

**Untersuchungen zur
Acrylamid- und Acrolein-Exposition mittels
Lebensmittel- und Humanbiomonitoring**

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

D386

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Meike Rünz

Betreuung der Arbeit: Prof. Dr. Elke Richling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 22.02.2018

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 2013 bis Februar 2017 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Richling durchgeführt.

Prüfungskommission

- Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Sitzmann
1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Elke Richling
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	X
Kurzzusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Allgemeine Grundlagen	3
2.1.1 Risikobewertung	3
2.1.2 Umwelt- und Humanbiomonitoring	4
2.1.3 Hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminanten	5
2.2 Acrylamid	6
2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	6
2.2.2 Bildung	6
2.2.2.1 Industrielle Synthese	6
2.2.2.2 Exogene Bildung	6
2.2.2.3 Endogene Bildung	9
2.2.3 Gehalte in Lebensmitteln	10
2.2.3.1 Einflussfaktoren auf die Gehalte in Lebensmitteln	12
2.2.4 Toxikokinetik	15
2.2.4.1 Resorption und Verteilung	15
2.2.4.2 Metabolismus	16
2.2.4.3 Ausscheidung	23
2.2.5 Toxikodynamik	27
2.2.5.1 Akute Toxizität	27
2.2.5.2 Neurotoxizität	27
2.2.5.3 Reproduktionstoxizität	29
2.2.5.4 Entwicklungstoxizität	29
2.2.5.5 Genotoxizität und Mutagenität	31
2.2.5.6 Kanzerogenität	34
2.2.6 Expositionsabschätzung	36
2.2.6.1 Expositionsabschätzung mittels Umweltmonitoring	36
2.2.6.2 Expositionsabschätzung mittels Humanbiomonitoring	37
2.2.7 Risikocharakterisierung und Risikomanagement	42
2.3 Acrolein	44
2.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	44
2.3.2 Bildung	44
2.3.2.1 Industrielle Synthese	44
2.3.2.2 Exogene Bildung	44
2.3.2.3 Endogene Bildung	48
2.3.3 Gehalte in Lebensmitteln	51
2.3.3.1 Einflussfaktoren auf die Gehalte in Lebensmitteln	52

2.3.4	Toxikokinetik	53
2.3.4.1	<i>Resorption und Verteilung</i>	53
2.3.4.2	<i>Metabolismus</i>	54
2.3.4.3	<i>Ausscheidung</i>	58
2.3.5	Toxikodynamik	59
2.3.5.1	<i>Akute Toxizität</i>	60
2.3.5.2	<i>Subchronische Toxizität</i>	60
2.3.5.3	<i>Chronische Toxizität</i>	61
2.3.5.4	<i>Genotoxizität und Mutagenität</i>	61
2.3.5.5	<i>Kanzerogenität</i>	62
2.3.6	Expositionsabschätzung	63
2.3.6.1	<i>Expositionsabschätzung mittels Umweltmonitoring</i>	63
2.3.6.2	<i>Expositionsabschätzung mittels Humanbiomonitoring</i>	65
2.3.7	Risikocharakterisierung	68
3	Problemstellung	69
4	Ergebnisse und Diskussion	71
4.1	Entwicklung und Validierung von HPLC-ESI-MS/MS-Methoden	71
4.1.1	Acrylamid in Lebensmitteln	71
4.1.2	Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin	72
4.2	Humanstudie I.....	74
4.2.1	Analyse der Gewichtsentwicklung	75
4.2.2	Analyse der Aktivitätsprotokolle	75
4.2.3	Analyse der Lebensmittel	76
4.2.3.1	<i>Acrylamid</i>	76
4.2.3.2	<i>Acrolein</i>	81
4.2.3.3	<i>Protein</i>	82
4.2.3.4	<i>Asparagin</i>	84
4.2.4	Berechnung der täglichen alimentären Aufnahmemengen	86
4.2.4.1	<i>Acrylamid-Aufnahme</i>	86
4.2.4.2	<i>Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln</i>	90
4.2.4.3	<i>Protein-Aufnahme</i>	91
4.2.4.4	<i>Asparagin-Aufnahme</i>	92
4.2.4.5	<i>Kohlenhydrat-Aufnahme</i>	93
4.2.4.6	<i>Fett-Aufnahme</i>	94
4.2.4.7	<i>Energie-Aufnahme</i>	95
4.2.5	Analyse der Raumluft.....	96
4.2.5.1	<i>Acrolein</i>	96
4.2.6	Analyse des Urins der Probanden.....	96
4.2.6.1	<i>Urinvolumina</i>	96
4.2.6.2	<i>Kreatinin</i>	97
4.2.6.3	<i>Acrylamid-assoziierte Mercaptursäuren</i>	97
4.2.6.4	<i>Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren</i>	110

4.3	Untersuchungen zur Acrolein-Freisetzung.....	121
4.4	Humanstudie II	124
4.4.1	Berechnung der täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln	125
4.4.2	Ermittlung von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen.....	125
4.4.3	Analyse des Urins der Probanden.....	126
4.4.3.1	Urinvolumina	126
4.4.3.2	Kreatinin.....	126
4.4.3.3	Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren.....	126
5	Zusammenfassung	143
6	Materialien	147
6.1	Geräte.....	147
6.2	Verbrauchsmaterialien.....	148
6.3	Chemikalien	149
7	Methoden.....	151
7.1	Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln.....	151
7.1.1	Probenaufarbeitung	151
7.1.2	Probenvermessung.....	151
7.1.2.1	Methodenentwicklung.....	151
7.1.2.2	Methodenvalidierung	154
7.1.2.3	HPLC- und ESI _{pos} -MS/MS-Parameter.....	157
7.1.2.4	Kalibriergeraden.....	158
7.2	Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin	162
7.2.1	Probenaufarbeitung	162
7.2.2	Probenvermessung.....	163
7.2.2.1	Methodenentwicklung.....	163
7.2.2.2	Methodenvalidierung	169
7.2.2.3	HPLC- und ESI _{neg} -MS/MS-Parameter	170
7.2.2.4	Kalibriergeraden.....	172
7.3	Abschätzung von Nährstoff- und Energie-Gehalten in Lebensmitteln mittels Prodi 5.8 Expert	183
7.4	Bestimmung von Kreatinin in Urin	184
7.4.1	Versuchsvorbereitung.....	184
7.4.2	Versuchsdurchführung.....	184
7.5	Synthese von N-Aceetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein	185
7.6	Bestimmung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Kaliumphosphatpuffer.....	187
7.6.1	Probenvorbereitung	187
7.6.2	Probenvermessung.....	187
7.7	Berechnungen und Statistik	189
7.7.1	Berechnung der AUC	189
7.7.2	Anderson-Darling-Test.....	189
7.7.3	Gepaarter und ungepaarter t-Test	189
7.7.4	Wilcoxon-Test	189

7.7.5 Mann-Whitney- <i>U</i> -Test	189
8 Informationen zu den Humanstudien	190
8.1 Humanstudie I.....	190
8.1.1 Rechtliche Genehmigung.....	190
8.1.2 Rekrutierung der Probanden.....	190
8.1.3 Medizinische Voruntersuchung.....	190
8.1.4 Lebensmittel-Screening (Acrylamid-Gehalte)	191
8.1.5 Zusatzinformationen	192
8.2 Humanstudie II	193
8.2.1 Rechtliche Genehmigung.....	193
8.2.2 Rekrutierung der Probanden.....	193
8.2.3 Medizinische Voruntersuchung.....	193
9 Literaturverzeichnis	194
Anhang.....	211
Lebenslauf.....	i
Publikationsliste	iii
Danksagung	v
Erklärung.....	vii

Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
AA	Acrylamid
AA-Hb	Acrylamid-Hämoglobin-Addukt
AAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein
AAMA-SO	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein- <i>S</i> -oxid
AC	Acrolein
Ade	Adenin
AGE	<i>advanced glycation endproducts</i>
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
ALARA	so gering wie vernünftigerweise erreichbar <i>as low as reasonably achievable</i>
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AO	Aminooxidase
AUC	Fläche unter der Kurve <i>area under the curve</i>
BfR	Bundesinstitut für Riskobewertung
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BMDL	untere Vertrauensgrenze der Benchmarkdosis <i>benchmark dose lower confidence limit</i>
BMI	Body-Mass-Index
BSO	Buthioninsulfoximin
BVL	Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CA	Chromosomenaberration
CAD	stoßaktiviertes Dissoziationsgas <i>collisionally activated dissociation gas</i>
CE	Kollisionsenergie <i>collision energy</i>
CEMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein
CEP	Zelleintrittspotential <i>cell entrance potential</i>
CHO	Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters <i>chinese hamster ovary</i>
cII	chronisch lymphatische Leukämie
<i>c</i>_{max}	maximale Konzentration
CO₂	Kohlenstoffdioxid
<i>c</i>_{predose}	Ausgangskonzentration
CRP	C-reaktives Protein
CUR	Curtain-Gas <i>curtain gas</i>
<i>c</i>_{washout}	Konzentration nach einer <i>Washout</i> -Phase

