliche Sprague-Dawley-Ratten verfüttert, wobei die tägliche Acrylamid-Dosis auf 100 µg/kg KG für Pommes frites (PFG; PFR) und Lebkuchen bzw. 50 µg/kg KG für Brotkruste eingestellt werden sollte. Änderungen in der Bioverfügbarkeit von Acrylamid sollten mit Biomarkern erfasst werden, die eine Bilanzierung der Acrylamid-Aufnahme und Ausscheidung über 24 Stunden sowie über den gesamten Expositionszeitraum ermöglichen. Als Langzeit-Expositionsbiomarker wurden Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin am Hämoglobin bestimmt.

Als Kurzzeitmarker für Aufnahme, Entgiftung und Ausscheidung von Acrylamid sowie dessen Biotransformation zu Glycidamid im Organismus über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) als Abbauprodukte der Glutathion-Addukte im 24-Stunden-Urin der Tiere bestimmt.

Für die Ermittlung der Gesamtbilanz an Acrylamid-Ausscheidung aus dem Organismus wurde zusätzlich die Acrylamid- und Glycidamid-Ausscheidung über den Urin und im Rahmen der Diplomarbeit von Natalie Gerhard über Fäces erfasst [Gerhardt, 2008].

Da Lebensmittelmatrices die Kinetik der Acrylamid-Aufnahme durch den Darm beeinflussen können, wurde in einem weiteren Experiment die Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites (aus der Kartoffel geschnitten; PFG) und Bildung von Glycidamid vergleichend zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsondierung) untersucht. Dazu wurden die Acrylamid- und Glycidamid-Serumspiegel zum Zeitpunkt T = 0 bis zu 4 Stunden nach der jeweiligen Acrylamid-Gabe bestimmt.

4.1.1 Fütterung von Pommes frites (PFG: geschnitten; PFR: rekonstituiert)

Im Folgenden sind die Ergebnisse nach Fütterung über 1, 3, 5, 7 und 9 Tage dargestellt. Die tägliche Dosis lag bei 100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG/PFR) bzw. Trinkwasser (AA-TW; Schlundsondierung). Die Blutentnahme erfolgte 24 Stunden nach der letzten Fütterung und die Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid sowie der entsprechenden Mercaptursäuren wurde im 24-Stunden-Sammelurin durchgeführt.

4.1.1.1 Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte

In Abb. 4.2 und 4.3 sind repräsentative GC-MS-Chromatogramme zur Bestimmung der Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte gezeigt. Dabei wurden die Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin im Hämoglobin durch den modifizierten Edman-Abbau mittels PFPITC in die entsprechenden AAVal- bzw. GAValPFPTHs überführt, wobei in einem weiteren Derivatisierungsschritt GAValPFPTH mit Aceton zum acGAValPFPTH umgesetzt wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit den entsprechenden 7-fach deuterierten internen Standards.

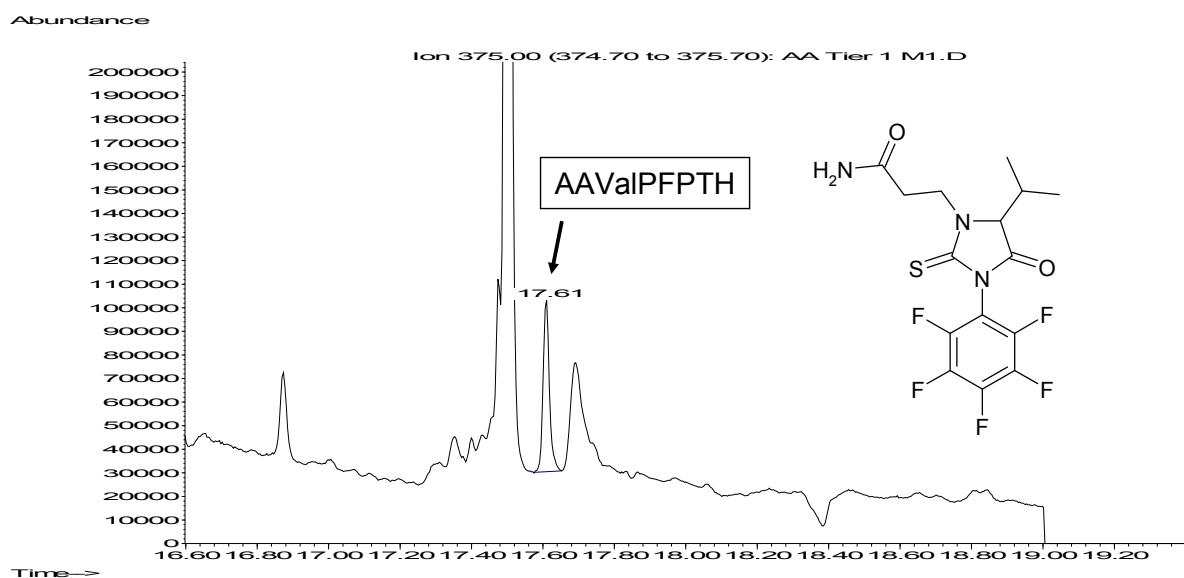


Abb. 4.2: GC-MS Chromatogramm zur Bestimmung von AAValPFPTH (100 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (AA-TW); einmalige Verabreichung)

Wie Abb. 4.2 verdeutlicht, ergibt die gaschromatographische Auftrennung bereits nach einmaliger Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG im Fall von AAValPFPTH ein basisliniengetreuntes, gut integrierbares Signal mit einer Retentionszeit von 17,6 Minuten. Im Gegensatz dazu zeigt das Chromatogramm von acGAValPFPTH (Abb. 4.3) eine höhere

Matrixbelastung bei gleichzeitig geringerer Signalintensität des Analyten. Darüber hinaus kommt es durch das Vorliegen von zwei Stereozentren im Molekül zur Bildung von Diastereomerenpeaks (Retentionszeiten: 18,5 bzw. 18,6 Minuten), was zusätzlich zu einer Verringerung der Signalintensität führt [Paulsson et al., 2003; Schettgen et al., 2004]. Das Vorkommen von Diastereomeren-Paaren ist auch für andere Epoxide wie z. B. Ethylenoxid oder Propylenoxid beschrieben [Törnqvist, 1994]. Da der zuerst eluierende Peak von acGAValPFPTH häufig mit Matrixbestandteilen interferierte, wurde lediglich der später eluierende größere Diastereomerenpeak zur Quantifizierung von GAVal-Addukten herangezogen. Da gleichermaßen nur der entsprechende Peak des internen Standards acGAD₇ValPFPTH berücksichtigt wurde und sich das Verhältnis des Diastereomerenpaares von acGAValPFPTH als konstant erwiesen hat ist durch diese Vorgehensweise keine Beeinflussung der Ergebnisse zu erwarten [Bertow, 2008]. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN-Vorschrift 32645 bestimmt und betragen 0,4 bzw. 3,1 fmol für AAValPFPTH sowie 1,6 bzw. 8,0 fmol für acGAValPFPTH (absolute Angaben) [Bertow, 2008].

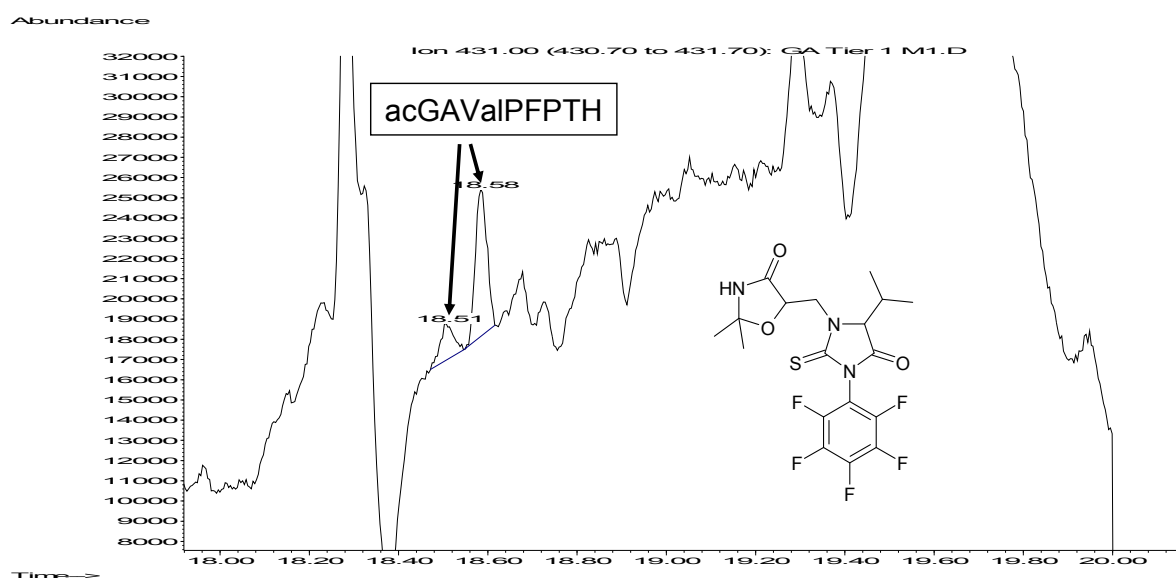


Abb. 4.3: GC-MS Chromatogramm zur Bestimmung von acGAValPFPTH (100 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (AA-TW); einmalige Verabreichung)

In Abb. 4.4 sind die Ergebnisse nach Gabe von 100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG/PFR) bzw. Trinkwasser (AA-TW) dargestellt. Bei den behandelten Tieren sind sowohl bei den Trinkwasser- als auch bei den Lebensmittel-Gruppen deutliche, nahezu lineare Anstiege der AAVal-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und damit der kumulativen Acrylamid-Dosis zu erkennen. Bei einmaliger Exposition mit Acrylamid steigt die AAVal-Konzentration von 12 ± 1 pmol/g Hb bei den Kontrolltieren auf $35\text{--}40$ pmol/g Hb bei den behandelten Tieren an. Nach 7-tägiger Exposition mit Acrylamid erhöht sich die AAVal-Konzentration auf 246 ± 22 bzw. 255 ± 7 pmol/g Hb bei den AA-TW- und Lebensmittel-

Gruppen. Dieser Gehalt ist im Vergleich zur 3-tägigen Fütterung (120 ± 13 bzw. 119 ± 9 pmol/g Hb) etwa um den Faktor 2 erhöht, was auf Kumulation der Acrylamid-Hb-Addukte zurückgeführt werden kann. Nach 9 Tagen ist die AAVal-Bildung mit 286-290 pmol/g Hb bei den Acrylamid-Trinkwasser- und Lebensmittelgruppen etwa um den Faktor 3 größer als nach 3 Tagen ($100-120$ pmol/g Hb).

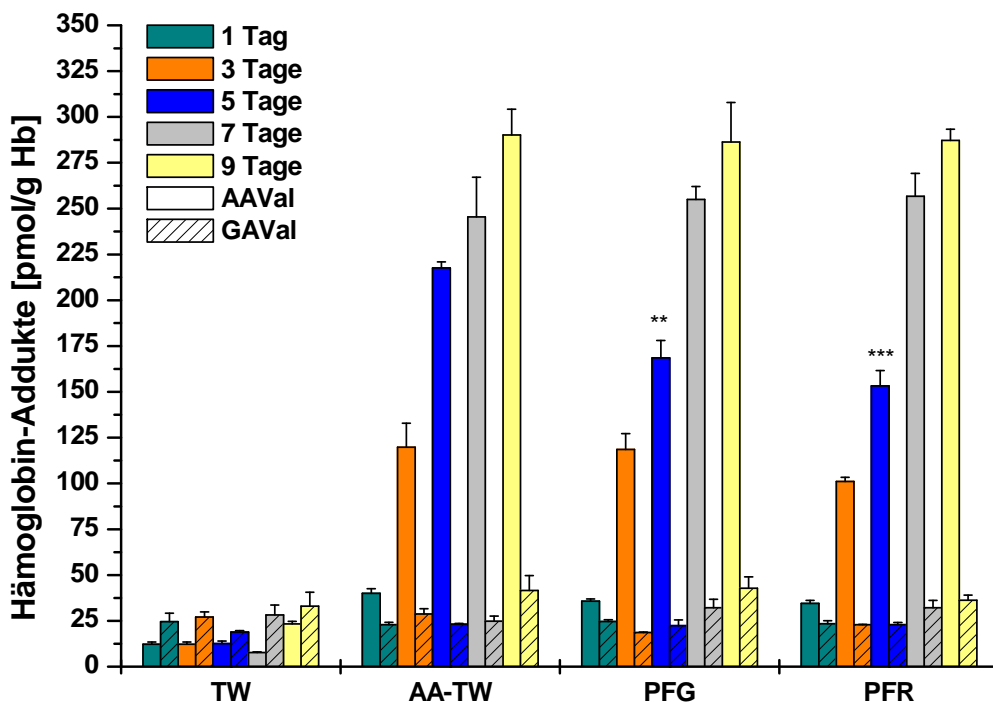


Abb. 4.4: Hämoglobin-Addukte im Blut von Ratten nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d über Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten; PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert) bzw. Trinkwasser (AA-TW), TW: Negativkontrolle, Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe; *: signifikant unterschiedlich zu AA-TW (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bei den Negativ-Kontrolltieren (TW) liegen die AAVal-Konzentrationen bei 8–23 pmol/g Hb, während die GAVal-Konzentrationen mit 27–33 pmol/g Hb etwa 1,4–3,5-fach höher liegen. Vergleichbare Hintergrundgehalte in Ratten wurden von Tareke et al. (GAVal/AAVal: 2-3) sowie von Paulsson et al. (GAVal/AAVal = 1,8) beobachtet [Tareke et al. 2006; Paulsson et al. 2002]. Vermutlich sind die Hintergrundgehalte an AAVal und GAVal auf die Acrylamid-Belastung der Standarddiät (ca. $11 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg) zurückzuführen. Darüber hinaus könnte eine endogene Bildung von Acrylamid einen geringen Beitrag zur Hintergrundexposition leisten. Bei geringen Acrylamid-Konzentrationen könnte die Bindung von Acrylamid an SH-Gruppen überwiegen, da nach dem Hard-Soft-Acid-Base-Konzept nach Pearson die Thiol-Reaktivität von Acrylamid im Vergleich zu Glycidamid größer ist [Ayers et al., 2006]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu AAVal höheren GAVal-Gehalte. Hamdan et al. zeigten, dass nach den SH-Gruppen des Cysteins nicht die freie α -Aminogruppe sondern die ϵ -Aminogruppe des Lysins die nachgeordnet wichtigste Rolle bei

der Adduktbildung von Acrylamid mit Proteinen spielt, wodurch die resultierenden Addukt-Gehalte ebenfalls beeinflusst werden könnten [Hamdan et al., 2001].

Die behandelten Tiere zeigen nach den durchgeführten Expositionsperioden keine signifikante Änderung der GAVal-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet auf eine geringe Glycidamid-Blutkonzentration bzw. systemische Verfügbarkeit von Glycidamid hin, wobei der daraus resultierende GAVal-Anstieg mit der verwendeten analytischen Methode vermutlich nicht erfasst werden kann. Diese Vermutung wird durch die in Kap. 4.1.1.4 diskutierten Glycidamid-Serumkonzentrationen ($< 0,06 \mu\text{M}$) nach Aufnahme von $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG) bzw. Acrylamid-haltiges Trinkwasser gestützt. In einem weiteren Experiment, bei dem eine etwa 11-fach höhere einmalige Acrylamid-Dosis als die über 9 Tage applizierte Gesamtdosis verabreicht wurde (Kap. 4.2.1), wurde eine etwa 10-fach höhere GAVal-Bildung gefunden. Das heißt, bei höheren Dosen wird das in der Leber metabolisch aus Acrylamid gebildete Glycidamid als Hb-Addukt in entsprechender Konzentration nachgewiesen. In der niedrigen Dosierung von 9 Tagesdosen (\hat{a} $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG), also einer Gesamtdosis von $900 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG, bleibt das Glycidamid-Hb-Addukt im Bereich der unbehandelten Kontrolle, während das Acrylamid-Hb-Addukt dosisabhängig ansteigt. Tareke et al. fanden nach oraler Verabreichung (Schlundsondierung) von $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG an männliche und weibliche F344-Ratten Anstiege der AAVal- und GAVal-Gehalte von 10-20 bzw. 30-90 pmol/g Hb [Tareke et al. 2006]. Ebenfalls höhere GAVal- als AAVal-Anstiege wurden von Törnqvist et al. nach Verabreichung von 100 bzw. $500 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d über 7 Tage bestimmt [Törnqvist et al., 2008]. Dabei lagen die AAVal- und GAVal-Gehalte der weiblichen F344-Ratten bei 160 pmol/g Hb und 320 pmol/g Hb ($100 \mu\text{g/kg KG/d}$; Gesamtdosis $700 \mu\text{g/kg KG}$) sowie 680 pmol/g Hb und 1710 pmol/g Hb ($500 \mu\text{g/kg KG/d}$; Gesamtdosis $3500 \mu\text{g/kg KG}$). Allerdings wurde bei dieser Studie die Acrylamid-Dosis nicht mittels Schlundsondierung, sondern über das Trinkwasser verabreicht, was vermutlich eine veränderte Toxikokinetik zur Folge hat. Insbesondere könnte durch die kontinuierliche Aufnahme von Acrylamid im Trinkwasser der Metabolismus zum Glycidamid effektiver verlaufen, woraus höhere GAVal-Addukt-Gehalte resultieren könnten. Im Vergleich dazu bestimmten Fennell et al. bei einer vergleichbaren oralen Gabe (Schlundsondierung) von $3000 \mu\text{g/kg KG}$ an F344-Ratten höhere AAVal- als GAVal-Anstiege (890 bzw. 750 pmol/g Hb) [Fennell et al., 2005].

Lediglich nach einer Expositionsdauer von 5 Tagen erscheint die AAVal-Bildung bei den Lebensmittel-Gruppen (153-169 pmol/g Hb) im Vergleich zur Acrylamid-Gabe über Trinkwasser (218 ± 3 pmol/g Hb) signifikant erniedrigt bzw. die AA-TW-Gruppe erhöht. Bei Gabe über Pommes frites ergibt sich eine um ca. 25 % erniedrigte Hb-Addukt-Bildung. Dieser Messwert ist allerdings gekennzeichnet durch eine auffallend niedrige Streuung zwischen den 3 Individuen (siehe Abb. 4.4). Da dies der einzige Zeitpunkt ist, bei dem eine

im Vergleich zu Trinkwasser etwa um 25 % verminderte Acrylamid-Hb-Addukt- und Mercaptursäure-Bildung (siehe Kap. 4.1.1.2) nach Gabe über Pommes frites erkennbar ist, kann eine am Verhalten der Biomarker zu Tage tretende akzidentielle Überdosierung von Acrylamid im Trinkwasser um etwa 25 % vermutet werden. Die vier übrigen untersuchten Expositionsperioden liefern keinerlei Hinweis auf eine Beeinflussung der Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites im Vergleich zu Trinkwasser.

Die beobachteten Anstiege der AAVal-Addukte deuten daraufhin, dass sich die Verfügbarkeit von Acrylamid aus den geprüften Pommes frites (PFG und PFR) nicht signifikant von der Verfügbarkeit aus Trinkwasser (AA-TW) unterscheidet. Bei einer Acrylamid-Resorptionsstudie in Schweinen wurde die Acrylamid-Aufnahme aus kommerziellem Schweinefutter, welches Beimengungen von Kartoffelchips mit definiertem Acrylamid-Gehalt enthielt, mit der Aufnahme aus Trinkwasser verglichen. Dabei wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Bildung von AAVal-Addukten festgestellt [Aureli et al., 2007]. Vikström et al. untersuchten die Acrylamid-Aufnahme über Futter unterschiedlicher Zusammensetzung unter subchronischen Bedingungen im Niedrig-Dosis-Bereich (3-50 µg/kg KG/d) an Mäusen. Dabei wurden anhand der Gehalte an AAVal- und GAVal-Addukten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich zusammengesetzten Futtermitteln festgestellt [Vikström et al., 2008].

4.1.1.2 Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Pommes frites

In Abb. 4.5 ist ein repräsentatives HPLC-MS/MS Chromatogramm zur Bestimmung der Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren sowie der entsprechenden 3-fach deuterierten internen Standards gezeigt. Die Analyten AAMA und GAMA sind basisliniengetrennt und weisen Retentionszeiten von 11,3 bzw. 8,7 Minuten auf, welche mit den Retentionszeiten der internen Standards D₃-AAMA und D₃-GAMA nahezu identisch sind.

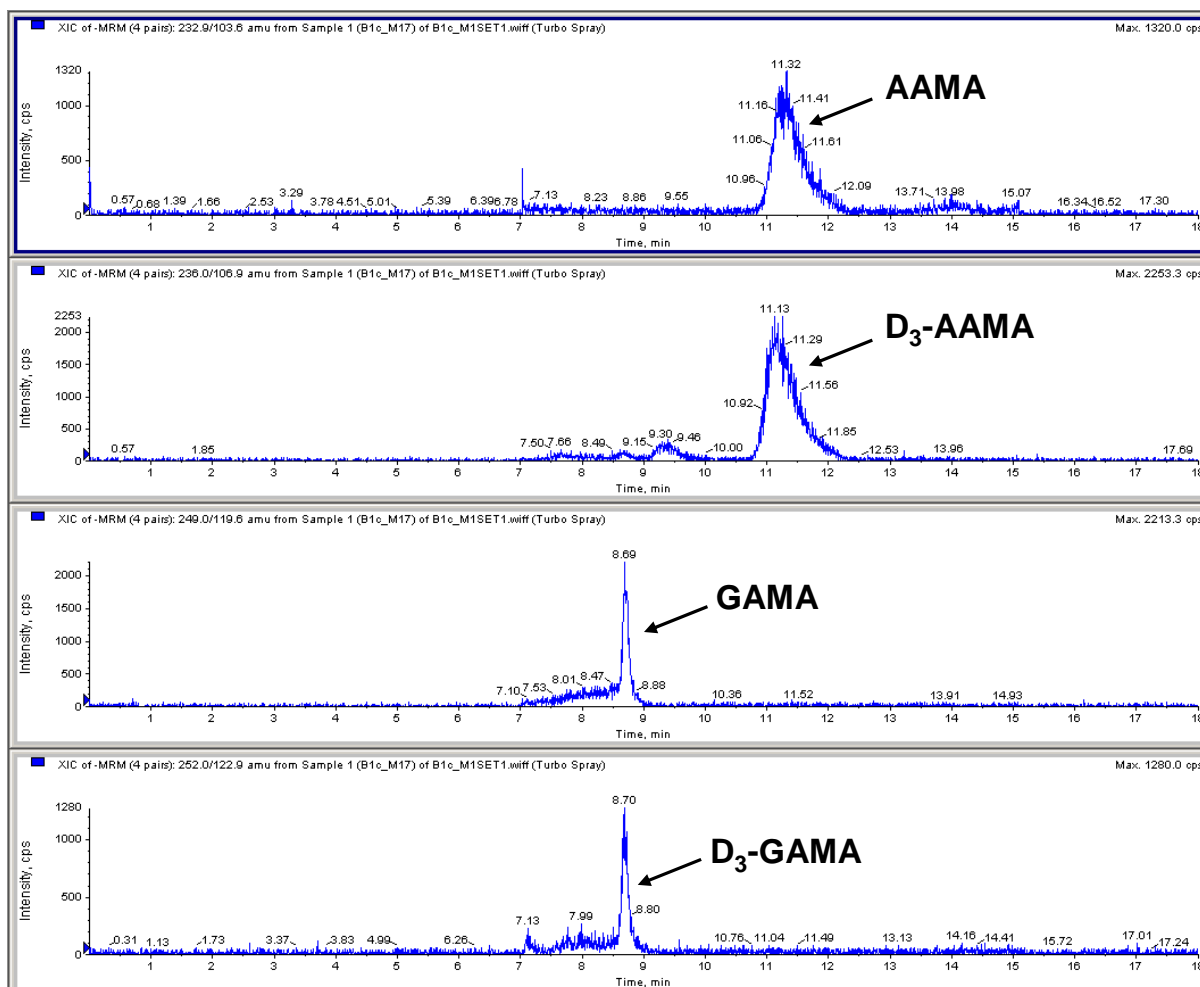


Abb. 4.5: HPLC-MS/MS Chromatogramm zur Bestimmung von AAMA und GAMA im 24-Stunden-Sammelurin (100 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser; einmalige Verabreichung)

Bei den Mercaptursäuren handelt es sich im Gegensatz zu den Hämoglobin-Addukten um Biomarker, welche Acrylamid-Expositionen der vergangenen 24 Stunden widerspiegeln. Bei allen Behandlungsgruppen wurde eine vergleichbare Mercaptursäure-Gesamtausscheidung beobachtet, wobei keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Expositionsdauer erkennbar waren. Nach Behandlung mit identischen Tagesdosen von 100 µg Acrylamid/kg KG lag der Anteil der Mercaptursäuren (AAMA + GAMA; Abb. 4.6) an

der gegebenen Tagesdosis im 24-Stunden-Urin für AA-TW-Gruppen bei $51,1 \pm 11,7 \%$ (Range: 38,1-73,5 %; Median: 49,2 %) sowie für PFG- und PFR-Behandlungsgruppen bei $50,6 \pm 8,7 \%$ (Range: 26,0-67,5 %; Median: 49,9 %) bzw. $48,1 \pm 9,7 \%$ (Range: 23,9-60,2 %; Median: 51,6 %). Vergleichbare prozentuale Anteile der Mercaptursäuren AAMA und GAMA nach oraler Verabreichung von 0,1-50 mg/kg KG an Ratten über Trinkwasser wurden von Doerge et al. (59 %), Fennell et al. (50 %) und Sumner et al. (46 %, 54 %) beobachtet [Doerge et al., 2007; Fennell et al., 2005; Sumner et al., 1992; 2003]. Auch bei den Tieren der Negativkontrolle konnte AAMA mit Absolutmengen von 4-6 nmol nachgewiesen werden, wobei GAMA nicht detektierbar war. Diese Hintergrundbelastung ist, wie bereits bei den Hb-Addukten (Kap. 4.1.1.1) diskutiert, vermutlich auf die Acrylamid-Aufnahme über die Standarddiät zurückzuführen.

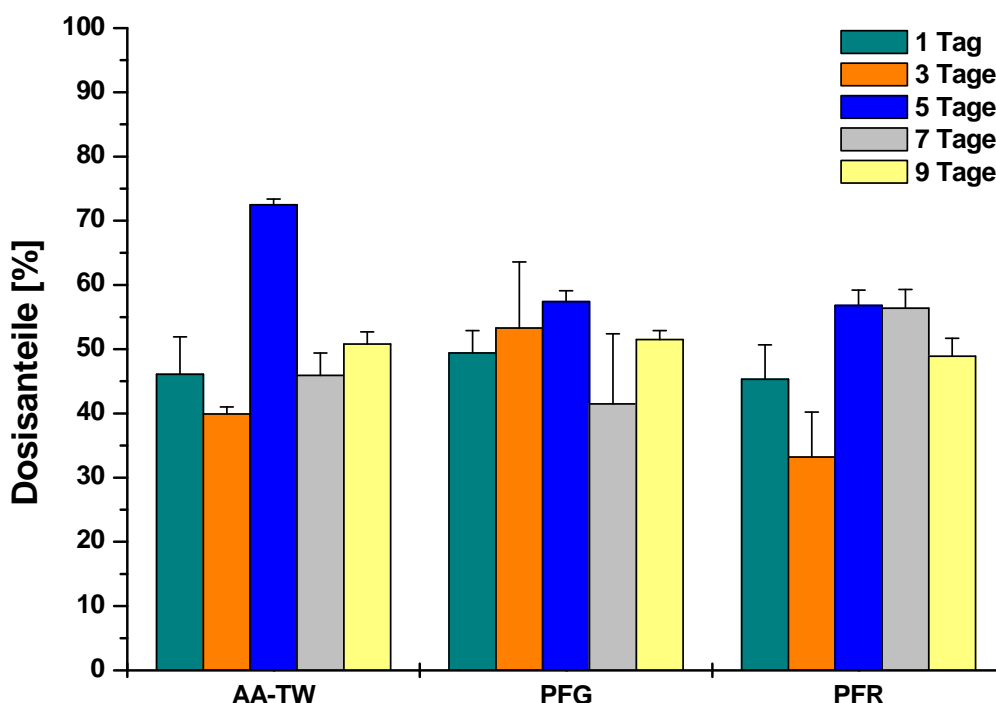


Abb. 4.6: Prozentualer Anteil der Mercaptursäureausscheidung an der verabreichten Einzeldosis von 100 µg Acrylamid/kg KG/d nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition über Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten; PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe

Insgesamt weisen die AAMA- und GAMA-Gehalte (Abb. 4.7) eine größere Variabilität als die Hämoglobinaddukte (siehe Kap. 4.1.1.1) auf. Bei den AA-TW-Gruppen liegen die Anteile an der gegebenen täglichen Dosis (100 µg Acrylamid/kg KG) über alle Expositionsperioden gemittelt bei $35,7 \pm 9,5 \%$ (Range: 21,4-53,9 %; Median: 30,5 %) für AAMA und $15,4 \pm 4,6 \%$ (Range: 8,7-22,7 %; Median: 14,9 %) für GAMA. Die entsprechenden Dosisanteile liegen bei den PFG- bzw. PFR-Gruppen bei $30,0 \pm 6,7 \%$ (15,2-39,7 %; Median: 30,3 %) für AAMA und $20,6 \pm 4,5 \%$ (10,8-29,0 %; Median: 19,6 %) für GAMA bzw. $30,0 \pm 9,0 \%$ (15,5-43,9 %;

Median: 30,2 %) für AAMA und $18,1 \pm 4,3$ % (8,4-27,9 %; Median: 17,1 %) für GAMA. Auch bei den Mercaptursäuren sind die Dosisanteile nach Verabreichung von Acrylamid über Trinkwasser (AA-TW) an Tag 5 wie bei den Hb-Addukten erhöht, was die Vermutung einer akzidentiellen Überdosierung unterstützt. Für die Behandlungsgruppen PFG und PFR zeigte sich eine Tendenz hin zu einer stärkeren Bildung von GAMA-Mercaptursäuren im Vergleich zur AA-TW-Gruppe (signifikant: PFG: 3, 9 Tage; PFR: 9 Tage), während die AAMA-Gehalte im Urin entsprechend abnahmen (signifikant: PFG: 9 Tage; PFR: 3, 9 Tage).

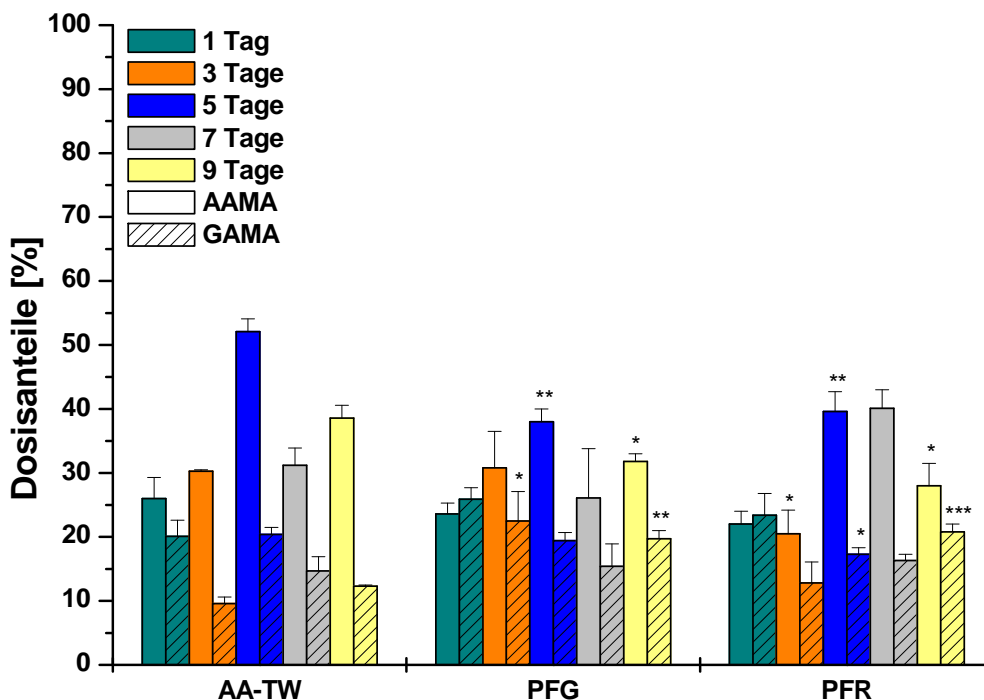


Abb. 4.7: Dosisanteile berechnet auf Grundlage der Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d über Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten; PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert) bzw. Trinkwasser (AA-TW); AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure; Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe; *: signifikant unterschiedlich zur AA-Trinkwassergruppe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Das Verhältnis GAMA/AAMA beträgt bei den AA-TW-, PFG- und PFR-Gruppen über alle Expositionsperioden gemittelt $0,46 \pm 0,17$, $0,72 \pm 0,21$ und $0,66 \pm 0,25$. Damit ist das GAMA/AAMA-Verhältnis bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites höher (signifikant: PFG und PFR: 1, 3, 9 Tage) als bei Gabe von Acrylamid über Trinkwasser, wobei bei erstmaliger Gabe der Acrylamid-Dosis die höchsten GAMA/AAMA-Verhältnisse beobachtet wurden (GAMA/AAMA: 0,8-1,1; Abb. 4.8). Da sich die Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren nach einmaliger Verabreichung von Acrylamid sich nicht signifikant von derjenigen nach wiederholter Gabe unterscheidet (Abb. 4.6), deuten die niedrigeren GAMA/AAMA-Verhältnisse nach wiederholter Verabreichung von Acrylamid auf einen adaptiven Effekt hin.

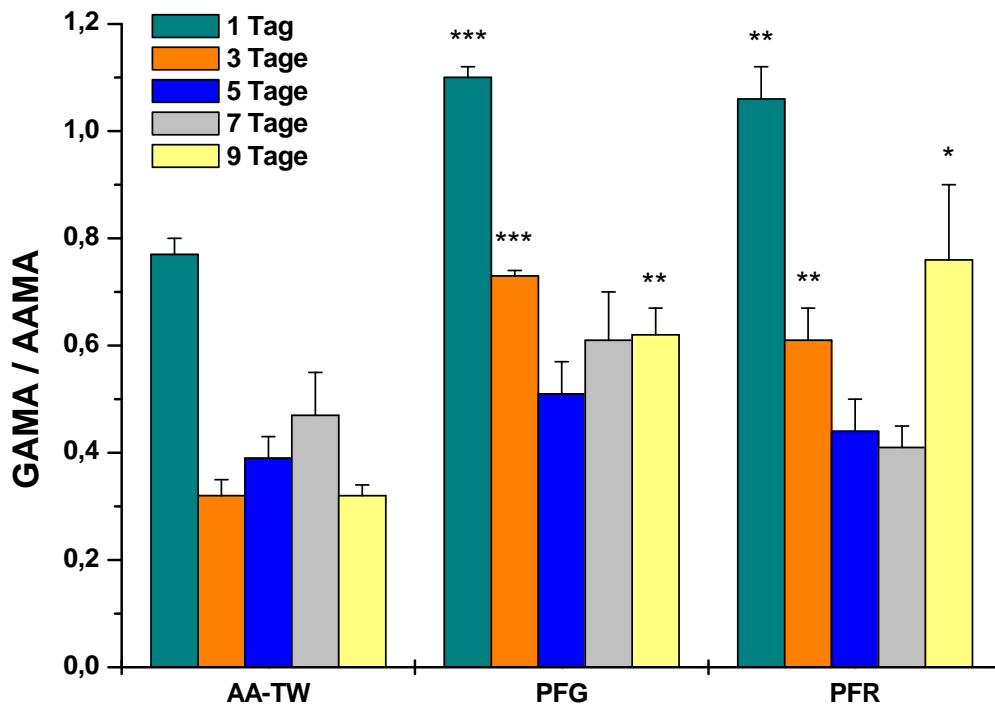


Abb. 4.8: Verhältnis GAMA/AAMA nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten; PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe; *: signifikant unterschiedlich zur Acrylamid-Trinkwassergruppe (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Die höheren GAMA/AAMA-Verhältnisse bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites könnten wie in Kap. 4.1.1.4 diskutiert auf eine verzögerte Freisetzung von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix bzw. Resorption im Gastrointestinaltrakt zurückgeführt werden. Dadurch könnte einerseits die maximal erreichbare Konzentration von Acrylamid im Blut im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde) geringer werden, andererseits könnte diese Acrylamid-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden, wodurch die metabolische Umwandlung von Acrylamid zu Glycidamid effektiver sein könnte.

Insgesamt deuten die Gesamtgehalte an Mercaptursäuren darauf hin, dass sich die Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus den untersuchten Pommes frites (PFG und PFR) nicht signifikant von derjenigen aus Trinkwasser (AA-TW) unterscheidet.

4.1.1.3 Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites (PFG, PFR) bzw. Trinkwasser

In Abb. 4.9 ist ein repräsentatives HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer mit Pommes frites (PFG; 1 Tag) gefütterten Ratte gezeigt. Die Analyten Acrylamid und Glycidamid sind basisliniengetreunt und weisen Retentionszeiten von 8,8 bzw. 12,4 Minuten auf, welche mit den Retentionszeiten der internen Standards D₅-Acrylamid und ¹³C₃-Glycidamid nahezu identisch sind.

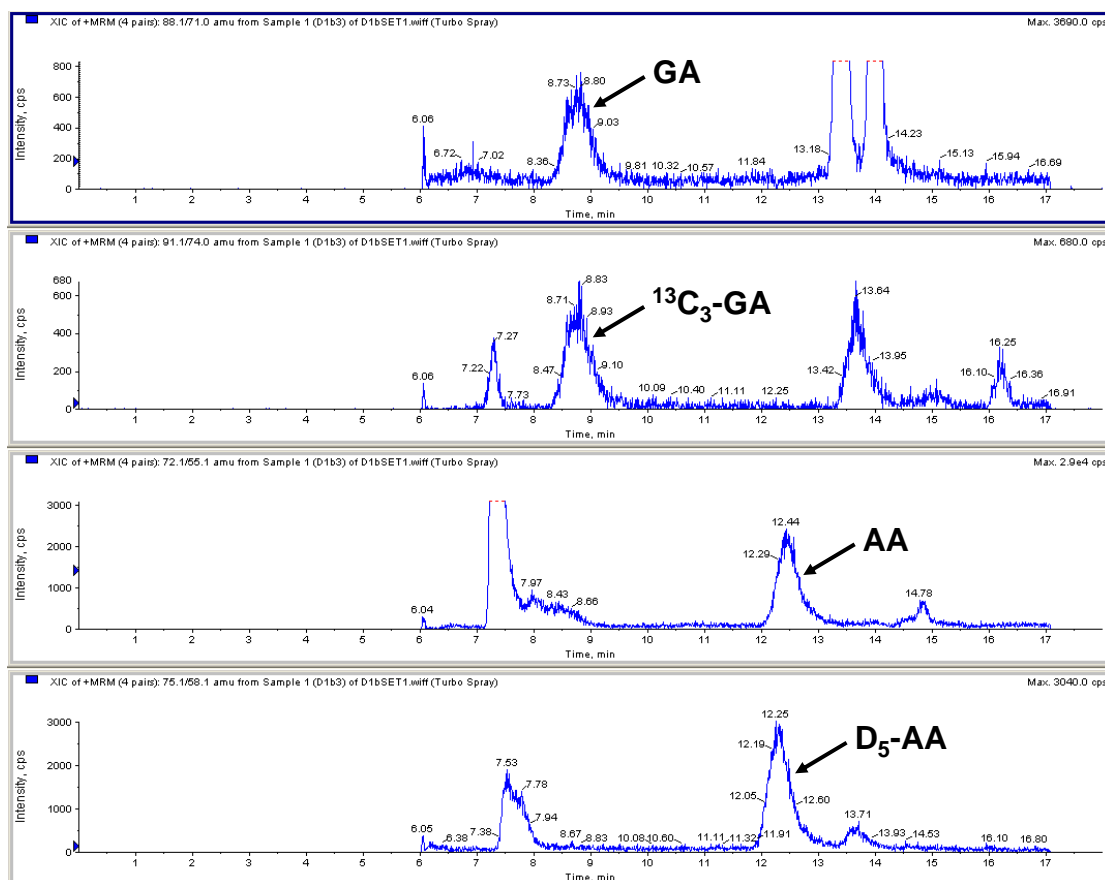


Abb. 4.9: HPLC-MS/MS-Chromatogramm zur Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid in Urin (100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites (aus Kartoffel geschnitten, PFG); einmalige Verabreichung)

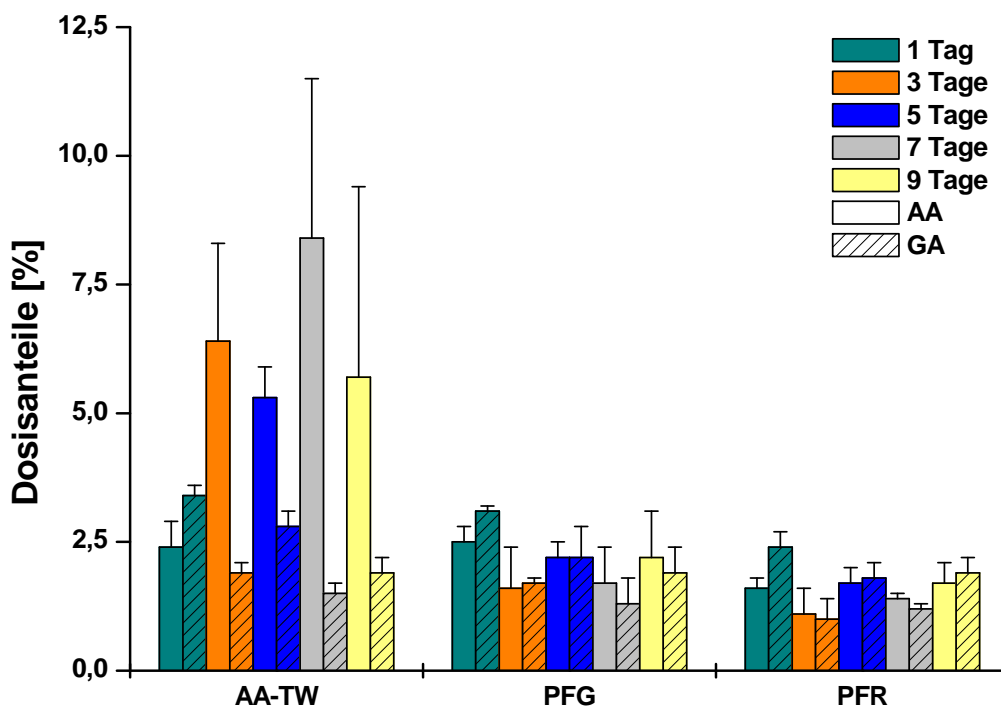


Abb. 4.10: Prozentualer Anteil der Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid an der verabreichten Einzeldosis von 100 µg Acrylamid/kg KG/d nach 1, 3, 5, 7 und 9 -tägiger Exposition über Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten; PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert) bzw. Trinkwasser (AA-TW); Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe

Der prozentuale Anteil der über den Urin ausgeschiedenen Acrylamid- bzw. Glycidamid-Stoffmenge an der gegebenen täglichen Dosis von 100 µg Acrylamid/kg KG liegt über die Expositionsperioden gemittelt bei $5,6 \pm 3,0$ % bzw. $2,3 \pm 0,7$ % (AA-TW), $2,0 \pm 0,6$ % bzw. $2,0 \pm 0,7$ % (PFG) und $1,5 \pm 0,4$ % bzw. $1,7 \pm 0,6$ % (PFR). In den Urinproben der Negativkontrollen war sowohl Acrylamid als auch Glycidamid nicht nachweisbar. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Doerge et al. nach oraler Gabe von 100 µg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten gefunden [Doerge et al., 2007]. Dabei lagen die über den Urin ausgeschiedenen mittleren Anteile von Acrylamid und Glycidamid bei 2 bzw. 6 % der verabreichten Dosis.

Bei Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (AA-TW) wird mit Ausnahme der einmaligen Verabreichung (1 Tag) im Vergleich zu PFG- und PFR-Gruppen tendenziell mehr Acrylamid über den Urin ausgeschieden (Abb. 4.10), wobei die behandelten Tiere relativ große individuelle Unterschiede zeigen. Diese Beobachtung könnte auf die in Kap. 4.1.1.4 diskutierten höheren Acrylamid-Serumkonzentrationen bei Verabreichung von Acrylamid über Trinkwasser zurückgeführt werden. Allerdings führt die tendenziell höhere Ausscheidung von Acrylamid zu keiner signifikant veränderten Gesamtausscheidung der Mercaptursäuren, da die mittleren Anteile an freiem Acrylamid und Glycidamid im Urin meist unter 10 % der verabreichten Dosis liegen und damit einen geringen Anteil zur Gesamtausscheidung von Acrylamid leisten. Darüber hinaus wurden nach einmaliger

Verabreichung von Acrylamid tendenziell höhere Glycidamid-Gehalte im Urin festgestellt, wobei die beobachteten Unterschiede weniger als 1 % der verabreichten Dosis betragen. Insgesamt sind unter Berücksichtigung der geringen Anzahl behandelter Tiere die Gehalte an Acrylamid und Glycidamid in den untersuchten Gruppen und Expositionsperioden auf vergleichbarem Niveau. Zwischen den Behandlungsgruppen PFG und PFR sowie den einzelnen Expositionsperioden können keine signifikanten Unterschiede in der Acrylamid- bzw. Glycidamid-Ausscheidung festgestellt werden.

4.1.1.4 **Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid in Rattenserum nach Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites (PFG) bzw. Trinkwasser**

Zur Untersuchung der Acrylamid-Resorptionskinetik wurden an jeweils 4 Versuchstiere Einzeldosen von 100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG) bzw. Trinkwasser (Schlundsondierung) verabreicht. Die Gewinnung von Blutproben erfolgte bei jeweils 3 Versuchstieren (randomisiert) zu den Zeitpunkten 30, 60, 120 und 240 Minuten nach der Acrylamid-Aufnahme mittels retrobulbärer Punktion. Die Bestimmung der Hintergrundbelastung an Acrylamid und Glycidamid wurde bei drei weiteren Versuchstieren durchgeführt.

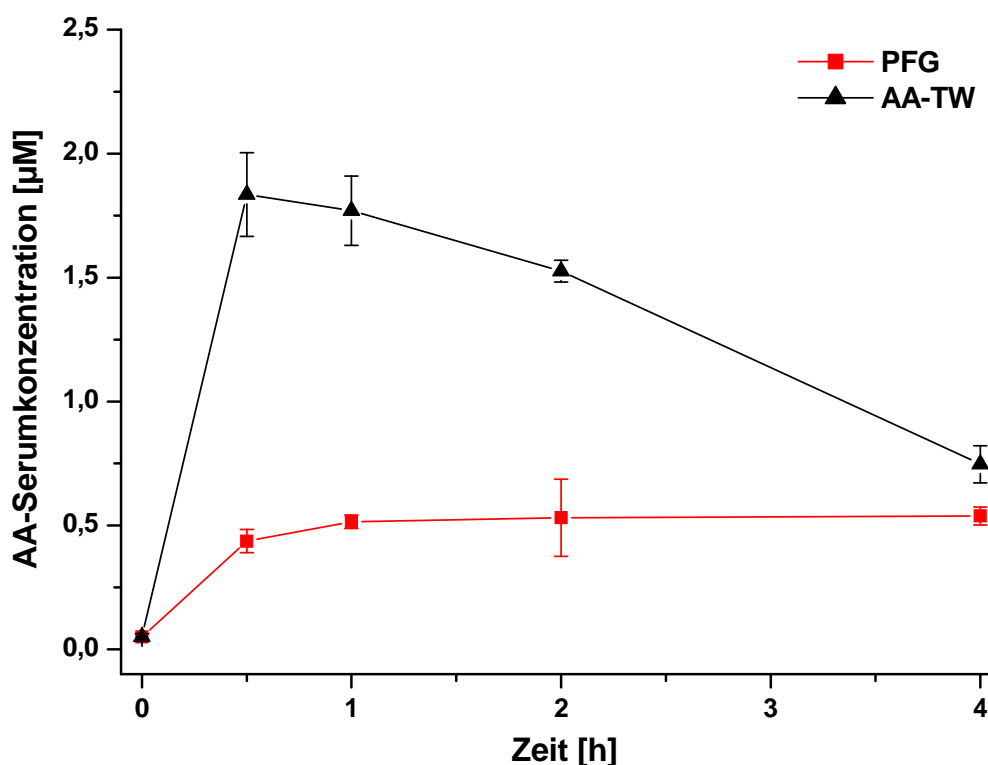


Abb. 4.11: Acrylamid-Serumkonzentration nach Aufnahme von 100 µg AA/kg KG/d über Pommes frites (PFG) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Blutentnahmezeitpunkt

Die maximale Acrylamid-Serumkonzentration wurde sowohl bei den PFG- als auch bei den AA-TW-Gruppen bereits zwischen 30 und 60 Minuten nach der Acrylamid-Aufnahme erreicht (Abb. 4.11). Dabei stiegen die Gehalte im Serum von $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$ zum Zeitpunkt $T = 0$ auf $0,52 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (nach 60 Minuten) bei der PFG- bzw. $1,84 \pm 0,17 \mu\text{M}$ (nach 30 Minuten) bei der AA-TW-Gruppe an, d. h. die maximale Acrylamid-Serumkonzentration liegt bei Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde) etwa um den Faktor 3-4 höher als bei Acrylamid-Gabe über Pommes frites (PFG). Die nachweisbaren Acrylamid-Serumkonzentrationen zum Zeitpunkt $T = 0$ (Negativ-Kontrollen) sind vermutlich auf den Acrylamid-Gehalt (ca. $11 \mu\text{g/kg}$) der Standarddiät zurückzuführen. Bei Verabreichung von Acrylamid über Trinkwasser ist bereits nach 60 Minuten eine tendenzielle Verringerung der Acrylamid-Serumkonzentration zu beobachten ($1,77 \pm 0,14 \mu\text{M}$), welche nach 120 Minuten weiter abnimmt ($1,53 \pm 0,04 \mu\text{M}$). Nach 240 Minuten liegt die Acrylamid-Konzentration mit $0,75 \pm 0,08 \mu\text{M}$ nur noch bei ca. 40 % des maximal erreichten Wertes. Für die AA-TW-Gruppen liegt die Halbwertszeit von Acrylamid im Serum bei ca. 3 Stunden. Im Gegensatz dazu bleiben die Acrylamid-Serumkonzentrationen der PFG-Gruppe bei den entsprechenden Blutentnahmezeitpunkten mit $0,44$ - $0,54 \mu\text{M}$ relativ konstant, wobei auch 240 Minuten nach der Acrylamid-Aufnahme noch keine Tendenz zu einer Verringerung der Acrylamid-Konzentration im Serum zu erkennen ist. Die nach Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites gemessenen geringeren Acrylamid-Serumgehalte deuten auf eine verzögerte Freisetzung von Acrylamid aus Lebensmitteln bzw. verlangsamte Resorption im Gastrointestinaltrakt im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser hin. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Verschiebung des Mercaptursäure-Verhältnisses GAMA/AAMA zu Gunsten von GAMA (Kap. 4.1.1.2) bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites, da bei einer verzögerten Resorption der Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid effektiver sein könnte.