CXP	Zellaustrittspotential <i>cell exit potential</i>
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DCF	2,7-Dichlorfluorescein
DDC	Diethyldithiocarbamat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DGF	Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft
DHPA	2,3-Dihydroxypropanamid
DHPS	2,3-Dihydroxypropansäure
DiP	Dipeptidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
DP	Declustering-Potential <i>declustering potential</i>
E%	Energieprozent
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit <i>European Food Safety Authority</i>
EH	Epoxidhydrolase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Eingangspotential <i>entrance potential</i>
ESI_{pos/neg}	positive/negative Elektrosprayionisation <i>positive/negative electrospray ionisation</i>
F344	Fischer 344
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FFM	fettfreie Masse
FKS	fetales Kälberserum <i>fetal bovine serum</i>
FM	Fettmasse
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GA	Glycidamid
GA-Hb	Glycidamid-Hämoglobin-Addukt
GAMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein
GC	Gaschromatographie
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
GK	Gemischtköstler
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin

Glycidaldehyd-MA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxy-2-hydroxyethyl)- <i>L</i> -cystein
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS1	Zerstäubergas <i>nebulizer gas</i>
GS2	Heizgas <i>turbo heater gas</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
Gua	Guanin
Hb	Hämoglobin
HEPA	Schwebstofffilter <i>high efficiency particulate air filter</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>high performance liquid chromatography</i>
HPMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)- <i>L</i> -cystein
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HS	Headspace
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IQR	Interquartilsabstand
IS	Ionenspray-Spannung <i>ion spray coltage</i>
ISIC	<i>Institute for Scientific Information on Coffee</i>
iso-GAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)- <i>L</i> -cystein
KG	Körpergewicht
LB	untere Grenze <i>lower bound</i>
LC₅₀	Konzentration, die zu einer 50%igen Reduktion der Zellviabilität führt
LDL	Lipoprotein geringer Dichte <i>low density lipoprotein</i>
LFBG	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LO(A)EL	<i>lowest observed (adverse) effect level</i>
LOD	Nachweisgrenze <i>limit of detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze <i>limit of quantification</i>
LOR	<i>limit of reporting</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis <i>mass-to-charge ratio</i>
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration MAK-Kommission: Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft

MB	mittlere Grenze <i>middle bound</i>
MCH	mittlerer Hämoglobin-Gehalt <i>mean corpuscular hemoglobin</i>
MCHC	mittlere Hämoglobin-Konzentration <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
MCV	mittleres Zellvolumen <i>mean cell volume</i>
METH	Methamphetamin
MOE	<i>margin of exposure</i>
MPO	Myeloperoxidase
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Salzsäure
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
N1-GA-dA	<i>N1-(2-Carboxy-2-hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin</i>
N3-GA-Ade	<i>N3-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin</i>
N7-GA-Gua	<i>N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin</i>
na	nicht angegeben
NAPS	Programm zur Überwachung der Luftverschmutzung (Kanada) <i>National Air Pollution Surveillance program (Canada)</i>
NAT	<i>N-Acetyltransferase</i>
NMR	Kernspinresonanz <i>nuclear magnetic resonance</i>
NO(A)EL	<i>no observed (adverse) effect level</i>
NTP	Nationales Toxikologie-Programm des Ministeriums für Gesundheitspflege und Soziale Dienste der Vereinigten Staaten von Amerika <i>National Toxicology Program of the United States Department of Health and Human Services</i>
OPMA	<i>N-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein</i>
OPMA-SO	<i>N-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein-S-oxid</i>
P95	95. Perzentil
PAL	Maß der physikalischen Aktivität <i>physical activity level</i>
PFPH	Pentafluorphenylhydrazin
PMA	Phorbolmyristatacetat
PND	postnataler Tag <i>postnatal day</i>
PRI	Referenzzufuhr der Bevölkerung <i>population reference intake</i>
Q	Quadrupol

ROS	reaktive Sauerstoffspezies <i>reactive oxygen species</i>
RR	relatives Risiko
SCE	Schwesterchromatidaustausch <i>sister chromatid exchange</i>
SD	Standardabweichung <i>standard deviation</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SKLM	Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft
SL	Stammlösung
SLRLT	X-chromosomal-rezessiven-Letalmutationenstest <i>sex linkes recessive letal test</i>
sMRM	<i>scheduled multiple reaction monitoring</i>
SPE	Festphasenextraktion <i>solid phase extraction</i>
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis <i>signal-to-noise ratio</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
tail % DNA	Prozentsatzes der DNA im Kometenschweif
TBW	gesamtes Körperwasser <i>total body water</i>
TDI	tolerierbare tägliche Aufnahmemenge <i>tolerable daily intake</i>
TEM	Temperatur
TK	Thymidinkinase
t_{max}	Zeit des Auftretens der maximalen Konzentration (C_{max})
UB	obere Grenze <i>upper bound</i>
UDS	unplanmäßige DNA-Synthese
UL	Umluft
US-EPA	Umweltschutzbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika <i>United States Environmental Protection Agency</i>
V	Veganer
WHO	Weltgesundheitsorganisation <i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
ZV	Zwischenverdünnung
α-OH-PdG	α -Hydroxy-1 N^2 -propano-2-deoxyguanosin
γ-GT	γ -Glutamyltransferase
γ-OH-PdG	γ -Hydroxy-1 N^2 -propano-2'-deoxyguanosin

Abstract

This work focuses on the heat-induced food contaminants acrylamide and acrolein. Acrylamide is mainly formed during the Maillard reaction from reducing sugars and amino acids (Mottram *et al.*, 2002), whereas a thermally induced acrolein formation was primarily described in fats and oils (Ewert *et al.*, 2014). Since toxicological effects are proven for acrylamide and acrolein, an exposure assessment is necessary to carry out a risk evaluation. For the exposure assessment of acrylamide, the *European Food Safety Authority* (EFSA) recommended to perform duplicate diet studies in which acrylamide contents in foods ready for consumption (duplicates) were determined to gather information on the acrylamide contents of home cooked food. The analysis of acrylamide metabolites in the urine of volunteers from the duplicate diet studies should be performed for the purpose of validation of the biomarkers (EFSA, 2015a). Such a human intervention study (I) was performed with 14 volunteers in a controlled environment following a prescribed diet. The evaluation of this study was carried out in the present work and allowed to validate the acrylamide-associated mercapturic acids *N*-acetyl-*S*-(carbamoyl-ethyl)-L-cysteine (AAMA) and *N*-acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine (GAMA) as biomarkers of an alimentary acrylamide exposure. In addition, the study indicated the presence of an AAMA and GAMA baseline level, which was probably caused by endogenous acrylamide formation. Another focus of this work was to determine the acrolein-associated mercapturic acids *N*-acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cysteine (HPMA) and *N*-acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cysteine (CEMA) in the urine of volunteers of study I and in the urine of volunteers of a further human study (II). The excretion of those biomarkers of acrolein exposure was examined in the connection with the intake of highly heated food. The human study II was performed with omnivores ($n = 10$) and vegans ($n = 10$) and in contrast to study I the volunteers kept their lifestyle and eating habits during the ten-day study period. Neither in study I nor in study II a correlation between the excretion of the acrolein-associated mercapturic acids HPMA and CEMA and the intake of highly heated food was shown. Under controlled conditions (study I) a constant HPMA and CEMA excretion (baseline level) was observed. An in part considerably higher HPMA and CEMA excretion compared to study I was observed under free living conditions (study II). This indicated the impact of a non-alimentary exogenous acrolein exposure on the HPMA and CEMA excretion.

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den hitzeinduzierten Lebensmittelkontaminanten Acrylamid und Acrolein. Acrylamid entsteht vorwiegend im Rahmen der Maillard-Reaktion beim Erhitzen von Lebensmitteln aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren (Mottram *et al.*, 2002), wohingegen eine thermisch induzierte Acrolein-Bildung bisher vor allem in Fetten und Ölen beschrieben wurde (Ewert *et al.*, 2014). Sowohl für Acrylamid als auch für Acrolein sind toxische Wirkungen nachgewiesen, sodass eine Expositionsabschätzung nötig ist, um eine Risikobewertung vornehmen zu können. Zur Abschätzung der Acrylamid-Exposition empfahl die *European Food Safety Authority* (EFSA) die Durchführung von Duplikatstudien, bei denen eine Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in den verzehrfertigen Mahlzeiten (Duplikaten) erfolgen sollte, um genauere Informationen zu den Acrylamid-Gehalten von im Haushalt zubereiteten Lebensmitteln zu erhalten. Eine Analyse von Acrylamid-Metaboliten im Urin der Probanden der Duplikatstudien sollte zur Validierung der Biomarker erfolgen (EFSA, 2015a). Eine entsprechend konzipierte neuntägige Humanstudie (I) wurde mit 14 Probanden unter Vorgabe eines Ernährungsplans in einer kontrollierten Umgebung durchgeführt. Die Auswertung dieser Studie erfolgte im Rahmen dieser Arbeit und ermöglichte es die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren *N*-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein (AAMA) und *N*-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (GAMA) als Biomarker der alimentären Acrylamid-Exposition zu validieren. Zusätzlich gab die Humanstudie Hinweise auf das Vorliegen eines Basislevels der AAMA- und GAMA-Ausscheidung, welches möglicherweise auf einer endogenen Acrylamid-Bildung beruhte. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein (HPMA) und *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein (CEMA) im Urin der Probanden der Humanstudie I sowie im Urin der Probanden einer weiteren Humanstudie (II) dar. Die Ausscheidung dieser Biomarker der Acrolein-Exposition wurde im Zusammenhang mit der Aufnahme von hochoerhitzten Lebensmitteln betrachtet. Bei Humanstudie II handelte es sich um eine Studie, die mit Gemischtköstlern (n = 10) und Veganern (n = 10) über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt wurde. Anders als in Humanstudie I behielten die Probanden während des Studienzeitraums ihre Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bei. Es zeigte sich bei Humanstudie I sowie Humanstudie II kein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA und der Aufnahme von hochoerhitzten Lebensmitteln. Unter kontrollierten Bedingungen (Humanstudie I) wurde eine konstante HPMA- und CEMA-Ausscheidung (Basislevel) beobachtet, wohingegen unter *free living* Bedingungen (Humanstudie II) zum Teil eine deutlich höhere HPMA- und CEMA-Ausscheidung nachgewiesen wurde. Dies legte den Einfluss einer nicht-alimentären exogenen Acrolein-Exposition auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung nahe.