Glycidamid konnte sowohl bei den Versuchstieren der PFG- als auch in einer Probe der AA-TW-Gruppe lediglich 240 Minuten nach der Acrylamid-Aufnahme nachgewiesen werden, wobei die gemessenen Konzentrationen mit $0,056$ - $0,059 \mu\text{M}$ bereits unter der Bestimmungsgrenze ($0,07 \mu\text{M}$) der verwendeten Methode zur Bestimmung von Glycidamid in Rattenserum lagen. Die bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites im Vergleich zur Acrylamid-Trinkwasser-Gruppe anhand des Biomarkers GAMA beobachtete tendenziell erhöhte Bildung von Glycidamid wird durch die Glycidamid-Serumgehalte nicht widerspiegelt, da der überwiegende Teil des in der Leber gebildeten Glycidamids vermutlich unmittelbar mit GSH gekoppelt wird. Darüber hinaus lag auch die in Kap. 4.1.1.3 beschriebene Glycidamid-Ausscheidung über den Urin bei einmaliger Verabreichung von $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (AA-TW) bzw. Pommes frites (PFG) mit einem Anteil von ca. 3 % der gegebenen Dosis auf vergleichbarem Niveau. Für eine effiziente

Entgiftung des metabolisch gebildeten Glycidamid spricht auch die Tatsache, dass mit Hilfe des Comet Assay nach FPG-Behandlung keine signifikanten DNA-Schäden im Blut und in der Leber der behandelten Tiere detektiert wurden [Feld, persönliche Mitteilung]. Frühere Arbeiten zeigten, dass nach 4-stündiger Inkubation von humanem Vollblut mit 10 μM Glycidamid DNA-Schäden mittels Comet assay nach FPG-Behandlung detektierbar waren [Thielen et al., 2006].

Da die Entnahme von Serumproben nur bis zu einem Zeitraum von 4 Stunden nach Acrylamid-Aufnahme erfolgte und Glycidamid lediglich nach 4 Stunden detektiert werden konnte, wäre in Anbetracht der vorhandenen Acrylamid-Serumkonzentration ein weiterer Anstieg der Glycidamid-Serumkonzentration denkbar. Doerge et al. untersuchten die Resorptionskinetik von Acrylamid an F344-Ratten über einen Zeitraum von 10-12 Stunden nach Verabreichung von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG i.v. bzw. mittels Schlundsondierung sowie Gabe von Acrylamid-dotierter Standarddiät [Doerge et al., 2005]. Dabei wurde in den untersuchten Behandlungsgruppen die maximale Glycidamid-Serumkonzentration bereits 2-4 Stunden nach der Acrylamid-Verabreichung beobachtet, so dass die Wahrscheinlichkeit für einen wesentlichen Anstieg der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Glycidamid-Serumkonzentrationen über den Zeitraum von 4 Stunden hinaus als gering einzuschätzen ist.

In der Studie von Doerge et al. wurden nach oraler Verabreichung von 100 μg Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten die maximalen Acrylamid-Serumkonzentrationen nach 1-2 Stunden erreicht und lagen bei ca. 0,4 bzw. 0,3 μM für die Gabe mittels Schlundsonde bzw. Acrylamid-dotierter Standarddiät [Doerge et al., 2005]. Diese maximalen Acrylamid-Serumgehalte liegen insbesondere bei Verabreichung mittels Schlundsonde (Faktor: ~ 4) unter den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrationen. Allerdings liegen die maximalen Glycidamid-Serumkonzentrationen (ca. 0,2 μM) über den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen ($< 0,06 \mu\text{M}$). Weiterhin wurden von Doerge et al. nach oraler Verabreichung von 100 μg Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten höhere GAMA- (27-29 % der verabreichten Dosis) sowie höhere Glycidamid-Gehalte (6 % der verabreichten Dosis) im Urin beobachtet [Doerge et al., 2007]. Tareke et al. untersuchten die Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Adduktbildung nach Verabreichung von 100 μg Acrylamid/kg KG per Schlundsonde an männlichen F344-Ratten [Tareke et al., 2006]. Dabei wurde ein Anstieg von GAVal um 20-30 pmol/g Hb beobachtet, während sich die AAVal-Gehalte lediglich um ca. 10 pmol/g Hb erhöhten. Darüber hinaus beobachteten die Autoren bei der Inkubation von Rattenlebermikrosomen mit Acrylamid Unterschiede in der Geschwindigkeit der Glycidamid-Bildung, wobei die Geschwindigkeitskonstante bei F344-Ratten mit 12 pmol/min/mg Protein um mehr als 80 % höher lag als diejenige von Sprague-Dawley-Ratten (7 pmol/min/mg Protein).

In der vorliegenden Arbeit stiegen die AAVal-Gehalte nach einmaliger Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG an männliche Sprague Dawley Ratten mittels Schlundsonde um ca. 30 pmol/g Hb an, während sich die GAVal-Adduktgehalte nicht signifikant veränderten.

Die zitierten Studien deuten auf Unterschiede in der Toxikokinetik von Acrylamid in F344-Ratten im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sprague Dawley Ratten hin. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die Körpergewichte der F344-Ratten (ca. 150 g) in diesen Studien weit unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sprague Dawley Ratten (ca. 280 g) lagen, was ebenfalls die Toxikokinetik von Acrylamid beeinflussen könnte.

4.1.2 Fütterung von Brotkruste (BK)

Im Folgenden sind die Ergebnisse nach Verabreichung von Brotkruste über 1-9 Tage dargestellt. Da in der Brotkruste der maximal generierbare Acrylamid-Gehalt bei 1400 µg/kg lag, wurde die tägliche Dosis auf 50 µg Acrylamid/kg KG über Brotkruste bzw. Trinkwasser reduziert. Das Versuchsprotokoll entsprach den Untersuchungen mit Pommes frites.

4.1.2.1 Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte

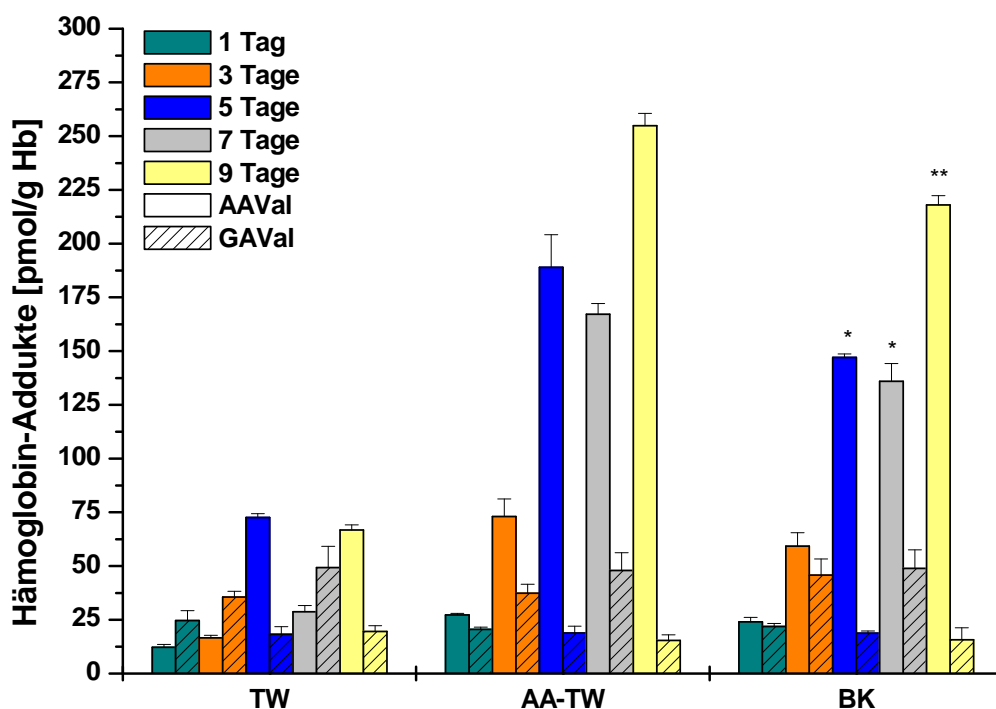


Abb. 4.12: Hämoglobin-Addukt-Bestimmung nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 50 µg Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser (AA-TW), TW: Negativkontrolle, Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zu AA-TW (*p<0,05; **p<0,01)

Wie bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites sind auch bei diesem Experiment nach den untersuchten Expositionsperioden (50 µg Acrylamid/kg KG/d bei den behandelten Tieren) sowohl bei den Trinkwasser- als auch bei der Lebensmittelgruppe deutliche Anstiege der AAVal-Gehalte zu erkennen (Abb. 4.12). Der AAVal-Gehalt der nichtbehandelten Kontrolle beträgt 12-73 pmol/g Hb, während der AAVal-Gehalt der Acrylamid-behandelten Tiere von 24-27 (1 Tag) auf 218-255 (9 Tage) pmol/g Hb ansteigt. Wie bei der Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites ist auch bei der Gabe von 50 µg Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste bzw. Trinkwasser eine Kumulation der Acrylamid-Hb-Addukte zu beobachten. Jedoch zeigen die unbehandelten Negativ-Kontrollen (TW) nach 5, 7 und 9 Tagen Fütterung

deutlich höhere AAVal-Hintergrundgehalte (29-73 pmol/g Hb) im Vergleich zu den übrigen Negativkontrollen (12-17 pmol/g Hb). Nach Berücksichtigung dieser höheren AAVal-Hintergrundgehalte durch Auftragung der Hb-Addukt-Zunahme (Δ pmol/g Hb) gegen die Expositionsdauer ergibt sich eine nahezu lineare Zunahme der Acrylamid-Hb-Addukte in Abhängigkeit von der Gesamtdosis (Abb. 4.13), was auch bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites beobachtet wurde.

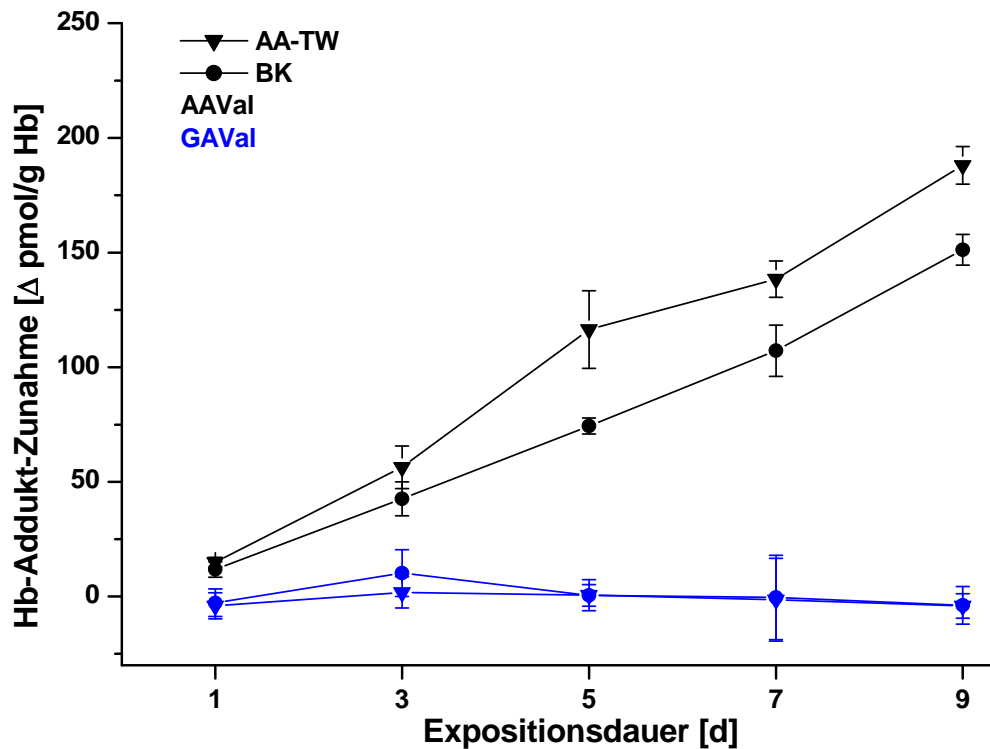


Abb. 4.13: Hämoglobin-Addukt-Zunahme in Abhängigkeit von der Expositionsdauer 50 μ g Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe

In den BK-Gruppen deutet sich eine geringfügige, um etwa 15-20 % verminderte AAVal-Bildung im Vergleich zur AA-TW-Gruppe an (signifikant nach 5, 7 und 9 Tagen). Bei den behandelten Tieren ist nach den durchgeführten Expositionsperioden keine signifikante Änderung der GAVal-Konzentration im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen zu erkennen, was bereits bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites beobachtet und diskutiert wurde (Kap. 4.1.1.1).

4.1.2.2 Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Brotkruste (BK)

Die Anteile der Mercaptursäuren (AAMA + GAMA; Abb. 4.14) an der gegebenen Tagesdosis liegen gemittelt über alle durchgeführten Expositionsperioden für AA-TW-Gruppen bei $58,5 \pm 11,2$ % (32,6-74,8 %; Median: 62,0 %) und für die Brotkruste (BK)-Gruppen bei $48,9 \pm 6,5$ % (33,6-60,3 %; Median: 50,5 %). Auf der Basis der AAVaI-Addukt-Gehalte wurden bei den Negativkontrollen der Fütterungsversuche über 5, 7 und 9 Tage erhöhte Hintergrundbelastungen beobachtet. Der Gehalt an AAMA im 24-Stunden-Urin der Negativkontrollen beträgt 4-8 nmol absolut, wobei GAMA nicht detektierbar war. Ähnliche Hintergrundgehalte an Mercaptursäuren wurden bei den Negativkontrollen der Fütterungsversuche mit Pommes frites ermittelt. Daraus folgt, dass die Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren nicht auf eine erhöhte Hintergrundbelastung mit Acrylamid hindeutet.

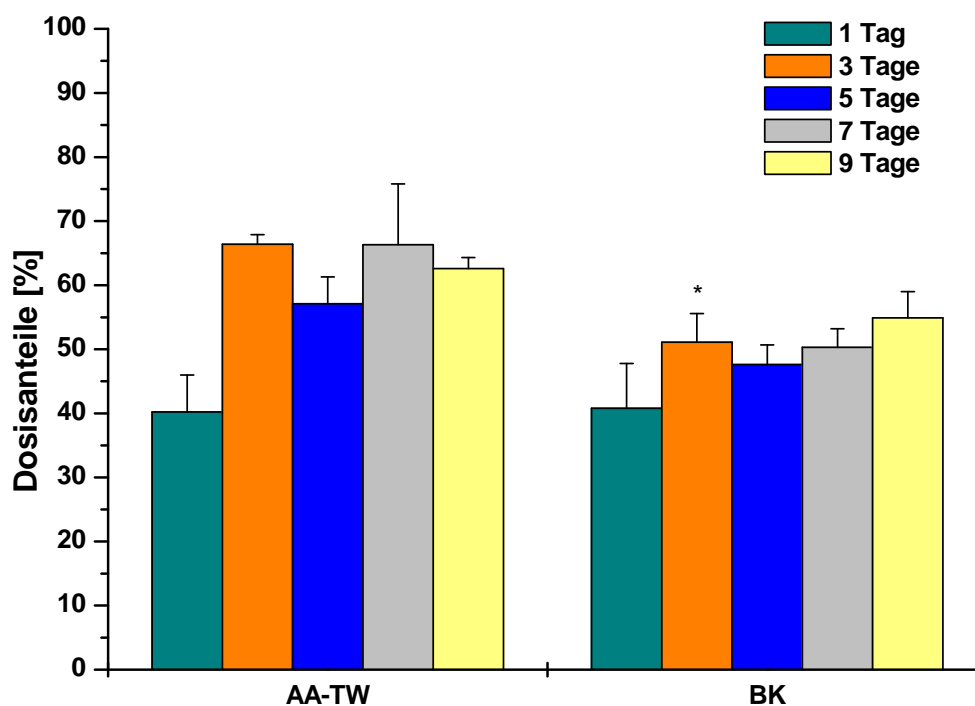


Abb. 4.14: Dosisanteile berechnet auf Grundlage der Gesamtausscheidung an AAMA und GAMA nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit $50 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste bzw. Trinkwasser (AA-TW); Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zur Acrylamid-Trinkwassergruppe (* $p < 0,05$)

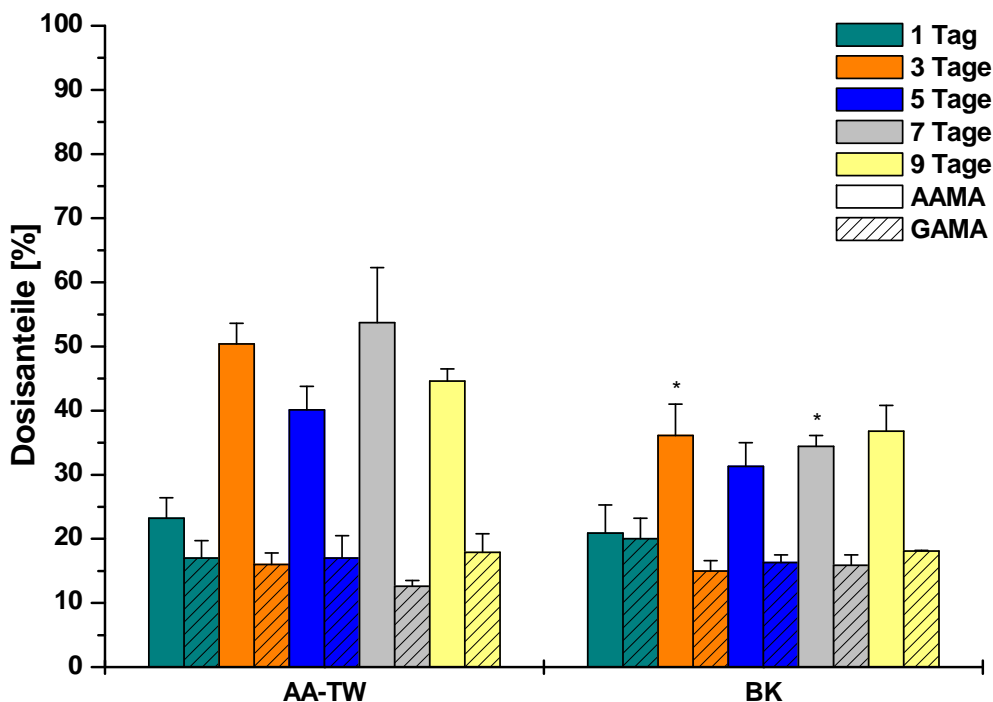


Abb. 4.15: Mercaptursäuren-Bestimmung nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 50 µg Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser (AA-TW), AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure, Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe
*: signifikant unterschiedlich zur Acrylamid-Trinkwassergruppe (p<0,05)

Die AAMA- und GAMA-Anteile an der verabreichten Tagesdosis von 50 µg Acrylamid/kg KG nach 3-, 5-, 7- und 9- tägiger Exposition mit Acrylamid zeigen innerhalb der Acrylamid-Trinkwasser- und Brotkrustegruppen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die AAMA-Ausscheidung nach einmaliger Gabe von Acrylamid ist sowohl bei der AA-TW- als auch bei der BK-Gruppe im Vergleich zur Exposition über 3, 5, 7 und 9 Tage erniedrigt, was bereits bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites beobachtet wurde. Der Vergleich der Gehalte an AAMA in den AA-TW- und BK-Gruppen zeigt eine leichte Erniedrigung der ausgeschiedenen Dosisanteile bei Exposition über BK (signifikant: 3, 7 Tage). Dies korreliert mit den Daten zur Acrylamid-Hb-Adduktbildung und deutet auf eine geringfügig verminderte Bioverfügbarkeit von Acrylamid über Brotkruste im Vergleich zu Trinkwasser hin.

Doerge et al. untersuchten die Aufnahme von 100 µg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten nach intravenöser im Vergleich zu oraler Verabreichung. Dabei zeigte sich, dass Acrylamid nach Verabreichung in Trinkwasser mittels Schlundsondierung schnell und nahezu vollständig aufgenommen wird. Bei Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung betrug die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur intravenösen Verabreichung jedoch nur 32-44 %, was auf einen ausgeprägten Einfluss durch die Lebensmittelmatrix schließen lässt [Doerge et al., 2005]. Allerdings ist bei dieser Studie zu beachten, dass die Acrylamid-Gehalte im Futter durch Zusatz von Acrylamid-Lösungen generiert wurden. Dabei könnte die Reaktion von Futterinhaltsstoffen mit dem zugesetzten Acrylamid zu einer Verminderung der freien Acrylamid-Gehalte führen, wodurch sich die resorbierbare Gesamtmenge bei Einstellung

einer bestimmten Dosis verringern würde. In der vorliegenden Arbeit wurden Lebensmittel verwendet, in denen der Acrylamid-Gehalt bei der Herstellung generiert wurde, so dass es sich bei den Analyseergebnissen um den tatsächlich vorhandenen Gehalt an freiem, resorbierbarem Acrylamid handelt.

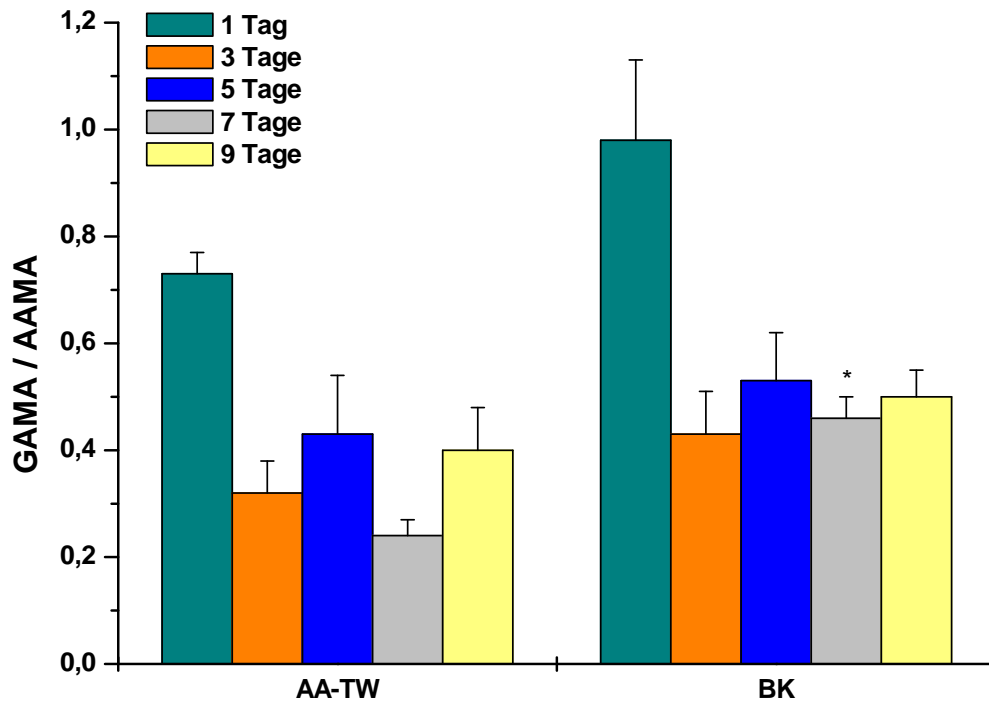


Abb. 4.16: Verhältnis GAMA/AAMA nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 50 µg Acrylamid/kg KG/d über Brotkruste bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zur Acrylamid-Trinkwassergruppe (*p<0,05)

Die GAMA-Konzentrationen zeigen beim Vergleich der beiden Expositionsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Wie bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites deutet sich auch bei den BK-Gruppen (GAMA/AAMA: $0,58 \pm 0,22$) im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (GAMA/AAMA: $0,43 \pm 0,18$) eine Verschiebung des GAMA/AAMA-Verhältnisses zu Gunsten von GAMA an (Abb. 4.16), was vermutlich auf die verzögerte Resorption von Acrylamid bei Aufnahme über Lebensmittel zurückzuführen ist. Dadurch könnte der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid effektiver verlaufen, was zu einer höheren GAMA-Ausscheidung führen würde. Bei erstmaliger Gabe der Acrylamid-Dosis wurden die höchsten GAMA/AAMA-Verhältnisse beobachtet, was ebenfalls bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites beobachtet wurde.

4.1.2.3 Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Acrylamid über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser

Der prozentuale Anteil der über den Urin ausgeschiedenen Acrylamid- bzw. Glycidamid-Stoffmenge an der gegebenen täglichen Dosis von 50 µg Acrylamid/kg KG liegt über die Expositionsperioden gemittelt bei $5,0 \pm 2,9$ % bzw. $3,5 \pm 2,3$ % für die AA-TW-Gruppen und $2,8 \pm 0,5$ % bzw. $2,9 \pm 0,7$ % für die Brotkruste (BK)-Gruppen. Bei Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (AA-TW) wird trotz relativ großer individueller Unterschiede mit Ausnahme der einmaligen Verabreichung (1 Tag) im Vergleich zu BK-Gruppen tendenziell mehr Acrylamid über den Urin ausgeschieden (Abb. 4.17), was auch bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites (Kap. 4.1.1.3) beobachtet und diskutiert wurde. Innerhalb der Behandlungsgruppen konnten zwischen den einzelnen Expositionsperioden keine signifikanten Unterschiede in der Acrylamid-Ausscheidung beobachtet werden. Die Gehalte an Glycidamid sind in den untersuchten Gruppen und Expositionsperioden auf vergleichbarem Niveau. In den Urinproben der Negativkontrollen war sowohl Acrylamid als auch Glycidamid nicht nachweisbar.

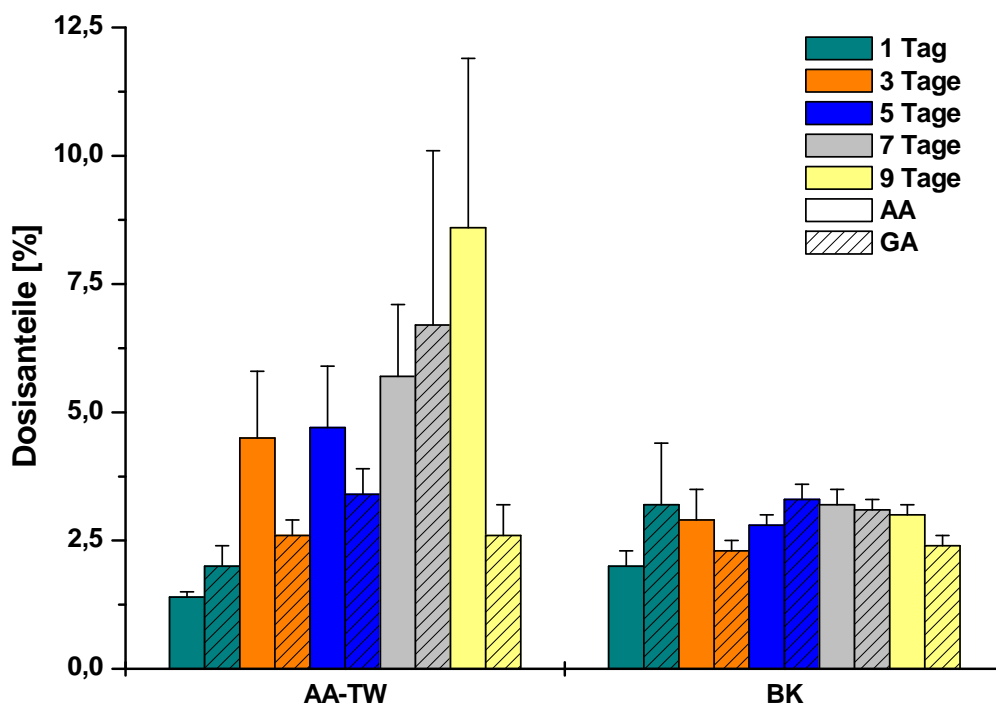


Abb. 4.17: Prozentualer Anteil der Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid an der verabreichten Einzeldosis von 50 µg Acrylamid/kg KG/d nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition über Brotkruste (BK) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe

Insgesamt sind die Dosisanteile von Acrylamid und Glycidamid im Urin nach Verabreichung von Acrylamid über Brotkruste mit denjenigen der Pommes frites vergleichbar. Die bei den Brotkruste-Gruppen beobachteten reduzierten AAVaI- und AAMA-Gehalte korrelieren daher nicht mit der Ausscheidung von Acrylamid oder Glycidamid über den Urin.

Im Rahmen früherer Arbeiten im Arbeitskreis wurden die Gehalte an freiem Acrylamid und Glycidamid in den Fäces der behandelten Tiere bestimmt [Gerhardt, 2008]. Dabei konnte in keiner der untersuchten Proben Glycidamid nachgewiesen werden. Bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites und Lebkuchen lagen die Acrylamid-Gehalte bei 53 % der Proben unter der Nachweisgrenze. Bei den übrigen Tieren lagen die mittleren Dosis-Anteile von freiem Acrylamid bei 1,1 % (Pommes frites) und 1,2 % (Lebkuchen). Bei Verabreichung von Brotkruste konnte in nahezu allen Fäces-Proben Acrylamid nachgewiesen werden, wobei die mittleren Anteile an der verabreichten Dosis mit 3,4 % tendenziell höher als bei Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites bzw. Lebkuchen lagen. Allerdings wurden auch in den Fäces-Proben von Negativkontrollen relativ hohe Acrylamid-Gehalte gemessen, so dass keine exakte Aussage über die tatsächlich über Fäces ausgeschiedene Menge an Acrylamid bei Aufnahme über die Lebensmittel getroffen werden kann.

4.1.3 Verabreichung von Lebkuchen (LK)

Im Folgenden sind die Ergebnisse nach Fütterung von Lebkuchen über 1, 3, 5, 7 und 9 Tage dargestellt. Die tägliche Dosis sollte auf 100 µg Acrylamid/kg KG über Lebkuchen (LK) bzw. Trinkwasser (AA-TW, Schlundsondierung) eingestellt werden. Für den Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens wurden im Rahmen mehrmals durchgeführter Kontrollmessungen stark unterschiedliche Werte ermittelt (4150 ± 800 µg Acrylamid/kg; Kap. 6.1.1), obwohl die in den jeweiligen Messungen untersuchten Lebkuchen jeweils aus der gleichen Probe stammten und gleich behandelt wurden. Die Vermutung, dass der Acrylamid-Gehalt möglicherweise nicht exakt bestimmt wurde, ergab sich an dem zunächst unklaren Befund, dass sowohl die AAVal-Addukte als auch die Mercaptursäure-Bildung in den LK-Gruppen höher war als in den AA-TW-Gruppen. Insofern musste sich die jeweilige Einwaage für die exakte Dosierung über den nach der Gesamtheit der zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden Analysedaten richten. Daher wurden in Abhängigkeit von den jeweiligen Analyseergebnissen für die Durchführung der Fütterungsversuche zu den jeweiligen Versuchsabschnitten unterschiedliche Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens zu Grunde gelegt.

4.1.3.1 Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte nach Verabreichung von Lebkuchen (LK)

Auch bei Fütterung von Lebkuchen sind vergleichbar zur Gabe von Pommes frites und Brotkruste nach den untersuchten Expositionsperioden bei den behandelten Tieren sowohl bei der Trinkwasser- als auch bei der Lebensmittelgruppe Gesamtdosis-abhängige Anstiege der AAVal-Gehalte zu erkennen (Abb. 4.18).

Die AAVal-Gehalte der Kontrollen betragen 8-23 pmol/g Hb, während diejenige der behandelten Tiere von 33-40 pmol/g Hb nach einmaliger Gabe auf 290-383 pmol/g Hb nach 9 Tagen ansteigt. Wie bei der Verabreichung von Acrylamid über Pommes frites und Brotkruste ist auch bei der Gabe von 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser eine Kumulation der Acrylamid-Hb-Addukte zu beobachten. Auch bei der Fütterung von Lebkuchen wurde bei den behandelten Tieren keine signifikante Änderung der GAVal-Gehalte im Vergleich zur Negativkontrolle (TW) beobachtet. Jedoch zeigt die Lebkuchen-Gruppe nach allen Expositionszeiträumen signifikant unterschiedliche AAVal-Gehalte im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen. Nach 1- und 5-tägiger Fütterung sind die AAVal-Gehalte signifikant erniedrigt (angenommener Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens: 5400 µg/kg), während nach 3-, 7- und 9-tägiger Fütterung die entsprechenden Gehalte signifikant erhöht sind (angenommene Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens: 3 Tage: 3200 µg/kg; 7 Tage: 3400 µg/kg; 9 Tage: 4060 µg/kg). Vermutlich reflektieren die AAVal-Messwerte die ungenaue

Charakterisierung des Gehaltes an Acrylamid im Lebkuchen. Wahrscheinlich wurde in Abhängigkeit der Analysenergebnisse sowohl von zu hohen (Zeitpunkte 1 und 5 Tage) als auch von zu niedrigen (Zeitpunkte 3, 7 und 9 Tage) Acrylamid-Gehalten des Lebkuchens ausgegangen.

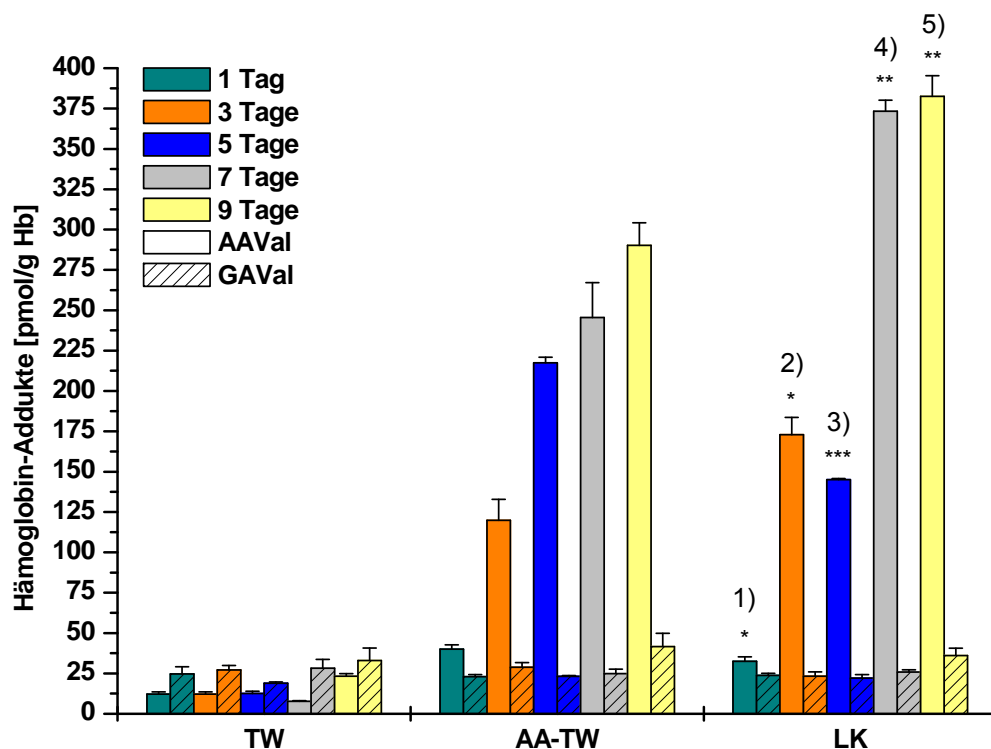


Abb. 4.18: Hämoglobin-Addukte im Blut von Ratten nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Lebkuchen bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zu AA-TW (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), zu Grunde gelegte Acrylamid-Gehalte des LK: 1) 5400 µg/kg; 2) 3200 µg/kg; 3) 5400 µg/kg; 4) 3400 µg/kg; 5) 4060 µg/kg

4.1.3.2 Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren im 24-Stunden-Sammelurin nach Fütterung von Lebkuchen (LK)

Die Anteile der Mercaptursäuren an der verabreichten Dosis spiegeln die Ergebnisse bei den Acrylamid-Hb-Addukten wider. Nach allen Expositionsperioden (Ausnahme: einmalige Verabreichung) wurden signifikante Unterschiede in der Ausscheidung von AAMA bei den LK-Gruppen im Vergleich zu AA-TW-Gruppen beobachtet (Abb. 4.19).

Wie bereits bei den Acrylamid-Hb-Addukten festgestellt wurde, liegen die gemessenen AAMA-Dosisanteile nach einmaliger sowie 5-tägiger Behandlung niedriger (signifikant: 5 Tage) und nach 3-, 7- und 9-tägiger Fütterung mit Lebkuchen höher (signifikant: 3, 7 und 9 Tage) als in den entsprechenden AA-TW-Gruppen. Auch die GAMA-Dosisanteile zeigen sowohl bei 3-, als auch nach 7- und 9-tägiger Fütterung (signifikant: 3 und 9 Tage) mit Lebkuchen erhöhte Werte im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen. Wie bereits bei den Hb-

Addukten erwähnt können die beobachteten Unterschiede vermutlich auf die unterschiedlichen, bei der Versuchsdurchführung zugrunde gelegten Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens zurückgeführt werden.

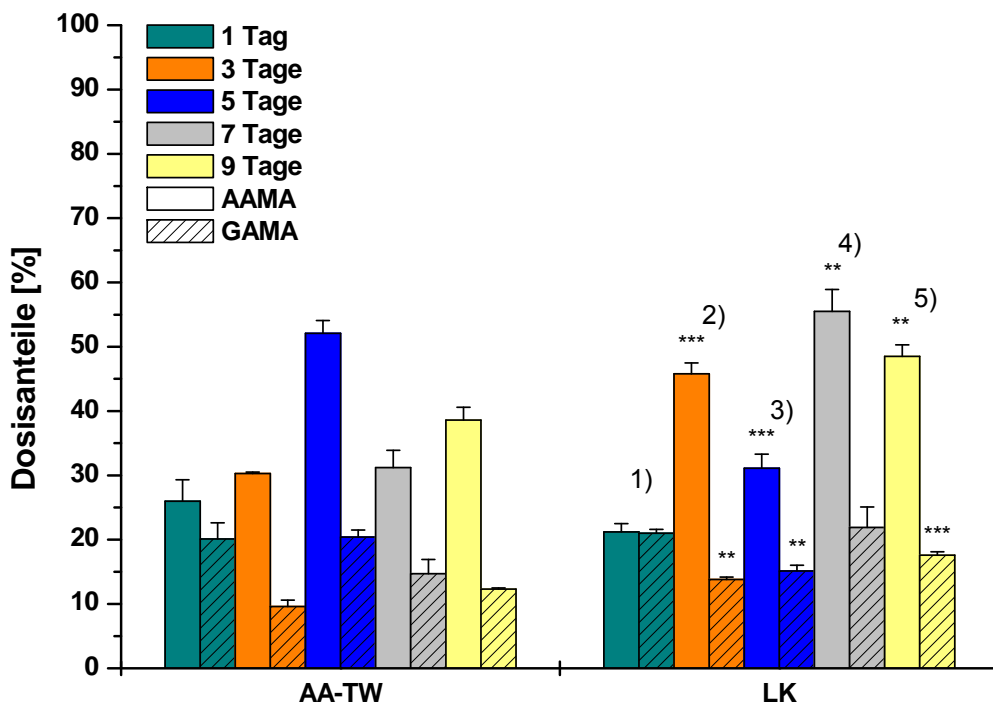


Abb. 4.19: Dosisanteile berechnet auf Grundlage der Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Lebkuchen (LK): bzw. Trinkwasser (AA-TW), AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure, GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure; Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zur Acrylamid-Trinkwassergruppe (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), zu Grunde gelegte Acrylamid-Gehalte des LK: 1) 5400 µg/kg, 2) 3200 µg/kg, 3) 5400 µg/kg, 4) 3400 µg/kg, 5) 4060 µg/kg

4.1.3.3 Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin nach Verabreichung von Lebkuchen (LK)

Bei den Fütterungsversuchen mit Lebkuchen (LK) wurden aufgrund der stark unterschiedlichen Analysenergebnisse zum Acrylamid-Gehalt (4150 ± 800 µg Acrylamid/kg) vermutlich sowohl zu hohe als auch zu niedrige Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens für die exakte Einstellung der Dosis von 100 µg Acrylamid/kg KG zugrunde gelegt. Jedoch werden die daraus resultierenden Unterschiede in der tatsächlich verabreichten Acrylamid-Dosis durch die über den Urin ausgeschiedene Stoffmenge an Acrylamid und Glycidamid nicht wiedergegeben. Der prozentuale Anteil der über den Urin ausgeschiedenen Acrylamid- bzw. Glycidamid-Stoffmenge an der verabreichten täglichen Dosis von 100 µg Acrylamid/kg KG liegt über die Expositionsperioden gemittelt bei $5,6 \pm 3,0$ % bzw. $2,3 \pm 0,7$ % für die AA-TW-Gruppen und $1,8 \pm 0,5$ % bzw. $1,8 \pm 0,6$ % für die Lebkuchen (LK)-Gruppen und ist mit den Ergebnissen aus den Fütterungsversuchen mit Pommes frites bzw. Brotkruste vergleichbar.

Auch bei der Verabreichung von Lebkuchen wird mit Ausnahme der einmaligen Verabreichung (1 Tag) im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (AA-TW) tendenziell weniger Acrylamid über den Urin ausgeschieden (Abb. 4.20). Innerhalb der Behandlungsgruppen konnten zwischen den einzelnen Expositionsperioden keine signifikanten Unterschiede in der Acrylamid-Ausscheidung beobachtet werden, obwohl in den Lebkuchen-Gruppen unterschiedliche Acrylamid-Dosen verabreicht wurden. Die Glycidamid-Dosisanteile sind in den untersuchten Gruppen und Expositionsperioden ebenfalls auf vergleichbarem Niveau.

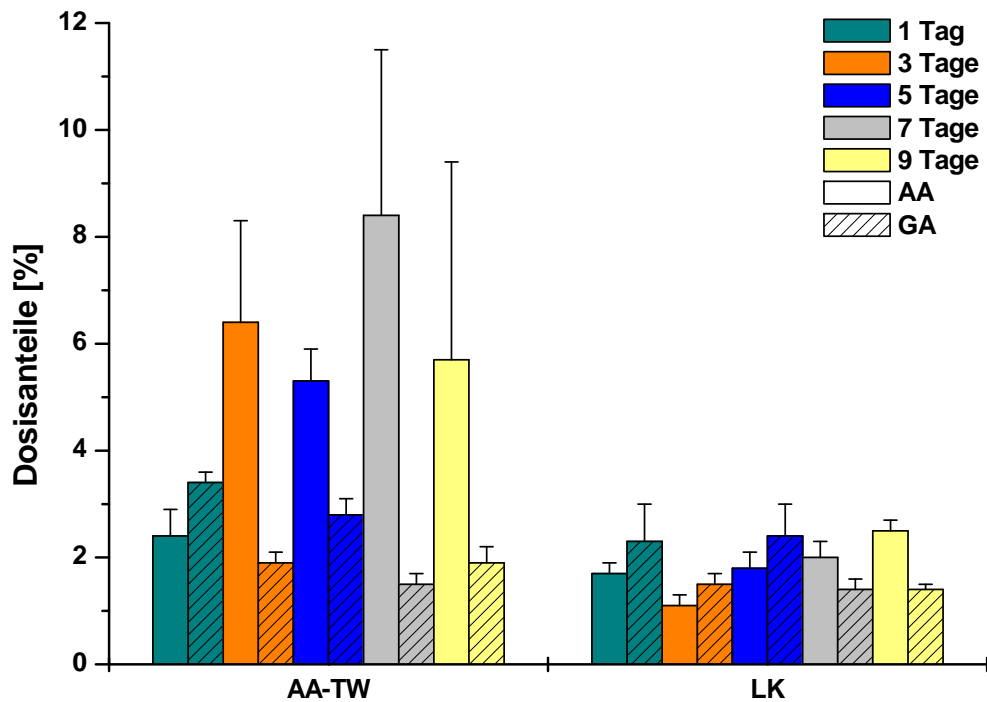


Abb. 4.20: Prozentualer Anteil der Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid an der verabreichten Einzeldosis von 100 µg Acrylamid/kg KG/d nach 1-, 3-, 5-, 7- und 9-tägiger Exposition über Lebkuchen (LK) bzw. Trinkwasser (AA-TW), Mittelwert ± SD, 3 Tiere pro Gruppe

4.2 Verabreichung der kumulativen Dosis aus den Fütterungsversuchen (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) bzw. 10 mg Acrylamid/kg KG als Einzeldosis über Trinkwasser (Schlundsonde)

Zum Vergleich der Toxikokinetik von Acrylamid bei wiederholter Verabreichung im Rahmen des Fütterungsversuchs (50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d für maximal 9 Tage) mit derjenigen nach Gabe der entsprechenden kumulativen Einzeldosis wurden jeweils 3 Tiere mit 450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser mittels Schlundsondierung behandelt. Darüber hinaus wurde zur Untersuchung der Acrylamid-Toxikokinetik im Hochdosisbereich an zwei Versuchstiere eine Dosis von 10 mg Acrylamid/kg KG verabreicht.

4.2.1 Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte

Bei den behandelten Tieren sind nahezu lineare Anstiege der AAVal-Gehalte in Abhängigkeit von der verabreichten Acrylamid-Dosis zu erkennen (Abb. 4.21). Bei einmaliger Exposition mit 0,45 mg Acrylamid/kg KG über Acrylamid-haltiges Trinkwasser (Schlundsondierung) steigt der AAVal-Gehalt von 12 ± 1 pmol/g Hb bei den Kontrolltieren auf 186 ± 9 pmol/g Hb bei den behandelten Tieren an. Im Rahmen der Fütterungsstudie wurde bei 9-tägiger Behandlung mit 50 µg Acrylamid/kg KG/d (entsprechend einer kumulativen Dosis von 0,45 mg Acrylamid/kg KG) ein vergleichbarer AAVal-Anstieg um ca. 180-190 pmol/g Hb beobachtet. Bei Verabreichung einer Einzeldosis von 0,9 mg Acrylamid/kg KG liegen die AAVal-Gehalte bei 366 ± 21 pmol/g Hb. Dieser Gehalt ist im Vergleich zur Einzeldosis von 0,45 mg Acrylamid/kg KG etwa um den Faktor 2 erhöht. Nach 9-tägiger Exposition mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d steigen die AAVal-Gehalte auf 290 ± 14 pmol/g Hb, welche im Vergleich zur Einzeldosis von 0,9 mg Acrylamid/kg KG niedriger liegen. Nach Verabreichung einer Einzeldosis von 10 mg Acrylamid/kg KG wurde ein etwa 10-fach höherer Anstieg der AAVal-Addukte (3834 ± 488 pmol/g Hb) im Vergleich zur einmaligen Dosis von 0,9 mg Acrylamid/kg KG beobachtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das Ausmaß der AAVal-Bildung lediglich von der resultierenden Gesamtdosis abhängig ist, was auf eine Kumulation der Hb-Addukte als Langzeitbiomarker der inneren Exposition zurückzuführen ist. Aufgrund der im Vergleich zur Lebensdauer der Erythrocyten (ca. 60-90 Tage bei der Ratte) relativ kurzen Expositionszeit von maximal 9 Tagen sind die ermittelten AAVal-Gehalte nach wiederholter Exposition mit 50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d mit der Verabreichung der kumulativen Dosis von 450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG vergleichbar.

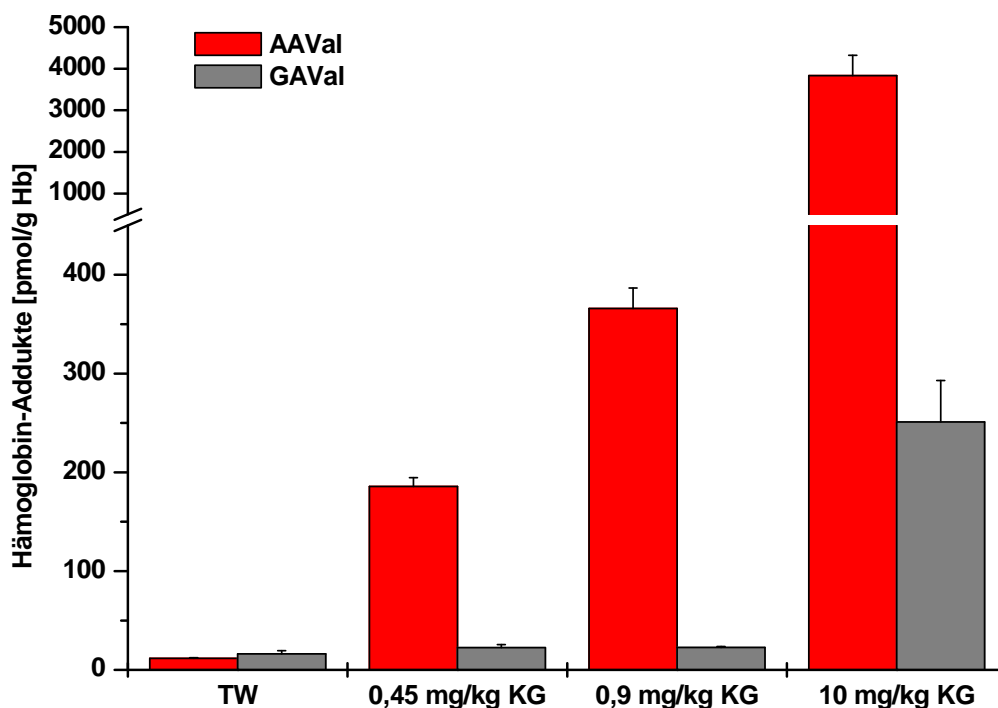


Abb. 4.21: Hämoglobin-Addukt-Bestimmung nach Exposition mit 0,45 mg Acrylamid/kg KG, 0,9 mg Acrylamid/kg KG und 10 mg/kg KG über Trinkwasser (Schlundsondierung), TW: Negativkontrolle, Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe (10 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere)

Die behandelten Tiere zeigen nach Gabe einer Einzeldosis von 0,45 bzw. 0,9 mg Acrylamid/kg KG keine signifikante Änderung der GAVal-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Kontrolltieren liegt der GAVal-Gehalt mit 16 ± 3 pmol/g Hb höher als derjenige von AAVal (12 ± 1 pmol/g Hb), was bereits bei den Kontrolltieren der Fütterungsstudie beobachtet und diskutiert wurde (Kap. 4.1.1.1). Auch bei 9-tägiger Behandlung mit 50 bzw. 100 μ g Acrylamid/kg KG (Fütterungsstudie) wurde kein signifikanter Anstieg der GAVal-Addukte festgestellt. Dies deutet zusammen mit den in Kap. 4.1.1.4 diskutierten relativ niedrigen Glycidamid-Serumkonzentrationen ($< 0,06$ μ M) nach Aufnahme von 100 μ g Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG) bzw. Acrylamid-haltiges Trinkwasser auf im Vergleich zu Acrylamid relativ geringe Glycidamid-Blutkonzentrationen hin. Die Gehalte an Glycidamid-Mercaptursäure (Kap. 4.2.2) nach Verabreichung der Einzeldosen deuten darauf hin, dass die Glycidamid-Bildung im Dosisbereich von 50-10000 μ g Acrylamid/kg KG nahezu linear verläuft. Lediglich nach Gabe einer Einzeldosis von 10 mg Acrylamid/kg KG wurde ein signifikanter Anstieg der GAVal-Addukte auf 251 ± 47 pmol/g Hb beobachtet. Darüber hinaus wurde nach Verabreichung einer Einzeldosis von 10 mg Acrylamid/kg KG ein signifikanter Anstieg der DNA-Schäden in Blut und Leber beobachtet, wohingegen bei niedrigeren Konzentrationen bis 0,9 mg Acrylamid/kg mittels Comet Assay kein signifikanter Anstieg der DNA-Schäden bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren gemessen wurde [Feld, persönliche Mitteilung].

4.2.2 Ausscheidung von AAMA, GAMA, Acrylamid und Glycidamid im 24-Stunden-Sammelurin

Nach Verabreichung einer Einzeldosis von 0,45 mg Acrylamid/kg KG lagen die prozentualen Anteile von AAMA, GAMA, Acrylamid und Glycidamid bei $43,1 \pm 2,2 \%$, $17,6 \pm 1,7 \%$, $3,5 \pm 1,5 \%$ und $2,7 \pm 0,1 \%$ (Abb. 4.22). Nach 9-tägiger Behandlung mit $50 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d wurden im 24-Stunden-Urin nach dem letzten Behandlungstag vergleichbare Werte ermittelt ($36,8 \pm 4,0 \%$, $18,1 \pm 0,1 \%$, $3,0 \pm 0,2 \%$ und $2,4 \pm 0,2 \%$). Die nach Gabe einer Einzeldosis von $50 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG (Fütterungsstudie, Tag 1) festgestellte niedrigere Ausscheidung von AAMA ($20,9 \pm 4,4 \%$ der Dosis) sowie erhöhte Ausscheidung von GAMA ($20,0 \pm 3,2 \%$ der Dosis) wurde nach einmaliger Verabreichung von $0,45 \text{ mg}$ Acrylamid/kg KG nicht beobachtet.