1 Einleitung

Die Sicherheit von Lebensmitteln ist für den Verbraucher von besonderer Bedeutung. Kontaminanten sind in Lebensmitteln unerwünscht, jedoch zum Teil unvermeidbar. Sie können bei der Herstellung, Verpackung, Lagerung oder Zubereitung von Lebensmitteln entstehen (BfR, 2017; BMEL, 2017).

Acrylamid ist eine hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminante, die im Rahmen der Maillard-Reaktion aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren wie Asparagin entsteht (Mottram *et al.*, 2002). Hohe Acrylamid-Gehalte finden sich vor allem in hochoverhitzten Kartoffelprodukten (z. B. in Kartoffelchips und Pommes frites) oder Getreideprodukten (z. B. in Knäckebrot und Lebkuchen). Diese stark erhitzten Lebensmittel stellen neben Tabakrauch die Hauptexpositionsquelle dar (EFSA, 2015a).

Schon vor dem Nachweis in Lebensmitteln wurde Acrylamid von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als „möglicherweise krebserzeugend beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft (IARC, 1994). Um das Risiko, dass von der Acrylamid-Aufnahme über Lebensmittel ausgeht, beurteilen zu können, ist eine Abschätzung der Exposition nötig. Durch Lebensmittelmonitoring, welches auf einer Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln basiert, kann die tägliche Acrylamid-Aufnahme abgeschätzt werden. Entsprechend wurde von der *European Food Safety Authority* (EFSA) eine durchschnittliche tägliche Acrylamid-Aufnahme in Europa von 0,4 - 1,9 µg/kg Körpergewicht (KG) ermittelt (EFSA, 2015a).

Eine weitere Möglichkeit die Acrylamid-Exposition zu ermitteln stellt das Humanbiomonitoring dar, bei dem die Bestimmung von Biomarkern wie Mercaptursäuren in Urin erfolgt. Die hauptsächlich ausgeschiedene Acrylamid-Mercaptursäure ist *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein (AAMA). Ihre Ausscheidung über 24 Stunden macht circa 30 - 40 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge aus. Ebenfalls wird auch die Mercaptursäure des genotoxischen Metaboliten Glycidamids über den Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung der Glycidamid-Mercaptursäure *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein (GAMA) macht über 24 Stunden circa 1 - 3 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge aus (Fennell *et al.*, 2006; Kopp und Dekant, 2009).

Zur Optimierung der Abschätzung der Acrylamid-Exposition empfiehlt die EFSA die Durchführung von Duplikatstudien, bei denen sowohl die Acrylamid-Gehalte in den verzehrfertigen Lebensmitteln (Duplikat-Mahlzeiten) als auch die Biomarker-Ausscheidung in Urin untersucht werden (EFSA, 2015a).

Acrolein ist eine weitere toxikologisch relevante α,β -ungesättigte Carbonylverbindung für die eine hitzeinduzierte Bildung in Lebensmitteln postuliert ist. Ob die Acrolein-Aufnahme über Lebensmittel einen entscheidenden Beitrag zur Gesamtexposition leistet ist bisher nicht geklärt. Eindeutig belegt ist jedoch der Beitrag von Tabakkonsum zur Acrolein-Exposition. Daten zu Acrolein-Gehalten in Lebensmitteln existieren nur für wenige Lebensmittelgruppen (SKLM, 2012). Hohe Gehalte konnten bisher in erhitzten Ölen und Fetten nachgewiesen werden (Ewert *et al.*, 2011; Granvogl, 2014).

Aufgrund der wenigen existierenden Daten zu Acrolein-Gehalten in Lebensmitteln ist keine zuverlässige Expositionsabschätzung mittels Lebensmittelmonitoring möglich. Eine Abschätzung der Exposition kann jedoch mittels Humanbiomonitoring erfolgen. Die Acrolein-Mercaptursäuren *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein (HPMA) und *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein (CEMA) stellen Biomarker der Acrolein-Exposition dar, die in Urin bestimmt werden können. Beim Menschen existieren allerdings nur

unzureichende Daten zur prozentualen Ausscheidung der Expositionsbiomarker. Je nach angenommener prozentualer Acrolein-Ausscheidung als HPMA über 24 Stunden wurde eine mittlere tägliche Acrolein-Exposition von 2,1 - 24 µg/kg KG ermittelt (SKLM, 2012).

Eine mittels Humanbiomonitoring abgeschätzte Exposition spiegelt jedoch nicht nur die alimentäre Acrolein-Aufnahme wider, sondern auch die Exposition durch endogene Bildung und durch andere exogene Acrolein-Quellen. Es gilt abzuklären, inwiefern Lebensmittel im Vergleich zu anderen exogenen Acrolein-Quellen und/oder einer endogenen Bildung zur Ausscheidung von Biomarker der Acrolein-Exposition beitragen.

2 Kenntnisstand

2.1 Allgemeine Grundlagen

2.1.1 Risikobewertung

„Risiko“ wird vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) als „das Ausmaß eines möglichen Schadens und die Wahrscheinlichkeit, dass er eintritt“ definiert. Ein Risiko ergibt sich somit aus der Gefährdung durch einen Stoff sowie durch das Ausmaß und die Häufigkeit der Exposition mit diesem Stoff. Die Risikobewertung eines Stoffes umfasst vier Schritte, welche in Abbildung 1 dargestellt sind (BfR, 2010).



Abbildung 1: Arbeitsschritte der Risikobewertung [erstellt nach (BfR, 2010)]

Den ersten Schritt der Risikobewertung stellt die Identifizierung der möglichen Gefahrenquelle dar. Es folgt die Charakterisierung des Gefährdungspotenzials, bei der eine qualitative und/oder quantitative Beurteilung der gesundheitsschädlichen Wirkung, die von der Gefahrenquelle ausgehen könnte, durchgeführt wird. Bei diesem Punkt werden sowohl die Toxikokinetik als auch die Toxikodynamik des Stoffes betrachtet. Anschließend erfolgt eine Abschätzung der Exposition des Menschen unter Berücksichtigung der relevanten Expositionspfade. Hierfür sind Umwelt- und Humanbiomonitoring-Daten von Bedeutung (siehe Kapitel 2.1.2). Abschließend wird eine Risikocharakterisierung durchgeführt (BfR, 2010), welche sich je nach Toxizität des Stoffes unterscheidet. Für die meisten Stoffe wird davon ausgegangen, dass es einen Schwellenwert gibt, unterhalb dessen keine Toxizität vorliegt. Bei diesen Stoffen können gesundheitsbezogene Richtwerte wie eine duldbare tägliche Aufnahmemenge (*tolerable daily intake*, TDI) ermittelt werden. Die Ableitung eines TDI erfolgt unter Berücksichtigung verschiedener Unsicherheitsfaktoren ausgehend von einem im Tierversuch ermittelten toxikologischen Endpunkt wie der unteren Vertrauensgrenze der Benchmarkdosis (*benchmark dose lower confidence limit*, BMDL) oder dem *no observed adverse effect level* (NOAEL). Anders stellt sich die Situation für genotoxische Kanzerogene dar. Bei diesen wird davon ausgegangen, dass es keinen Schwellenwert für die Kanzerogenität gibt (Committee on Carcinogenicity, 2012). Die Exposition mit diesen Stoffen sollte am besten vollständig vermieden werden, da dies jedoch technologisch oft nicht möglich ist, gilt ein Minimierungskonzept. Dies besagt, dass der Gehalt der Substanz, soweit minimiert werden soll wie es technologisch erreichbar ist. Bezeichnet wird dieses Prinzip als *as low as reasonably achievable* (ALARA) - Prinzip (BfR, 2005). Zur Priorisierung des Risikos kann außerdem ein *margin of exposure* (MOE) ermittelt werden. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis eines im Tierversuch ermittelten toxikologischen Endpunktes, bevorzugt dem BMDL₁₀, und der abgeschätzten Exposition. Der MOE verhält sich umgekehrt proportional zum Risiko. Bei einem MOE größer 10.000 wird von einem geringen Risiko ausgegangen und die Priorität für das Risikomanagement wird als gering eingestuft. Je weiter der MOE unter 10.000 liegt, desto größer wird das Risiko und desto größer wird die Priorität für das Risikomanagement Minimierungsmaßnahmen einzuleiten (BfR, 2005; EFSA, 2005).

2.1.2 Umwelt- und Humanbiomonitoring

Um die Exposition des Menschen mit einem Schadstoff abschätzen zu können, ist ein Monitoring nötig. Dieses Monitoring von Schadstoffen lässt sich grundlegend in zwei Bereiche einteilen, das Umwelt- und das Humanbiomonitoring (siehe Abbildung 2).

UMWELT-MONITORING	HUMANBIOMONITORING		Erkrankung
	Belastungsmonitoring	Effektmonitoring	
<i>äußere Belastung</i>	<i>innere Belastung</i>	<i>biochemische Effekte</i> <i>biologische Effekte</i>	
Schadstoffe in Luft, Boden, Wasser, und Lebensmitteln	Schadstoffe und Metaboliten in biologischen Materialien	Protein- und DNA-Addukte cyto genetische Parameter Enzyme und Enzymausstattung	
URSACHE	Bedeutung für die Risikoabschätzung		WIRKUNG

Abbildung 2: Monitoring von Schadstoffen [modifiziert nach (DFG, 2001)]

Das Umweltmonitoring dient hauptsächlich der Beobachtung und Überwachung von Belastungssituationen. Es umfasst Schadstoffmessungen in Umweltmedien wie Wasser, Boden und Luft. Ebenfalls beinhaltet es das Lebensmittelmonitoring, bei dem die Schadstoffgehalte in Lebensmitteln bestimmt werden. Eine andere Möglichkeit stellt das Humanbiomonitoring dar, welches sich in das Belastungs- und das Effektmonitoring unterteilen lässt. Beim Belastungsmonitoring, welches auch als Dosismonitoring bezeichnet wird, werden Schadstoff- und Metabolit-Konzentrationen in humanbiologischen Materialien wie Blut, Urin oder Ausatemluft durch einmalige oder wiederholte Messung bestimmt. Das Effektmonitoring befasst sich mit der Messung von biologischen Parametern, die die Wirkung des Schadstoffes anzeigen. Diese Wirkparameter sind bis auf wenige Ausnahmen unspezifisch und müssen deswegen in Zusammenhang mit den Belastungsparametern betrachtet werden. Im Unterschied zum Umweltmonitoring ist es mit Hilfe des Humanbiomonitorings möglich, die individuelle Belastung und das individuelle Gesundheitsrisiko zu ermitteln. Da die bestimmten Schadstoff- bzw. Metabolit-Konzentrationen jedoch die Gesamtbelastung des Organismus widerspiegeln, kann nicht zwischen den über die verschiedenen Aufnahmewege (oral, inhalativ und dermal) zustande kommenden Schadstoffbelastungen des Organismus differenziert werden. Hierzu sind Informationen zu den genauen Lebensgewohnheiten sowie Untersuchung der äußeren Belastungen mittels Umweltmonitoring nötig. Umwelt- und Humanbiomonitoring sind somit als sich ergänzende Untersuchungsansätze anzusehen, die eine Abschätzung der Schadstoff-Exposition ermöglichen (Umweltbundesamt, 1996; DFG, 2001).

2.1.3 Hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminanten

Eine Exposition mit Schadstoffen erfolgt unter anderem durch den Verzehr von Lebensmitteln. Bei den Schadstoffen, die in Lebensmitteln vorhanden sind, kann es sich um toxische Stoffe handeln die natürlich im Lebensmittel vorkommen wie z. B. Stoffe die von Pflanzen als Schutz gegen Fraßfeinde produziert werden. Ebenfalls können toxikologisch bedenkliche Rückstände von z. B. Pflanzenschutzmitteln oder Tierarzneimitteln sowie Kontaminanten, welche z. B. bei der Herstellung, Verpackung, Lagerung oder Zubereitung entstehen, in Lebensmitteln vorliegen (EFSA, 2016).

Einen wichtigen Herstellungs- und/oder Zubereitungsprozess, bei dem es zur Bildung von Kontaminanten kommen kann, stellt das Erhitzen von Lebensmitteln dar. Ziel des Erhitzens ist es die Qualität und Haltbarkeit der Lebensmittel zu erhöhen. Durch das Erhitzen kommt es zu einer Vielzahl von physikalischen und chemischen Veränderungen. Neben dem Geschmack und dem Aroma, ändert sich die Farbe, die Form, die Größe sowie die Konsistenz des Lebensmittels (Skog und Alexander, 2006).

Eine wichtige Reaktion, die mit dem Erhitzen von Lebensmitteln in Verbindung gebracht wird, ist die Maillard-Reaktion, die ihren Name nach dem französischen Forscher Louis Maillard erhielt, der um 1912 auf diesem Gebiet arbeitete (Maillard, 1912). Auch wenn der Begriff Maillard-Reaktion impliziert, dass es sich um eine einzige Reaktion handelt, wird unter der Maillard-Reaktion eine Klasse von Reaktionen verstanden, die nach einem gemeinsamen Schema ablaufen. Während der Maillard-Reaktion reagieren Aminosäuren und reduzierende Zucker bei hohen Temperaturen über mehrere Zwischenstufen zu verschiedenen flüchtigen Reaktionsprodukten, welche zum Aroma und Geschmack des Lebensmittels beitragen, sowie zu nicht flüchtigen Verbindungen wie z.B. zu den Melanoidinen, welche vor allem für die Farbe der Lebensmittel verantwortlich sind. Diesen erwünschten Reaktionsprodukten der Maillard-Reaktion stehen jedoch auch unerwünschte Reaktionsprodukte gegenüber, die ein kanzerogenes und/oder mutagenes Potential besitzen können und als hitzeinduzierte Kontaminanten bezeichnet werden. Die bekanntesten hitzeinduzierten Kontaminanten, die während der Maillard-Reaktion gebildet werden, stellen heterozyklische aromatische Amine, Furan und Furanderivate sowie α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen wie Acrylamid und Acrolein dar (Skog und Alexander, 2006). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den hitzeinduzierten Lebensmittelkontaminanten Acrylamid (siehe Abbildung 3) und Acrolein (siehe Abbildung 4).

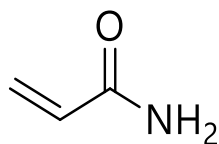


Abbildung 3: Strukturformel von Acrylamid

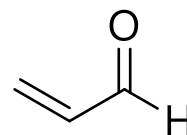


Abbildung 4: Strukturformel von Acrolein

2.2 Acrylamid

2.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Acrylamid (Prop-2-enamid, CAS: 79-06-1) hat die Summenformel C_3H_5NO und weist ein Molekulargewicht von 71,08 g/mol auf. Der Schmelzpunkt liegt im Bereich von 84 - 86 °C und der Siedepunkt bei 125 °C (33,3 hPa). Bei Raumtemperatur ist Acrylamid ein farb- und geruchloser kristalliner bzw. pulverförmiger Feststoff, welcher in Wasser gut löslich ist (BfR, 2011; IFA, 2017).

Acrylamid zählt zu den α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen und besitzt durch die konjugierte Struktur mit elektrophilem Charakter eine hohe Reaktivität (SKLM, 2012). Es kann radikalisch zu Polyacrylamid polymerisieren sowie elektrophil über eine Michael-Addition mit Nukleophilen reagieren (Lignert *et al.*, 2002).

2.2.2 Bildung

2.2.2.1 Industrielle Synthese

Hydratation von Acrylnitril zu Acrylamid

In Europa liegt die industrielle Produktion von Acrylamid bei 150.000 bis 200.000 Tonnen pro Jahr (SCOEL, 2011). Als Industriechemikalie wird Acrylamid vor allem zur Herstellung von Polyacrylamid verwendet, welches zur Wasseraufbereitung und als Dichtungsmittel genutzt wird sowie Anwendung in der Kosmetik-, Papier- und Verpackungsindustrie findet (EFSA, 2015a). Die industrielle Synthese von Acrylamid erfolgt durch Hydratation von Acrylnitril (siehe Abbildung 5). Dieser Prozess kann sowohl enzymatisch als auch Kupfer-katalysiert erfolgen (Yamada und Kobayashi, 1996).

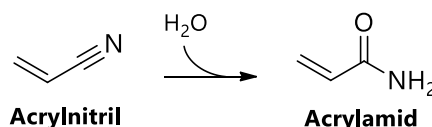


Abbildung 5: Hydratation von Acrylnitril zu Acrylamid [erstellt nach (Yamada und Kobayashi, 1996)]

2.2.2.2 Exogene Bildung

Im Jahr 2002 wurde Acrylamid erstmals in erhitzten Lebensmitteln nachgewiesen. Es entsteht vor allem in Lebensmitteln, die einer Hitzebehandlung (≥ 120 °C) wie Rösten, Backen, Braten oder Frittieren, unterzogen werden (Tareke *et al.*, 2002; EFSA, 2015a). Ebenfalls entsteht Acrylamid bei Verbrennungsprozessen und ist unter anderem in Tabakrauch enthalten (Moldoveanu und Gerardi, 2011; EFSA, 2015a).

Den Hauptbildungsweg stellt die hitzeinduzierte Bildung von Acrylamid im Rahmen der Maillard-Reaktion aus Aminosäuren wie Asparagin und reaktiven Carbonylverbindungen wie Glucose dar (Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002). Als Nebenweg der Acrylamid-Bildung ist jedoch auch ein direkter thermischer Abbau von Aminosäuren zu Acrylamid beschrieben (Stadler *et al.*, 2002; Yasuhara *et al.*, 2003). Weitere untergeordnete Mechanismen der Acrylamid-Bildung gehen von Triacylglyceriden (Yasuhara *et al.*, 2003) und Kohlenhydraten (Gertz und Klostermann, 2002) aus.