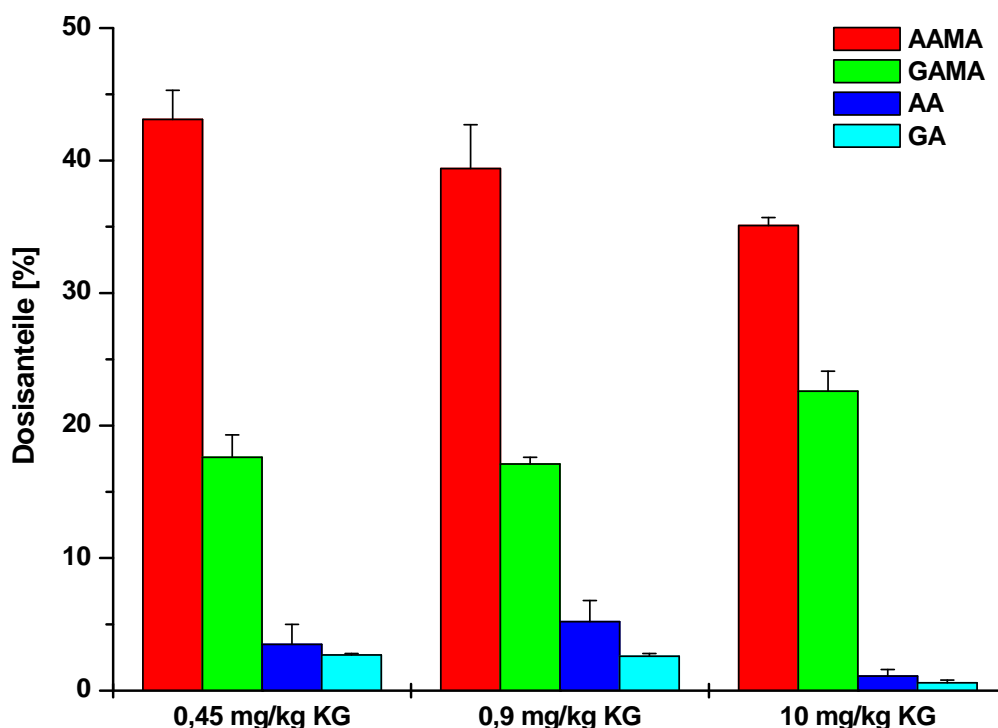


Abb. 4.22: Urinmetabolite (AAMA: Acrylamid-Mercaptursäure; GAMA: Glycidamid-Mercaptursäure; AA: Acrylamid; GA: Glycidamid) nach Exposition mit 0,45; 0,9 und 10 mg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (Schlundsondierung), Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe (10 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere)

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Verabreichung einer Einzeldosis von $0,9 \text{ mg}$ Acrylamid/kg KG, wobei die prozentualen Anteile von AAMA, Acrylamid und Glycidamid ($39,4 \pm 3,3 \%$, $5,2 \pm 1,6 \%$ und $2,6 \pm 0,2 \%$) an der gegebenen Dosis ebenfalls mit denen nach 9-tägiger Behandlung mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d ($38,6 \pm 2,0 \%$, $5,7 \pm 3,7 \%$, und $1,9 \pm 0,3 \%$; Fütterungsstudie) vergleichbar waren. Lediglich die GAMA-Ausscheidung nach 9-tägiger Behandlung mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d ($12,3 \pm 0,2 \%$) war

im Vergleich zur Einzeldosis von 0,9 mg Acrylamid/kg KG ($17,1 \pm 0,5 \%$) erniedrigt. Diese anhand der GAMA-Ausscheidung zu Tage tretende verminderte Bildung von Glycidamid nach wiederholter Verabreichung würde in Verbindung mit der im Vergleich zur kumulativen Dosis geringeren AAVal-Bildung (Kap. 4.2.1) auf eine verstärkte Detoxifizierung von Acrylamid deuten (z. B. durch Induktion von Glutathion-S-Transferasen (GSTs)). Allerdings wäre im Falle einer GST-Induktion auch eine vermehrte Bildung von Acrylamid-GSH-Addukten und im weiteren Verlauf eine erhöhte Ausscheidung von AAMA zu erwarten, was jedoch bei dem durchgeführten Experiment nicht beobachtet wurde. Aufgrund der relativ niedrigen Anzahl behandelter Tiere zeigen die beobachteten Unterschiede in der Ausscheidung von GAMA nur eine Tendenz und bedürfen weiterer Abklärung.

Nach Verabreichung einer Einzeldosis von 10 mg Acrylamid/kg KG lagen die prozentualen Anteile von AAMA, GAMA, Acrylamid und Glycidamid bei $35,1 \pm 0,6 \%$, $22,6 \pm 1,5 \%$, $1,1 \pm 0,5 \%$ und $0,6 \pm 0,2 \%$. Im Vergleich zur Dosis von 0,45 bzw. 0,9 mg Acrylamid/kg KG (GAMA/AAMA: $0,41 \pm 0,06$ bzw. $0,43 \pm 0,03$) war eine Verschiebung des GAMA/AAMA-Verhältnisses ($0,65 \pm 0,03$) zu Gunsten von GAMA zu beobachten. Eine mögliche Erklärung könnte die Sättigung der Detoxifizierung von Acrylamid durch Kopplung an Glutathion in der Leber im Dosisbereich von 1-10 mg Acrylamid/kg KG sein, wodurch das verbleibende Acrylamid vermehrt zu Glycidamid umgewandelt werden könnte. Im Einklang mit der verminderten AAMA-Ausscheidung war auch der Dosisanteil von Acrylamid im Urin erniedrigt, wobei die erhöhte GAMA-Ausscheidung durch die Glycidamid-Gehalte im Urin nicht widerspiegelt wurde. Allerdings ist zu beachten, dass die statistische Aussagekraft dieser Dosisgruppe ($n = 2$) begrenzt ist.

Doerge et al. ermittelten nach oraler Verabreichung von 100 μg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten Dosisanteile von 31 % für AAMA und 28 % für GAMA [Doerge et al., 2007]. In der Veröffentlichung von Fennell et al. lagen die Dosisanteile von AAMA und GAMA nach Gabe von 3 mg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten bei 29 bzw. 21 % [Fennell et al., 2005]. Sumner et al. beobachteten nach oraler Gabe von 50 mg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten Dosisanteile von 42 % für AAMA und 12 % für GAMA [Sumner et al., 2003]. Diese Daten lassen vermuten, dass der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid in der Ratte sättigbar ist, da mit zunehmender Dosis die Ausscheidung an GAMA als Biomarker für die Bildung von Glycidamid abnimmt, wobei die Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren auf vergleichbarem Niveau liegt [Doerge et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein derartiger Effekt im Dosisbereich von 0,05 – 10 mg Acrylamid/kg KG nicht beobachtet.

4.3 Einfluss des Narkotisierungsmittels Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid

Der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid erfolgt im Wesentlichen durch CYP450 2E1 [Sumner et al., 1999; Ghanayem et al., 2005]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der Tierversuche das Narkotisierungsmittel Isofluran eingesetzt, dessen Metabolismus ebenfalls durch CYP450 2E1 vermittelt wird [Kharasch und Thummel, 1993; Bradshaw und Ivanetich, 1984]. Da beide Substanzen von dem gleichen Enzym umgesetzt werden, ist eine gegenseitige Beeinflussung des Metabolismus nicht auszuschließen. Um den Einfluss des Narkotisierungsmittels Isofluran auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Acrylamid-Biomarker (Hb-Addukte und Mercaptursäuren) zu untersuchen wurden an 4 Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 100 µg Acrylamid/kg KG/d mittels Schlundsonde verabreicht. Bei zwei Versuchstieren wurden die jeweiligen Schlundsondierungen nach leichter Isofluran-Narkose durchgeführt, die beiden anderen Tiere wurden ohne Narkotisierung behandelt. Die Mercaptursäuren wurden nach der letzten Applikation (Tag 2) im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Die Entnahme von Blut erfolgte 24 Stunden nach der letzten Applikation.

Wie Tab. 4.1 verdeutlicht steigt der AAVal-Gehalt von 19 ± 4 pmol/g Hb bei den Kontrolltieren (TW) auf 93 ± 11 pmol/g Hb bei den narkotisierten bzw. 92 ± 2 pmol/g Hb bei den nicht narkotisierten Tieren an, wobei das Ausmaß der AAVal-Bildung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen erkennen lässt. Die behandelten Tiere zeigen nach Exposition mit 100 µg Acrylamid/kg KG/d über den Zeitraum von zwei Tagen sowohl mit als auch ohne Isofluran-Behandlung keine signifikante Änderung der GAVal-Gehalte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bei den narkotisierten Tieren liegen die Anteile der Mercaptursäuren an der gegebenen täglichen Dosis (100 µg Acrylamid/kg KG) bei $28,6 \pm 0,5$ % für AAMA und $14,4 \pm 1,3$ % für GAMA. Die entsprechenden Dosisanteile liegen für die nicht narkotisierte Behandlungsgruppe bei $26,1 \pm 2,5$ % für AAMA und $15,2 \pm 0,4$ % für GAMA. Die Mercaptursäure-Ausscheidung spiegelt die Ergebnisse bei den Hb-Addukten wieder, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen beobachtet wurden.

Tab. 4.1: Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid sowie Dosisanteile der Mercaptursäuren nach Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG/d an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit (AA-TW (narkotisiert)) und ohne (AA-TW) Isofluran-Narkose. TW: Negativkontrolle; Mittelwert ± SD, 2 Tiere pro Gruppe

	AAVal [pmol/g Hb]	GAVal [pmol/g Hb]	AAMA [%]	GAMA [%]
TW	19 ± 4	35 ± 3	-	-
AA-TW (narkotisiert)	93 ± 11	36 ± 7	28,6 ± 0,5	14,4 ± 1,3
AA-TW	92 ± 2	42 ± 10	26,1 ± 2,5	15,2 ± 0,4

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse bei den Hb-Addukten und Mercaptursäuren, dass die unter den Versuchsbedingungen der Fütterungsstudie durchgeführte moderate Isofluran-Narkose die Hb-Addukt-Bildung bzw. Mercaptursäureausscheidung nicht signifikant beeinflusst. Insbesondere deutet die GAMA-Ausscheidung der narkotisierten Gruppe auf eine unveränderte Enzymaktivität von CYP450 2E1 im Hinblick auf den Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid hin, da es sich bei GAMA um den Hauptmetaboliten von Glycidamid handelt. Plate et al. untersuchten den Einfluss von Isofluran auf die Aktivität von CYP450 2E1 in Rattenleber. Dabei wurde bei Wistar-Ratten nach einer Isofluran-Behandlungsdauer von 75 Sekunden ebenfalls keine signifikante Veränderung der CYP450 2E1 Enzymaktivität beobachtet [Plate et al., 2005].

4.4 Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA im Rahmen der Rattenfütterungsstudie

Bei Acrolein handelt es sich um eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, welche in erhitzten Lebensmitteln durch Dehydratisierung von Glycerin, durch Lipidperoxidation sowie bei der thermischen Zersetzung von Aminosäuren und im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet werden kann. Darüber hinaus kann Acrolein endogen durch Myeloperoxidase-vermittelte Oxidation von Threonin und Abbau von Spermin unter Beteiligung von Aminoxydase entstehen. [Stevens und Maier, 2008]

Um die Acrylamid-Exposition der Rattenfütterungsstudie mit der Belastung durch Acrolein zu vergleichen, wurde der Gehalt an *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein (HPMA) im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt, wobei es sich bei HPMA um den Hauptmetaboliten von Acrolein in der Ratte handelt [Parent et al., 1998; Sanduja et al., 1989]. Darüber hinaus wurde HPMA im Urin von Ratten nach Aufnahme von Allylalkohol (2-Propen-1-ol), Allylchlorid (3-Chlorpropen), Allylbromid (3-Brompropen), Allylcyanid (3-Butennitril) und Cyclophosphamid gefunden.

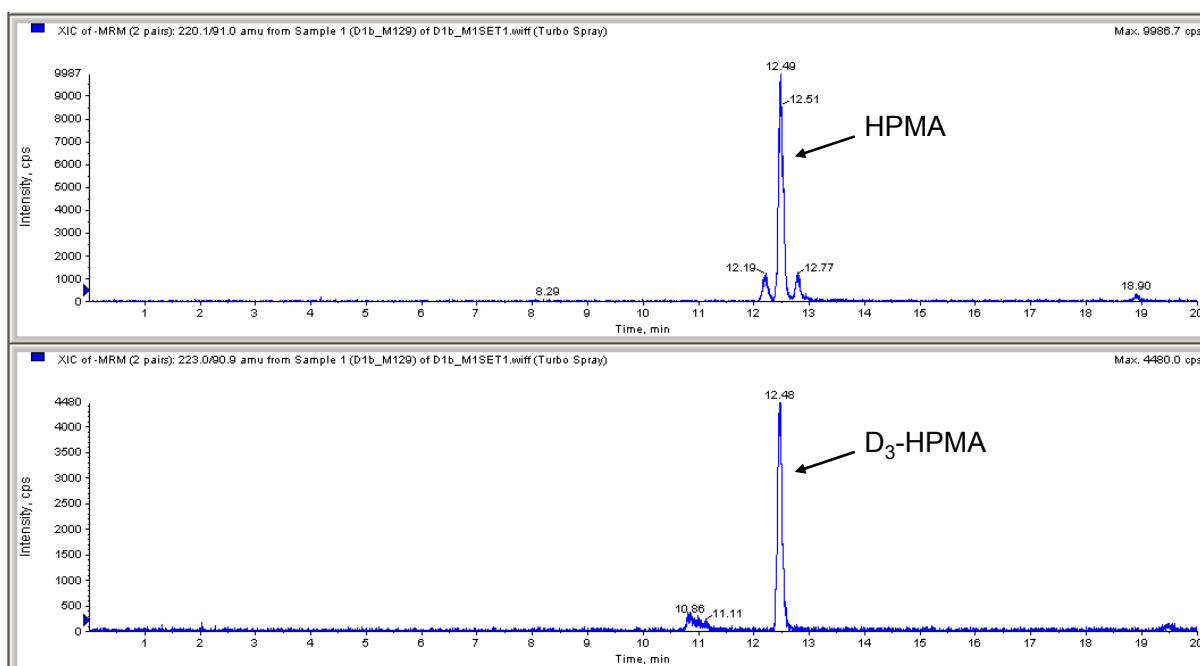


Abb. 4.23: HPLC-MS/MS Chromatogramm zur Bestimmung von HPMA im 24-Stunden-Sammelurin (100 μ g Acrylamid/kg KG über geschnittene Pommes frites (PFG); einmalige Verabreichung)

Abb. 4.23 zeigt ein repräsentatives HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer mit Pommes frites (PFG; 1 Tag) gefütterten Ratte. Der Analyt HPMA weist eine Retentionszeit von 12,5 Minuten auf, welche mit der Retentionszeit des internen Standards D_3 -HPMA übereinstimmt. Die Gesamtausscheidung von HPMA (Abb. 4.24) lag bei den mit Acrylamid behandelten

Tieren (50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d) und Negativkontrollen bei 229 ± 74 nmol (Median: 229; Range: 39-421). Insgesamt wurden bei allen untersuchten Tieren starke individuelle Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet. Dadurch sind zwischen den Gruppen der getesteten Lebensmittel und Negativkontrollen bzw. Expositionsperioden keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

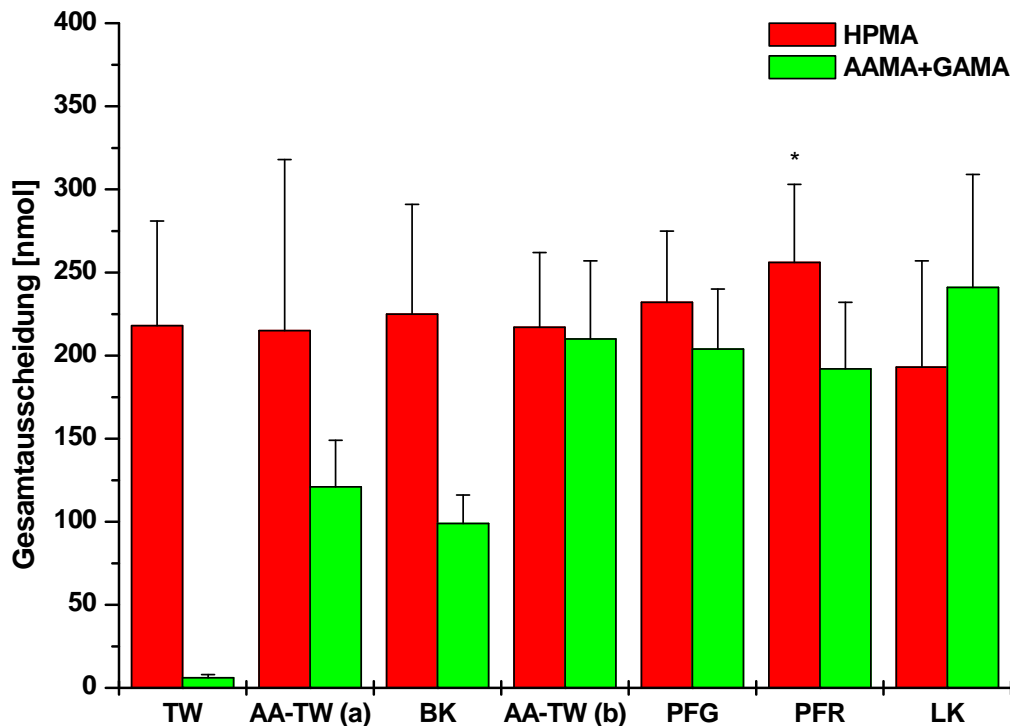


Abb. 4.24: Gesamtausscheidung der Mercaptursäuren von Acrolein (HPMA) sowie Acrylamid (AAMA+GAMA) nach Verabreichung acrylamidreicher Lebensmittel gemittelt über die Expositionsperioden 1, 3, 5, 7 und 9 Tage, TW: Negativkontrolle, AA-TW (a): 50 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser (Schlundsonde), BK: Brotkruste (50 µg Acrylamid/kg KG/d), AA-TW (b): 100 µg Acrylamid/kg KG/d über Trinkwasser (Schlundsonde), PFG: Pommes frites aus der Kartoffel geschnitten; PFR: Pommes frites aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituiert, LK: Lebkuchen (jeweils 100 µg Acrylamid/kg KG/d); Mittelwert \pm SD, 15 Tiere pro Gruppe, *: signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle (* $p < 0,05$)

Lediglich bei Aufnahme von Pommes frites (PFR) wurde unter Berücksichtigung aller Expositionsperioden (1, 3, 5, 7 und 9 Tage) eine signifikant erhöhte Ausscheidung von HPMA im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt ($p < 0,05$). Da weder die Acrolein-Gehalte der Lebensmittel noch die der Standarddiät bekannt waren und auch Unterschiede in der endogenen Bildung von Acrolein bei den jeweiligen Tieren nicht ausgeschlossen werden können, kann keine endgültige Aussage zu den Ergebnissen getroffen werden. Allerdings deuten die HPMA-Gehalte auf einen geringen Beitrag der verabreichten Lebensmittel zur Acrolein-Gesamtexposition unter den Versuchsbedingungen der Fütterungsstudie hin. Bei Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG war die ausgeschiedene Stoffmenge von Acrylamid-Mercaptursäuren (AAMA+GAMA) mit derjenigen

von HPMA vergleichbar, wobei bei den Negativkontrollen um Faktor 20-30 höhere HPMA-Gehalte im Vergleich zu den Acrylamid-Mercaptursäuregehalten bestimmt wurden. Diese Hintergrundbelastung könnte aus Acrolein belasteter Standarddiät sowie der endogenen Bildung von Acrolein resultieren. Darüber hinaus ist eine Exposition über die Atemluft möglich. Aus den Gehalten an HPMA ergibt sich ohne Berücksichtigung sonstiger Acrolein-Metabolite eine mittlere Belastung von $46 \pm 16 \mu\text{g Acrolein/kg KG}$ (Median: 46; Range: 9-147). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die im Rahmen der Tierstudie verwendeten Sprague Dawley-Ratten neben der verabreichten Acrylamid-Dosis auch einer relativ hohen Acrolein-Exposition ausgesetzt sind.

4.5 Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA nach Verabreichung von 0,05-10 mg Acrylamid/kg KG an Ratten

Um den Einfluss relativ hoher Acrylamid-Dosen auf die Konjugation von Acrolein mit Glutathion zu untersuchen, wurden die Gehalte an HPMA nach Verabreichung einer Einzeldosis von bis zu 10 mg Acrylamid/kg KG bestimmt (Abb. 4.25).

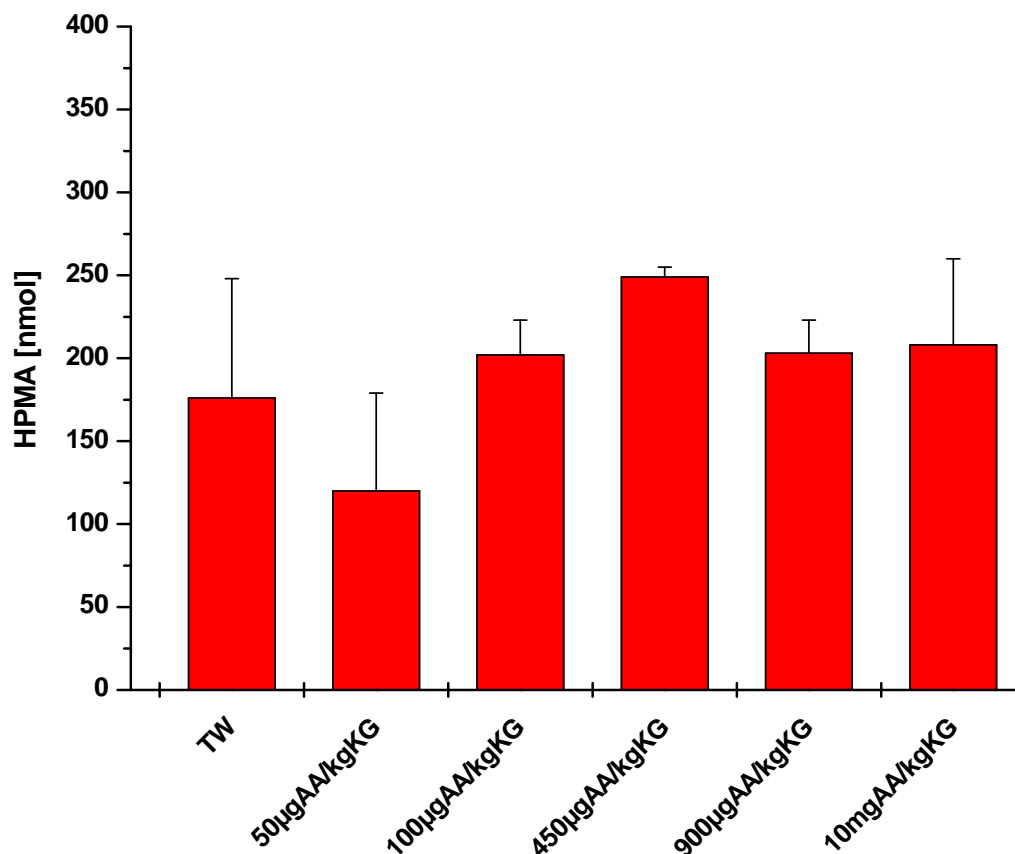


Abb. 4.25: HPMA-Ausscheidung nach einmaliger Verabreichung von Acrylamid-haltigem Trinkwasser mittels Schlundsonde; TW: Negativkontrolle; Mittelwert \pm SD, 3 Tiere pro Gruppe (10 mg Acrylamid/kg KG: 2 Tiere)

Die Gesamtausscheidung von HPMA (Abb. 4.25) lag bei den mit Acrylamid behandelten Tieren und Negativkontrollen bei 188 ± 64 nmol (Median: 193; Range: 40-259). Diese Stoffmenge entspricht unter Ausschluss weiterer Acrolein-Metabolite einer Dosis von 41 ± 14 µg Acrolein/kg KG (Median: 46 µg/kg KG; Range: 9-58 µg/kg KG). Auch in diesem Experiment wurden starke individuelle Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet, was bereits bei den Versuchstieren der Fütterungsstudie diskutiert wurde und möglicherweise auf Unterschiede in der endogenen Bildung von Acrolein sowie unterschiedliche Aufnahmemengen der vermutlich Acrolein-haltigen Standarddiät zurückzuführen ist. Zwischen den Versuchstieren der verschiedenen

Behandlungsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtausscheidung von HPMA zu erkennen. Selbst bei der höchsten Acrylamid-Dosis von 10 mg Acrylamid/kg KG lagen die Gehalte an HPMA im Bereich der unbehandelten Kontrollen (TW), d. h. die mit hohen Acrylamid-Dosen einhergehende GSH-Depletion führt zu keiner verminderten Ausscheidung von HPMA im 24-Stunden-Urin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bei hohen Acrylamid-Dosen beobachteten unveränderten Anteilen der Acrylamid-Mercaptursäuren AAMA und GAMA (Kap. 4.2.2) und verdeutlichen die hohe Effektivität und Kapazität des durch Kopplung mit Glutathion vermittelten Phase II-Metabolismus.

4.6 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse aus den Tierversuchen

Um zu untersuchen, inwieweit spezifische Lebensmittelmatrices die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Acrylamid beeinflussen, wurden Pommes frites (PFG: aus der Kartoffel geschnitten (mit intakter Gewebestruktur); PFR: aus Kartoffelerzeugnissen rekombiniert) sowie Brotkruste (BK) und Lebkuchen (LK) an männliche Sprague Dawley-Ratten über 1-9 Tage verfüttert und mit der Aufnahme von Acrylamid über Trinkwasser (Schlundsondierung, AA-TW) verglichen. Die tägliche Acrylamid-Dosis wurde auf 100 µg/kg KG für Pommes frites und Lebkuchen bzw. 50 µg/kg KG für Brotkruste eingestellt. Bei allen Behandlungsgruppen waren deutliche, nahezu lineare Anstiege der AAVal-Hb-Addukt-Gehalte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und damit der kumulativen Acrylamid-Dosis zu erkennen. Das Ausmaß der AAVal-Bildung in den Tieren, denen Acrylamid über Pommes frites (PFG, PFR) verabreicht wurde, entsprach weitgehend jener nach Gabe einer entsprechenden Dosis Acrylamid in Trinkwasser mittels Schlundsondierung (AA-TW-Gruppen), was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von Acrylamid hindeutet. Bei einer Acrylamid-Resorptionsstudie in Schweinen wurde die Acrylamid-Aufnahme aus kommerziellem Schweinefutter, welches Beimengungen von Kartoffelchips mit definiertem Acrylamid-Gehalt enthielt, mit der Aufnahme aus Trinkwasser verglichen. Dabei wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Bildung von AAVal-Addukten festgestellt [Aureli et al., 2007]. Vikström et al. untersuchten die Acrylamid-Aufnahme über Futter unterschiedlicher Zusammensetzung unter subchronischen Bedingungen im Niedrig-Dosis-Bereich (3-50 µg/kg KG/d) an Mäusen. Dabei wurden anhand der Gehalte an AAVal- und GAVal-Addukten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich zusammengesetzten Futtermitteln festgestellt [Vikström et al., 2008].

Lediglich in den Gruppen, die Acrylamid über Brotkruste erhielten, wurde eine geringfügige, um ca. 15-20 % verminderte Bildung von AAVal-Hb-Addukten im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen beobachtet. Diejenigen Behandlungsgruppen, welche Acrylamid über Lebkuchen erhielten, zeigten nach allen Expositionszeiträumen eine signifikant unterschiedliche AAVal-Hb-Adduktbildung im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen. Für den Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens wurden im Rahmen mehrmals durchgeführter Kontrollmessungen stark unterschiedliche Werte ermittelt (4150 ± 800 µg Acrylamid/kg; Kap. 6.1.1), obwohl die in den jeweiligen Messungen untersuchten Lebkuchen jeweils aus der gleichen Probe stammten und gleich behandelt wurden. Daher wurden in Abhängigkeit von den jeweiligen Analyseergebnissen für die Durchführung der Fütterungsversuche zu den jeweiligen Versuchsabschnitten unterschiedliche Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens zu Grunde gelegt.

Vermutlich reflektieren die AAVal-Messwerte die ungenaue Charakterisierung des Gehaltes an Acrylamid im Lebkuchen, geben aber keinen Anhaltspunkt für Unterschiede in der Bioverfügbarkeit.

Bei den Negativkontrollen (TW-Gruppen) liegen die GAVal-Gehalte 1,4-3,5-fach höher als die entsprechenden AAVal-Gehalte. Vergleichbare Hintergrundgehalte in Ratten wurden von Tareke et al. (GAVal/AAVal: 2-3) sowie von Paulsson et al. (GAVal/AAVal = 1,8) beobachtet [Tareke et al. 2006; Paulsson et al. 2002]. Vermutlich sind die Hintergrundgehalte an AAVal und GAVal auf die Acrylamid-Belastung der Standarddiät (ca. 11 µg Acrylamid/kg) zurückzuführen. Darüber hinaus könnte eine endogene Bildung von Acrylamid einen geringen Beitrag zur Hintergrundexposition leisten. Bei geringen Acrylamid-Konzentrationen könnte die Bindung von Acrylamid an SH-Gruppen überwiegen, da nach dem Hard-Soft-Acid-Base-Konzept nach Pearson die Thiol-Reaktivität von Acrylamid im Vergleich zu Glycidamid größer ist [Ayers et al., 2006]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu AAVal höheren GAVal-Gehalte. Hamdan et al. zeigten, dass nach den SH-Gruppen des Cysteins nicht die freie α -Aminogruppe sondern die ϵ -Aminogruppe des Lysins die nachgeordnet wichtigste Rolle bei der Adduktbildung von Acrylamid mit Proteinen spielt, wodurch die resultierenden Addukt-Gehalte ebenfalls beeinflusst werden könnten [Hamdan et al., 2001].

Die behandelten Tiere zeigen nach den durchgeführten Expositionsperioden keine signifikante Änderung der GAVal-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet auf eine geringe Glycidamid-Blutkonzentration bzw. systemische Verfügbarkeit von Glycidamid hin, wobei der daraus resultierende GAVal-Anstieg mit der verwendeten analytischen Methode vermutlich nicht erfasst werden kann. Diese Vermutung wird durch die im Vergleich zu den entsprechenden Acrylamid-Serumkonzentrationen um den Faktor 10-30 niedrigeren Glycidamid-Serumkonzentrationen (< 0,06 µM) nach Aufnahme von 100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites (PFG) bzw. Acrylamid-haltiges Trinkwasser gestützt (Kap. 4.1.1.4). Lediglich nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG (Kap. 4.2.1) wurde ein signifikanter Anstieg der GAVal-Bildung beobachtet. Das heißt, bei höheren Dosen wird das in der Leber metabolisch aus Acrylamid gebildete Glycidamid als Hb-Addukt in entsprechender Konzentration nachgewiesen. In der niedrigen Dosierung von 9 Tagesdosen (à 100 µg bzw. 50 µg Acrylamid/kg KG), also einer Gesamtdosis von 900 µg Acrylamid/kg KG, bleibt das Glycidamid-Hb-Addukt im Bereich der unbehandelten Kontrolle, während das Acrylamid-Hb-Addukt dosisabhängig ansteigt. Tareke et al. fanden nach oraler Verabreichung (Schlundsondierung) von 100 µg Acrylamid/kg KG an männliche und weibliche F344-Ratten Anstiege der AAVal- und GAVal-Gehalte von 10-20 bzw. 30-90 pmol/g Hb [Tareke et al. 2006]. Ebenfalls höhere GAVal- als AAVal-Anstiege wurden von Törnqvist et al. nach Verabreichung von 100 bzw. 500 µg Acrylamid/kg KG/d über 7 Tage

bestimmt [Törnqvist et al., 2008]. Dabei lagen die AAVal- und GAVal-Gehalte der weiblichen F344-Ratten bei 160 pmol/g Hb und 320 pmol/g Hb (100 µg/kg KG/d; Gesamtdosis 700 µg/kg KG) sowie 680 pmol/g Hb und 1710 pmol/g Hb (500 µg/kg KG/d; Gesamtdosis 3500 µg/kg KG). Allerdings wurde bei dieser Studie die Acrylamid-Dosis nicht mittels Schlundsondierung, sondern über das Trinkwasser verabreicht, was vermutlich eine veränderte Toxikokinetik zur Folge hat. Insbesondere könnte durch die kontinuierliche Aufnahme von Acrylamid im Trinkwasser der Metabolismus zum Glycidamid effektiver verlaufen, woraus höhere GAVal-Addukt-Gehalte resultieren könnten. Im Vergleich dazu bestimmten Fennell et al. bei einer vergleichbaren oralen Gabe (Schlundsondierung) von 3000 µg/kg KG an F344-Ratten höhere AAVal- als GAVal-Anstiege (890 bzw. 750 pmol/g Hb) [Fennell et al., 2005].

Die Anteile der Mercaptursäuren an der verabreichten täglichen Dosis lagen über alle Behandlungsgruppen und Expositionsperioden gemittelt bei 36 ± 10 % für AAMA und 18 ± 4 % für GAMA, wobei im Hinblick auf die Gesamtausscheidung keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Expositionsdauer erkennbar waren. Vergleichbare prozentuale Anteile der Mercaptursäuren (AAMA + GAMA) nach oraler Verabreichung von 0,1-50 mg/kg KG an Ratten über Trinkwasser wurden von Doerge et al. (59 %), Fennell et al. (50 %) und Sumner et al. (46 %, 54 %) beobachtet [Doerge et al., 2007; Fennell et al., 2005; Sumner et al., 1992; 2003].

Nach Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites wurde kein signifikanter Unterschied in der Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren im Vergleich zur Gabe in Trinkwasser mittels Schlundsondierung (AA-TW-Gruppen) beobachtet, was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von Acrylamid hindeutet.

Bei den mit Brotkruste behandelten Tieren wurde eine im Vergleich zu AA-TW-Gruppen geringfügig erniedrigte Ausscheidung an AAMA beobachtet, was im Einklang mit der erniedrigten AA-Val-Bildung steht. Doerge et al. untersuchten die Aufnahme von 100 µg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten nach intravenöser im Vergleich zu oraler Verabreichung. Bei Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung betrug die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur intravenösen Verabreichung 32-44 %, was auf einen ausgeprägten Einfluss durch die Lebensmittelmatrix schließen lässt [Doerge et al., 2005]. Allerdings ist bei dieser Studie zu beachten, dass die Acrylamid-Gehalte im Futter durch Zusatz von Acrylamid-Lösungen generiert wurden. Dabei könnte die Reaktion von Futterinhaltsstoffen mit dem zugesetzten Acrylamid zu einer Verminderung der freien Acrylamid-Gehalte führen, wodurch sich die resorbierbare Gesamtmenge bei Einstellung einer bestimmten Dosis verringern würde. In der vorliegenden Arbeit wurden Lebensmittel verwendet, in denen der Acrylamid-Gehalt bei der Herstellung generiert wurde, so dass es sich bei den Analyseergebnissen um den tatsächlich vorhandenen Gehalt an freiem, resorbierbarem Acrylamid handelt.

Nach Aufnahme von Acrylamid über Lebkuchen wurden nach allen Expositionsperioden Unterschiede in der Mercaptursäure-Ausscheidung im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen festgestellt, was vermutlich die ungenaue Charakterisierung des Acrylamid-Gehalts im Lebkuchen reflektiert und die Ergebnisse bei den AAVaI-Hb-Addukten widerspiegelt.

Nach Exposition mit Acrylamid über Pommes frites und Brotkruste konnte eine Veränderung des Mercaptursäure-Verhältnisses GAMA/AAMA hin zu einer verstärkten Bildung von GAMA im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen gezeigt werden. Die höheren GAMA/AAMA-Verhältnisse bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites und Brotkruste könnten auf eine verzögerte Freisetzung von Acrylamid aus der Lebensmittelmatrix bzw. Resorption im Gastrointestinaltrakt zurückgeführt werden. Dadurch könnte einerseits die maximal erreichbare Konzentration von Acrylamid im Blut im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde) geringer werden, andererseits könnte diese Acrylamid-Konzentration über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden, wodurch die metabolische Umwandlung von Acrylamid zu Glycidamid effektiver sein könnte. Bei der erstmaligen Gabe der Acrylamid-Dosis wurden im Vergleich zur wiederholten Verabreichung die höchsten GAMA/AAMA-Verhältnisse beobachtet, was auf adaptive Effekte hindeuten könnte.

Für die Ermittlung der Gesamtbilanz an Acrylamid-Ausscheidung aus dem Organismus wurde die Acrylamid- und Glycidamid-Ausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Die ausgeschiedenen Anteile an der verabreichten Tagesdosis lagen über die Behandlungsgruppen und Expositionsperioden gemittelt bei $3,1 \pm 2,4$ % für Acrylamid und $2,4 \pm 1,3$ % für Glycidamid. Zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Acrylamid- bzw. Glycidamid-Ausscheidung beobachtet, wobei innerhalb der AA-TW-Gruppen tendenziell mehr Acrylamid über den Urin ausgeschieden wurde. Diese Beobachtung könnte auf die in Kap. 4.1.1.4 diskutierten höheren Acrylamid-Serumkonzentrationen bei Verabreichung von Acrylamid über Trinkwasser zurückgeführt werden. Allerdings führt die tendenziell höhere Ausscheidung von Acrylamid zu keiner signifikant veränderten Gesamtausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA, da die mittleren Anteile an freiem Acrylamid und Glycidamid im Urin meist unter 10 % der verabreichten Dosis liegen und damit einen geringen Anteil zur Gesamtausscheidung von Acrylamid leisten. Darüber hinaus wurden nach einmaliger Verabreichung von Acrylamid tendenziell höhere Glycidamid-Gehalte im Urin festgestellt, wobei die beobachteten Unterschiede weniger als 1 % der verabreichten Dosis betragen.

Die bei den Brotkruste-Gruppen beobachteten reduzierten AAVaI- und AAMA-Gehalte korrelieren nicht mit der Ausscheidung von Acrylamid oder Glycidamid über den Urin. Im Rahmen früherer Arbeiten im Arbeitskreis wurden die Gehalte an freiem Acrylamid und Glycidamid in den Fäces der behandelten Tiere bestimmt [Gerhardt, 2008]. Dabei konnte in

keiner der untersuchten Proben Glycidamid nachgewiesen werden. Bei den Fütterungsversuchen mit Pommes frites und Lebkuchen lagen die Acrylamid-Gehalte bei 53 % der Proben unter der Nachweisgrenze. Bei den übrigen Tieren lagen die mittleren Dosis-Anteile von freiem Acrylamid bei 1,1 % (Pommes frites) und 1,2 % (Lebkuchen). Bei Verabreichung von Brotkruste konnte in nahezu allen Fäces-Proben Acrylamid nachgewiesen werden, wobei die mittleren Anteile an der verabreichten Dosis mit 3,4 % tendenziell höher als bei Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites bzw. Lebkuchen lagen. Allerdings wurden auch in den Fäces-Proben von Negativkontrollen relativ hohe Acrylamid-Gehalte gemessen, so dass keine endgültige Aussage über die tatsächlich über Fäces ausgeschiedene Menge an Acrylamid bei Aufnahme über die Lebensmittel getroffen werden kann.

Zum Vergleich der Toxikokinetik von Acrylamid bei wiederholter Verabreichung (50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d für maximal 9 Tage) mit derjenigen nach Gabe der entsprechenden kumulativen Einzeldosis wurden 450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser mittels Schlundsondierung an Sprague Dawley-Ratten verabreicht. Darüber hinaus wurde zur Untersuchung der Acrylamid-Toxikokinetik im Hochdosisbereich eine Dosis von 10 mg Acrylamid/kg KG verabreicht. Dabei konnten bei den behandelten Tieren nahezu lineare Anstiege der AAVal-Hb-Addukte in Abhängigkeit von der verabreichten Acrylamid-Dosis beobachtet werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das Ausmaß der AAVal-Bildung lediglich von der resultierenden Gesamtdosis abhängig ist, was auf eine Kumulation der Hb-Addukte als Langzeitbiomarker der inneren Exposition zurückzuführen ist. Aufgrund der im Vergleich zur Lebensdauer der Erythrocyten (ca. 60-90 Tage bei der Ratte) relativ kurzen Expositionszeit von maximal 9 Tagen sind die ermittelten AAVal-Gehalte nach wiederholter Exposition mit 50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d mit der Verabreichung der kumulativen Dosis von 450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG vergleichbar. Die behandelten Tiere zeigen nach Gabe einer Einzeldosis von 0,45 bzw. 0,9 mg Acrylamid/kg KG keine signifikante Änderung der GAVal-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG wurde ein signifikanter Anstieg der GAVal-Addukte im Vergleich zu den Negativkontrollen beobachtet.

Die über den Urin ausgeschiedenen Anteile von AAMA, GAMA sowie freiem Acrylamid und Glycidamid an der verabreichten Dosis von 0,45-10 mg Acrylamid/kg KG waren mit den Ergebnissen nach einmaliger bzw. wiederholter Gabe von 50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d vergleichbar. Doerge et al. ermittelten nach oraler Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten Dosisanteile von 31 % für AAMA und 28 % für GAMA [Doerge et al., 2007]. In der Veröffentlichung von Fennell et al. lagen die Dosisanteile von AAMA und GAMA nach Gabe von 3 mg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten bei 29 bzw.

21 % [Fennell et al., 2005]. Sumner et al. beobachteten nach oraler Gabe von 50 mg Acrylamid/kg KG an F344-Ratten Dosisanteile von 42 % für AAMA und 12 % für GAMA [Sumner et al., 2003]. Diese Daten lassen vermuten, dass der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid in der Ratte sättigbar ist, da mit zunehmender Dosis die Ausscheidung an GAMA als Biomarker für die Bildung von Glycidamid abnimmt, wobei die Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren auf vergleichbarem Niveau bleibt [Doerge et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein derartiger Effekt im Dosisbereich von 0,05 – 10 mg Acrylamid/kg KG nicht beobachtet.

Zur Untersuchung der Resorptionskinetik von Acrylamid bei Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG über Pommes frites im Vergleich zur Aufnahme in Trinkwasser (Schlundsondierung) (Kap. 4.1.1.4) wurden in der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von 4 Stunden die Acrylamid- und Glycidamid-Gehalte in Rattenserum bestimmt. Dabei lag die maximale Acrylamid-Serumkonzentration bei Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde) etwa um den Faktor 3-4 höher als bei Acrylamid-Gabe über Pommes frites. Die nach Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites gemessenen geringeren Acrylamid-Serumgehalte deuten auf eine verzögerte Freisetzung von Acrylamid aus Lebensmitteln bzw. verlangsamte Resorption im Gastrointestinaltrakt im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser hin. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Verschiebung des Mercaptursäure-Verhältnisses GAMA/AAMA zu Gunsten von GAMA (Kap. 4.1.1.2) bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites, da bei einer verzögerten Resorption der Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid effektiver sein könnte. Glycidamid konnte bei den behandelten Gruppen lediglich 4 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme nachgewiesen werden, wobei die gemessenen Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode zur Bestimmung von Glycidamid in Rattenserum lagen. Die bei Acrylamid-Aufnahme über Pommes frites im Vergleich zur AA-TW-Gruppe anhand des Biomarkers GAMA beobachtete tendenziell erhöhte Bildung von Glycidamid wird durch die Glycidamid-Serumgehalte nicht widerspiegelt, da der überwiegende Teil des in der Leber gebildeten Glycidamids vermutlich unmittelbar mit GSH gekoppelt wird. Darüber hinaus lag auch die in Kap. 4.1.1.3 beschriebene Glycidamid-Ausscheidung über den Urin bei einmaliger Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser (AA-TW) bzw. Pommes frites (PFG) mit einem Anteil von ca. 3 % der gegebenen Dosis auf vergleichbarem Niveau. Für eine effiziente Entgiftung des metabolisch gebildeten Glycidamid spricht auch die Tatsache, dass mit der im Arbeitskreis etablierten Methode des Comet Assay nach FPG-Behandlung keine signifikanten DNA-Schäden im Blut und in der Leber der behandelten Tiere detektiert wurden [Feld, persönliche Mitteilung].

Da die Entnahme von Serumproben nur bis zu einem Zeitraum von 4 Stunden nach Acrylamid-Aufnahme erfolgte und Glycidamid lediglich nach 4 Stunden detektiert werden konnte, wäre in Anbetracht der vorhandenen Acrylamid-Serumkonzentration ein weiterer Anstieg der Glycidamid-Serumkonzentration denkbar. Doerge et al. untersuchten die Resorptionskinetik von Acrylamid an F344-Ratten über einen Zeitraum von 10-12 Stunden nach Verabreichung von 100 µg/kg KG i.v. bzw. mittels Schlundsondierung sowie Gabe von Acrylamid-dotierter Standarddiät [Doerge et al., 2005]. Dabei wurde in den untersuchten Behandlungsgruppen die maximale Glycidamid-Serumkonzentration bereits 2-4 Stunden nach der Acrylamid-Verabreichung beobachtet, so dass die Wahrscheinlichkeit für einen wesentlichen Anstieg der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Glycidamid-Serumkonzentrationen über den Zeitraum von 4 Stunden hinaus als gering einzuschätzen ist.

In der Studie von Doerge et al. wurden nach oraler Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten die maximalen Acrylamid-Serumkonzentrationen nach 1-2 Stunden erreicht und lagen bei ca. 0,4 bzw. 0,3 µM für die Gabe mittels Schlundsonde bzw. Acrylamid-dotierter Standarddiät [Doerge et al., 2005]. Diese maximalen Acrylamid-Serumgehalte liegen insbesondere bei Verabreichung mittels Schlundsonde (Faktor: ~ 4) unter den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrationen. Allerdings liegen die maximalen Glycidamid-Serumkonzentrationen (ca. 0,2 µM) über den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen (< 0,06 µM). Weiterhin wurden von Doerge et al. nach oraler Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG an männliche F344-Ratten höhere GAMA- (27-29 % der verabreichten Dosis) sowie höhere Glycidamid-Gehalte (6 % der verabreichten Dosis) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit (GAMA: 18 ± 4 %; GA: 2,4 ± 1,3 %) berichtet [Doerge et al., 2007]. Tareke et al. untersuchten die Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Adduktbildung nach Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG per Schlundsonde an männlichen F344-Ratten [Tareke et al., 2006]. Dabei wurde ein Anstieg von GAVal um 20-30 pmol/g Hb berichtet, während sich die AAVal-Gehalte lediglich um ca. 10 pmol/g Hb erhöhten. Darüber hinaus beobachteten die Autoren bei der Inkubation von Rattenlebermikrosomen mit Acrylamid Unterschiede in der Geschwindigkeit der Glycidamid-Bildung, wobei die Geschwindigkeitskonstante bei F344-Ratten mit 12 pmol/min/mg Protein um mehr als 80 % höher lag als diejenige von Sprague-Dawley-Ratten (7 pmol/min/mg Protein). In der vorliegenden Arbeit stiegen die AAVal-Gehalte nach einmaliger Verabreichung von 100 µg Acrylamid/kg KG an männliche Sprague Dawley Ratten mittels Schlundsonde um ca. 30 pmol/g Hb an, während sich die GAVal-Adduktgehalte nicht signifikant veränderten. Die zitierten Studien deuten auf Unterschiede in der Toxikokinetik von Acrylamid in F344-Ratten im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sprague Dawley-Ratten hin. Darüber hinaus muss berücksichtigt

werden, dass die Körpergewichte der F344-Ratten (ca. 150 g) in diesen Studien weit unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sprague Dawley Ratten (ca. 280 g) lagen, was ebenfalls die Toxikokinetik von Acrylamid beeinflussen könnte.

Um den Einfluss des Narkotisierungsmittels Isofluran auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Acrylamid-Biomarker (Hb-Addukte und Mercaptursäuren) in den behandelten Tieren zu untersuchen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 100 µg Acrylamid/kg KG/d mittels Schlundsonde verabreicht. Bei zwei Versuchstieren wurden die jeweiligen Schlundsondierungen nach leichter Isofluran-Narkose durchgeführt, die beiden anderen Tiere wurden ohne Narkotisierung behandelt. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse bei den Hb-Addukten und Mercaptursäuren, dass die unter den Versuchsbedingungen der Fütterungsstudie durchgeführte moderate Isofluran-Narkose die Hb-Addukt-Bildung bzw. Mercaptursäureausscheidung nicht signifikant beeinflusst. Insbesondere deutet die GAMA-Ausscheidung der narkotisierten Gruppe auf eine unveränderte Enzymaktivität von CYP450 2E1 im Hinblick auf den Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid hin, da es sich bei GAMA um den Hauptmetaboliten von Glycidamid handelt. Plate et al. untersuchten den Einfluss von Isofluran auf die Aktivität von CYP450 2E1 in Rattenleber. Dabei wurde bei Wistar-Ratten nach einer Isofluran-Behandlungsdauer von 75 Sekunden ebenfalls keine signifikante Veränderung der CYP450 2E1 Enzymaktivität beobachtet [Plate et al., 2005].

Bei Acrolein handelt es sich um eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, welche in erhitzten Lebensmitteln durch Dehydratisierung von Glycerin, durch Lipidperoxidation sowie bei der thermischen Zersetzung von Aminosäuren und im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet werden kann. Darüber hinaus kann Acrolein endogen durch Myeloperoxidase-vermittelte Oxidation von Threonin und Abbau von Spermin unter Beteiligung von Aminooxidase entstehen. [Stevens und Maier, 2008]

Um die Acrylamid-Exposition der Versuchstiere mit derjenigen von Acrolein zu vergleichen, wurde der Gehalt an *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein (HPMA) im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt, wobei es sich bei HPMA um den Hauptmetaboliten von Acrolein handelt. Dabei konnte über den Gehalt an HPMA im Urin der Tiere eine theoretische mittlere Belastung von 46 ± 16 µg Acrolein/kg KG berechnet werden. Insgesamt wurden bei den untersuchten Tieren große individuelle Unterschiede sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet. Dadurch sind zwischen den Gruppen der getesteten Lebensmittel und Negativkontrollen bzw. Expositionsperioden keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Lediglich bei Aufnahme von Pommes frites (PFR) wurde unter Berücksichtigung aller Expositionsperioden (1, 3, 5, 7 und 9 Tage) eine signifikant erhöhte

Ausscheidung von HPMA im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt ($p < 0,05$). Da weder die Acrolein-Gehalte der Lebensmittel noch die der Standarddiät bekannt waren und auch Unterschiede in der endogenen Bildung von Acrolein bei den jeweiligen Tieren nicht ausgeschlossen werden können, kann keine endgültige Aussage zu den Ergebnissen getroffen werden. Allerdings deuten die HPMA-Gehalte auf einen geringen Beitrag der verabreichten Lebensmittel zur Acrolein-Gesamtexposition unter den Versuchsbedingungen der Fütterungsstudie hin.

In den Tieren, denen die höchste Acrylamid-Dosis (10 mg Acrylamid/kg KG) verabreicht wurde, lagen die Gehalte an HPMA im Bereich der unbehandelten Kontrollen, d. h. die mit hohen Acrylamid-Dosen einhergehende GSH-Depletion führt zu keiner verminderten Ausscheidung von HPMA im 24-Stunden-Urin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bei hohen Acrylamid-Dosen beobachteten nahezu unveränderten Anteilen der Acrylamid-Mercaptursäuren AAMA und GAMA (Kap. 4.2.2) und verdeutlichen die hohe Effektivität und Kapazität des durch Kopplung an Glutathion vermittelten Phase II-Metabolismus. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die im Rahmen der Tierstudie verwendeten Sprague Dawley-Ratten neben der verabreichten Acrylamid-Dosis auch einer relativ hohen Acrolein-Exposition ausgesetzt sind.