Bildung aus Aminosäuren

Bildung aus Asparagin und reaktiven Carbonylverbindungen

Acrylamid entsteht vor allem aus Asparagin und reaktiven Carbonylverbindungen im Rahmen der Maillard-Reaktion ab Temperaturen $> 120\text{ °C}$ (Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002). Der postulierte Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 6 dargestellt.

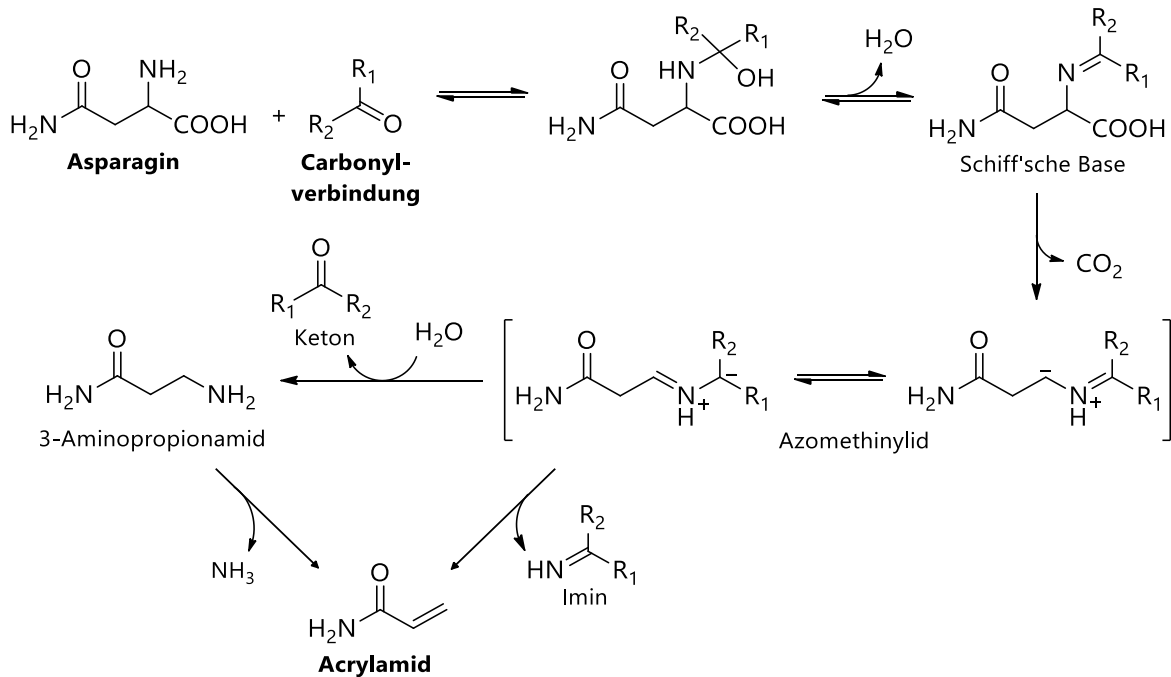


Abbildung 6: Bildung von Acrylamid aus Asparagin und reaktiven Carbonylverbindungen [modifiziert nach (Zyzak *et al.*, 2003)]

Im ersten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff der freien α -Aminogruppe von Asparagin an die Carbonylgruppe der reaktiven Carbonylverbindungen. Unter Dehydratisierung entsteht eine Schiffsche Base, die bei hohen Temperaturen decarboxyliert wird. Das entstandene Azomethinylid kann auf zwei Wegen weiter reagieren. Zum einen ist in Anwesenheit von Wasser die Reaktion zu 3-Aminopropionamid möglich, aus dem durch Desaminierung Acrylamid entstehen kann. Zum anderen kann es auch durch Abspaltung eines Imins direkt zur Acrylamid-Bildung kommen (Xu *et al.*, 2014).

Reaktive Carbonylverbindungen die besonders effizient zur Acrylamid-Bildung führen sind α -Hydroxycarbonylverbindungen wie Glucose und Fructose. Fructose enthält zwei α -Hydroxycarbonylgruppen und führt zu einer höheren Acrylamid-Bildung im Vergleich zu Glucose, welche nur eine α -Hydroxycarbonylgruppe aufweist. Die Acrylamid-Bildungsrate lag beim Erhitzen von Asparagin und Fructose (1:1) für 30 Minuten auf 180 °C bei $1130\text{ }\mu\text{mol/mol}$ (Stadler *et al.*, 2004). Das Erhitzen von Asparagin und Glucose (1:1) für 30 Minuten auf 180 °C resultierte in einer Acrylamid-Bildungsrate von $368\text{ }\mu\text{mol/mol}$. Unter Wasser-Zugabe ($0,005\text{ ml}$) stieg die Acrylamid-Bildungsrate aus Asparagin und Glucose (1:1) unter denselben Erhitzungsbedingungen auf $960\text{ }\mu\text{mol/mol}$ (Stadler *et al.*, 2002). Auch die Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylverbindungen, welche ebenfalls im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildet werden, führte zur Acrylamid-Bildung, jedoch mit geringerer Ausbeute verglichen zur Reaktion mit α -Hydroxycarbonylverbindungen (Stadler *et al.*, 2004).

Bildung aus anderen Aminosäuren und reaktiven Carbonylverbindungen

Neben der Bildung von Acrylamid aus Asparagin wurde auch eine Bildung von Acrylamid aus den Aminosäuren Methionin, Glutamin, Cystein und Asparaginsäure in Anwesenheit von reaktiven Carbonylverbindungen nachgewiesen. Die Acrylamid-Bildung aus Methionin, Glutamin und Cystein war weniger Effizient als die aus Asparagin. Die Bildungsrate von Acrylamid aus Asparagin und Glucose (1:1) lag beim Erhitzen unter Wasser-Zugabe für 30 Minuten bei 180 °C bei 960 µmol/mol. Hingegen lag die Acrylamid-Bildungsrate von Methionin, Glutamin bzw. Cystein und Glucose unter den gleichen Bedingungen jeweils bei weniger als 20 µmol/mol (Stadler *et al.*, 2002). Ebenfalls wurde eine geringe Acrylamid-Bildung (0,5 - 1 mg/mol) auch nach Erhitzen von Asparaginsäure und Glucose bei 185 °C in einem Phosphatpuffer beschrieben (Mottram *et al.*, 2002).

Bildung aus Aminosäuren durch thermischen und enzymatischen Abbau

Auch in Abwesenheit von reaktiven Carbonylverbindungen kann es zur Acrylamid-Bildung aus verschiedenen Aminosäuren kommen. In einem *in vitro* Experiment von Stadler *et al.* (2002) wurden nach Erhitzen von Asparagin bzw. Methionin für 30 Minuten bei 180 °C Acrylamid-Bildungsraten von 0,6 bzw. 3,6 µmol/mol Aminosäure bestimmt. Yasuhara *et al.* (2003) ermittelte für Asparagin bzw. Glutamin nach Erhitzen für 30 Minuten bei 180 °C Acrylamid-Bildungsraten von 1,0 bzw. 0,2 µg/mol Aminosäure (0,01 bzw. 0,03 µmol/mol Aminosäure). Neben diesem rein thermischen Abbau von Aminosäuren zu Acrylamid wurde auch eine enzymatisch katalysierte Acrylamid-Bildung aus Asparagin postuliert. Xu *et al.* (2014) vermuten, dass es durch Decarboxylasen zur Bildung von 3-Aminopropionamid aus Asparagin kommen kann, welches thermisch zu Acrylamid deaminiert werden kann (siehe Abbildung 7).

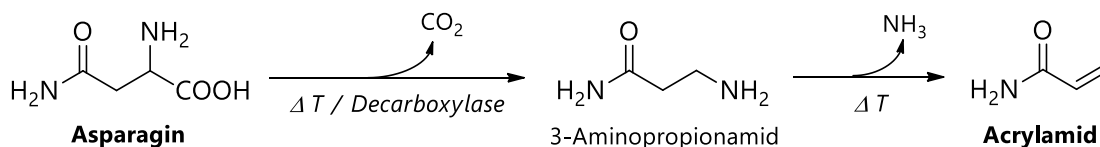


Abbildung 7: Bildung von Acrylamid aus Asparagin durch thermischen und enzymatischen Abbau [erstellt nach (Xu *et al.*, 2014)]

Auch nach dem Erhitzen von Asparaginsäure, β-Alanin, Carnosin oder Cystein auf 350 °C konnte eine Acrylamid-Bildung in Abwesenheit von reaktiven Carbonylverbindungen beobachtet werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Aminoverbindungen thermisch zu Acrylsäure abgebaut werden können, welche dann mit Ammoniak oder anderen stickstoffhaltigen Verbindungen zu Acrylamid reagieren kann. Dieser Mechanismus ist exemplarisch für β-Alanin in Abbildung 8 dargestellt. Das Erhitzen von Serin resultierte in keiner nachweisbaren Acrylamid-Bildung, die Vorläuferverbindung Acrylsäure konnte jedoch nachgewiesen werden (Yaylayan *et al.*, 2005).