4.7 Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid im Blut der Allgemeinbevölkerung mittels GC-MS

Die Bestimmung der Hb-Addukte von Acrylamid und Glycidamid wurde bei 8 Probanden (6 Nichtraucher, 2 Raucher) nach modifiziertem Edman-Abbau mittels GC-MS durchgeführt. Bei den Nicht-Rauchern lagen die AAVal- bzw. GAVal-Gehalte bei $40,1 \pm 5,4$ bzw. $23,8 \pm 7,1$ pmol/g Hb. In der Literatur sind vergleichbare AAVal- bzw. GAVal-Adduktgehalte bei Nichtrauchern von 27 ± 6 bzw. 26 ± 6 pmol/g Hb sowie 19 ± 7 bzw. 17 ± 4 pmol/g Hb beschrieben [Paulsson et al., 2003; Schettgen et al., 2004].

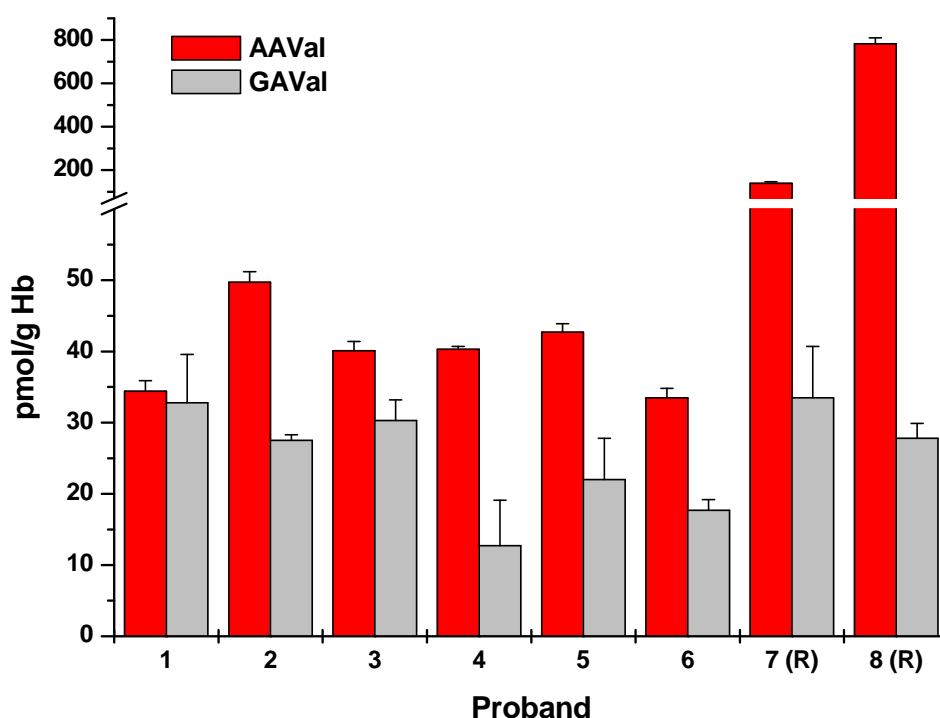


Abb. 4.26: Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin im Blut der Allgemeinbevölkerung (GC-MS). Probanden 1-6: Nichtraucher; Probanden 7 und 8: Raucher; Mittelwert \pm SD, $n = 3$

Bei den Rauchern wurden deutlich höhere AAVal-Gehalte gemessen, wobei Proband 8 mit 782 pmol/g Hb eine besonders hohe Belastung mit Acrylamid aufweist. Bei diesem Probanden wurden im Einklang mit den hohen AAVal-Adduktgehalten ebenfalls stark erhöhte Gehalte der Acrylamid-Mercaptursäuren (AAMA + GAMA) im Urin festgestellt (Kap. 4.8, Proband 6). Darüber hinaus lag auch der Gehalt des Acrolein-Metaboliten HPMA etwa um den Faktor 5 höher als bei den restlichen Probanden (Kap. 4.9, Proband 6). In der Literatur sind für einzelne Probanden ebenfalls hohe AAVal-Gehalte beschrieben. Vesper et al. ermittelten bei einem Probanden einen AAVal-Gehalt von 453 pmol/g Hb [Vesper et al., 2006]. Fennell et al. fanden Messwerte von bis zu 986 pmol/g Hb [Fennell et al., 2005].

Scherer et al. bestimmten bei Rauchern AAVal-Gehalte von 84 ± 42 pmol/g Hb [Scherer et al., 2007]. Im Gegensatz zu den AAVal-Addukten sind die GAVal-Gehalte bei den Rauchern (27,8-33,5 pmol/g Hb) mit den entsprechenden Gehalten bei Nichtrauchern vergleichbar. Da mit steigender Acrylamid-Exposition auch eine höhere Glycidamid Bildung einhergeht, wäre auch ein Anstieg der GAVal-Gehalte zu erwarten. Schettgen et al. fanden bei Rauchern sowohl tendenziell höhere AAVal- (80 ± 48 pmol/g Hb) als auch GAVal- (53 ± 30 pmol/g Hb) Gehalte im Vergleich zu Nichtrauchern (27 ± 6 bzw. 26 ± 6 pmol/g Hb), wobei relativ große individuelle Schwankungen beobachtet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei lediglich 2 Rauchern die Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte bestimmt, wodurch die statistische Aussagekraft der ermittelten Werte begrenzt ist. Darüber hinaus könnte aus dem sowohl inhalativen als auch oralen Expositionsweg der Raucher eine geringere Glycidamid-Bildung resultieren, da bei ausschließlich oraler Exposition durch den First-Pass-Effekt in der Leber möglicherweise mehr Glycidamid gebildet werden könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch die in Kap. 4.8 beobachteten niedrigeren GAMA/AAMA-Verhältnisse bei Rauchern. Die gemessenen Gehalte an AAVal sind sowohl bei den Nichtrauchern als auch bei den Rauchern größer als die entsprechenden Gehalte von GAVal. Das Verhältnis GAVal/AAVal beträgt 0,32-0,95 bei den Nichtrauchern sowie 0,04-0,24 bei den Rauchern und unterliegt damit relativ großen individuellen Schwankungen. Vesper et al. ermittelten GAVal/AAVal-Verhältnisse mit einem ebenfalls hohen Schwankungsbereich von 0,33-3,12 [Vesper et al., 2006].

4.8 Bestimmung der Acrylamid-Mercaptursäuren im Urin von Probanden aus der Allgemeinbevölkerung

Die Bestimmung der Acrylamid- (AAMA) und Glycidamid-Mercaptursäurekonzentration (GAMA) im Urin erfolgte bei 10 Probanden (5 Nichtraucher; 5 Raucher; Alter: 23-54 Jahre) mittels des API 3200 HPLC-MS/MS Systems. Die AAMA-Konzentration der Nichtraucher lag bei 263 ± 136 nM (Range: 74-465 nM), diejenige der Raucher bei 2138 ± 2665 nM (Range: 480-7447 nM). Die GAMA-Konzentration wurde mit 56 ± 27 nM (Range: 16-101 nM) bei Nichtrauchern und 315 ± 396 nM (Range: 85-1107 nM) bei Rauchern bestimmt.

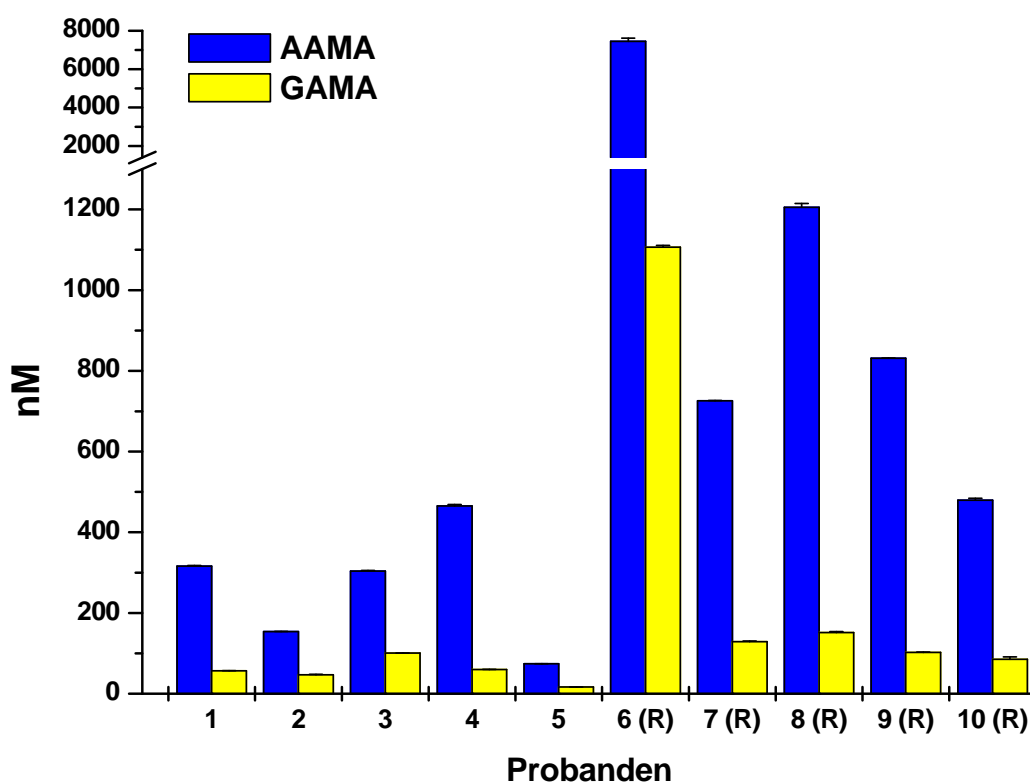


Abb. 4.27: Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid (AAMA) und Glycidamid (GAMA) im Urin der Allgemeinbevölkerung (HPLC-MS/MS). Probanden 1-5: Nichtraucher; Probanden 6-10: Raucher; Mittelwert \pm SD, n = 2

Boettcher et al. ermittelten vergleichbare AAMA- bzw. GAMA-Konzentrationen von 542 nM (Range: 73-1443 nM) bzw. 76 nM (Range: 12-180 nM) bei Rauchern und 124 nM (Range: 13-354 nM) bzw. 20 nM (Range: ND-56 nM) bei Nichtrauchern [Boettcher et al., 2005b]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Urban et al. gezeigt, die die Mercaptursäure-Konzentration im Urin von jeweils 60 Rauchern und Nichtrauchern bestimmten. Dabei lagen die Gehalte von AAMA bzw. GAMA bei 793 ± 460 nM bzw. 110 ± 80 nM bei den Rauchern und 312 ± 199 nM bzw. 64 ± 52 nM bei den Nichtrauchern [Urban et al., 2006]. Schettgen et al.

fanden ebenfalls vergleichbare mittlere AAMA Konzentrationen von 1036 nM (Range: 129-1908 nM) bei Rauchern und 225 nM (Range: 54-729 nM) bei Nichtrauchern [Schettgen et al. 2008]. Insbesondere bei Proband 6 wurden im Vergleich zu den anderen Probanden stark erhöhte AAMA und GAMA Konzentrationen ermittelt, was auf eine hohe Acrylamid-Belastung schließen lässt. Im Einklang mit der erhöhten Mercaptursäureausscheidung wurde bei diesem Probanden auch ein hoher Gehalt an AAVal-Addukten und des Acrolein-Metaboliten HPMA festgestellt. Nach eigenen Angaben handelt es sich bei Proband 6 um einen sehr starken Raucher. Insgesamt zeigen die gemessenen Mercaptursäuregehalte relativ große individuelle Schwankungen sowohl bei den Rauchern als auch bei den Nichtrauchern. Diese Beobachtung könnte sowohl auf Unterschiede in der individuellen Acrylamid-Belastung als auch der Harnproduktion zurückgeführt werden. Dennoch lässt sich bei den Rauchern unter Ausschluss des offensichtlich überdurchschnittlich belasteten Probanden 6 eine signifikant erhöhte Ausscheidung von AAMA (811 ± 261 nM, $p < 0,01$) und GAMA (117 ± 25 nM, $p < 0,05$) im Vergleich zu den Nichtrauchern feststellen. Darüber hinaus führt die erhöhte Acrylamid-Exposition der Raucher zu einer im Vergleich zu Nichtrauchern etwa 3-fach höheren AAMA-Konzentration, während die GAMA-Konzentration lediglich um den Faktor 2 höher liegt. Die GAMA/AAMA Verhältnisse liegen dadurch bei Nichtrauchern ($0,23 \pm 0,08$) tendenziell höher als bei Rauchern ($0,15 \pm 0,02$). Vergleichbare GAMA/AAMA-Verhältnisse wurden von Boettcher et al. (Nichtraucher: 0,22; Raucher: 0,15) beobachtet [Boettcher et al., 2005b]. Für die Aufnahme von Acrylamid ist bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern neben dem oralen der inhalative Expositionsweg von wesentlicher Bedeutung. Bei ausschließlich oraler Aufnahme von Acrylamid könnte im Vergleich zur inhalativen Exposition bedingt durch den First-Pass-Effekt in der Leber mehr Glycidamid gebildet werden, was im weiteren Verlauf zu einer höheren GAMA- und geringeren AAMA-Ausscheidung führt. Bei oraler und gleichzeitig inhalativer Aufnahme könnte der oxidative Metabolismus vermindert sein, was eine höhere AAMA- und geringere GAMA-Ausscheidung zur Folge hätte. Dadurch könnten die bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern beobachteten niedrigeren GAMA/AAMA-Verhältnisse erklärt werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch die bei Rauchern stark erhöhten Gehalte an AAVal-Hb-Addukten, während bei den GAVal-Gehalten kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Nichtrauchern beobachtet wurde (Kap. 4.7).

Heudorf et al. untersuchten die Gehalte an AAMA und GAMA in Urinproben von 5-6-jährigen Kindern ($n = 110$). Dabei wurde eine mittlere AAMA-Konzentration von 154 nM (95. Perzentil: 653 nM) und GAMA-Konzentration von 54 nM (95. Perzentil: 223 nM) gefunden. Daraus wurde eine mittlere Acrylamid-Aufnahme von $0,54 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ (95. Perzentil: $1,91 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) abgeleitet, welche die mittlere Aufnahme beim Erwachsenen etwa um 50 % übersteigt [Heudorf et al., 2009]. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Mercaptursäurekonzentrationen bei den Nichtrauchern deutet

ebenfalls auf eine erhöhte Exposition mit Acrylamid und einen effektiveren Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid bei Kindern im Vergleich zum Erwachsenen hin. Auch Hartmann et al. beobachteten in der Altersgruppe der 5-10 Jährigen signifikant erhöhte GAMA/AAMA Verhältnisse im Vergleich zu Erwachsenen [Hartmann et al., 2008].

4.9 Bestimmung des Acrolein-Metaboliten HPMA in Urinproben der Allgemeinbevölkerung

Der Gehalt an HPMA wurde im Urin von 10 Probanden (5 Nichtraucher; 5 Raucher; Alter: 23-54 Jahre) mittels des API 2000 HPLC-MS/MS Systems bestimmt. Dabei handelte es sich um die Urinproben aus der Acrylamid-Mercaptursäurebestimmung (Kap. 4.8).

Die HPMA-Konzentration der Nichtraucher lag bei $3,12 \pm 1,81 \mu\text{M}$ (Range: 0,57-5,72 μM), diejenige der Raucher bei $16,57 \pm 16,32 \mu\text{M}$ (Range: 5,25-48,75 μM).

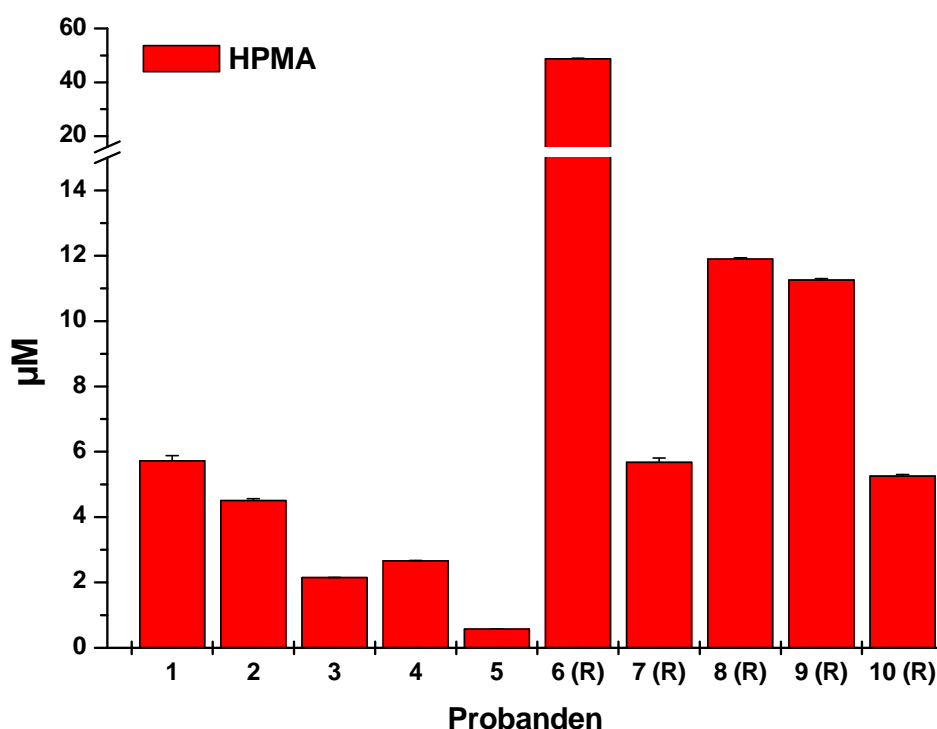


Abb. 4.28: Bestimmung von HPMA im Urin der Allgemeinbevölkerung (HPLC-MS/MS). Probanden 1-5: Nichtraucher; Probanden 6-10: Raucher; Mittelwert \pm SD, n=2

Schettgen et al. fanden vergleichbare mittlere HPMA Konzentrationen von $7,60 \mu\text{M}$ (Range: 0,60-24,15 μM) bei Rauchern (n=14) und $0,70 \mu\text{M}$ (Range: 0,17-3,30 μM) bei Nichtrauchern [Schettgen et al., 2008]. Proband 6 zeigt im Vergleich zu den anderen Rauchern um Faktor 5-10 höhere HPMA-Gehalte. In Verbindung mit den ebenfalls stark erhöhten Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuregehalten ist dies ein weiteres Indiz für den nach eigenen Angaben hohen Zigarettenkonsum dieses Probanden. Eine Zigarette enthält durchschnittlich

1-2 µg Acrylamid und 118 µg Acrolein, wodurch das Rauchen einen wesentlichen Beitrag sowohl zur Acrylamid- und vor allem zur Acrolein-Exposition leisten kann [Smith et al., 2000; Stevens und Maier, 2008]. Insgesamt zeigen die gemessenen HPMA-Gehalte relativ große individuelle Schwankungen sowohl bei den Rauchern als auch bei den Nichtrauchern, was bereits bei den Acrylamid-Mercaptursäuren beobachtet wurde. Dies ist möglicherweise sowohl auf Unterschiede in der individuellen Acrolein-Belastung als auch der Harnproduktion zurückzuführen. Bei den Rauchern lässt sich unter Ausschluss von Proband 6 eine signifikant erhöhte Ausscheidung von HPMA ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Nichtrauchern feststellen, was vermutlich auf die hohen Acrolein-Gehalte im Hauptstromrauch von Zigaretten zurückzuführen ist. Allerdings zeigen auch die Nichtraucher relativ hohe Konzentrationen an HPMA im Urin, welche etwa um den Faktor 10 höher liegen als die Summe der entsprechenden Acrylamid-Mercaptursäuren AAMA und GAMA. Für Nichtraucher kommt neben der Exposition über Lebensmittel und einer endogenen Bildung die Atmosphäre als eine weitere wichtige Expositionsquelle für Acrolein in Betracht. Der Acrolein-Gehalt in der Atmosphäre beträgt 8-25 µg/m³ [EPA, 2003]. Beim Menschen liegt das mittlere Atemvolumen bei 20 m³/24 h [ECHA, 2008]. Daher ergibt sich bei Annahme einer vollständigen Resorption eine tägliche Aufnahme von mindestens 160 µg Acrolein.

Insgesamt deuten die Gehalte an HPMA darauf hin, dass die Allgemeinbevölkerung einer relativ hohen Belastung mit Acrolein ausgesetzt ist. Die Exposition gegenüber Acrolein scheint die Belastung mit Acrylamid bei weitem zu übertreffen. Bei Acrolein handelt es sich um das stärkste Elektrophil unter den α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, welches im Gegensatz zu Acrylamid ohne metabolische Aktivierung DNA-Addukte bildet [Witz et al., 1987; Wang et al., 2008]. Darüber hinaus verläuft der oxidative Metabolismus von Acrolein ähnlich wie bei Acrylamid über die Bildung hochreaktiver Epoxide [Parent et al., 1998]. Generell handelt es sich bei α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen um besonders reaktionsfähige Substanzen, welche einerseits leicht mit Proteinen und DNA reagieren, was zu zytotoxischen und genotoxischen Wirkungen führen kann, andererseits jedoch schnell und effektiv durch Bindung an Glutathion detoxifiziert werden [SKLM, 2006].

4.10 Etablierung einer HPLC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid im Blut der Allgemeinbevölkerung

Die Chromatogramme in Kap. 4.1.1.1 zur Messung der Hb-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mittels GC-MS verdeutlichen, dass insbesondere die Bestimmung der Glycidamid-Hb-Addukte Probleme bereitet, da einerseits nach Derivatisierung mit PFPITC die entstandenen PFPTHs als Diastereomere vorliegen und daher als Doppelpeak detektiert werden, andererseits die gemessenen Ionenspuren der Analyten und internen Standards hohe Matrixbelastungen aufweisen. Des Weiteren muss zur Bestimmung von GAValPFPTH mittels GC-MS eine zusätzliche Derivatisierung mit Aceton durchgeführt werden, um die chromatographischen Eigenschaften dieses Analyten zu verbessern.

Um die Empfindlichkeit für die Quantifizierung von GAValPFPTH zu erhöhen und das relativ zeitaufwendige Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Isolierung der PFPTHs zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-MS/MS Methode in Verbindung mit einer Festphasenextraktion (SPE) zur Probenaufarbeitung etabliert. Frühere Arbeiten im Arbeitskreis zeigten, dass trotz der hohen Selektivität der MS/MS-Technik die Sensitivität eines API 2000 Massenspektrometers nicht ausreicht, um die Hintergrund-Adduktgehalte an AAVal und GAVal in Blutproben der Allgemeinbevölkerung im Bereich von 5-100 pmol/g Hb zu messen [Bertow, 2008]. Daher wurde die Etablierung der MS/MS-Methode mittels des empfindlicheren API 3200 Tandemmassenspektrometers vorgenommen.

In Abb. 4.29 ist das MRM-Chromatogramm zur Messung einer AA- bzw. GAValPFPTH-Standardlösung gezeigt. Die beiden Analyte sind basisliniengetrennt und weisen Retentionszeiten von 12,4 Minuten für AAValPFPTH sowie 11,3 und 11,5 Minuten für GAValPFPTH auf. Das Signal von GAValPFPTH zeigt, wie bereits bei der Bestimmung mittels GC-MS beobachtet, einen Doppelpeak, welcher auf das Vorkommen von Diastereomeren zurückzuführen ist. Die ermittelten absoluten Nachweisgrenzen liegen bei 12 fmol für AAValPFPTH sowie 30 fmol für GAValPFPTH und liegen im Vergleich zur Messung mittels GC-MS (AAValPFPTH: 0,4 fmol; acGAValPFPTH: 1,6 fmol) höher.

Abb. 4.30 zeigt das MRM-Chromatogramm eines starken Rauchers mit den Ionenspuren der Analyten AAVal- und GAValPFPTH bzw. der entsprechenden 7-fach deuterierten internen Standards. Sowohl für AAValPFPTH ($R_T = 12,8$ Minuten) als auch für GAValPFPTH ($R_T = 11,7/ 12,1$ Minuten) sind deutliche und gut integrierbare Peaks zu erkennen. Allerdings ist bei dem zuletzt eluierenden Diastereomeren-Peak von GAVal- bzw. GAD₇Val-PFPTH im Vergleich zum Chromatogramm der methanolischen Standardlösung (Abb. 4.29) eine starke

Suppression des Signals zu beobachten, welche vermutlich auf Matrixeffekte zurückzuführen ist.

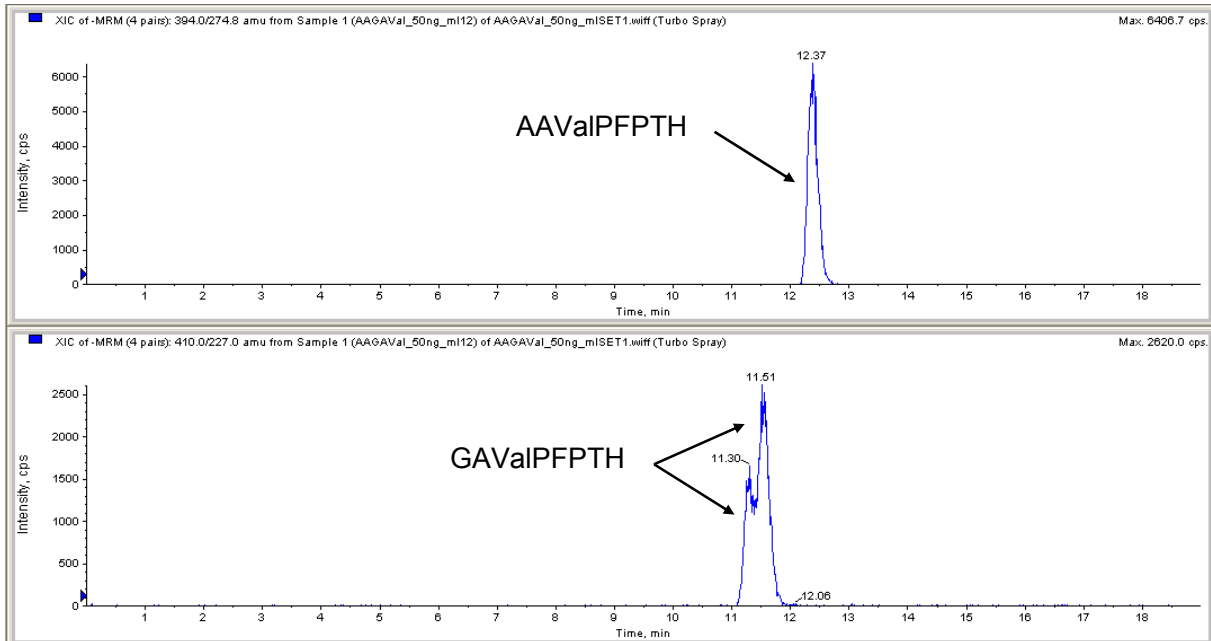


Abb. 4.29: MRM-Chromatogramm zur Messung einer AAVa- und GAVaIPFPTH-Standardlösung (50 ng/ml Methanol)

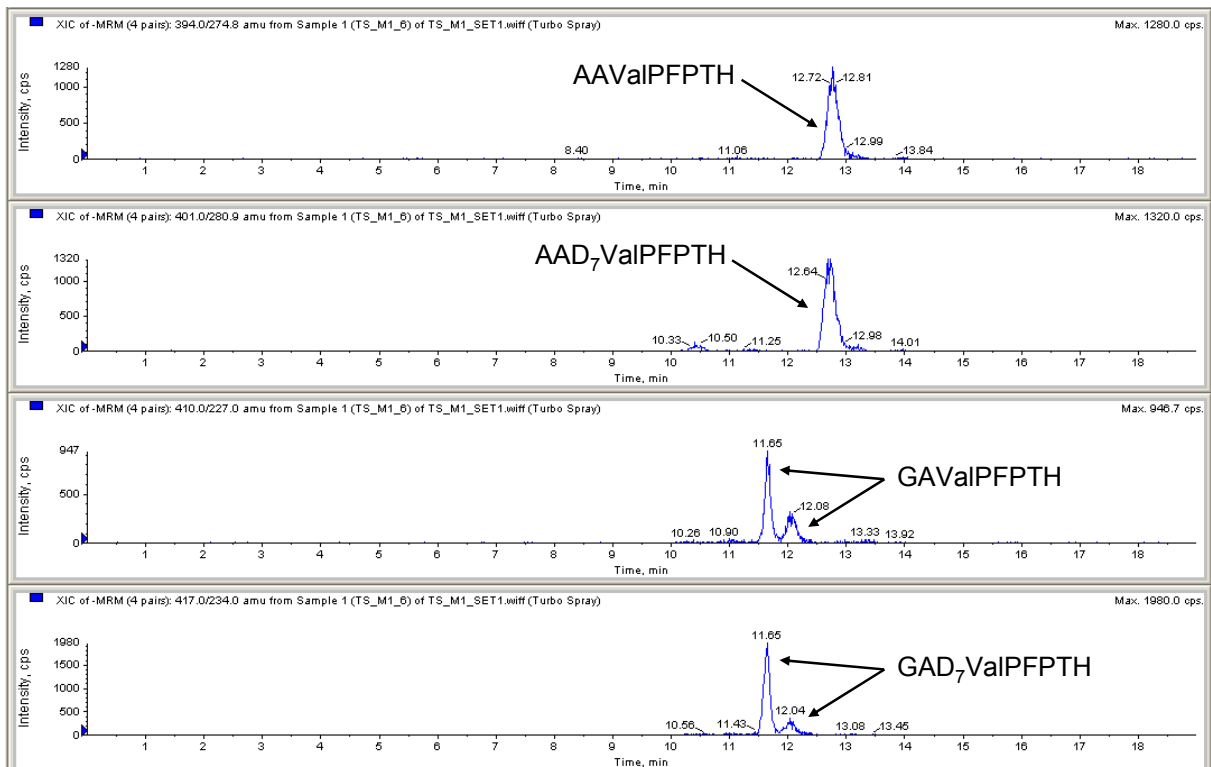


Abb. 4.30: MRM-Chromatogramm eines Rauchers zur Bestimmung der AAVa- und GAVaIPFPTHs

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 4.31 das MRM-Chromatogramm eines Nichtraucherers mit den entsprechenden Ionenspuren. Es wird deutlich, dass die Empfindlichkeit der verwendeten HPLC-MS/MS Methode zur Bestimmung der AAVaI-Addukte bei Nichtrauchern ausreichend ist. Allerdings zeigt sich bei der Bestimmung von GAVaIPFPTH, dass die Intensität der beiden Diastereomerenpeaks bereits im Bereich der Nachweisgrenze liegt und dadurch die Quantifizierung mit einem größeren Fehler behaftet ist. Darüber hinaus waren die geringen GAVaI-Gehalte der nichtrauchenden Allgemeinbevölkerung in der Mehrzahl der gemessenen Hb-Proben aufgrund der offensichtlich zu geringen Empfindlichkeit der verwendeten Methode nicht nachweisbar.

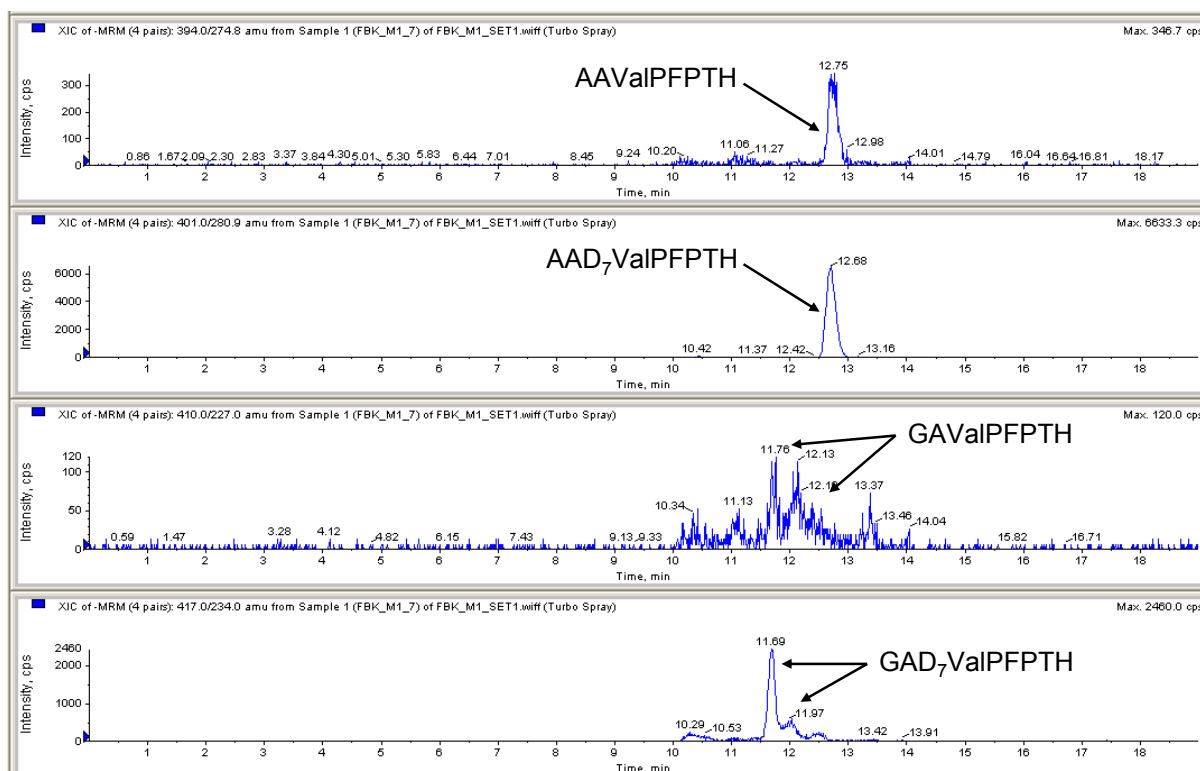


Abb. 4.31: MRM-Chromatogramm eines Nichtrauchers zur Bestimmung der AAVaI- und GAVaI-PFPTHs

Die erhaltenen Ergebnisse bei der Ermittlung der Wiederfindungsrate der SPE-Methode verdeutlichen, dass die verwendete strata C18-E-Säule sowohl für AAVaIPFPTH ($81 \pm 14 \%$) als auch GAVaIPFPTH ($94 \pm 13 \%$) mit der verwendeten SPE-Methode (Kap. 6.5.2.3) akzeptable Werte lieferte und somit für deren Extraktion geeignet ist. Allerdings müssen bei der Aufarbeitung von derivatisierten Hb-Proben die in der Lösung enthaltenen Matrixkomponenten berücksichtigt werden, da diese ebenfalls adsorbiert werden können und möglicherweise die Sorbenskapazität vermindern. Zusätzlich können Matrixbestandteile bei Koelution mit den Analyten zu einer Suppression der Analytsignale führen, was insbesondere bei GAVaIPFPTH beobachtet wurde. Zur Identifizierung solcher Matrixeffekte

wurden die Peakflächen der internen Standards von derivatisierten Hb-Proben mit denen von mittels SPE aufgearbeiteten Standardlösungen (ohne Hb; ohne PFPITC) verglichen (Kap. 6.5.2.6). Als Referenz dienten die Standardlösungen aus der Bestimmung der Wiederfindung. Dabei führte die Anwesenheit von Matrixbestandteilen in Form von Hb und PFPITC zu einer mittleren Abnahme der Wiederfindungsrate um 24 % für AAD₇ValPFPTH und 72 % für GAD₇ValPFPTH. Da weder in der Probenflüssigkeit nach Passage der SPE-Säule noch im Waschwasser die Analyten nachweisbar waren und auch die Erhöhung des Elutionsvolumens zu keiner Erhöhung der Wiederfindungsrate führte, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Suppression der Analytsignale auf eine Koelution von Matrixbestandteilen zurückzuführen ist, wobei dieser Effekt bei GAD₇ValPFPTH offensichtlich stärker ausgeprägt ist. Die beobachtete Signalsuppression führt bei GAValPFPTH in Verbindung mit der ohnehin durch die Ausbildung von Diastereomerenpeaks geringeren Signalintensität zu einer im Vergleich zu AAValPFPTH wesentlich geringeren Empfindlichkeit der HPLC-MS/MS Methode.

4.11 Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“

In Kooperation mit Prof. Dr. Uwe Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität Köln wurden im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studien-Nr. KPUK-03-ACR/PIL-01) Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin des Hämoglobin bestimmt. Dabei sollte die Kinetik der Addukt-Bildung nach Gabe Acrylamid-reicher Nahrung (Kartoffel-Chips) jeweils bei unbeeinflusster (R-Phase), gehemmter (T1-Phase) und induzierter (T2-Phase) CYP450 2E1-Aktivität untersucht werden. Die jeweiligen Studienphasen wurden in randomisierter Abfolge durchgeführt.

Tab. 4.2: Studienperioden

Phänotypisierung (P-Phase)
orale Gabe von 250 mg Chlorzoxazon (Parafon Forte® DSC 500 mg; ½ Tablette) Bestimmung von Chlorzoxazon und des Metaboliten 6-OH-Chlorzoxazon pre-dose und 2 h danach mittels HPLC
Referenzperiode (R-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) ohne Komedikation
Testperiode 1 (T1-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) 10 h nach oraler Applikation von 500 mg Disulfiram (Antabus® 0,5 Dispergetten)
Testperiode 2 (T2-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) nach täglicher Aufnahme von 48 ml Ethanol über 7 Tage in Form von Bier (jeweils 1 Liter Reissdorf Kölsch®)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid bei 13 Probanden in Blutproben der Referenzperiode sowie den Testperioden 1 und 2 jeweils zu den Zeitpunkten pre-dose und 24 Stunden nach Acrylamid-Aufnahme mittels GC-MS bestimmt. Weiterhin wurde bei 3 Probanden die Acrylamid-Hb-Adduktbildung

zu den Zeitpunkten pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 Stunden in den jeweiligen Studienperioden mittels HPLC-MS/MS untersucht.

4.11.1 Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid vor und 24 Stunden nach Acrylamid-Aufnahme mittels GC-MS

Die Hintergrundbelastung an AAVal- und GAVal-Hb-Addukten lag vor Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips (gemessen als pre dose-Wert vor Beginn der randomisierten 1. Studienperiode) bei 38 ± 10 pmol/g Hb für AAVal und 29 ± 9 pmol/g Hb für GAVal. Vergleichbare Hintergrundbelastungen wurden von Paulsson et al. (AAVal: 27 ± 6 pmol/g Hb; GAVal: 26 ± 6 pmol/g Hb) sowie von Schettgen et al. (AAVal: 19 ± 7 pmol/g Hb; GAVal: 17 ± 4 pmol/g Hb) ermittelt [Paulsson et al., 2003; Schettgen et al., 2004]. 24 Stunden nach Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips stiegen die AAVal-Gehalte um $7,7 \pm 4,8$ pmol/g Hb in der R-Phase sowie $11,9 \pm 4,9$ pmol/g Hb in der T1-Phase und $9,2 \pm 5,1$ pmol/g Hb in der T2-Phase. Die entsprechenden GAVal-Gehalte stiegen um $2,7 \pm 6,9$ pmol/g Hb in der R-Phase sowie $0,6 \pm 8,1$ pmol/g Hb in der T1-Phase und $3,9 \pm 9,5$ pmol/g Hb in der T2-Phase.

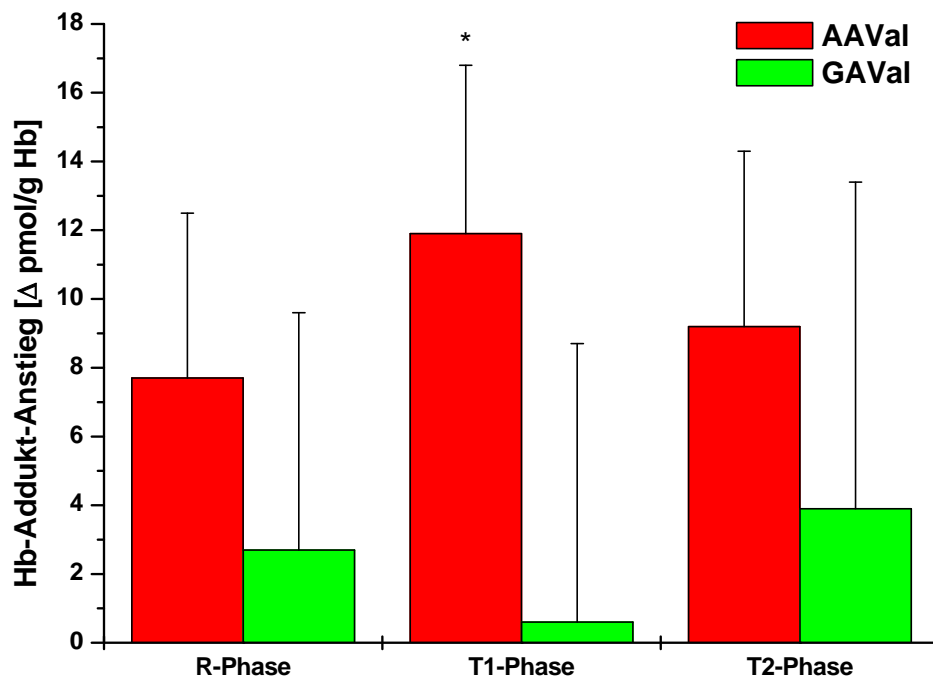


Abb. 4.32: Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin bei 13 Probanden 24 h nach Aufnahme von Acrylamid über Kartoffelchips. Studienphasen: R-Phase: (Referenzphase ohne Komedikation); T1-Phase (Vorbehandlung mit Disulfiram); T2-Phase (Vorbehandlung mit Ethanol), *: signifikant unterschiedlich zur R-Phase ($p < 0,05$)

Insgesamt zeigen die Anstiege der AAVal- und GAVal-Addukt-Gehalte relativ große individuelle Schwankungen. Vesper et al. untersuchten in einer vergleichbaren Studie die Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Adduktbildung bei 6 Probanden, welche über den Zeitraum von einer Woche täglich 115 µg Acrylamid (1,9 µg Acrylamid/kg KG/d) über Kartoffelchips aufnahmen, was einer Gesamtdosis von ca. 0,8 mg Acrylamid entspricht. Dabei zeigte sich ein mittlerer Anstieg von AAVal um 7 pmol/g Hb und GAVal um 6 pmol/g Hb, wobei sowohl für AAVal (-6 bis +19 pmol/g Hb) als auch für GAVal (-5 bis +18 pmol/g Hb) ebenfalls relativ große Schwankungen beobachtet wurden [Vesper et al., 2005].

Die festgestellten Unterschiede in den Anstiegen der AAVal- und GAVal-Gehalte könnten auf Polymorphismen in Genen zurückgeführt werden, welche metabolisierende Enzyme kodieren. Duale et al. untersuchten bei 49 Probanden die Beziehung zwischen den GAVal- und AAVal-Hb-Hintergrundbelastungen und Polymorphismen in kodierenden Genen von CYP450 2E1 sowie Glutathion-S-Transferasen (GSTM1, GSTT1, GSTP1). Dabei wurden signifikant höhere GAVal/AAVal-Verhältnisse bei Probanden mit GSTM1- und GSTT1-null Varianten im Vergleich zu den entsprechenden Wild-Typen festgestellt, wohingegen für die CYP450 2E1-Genotypen kein signifikanter Zusammenhang zu den GAVal/AAVal-Verhältnissen gezeigt werden konnte [Duale et al., 2009]. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studie wurde eine Phänotypisierung der Probanden unter Einschluss von CYP450 2E1*5A, CYP450 2E1*5B, CYP450 2E1*6, GSTM1-null, GSTT1-null sowie GSTP1-Einzelnukleotid Polymorphismen vorgenommen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Duale et al. konnte dabei kein signifikanter Einfluss bestimmter Phänotypen der untersuchten Gene auf den Metabolismus des aufgenommenen Acrylamids gezeigt werden [Doroshenko et al., 2009]. Dennoch kann in Anbetracht der relativ geringen einmaligen Aufnahmemenge von ca. 15 µg/kg KG in den jeweiligen Studienperioden und der damit verbundenen größeren Schwankungsbreite der Messergebnisse eine Beeinflussung der Toxikokinetik von Acrylamid durch Polymorphismen metabolisierender Enzyme nicht ausgeschlossen werden.

Bei Disulfiram handelt es sich um einen selektiven Inhibitor, der sowohl nach akuter als auch chronischer Gabe eine vergleichbare Verminderung der CYP450 2E1-Aktivität bewirkt [Frye und Branch, 2002; Emery et al., 1999; Kharasch et al., 1993]. Da der oxidative Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid im Wesentlichen durch CYP450 2E1 vermittelt wird, kann die in der T1-Phase bei CYP450 2E1-Hemmung im Vergleich zur Referenzphase signifikant erhöhte AAVal-Bildung vermutlich auf höhere Acrylamid-Blutkonzentrationen zurückgeführt werden. Diese Vermutung wird durch eine bei den Probanden der durchgeführten Studie signifikant erhöhte Ausscheidung von Acrylamid (Faktor: 1,34) und AAMA (Faktor: 1,18) sowie signifikant erniedrigte GAMA-Ausscheidung (Faktor: 0,44) im Vergleich zur Referenzphase gestützt. Darüber hinaus deutet die beobachtete Erniedrigung der GAMA

Ausscheidung um lediglich 50-60 % darauf hin, das neben dem hauptsächlich CYP450 2E1 vermittelten Metabolismus noch weitere Bildungswege für Glycidamid im menschlichen Organismus existieren [Doroshenko et al., 2009].

Die Exposition gegenüber Ethanol führt selbst bei moderatem Alkoholkonsum zu einer Induktion von hepatischem und extrahepatischem CYP450 2E1 [McCarver et al., 1998; Roberts et al., 1995; Tsutsumi et al., 1993]. Die Aufnahme von täglich 40 g Ethanol über eine Woche führt zu einer Erhöhung der CYP450 2E1-Aktivität um ca. 30 % [Oneta et al., 2002]. Daher wäre im Rahmen der Studienphase T2 nach einwöchiger Vorbehandlung mit Ethanol eine stärkere Glycidamid-Bildung zu erwarten. Daraus würde eine verminderte Zunahme von AAVal sowie erhöhte Zunahme von GAVal resultieren. Allerdings zeigte sowohl die Erhöhung der AAVal- als auch die der GAVal-Addukt-Gehalte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Referenzphase. Weiterhin wurden bei den Probanden der Studie keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung von Acrylamid bzw. der Mercaptursäuren zwischen T2- und Referenz-Phase beobachtet. Daraus folgt, dass die moderate Induktion von CYP450 2E1 keinen eindeutigen Effekt auf die Toxikokinetik von Acrylamid hat [Doroshenko et al., 2009]. Allerdings ist angesichts der relativ geringen aufgenommenen Dosis von ca. 15 µg Acrylamid/kg KG und der beobachteten individuellen Schwankungen fraglich, ob die Ethanol vermittelte CYP450 2E1 Induktion zu einer mit den verwendeten analytischen Methoden erfassbaren relativen Veränderung des Biomarker-Status führt.

4.11.2 Kinetik der Acrylamid-Hämoglobin-Adduktbildung *in vivo*

Zur Untersuchung der Kinetik der *in vivo* Adduktbildung von Acrylamid mit dem endständigen Valin im Hämoglobin wurde bei den Probanden 8, 13 und 16 der humanen Verzehrsstudie die Acrylamid-Hämoglobin-Adduktbildung zu den Zeitpunkten pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 Stunden in den Studienperioden R- (Acrylamid-Aufnahme ohne Komedikation), T1- (Acrylamid-Aufnahme nach CYP450 2E1-Hemmung durch Disulfiram) und T2- (Acrylamid-Aufnahme nach CYP450 2E1-Induktion durch Vorbehandlung mit Ethanol) Phase mittels HPLC-MS/MS bestimmt.

In Abb. 4.33 ist der zeitliche Verlauf der AAVal-Bildung bei Proband 8 nach Aufnahme von jeweils 1 mg Acrylamid (ca. 15 µg/kg KG) über Kartoffelchips in den untersuchten Studienphasen gezeigt. In der R-Phase liegt der AAVal-Gehalt bei $44,7 \pm 0,6$ pmol/g Hb vor ($T = 0$) bzw. $43,4 \pm 1,3$ pmol/g Hb 24 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme. In der T1-Phase liegt der AAVal-Gehalt vor Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips bei $43,8 \pm 0,4$ pmol/g Hb und steigt bis auf $48,2 \pm 0,9$ pmol/g Hb nach 24 Stunden an. Ein ähnlicher Anstieg wurde in der T2-Phase beobachtet, wobei die entsprechenden AAVal-Gehalte bei $45,7 \pm 0,4$ pmol/g Hb und $48,9 \pm 0,1$ pmol/g Hb liegen.

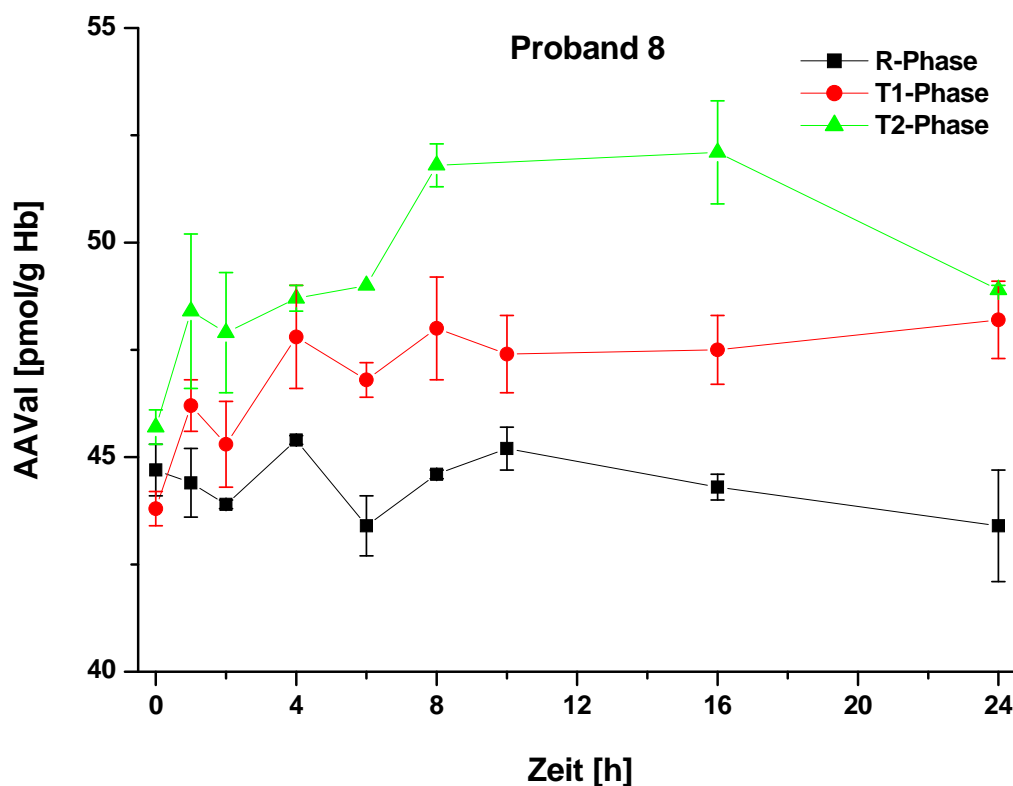


Abb. 4.33: Zeitlicher Verlauf der AAVal-Bildung bei Proband 8 nach Aufnahme von jeweils 1 mg Acrylamid über Kartoffelchips in den untersuchten Studienphasen; R-Phase (Referenzphase ohne Komedikation), T1-Phase (Vorbehandlung mit Disulfiram), T2-Phase (Vorbehandlung mit Ethanol), n = 1-2

Bei der Bestimmung mittels GC-MS wurden ähnliche AAVal-Gehalte ermittelt (R-Phase: $48,1 \pm 2,7$ pmol/g Hb (T = 0) und $49,4 \pm 3,0$ pmol/g Hb (T = 24 h), T1-Phase: $46,7 \pm 2,2$ pmol/g Hb (T = 0) und $59,9 \pm 2,9$ pmol/g Hb (T = 24 h), T2-Phase: $52,4 \pm 2,0$ pmol/g Hb (T = 0) und $67,5 \pm 2,7$ pmol/g Hb (T = 24 h)), wobei die Anstiege in der T1- und T2-Phase mit ca. 13 bzw. 15 pmol/g Hb im Vergleich zur Messung mittels HPLC-MS/MS (T1-Phase: 4,4 pmol/g Hb; T2-Phase: 3,2 pmol/g Hb) größer sind. Der zeitliche Verlauf der AAVal-Bildung zeigt in der R-Phase keinen signifikanten Anstieg der Gehalte im Zeitraum von 24 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme.

Abb. 4.34 zeigt die Kinetik der AAVal-Bildung bei Proband 13. Nach Aufnahme der Kartoffelchips steigt der AAVal-Gehalt in der R-Phase von $45,2 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T = 0) auf $47,6 \pm 0,9$ pmol/g Hb (T = 16 h). In der T1-Phase liegen die AAVal-Gehalte bei $41,8 \pm 0,3$ pmol/g Hb (T = 0) bzw. $44,9 \pm 0,4$ pmol/g Hb 24 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme. In der T2-Phase steigt der AAVal-Gehalt nach Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips von $47,3 \pm 0,6$ pmol/g Hb (T = 0) auf $52,2 \pm 1,0$ pmol/g Hb (T = 24 h) an.

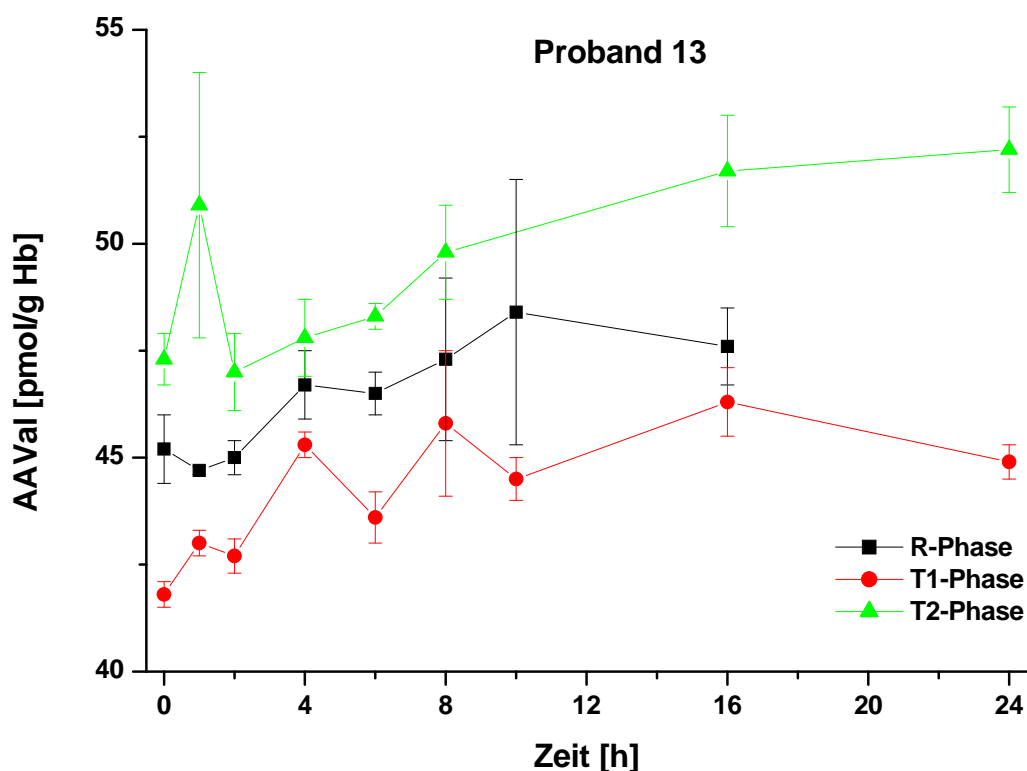


Abb. 4.34: Zeitlicher Verlauf der AAVal-Bildung bei Proband 13 nach Aufnahme von jeweils 1 mg Acrylamid über Kartoffelchips in den untersuchten Studienphasen; R-Phase (Referenzphase ohne Komedikation), T1-Phase (Vorbehandlung mit Disulfiram), T2-Phase (Vorbehandlung mit Ethanol), n = 2

Wie bereits bei den Ergebnissen von Proband 8 diskutiert, wurden auch bei Proband 13 nach Bestimmung mittels GC-MS ähnliche AAVal-Gehalte ermittelt (R-Phase: $43,7 \pm 3,5$ pmol/g Hb (T = 0) und $54,3 \pm 2,8$ pmol/g Hb (T = 24 h), T1-Phase:

$34,7 \pm 1,1$ pmol/g Hb (T = 0) und $49,8 \pm 1,4$ pmol/g Hb (T = 24 h), T2-Phase: $51,0 \pm 2,4$ pmol/g Hb (T = 0) und $65,5 \pm 1,4$ pmol/g Hb (T = 24 h)), wobei die beobachteten Anstiege im Vergleich zur Messung mittels HPLC-MS/MS ebenfalls höher liegen.

Abb. 4.35 zeigt den zeitlichen Verlauf der AAVal-Bildung bei Proband 16. Nach Exposition mit Acrylamid ohne Komedikation (R-Phase) steigt der AAVal-Gehalt von $42,5 \pm 0,6$ pmol/g Hb zum Zeitpunkt T = 0 auf $47,5 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T = 24 h) an. In der T1-Phase liegen die entsprechenden Gehalte bei $46,5 \pm 0,7$ pmol/g Hb (T = 0) bzw. $51,5 \pm 0,6$ pmol/g Hb (T = 24 h). Im Vergleich dazu lassen die AAVal-Gehalte in der Studienphase T2 ($40,7 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T = 0) bzw. $42,8 \pm 0,4$ pmol/g Hb (T = 24 h)) lediglich auf einen geringen Anstieg der AAVal-Gehalte schließen.

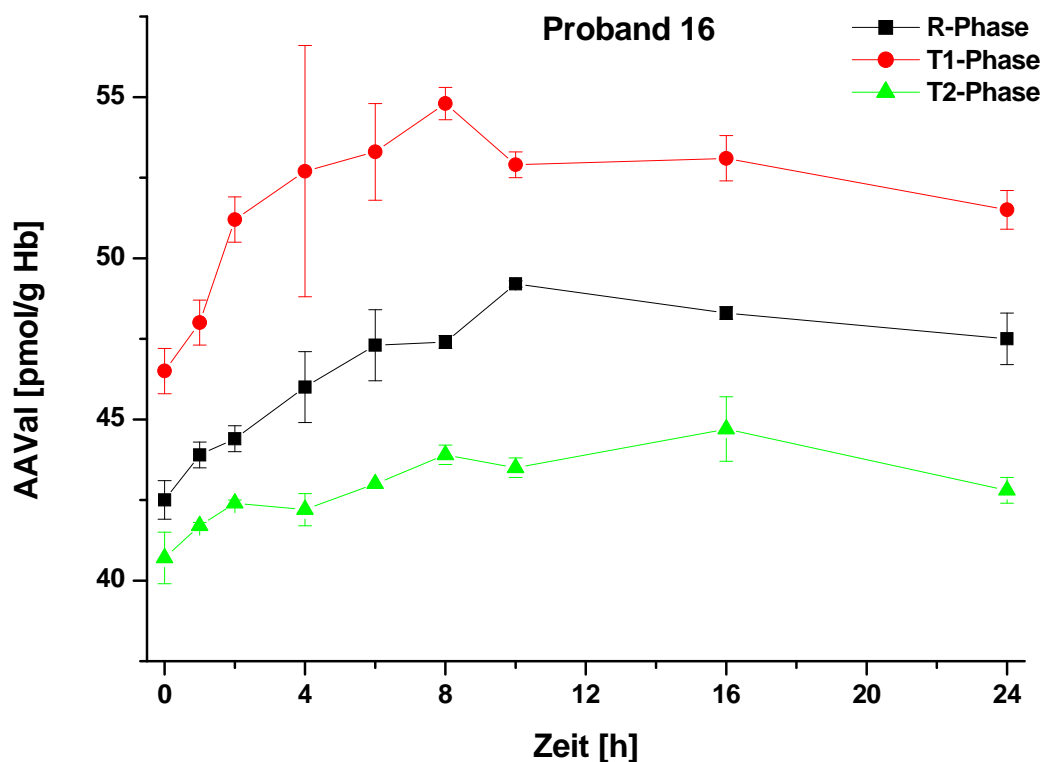


Abb. 4.35: Zeitlicher Verlauf der AAVal-Bildung bei Proband 16 nach Aufnahme von jeweils 1 mg Acrylamid über Kartoffelchips in den untersuchten Studienphasen; R-Phase (Referenzphase ohne Komedikation), T1-Phase (Vorbehandlung mit Disulfiram), T2-Phase (Vorbehandlung mit Ethanol), n = 1-2

Wie bereits bei den Probanden 8 und 13 diskutiert, sind die mittels HPLC-MS/MS zu den Zeitpunkten pre dose (T = 0) und T = 24 h ermittelten AAVal-Gehalte von Proband 16 mit denjenigen nach der Bestimmung mittels GC-MS vergleichbar (R-Phase: $40,9 \pm 1,7$ pmol/g Hb (T = 0) und $59,2 \pm 2,3$ pmol/g Hb (T = 24 h), T1-Phase: $58,7 \pm 1,4$ pmol/g Hb (T = 0) und $73,3 \pm 2,6$ pmol/g Hb (T = 24 h), T2-Phase: $36,6 \pm 0,3$ pmol/g Hb (T = 0) und $49,7 \pm 1,7$ pmol/g Hb (T = 24 h)). Auch die Ergebnisse von

Proband 16 zeigen bei Messung mittels GC-MS im Vergleich zu HPLC-MS/MS größere Anstiege der AAVal-Gehalte.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse bei den untersuchten Probanden, dass die Aufnahme von ca. 15 µg Acrylamid/kg KG über Kartoffelchips in allen Studienperioden (mit Ausnahme der R-Studienphase von Proband 8) zu einem signifikanten Anstieg der AAVal-Gehalte führt. Die beobachteten Anstiege lagen bei den Messungen mittels HPLC-MS/MS über die jeweiligen Studienperioden gemittelt bei $2,1 \pm 2,5$ pmol/g Hb (R-Phase), $4,2 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T1-Phase) und $3,4 \pm 1,2$ pmol/g Hb (T2-Phase), wohingegen bei der Messung mittels GC-MS bei diesen Probanden größere Anstiege der AAVal-Gehalte beobachtet wurden ($10,1 \pm 7,0$ pmol/g Hb (R-Phase), $14,3 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T1-Phase), $14,2 \pm 0,8$ pmol/g Hb (T2-Phase)). Da sich sowohl die GC-MS- als auch HPLC-MS/MS-Methode als ausreichend empfindlich zur Bestimmung der AAVal-Addukte erwiesen hat und mit der gleichen internen Standardisierung (AAD₇ValPFPTH) und Derivatisierungstechnik gearbeitet wurde, können die beobachteten Unterschiede dadurch nicht erklärt werden. Die Bestimmung der Hb-Addukte in den isolierten Hb-Proben mittels HPLC-MS/MS wurde ca. 18 Monate nach den entsprechenden GC-MS-Messungen durchgeführt, wobei die Lagerung der isolierten Hämoglobin-Proben bei -30°C in Kunststoffvials erfolgte. Unter diesen Lagerungsbedingungen ist eine Beeinflussung der AAVal-Addukt-Gehalte nicht zu erwarten. Die maximalen AAVal-Konzentrationen wurden bei den untersuchten Probanden im Zeitraum von 8-10 Stunden erreicht, wobei 10 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme meist ein Plateau-förmiger Verlauf der Bildungskurven zu erkennen ist. Die Aufnahme von ca. 15 µg Acrylamid/kg KG bewirkt in den jeweiligen Studienperioden, wie bereits diskutiert, lediglich einen geringen Anstieg der AAVal-Gehalte (2–4 pmol/g Hb). Dadurch ist in Verbindung mit der geringen Anzahl an Messungen (n = 1-2) und der beobachteten Schwankungsbreite der Messergebnisse die Interpretation der AAVal-Bildung in den einzelnen Studienphasen nur eingeschränkt möglich. Dennoch deuten die AAVal-Anstiege in der T1-Phase (Acrylamid-Aufnahme nach CYP450 2E1-Hemmung durch Disulfiram) auch bei der Bestimmung mittels HPLC-MS/MS auf eine erhöhte Bildung von AAVal im Vergleich zur R- (Acrylamid-Aufnahme ohne Komedikation) und T2- (Acrylamid-Aufnahme nach CYP450 2E1-Induktion durch Vorbehandlung mit Ethanol) Phase hin, wodurch die bei Messung mittels GC-MS beobachteten Ergebnisse bestätigt werden (Kap. 4.11.1).

Im Rahmen von früheren Arbeiten im Arbeitskreis wurde die Kinetik der Acrylamid-Hb-Addukt-Bildung bei den Probanden 4, 7 und 10 mittels GC-MS bestimmt [Bertow, 2008]. Dabei lag die maximale AAVal-Konzentration ebenfalls in einem Bereich von 8-12 Stunden. Die beobachteten mittleren Anstiege der AAVal-Gehalte lagen bei 6 pmol/g Hb (R-Phase), 15 pmol/g Hb (T1-Phase) sowie 8 pmol/g Hb (T2-Phase), was ebenfalls auf eine verstärkte AAVal-Bildung in der T1-Phase hindeutet.

5 Zusammenfassung

Bei Acrylamid handelt es sich um ein genotoxisches Kanzerogen, welches beim Erhitzen von Lebensmitteln gebildet wird. Die Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus Lebensmitteln und die niedrigste genotoxisch wirksame Dosis im lebenden Organismus sind derzeit die zentralen offenen Fragen für die Risikobewertung von Acrylamid.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit spezifische Lebensmittelmatrices die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Acrylamid beeinflussen. Lebkuchen als zuckerhaltiges, fettarmes und trockenes Lebensmittel auf Getreidebasis und Pommes frites (fett- und wasserreich; Kartoffelbasis) die entweder direkt aus der Kartoffel geschnitten (mit intakter Gewebestruktur) oder aus Kartoffelerzeugnissen „rekombiniert“ wurden sowie Brotkruste wurden an männliche Sprague Dawley-Ratten über 1, 3, 5, 7 und 9 Tage verfüttert und mit der Aufnahme von Acrylamid über Trinkwasser (Schlundsondierung) verglichen. Die täglich verabreichte Acrylamid-Dosis lag bei 100 µg/kg KG für Pommes frites und Lebkuchen bzw. 50 µg/kg KG für Brotkruste.

Als Langzeit-Expositionsbiomarker wurden Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin (Val) am Hämoglobin (Hb) herangezogen. Bei allen Behandlungsgruppen waren deutliche, nahezu lineare Anstiege der AAVal-Hb-Addukt-Gehalte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und damit der kumulativen Acrylamid-Dosis zu erkennen. Im Gegensatz zu den AAVal-Hb-Addukten blieb die Glycidamid-Hb-Adduktbildung bei allen Behandlungsgruppen im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Das Ausmaß der AAVal-Bildung in den Tieren, denen Acrylamid über Pommes frites verabreicht wurde, entsprach jener nach Gabe einer entsprechenden Dosis Acrylamid in Trinkwasser mittels Schlundsondierung (AA-TW-Gruppen), was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von Acrylamid hindeutet. Lediglich in den Gruppen, die Acrylamid über Brotkruste erhielten, wurde eine geringfügig verminderte Bildung von AAVal-Hb-Addukten im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen beobachtet.

Bei den Behandlungsgruppen, welche Acrylamid über Lebkuchen erhielten, wurde nach allen Expositionszeiträumen eine signifikant unterschiedliche AAVal-Hb-Adduktbildung im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen beobachtet. Vermutlich reflektieren die AAVal-Messwerte die ungenaue Charakterisierung des Gehaltes an Acrylamid im Lebkuchen, wodurch im Rahmen der Messungenauigkeiten keine endgültige Aussage zur Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus Lebkuchen gemacht werden kann.

Als Kurzzeit-Expositionsbiomarker für Aufnahme, Entgiftung und Ausscheidung von Acrylamid, sowie dessen Biotransformation zu Glycidamid im Organismus über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (AAMA und

GAMA) als Abbauprodukte der Glutathion-Addukte herangezogen. Die Anteile der Mercaptursäuren an der verabreichten täglichen Dosis lagen über alle Behandlungsgruppen und Expositionsperioden gemittelt bei $36 \pm 10 \%$ für AAMA und $18 \pm 4 \%$ für GAMA, wobei im Hinblick auf die Gesamtausscheidung keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Expositionsdauer erkennbar waren. Nach Aufnahme von Acrylamid über Pommes frites wurde kein signifikanter Unterschied in der Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren im Vergleich zur Gabe in Trinkwasser mittels Schlundsondierung (AA-TW-Gruppen) beobachtet, was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von Acrylamid hindeutet. Bei den mit Brotkruste gefütterten Tieren wurde eine im Vergleich zu AA-TW-Gruppen geringfügig erniedrigte Ausscheidung an AAMA beobachtet, was im Einklang mit der erniedrigten AA-Val-Bildung steht. Nach Aufnahme von Acrylamid über Lebkuchen wurden nach allen Expositionsperioden Unterschiede in der Mercaptursäure-Ausscheidung im Vergleich zu den AA-TW-Gruppen festgestellt, was die Ergebnisse bei den AAVal-Hb-Addukten widerspiegelt. Nach Exposition mit Acrylamid über Pommes frites und Brotkruste konnte eine Veränderung des Mercaptursäure-Verhältnisses GAMA/AAMA hin zu einer verstärkten Bildung von GAMA im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsondierung) gezeigt werden.

Insgesamt lassen die Biomarker Hämoglobin-Addukte und Mercaptursäuren erkennen, dass die Bioverfügbarkeit von Acrylamid aus den untersuchten Lebensmitteln mit derjenigen nach Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsondierung) vergleichbar ist.

Für die Ermittlung der Gesamtbilanz an Acrylamid-Ausscheidung aus dem Organismus wurde auch die Acrylamid- und Glycidamid-Ausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin bestimmt. Die ausgeschiedenen Anteile an der verabreichten Tagesdosis lagen über die Behandlungsgruppen und Expositionsperioden gemittelt bei $3,1 \pm 2,4 \%$ für Acrylamid und $2,4 \pm 1,3 \%$ für Glycidamid und leisten damit im Vergleich zu den Mercaptursäuren einen verhältnismäßig geringen Beitrag zur Gesamtausscheidung einer verabreichten Acrylamid-Dosis. Zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Acrylamid- bzw. Glycidamid-Ausscheidung beobachtet, wobei innerhalb der AA-TW-Gruppen tendenziell mehr Acrylamid über den Urin ausgeschieden wurde.

Zur Untersuchung der Resorptionskinetik von Acrylamid bei Verabreichung über Pommes frites im Vergleich zur Aufnahme in Trinkwasser (Schlundsondierung) wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden die Acrylamid- und Glycidamid-Gehalte in Rattenserum bestimmt. Dabei lag die maximale Acrylamid-Serumkonzentration bei Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser (Schlundsonde) etwa um den Faktor 4 höher als bei Acrylamid-Gabe über Pommes frites. Insgesamt deutet der zeitliche Verlauf der Acrylamid-Serumkonzentration in der mit Pommes frites gefütterten Gruppe auf eine im Vergleich zur AA-TW-Gruppe verzögerte Freisetzung bzw. verlangsamte Resorption von Acrylamid im Gastrointestinaltrakt

hin. Glycidamid konnte bei den behandelten Gruppen lediglich 4 Stunden nach der Acrylamid-Aufnahme nachgewiesen werden, wobei die gemessenen Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode zur Bestimmung von Glycidamid in Rattenserum lagen.

Zum Vergleich der Toxikokinetik von Acrylamid bei wiederholter Verabreichung (50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d für maximal 9 Tage) mit derjenigen nach Gabe der entsprechenden kumulativen Einzeldosis wurden 450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG über Trinkwasser mittels Schlundsondierung an männliche Sprague Dawley-Ratten verabreicht. Darüber hinaus wurde zur Untersuchung der Acrylamid-Toxikokinetik im Hochdosisbereich eine Einzeldosis von 10 mg Acrylamid/kg KG gegeben. Dabei wurden bei den behandelten Tieren nahezu lineare Anstiege der AAVal-Hb-Addukte in Abhängigkeit von der verabreichten Acrylamid-Dosis beobachtet. Die Glycidamid-Hämoglobin-Addukte (GAVal) zeigten lediglich nach Verabreichung von 10 mg Acrylamid/kg KG einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Negativkontrollen. Die über den Urin ausgeschiedenen Anteile von AAMA, GAMA sowie freiem Acrylamid und Glycidamid an der verabreichten Dosis waren im Dosisbereich von 0,45-10 mg Acrylamid/kg KG mit den Ergebnissen nach einmaliger bzw. wiederholter Gabe von 50 bzw. 100 µg Acrylamid/kg KG/d vergleichbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im untersuchten Dosisbereich von 0,05-10 mg Acrylamid/kg KG keine Sättigung des oxidativen Metabolismus unter Bildung von Glycidamid zu erwarten ist.

Zur Abschätzung der Hintergrundbelastung mit Acrylamid wurden in 8 humanen Blutproben die Gehalte an Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukten (AAVal, GAVal) sowie in 10 humanen Urinproben die Gehalte an Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (AAMA, GAMA) bestimmt. Bei den Rauchern wurden deutlich höhere AAVal-Gehalte im Vergleich zu Nichtrauchern gemessen, wohingegen die Gehalte an GAVal auf vergleichbarem Niveau lagen. Darüber hinaus wurde bei den Rauchern eine im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant höhere Ausscheidung von AAMA und GAMA beobachtet, wobei die entsprechenden GAMA/AAMA-Verhältnisse bei Rauchern erniedrigt waren. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das Rauchen einen wesentlichen Beitrag zur Acrylamid-Exposition leisten kann.

Um die Empfindlichkeit für die Quantifizierung der Hämoglobin-Addukte zu erhöhen und das relativ zeitaufwendige Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Isolierung der Hämoglobin-Addukt-Derivate (PFPTHs) zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-MS/MS Methode in Verbindung mit einer Festphasenextraktion (SPE) zur Probenaufarbeitung etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit der verwendeten Methode zur Bestimmung der AAVal-Addukte bei Nichtrauchern ausreichend

ist. Allerdings lagen bei der Bestimmung der GAVal-Addukte die Intensitäten der beiden Diastereomeren-Peaks bereits im Bereich der Nachweisgrenze.

In Kooperation mit Prof. Dr. Uwe Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität Köln wurden im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin des Hämoglobin bestimmt. Dabei wurde das Ausmaß der Addukt-Bildung bei 13 Probanden nach Aufnahme von ca. 1 mg Acrylamid über Kartoffel-Chips jeweils bei unbeeinflusster (R-Phase), gehemmter (T1-Phase) und induzierter (T2-Phase) CYP450 2E1-Aktivität untersucht. In der Referenzperiode (R-Phase) ohne Komedikation wurde bei diesen Probanden ein Anstieg der AAVal-Gehalte um 8 ± 5 pmol/g Hb beobachtet. Ein im Vergleich zur R-Phase signifikant erhöhter AAVal-Anstieg (12 ± 5 pmol/g Hb) zeigte sich in der Testperiode T1, in der CYP450 2E1 durch Disulfiram gehemmt wurde. In der Testperiode T2, in der CYP450 2E1 durch eine Vorbehandlung mit Ethanol induziert wurde, wiesen die AAVal-Gehalte einen mit der R-Phase vergleichbaren Anstieg um 9 ± 5 pmol/g Hb auf. Für GAVal hingegen konnten aufgrund der größeren Messwertschwankungen keine signifikanten Veränderungen in der Testperiode T1 bzw. T2 im Vergleich zur Referenzperiode festgestellt werden.

Darüber hinaus wurde bei 3 Probanden der zeitliche Verlauf der AAVal-Bildung in den jeweiligen Testperioden über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Die maximale AAVal-Konzentration wurde bei den untersuchten Probanden im Zeitraum von 8-10 Stunden erreicht, wobei anschließend ein Plateau-förmiger Verlauf der Bildungskurven beobachtet wurde.

Um die Exposition gegenüber Acrylamid mit derjenigen von Acrolein zu vergleichen, wurde der Gehalt an *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cystein (HPMA) im 24-Stunden-Sammelurin aus der Rattenfütterungsstudie sowie in 10 Urinproben aus der Allgemeinbevölkerung bestimmt, wobei es sich bei HPMA um den Hauptmetaboliten von Acrolein handelt. Dabei wurde über den Gehalt an HPMA im Urin der Tiere eine theoretische mittlere Belastung von 46 ± 16 µg Acrolein/kg KG berechnet. Allerdings deuten die HPMA-Gehalte auf einen geringen Beitrag der verabreichten Lebensmittel zur Acrolein-Gesamtexposition unter den Versuchsbedingungen der Fütterungsstudie hin. In den untersuchten humanen Urinproben zeigten die gemessenen HPMA-Gehalte relativ große individuelle Schwankungen. Dennoch lässt sich bei den rauchenden Probanden eine signifikant erhöhte Ausscheidung von HPMA im Vergleich zu den Nichtrauchern feststellen. Allerdings zeigen auch die Nichtraucher relativ hohe Konzentrationen an HPMA im Urin, welche etwa um den Faktor 10 höher liegen als die Summe der entsprechenden Acrylamid-Mercaptursäuren AAMA und GAMA. Insgesamt

deuten die Gehalte an HPMA darauf hin, dass die Allgemeinbevölkerung einer relativ hohen Belastung mit Acrolein ausgesetzt ist.

6 Methoden

6.1 Fütterungsstudie an der Ratte

Die Fütterungsstudie wurde im Rahmen des Projektes „Umsetzung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (Projekt-Nr.: AiF 209 ZBG) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gert Fricker am Institut für pharmazeutische Technologie der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg durchgeführt.

6.1.1 Spezifikation der Acrylamid-haltigen Lebensmittel

Die geschnittenen (PFG) und aus Kartoffelerzeugnissen rekonstituierten Pommes frites (PFR) wurden freundlicherweise vom Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (DIL), die verwendete Brotkruste (BK) und der Lebkuchen (LK) vom Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung in Nuthetal (ILU) hergestellt.



Abb. 6.1: Verwendete Lebensmittel zur Durchführung der Fütterungsstudie, a: Lebkuchen (LK) b: geschnittene Pommes frites (PFG), c: rekonstituierte Pommes frites (PFR), d: Brotkruste (BK)

Die verwendeten Lebkuchen wurden nach einer Standardrezeptur für einfache braune Lebkuchen hergestellt. Dazu wurde ein Grundteig aus Weizenmehl (Type 550, 21,7 %), Roggenmehl (Type 1150, 9,3 %), Invertzuckercreme (25,2 %), Glucosesirup (2,8 %), 10 %-iger Milchsäure (2 %), Wasser (23,6 %), Gewürz (9,4 %), ABC-Trieb (3,6 %) und Pottasche (2,4 %) gemischt. Der Teig wurde zu einem Band mit 5 mm Dicke ausgerollt und rechteckige Teigstücke mit einem Gewicht von ca. 40 g ausgestochen. Die Teigstücke wurden anschließend in einem Etagenbackofen (Oberhitze 190 °C/Unterhitze 160 °C) für 20 min gebacken.

Zur Herstellung der geschnittenen Pommes frites wurden Speisekartoffeln (Wernsing GmbH, Addrup) zu Stäbchen geschnitten und lauwarm gewässert. Anschließend wurden die Stäbchen mit einem Fön getrocknet (ca. 3 min in flacher Schicht, Oberfläche trocken) und in 300 g Portionen für 2 min bei 180 °C frittiert (Frymaster, Enodis, Eschborn). Die rekonstituierten Pommes frites wurden aus einem Teig von 30 % Kartoffelflocken (Emslandstärke, Emlichheim), 20 % Kartoffelgranulat (Emslandstärke, Emlichheim) und 50 % Leitungswasser hergestellt. Nach dem Ausrollen des Teiges auf eine Dicke von 8 mm erfolgte zum Ausgleich der internen Wasserverteilung eine zweistündige Teigruhe. Anschließend wurde der Teig in Stäbchen geschnitten ($\varnothing = 8$ mm) und in 300 g Portionen für 3 min bei 175 °C frittiert (Frymaster, Enodis, Eschborn). Die fertig frittierten Pommes frites wurden unmittelbar nach der Herstellung eingefroren und unter Einbeziehung aller Chargen gemischt (jeweils ca. 3 kg Endprodukt).

Zur Generierung möglichst hoher Acrylamid-Gehalte in der Brotkruste erfolgte der Einsatz von Roggenvollkornmehl verbunden mit einer längeren Backzeit (60 min; Temperaturgradient von 250 °C auf 210 °C) sowie der Zusatz von Invertzuckercreme (3 % auf Gesamtmehl) und ABC-Trieb (1 % auf Gesamtmehl). Die Eingangsbestimmung der Acrylamid-Gehalte erfolgte durch die herstellenden Institute, Kontrollmessungen wurden von Eurofins Analytik, Hamburg durchgeführt.

Die ermittelten Gehalte der geschnittenen und rekonstituierten Pommes frites (PFG und PFR) sowie Brotkruste sind in Tab. 6.1 aufgeführt. Nach Erhalt der Lebensmittel und nach 3 monatiger Lagerung bei -20 °C wurden weitere Kontrollmessungen durchgeführt (Eurofins Analytik, Hamburg). Die Daten belegen, dass der Acrylamid-Gehalt der Lebensmittel PFR, PFG und BK sich während der Lagerung nicht signifikant verändert. Zur Durchführung der Fütterungsversuche wurden für die geschnittenen und rekonstituierten Pommes frites Acrylamid-Gehalte von 2800 µg/kg sowie für Brotkruste 1400 µg/kg angenommen.

Tab. 6.1: Acrylamid-Gehalte in Pommes frites geschnitten (PFG), rekonstituiert (PFR) und Brotkruste (BK)

	Hersteller [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	euofins [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	euofins [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Datum	06/2007	06/2007	09/2007
PFG	2841 (DIL)	2800	2900
PFR	2847 (DIL)	2600	2800
BK	1294 (ILU)	1400	1400

Für den Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens wurden im Rahmen mehrmals durchgeführter Kontrollmessungen stark unterschiedliche Werte ermittelt (Tab. 6.2). Die in den jeweiligen Messungen untersuchten Lebkuchen stammten aus der gleichen Probe und waren gleich behandelt. Dazu wurden repräsentative Stichproben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, pulverisiert und anschließend auf Trockeneis an die jeweiligen Institute verschickt.

Tab. 6.2: Ermittelte Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens; A: Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung, Nuthetal; B: Eurofins Analytik, Hamburg; C: Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., Quakenbrück; D: Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Technische Universität München, Garching; E: Zentrallabor der deutschen Süßwarenindustrie, Bonn

Datum	Institut	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
02/07	A	3181
06/07	B	3600
07.09.07		4100
12.09.07		4500, 4700
10/07	A	3550
	C	3700
	D	4200
	E	4250
11/07	D	LC-MS: 3500, 3700; GC-MS: 5400
05/08	C	4100
	A	3500
	D	LC-MS: 4000; GC-MS: 3700
11/08	eigene Messung	LC-MS: 6321 \pm 49

In Abhängigkeit von den Analysenergebnissen wurden zur Durchführung der Fütterungsversuche für den Acrylamid-Gehalt des Lebkuchens unterschiedliche Werte angenommen (Tab. 6.3).

Tab. 6.3: Mittlere Acrylamid-Gehalte des Lebkuchens (in Abhängigkeit von den vorliegenden Daten) zur Durchführung der Fütterungsversuche

Expositionsperiode [d]	Acrylamid-Gehalte [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	5400
3	3200
5	5400
7	3400
9	4063

6.1.2 Konditionierung der Tiere

Die männlichen Sprague-Dawley Ratten (Stamm Crl:CD(SD); 6-8 Wochen alt; Körpergewicht ~ 250 g) wurden nach Eintreffen und Anpassung an die Umgebungsbedingungen (22 °C; Tag-Nacht Rhythmus) über 10 Tage mit einer Acrylamid-armen Standarddiät (ssniff Spezialdiät; Bestimmung der Acrylamid-Gehalte durch EUROFINS Hamburg: < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$; eigene Messungen: $11 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$) an die Futteraufnahme und den Fresszyklus (bestimmte Menge in definiertem Zeitraum) im Stoffwechselkäfig gewöhnt. Nach nüchtern setzen der Tiere über Nacht im Gemeinschaftskäfig wurde jeweils an Einzeltiere im Stoffwechselkäfig 15 g Pelletfutter (Acrylamid-arm) verfüttert. Für die vollständige Futteraufnahme wurde ein Zeitraum von 3 Stunden gewährt. Danach wurden die Tiere wieder in die Gemeinschaftshaltung zurück verbracht und erhielten jeweils weitere 10 g Standarddiät pro Tier.

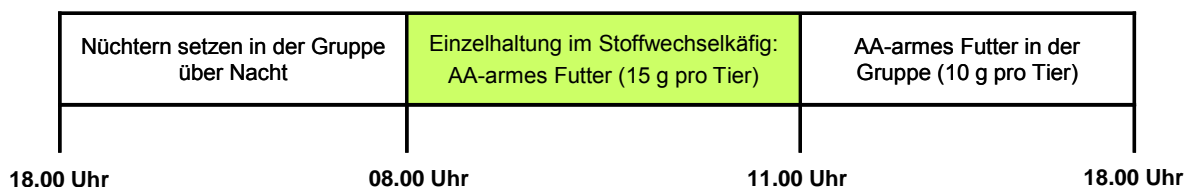


Abb. 6.2: Verlauf der Konditionierung

6.1.3 Behandlung der Tiere in der Hauptstudie

Pro Fütterungsperiode wurden jeweils 3 Tiere (Körpergewicht: 287 ± 16 g) aus den Gruppen Trinkwasserkontrolle (Schlundsondierung; AA-TW), Lebkuchen (LK), Pommes frites geschnitten (PFG) und Pommes frites rekonstituiert (PFR) (Tab. 6.4) mit $100 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG/d gleichzeitig behandelt. In der Brotkruste konnten auch nach Variation der Rezeptur (Zusatz von ABC-Trieb und von reduzierenden Kohlenhydraten) und des Backprozesses (Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung, Nuthetal) lediglich Gehalte von maximal $1400 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg generiert werden. Die täglich zugeführte Dosis wurde deshalb bei Brotkruste (BK) auf $50 \mu\text{g}$ Acrylamid/kg KG reduziert und die Trinkwasserkontrolle (Schlundsondierung; AA-TW) entsprechend angepasst. Bei den durchgeführten Versuchen wurden jeweils 3 Tiere als Negativkontrolle (TW) mitgeführt.

Tab. 6.4: Behandlungsgruppen der Fütterungsstudie

	Kontrolle (TW)	AA-haltiges Trinkwasser (AA-TW)	geschnittene Pommes frites (PFG)	rekonstituierte Pommes frites (PFR)	Lebkuchen (LK)	Brotkruste (BK)
AA-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			2800	2800	3200-5400	1400
Tägliche AA-Dosis [$\mu\text{g}/\text{kg}$ KG]		50 bzw. 100	100	100	100	50
Behandlung im Stoffwechsellkäfig	Trinkwasser und Standarddiät ad lib.	Trinkwasser ad lib.	Trinkwasser ad lib.			

Während des Behandlungszyklus in der Hauptstudie (Abb. 6.3) wurden die Tiere täglich gewogen, um die zu verabreichende Menge an Acrylamid-haltigem Lebensmittel bzw. Trinkwasser für die exakte Dosierung ermitteln zu können. Die Applikation des Acrylamid-haltigen Trinkwassers mittels Schlundsonde erfolgte unter leichter Narkose. Dazu wurden die Tiere im Exsikkator (Volumen: $\sim 5,8$ Liter) mit ca. 5 ml Isofluran, welches auf Zellstofftücher aufgebracht wurde, innerhalb 60 Sekunden narkotisiert. Die übrigen Behandlungsgruppen und Negativkontrollen wurden analog behandelt. Die Acrylamid-Dosis wurde den über Nacht nüchtern gesetzten Tieren der AA-TW-Gruppe über zwei Schlundsondierungen zum Zeitpunkt 0 und 1,5 Stunden nach Beginn der Fütterung verabreicht (je ca. 0,5 ml einer $17 \mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ Acrylamid-Trinkwasserlösung), um die Acrylamid-Aufnahme zeitlich den Fütterungsbedingungen anzunähern. Die Fütterung mit 4-11 g der Lebensmittel erfolgte im Stoffwechsellkäfig. Die Futteraufnahme erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von 3 Stunden. Anschließend erhielten die Tiere noch 15 g Acrylamid-arme Standarddiät (AA-

TW-Gruppe: 25 g) im Gemeinschaftskäfig. Art und Sequenz der Behandlung war für alle Gruppen gleich.

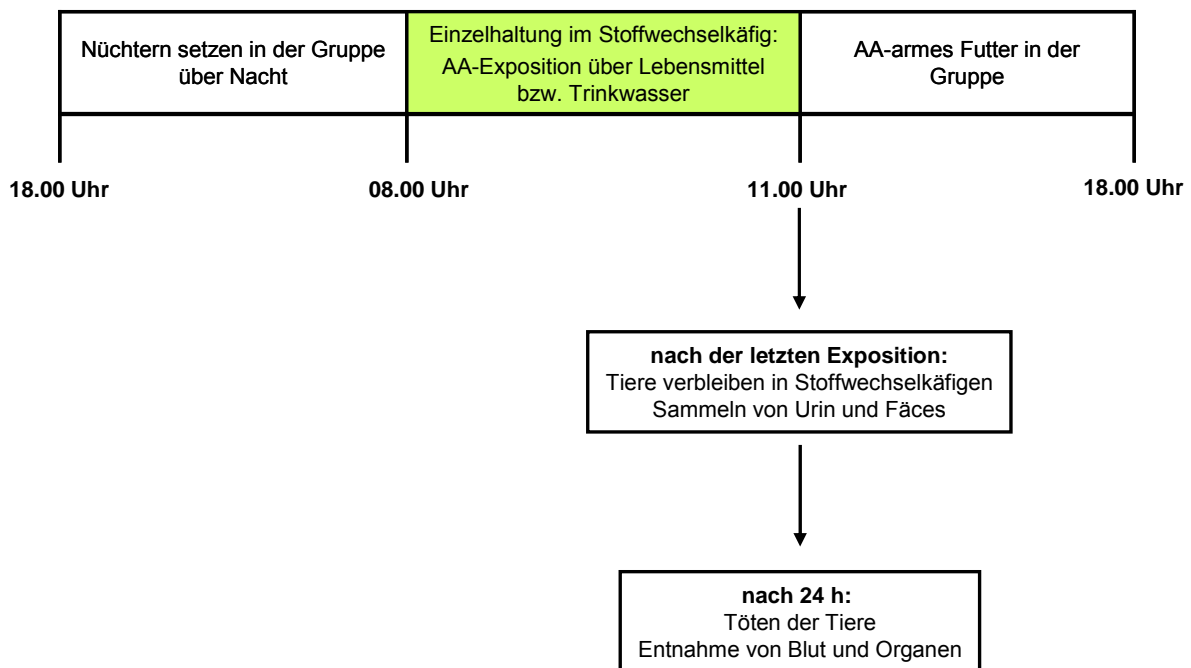


Abb. 6.3: Zeitzyklus der Fütterungsversuche

Nach der letzten Exposition verblieben die Versuchstiere zum Sammeln von Urin und Fäces in ihren Stoffwechselkäfigen und erhielten Acrylamid-arme Standarddiät und Trinkwasser ad lib. Nach 24 Stunden wurden die Versuchstiere durch cervikale Dislokation getötet und Blut sowie Organe entnommen.

6.1.4 Kumulative Dosis (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) und 10 mg Acrylamid/kg KG

Nach dem nüchtern setzen der Versuchstiere über Nacht wurde die kumulative Dosis aus der Fütterungsstudie (450 bzw. 900 µg Acrylamid/kg KG) an jeweils drei Versuchstiere durch Schlundsondierung mit ca. 0,5 ml (in Abhängigkeit von der Körpermasse) einer 250 µg/ml bzw. 500 µg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung verabreicht. 10 mg Acrylamid/kg KG wurden zwei Versuchstieren durch Schlundsondierung mit jeweils ca. 0,5 ml einer 5 mg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung appliziert. Die jeweiligen Schlundsondierungen wurden unter leichter Isofluran-Narkose durchgeführt. Die Versuchstiere verblieben für 24 Stunden im Stoffwechselkäfig, um Urin und Fäces zu sammeln. Anschließend wurden sie durch cervikale Dislokation getötet und Blut sowie Organe entnommen. Das Versuchsprotokoll entsprach im Übrigen der Behandlung mit Acrylamid-haltigem Trinkwasser in der Hauptstudie (Kap. 6.1.3).

6.1.5 Fütterungsversuch zur Bestimmung der Resorptionskinetik von Acrylamid und Glycidamid

Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik von Acrylamid wurden an jeweils vier Versuchstiere Einzeldosen von 100 µg Acrylamid/kg KG über geschnittene Pommes frites (PFG) bzw. Trinkwasser (Schlundsondierung) verabreicht. Die Gewinnung von Blutproben erfolgte bei jeweils drei Versuchstieren randomisiert zu den Zeitpunkten 30, 60, 120 und 240 min nach der Acrylamid-Aufnahme mittels retrobulbärer Punktion. Die Bestimmung der Hintergrundbelastung an Acrylamid und Glycidamid erfolgte bei drei Kontrolltieren. Das Versuchsprotokoll entsprach der Behandlung der Tiere in der Hauptstudie (Kap. 6.1.3).

6.1.6 Einfluss von Isofluran auf den Metabolismus von Acrylamid

Um den Einfluss des zur Narkotisierung verwendeten Isoflurans auf den Metabolismus von Acrylamid zu untersuchen, wurden an vier Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 100 µg Acrylamid/kg KG verabreicht. Nach dem nüchtern setzen der Versuchstiere über Nacht wurde die tägliche Dosis durch zwei Schlundsondierungen zum Zeitpunkt 0 und 1,5 Stunden mit ca. 0,5 ml (in Abhängigkeit von der Körpermasse) einer 25 µg/ml Acrylamid-Trinkwasserlösung appliziert. Bei zwei Versuchstieren wurden die jeweiligen Schlundsondierungen nach leichter Isofluran-Narkose durchgeführt, die beiden anderen Tiere wurden ohne Narkotisierung behandelt. Die Mercaptursäuren wurden nach den jeweiligen Applikationen im 24 Stunden Sammelurin bestimmt. Die Entnahme von Blut zur Bestimmung der Hb-Addukte erfolgte 24 Stunden nach der letzten Applikation. Das Versuchsprotokoll entsprach der Behandlung der Tiere in der Hauptstudie (Kap. 6.1.3).

6.2 Bestimmung von Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin Addukten im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Uwe Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität Köln wurden im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP450 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studien-Nr. KPUK-03-ACR/PIL-01) Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem endständigen Valin des Hämoglobin bestimmt. Ziel dieser Studie war es, die Rolle der CYP450 2E1-Aktivität bei der Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen zu charakterisieren. Daneben sollten Informationen zur Bedeutung der Glutathion-S-Transferasen beim Phase-II Metabolismus von Acrylamid und Glycidamid gewonnen werden. Dazu wurde in einer klinischen Studie der Konzentrations-Zeit-Verlauf von Acrylamid und seinen Metaboliten Glycidamid, AAMA und GAMA in Plasma und Urin, sowie von den Hämoglobin-Addukten nach Gabe Acrylamid-reicher Nahrung (Kartoffel-Chips) jeweils bei unbeeinflusster, gehemmter und induzierter CYP450 2E1-Aktivität bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss genetischer Varianten für CYP450 2E1 und Glutathion-S-Transferasen auf den Acrylamid-Metabolismus untersucht.

An der Studie nahmen 16 gesunde kaukasische Probanden (8 Männer; 8 Frauen) im Alter von 20-45 Jahren ($29,8 \pm 5,9$ Jahre) mit einem Body Mass Index von $22,9 \pm 2,0$ kg/m² teil. Um die Gesundheit der Probanden sicherzustellen wurden umfangreiche klinische Voruntersuchungen durchgeführt. Die Probanden wurden angewiesen 72 Stunden vor bis 48 Stunden nach einer Studienperiode auf Acrylamid-reiche und Methylxanthin-haltige Lebensmittel sowie Alkohol und jegliche Komedikation zu verzichten. Die stationäre Aufnahme erfolgte 11 Stunden vor bis 24 Stunden nach einer Studienperiode. Während dem stationären Aufenthalt erfolgte eine standardisierte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Dabei wurde 11 Stunden vor bis 6 Stunden nach Aufnahme der Kartoffel-Chips gefastet. Des Weiteren sollte 1 Stunde vor bis 6 Stunden nach der Administration keine Flüssigkeit aufgenommen werden und die Flüssigkeitsaufnahme wurde bis 72 Stunden post-Dosis auf maximal 3 Liter beschränkt.

Die klinische Studie wurde in Form eines offenen, monozentrischen und randomisierten „change-over“ Designs durchgeführt. Die vier Studienperioden sind mit einer Auswaschphase von jeweils 14 Tagen zwischen zwei Studienperioden getrennt.

Tab. 6.5: Studienperioden

Phänotypisierung (P-Phase)
orale Gabe von 250 mg Chlorzoxazon (Parafon Forte® DSC 500 mg; ½ Tablette) Bestimmung von Chlorzoxazon und des Metaboliten 6-OH-Chlorzoxazon pre-dose und 2 Stunden danach mittels HPLC
Referenzperiode (R-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) ohne Komedikation
Testperiode 1 (T1-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) 10 Stunden nach oraler Applikation von 500 mg Disulfiram (Antabus® 0,5 Dispergetten)
Testperiode 2 (T2-Phase)
Gabe von 150 g Kartoffelchips mit einem Gehalt von 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) nach täglicher Aufnahme von 48 ml Ethanol über 7 Tage in Form von Bier (jeweils 1 Liter Reissdorf Kölsch®)

In drei Studienperioden wurden jeweils 957-1000 µg Acrylamid (14,8 µg/kg KG) in Form von Kartoffelchips (150 g, 6230 ± 990 µg Acrylamid/kg) in Verbindung mit 240 ml Trinkwasser mit oder ohne Komedikation zur Bestimmung der Acrylamid-Toxikokinetik gegeben. In der Studienperiode „Phänotypisierung“ wurde das CYP450 2E1-Substrat Chlorzoxazon zur Bestimmung der CYP450 2E1-Aktivität gegeben (Tab. 6.5). Zur Hemmung der CYP450 2E1-Aktivität erhielten die Probanden 10 Stunden vor Aufnahme der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips eine einmalige orale Dosis von 500 mg Disulfiram (Antabus® 0,5 Dispergetten). Zur CYP450 2E1-Induktion nahmen die Probanden über einen Zeitraum von 7 Tagen jeweils abends ca. 48 ml Ethanol in Form von Bier (Reissdorf Kölsch, Privatbrauerei Heinrich Reissdorf & Co) auf.

Zur Bestimmung der Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukte wurden in drei Studienperioden (R-Phase, T1-Phase und T2-Phase) jeweils 3 min vor Einnahme der Acrylamid-reichen Nahrung sowie zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 12; 16 und 24 Stunden nach Gabe der Dosis Blutproben entnommen. Die Aufarbeitung der Blutproben wurde gemäß der in Kapitel 6.3 beschriebenen Methode bis zur Gewinnung des Hämolysates von Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie der Universität Köln durchgeführt. Die erhaltenen Hämolysate wurden bei -80 °C im Biofreezer gelagert und unter Kühlung mittels Trockeneis verschickt. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden gemäß Kapitel 6.3 an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid bei 13 Probanden in Blutproben der Referenzperiode und den Testperioden 1 und 2 jeweils zu den Zeitpunkten pre-dose und 24 Stunden mittels GC/MS bestimmt.

Weiterhin wurde bei 3 Probanden die Acrylamid-Hämoglobinadduktbildung zu den Zeitpunkten pre-dose, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 Stunden in den jeweiligen Studienperioden mittels HPLC-MS/MS untersucht. Die randomisierte Abfolge der Studienperioden der untersuchten Probanden ist in Tab. 6.6 gezeigt.

Tab. 6.6: Randomisierte Abfolge der Studienperioden

Proband	Abfolge der Studienperioden			
	1.	2.	3.	4.
1	R	P	T2	T1
2	T1	R	P	T2
3	T1	T2	P	R
5	T2	T1	R	P
6	P	R	T1	T2
8	R	T1	T2	P
9	R	P	T2	T1
11	T1	T2	P	R
12	P	T2	T1	R
13	T1	R	P	T2
14	P	T2	T1	R
15	T2	P	R	T1
16	T2	P	R	T1

6.3 Isolierung und Aufreinigung von Hämoglobin aus Human- und Rattenvollblut

Die frisch gewonnenen Blutproben können bis zur weiteren Verarbeitung für bis zu zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad aufbewahrt werden. Zur Abtrennung des Blutplasmas werden 0,5-2 ml Vollblut für 5 min bei 2400 rpm (800 x g) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Entfernen des Plasmas (Überstand) werden die Erythrocyten (Pellet) dreimal mit 1-2 ml 0,9 %-iger Natriumchloridlösung gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation für drei Minuten bei 2400 rpm (800 x g) und RT. Nach Zugabe von 2 ml H₂O_{bidest} werden die Proben gevortext und für mindestens 2 Stunden tiefgefroren (-30 °C). Nach dem Auftauen und erneuten Vortexen werden zu dem Hämolysat 10 ml einer 50 mM HCl in 2-Propanol gegeben und zur Extraktion des Hämoglobins kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm (3500 x g) und RT wird der Überstand in 50 ml

Falcons überführt und nach Zugabe von 8 ml Ethylacetat zur vollständigen Ausfällung des Hämoglobins für mindestens zwei Stunden bei 4 °C gelagert. Danach wird für drei Minuten bei 3000 rpm (1250 x g) und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Hämoglobin-Pellet wird zweimal mit je 5 ml Ethylacetat und zweimal mit je 5 ml n-Hexan gewaschen, wobei die Waschflüssigkeiten jeweils nach Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 rpm (1250 x g) und RT abdekantiert werden. Die erhaltenen Hämoglobin-Pellets werden zur Trocknung über Nacht im Abzug aufbewahrt.

6.4 Bestimmung der Hämoglobin-Addukte von Acrylamid und Glycidamid mittels GC-MS

6.4.1 Hämoglobin-Derivatisierung und Flüssig-Flüssig-Extraktion der PFPTHs

Es werden ca. 50 mg Hämoglobin in Kunststoffvials (13 ml) eingewogen und in 3 ml Formamid durch vortexen gelöst. Nach Zugabe von 40 µl NaOH und 20 µl PFPITC werden die Proben für 24 Stunden auf der Schüttelapparatur gelagert. Anschließend wird für 90 min bei 45 °C im Schüttelwasserbad vollständig derivatisiert. Nach Zugabe der internen Standards AA- bzw. GA-D₇ValPFPTH (9,9 bzw. 9,5 pmol absolut) und vortexen werden die Proteine mittels 400 µl gesättigter NaCl-Lösung gefällt. Durch Extraktion mit 2 x 3 ml Diethylether und vortexen werden die PFPTHs extrahiert, wobei nach jedem Extraktionsschritt eine Zentrifugation für 3 min bei 5700 rpm (4500 x g) und RT erfolgt. Die erhaltenen Diethylether-Phasen werden in 15 ml Falcons vereinigt und im N₂-Strom eingengt. Zur Acetonisierung des GAValPFPTHs wird der Überstand in 200 µl frisch hergestelltem saurem Aceton (1 % H₂SO₄ konz.) aufgenommen, gevortext und über Nacht bei RT gelagert. Nach Neutralisation mit 300 µl NaHCO₃-Lsg. (0,1 M) werden 1,5 ml Toluol zugeben und gevortext. Zur Verbesserung der Phasentrennung wird für eine Minute bei 3000 rpm (1250 x g) und RT zentrifugiert. Die erhaltene Toluol-Phase wird mit 2 x 2 ml H₂O_{bidest} gewaschen (Vortex), wobei nach jedem Waschschrift für eine Minute bei 3000 rpm (1250 x g) und RT zentrifugiert wird. Die Toluol-Phase wird nach dem Waschen in Eppis überführt und im N₂-Strom getrocknet. Nach dem Trocknen können die Proben bei -30 °C gelagert werden. Vor der Messung wird der Rückstand in 100 µl Toluol aufgenommen und gevortext. Nichtlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm (9500 x g) und Raumtemperatur abgetrennt. Zur Messung wird der Überstand anschließend in 1,5 ml Braunglasvials mit 300 µl Glaseinsätzen überführt.