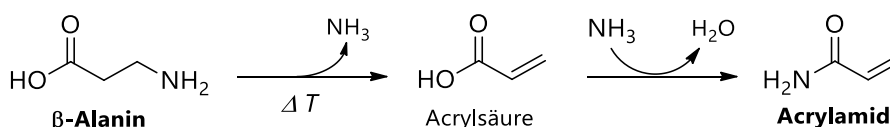


Abbildung 8: Bildung von Acrylamid aus β-Alanin durch thermischen Abbau [modifiziert nach (Yaylayan *et al.*, 2005)]

Bildung aus Triacylglyceriden

Ein Nebenweg der Acrylamid-Bildung ist die Bildung aus Triacylglyceriden. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass es durch Erhitzen (180 °C, 30 min) von Glycerin mit Asparagin sowie durch Erhitzen des Triacylglycerids Triolein mit Ammoniumchlorid zur Bildung von Acrylamid kommt. Die Acrylamid-Bildungsraten lagen bei 4,4 µg/g Asparagin für die Reaktion von Glycerin mit Asparagin und bei 0,5 µg/g Ammoniumchlorid für die Reaktion von Triolein mit Ammoniumchlorid. Postulierte Mechanismen der Acrylamid-Bildung aus Triacylglyceriden sind in Abbildung 9 dargestellt. Aus Glycerin sowie aus den Fettsäure-Resten von Triacylglyceriden kann Acrolein freigesetzt werden (siehe Kapitel 2.3.2.2). Eine anschließende Oxidation von Acrolein kann zur Bildung von Acrylsäure führen, aus welcher wiederum durch Aminierung Acrylamid entstehen kann. Alternativ ist auch eine radikalische Acrylamid-Bildung aus Acrolein denkbar (Yasuhara *et al.*, 2003).

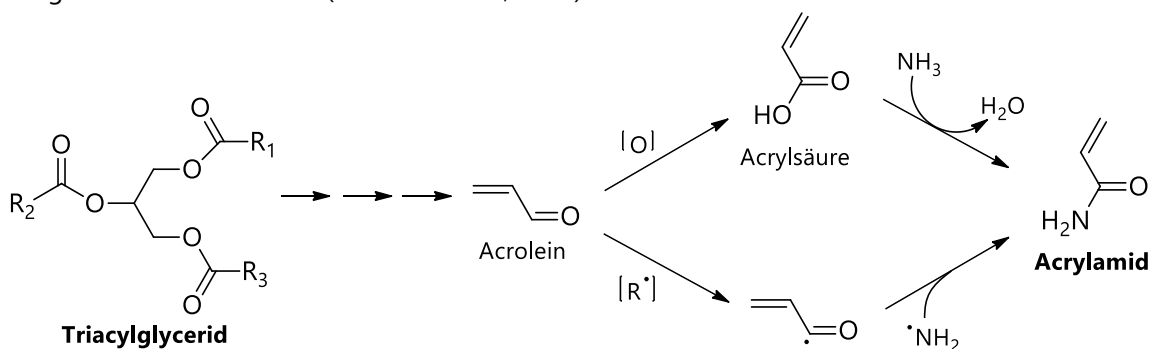


Abbildung 9: Bildung von Acrylamid aus Triacylglyceriden, R₁, R₂ und R₃: Alkyl- oder Alkenylgruppe [modifiziert nach (Yasuhara *et al.*, 2003)]

Bildung aus Kohlenhydraten

Ein ebenfalls postulierter Bildungsmechanismus ist die hitzeinduzierte Acrylamid-Bildung aus reduzierenden Zuckern. In Abbildung 10 ist dieser Mechanismus ausgehend von Glucose dargestellt. Glucose kann zu zwei Molekülen Glycerinaldehyd gespalten werden, die unter Dehydratisierung weiter zu Methylglyoxal reagieren können. Im Wässrigen kann es anschließend zur Bildung von Acrylsäure kommen, aus welcher durch Reaktion mit stickstoffhaltigen Verbindungen Acrylamid entstehen kann (Gertz und Klostermann, 2002).

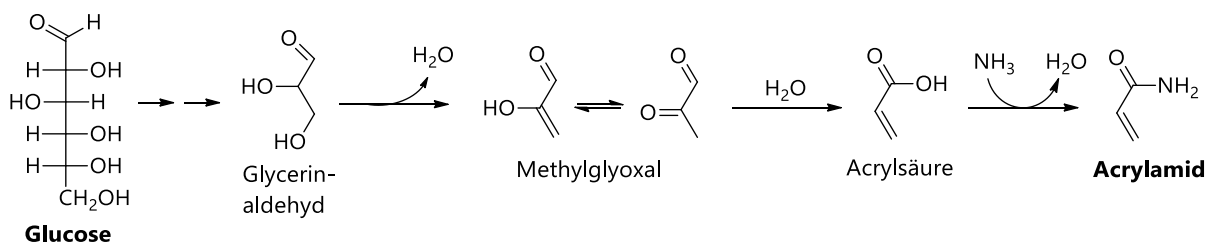


Abbildung 10: Bildung von Acrylamid aus Glucose [modifiziert nach (Gertz und Klostermann, 2002)]

2.2.2.3 Endogene Bildung

Erste Hinweise auf eine endogene Bildung von Acrylamid lieferte eine *in vivo* Studie an B6C3F1-Mäusen (n = 29). Nach der Exposition der Tiere mit Substanzen, die freie Radikale induzieren können (FeSO₄, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Salzsäure (MPTP) oder Methamphetamin (METH)), wurde

eine Zunahme an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten im Blut der Mäuse festgestellt. Diese wurde als Hinweis auf eine endogene Acrylamid-Bildung gewertet (Tareke *et al.*, 2008). Um die vermutete endogene Acrylamid-Bildung zu bestätigen und um Hinweise über den Bildungsmechanismus zu erhalten, führte Tareke *et al.* (2009) *in vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) durch. Nach Inkubation von Asparagin mit H₂O₂ konnte unter den gegebenen Bedingungen eine Acrylamid-Bildung beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Glucose-Zugabe nicht zu einer Erhöhung der Acrylamid-Bildung führte. Eine Zugabe von Chelatbildnern (EDTA und Phytat) inhibierte die Reaktion, was darauf hindeutet, dass Spuren von Metallionen, die im Reaktionsansatz vorlagen, die Reaktion katalysiert haben könnten (Tareke *et al.*, 2009). Eine weitere Studie, die Hinweise auf eine endogene Bildung von Acrylamid *in vivo* gab, ist eine Studie von Watzel *et al.* (2012a), welche an Sprague-Dawley-Ratten (n = 54) durchgeführt wurde. Innerhalb dieser Studie erhielten die Tiere eine Acrylamid-minimierte Nahrung, bei der der Acrylamid-Gehalt unter der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) von 0,5 µg/kg lag. Basierend auf diesem LOD wurde eine maximale Acrylamid-Aufnahme der Kontrollgruppe von 0,1 µg/kg KG berechnet. Die erfasste Mercaptursäure-Ausscheidung ließ sich jedoch auf eine Acrylamid-Aufnahme von 0,6 µg/kg KG zurückrechnen. Es wurde vermutet, dass die bestimmte Mercaptursäure-Ausscheidung, welche nicht auf eine Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung zurückzuführen war, ein Basislevel der endogenen Acrylamid-Bildung darstellte (Watzek *et al.*, 2012a).

2.2.3 Gehalte in Lebensmitteln

Nachdem der Nachweis einer Bildung von Acrylamid in erhitzten Lebensmitteln im Jahr 2002 erfolgt war, starten viele europäische Länder Monitoring-Programme zur Ermittlung und Überwachung der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln. Eine umfangreiche Datenanalyse wurde im Jahr 2015 von der EFSA durchgeführt. Berücksichtigt wurden 43.419 Analysen von Lebensmittelerzeugnissen, die im Zeitraum von Januar 2010 bis November 2013 von 24 europäischen Ländern (7.448 Proben) und sechs Lebensmittelverbänden (35.971 Proben) durchgeführt wurden. Bei den verwendeten Analysemethoden handelte es sich um HPLC- und GC-basierte Methoden. Die ermittelten Acrylamid-Gehalte einiger Lebensmittel sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zur Bestimmung der Acrylamid-Gehalte wurden drei verschiedene Ansätze angewandt. Der erste Ansatz verwendete die untere Grenze (*lower bound* LB), d. h. es wurden zur Berechnung der Acrylamid-Gehalte alle Werte unter dem LOD und der Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) gleich null gesetzt. Beim zweiten Ansatz unter Verwendung der mittleren Grenze (*middle bound*, MB) wurde für alle Werte < LOD der halbe LOD und für alle Werte zwischen LOD und LOQ der halbe LOQ verwendet. Der Ansatz der oberen Grenze (*upper bound*, UB) legte zugrunde, dass alle Werte < LOD als LOD berechnet wurden und alle Werte zwischen LOD und LOQ als LOQ (EFSA, 2015a). Die im Folgenden aufgeführten Acrylamid-Gehalte sind unter Verwendung des MB-Ansatzes berechnet worden.

Die Lebensmittelgruppe, die nach Datenanalyse durch die EFSA die höchsten Acrylamid-Gehalte aufwies waren „Kartoffelchips und Snacks“. Der mittlere Acrylamid-Gehalt dieser Lebensmittelgruppe lag bei 389 µg/kg und das 95. Perzentil (P95) bei 932 µg/kg. Produkte aus frischen Kartoffeln (Ø: 392 µg/kg) wiesen geringfügig höhere Gehalte als Produkte aus Kartoffelteig (Ø: 338 µg/kg) auf (EFSA, 2015a).