6.4.2 GC-MS

Die Messungen wurden mit einem Agilent 6890/5973 inert Quadrupol GC-MS Gerät mit PTV (Programmable Temperature Vaporizer)-Injektor im Pulsed Splitless Modus in Verbindung mit der Steuerungssoftware ChemStation durchgeführt. Die Ionisierung der Analyte erfolgte mittels negativer chemischer Ionisation mit Methan als Reaktantgas. Die gaschromatographische Trennung erfolgte auf einer unpolaren DB-XLB-Säule. Tab. 6.7 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Massenspuren der Analyte und internen Standards sowie die Messparameter. Die Gesamtdauer für eine Analyse lag bei 22 min. Zur Schonung des Detektors erfolgte die Detektion bei AAVaIPFPTH- und AAD₇VaIPFPTH zwischen 17 und 18 min; bei acGAVaIPFPTH- und acGAD₇VaIPFPTH zwischen 18 und 19 min. Die Validierung der Methode wurde im Rahmen der Dissertation von Daniel Bertow durchgeführt [Bertow, 2008]. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN-Vorschrift 32645 bestimmt und betragen 0,4 bzw. 3,1 fmol für AAVaIPFPTH sowie 1,6 bzw. 8,0 fmol für acGAVaIPFPTH (Angaben als absolute Stoffmengen).

Tab. 6.7: Messparameter GC-MS

Massenspuren der Analyte und internen Standards [m/z]	
AAVaIPFPTH	375
AAD₇VaIPFPTH	382
acGAVaIPFPTH	431
acGAD₇VaIPFPTH	438
MS-Parameter	
Detektion	Selected Ion Monitoring (SIM)
Dwell-Time	70 ms
Ionisierungsenergie	70 eV
Ionenquellentemperatur	150 °C
Quadrupol-Temperatur	150 °C
Reaktantgas	Methan-Fluss: 45 %
Solvent Delay	15 min
GC-Parameter	
Injektionsvolumen	1 µl
PTV-Injektor	250 °C
Flow	1,3 ml/min (13,7 psi)
Pulsed pressure	30 psi für 1 min
Säulenofen	90 °C für 1 min; mit 25 °C/min auf 120 °C; mit 10 °C/min auf 240 °C; mit 25 °C/min auf 310 °C; halten für 5 min
Interface	280 °C

6.5 HPLC-MS/MS

6.5.1 Allgemeines

Die HPLC-MS/MS Messungen der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Tripel-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer API 2000 bzw. API 3200 (Applied Biosystems) in Verbindung mit Elektronenspray-Ionisation (ESI) durchgeführt. Das Tuning und die Kalibrierung der Massenspektrometer erfolgte mit Polypropylenglykol (PPG)-Standards (Applied Biosystems). Eine Übersicht der verwendeten PPG-Standards in Abhängigkeit von Gerätetyp und Polarisierung ist in Tab. 6.8 gezeigt.

Tab. 6.8: Verwendete PPG-Standards für Tuning und Kalibrierung

	ESI positiv	ESI negativ
API 2000	PPG	PPG 3000
API 3200	PPG (1/10 Verdünnung)	PPG 3000

6.5.1.1 Tuning und Kalibrierung

Unter Tuning versteht man die Einstellung des Auflösungsvermögens des Massenspektrometers. Dabei wird insbesondere die Peak-Breite (width) und -Schärfe mit Hilfe von PPGs optimiert, um für die zu bestimmende Substanz eine maximale Sensitivität zu erreichen. Dabei ist zu beachten, dass bei höherer Auflösung die Sensitivität abnimmt. Unter optimalen Bedingungen sollte für API 2000 und API 3200 die Peakbreite zwischen 0,6 und 0,8 amu bei 50 % der maximalen Peakhöhe liegen, was für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HPLC-MS/MS Messungen sichergestellt wurde.

Die Kalibrierung soll die korrekte Zuordnung von massenspektrometrischen Signalen zu einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis bei akzeptabler Massenverschiebung (mass shift) gewährleisten. Die Kalibrierung der verwendeten HPLC-MS/MS Systeme erfolgte mittels spezifischer Fragmentationen der PPG-Standards.

6.5.1.2 Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter

Zur Erzielung einer maximalen Sensitivität wurden sowohl die substanz- als auch die quellenspezifischen Parameter der jeweiligen Analyte in Verbindung mit den entsprechenden HPLC-Bedingungen optimiert. Abb. 6.4 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Tandem-Massenspektrometer mit den zu optimierenden Parametern.

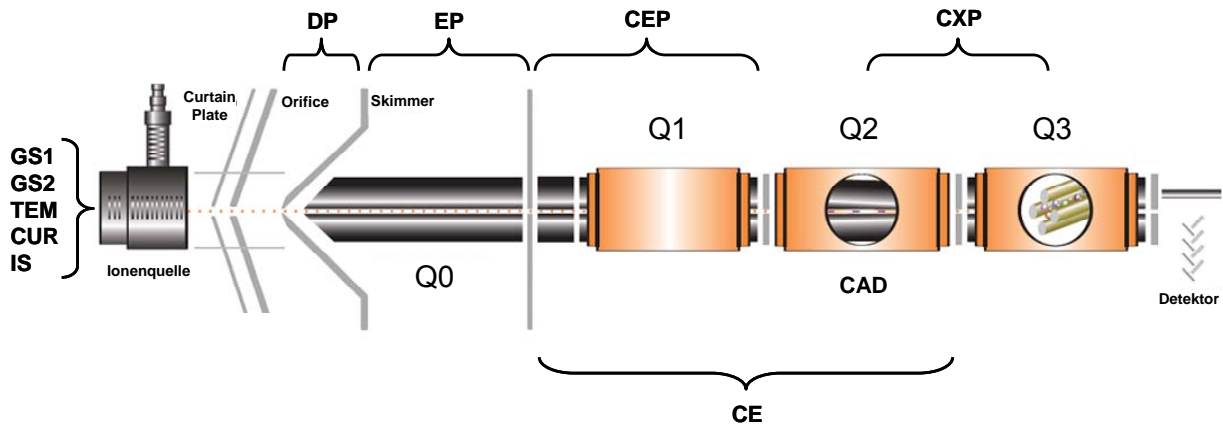


Abb. 6.4: Schematische Darstellung eines Tandem-Massenspektrometers (API 3200); Erläuterung der Abkürzungen siehe Tab. 6.9 bzw. 6.10, modifiziert nach [Applied Biosystems, 2008]

Die analytabhängigen Parameter des Massenspektrometers DP, EP, CEP, CE, CAD und CXP wurden mittels des „Quantitative Optimization“-Tools der Analyst Software 1.4.2 in Verbindung mit der Spritzenpumpe (Flow: 10 µl/min) optimiert. Tab. 6.9 zeigt die optimierten Parameter und deren Funktion.

Tab. 6.9: Analytabhängige Parameter

Parameter	Funktion
DP (Declustering Potential)	Potential zwischen Skimmer und Orifice: Minimierung von Lösungsmittel-Analyt-Clustern
EP (Entrance Potential)	Transport und Fokussierung von Ionen in Q0
CEP (Collision Cell Entrance Potential)	Potential zwischen Q0 und Q2-Eingang: Fokussierung von Ionen in Q2
CE (Collision Energy)	Potential zwischen Q0 und Q2 zur Steuerung der Kollisionsenergie
CAD-Gas (Collision Activated Dissociation)	Gasdruck des Kollisionsgases (N ₂) in Q2
CXP (Collision Cell Exit Potential)	Potential zwischen Q2 und Q3: Überleitung der Ionen von Q2 nach Q3

Die quellspezifischen Parameter wurden mittels des FIA (Flow Injektion Analysis)-Tools der Analyst 1.4.2 Software optimiert. Dabei ist es notwendig anhand der Retentionszeiten der Analyten die Zusammensetzung des Fließmittels zum Zeitpunkt der Elution zu ermitteln. Anschließend wird unter isokratischen Bedingungen mit der entsprechenden Fließmittelzusammensetzung und Flussrate der Analyt unter wechselnden Quellenparametern mittels Loop-Injektion injiziert (ohne HPLC-Säule), um eine maximale Signalintensität zu erreichen. Tab. 6.10 gibt einen Überblick über die optimierten Parameter und deren Funktion.

Tab. 6.10: Quellenspezifische Parameter

Parameter	Funktion
GS1 (Gas 1)	Vernebelungsgas (N ₂): bildet kleine Fließmittel-Tropfen; beeinflusst Spray-Stabilität und Sensitivität
GS2 (Gas 2)	Hilfs-/Turbo-Gas (N ₂): Verdampfung der Spray-Tropfen
TEM (Temperatur)	Temperatur des Hilfs-/Turbo-Gases: steigert Verdampfung der Spray-Tropfen und damit Bildung von Analyt-Ionen in der Gasphase
CUR (Curtain Gas)	Gasfluss zwischen Curtain Plate und Orifice: schützt Ionenoptik vor Kontamination
IS (IonSpray Voltage)	Potential der Spray-Nadel: ionisiert Probe

6.5.1.3 Quantifizierung der Analyte mittels isotope markierter interner Standards

Die Quantifizierung der Analyte in der vorliegenden Arbeit erfolgte mit isotope markierten internen Standards (IS), bei denen ein oder mehrere Atome des Moleküls durch stabile Isotope höherer Masse substituiert sind. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zeigen Analyt und isotope markierter interner Standard nahezu identische chemische und physikalische Eigenschaften. Daher kann bei der Probenaufarbeitung, Chromatographie, Ionisierung und Detektion angenommen werden, dass sich Analyt und interner Standard gleich verhalten. Zur Ermittlung der Kalibrierfunktionen werden Verdünnungsreihen der Analyten hergestellt, die stets die gleiche Menge internen Standard enthalten. Dabei werden die erhaltenen Peakflächenverhältnisse des Analyten zum internen Standard gegen die entsprechenden Stoffmengenverhältnisse aufgetragen, woraus die Geradengleichung der Kalibriergerade resultiert.

6.5.1.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze ist definiert als die kleinste Konzentration einer Verbindung, die mit einem Analyseverfahren noch detektiert werden kann, wobei man von einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ausgeht [Hädrich und Vogelsang, 1996]. Die Bestimmungsgrenze ist meist das Doppelte der Nachweisgrenze und legt den untersten Wert fest, der noch reproduzierbar quantifiziert werden kann. Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Verdünnungen der Analyte hergestellt und die Peakhöhe gegen die Konzentration aufgetragen. Aus den Regressionsgeraden lassen sich durch Einsetzen des jeweiligen Hintergrundrauschens die zugehörigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

6.5.2 Bestimmung der Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid mittels HPLC-ESI-MS/MS

6.5.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS)

Die Messung der Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Addukte wurde mittels des API 3200 HPLC-MS/MS-Systems durchgeführt. Zur Überprüfung der Ionisierung und Fragmentierung von AAVaI- bzw. GAVaIPFPTH im Elektrospray wurden bei der Etablierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode zunächst die Molekül- und Fragmentationen der AAVaI- und GAVaIPFTHs identifiziert.

Dazu wurden mit Standardlösungen der Konzentration 10 µg/ml bei konstantem Flow (Spritzenpumpe: 10 µl/min) Scans im Bereich von 150-420 m/z sowohl im negativen als auch positiven Ionisationsmodus durchgeführt. Da die Molekül- und Fragmentationen im negativen Ionisationsmodus deutlich höhere Intensitäten zeigten, wurden diese für die Etablierung der HPLC-ESI-MS/MS-Methode herangezogen. In Abb. 6.5 und 6.6 sind die Molekül- bzw. Produktionen von AAVaIPFPTH bzw. AAD₇VaIPFPTH, in Abbildung 6.7 und 6.8 von GAVaIPFPTH bzw. GAD₇VaIPFPTH gezeigt.

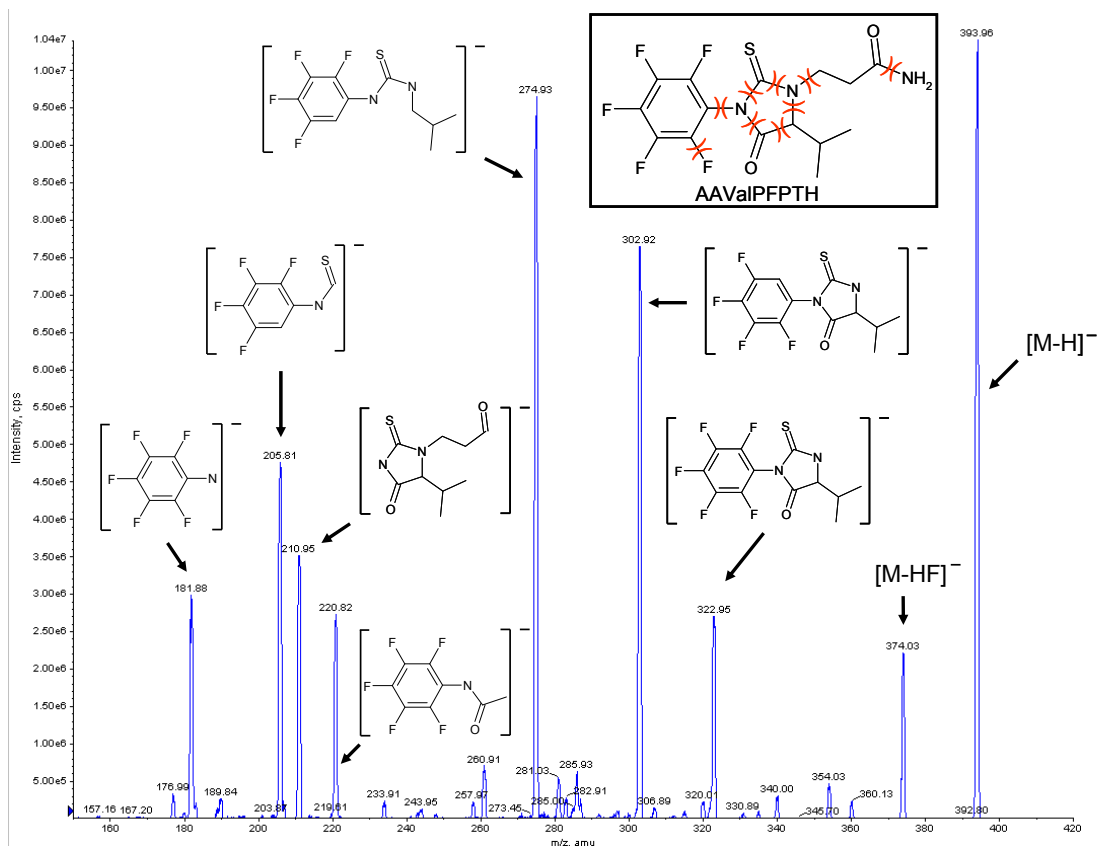


Abb. 6.5: Molekül- und Fragmentationen von AAVaIPFPTH

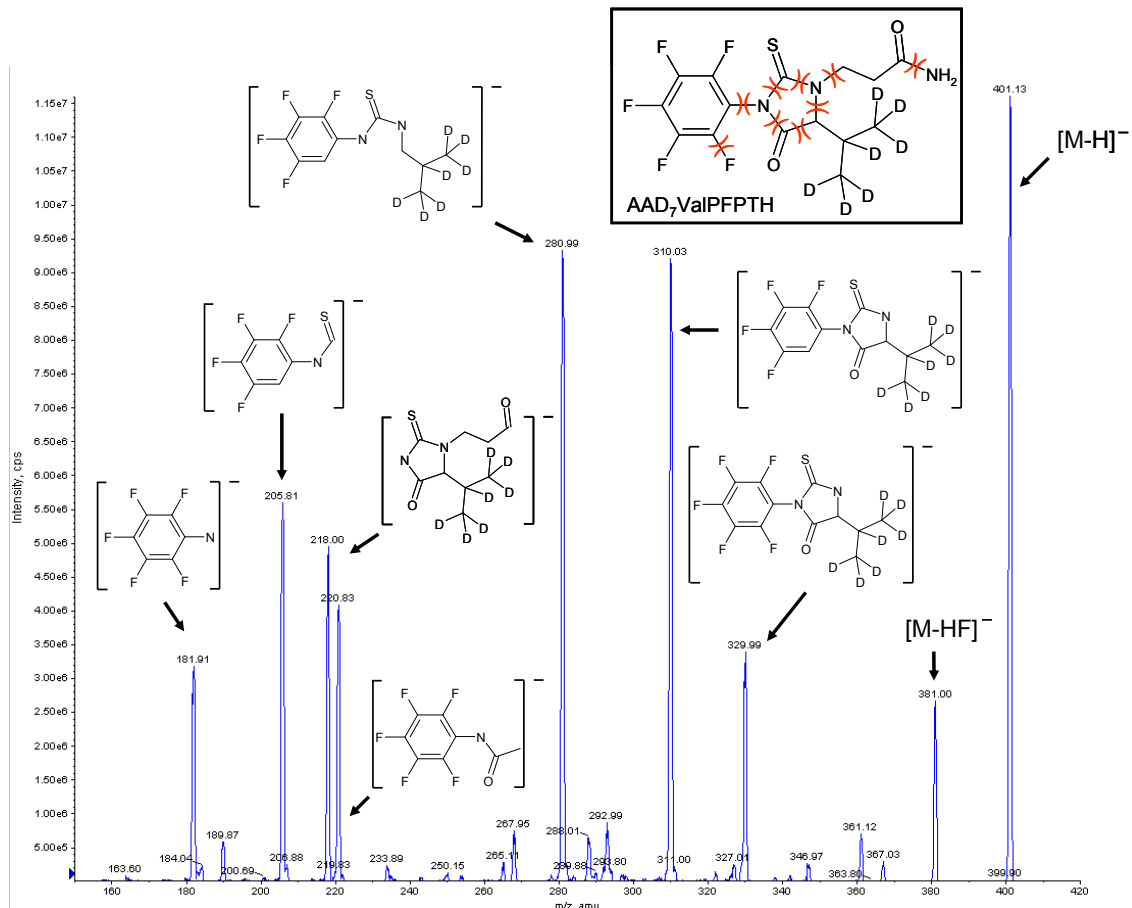


Abb. 6.6: Molekül- und Fragmentationen von AAD₇ValPFPTH

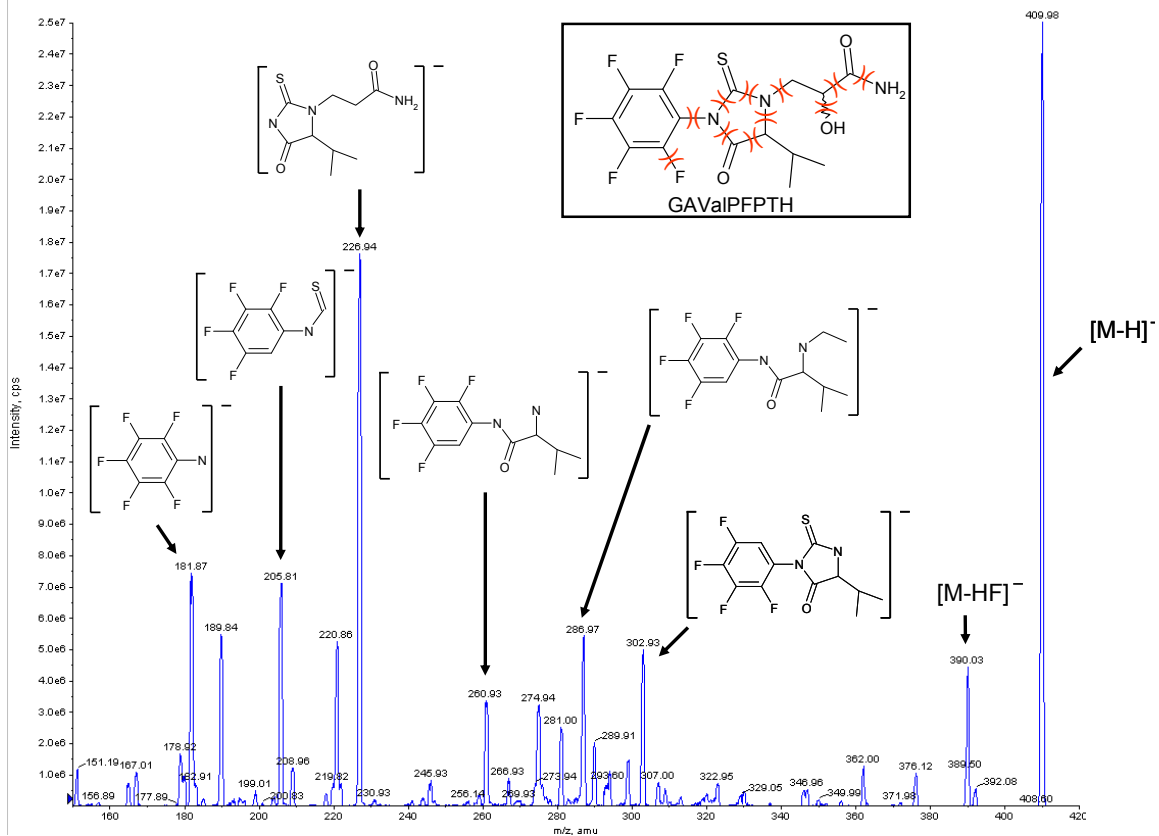


Abb. 6.7: Molekül- und Fragmentationen von GAValPFPTH

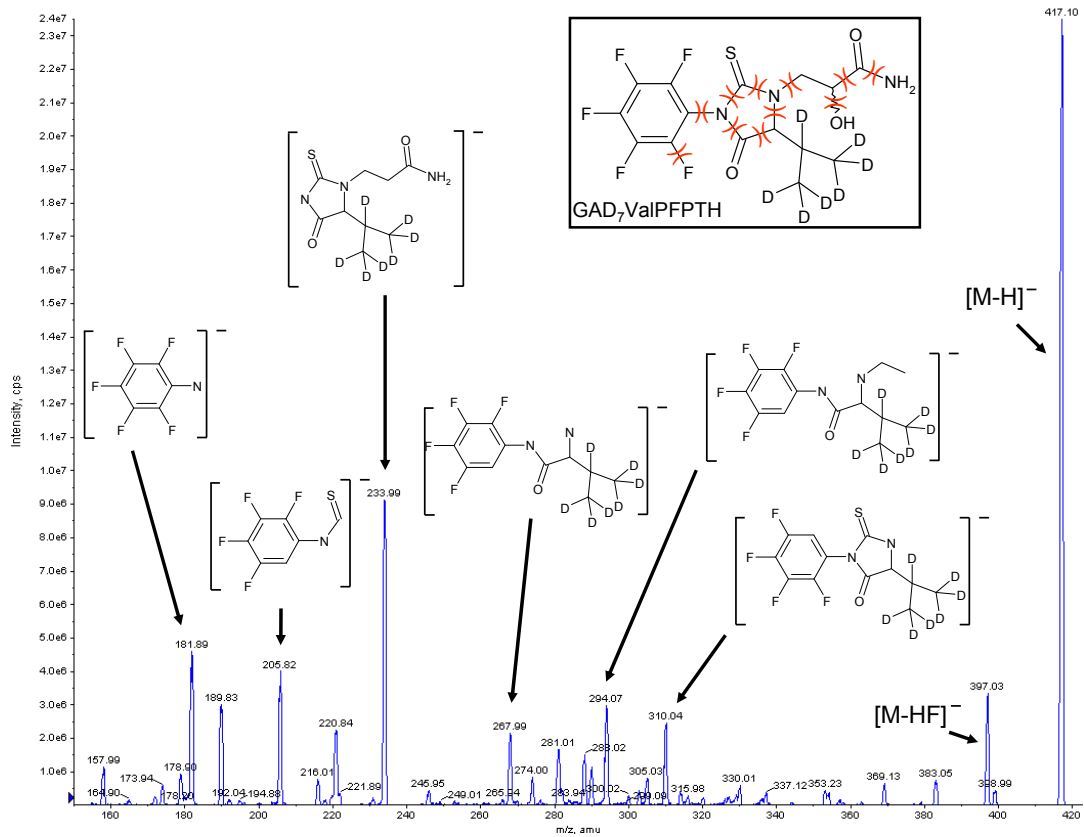


Abb. 6.8: Molekül- und Fragmentionen von GAD₇ValPFPTH

Zur Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter wurden Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml in Methanol verwendet. Aufgrund der relativ hohen Intensitäten wurden die in Tab. 6.11 gezeigten Molekül (Q1)- und Fragment (Q3)-Ionen sowie die dargestellten optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter der Analyte bzw. internen Standards zur Etablierung der MRM-Methode herangezogen. Da aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Analyt und internem Standard kaum Unterschiede in den substanz- und quellenspezifischen Parametern vorhanden waren, wurden für den internen Standard die optimierten Parameter des Analyten verwendet.

Tab. 6.11: Übersicht über die verwendeten m/z-Verhältnisse der Molekül- und Fragmentionen sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter

	AAValPFPTH	AA ₇ ValPFPTH	GAValPFPTH	GA ₇ ValPFPTH
Q1	394,0	401,0	410,1	417,0
Q3	274,8	280,9	227,0	234,0
substanzspezifische Parameter [Volt]				
DP	-45		-50	
EP	-4		-4,5	
CE	-36		-22	
CXP	-18		-4	
CEP	-22		-28	
quellenspezifische Parameter				
CUR [psi]	20			
CAD [psi]	3			
IS [kV]	-4500			
TEM [°C]	450			
GS 1 [psi]	25			
GS 2 [psi]	30			
Dwell time [ms]	150			

6.5.2.2 Chromatographie der PFPTHs

Durch die Verwendung einer Phenomenex Luna C18 (2) RP-Säule (150 x 2 mm; 3 µm) konnten die Analyten AAValPFPTH und GAValPFPTH basisliniengetrennt werden. Die Elution erfolgte mittels des in Tab. 6.12 gezeigten Gradienten bei einem Flow von 0,2 ml/min. Um die Trennleistung der Säule zu erhalten und um Matrixeinflüsse auf die Analytsignale von aufeinanderfolgenden Messungen zu verhindern, wurde ein Spülprogramm integriert. Zum Schutz des Massenspektrometers vor Verunreinigungen wurde mit Hilfe des integrierten Valco Valve der Eluent zwischen 10 und 14 min in die Ionenquelle überführt.

Tab. 6.12: Gradientenelution der PFPTHs von Acrylamid und Glycidamid, Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure; B: Acetonitril

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Initial	60	40
1	60	40
10	20	80
22	20	80
30	60	40

6.5.2.3 Hämoglobin-Derivatisierung und Festphasenextraktion (SPE)

Es wurden ca. 25 mg Hb (Isolierung von Hb s. Kap. 6.3) in Kunststoffvials (13 ml) eingewogen und in 1,5 ml Formamid durch vortexen gelöst. Nach Zugabe von 20 µl NaOH (1 M) und 10 µl PFPICT wurden die Proben für 90 min bei 45 °C im Schüttelwasserbad derivatisiert. Zur internen Kalibrierung wurden anschließend 10 µl der Standardlösungen (50 ng/ml-2 µg/ml) hinzugegeben. Die Ausfällung der Proteine erfolgte mit 400 µl gesättigter NaCl-Lösung und 3 ml H₂O_{bidest.} Nach dem Vortexen wurden die Proben für 30 min bei 5000 rpm (3500 x g) und RT zentrifugiert und der erhaltene Überstand mittels SPE aufgereinigt und aufkonzentriert.

Die Konditionierung der SPE-Säule erfolgte mit 2 ml MeOH, 2 ml H₂O_{bidest} und 1 ml eines Formamid/Wasser-Gemisches (Verhältnis 50:50 v/v). Nach der Probenaufgabe wurde mit 1 ml H₂O_{bidest} und 1 ml eines MeOH/Wasser-Gemisches (Verhältnis 50:50 v/v) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1,5 ml MeOH in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Das benötigte Vakuum zum Absaugen wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe hergestellt. Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung des Eluates im Stickstoffstrom auf circa 100 µl und die dabei ausfallenden Proteine wurden durch Zentrifugieren bei 5000 rpm (3500 x g) für 30 min abgetrennt. Die Lösung wurde mittels HPLC-MS/MS vermessen, wobei das Injektionsvolumen in Abhängigkeit von dem verbleibenden Probevolumen bei 30-90 µl lag.

6.5.2.4 Linearität/Kalibriergerade PFPTHs

Zur Überprüfung der Linearität und Bestimmung der Kalibriergeraden wurden Standardlösungen mit 5-1000 ng/ml AAVaIPFPTH bzw. GAVaIPFPTH vermessen, in denen stets die gleiche Konzentration der internen Standards AAD₇VaIPFPTH und GAD₇VaIPFPTH (100 ng/ml) enthalten war.

6.5.2.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden von AAVaIPFPTH und GAVaIPFPTH methanolische Lösungen der Konzentrationen 0,5-50 ng/ml hergestellt und davon jeweils 10 µl mittels HPLC-MS/MS vermessen. Nach Auftragung der Peakhöhe gegen die Konzentration ergaben sich die im Anhang gezeigten Regressionsgeraden.

Aus den Regressionsgeraden lassen sich durch Einsetzen des Hintergrundrauschens (20 cps) die in Tab. 6.13 gezeigten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

Tab. 6.13: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen AAVaIPFPTH bzw. GAVaIPFPTH (absolute Stoffmengen)

	AAVaIPFPTH	GAVaIPFPTH
Nachweisgrenze [fmol]	12	30
Bestimmungsgrenze [fmol]	25	59

6.5.2.6 Wiederfindung und Identifizierung von Matrixeffekten

Zur Bestimmung der Wiederfindung der SPE-Methode und Identifizierung von Matrixeffekten wurden als Referenzprobe zu je 190 µl MeOH jeweils 10 µl einer Standardlösung (AAD₇VaIPFPTH + GAD₇VaIPFPTH, 5 µg/ml) gegeben (n = 3). Zur Identifizierung von Matrixeffekten wurden ca. 25 mg Hb eingewogen und nach Zugabe von 1,5 ml Formamid, 20 µl NaOH (1 M) und 10 µl PFPITC im Schüttelwasserbad für 90 min bei 45 °C derivatisiert. Nach dem Versetzen mit internem Standard (10 µl; 5 µg/ml) wurden 200 µl NaCl (gesättigt) und 1,5 ml H₂O_{bidest} zugegeben, zentrifugiert (30 min; 5000 rpm (3500 x g)) und mittels SPE (Kap. 6.5.2.3) aufgereinigt. Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln wurden drei weitere Proben mit der gleichen Menge IS versetzt wie die Referenzprobe und anschließend ohne Zugabe von Hb und PFPITC analog der Proben zur Identifizierung von Matrixeffekten aufgearbeitet. Nach dem Einengen der Proben unter N₂ wurden diese auf ein Volumen von 200 µl eingestellt und mittels HPLC-MS/MS vermessen (Injektionsvolumen: 10 µl). Zur Bestimmung der Wiederfindung und Identifizierung von Matrixeffekten wurden die Peakflächen der internen Standards jeweils mit den Peakflächen der Referenzproben ins Verhältnis gesetzt (Tab. 6.14).

Tab. 6.14: Wiederfindungsrate (WFR) der deuterierten PFPTHs nach SPE-Aufarbeitung von Standardlösungen und derivatisierten Proben, MW ± SD, n = 3

	WFR (Standardlösung)	WFR (Probe)
AAD₇VaIPFPTH	81 ± 14 %	57 ± 5 %
GAD₇VaIPFPTH	94 ± 13 %	22 ± 5 %

6.5.3 Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid

6.5.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS)

Die Bestimmung der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid wurde mit den API 2000 und API 3200 HPLC-MS/MS-Systemen durchgeführt. Zur Identifizierung der Molekül- und Fragmentationen wurden Scans im Bereich von 50-300 m/z mit Standardlösungen der Konzentration 100-250 ng/ml bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im negativen Ionisationsmodus durchgeführt. In Abbildung 6.9 und 6.10 sind die Molekül- bzw. Fragmentationen der Analyte AAMA bzw. GAMA und in Abbildung 6.11 und 6.12 der jeweiligen internen Standards D₃-AAMA bzw. D₃-GAMA gezeigt.

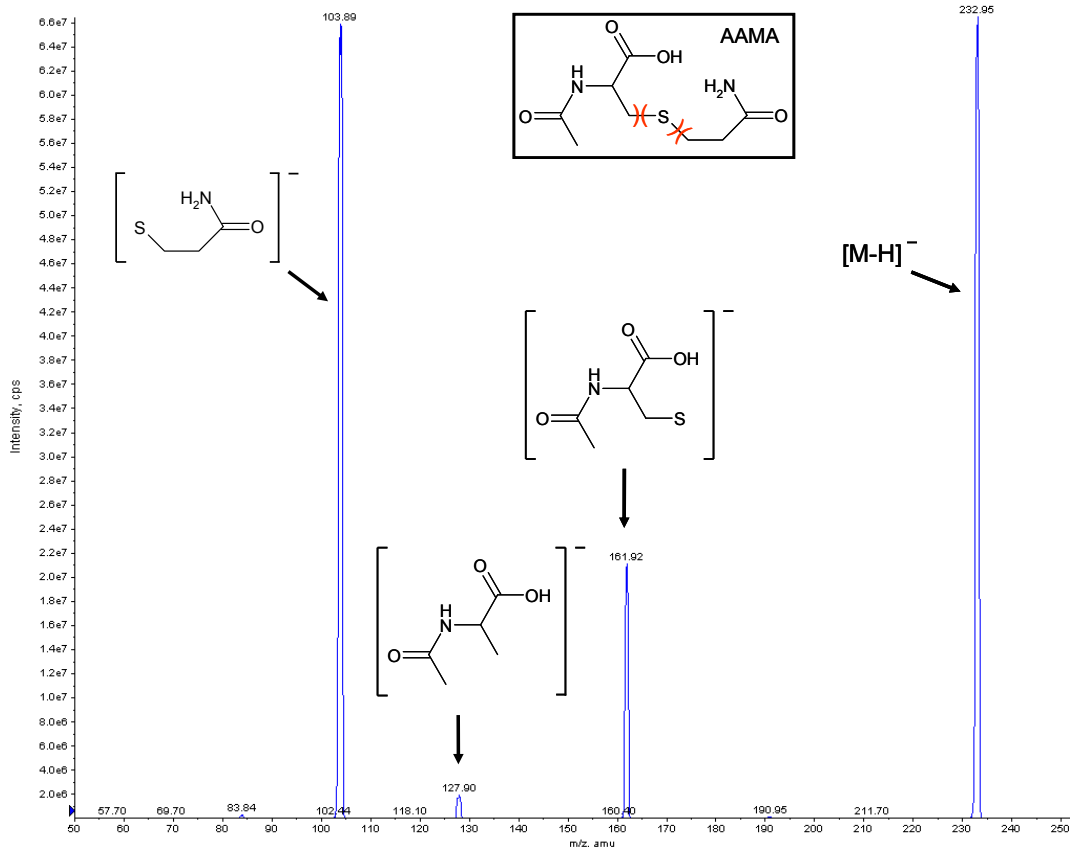


Abb. 6.9: Molekül- und Fragmentationen der Acrylamid-Mercaptursäure (AAMA)

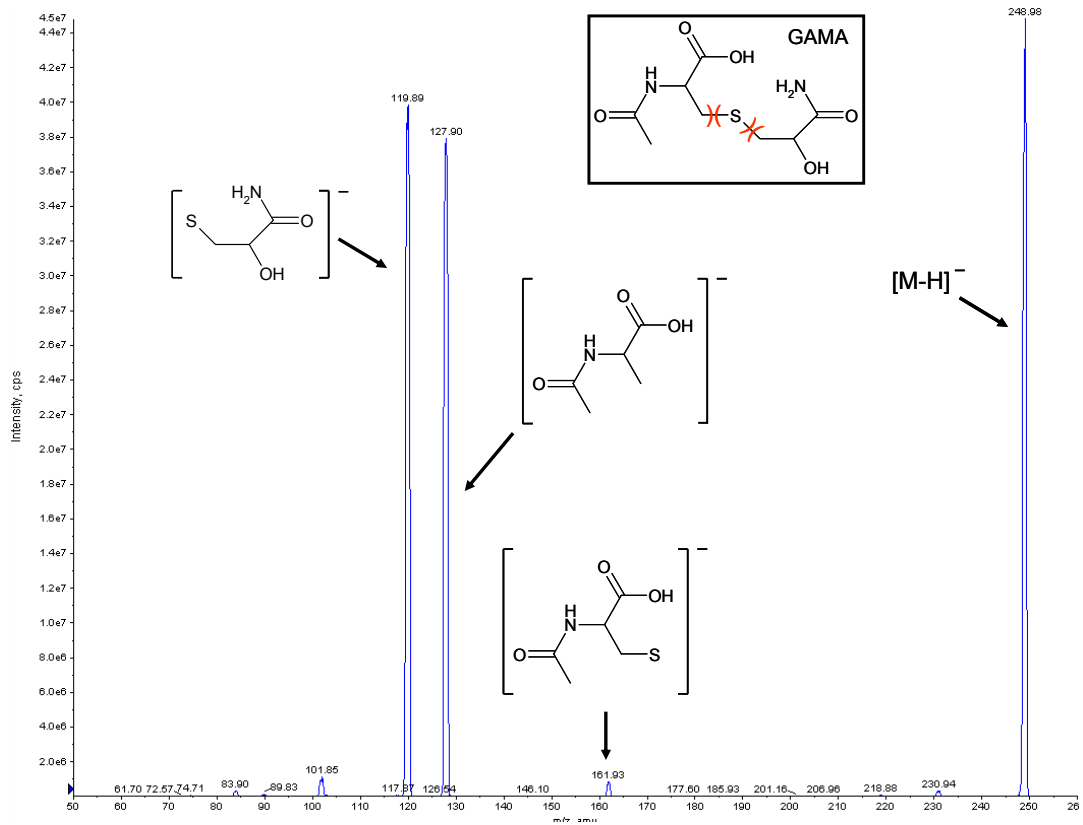


Abb. 6.10: Molekül- und Fragmentationen der Glycidamid-Mercaptursäure (GAMA)

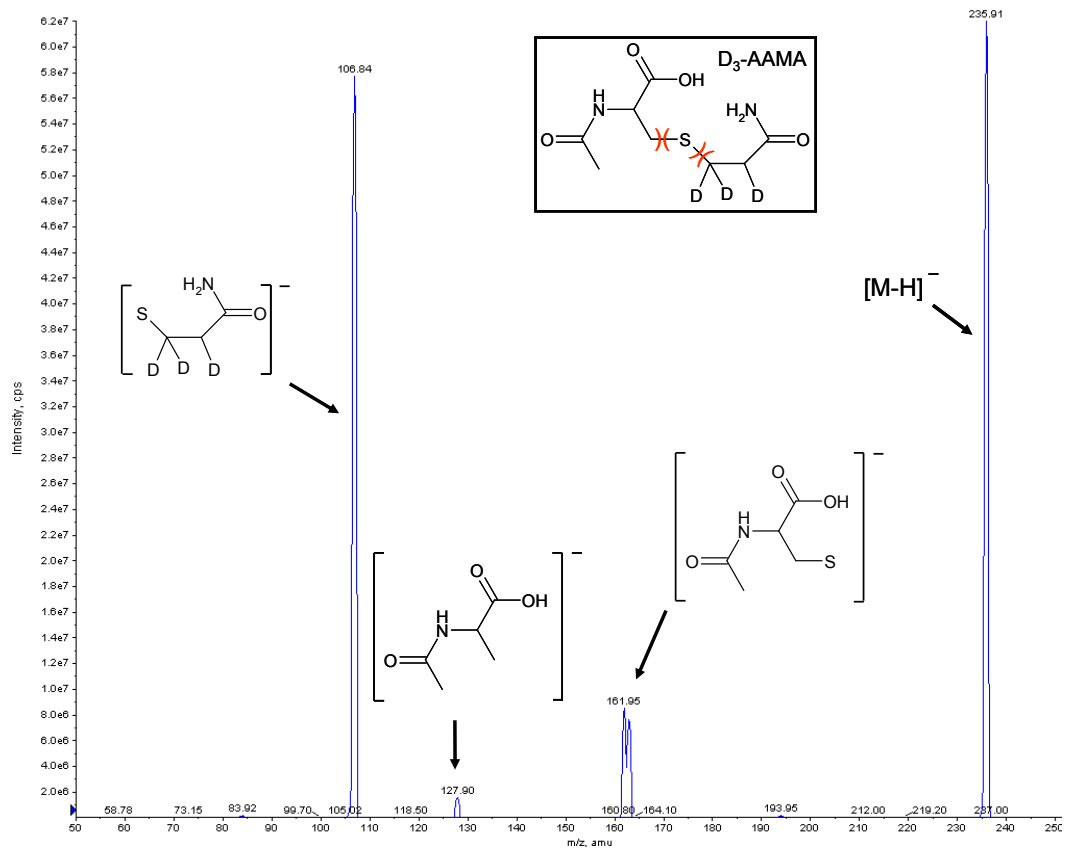


Abb. 6.11: Molekül- und Fragmentationen des internen Standards D_3 -AAMA

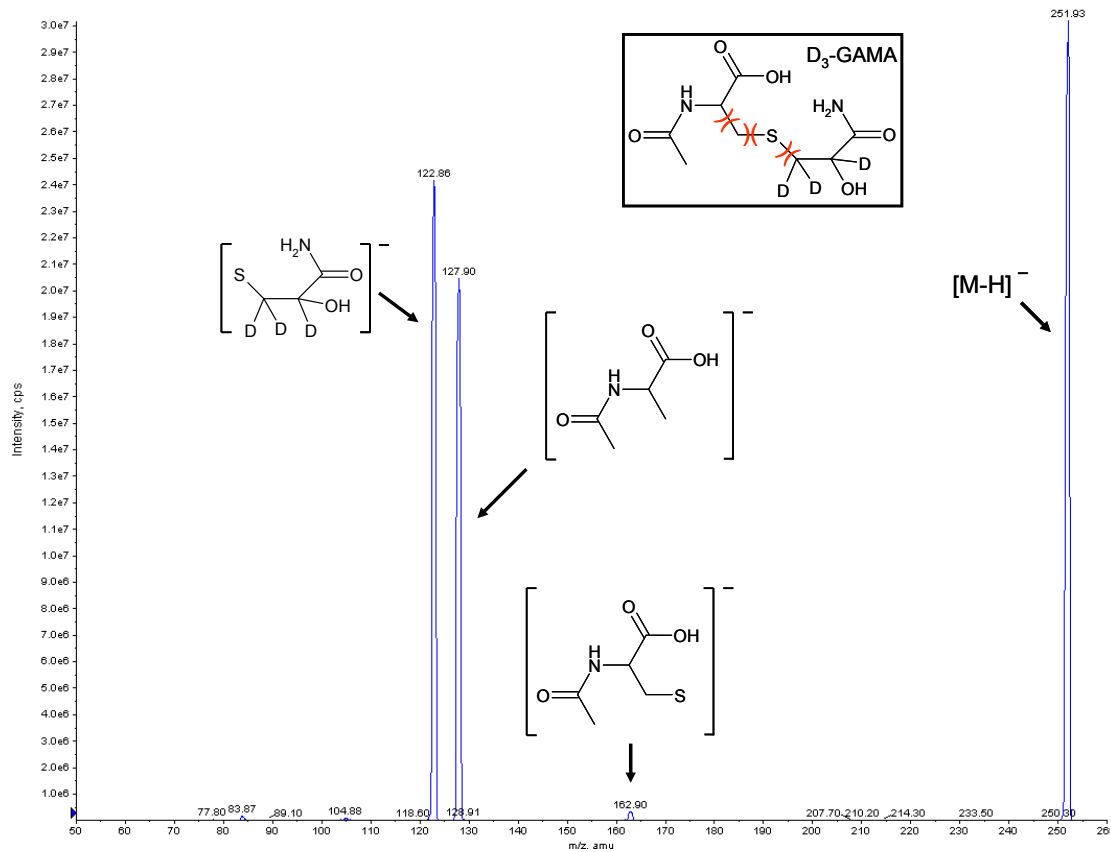


Abb. 6.12: Molekül- und Fragmentationen des internen Standards D₃-GAMA

Zur Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter wurden Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml Methanol verwendet (Spritzenpumpen-Flow: 10 µl/min), wobei die Optimierung des API 2000 HPLC-MS/MS-Systems mittels des Manual Tuning Tools der Analyst 1.4.1 Software manuell durchgeführt wurde. Aufgrund der relativ hohen Intensitäten wurden die in Tab. 6.15 und 6.16 gezeigten Molekül (Q1)- und Fragment (Q3)-Ionen sowie die dargestellten optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter der Analyte bzw. internen Standards zur Etablierung der MRM-Methode bei den HPLC-MS/MS-Systemen API 2000 bzw. API 3200 herangezogen. Generell wurden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Analyte und entsprechenden internen Standards keine wesentlichen Unterschiede in den substanz- und quellenspezifischen Parametern festgestellt. Deshalb erfolgte die Etablierung der API 2000 Methode für sämtliche Analyte und internen Standards mit identischen substanz- und quellenspezifischen Parametern.

Tab. 6.15: Übersicht über die verwendeten m/z-Verhältnisse der Molekül- und Fragmentionen der Analyte bzw. internen Standards sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter des API 2000 HPLC-MS/MS-Systems

	AAMA	D₃-AAMA	GAMA	D₃-GAMA
Q1	233,0	235,9	249,0	251,9
Q3	103,9	106,8	119,9	122,9
substanzspezifische Parameter [Volt]				
DP	-30			
EP	-5			
CE	-15			
FP	-400			
quellenspezifische Parameter				
CUR [psi]	30			
CAD [psi]	5			
IS [kV]	-3500			
TEM [°C]	475			
GS 1 [psi]	30			
GS 2 [psi]	45			
Dwell time [ms]	75			

Tab. 6.16: Übersicht über die verwendeten m/z-Verhältnisse der Molekül- und Fragmentionen der Analyte bzw. internen Standards sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter des API 3200 HPLC-MS/MS-Systems

	AAMA	D₃-AAMA	GAMA	D₃-GAMA
Q1	233,0	235,9	249,0	251,9
Q3	103,9	106,8	119,9	122,9
substanzspezifische Parameter [Volt]				
DP	-25		-30	
EP	-5		-4,5	
CE	-22		-22	
CXP	-1		-1	
CEP	-14		-16	
quellenspezifische Parameter				
CUR [psi]	10			
CAD [psi]	5			
IS [kV]	-4500			
TEM [°C]	450			
GS 1 [psi]	30			
GS 2 [psi]	30			
Dwell time [ms]	75			

6.5.3.2 Chromatographie der Mercaptursäuren

Die chromatographische Trennung der Mercaptursäuren wurde in Anlehnung an Boettcher et al. (2005a) auf einer Phenomenex Luna C8 (2) RP-Säule (150 x 4,6 mm; 3 µm) durchgeführt. Die Elution erfolgte unter isokratischen Bedingungen bei einem Flow von 0,3 ml/min. Da die Urinproben nach der SPE-Aufreinigung immer noch eine hohe Matrixbelastung aufwiesen, wurde zur Verhinderung von Matrixeinflüssen auf die Analytsignale von aufeinanderfolgenden Messungen ein Spülgradient integriert. Zum Schutz des Massenspektrometers vor Verunreinigungen wurde der Eluent mit Hilfe des integrierten Valco Valve zwischen 4 und 17 min in die Ionenquelle überführt. Die injizierten Probenvolumina lagen bei 30-50 µl.

Tab. 6.17: Isokratische Elution der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid und Spülgradient, Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure mit 5 % (v/v) Acetonitril; Fließmittel B: Acetonitril

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Initial	0,3	100	0
1	0,3	100	0
17	0,3	100	0
18	0,6	100	0
22	0,6	10	90
35	0,6	10	90
40	0,6	100	0
45	0,3	100	0

6.5.3.3 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Mercaptursäuren mittels Festphasenextraktion

Die Isolierung der Mercaptursäuren erfolgte in Anlehnung an Boettcher et al. (2005a). Die aufgetauten Urinproben (Lagerung bei -30 °C) wurden gevortext und zentrifugiert (5000 rpm, 3500 x g; 20 min; RT). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Urinvolumina der Versuchstiere mittels einer Messpipette und Urin-Aliquots von 0,1-4 ml wurden mit Ammoniumformiatpuffer (50 mM; pH 2,5) auf ein Endvolumen von 8 ml verdünnt. Nach dem Hinzufügen der internen Standards D₃-AAMA und D₃-GAMA (jeweils 40 µl; 10-100 µg/ml) wurde mit 4 N HCl ein pH-Wert von 2,5 (pH-Meter) eingestellt. Danach wurde die gesamte Probelösung auf eine mit 4 ml Methanol, 2 ml H₂O_{bidest} und 2 ml HCl (pH 2,5) konditionierte SPE-Säule (Isolute ENV⁺; 100 mg; 10 ml) gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 2 ml HCl (pH 2,5) und 1 ml HCl (pH 2,5) mit 10 % Methanol (v/v) erfolgte die Trocknung des Säulenmaterials an der Wasserstrahlpumpe. Anschließend wurde mit 1,85 ml Methanol (1 % Ameisensäure; v/v) eluiert und die in der SPE-Säule verbleibenden Reste des Elutionsmittels

mittels Wasserstrahlpumpe in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die methanolischen Lösungen wurden anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft und in 500-1000 µl Ameisensäure (0,1 % v/v) aufgenommen. Nach der Zentrifugation (13000 rpm; 9500 x g; 20 min; RT) wurde der Überstand zur Vermessung mittels HPLC-MS/MS in 1,5 ml Braunglas-Vials überführt.

6.5.3.4 Linearität/Kalibriergeraden

Zur Überprüfung der Linearität und Bestimmung der Kalibriergeraden wurden methanolische Standardlösungen mit 2,5-8000 ng/ml AAMA bzw. GAMA bei einem Injektionsvolumen von 10 µl vermessen, in denen stets die gleiche Konzentration der internen Standards D₃-AAMA und D₃-GAMA (jeweils 3 µg/ml) enthalten war.

6.5.3.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen API 3200

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden von AAMA und GAMA methanolische Lösungen der Konzentrationen 2,5-100 ng/ml hergestellt und davon jeweils 10 µl mittels HPLC-MS/MS vermessen. Nach Auftragung der Peakhöhe gegen die Konzentration ergaben sich die im Anhang gezeigten Regressionsgeraden.

Aus den Regressionsgeraden lassen sich durch Einsetzen des Hintergrundrauschens (25 cps) die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen errechnen.

Tab. 6.18: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen AAMA bzw. GAMA (API 3200; absolute Stoffmengen)

	AAMA	GAMA
Nachweisgrenze [fmol]	86	112
Bestimmungsgrenze [fmol]	172	224

6.5.3.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen API 2000

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte analog Kap. 6.5.3.5, wobei von AAMA und GAMA methanolische Lösungen der Konzentrationen 12,5-250 ng/ml bei einem Injektionsvolumen von 50 µl und einem Hintergrundrauschen von 30 cps vermessen wurden.

Tab. 6.19: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen AAMA bzw. GAMA (API 2000, absolute Stoffmengen)

	AAMA	GAMA
Nachweisgrenze [pmol]	4	6
Bestimmungsgrenze [pmol]	8	12

6.5.3.7 Wiederfindung der SPE-Methode

Zur Bestimmung der Wiederfindung der SPE-Methode wurden Referenzstandards der Konzentration 100 µg/ml D₃-AAMA bzw. 12,9 µg/ml D₃-GAMA vermessen (n = 3). Äquivalente Stoffmengen der Standardsubstanzen wurden auf ein Endvolumen von 4 ml mit H₂O_{bidest} verdünnt und wie unter Kap. 6.5.3.3 beschrieben mittels SPE aufkonzentriert.