Tabelle 1: Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln [modifiziert nach (EFSA, 2015a), ergänzt durch (FAO/WHO, 2011)]

Lebensmittelkategorie	n	Ø MB [LB-UB] [µg/kg]	P95 [µg/kg]
Kartoffelchips und Snacks	34.501	389 [388 - 389]	932
aus frischen Kartoffeln	31.467	392 [392 - 392]	949
aus Kartoffelteig	2795	338 [338 - 338]	750
Weitere frittierte und gebratene Kartoffelprodukte¹	1694	308 [303 - 313]	971
Pommes frites und Bratkartoffeln			
unzubereitet oder vorgekocht, zubereitet verkauft, analysiert wie verkauft	877	308 [302 - 314]	904
unzubereitet oder vorgekocht verkauft, analysiert wie verkauft	74	367 [362 - 372]	1888
unzubereitet oder vorgekocht verkauft, zubereitet analysiert	557	239 [236 - 242]	656
Frühstückscerealien	1230	161 [157 - 164]	552
auf Mais-, Hafer-, Dinkel-, Gerste- und Reisbasis	210	102 [96 - 109]	403
auf Weizen- und Roggenbasis	151	170 [169 - 172]	410
Brot²	543	42 [36 - 49]	156
Weitere Backwaren	2065	265 [261 - 269]	1048
Knäckebrötchen	528	171 [166 - 176]	486
Lebkuchen	693	407 [403 - 412]	1600
Kräcker	162	231 [229 - 233]	590
Kekse und Waffeln	682	201 [197 - 206]	810
Kaffee (trocken)	1457	522 [521 - 523]	1054
Röstkaffee (trocken)	595	249 [248 - 251]	543
Instantkaffee (trocken)	862	710 [710 - 710]	1122
Kaffee (Kaffegetränk)³	254	17 [nb - nb]	79⁴
Babynahrung			
verarbeitet, auf Cerealienbasis	736	73 [70 - 76]	175
nicht auf Cerealienbasis	416	24 [17 - 31]	72

¹außer Kartoffelchips und Snacks, ²ausgenommen getoastetes Brot, Knäckebrötchen und Zwieback, ³Quelle: FAO/WHO (2011), ⁴P97,5 = 97,5. Perzentil; LB: untere Grenze (EFSA, 2015a), MB: mittlere Grenze (EFSA, 2015a), n: Anzahl der Proben, P95: 95. Perzentil berechnet unter Verwendung des MB-, LB- und UB-Ansatzes der EFSA, Angabe nur eines Wertes, da alle Berechnungen zum gleichen Ergebnis führten, UB: obere Grenze (EFSA, 2015a), Ø MB [LB - UB]: Mittelwert berechnet unter Verwendung des MB-, LB- und UB-Ansatzes der EFSA

In der Kategorie „weitere frittierte und gebratene Kartoffelprodukte“ lag der mittlere Acrylamid-Gehalt bei 308 µg/kg und das 95. Perzentil bei 971 µg/kg. Auffallend war, dass die Acrylamid-Gehalte von Pommes frites und Bratkartoffeln, die unzubereitet oder vorgekocht analysiert wurden (Ø: 367 µg/kg, P95: 1888 µg/kg) höher waren als die von Pommes frites und Bratkartoffeln, die zubereitet analysiert wurden. Pommes frites und Bratkartoffeln, die zubereitet verkauft und analysiert wurden, wiesen Acrylamid-Gehalte von 308 µg/kg (Ø) bzw. 904 µg/kg (P95) auf und Pommes frites und Bratkartoffeln, die unzubereitet oder vorgekocht verkauft und zur Analyse zubereitet wurden, Gehalte von 239 µg/kg (Ø) bzw. 656 µg/kg (P95). Die EFSA vermutete, dass es aufgrund der Art der Probenahme zum Teil zu einer fehlerhaften Zuordnung in die Produktkategorien gekommen ist (EFSA, 2015a).

Frühstückscerealien wiesen laut EFSA mittlere Acrylamid-Gehalte von 161 µg/kg auf, wobei Frühstückscerealien auf Mais-, Hafer-, Dinkel-, Gerste- und Reisbasis (102 µg/kg) weniger Acrylamid enthielten als solche auf Weizen- oder Roggenbasis (170 µg/kg). Das 95. Perzentil der Acrylamid-Gehalte für die gesamte Gruppe der Frühstückscerealien lag bei 552 µg/kg (EFSA, 2015a).

Brot (ausgenommen getoastetes Brot, Knäckebrot und Zwieback) wies mit 42 µg/kg (Ø) bzw. 156 µg/kg (P95) deutlich geringere Acrylamid-Gehalte auf als Knäckebrot mit 171 µg/kg (Ø) bzw. 486 µg/kg (P95). Lebkuchen (Ø: 407 µg/kg, P95: 1600 µg/kg), Kräcker (Ø: 231 µg/kg, P95: 590 µg/kg) sowie Kekse und Waffeln (Ø: 201 µg/kg, P95: 810 µg/kg) wiesen nochmals höhere Acrylamid-Gehalte als Knäckebrot auf (EFSA, 2015a).

Für die Produktkategorie „Kaffee (trocken)“, welche feste Kaffeeprodukte (wie Kaffeepulver, Kaffeebohnen und Instantkaffeegranulat) beinhaltet, wurde ein Acrylamid-Gehalt von im Mittel 552 µg/kg und von 1054 µg/kg für das 95. Perzentil bestimmt. Instantkaffee (trocken) hat mit 710 µg/kg einen deutlich höheren mittleren Acrylamid-Gehalt als Röstkaffee (trocken) mit 249 µg/kg (EFSA, 2015a). Die Datenanalyse der EFSA beinhaltet keine Acrylamid-Gehalte von fertig zubereiteten Kaffeegetränken. Daten dazu lieferte die *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization* (FAO/WHO). In fertig zubereiteten Kaffeegetränken wurde ein mittlerer Acrylamid-Gehalt von 17 µg/kg ermittelt. Das 97,5. Perzentil des Acrylamid-Gehaltes lag bei 79 µg/kg (FAO/WHO, 2011).

Auch in Babynahrung konnte Acrylamid nachgewiesen werden, wobei verarbeitete Babynahrung auf Cerealienbasis (Ø: 73 µg/kg, P95: 175 µg/kg) mehr Acrylamid enthielt als nicht cerealienbasierte Babynahrung (Ø: 24 µg/kg, P95: 72 µg/kg) (EFSA, 2015a).

2.2.3.1 Einflussfaktoren auf die Gehalte in Lebensmitteln

Zubereitungstemperatur und Zubereitungszeit

Die Zubereitungstemperatur und -zeit sind die Haupteinflussfaktoren der Acrylamid-Bildung. Vor allem bei Temperaturen über 180 °C wurde in Pommes frites eine erhöhte Acrylamid-Bildung beobachtet. In Pommes frites, die für acht Minuten bei 160 °C frittiert wurden, wurde ein Acrylamid-Gehalt von weniger als 300 µg/kg bestimmt. Hingegen wurde bei gleicher Frittierzeit und einer Temperatur von 180 °C über 1200 µg/kg quantifiziert (Matthäus *et al.*, 2004). Auch bei Keksen führt eine gesteigerte Zubereitungstemperatur zur Zunahme des Acrylamid-Gehaltes. Kekse, die für 20 Minuten bei 160 °C gebacken wurden, wiesen einen Acrylamid-Gehalt von 120 µg/kg auf, wobei sich dieser durch eine Erhöhung der Backtemperatur auf 180 °C bei gleicher Backdauer verdoppelte (Gökmen *et al.*, 2007).

Die Auswirkungen einer verlängerten Zubereitungszeit wurden ebenfalls an Pommes frites und Keksen untersucht. Bei Pommes frites lag der Acrylamid-Gehalt nach Frittieren bei 180 °C für fünf Minuten bei unter 500 µg/kg und stieg nach einer Frittierzeit von acht Minuten um mehr als das Doppelte auf über 1000 µg/kg an. Frittieren für zehn Minuten bei gleicher Temperatur resultierte nochmals in einer deutlichen Steigerung des Acrylamid-Gehaltes auf mehr als 2000 µg/kg (Matthäus *et al.*, 2004). Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch das Frittieren (185 °C) von vorgekochten Pommes frites. Der Acrylamid-Gehalt der vorgekochten Pommes frites stieg mit verlängerter Frittierzeit (siehe Abbildung 11) von 45 µg/kg vor dem Frittieren auf 1512 µg/kg nach einer Frittierzeit von fünf Minuten an ((Jackson, 2014) aus (EFSA, 2015a)). Keksen wiesen nach einer Backzeit von zehn Minuten bei 180 °C einen Acrylamid-

Gehalt von 50 µg/kg auf, welcher bei einer Backzeit von 20 Minuten bei gleicher Temperatur auf über 250 µg/kg anstieg (Gökmen *et al.*, 2007).