Die Wiederfindung resultiert aus dem Verhältnis der Peakflächen nach SPE-Aufreinigung und den Peakflächen der Referenzproben. Für AAMA bzw. GAMA wurden Wiederfindungen von 97 ± 15 % bzw. 49 ± 10 % ermittelt.

6.5.3.8 Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität

Zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurden die Mercaptursäuren in unterschiedlichen Urinproben (n = 3) in aufeinanderfolgenden Messungen (n = 4) quantifiziert. Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität erfolgte die Bestimmung der Mercaptursäuren in unterschiedlichen Urinproben (n = 3) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

Tab. 6.20: Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität der AAMA- und GAMA-Bestimmung

Variabilität	AAMA [%]	GAMA [%]
Lauf-zu-Lauf	2,1 ± 0,4	3,5 ± 0,6
Tag-zu-Tag	0,4 ± 0,2	1,3 ± 0,3

6.5.4 Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid

6.5.4.1 Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS)

Die Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid wurde mittels des API 3200 HPLC-MS/MS-Systems durchgeführt. Zur Identifizierung der Molekül- und Fragmentionen wurden Produktions-Scans im Bereich von 40-100 m/z mit Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im positiven Ionisationsmodus durchgeführt. In Abbildung 6.13 und 6.14 sind die Molekül- bzw. Produktions-Scans im Bereich von 40-100 m/z mit Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im positiven Ionisationsmodus durchgeführt. In Abbildung 6.13 und 6.14 sind die Molekül- bzw. Produktions-Scans im Bereich von 40-100 m/z mit Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im positiven Ionisationsmodus durchgeführt. In Abbildung 6.15 und 6.16 von Glycidamid bzw. $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid gezeigt.

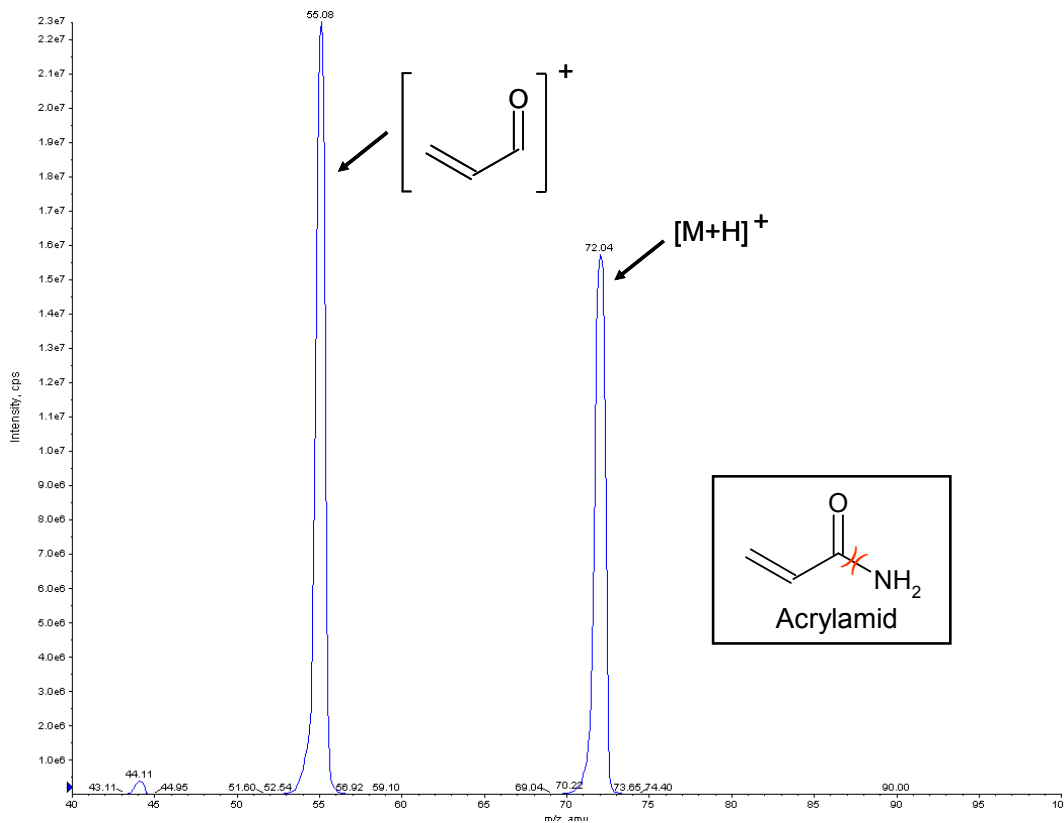


Abb. 6.13: Molekül- und Fragmentionen von Acrylamid

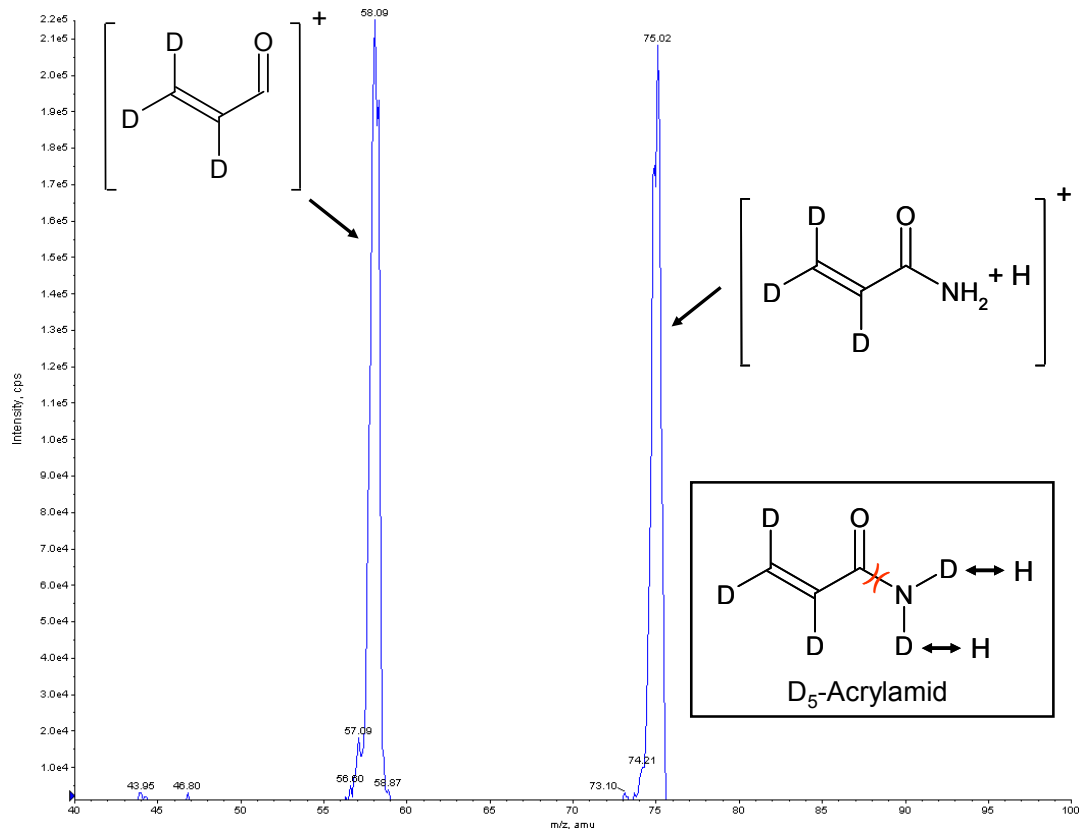


Abb. 6.14: Molekül- und Fragmentionen des internen Standards D₅-Acrylamid

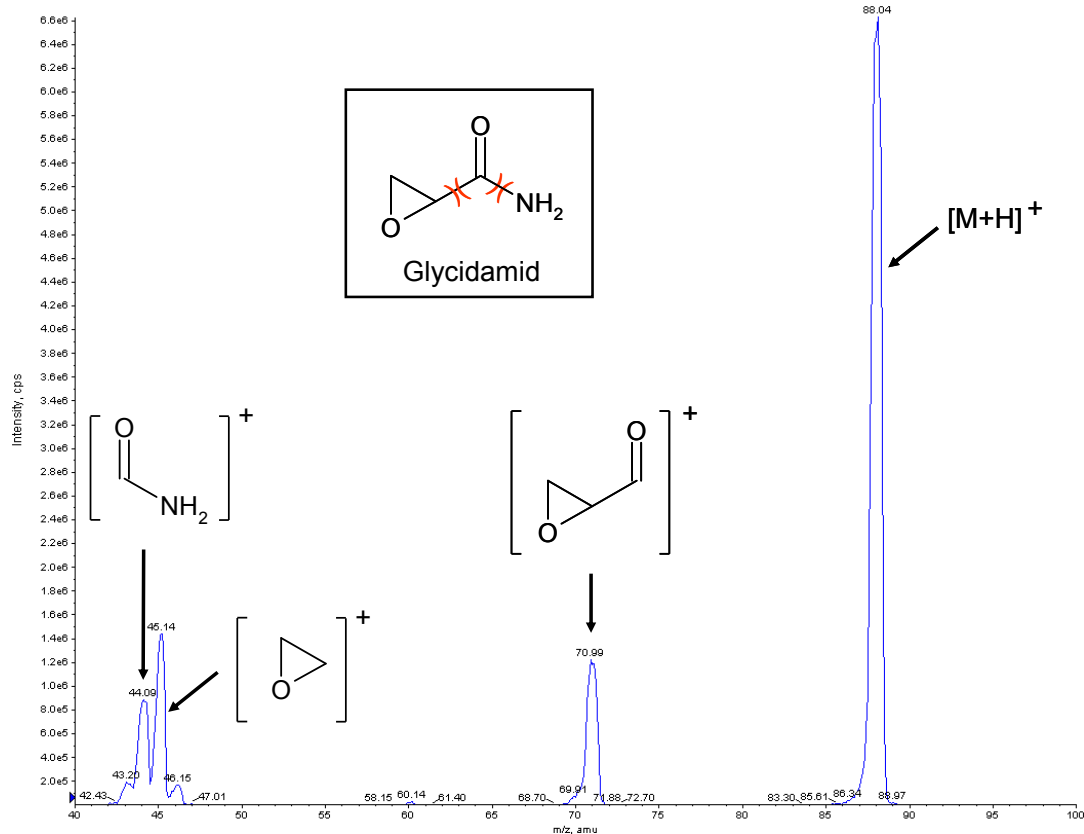


Abb. 6.15: Molekül- und Fragmentionen von Glycidamid

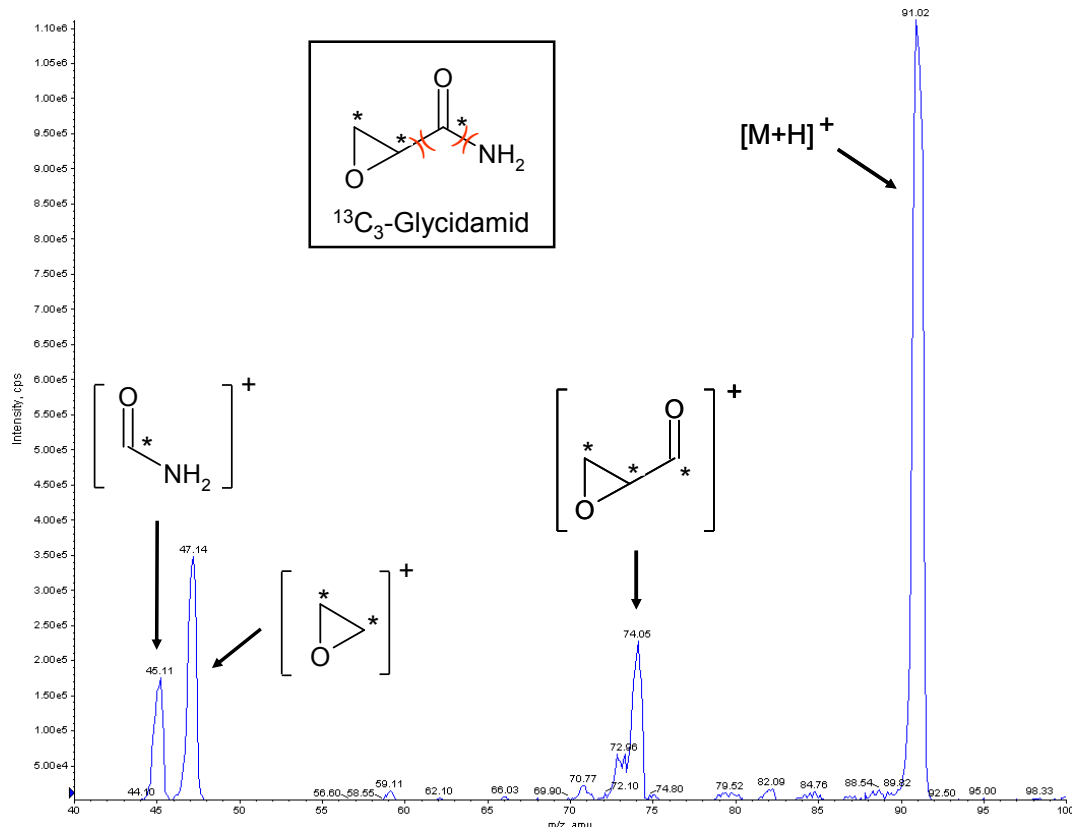


Abb. 6.16: Molekül- und Fragmentationen des internen Standards $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid

Beim internen Standard D_5 -Acrylamid führt der Lösungs- bzw. Ionisationsprozess offensichtlich an der Aminogruppe zu einem Austausch der Deuterium-Atome gegen Wasserstoff-Atome. Das Massenspektrum von D_5 -Acrylamid zeigt daher anstelle der erwarteten m/z 77 lediglich Molekülionen mit m/z 75. Zur Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter wurden Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml Methanol verwendet (Spritzenpumpen-Flow: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Tab. 6.21 zeigt die Molekül (Q1)- und Fragment (Q3)-Ionen sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter der Analyte bzw. internen Standards, welche zur Etablierung der ESI^+ -MRM-Methode herangezogen wurden.

Tab. 6.21: Übersicht über die verwendeten m/z der Molekül- und Fragmentionen der Analyte bzw. internen Standards sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter zur massenspektrometrischen Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid

	Acrylamid	D ₅ -Acrylamid	Glycidamid	¹³ C ₃ -Glycidamid
Q1	72,1	75,1	88,1	91,1
Q3	55,1	58,1	71,0	74,0
substanzspezifische Parameter [Volt]				
DP	+31		+21	
EP	+5,5		+6	
CE	+15		+11	
CXP	+4		+4	
CEP	+14		+10	
quellenspezifische Parameter				
CUR [psi]	10			
CAD [psi]	5			
IS [kV]	+5500			
TEM [°C]	450			
GS 1 [psi]	20			
GS 2 [psi]	40			
Dwell time [ms]	100			

6.5.4.2 Chromatographie von Acrylamid und Glycidamid

Die chromatographische Trennung von Acrylamid und Glycidamid wurde auf einer Phenomenex Luna C8 (2) RP-Säule (150 x 4,6 mm; 3 µm) durchgeführt. Die Elution erfolgte mittels des in Tab. 6.22 gezeigten Gradienten. Die Retentionszeiten lagen bei 12 min für Acrylamid und 9 min für Glycidamid. Um Matrixeinflüsse auf die Analytsignale von aufeinanderfolgenden Messungen zu vermeiden, wurde ein Spülgradient integriert. Zum Schutz des Massenspektrometers vor Verunreinigungen wurde mit Hilfe des integrierten Valco Valve der Eluent zwischen 6 und 17 min in die Ionenquelle überführt. Die injizierten Probenvolumina lagen bei 30-90 µl.

Tab. 6.22: Gradientenelution von Acrylamid und Glycidamid und Spülgradient, Fließmittel A: 0,05 % Ameisensäure, Fließmittel B: Methanol

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Initial	0,3	99	1
1	0,3	99	1
15	0,3	80	20
25	0,6	10	90
35	0,6	10	90
40	0,6	99	1
45	0,3	99	1

6.5.4.3 Isolierung von Acrylamid und Glycidamid aus Rattenurin

Aliquots der Urinproben (1-3 ml) wurden mit den internen Standards versetzt (absolut: 200-1000 ng D₅-Acrylamid; 280-560 ng ¹³C₃-Glycidamid), gevortext und zentrifugiert (3000 x g; 15 min; RT). Danach wurde die Urinprobe auf eine mit 4 ml Methanol und 2 x 4 ml H₂O_{bidest} konditionierte SPE-Säule (Isolute ENV⁺; 500 mg; 6 ml) gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 2 ml H₂O_{bidest} erfolgte die Elution mit 2 ml 60 %-iger Methanol-Lösung (v/v). Die in der SPE-Säule verbleibenden Reste des Elutionsmittels wurden mittels Wasserstrahlpumpe in die Elutionsgefäße (15 ml Kunststoff-Falcons) überführt. Die Eluate wurden anschließend im Stickstoffstrom bis zu einem Volumen von 500-1000 µl eingengt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Nach der Zentrifugation (13000 rpm; 9500 x g; 20 min; RT) wurde der Überstand zur Vermessung mittels HPLC-MS/MS in 1,5 ml Braunglas-Vials überführt (Injektionsvolumen: 30-50 µl).

6.5.4.4 Wiederfindung von Acrylamid und Glycidamid

Die Wiederfindungsraten der verwendeten SPE-Methode zur Bestimmung von Acrylamid und Glycidamid in Urin wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Natalie Gerhardt ermittelt [Gerhardt, 2008]. Sie betragen 84 ± 11 % für Acrylamid und 73 ± 2 % für Glycidamid.

6.5.4.5 Isolierung von Acrylamid und Glycidamid aus Rattenserum

Die Blutentnahme (ca. 0,5 ml) erfolgte durch retrobulbäre Punktion in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße. Anschließend wurden die Blutproben zur vollständigen Blutgerinnung für 30 min auf Eis gelagert und danach zentrifugiert (13000 rpm; 9500 x g; 15 min; RT). Die erhaltenen Serumproben (Überstand) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C im Biofreezer gelagert.

Aus den aufgetauten und gevortexten Serumproben wurden 100-200 µl Aliquots entnommen, zentrifugiert (13000 rpm; 9500 x g, 15 min; RT) und mit internen Standards versetzt (absolut: 0,13-0,26 nmol D₅-Acrylamid; 0,16-0,31 nmol ¹³C₃-Glycidamid). Nachdem die Proben auf ein Endvolumen von 400 µl mit H₂O_{bidest} verdünnt und homogenisiert waren, wurde die Lösung auf eine mit 4 ml Methanol und 2 x 2 ml H₂O_{bidest} konditionierte SPE-Säule (Isolute ENV⁺; 100 mg; 10 ml) gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 0,4 ml H₂O_{bidest} und 0,4 ml 2 %-iger Methanol-Lösung (v/v) wurde mit 1 ml 10 %-iger Acetonitril-Lösung (v/v) eluiert und die in der SPE-Säule verbleibenden Reste des Elutionsmittels mittels Wasserstrahlpumpe in die Elutionsgefäße (Eppendorf-Reaktionsgefäße) überführt. Die Lösungen wurden anschließend im Stickstoffstrom bis zu einem Volumen von 100 µl eingengt und bei einem Injektionsvolumen von 90 µl mittels HPLC-MS/MS vermessen.

6.5.4.6 *Wiederfindung von Acrylamid und Glycidamid in Serumproben*

Als Referenzproben wurden zu je 95 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ jeweils 5 μl einer Standardlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D_5 -Acrylamid; 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid) gegeben ($n = 3$). Um die Wiederfindungsrate der SPE-Methode zu ermitteln wurden 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit der gleichen Menge internen Standard wie die Referenzproben versetzt und anschließend wie unter Kap. 6.5.4.5 beschrieben aufgearbeitet. Zur Identifizierung von Matrixeffekten bzw. Bestimmung der Wiederfindung der Analyten in Rattenserum wurden 200 μl Rattenserum mit den gleichen Mengen internen Standards wie die Referenzproben versetzt und ebenfalls wie unter Kap. 6.5.4.5 beschrieben aufgearbeitet. Nach dem Einengen der Proben unter N_2 wurden diese auf ein Volumen von 100 μl eingestellt und mittels HPLC-MS/MS vermessen (Injektionsvolumen: 90 μl). Durch Vergleich der Peakflächen der internen Standards der aufgearbeiteten Proben bzw. der Referenzproben wurden die Wiederfindungsraten ermittelt.

Tab. 6.23: Wiederfindungsrate (WFR) von Acrylamid und Glycidamid nach SPE-Aufarbeitung von Standardlösungen und Serumproben, MW \pm SD, $n = 3$

	WFR (Standardlösung)	WFR (Serum)
D_5-Acrylamid	30 \pm 1 %	27 \pm 3 %
$^{13}\text{C}_3$-Glycidamid	61 \pm 3 %	43 \pm 6 %

6.5.4.7 *Nachweisgrenze von Glycidamid in Rattenserum*

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Glycidamid in Rattenserum wurden Serum-Aliquots (200 μl ; $n=3$) mit 0,54-0,72 ng $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid (entspricht 0,03-0,04 μM) versetzt und wie unter Kap. 6.5.4.5 beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Dabei zeigte sich, dass aus einer Konzentration von 0,035 μM eine Peakhöhe im Bereich der Nachweisgrenze (3-faches Grundrauschen; 150 cps) resultiert.

6.5.4.8 *Bestimmung von Acrylamid in der Standarddiät und im Lebkuchen*

Zur Bestimmung von freiem Acrylamid in der Standarddiät und in Lebkuchen wurden 1-15 g des Probenmaterials in ein 50 ml Becherglas eingewogen und auf ein Endvolumen von 30 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt. Nach Zugabe des internen Standards (1 μg D_5 -Acrylamid absolut) wurde für 1 Stunde auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Zentrifugation (3000 \times g; 30 min; RT) wurden 10 ml Aliquots der Überstände wie unter Kap. 6.5.4.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC-MS/MS vermessen.

6.5.4.9 Linearität/ Kalibriergeraden

Zur Überprüfung der Linearität und Bestimmung der Kalibriergeraden wurden methanolische Standardlösungen mit 50-1000 ng/ml Acrylamid bzw. 200-7500 ng/ml Glycidamid bei einem Injektionsvolumen von 10 µl vermessen, in denen stets die gleiche Konzentration der internen Standards (200 ng/ml D₅-Acrylamid; 280 ng/ml ¹³C₃-Glycidamid) enthalten war.

6.5.4.10 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden methanolische Lösungen der Konzentrationen 5-90 ng/ml Acrylamid bzw. 7-126 ng/ml Glycidamid hergestellt und davon jeweils 10 µl mittels HPLC-MS/MS vermessen. Nach Auftragung der Peakhöhe gegen die Konzentration ergaben sich die im Anhang gezeigten Regressionsgeraden.

Für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde ein Hintergrundrauschen von 50 cps angenommen.

Tab. 6.24: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Acrylamid und Glycidamid (absolute Angaben)

	Acrylamid	Glycidamid
Nachweisgrenze [pmol]	0,7	4
Bestimmungsgrenze [pmol]	1,3	8

6.5.5 Bestimmung von HPMA (Hydroxypropyl-Mercaptursäure)

6.5.5.1 Massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS)

Die Bestimmung von HPMA erfolgte mittels des API 2000 MS/MS-Systems. Die Abbildungen 6.17 und 6.18 zeigen die Molekül- bzw. Fragmentationen des Analyten HPMA bzw. des internen Standards D₃-HPMA. Zur Identifizierung der Molekül- und Fragmentationen wurden Produktionen-Scans im Bereich von 50-230 m/z mit Standardlösungen der Konzentration 10 µg/ml bei einem Flow von 10 µl/min (Spritzenpumpe) im negativen Ionisationsmodus durchgeführt.

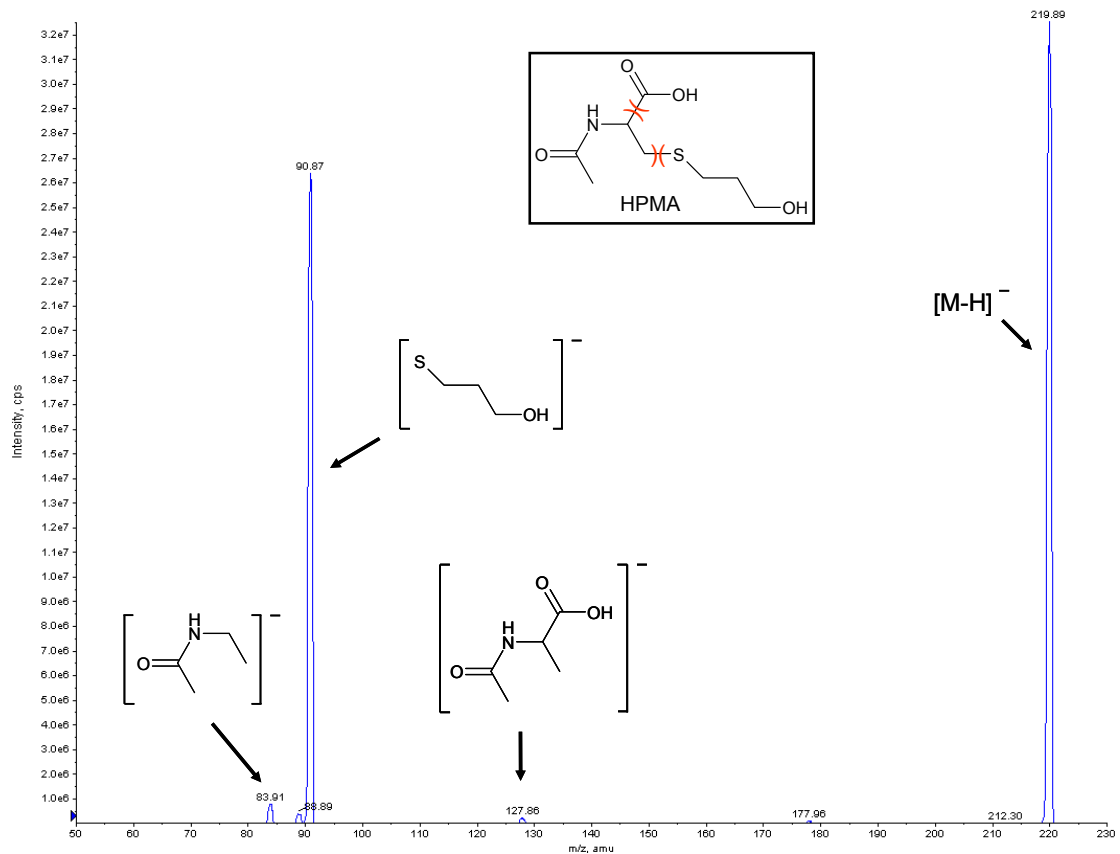


Abb. 6.17: Molekül- und Fragmentationen von HPMA

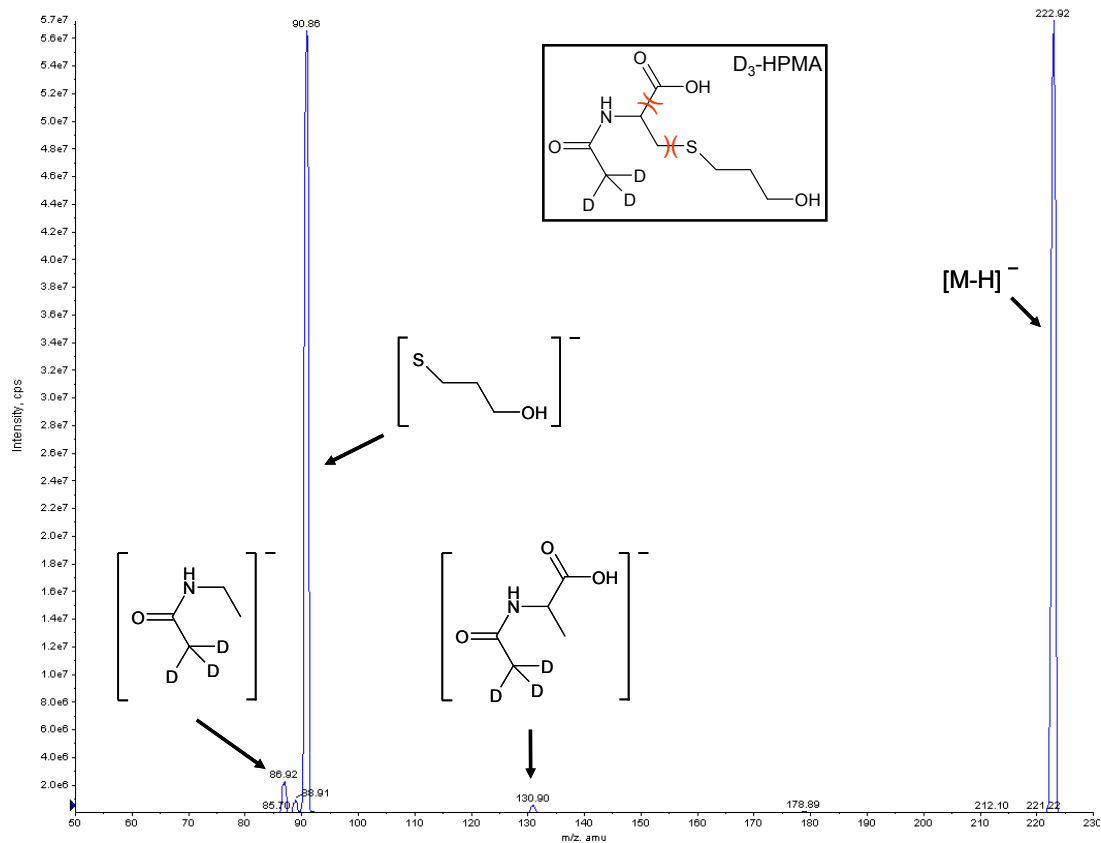


Abb. 6.18: Molekül- und Fragmentionen des internen Standards D₃-HPMA

Die Massenspektren zeigen, dass sowohl der interne Standard als auch der Analyt das Produktion mit m/z-Verhältnis 91 mit hoher Intensität bilden. Da dieses Fragment zur Etablierung der ESI⁻-MRM-Methode verwendet werden sollte, musste eine gegenseitige Beeinflussung des Analyten bzw. internen Standards ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung wurden methanolische Lösungen des Analyten oder internen Standards bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml in das HPLC-MS/MS-System injiziert (Injektionsvolumen: 10 µl).

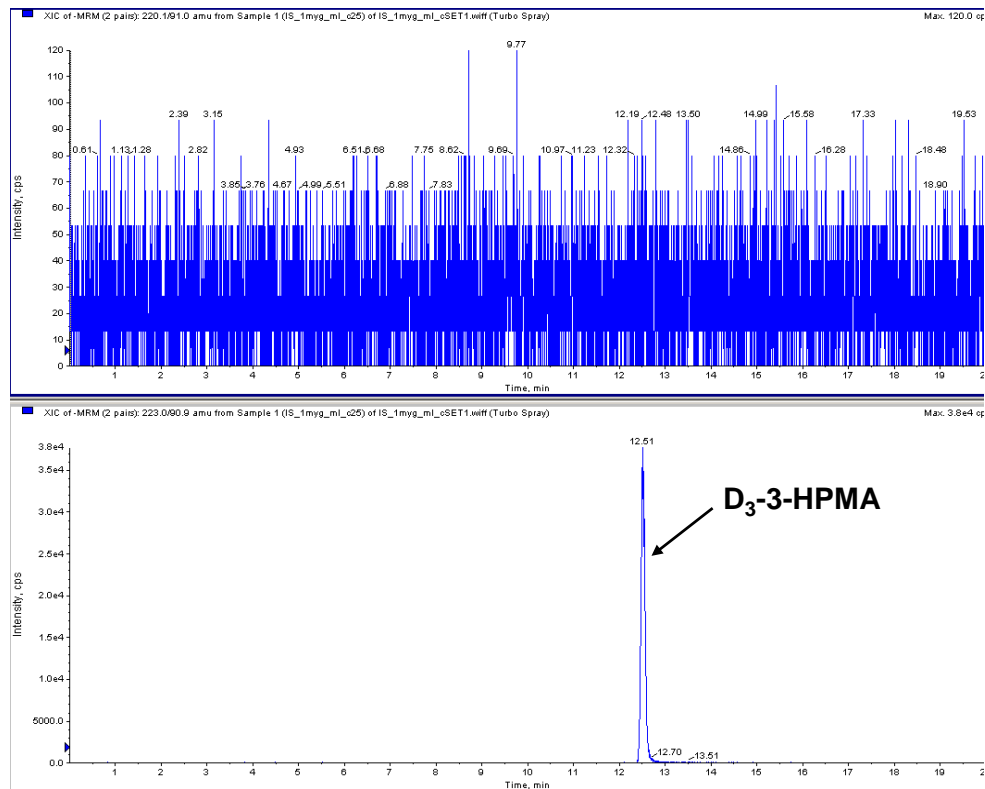


Abb. 6.19: Ionenspuren des Analyten (m/z 220,1→91,0; oben) bzw. internen Standards (m/z 223,0→91,0; unten); 1 $\mu\text{g/ml}$ D₃-HPMA; Injektionsvolumen: 10 μl

Wie Abb. 6.19 verdeutlicht, kommt es im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der beiden verwendeten Ionenspuren. Zum Zeitpunkt der Elution des internen Standards zeigt die Ionenspur des Analyten lediglich das Hintergrundsignal. Beim Vermessen einer entsprechenden Analytlösung wurde eine Beeinflussung der Ionenspur des internen Standards ebenfalls nicht beobachtet.

Zur Optimierung der substanz- und quellenspezifischen Parameter wurden Standardlösungen der Konzentration 250 ng/ml Methanol verwendet (Spritzenpumpen-Flow: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Zur Etablierung der MRM-Methode wurden die in Tab. 6.25 gezeigten Molekül (Q1)- und Fragment (Q3)-Ionen sowie optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter des Analyten bzw. internen Standards herangezogen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Analyt und internem Standard wurde mit identischen substanz- und quellenspezifischen Parametern gearbeitet.

Tab. 6.25: Übersicht über die verwendeten m/z-Verhältnisse der Molekül- und Fragmentionen des Analyten bzw. internen Standards sowie die optimierten substanz- und quellenspezifischen Parameter des API 2000 HPLC-MS/MS-Systems

	HPMA	D ₃ -HPMA
Q1	220,1	223,0
Q3	91,0	91,0
substanzspezifische Parameter [Volt]		
DP	-21	
EP	-9,5	
CE	-16	
FP	-330	
quellenspezifische Parameter		
CUR [psi]	55	
CAD [psi]	2	
IS [kV]	-3500	
TEM [°C]	350	
GS 1 [psi]	30	
GS 2 [psi]	10	
Dwell time [ms]	75	

6.5.5.2 Chromatographische Bedingungen

Die chromatographische Trennung von HPMA wurde auf einer Phenomenex Luna C8 (2) RP-Säule (150 x 4,6 mm; 3 µm) durchgeführt. Die Elution erfolgte mittels des in Tab. 6.26 gezeigten Gradienten. Die Retentionszeit lag bei 12-13 min. Um Matrixeinflüsse auf die Analytsignale von aufeinanderfolgenden Messungen zu vermeiden, wurde ein Spülgradient integriert. Zum Schutz des Massenspektrometers vor Verunreinigungen wurde mit Hilfe des integrierten Valco Valve der Eluent zwischen 8 und 16,9 min in die Ionenquelle überführt. Für die Messungen wurden jeweils 10 µl Probelösung injiziert.

Tab. 6.26: Gradientenelution von HPMA und Spülgradient, Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure mit 5 % Acetonitril (v/v), Fließmittel B: Acetonitril

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Initial	0,3	100	0
1	0,3	100	0
20	0,3	20	80
21	0,6	20	80
30	0,6	20	80
35	0,6	100	0
40	0,3	100	0

6.5.5.3 Isolierung von HPMA aus Urin

Die Aufarbeitung von Human- und Rattenurin erfolgte analog der Isolierung von Acrylamid- und Glycidamid-Mercaptursäuren (Kap. 6.5.3.3). Für die Festphasenextraktion wurden 0,5-4 ml Urin und 12,9 nmol D₃-HPMA (absolute Stoffmenge) als interner Standard verwendet.

6.5.5.4 Linearität/ Kalibriergerade

Zur Überprüfung der Linearität und Bestimmung der Kalibriergerade wurden methanolische Standardlösungen mit 2,5 ng-10 µg/ml HPMA bei einem Injektionsvolumen von 10 µl vermessen, in denen stets die gleiche Konzentration des internen Standards (2,9 µg/ml D₃-HPMA) enthalten war.

6.5.5.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze HPMA

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden methanolische Lösungen der Konzentrationen 2,5-500 ng/ml HPMA hergestellt und davon jeweils 10 µl mittels HPLC-MS/MS vermessen. Nach Auftragung der Peakhöhe gegen die Konzentration ergaben sich die im Anhang gezeigten Regressionsgeraden.

Für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde ein Hintergrundrauschen von 50 cps angenommen. Daraus resultierte eine Nachweisgrenze von 0,5 pmol und eine Bestimmungsgrenze von 0,9 pmol (Angaben als absolute Stoffmengen).

6.5.5.6 Wiederfindung der Festphasenextraktion sowie Tag-zu-Tag- und Lauf-zu-Lauf-Variabilität

Zur Bestimmung der Wiederfindung der SPE-Methode wurden Referenzstandards der Konzentration 1 µg/ml D₃-HPMA vermessen (Injektionsvolumen: 10 µl; n = 3). Äquivalente Stoffmengen der Standardsubstanzen wurden auf ein Volumen von 4 ml mit H₂O_{bidest} verdünnt und wie unter Kap. 6.5.3.3 beschrieben mittels SPE aufkonzentriert. Das eingeeengte Eluat wurde auf ein Endvolumen von 1 ml mit 0,1 %-iger Ameisensäure eingestellt und ebenfalls vermessen. Die Wiederfindungsrate resultierte aus dem Verhältnis der Peakflächen nach SPE-Aufreinigung zu den Peakflächen der Referenzproben und lag bei 67 ± 4 %.

Zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde HPMA in einer Urinprobe in aufeinanderfolgenden Messungen (n = 3) quantifiziert. Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität wurde HPMA in einer Urinprobe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Sowohl die Lauf-zu-Lauf- als auch Tag-zu-Tag-Variabilitäten lagen unter 5 % des Messwertes.

6.6 Geräte

API 2000 HPLC-MS/MS	HPLC: 2x Series 200 Micro Pump Series 200 Autosampler (Perkin Elmer) MS/MS: API 2000 mit ESI-Ionen- quelle (Applied Biosystems)
API 3200 HPLC-MS/MS	HPLC: Jasco 2008 (Jasco) MS/MS: API 3200 mit ESI-Ionen- quelle (Applied Biosystems)
Eppi-Tischzentrifuge	5415 (Eppendorf)
Feinwaage	CP224S (Sartorius)
Gefrierschrank (-20 °C)	Comfort*** (Liebherr)
GC-MS	GC: 6890; MS: 5973inert mit Software Chem Station (Agilent)
GC-Säule	DB-XLB, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (J&W Scientific)
Grobwaage	Sartorius Typ 1404
Magnetrührer mit Heizplatte	MR3301K (Heidolph)
pH-Meter	pH 522 (WTW)
Pipetten	Eppendorf Research P2,5-P5000
Schüttelapparatur	Typ 3015 (GFL)
Stoffwechselkäfig	Tecniplast, Buguggiate
Vortex-Gerät	(Heidolph)
Vakuumkammer	Macherey und Nagel
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugen	Megafuge 1.0R (Heraeus) Centrifuge 5804 R (Eppendorf)

6.7 Chemikalien

AAMA	synthetisiert von S. Foth, AK Eisenbrand
AAValPFPTH, AAD₇ValPFPTH	synthetisiert von D. Bertow, AK Eisenbrand
Acrylamid (p.a.)	Merck
Aceton (Spektroskopie)	Merck
Acetonitril (Gradient Grade)	J.T. Baker
Ammoniumformiat	Sigma
Ameisensäure	Merck
D₃-AAMA	synthetisiert von S. Foth, AK Eisenbrand
D₅-Acrylamid	CDN Isotopes
D₃-GAMA	synthetisiert von M. Redecker, AK Eisenbrand
D₃-HPMA	Toronto Research Chemicals Inc.
Diethylether (p.a.)	Riedel de Haen
Ethylacetat (p.a.)	J.T. Baker
Formamid (p.a.)	Merck
GAMA	synthetisiert von S. Foth, AK Eisenbrand
GAValPFPTH, GAD₇ValPFPTH	synthetisiert von D. Bertow, AK Eisenbrand
Glycidamid	Toronto Research Chemicals Inc.
Helium 5.0	Air Liquide
HCl (37 %)	J.T. Baker
¹³C₃-Glycidamid	Toronto Research Chemicals Inc.
HPMA	Toronto Research Chemicals Inc.
iso-Propanol (p.a.)	Merck
Isofluran	Baxter
Methanol (Gradient Grade)	J.T. Baker
Na₂CO₃ (p.a.)	Riedel de Haen
NaCl (p.a.)	Merck
NaOH (p.a.)	Merck
n-Hexan (p.a.)	J.T. Baker
Pentafluorphenylisothiocyanat (PF₅PITC)	Fluka
PPG-Kalibrierlösung	Applied Biosystems
PPG 3000-Kalibrierlösung	Applied Biosystems

Schwefelsäure (p.a.)

J.T. Baker

Stickstoff (technisch)

Air Liquide Deutschland GmbH

Toluol (für die Spektroskopie)

Merck

6.8 Verbrauchsmaterialien

Braunglas-Vials (1,5 ml; PTFE-Verschluss)	Abi Med
Isolute ENV⁺ SPE-Kartuschen (100 mg/6 ml; 500 mg/10 ml)	Separtis
Kanülen zur Blutabnahme (Multifly[®]-Set)	Sarstedt
Kunststoff-Schraubgefäße (15, 50 ml)	Greiner bio-one GmbH
Kunststoff-Schraubgefäße (13 ml)	Sarstedt
Mikro-Glaseinsatz (300 µl)	Abi Med
Monovetten (mit EDTA)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH
Strata C18e SPE-Kartuschen (55 µm, 200 mg/3 ml)	Phenomenex

7 Literatur

- Abramsson-Zetterberg L** (2003): The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat Res.*, 535 (2):215-22.
- Amrein TM, Bachmann S, Noti A, Biedermann M, Barbosa MF, Biedermann-Brem S, Grob K, Keiser A, Realini P, Escher F, Amadó R** (2003): Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.* 51 (18):5556-60.
- Amrein TM, Schönbächler B, Rohner F, Lukac H, Schneider H, Keiser A, Escher F, Amadó R** (2004): Potential for Acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 572-578.
- Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW** (1997): Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha hydroxy and alpha, beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation, *J. Clin. Invest.*, 99, 424–432.
- Applied Biosystems** (2008): API 3200/4000/5000TM LC-MS/MS System Basic Training, PowerPoint Präsentation
- Au W, Sokova OI, Kopnin B, Arrighi FE** (1980): Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. *Cytogenet. Cell genet.* 26; 108-116.
- Auld RB, Bedwell SF** (1967): Peripheral neuropathy with sympathetic overactivity from industrial contact with acrylamide. *Can. Med. Assoc. J.*, 96 (11):652-4
- Aureli F, Di Pasquale M, Lucchetti D, Aureli P, Coni E** (2007): An absorption study of dietary administered acrylamide in swine. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1202-1209.
- Ayers PW, Parr RG, Pearson RG** (2006): Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. *J. Chem. Phys.* 124 (19):194107.
- Badghisi H, Liebler DC** (2002): Sequence mapping of epoxide adducts in human hemoglobin with LC-tandem MS and the SALSA algorithm. *Chem Res Toxicol.*, 15 (6):799-805.
- Ballance P** (1961): Production of volatile compounds related to the flavor of foods from the Strecker degradation of methionine. *J. Sci. Food Agric.*, 12, 532–536.
- Barber DS, Hunt JR, Ehrich MF, Lehning EJ, Lo Pachin RM** (2001): Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology*, 22, 341-353.
- Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Rudolphi M, Spormann T, Zankl H, Eisenbrand G, Bertow D** (2005): Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561:77-88.

- Bayerisches Landesamt** für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2008): Untersuchungsergebnisse: Acrylamid in Lebensmitteln. <http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/rueckstaende/acrylamid/acrylamid-werte.htm>
- Bertow D** (2008): Molekulare Toxikologie von Acrylamid anhand der Analytik von Proteinaddukten. TU Kaiserslautern (Dissertation)
- Besaratinia A, Pfeifer GP** (2005): DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat. Res.*, 580 (1-2): 31-40.
- BfR Bundesinstitut für Risikobewertung** (2003): Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 46, 405-415
- Bjellaas T, Ølstørn HB, Becher G, Alexander J, Knutsen SH, Paulsen JE** (2007): Urinary metabolites as biomarkers of acrylamide exposure in mice following dietary crisp bread administration or subcutaneous injection. *Toxicol. Sci.* 100 (2):374-80
- Boettcher MI, Angerer J** (2005a): Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 824, 283-294.
- Boettcher MI, Schettgen T, Kutting B, Pischetsrieder M, Angerer J** (2005b): Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutat. Res.*, 580, 167-176.
- Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J** (2006a): Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch. Toxicol.*, 80 (2):55-61.
- Boettcher MI, Bolt HM, Angerer J** (2006b): Acrylamide exposure via the diet: influence of fasting on urinary mercapturic acid metabolite excretion in humans. *Arch. Toxicol.*, 80 (12):817-819.
- Bradshaw JJ, Ivanetich KM** (1984): Isoflurane: a comparison of its metabolism by human and rat hepatic cytochrome P-450. *Anesth. Analg.*, 63, 805-13.
- Budzikiewicz H, Schäfer M** (2005): Massenspektrometrie, 5. Auflage, WILEY-VCH, Weinheim
- Bull RJ, Robinson M, Laurie RD, Stoner GD, Greisiger E, Meier JR, Stober J** (1984): Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.*, 44 (1):107-11.
- Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Morden DC, Wade CE, Hermann EA, Gorzinski SJ** (1980): Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (5-6):157-82.
- Butterworth BE, Eldridge SR, Sprankle CS, Working PK, Bentley KS, Hurtt ME** (1992): Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20 (3):148-55.
- Carere A** (2006): Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann. Ist Super Sanita*, 42 (2):144-55.
- Carmine EL, Gaworski CL** (2005): Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food. Chem. Toxicol.*, 43, 1521-1539.

- Chapin** RE, Fail PA, George JD, Grizzle TB, Heindel JJ, Harry GJ, Collins BJ, Teague J (1995): The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 27 (1):9-24.
- Collins** JJ, Swaen GM, Marsh GM, Utidjian HM, Caporossi JC, Lucas LJ (1989): Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J. Occup. Med.*, 31 (7):614-7.
- Curren** RD, Yang LL, Conklin PM, Grafstrom RC, Harris CC (1988): Mutagenesis of xeroderma pigmentosum fibroblasts by acrolein. *Mut. Res.* 209, 17-22.
- De Wilde** T, De Meulenaer B, Mestdagh F, Govaert Y, Vandeburie S, Ooghe W, Fraselle S, Demeulemeester K, Van Peteghem C, Calus A, Degroodt JM, Verhé R (2005): Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (16):6550-7.
- Dearfield** KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ (1995): Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.* 330 (1-2):71-99
- Di Simplicio** P, Giannerini F, Giustarini D, Lusini L, Rossi R (1998): The role of cysteine in the regulation of blood glutathione-protein mixed disulfides in rats treated with diamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 148, 56-64.
- Doerge** DR, Twaddle NC, Boettcher MI, McDaniel LP, Angerer J (2007): Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicol. Lett.* 169 (1), 34-42.
- Doerge** DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI (2005): Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 208, 199-209.
- Doroshenko** O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, Reith Y, Lazar A, Taubert D, Kirchheiner J, Baum M, Eisenbrand G, Berger FI, Bertow D, Berkessel A, Sörgel F, Schömig E, Tomalik-Scharte D (2009) In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Canc. Epidem. Biomarkers Prev.* 18 (2):433-43.
- Duale** N, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen JE, Frandsen H, Olesen PT, Brunborg G (2009): Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicol. Sci.*, 108 (1):90-9.
- ECHA** (Europäische Chemikalien Agentur) (2008): http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r8_en.pdf?vers=20_08_08
- Ehling** S, Hengel M, Shibamoto T (2005): Formation of Acrylamide from Lipids. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 223-233.
- Eisenbrand** G, Schreier P, Meyer AH (2006): Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Elmore** JS, Koutsidis G, Dodson AT, Mottram DS, Wedzicha BL (2005): Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (4):1286-93.
- Emery** MG, Jubert C, Thummel KE, Kharasch ED (1999): Duration of cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1) inhibition and estimation of functional CYP2E1 enzyme half-life after single-dose disulfiram administration in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 213-219.

- Esterbauer** H, Schaur RJ, Zollner H (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.*, 11, 81–128.
- Fennell** TR, Friedman MA (2005): Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561:109-16.
- Fennell** TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA (2006): Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.*, 93 (2):256-67.
- Fennell** TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA (2005): Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.*, 85, 447-459.
- Field** EA, Price CJ, Sleet RB, Marr MC, Schwetz BA, Morrissey RE (1990): Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 14 (3):502-12.
- Food and drug administration** (U.S.) (2006): <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acryexpo.html>
- Forth** W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*
- Friedman** MA, Dulak LH, Stedham MA (1995): A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27: 95–105.
- Fuhr** U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sorgel F, Schomig E (2006): Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15, 266-271.
- Gamboa** da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR (2003): DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* 16 (10): 1328-37.
- Gargas** ML, Kirman CR, Sweeney LM, Tardiff RG (2009): Acrylamide: Consideration of species differences and nonlinear processes in estimating risk and safety for human ingestion. *Food Chem. Toxicol.*, 47 (4):760-8.
- Gaskell** SJ (1997): Electrospray: principles and practice. *J. Mass Spectrom.*, 32, 677.
- Gerhardt** N (2008): Etablierung einer LC-MS/MS-Methode zu der Bestimmung von Acrylamid in Fäces der Ratte. TU Kaiserslautern (Diplomarbeit)
- Gertz** CKS (2002): Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 762-771.
- Ghanayem** BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, Doerge DR (2005): Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.*, 88, 311-318.
- Ghilarducci** DP, Tjeerdema RS (1995): Fate and effects of acrolein. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 144:95-146.
- Graf** M, Amrein T, Graf S, Szalay R, Escher F, Amado R (2006): Reducing the Acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *Lwt-Food Sci Technol* 39, 724-728.

- Grafström RC**, Dypbukt JM, Willey JC, Sundqvist K, Edman C, Atzori L, Harris C (1988): Pathobiological effects of acrolein in cultured human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* 48, 1717-1721.
- Grafström RC**, Edman CC, Sundqvist K, Liu Y, Hybbinette SS, Atzori L, Nicotera P, Dypbukt J (1986): Cultured human bronchial cells as a model system in lung toxicology and carcinogenesis: implications from studies with acrolein. *Altern. Lab. Anim.* 16, 231-243.
- Granvogl M**, Schieberle P (2006): Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric Food Chem.*, 54, 5933-5938.
- Grivas S**, Jägerstad M, Lingnert H, Skog K, Törnqvist M, Aman P (2002): ACYRLAMIDE IN FOOD - Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods.
- Gutierrez-Espeleta GA**, Hughes LA, Piegorsch WW, Shelby MD, Generoso WM (1992): Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18 (2):189-92.
- Hagmar L**, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A (2001): Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ.*, 27 (4):219-26.
- Hales B** (1982): Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-Hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein. *Canc. Res.* 42, 3016-3021.
- Hamdan M**, Bordini E, Galvani M, Righetti PG (2001): Protein alkylation by acrylamide, its N-substituted derivatives and cross-linkers and its relevance to proteomics: a matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry study. *Electrophoresis.* 22 (9):1633-44.
- Harrison AG** (1992): Chemical Ionisation Mass Spectrometry. 2. Auflage, CRC, Boca Raton
- Hartmann EC**, Boettcher MI, Schettgen T, Fromme H, Drexler H, Angerer J (2008): Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6061-6068.
- Hashimoto K**, Tanii H (1985): Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 158 (3):129-33.
- Hashimoto K**; Aldridge WN (1970): Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem. Pharmacol.*, 19:2591-2604.
- Hashmi M**, Vamvakas S, Anders MW (1992): Bioactivation mechanism of S-(3-oxopropyl)-N-acetyl-L-cysteine, the mercapturic acid of acrolein. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 360 - 365.
- Haworth S**, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E (1983): *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutag. Suppl.* 1, 3-142.
- Hädrich J**, Vogelsang J (1996): Konzept '96 zur Ermittlung von Nachweis, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92: 341-350.
- Heldt-Hansen H-P**, Rittig F, Budolfson Lynglev G, Stringer MA, Ostergaard P (2004): Asparaginase mediated reduction of acrylamide formation in baked, fried, and roasted products. Detmold, presentation Novozymes.

- Hemminki K, Falck K, Vainio H (1980):** Comparison of alkylation rates and mutagenicity of directly acting industrial and laboratory chemicals. Epoxides, glycidyl ethers, methylating and ethylating agents, halogenated hydrocarbons, hydrazine derivatives, aldehydes, thiuram and dithiocarbamate derivatives. *Arch. Toxicol.* 46, 277-285.
- Hertog MLATM, Putz B, Tijssens LMM (1997):** The effect of harvest time on the accumulation of reducing sugars during storage of potatoe (*Solanum tuberosum* L.) tubers: experimental data described, using a physiological based, mathematical model. *Potatoe Res.* 40, 69-78.
- Heudorf U, Hartmann E, Angerer J (2009):** Acrylamide in children--exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *Int J Hyg Environ Health.*, 212, 135-41.
- Hopkins A (1970):** The effect of acrylamide on the peripheral nervous system of the baboon. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 33 (6):805–816.
- IARC International Agency for Research on Cancer (1994):** Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Some Industrial Chemicals. *International Agency for Research on Cancer*, Vol. 60, Lyon.
- Ikeda GJ, Miller E, Sapienza PP, Michel TC, Inskeep PB (1987):** Comparative tissue distribution and excretion of [1–14C]acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem. Toxicol.* 25 (11):871–875.
- Ikeda GJ, Miller E, Sapienza PP, Michel TC, King MT, Turner VA, Blumenthal H, Jackson WE 3rd, Levin S (1983):** Distribution of [14C]-labeled acrylamide and betaine in foetuses of rats, rabbits, beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem. Toxicol.* 21:49–58.
- Ikeda GJ; Miller E; Sapienza PP, Michel TC, King MT, Sager AO (1985)** Maternal-foetal distribution studies in late pregnancy. II. Distribution of 1-[14C]-acrylamide in tissues of beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem. Toxicol.* 23 (8):757–761.
- IPCS INCHEM (International Programme on Chemical Safety) (1999):** Pesticide Information Monograph on Acrylamide. <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652.htm>
- Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW (1986):** Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85 (2): 154–168.
- Jung MY, Choi DS, Ju JW (2003):** A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *J. Food Sci.* 68, 1287-1290.
- Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS (1999):** Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7:127–133.
- Kedderis GL, Batra R (1993):** Species differences in the hydrolysis of 2-cyanoethylene oxide, the epoxide metabolite of acrylonitrile. *Carcinogenesis*, 14 (4):685-9
- Kedderis GL, Batra R, Turner MJ (1995):** Conjugation of acrylonitrile and 2-cyanoethylene oxide with hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 135 (1):9-17
- Kharasch ED, Thummel KE (1993):** Identification of cytochrome P4502E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology*;79,795–807.

- Kharasch** ED, Thummel KE, Mhyre J, Lillibridge JH (1993): Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 53, 643-650.
- Kolek** E, Simko P, Simon P (2006): Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat treated model food matrix. *J. Food Nutr. Res.* 45, 17-20.
- Lee** Y, Sayre LM (1998): Reaffirmation that metabolism of polyamines by bovine plasma amine oxidase occurs strictly at the primary amino termini. *J. Biol. Chem.*, 273, 19490 – 19494.
- Li** J, Ho CT (2005): Generation of aldehydes from Maillard reactions of glucose and amino acids. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 300, 213–218.
- Licea Pérez** H, Cheong HK, Yang JS, Osterman-Golkar S (1999): Simultaneous Analysis of Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Glycidamide by Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 274, 76-82
- Lijinski** W, Reuber MD (1987): Chronic carcinogenesis studies of acrolein and related compounds. *Toxicology and Industrial Health*, 3, 337-345.
- LoPachin** RM (2002): The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *Neuro. Toxicol.* 23:253–257
- LoPachin** RM, Schwarcz AI, Gaughan CL, Mansukhani S, Das S (2004): In vivo and in vitro effects of acrylamide on synaptosomal neurotransmitter uptake and release. *Neurotoxicology*, 25 (3):349-363.
- Madle** S, Broschinski L, Mosbach-Schulz O, Schöning G, Schulte A (2003): Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 5, 405-414.
- Marlowe** C, Clark MJ, Mast RW, Friedman MA, Waddell WJ (1986): The distribution of [¹⁴C]acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86 (3):457-65
- Marnett** LJ, Hurd HK, Hollstein MC, Levin DE, Esterbauer H, Ames BN (1985): Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA 104. *Mut. Res.* 148, 25-34.
- Marsh** GM, Lucas LJ, Youk AO, Schall LC (1999): Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 56 (3):181-90.
- McCarver** DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W (1998): A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152, 276-281.
- McCollister** DD, Oyen F, Rowe VK (1964): Toxicology of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6 (2): 172–181.
- Miller** MJ, Carter DE, Sipes IG (1982): Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63, 36-44.
- Miller** PE, Denton MB (1986): The quadrupol massfilter: basic operation concepts. *J. Chem. Education*, 63, 617.

- Mottram** DS, Wedzicha BL, Dodson AT (2002): Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448 – 449.
- Mowrer** J, Törnqvist M, Jensen S, Ehrenberg L (1986): Modified Edman Degradation Applied to Hemoglobin for Monitoring Occupational Exposure to Alkylating Agents. *Toxicol. Environ. Chem.*, 11, 215-231.
- Mucci** LA, Adami HO, Wolk A (2006): Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer.*, 118 (1):169-73.
- Mucci** LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K (2003): Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer.*, 88 (1):84-9.
- Mucci** LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO (2004): Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int. J. Cancer.* 109 (5):774-6.
- Mucci** LA, Sandin S, Bälter K, Adami HO, Magnusson C, Weiderpass E (2005): Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA.*, 293 (11):1326-7.
- Niessen** WMA (1998): Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *J. Chromatogr. A* 794: 407 – 435.
- O'Brien** PJ, Siraki AG, Shangari N (2005): Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit. Rev. Toxicol.*, 35, 609 –662.
- Oneta** CM, Lieber CS, Li J, Ruttimann S, Schmid B, Lattmann J, Rosman AS, Seitz HK (2002): Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase. *J. Hepatol.*, 36, 47-52.
- Parent** R.A., Caravello H.E., Long J.E. (1991) Oncogenicity study of acrolein in mice. *J. of the American college of Toxicol.* 10 (6), 647-659.
- Parent** RA, Caravello HE, Balmer MF, Shellenberg TE, Long JE (1992a): One-year Toxicity of orally administered acrolein to the beagle dog. *J. Appl. Toxicol.* 12 (5), 311- 316.
- Parent** RA, Caravello HE, Hoberman AM (1992b): Reproductive study of acrolein on two generations of rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19 (2), 228-237.
- Parent** RA, Caravello HE, Sharp DE (1996): Metabolism and distribution of [2,3-¹⁴C] acrolein in Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Toxicol.* 16 (5):449-457.
- Parent** RA, Paust DE, Schrimpf MK et al. (1998): Metabolism and distribution of [2,3-¹⁴C] acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites. *Toxicol. Sci.* 43(2):110-120.
- Patel** JM, Wood JC, Leibman KC (1980): The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab. Dispos.*, 8, 305–308.
- Paulsson** B, Athanassiadis I, Rydberg P, Törnqvist M (2003): Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonisation of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 1859-1865.
- Paulsson** B, Grawe J, Törnqvist M (2002): Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mut. Res.* 516, 101-111.

- Paulsson B**, Kotova N, Grawé J, Henderson A, Granath F, Golding B, Törnqvist M (2003b): Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.* 535 (1):15-24.
- Pedreschi F**, Kaack K, Granby K (2006): Acrylamide content and color development in fried potatoe strips. *Food Res. Int.* 39, 40-46.
- Pelucchi C**, Galeone C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Bosetti C, Giacosa A, La Vecchia C (2006): Dietary acrylamide and human cancer. *Int. J. Cancer.*, 118 (2):467-71.
- Plate AY**, Crankshaw DL, Gallaher DD (2005): The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. *Anesth. Analg.* 101(4),1063-4.
- Ramsey JC**, Young JD, Gorzinski SJ (1984): Acrylamide: Toxikodynamics in rats. Toxikological Research Laboratory, Dow Chemical, Midland, Michigan
- Reimerdes EH**, Franke K (2006): Engineering and biotechnological aspects for the manufacturing of high quality fried potato products. *Biotechnol. J.*, 1 (4):413-9.
- Roberts BJ**, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE (1995): Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J. Biol. Chem.*, 270, 29632-29635.
- Rossi R**, Milzani A, Dalle-Donne I, Giannerini F, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, Di Simplicio P (2001): Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood: biochemical and pharmacological implications. *J. Biol. Chem.*, 276 (10):7004-10.
- Roempp online** (2009): <http://www.roempp.com>
- Rydberg P**, Lüning B, Wachtmeister CA, Eriksson L, Törnqvist M (2002): Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts: mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoin. *Chem. Res. Toxicol.*, 15 (4):570-81.
- Sanduja R**, Ansari GA, Boor PJ (1989): 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. *J. Appl. Toxicol.*, 9 (4):235-8.
- Scherer G**, Engl J, Urban M, Gilch G, Janket D, Riedel K (2007): Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 47, 171-183.
- Schettgen T**, Broding HC, Angerer J, Drexler H (2002): Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide – biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicol. Lett.*, 134, 65-70.
- Schettgen T**, Musiol A, Kraus T (2008): Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethylene oxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N,N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2629-38.
- Schettgen T**, Rossbach B, Kutting B, Letzel S, Drexler H, Angerer J (2004): Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 207, 531-539.
- Seal CJ**, de Mul A, Eisenbrand G, Haverkort AJ, Franke K, Lalljie SP, Mykkänen H, Reimerdes E, Scholz G, Somoza V, Tuijtelars S, van Boekel M, van Klaveren J,

- Wilcockson SJ, Wilms L (2008): Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods--a case study on potatoes, cereals and coffee. *Br. J. Nutr. Suppl.* 2:S1-S46.
- Sega** GA, Generoso EE, Brimer PA (1990): Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ. Mol. Mutagen.* 16 (3):137-42.
- Segeberäck** D, Calleman CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM (1995): Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis*, 16 (5): 1161-5.
- Sickles** DW, Stone JD, Friedman MA (2002): Fast axonal transport: a site of acrylamide neurotoxicity? *Neuro. Toxicol.* 23:223–251.
- SKLM** Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (2006): Natürliche Lebensmittel-Inhaltsstoffe: Beurteilung der Toxizität einer Substanz bei isolierter Verabreichung im Vergleich zur Aufnahme als Bestandteil der Nahrung. Stellungnahme vom 13.03.2006.
- Smith** CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000): "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food. Chem. Toxicol.*, 38, 371-383.
- Smyth** HF Jr, Carpenter CP, Weil CS (1951): Range-finding toxicity data: List IV. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.* 4, 119-122.
- Sobel** W, Bond GG, Parsons TW, Brenner FE (1986): Acrylamide cohort mortality study. *Br. J. Ind. Med.*, 43 (11):785-8.
- Solomon** JJ, Fedyk J, Mukai F, Segal A (1985): Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.*, 45 (8): 3465-70.
- Sörgel** F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C (2002): Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48 (6):267-74.
- Stadler** RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S (2002): Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419 (6906):449-50.
- Stevens** JF, Maier CS (2008): Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 7-25.
- Stryer** L.: Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1991, S. 149-167.
- Sumner** SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI (1999): Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* , 12, 1110-1116.
- Sumner** SC, MacNeela JP, Fennell TR (1992): Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.*, 5 (1):81-9.

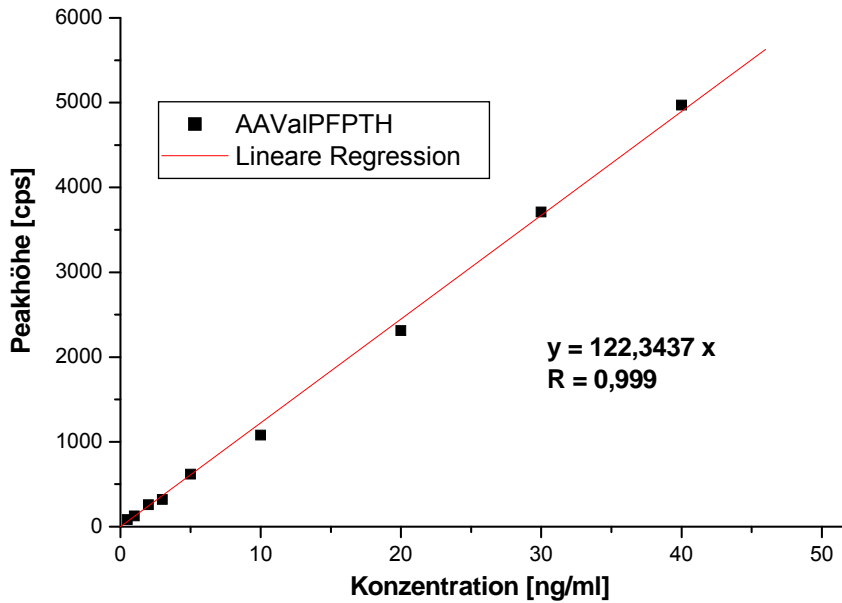
- Sumner** SC, Williams CC, Snyder RW, Krol WL, Asgharian B, Fennell TR (2003): Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.*, 75, 260-270.
- Taeymans** D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, Gondé P, Van Eijck P, Lalljie S, Lingnert H, Lindblom M, Matissek R, Müller D, Tallmadge D, O'Brien J, Thompson S, Silvani D, Whitmore T (2004): A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44 (5):323-47.
- Talhout** R, Opperhuizen A, van Amsterdam JG (2006): Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. *Food. Chem. Toxicol.*, 44, 1789–1798.
- Tareke** E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002): Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 4998-5006.
- Tareke** E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M: (2000): Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 517-522.
- Tareke** E, Twaddle NC, Mc Daniel LP, Churchwell MI, Young JF, Doerge DR (2006): Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 63-75
- Thielen** S, Baum M, Hoffmann M, Loeppky RN, Eisenbrand G (2006): Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and alpha-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50:430-6.
- Thielen** S, Baum M, Hoffmann M, Loeppky RN, Eisenbrand G (2006): Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and alpha-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells. *Mol Nutr. Food. Res.*, 50, 430-436.
- Thomann** P, Koella WP, Krinke G, et al. (1974): The assessment of peripheral neurotoxicity in dogs: comparative studies with acrylamide and clioquinol. *Agents Actions* 4 (1):47–53.
- Törnqvist** M (1994): Epoxide adducts to N-terminal valine of hemoglobin. *Methods in Enzymology*, 231, 650-657.
- Törnqvist** M, Paulsson B, Vikström AC, Granath F (2008): Approach for cancer risk estimation of acrylamide in food on the basis of animal cancer tests and in vivo dosimetry. *J. Agric. Food Chem.* 56 (15):6004-12.
- Tsuda** H, Shimizu CS, Taketomi MK, Hasegawa MM, Hamada A, Kawata KM, Inui N (1993): Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. *Mutagenesis.* 8 (1): 23-9.
- Tsutsumi** M, Lasker JM, Takahashi T, Lieber CS (1993): In vivo induction of hepatic P450E1 by ethanol: role of increased enzyme synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 304, 209-218.
- Tyl** RW, Friedman MA (2003): Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol.*, 17 (1):1-13.
- Urban** M, Kavvadias D, Riedel K, Scherer G, Tricker AR (2006): Urinary mercapturic acids and a hemoglobin adduct for the dosimetry of acrylamide exposure in smokers and nonsmokers. *Inhal. Toxicol.*, 10, 831-9

- USFDA** (2003): The Exposure Assessment for Acrylamide. 13. August 2007
- USFDA** (2007): Agency Response Letter GRAS Notice Nr GRN 000214, 4. July 2007.
- Van Landingham** CB, Lawrence GA, Shipp AM (2004): Estimates of lifetime-absorbed daily doses from the use of personal-care products containing polyacrylamide: a Monte Carlo analysis. *Risk Anal.*, 24 (3):603-19.
- Vesper** HW, Licea-Perez H, Meyers T, Ospina M, Myers GL (2005): Pilot study on the impact of potato chips consumption on biomarkers of acrylamide exposure. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 561, 89-96.
- Vesper** HW, Ospina M, Meyers T, Ingham L, Smith A, Gray JG, Myers GL (2006): Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 959-964.
- Vikström** AC, Eriksson S, Paulsson B, Karlsson P, Athanassiadis I, Törnqvist M (2008): Internal doses of acrylamide and glycidamide in mice fed diets with low acrylamide contents. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52 (8), 974-980.
- WHO** (2002): Health implications of acrylamide in food. Report of a Joint FAO/WHO consultation.
- Wilson** KM, Rimm EB, Thompson KM, Mucci LA (2006): Dietary acrylamide and cancer in humans: a review. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 19-27.
- Wise** LD, Gordon LR, Soper KA, Duchai DM, Morrissey RE (1995): Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 17 (2):189-98.
- Witz** G, Lawrie NJ, Amoruso MA et al. (1987): Inhibition by reactive aldehydes of superoxide anion radical production from stimulated polymorphonuclear leukocytes and pulmonary macrophages. Effects on cellular sulfhydryl groups and NADPH oxidase activity. *Biochem. Pharmacol.* 36(6):721-726.
- Yaylayan** VA, Harty-Majors S, Ismail AA (1999): Monitoring carbonyl-amine reaction and enolization of 1-hydroxy-2-propanone (Acetol) by FTIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2335–2340.
- Yaylayan** VA, Keyhani A (2000): Origin of carbohydrate degradation products in L-Alanine/D-[(13)C]glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2415–2419.
- Zenick** H, Hope E, Smith MK (1986): Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 17 (4):457-72.
- Zyzak** DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD (2003): Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4782-4787.

8 Anhang

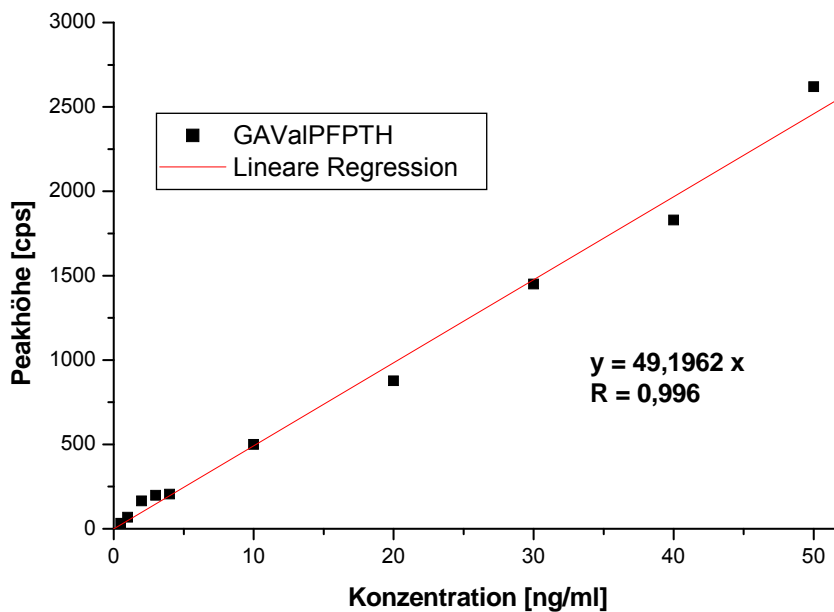
8.1 Regressionsgeraden der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

8.1.1 AAVaIPFPTH



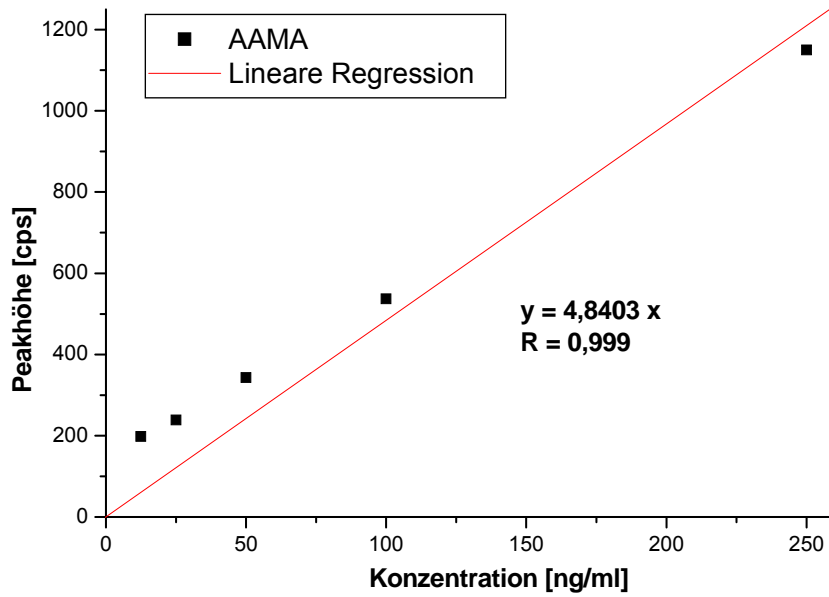
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
0,5	84
1	126
2	259
3	319
5	618
10	1080
20	2310
30	3710
40	4970

8.1.2 GAVaIPFPTH



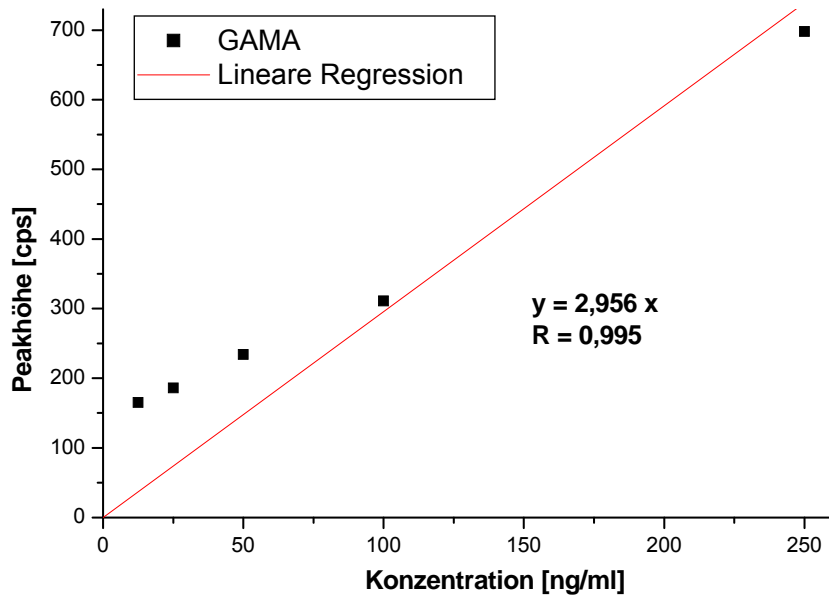
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
0,5	31
1	68
2	165
3	198
4	205
10	500
20	877
30	1450
40	1830
50	2620

8.1.3 AAMA (API 2000)



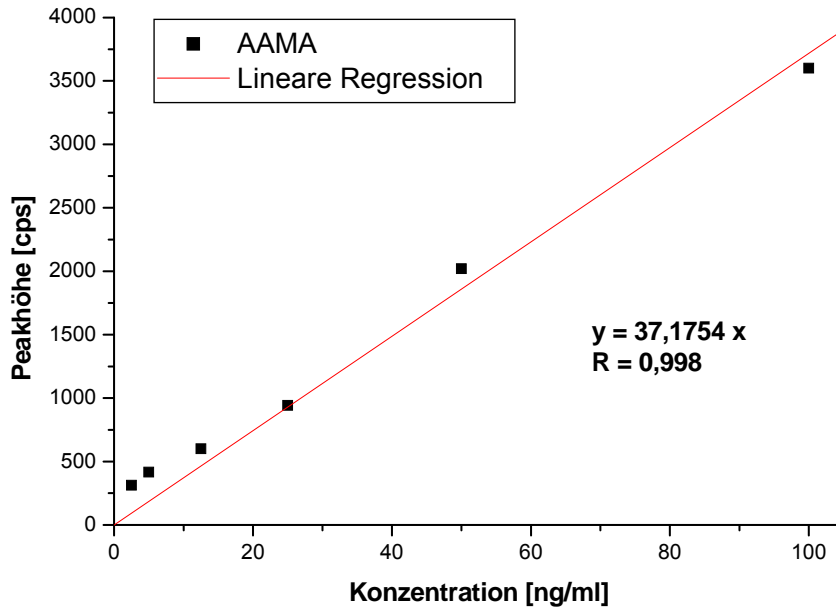
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
12,5	198
25	239
50	343
100	537
250	1150

8.1.4 GAMA (API 2000)



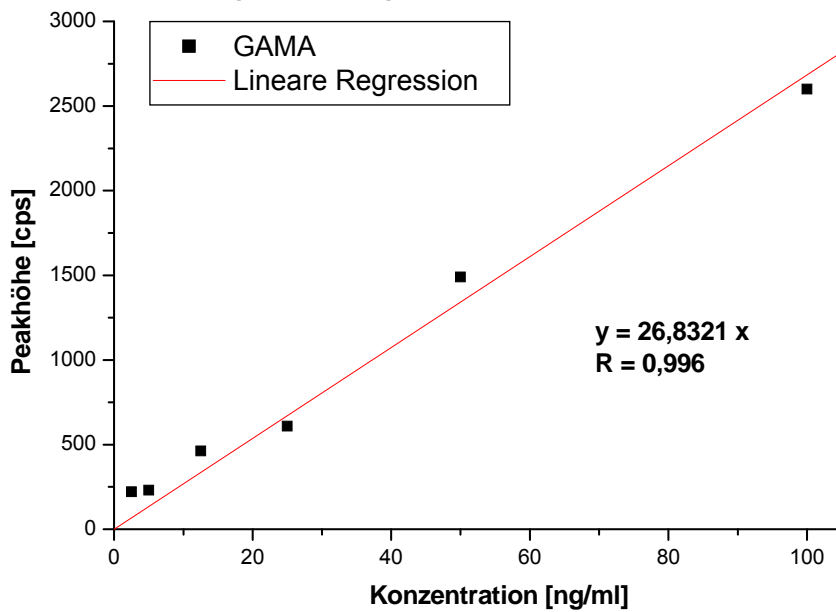
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
12,5	165
25	186
50	234
100	311
250	698

8.1.5 AAMA (API 3200)



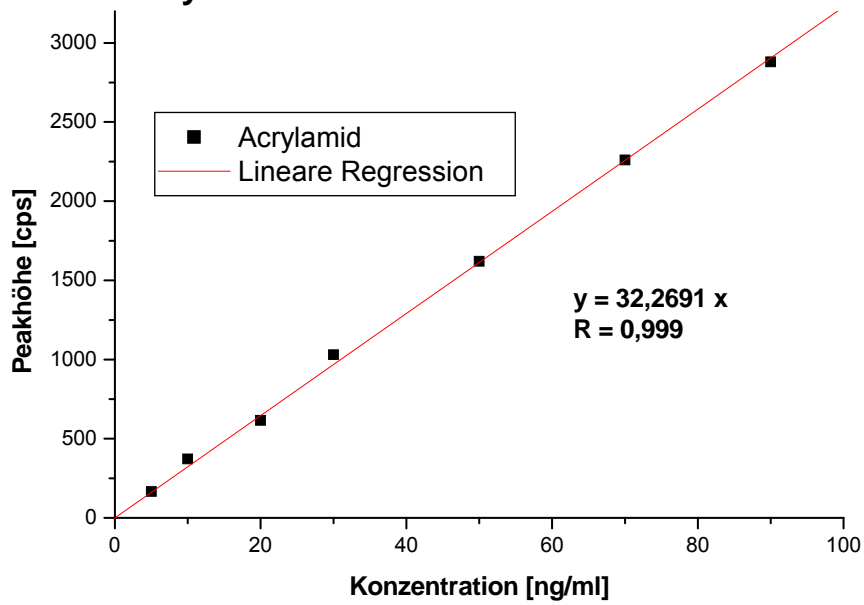
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
2,5	312
5	416
12,5	601
25	941
50	2020
100	3600

8.1.6 GAMA (API 3200)



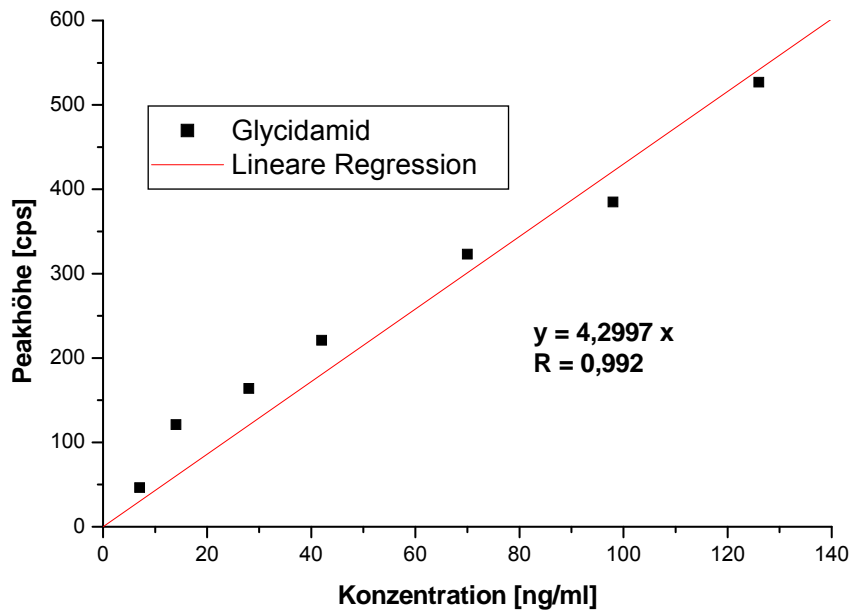
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
2,5	221
5	230
12,5	462
25	609
50	1490
100	2600

8.1.7 Acrylamid

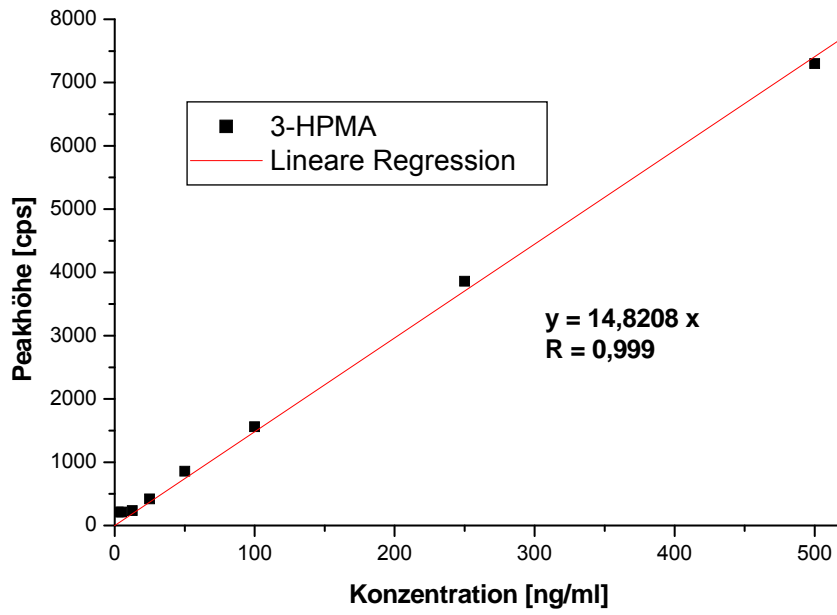


Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
5	167
10	372
20	615
30	1030
50	1620
70	2260
90	2880

8.1.8 Glycidamid



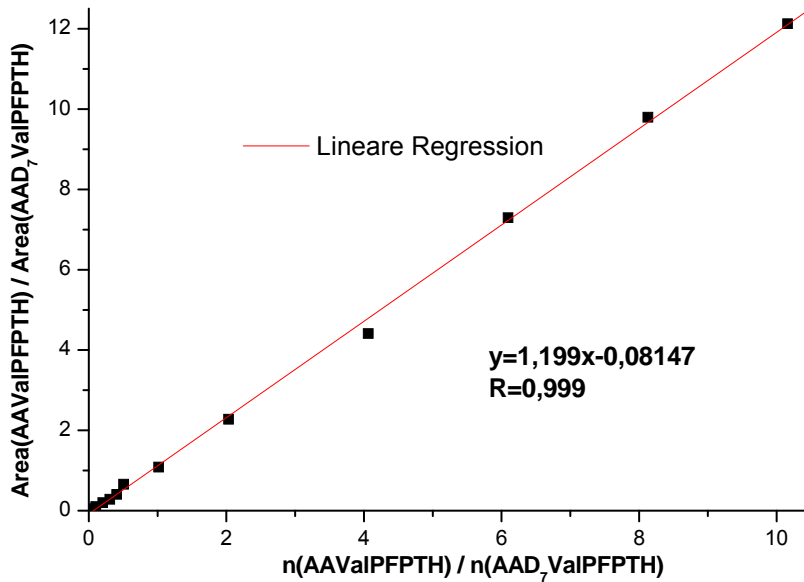
Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
7	46
14	121
28	164
42	221
70	323
98	385
126	527

8.1.9 HPMA

Konzentration [ng/ml]	Peakhöhe [cps]
2,5	214
5	215
12,5	236
25	419
50	855
100	1560
250	3860
500	7300

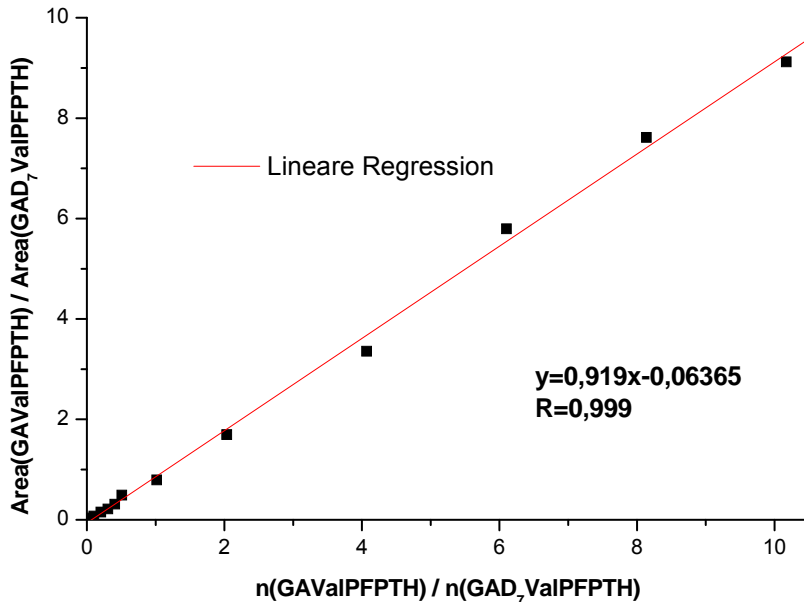
8.2 Kalibriergeraden/Linearität

8.2.1 AAVaIPFPTH



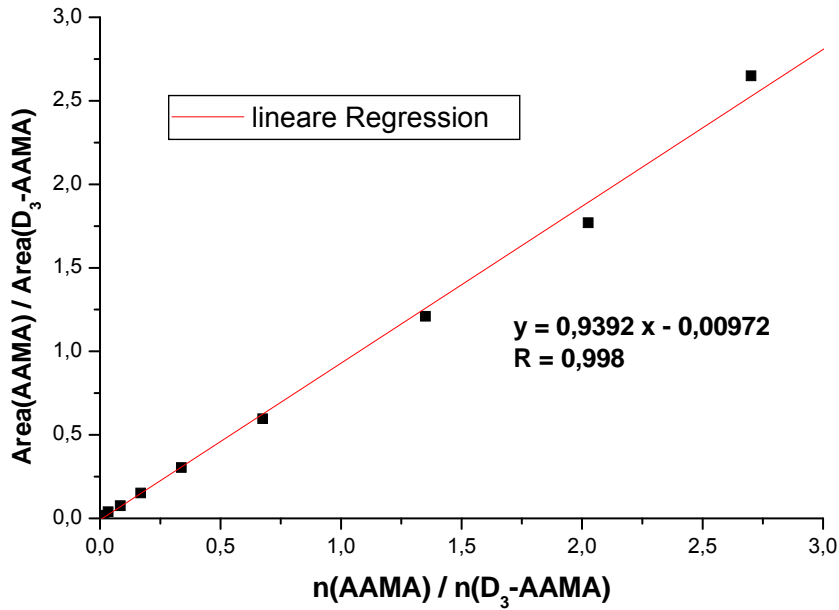
Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,05	0,051
0,1	0,102
0,199	0,203
0,285	0,305
0,407	0,406
0,658	0,508
1,083	1,016
2,274	2,032
4,41	4,063
7,292	6,095
9,797	8,127
12,123	10,158

8.2.2 GAVaIPFPTH



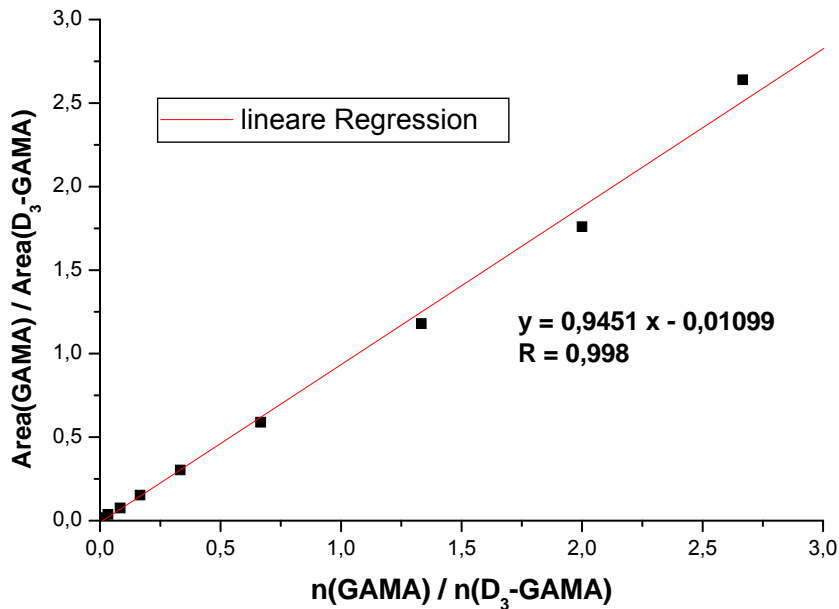
Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,037	0,051
0,074	0,102
0,154	0,203
0,214	0,305
0,31	0,407
0,49	0,509
0,794	1,017
1,696	2,034
3,356	4,069
5,795	6,103
7,616	8,137
9,12	10,172

8.2.3 AAMA



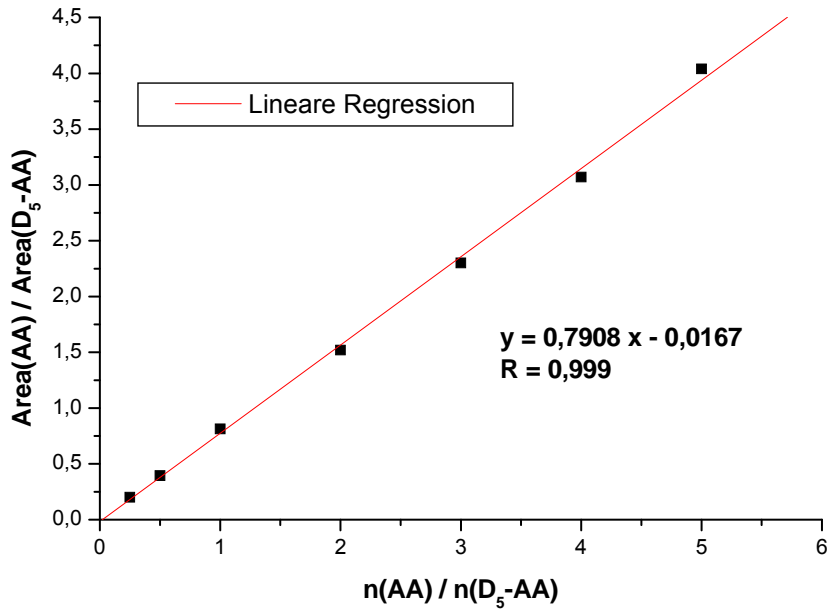
Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,00145	0,00084
0,00357	0,00169
0,00383	0,00422
0,00716	0,00844
0,0183	0,01688
0,0398	0,03376
0,0751	0,08441
0,152	0,16882
0,304	0,33763
0,597	0,67526
1,21	1,35052
1,77	2,02578
2,65	2,70104

8.2.4 GAMA



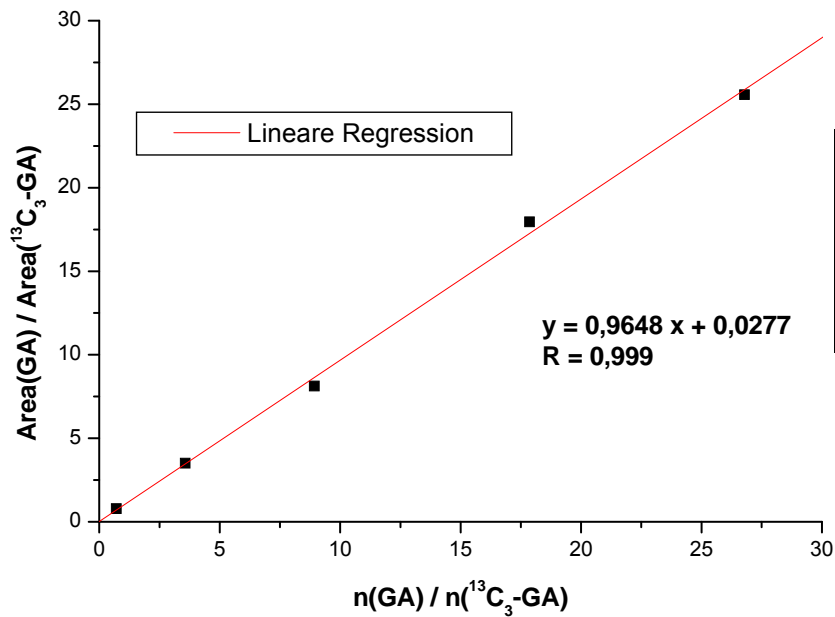
Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,00184	0,00083
0,00166	0,00167
0,0037	0,00417
0,0073	0,00833
0,0178	0,01667
0,0381	0,03333
0,0753	0,08333
0,153	0,16667
0,303	0,33333
0,589	0,66667
1,18	1,33333
1,76	2,0
2,64	2,66667

8.2.5 Acrylamid



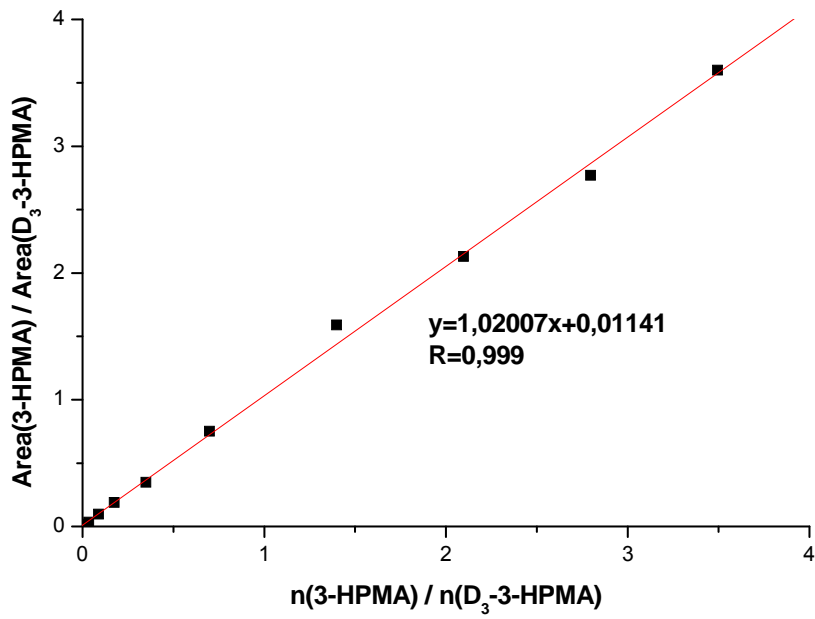
Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,201	0,25
0,395	0,5
0,813	1
1,52	2
2,3	3
3,07	4
4,04	5

8.2.6 Glycidamid



Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,79	0,71
3,51	3,57
8,13	8,93
17,96	17,86
25,57	26,79

8.2.7 HPMA



Area (Analyt)/ Area (IS)	n (Analyt)/ n (IS)
0,00498	0,00087
0,00388	0,00175
0,00385	0,00437
0,00853	0,00874
0,0171	0,01748
0,0337	0,03495
0,0972	0,08738
0,19	0,17476
0,349	0,34952
0,751	0,69904
1,59	1,39807
2,13	2,09711
2,77	2,79615
3,6	3,49518

8.3 Verwendete Formeln

Lineare Regression: $y = B \cdot x + A$ nach Origin 6.1 mit Messpunkten (x/y):

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i \right) \left(\sum_i x_i^2 \right) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i (x_i \cdot y_i) \right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum_i (x_i \cdot y_i) - \left(\sum_i x_i \right) \left(\sum_i y_i \right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes (m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung (σ_{n-1}):

$$\sigma_{n-1} = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte im Rahmen der Humanstudie durch den Anderson-Darling Test.

Als Signifikanztest wurde der unabhängige, 2-seitige t-Test herangezogen.

Veröffentlichungen

Posterbeiträge

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide: Impact of food-matrices on bioavailability and biological effects on rats.“
25 Jahre Lebensmittelchemie & Toxikologie an der TU Kaiserslautern, Symposium
„Cornerstones of Life Sciences in Chemistry“, 28.9.07, Kaiserslautern

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamid: Einfluss der Lebensmittelmatrix auf Bioverfügbarkeit und biologische Effekte in der Ratte.“
GDCH-Jahrestagung 2008, Regionalverband Süd-West, 3.-4.3.08 in Stuttgart-Hohenheim

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide: Impact of food matrices in bioavailability and biological effects on rats.“
DGPT-Jahrestagung 2008, 11-13.03.2008 in Mainz

Matthias Baum, Franz Ingo Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand
„Influence of food matrices on bioavailability and biological effects of acrylamide in the rat.“
AACR Annual Meeting 2008, 12-16.4.08 in San Diego, USA

Julia Feld, Franz Ingo Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Biomarker der Exposition und biologischen Wirksamkeit von Acrylamid in vivo.“
37. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 8.-10.09.2008 in Kaiserslautern

Julia Feld, Franz Ingo Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Effect Of Food Matrices On Bioavailability And Biological Effects Of Acrylamide in Rats.“
45th Congress of the European Societies of Toxicology, 05.-08.10.2008 in Rhodos,
Griechenland

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Balance of toxification and detoxification of acrylamide in the rat.“
DGPT-Jahrestagung 2009, 10-12.03.2009 in Mainz

Matthias Baum, Franz Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand
„Is there an effect of food matrices on the bioavailability of acrylamide?“
SOT Annual Meeting 2009, 15-19.3.09 in Baltimore, USA

Matthias Baum, Franz Ingo Berger, Julia Feld, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide in food: Balance of toxification and detoxification in the rat at doses, reflecting dietary worst case situations.“
AACR Annual Meeting 2009, 18-22.4.09 in Denver, USA

Publikationen

Franz Berger, Julia Feld, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Acrylamide: Impact of food-matrices on bioavailability and biological effects in rats”
Naunyn-Schmiedeberg’ s Archives of Pharmacology, Volume 377, Supplement 1, March
2008

Baum M, Berger FI, Feld J, Gerhardt N, Eisenbrand G
„Impact of food matrices on bioavailability and biological effects of acrylamide in rats”.
Research Association of the German Food Industry AiF 209 ZBG, 62-70, 2008

Julia Feld, Franz Berger, Matthias Baum, Gerhard Eisenbrand
„Balance of toxification and detoxification of acrylamide in the rat”
Naunyn-Schmiedeberg’ s Archives of Pharmacology, Volume 379, Supplement 1, March
2009

Baum M, Berger FI, Feld J, Eisenbrand G
„Acrylamid: Bioverfügbarkeit aus Lebensmitteln.“
Lebensmittelchemie Vol. 63 No. 2-2009

Doroshenko O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, Reith Y, Lazar A, Taubert D,
Kirchheiner J, Baum M, Eisenbrand G, Berger FI, Bertow D, Berkessel A, Sörgel F, Schömig
E, Tomalik-Scharte D
„In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide
toxicokinetics in humans.”
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2009 Feb;18(2):433-43.

Bedanken möchte ich mich bei

- dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des FEI-Projektes „Entwicklung und Anwendung neuer Verfahrensabläufe in Produktionsanlagen für Kartoffel- und Getreideerzeugnisse mit reduzierten Gehalten an Acrylamid und dessen Folgeprodukten“ (AiF 209 ZBG) in Zusammenarbeit mit dem Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e.V. (BLL) unter dem Teilprojekt „Acrylamid in Lebensmitteln: Einfluss spezifischer Lebensmittelmatrices auf Bioverfügbarkeit und biologische Effekte in der Ratte“
- der DFG für die finanzielle Unterstützung und Herrn Prof. Dr. med. Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität Köln für die Bereitstellung der Blutproben zur Untersuchung der Hämoglobinaddukte im Rahmen des DFG-Projektes „Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studiennummer: KPUK-03-ACR/PIL-01)
- dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Gert Fricker, Institut für pharmazeutische Technologie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche
- den Arbeitskreisen von Frau Prof. Dr. Elke Richling und Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die technische und materielle Unterstützung
- Dr. Michael Granvogl (TU München), Dr. Knut Franke (DIL Quakenbrück) und Dr. Heinz Kaiser (ILU Nuthetal) für die Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in den verwendeten Lebensmitteln
- Ingrid und Heike für die Unterstützung bei allen Problemen
- Ari, Michael, Karl-Heinz, Rainer und Eva für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft
- meinen Laborkollegen Julia, Nadine, Nico, Tamara, Hannah und Daniel für die fachlichen Diskussionen und das freundschaftliche Verhältnis.

Außerdem möchte ich allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Franz Ingo Berger
Anschrift: Herderstraße 6; 66894 Martinshöhe
Geburtsdatum: 19.09.1975 in Kaiserslautern
Familienstand: verheiratet; 1 Kind

Studium

04/2006-06/2009 Promotion bei Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand im Fachbereich Chemie; Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern; Thema „Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lebensmittelkontaminante Acrylamid in Ratte und Mensch“

04/2006-03/2008 Promotionsstipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz

10/2001-03/2006 Studium der Lebensmittelchemie an der TU Kaiserslautern
Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand mit dem Thema „Struktur-Aktivitätsbetrachtung indigoider Bisindole zur Wirkung an humanen Topoisomerasen“
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker

Berufstätigkeit

seit 11/2009 BASF SE, Tätigkeit im Bereich Regulatory Toxicology Chemicals

06/1999-09/2001 BASF AG, Ludwigshafen; Tätigkeit als Chemielaborant (Qualitätssicherung im Bereich Ammoniak- und Methanolsynthese)

Berufsausbildung

09/1996-05/1999 Ausbildung zum Chemielaboranten
BASF AG, Ludwigshafen

Wehrdienst

10/1995-07/1996 Absolvierung des Wehrdienstes in Gerolstein und Zweibrücken

Schulbildung

1992-1995 Hofenfels-Gymnasium Zweibrücken; Allgemeine Hochschulreife
1988-1992 Realschule Zweibrücken
1986-1988 Gemeinsame Orientierungsstufe von Realschule und Hofenfels-Gymnasium Zweibrücken
1982-1986 Grundschule Martinshöhe