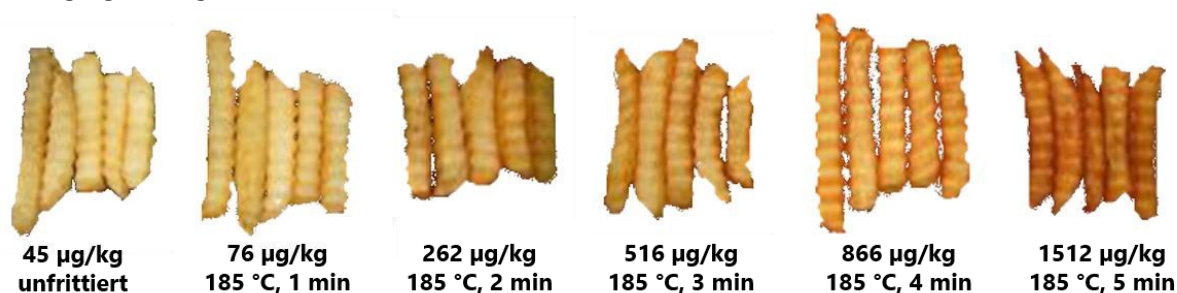


Abbildung 11: Einfluss der Frittierzeit auf den Acrylamid-Gehalt und den Bräunungsgrad von vorgekochten Pommes frites [modifiziert nach (Jackson, 2014) aus (EFSA, 2015a)]

Gehalt an reduzierenden Zuckern und Aminosäuren

Reduzierende Zucker und Aminosäuren v. a. Asparagin sind die wichtigsten Ausgangsverbindungen der Acrylamid-Bildung. Der Einfluss des Gehaltes an reduzierenden Zuckern (Glucose und Fructose) sowie des Gehaltes an verschiedenen Aminosäuren (Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure) von Kartoffeln auf den Acrylamid-Gehalt von Kartoffelchips wurde von Ohara-Takada *et al.* (2005) untersucht. Es zeigte sich sowohl eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) des Glucose-Gehaltes ($r^2 = 0,836$) sowie des Fructose-Gehaltes ($r^2 = 0,873$) der Kartoffeln mit dem Acrylamid-Gehalt der bei 180 °C frittierten Kartoffelchips. Die Gehalte an Asparagin ($r^2 = 0,033$), Asparaginsäure ($r^2 = 0,018$), Glutamin ($r^2 = 0,011$) und Glutaminsäure ($r^2 = 0,097$) in den Kartoffeln korrelierten nicht mit dem Acrylamid-Gehalt der bei 180 °C frittierten Kartoffelchips (Ohara-Takada *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen wurden von Rydberg *et al.* (2003) an homogenisierten Kartoffelproben, welche zur Acrylamid-Bildung auf 180 °C erhitzt wurden, durchgeführt. Gezeigt wurde, dass eine Zugabe von Glucose, Fructose und Asparagin zu den homogenisierten Kartoffelproben zu einer deutlichen Erhöhung der Acrylamid-Bildung führt. Zugabe von 35 bzw. 140 mmol/kg Glucose führte zu einem um 160 % bzw. 41 % gesteigertem Acrylamid-Gehalt. Entsprechend stieg der Acrylamid-Gehalt um 460 % bzw. 320 % nach Fructose-Zugabe und um 220 % bzw. 290 % nach Asparagin-Zugabe (Rydberg *et al.*, 2003). Da der Gehalt an Asparagin einen Einfluss auf die Acrylamid-Bildung hat, zeigen ebenfalls Studien bei denen eine Asparaginase-Behandlung durchgeführt wurde und es zu einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes kam (siehe folgender Abschnitt) (Pedreschi *et al.*, 2008; Hendriksen *et al.*, 2009).

Vorbehandlung von Lebensmitteln

Eine gezielte Vorbehandlung wie Wässern, Blanchieren, Asparaginase-Behandlung oder Zugabe von Antioxidantien kann den Acrylamid-Gehalt von Lebensmitteln reduzieren.

Blanchieren und Wässern

Blanchieren und Wässern von Kartoffeln führt zu einer Reduktion des Zucker- bzw. Aminosäuregehaltes, was wiederum zu einem reduzierten Acrylamid-Gehalt in aus diesen Kartoffeln hergestellten Kartoffelchips führte. Der Acrylamid-Gehalt, konnte durch Wässern für 90 Minuten je nach Frittierzeit und -temperatur um 20 bis 38 % reduziert werden. Blanchieren führte zu einer noch deutlicheren Reduktion

des Acrylamid-Gehaltes. Langzeitblanchieren für 70 Minuten bei 50 °C bzw. für 40 Minuten bei 70 °C führte zu einer Abnahme des Acrylamid-Gehaltes um mehr als 90 % (Pedreschi *et al.*, 2004).

Asparaginase-Behandlung

Eine Behandlung von Lebensmitteln mit dem Enzym Asparaginase (L-Asparaginaminohydrolase), welches die Hydrolyse der Acrylamid-Vorläuferverbindung Asparagin zu Asparaginsäure und Ammoniak katalysiert, führt ebenfalls zu einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes. Der Acrylamid-Gehalt von Pommes frites wurde durch Asparaginase-Behandlung (10.000 ASNU/l) der Kartoffeln für 20 Minuten bei 40 °C um 30 % reduziert. Wurden blanchierte Kartoffeln zur Herstellung von Pommes frites verwendet, führte eine entsprechende vorherige Asparaginase-Behandlung der Kartoffeln zu einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes in den Pommes frites um 60 % (Pedreschi *et al.*, 2008). Eine Reduktion des Acrylamid-Gehaltes durch Asparaginase-Behandlung wurde auch in Keksen und Knäckebrot nachgewiesen. Der Acrylamid-Gehalt konnte in Keksen nach Asparaginase-Behandlung (10.500 ASNU/kg Mehl) für 15 Minuten bei 40 °C um 84 % reduziert werden. In Knäckebrot führte eine Asparaginase-Behandlung (2100 ASNU/kg Mehl) für 30 oder 60 Minuten bei 10, 15 oder 20 °C zu einer Acrylamid-Reduktion um 84 bis 92 % (Hendriksen *et al.*, 2009).

Zugabe von Antioxidantien

Die Wirkung von Antioxidantien wie Vitamin C, Ferulasäure, Epigallocatechingallat, *tert*-Butylhydroquinon, Butylhydroxyanisol (BHA) oder Butylhydroxytoluol (BHT) und ihren Oxidationsprodukten auf die Acrylamid-Bildung bzw. den Acrylamid-Gehalt wurde von Ou *et al.* untersucht. Die Antioxidantien selbst konnten weder die Acrylamid-Bildung hemmen noch den Acrylamid-Gehalt direkt reduzieren. Deren Oxidationsprodukte führten jedoch zu einer Reduktion der Acrylamid-Vorläuferverbindung Asparagin sowie zu einer direkten Reduktion von Acrylamid (Ou *et al.*, 2010).

Zubereitungsart

Einen weiteren, eher untergeordneten, Einflussfaktor auf den Acrylamid-Gehalt stellt die Zubereitungsart dar (siehe Abbildung 12).

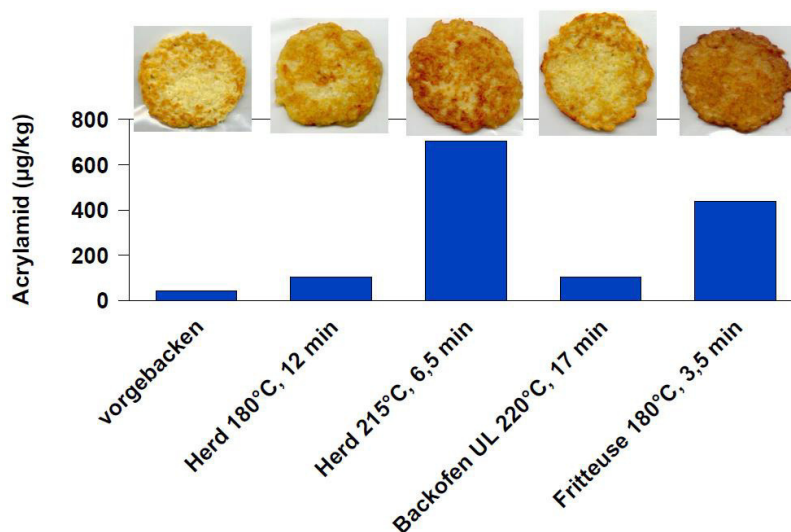


Abbildung 12: Acrylamid-Gehalt und Bräunungsgrad von Kartoffelpuffern, Zubereitung mittels Herd, Backofen oder Fritteuse (Matthäus, 2002), UL: Umluft

Die Wahl des Herdes, Backofens oder der Fritteuse beeinflusst den Acrylamid-Gehalt im Endprodukt. Im Backofen zubereitete Kartoffelpuffer wiesen trotz höchster Zubereitungstemperatur (220 °C) und Zubereitungszeit (17 min) einen geringeren Acrylamid-Gehalt (ca. 100 µg/kg) auf als Kartoffelpuffern, die auf dem Herd (215 °C, 6,5 min, ca. 700 µg/kg) oder in der Fritteuse (180 °C, 3,5 min, ca. 450 µg/kg) zubereitet wurden. Neben dem Acrylamid-Gehalt wurde auch der Bräunungsgrad (siehe Abbildung 12) durch die Zubereitungsart beeinflusst (Matthäus, 2002).

Lagerung von Lebensmitteln

Die Lagerung von Lebensmitteln kann ebenfalls zu einer Veränderung des Acrylamid-Gehaltes führen. Die Bestimmung des Acrylamid-Gehaltes in verschiedenen Lebensmitteln vor und nach der Lagerung für drei Monate resultierte vor allem für die Lebensmittel Baby-Kekse und diätetische Kekse (83 - 93 %), Kaffeebohnen (71 %), Kaffeepulver (70 %) sowie Kakaopulver (68 %) in einer Abnahme des Acrylamid-Gehaltes. Vermutet wurde, dass es zu dieser Acrylamid-Abnahme durch Reaktion von Acrylamid mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen gekommen sein kann (Hoenicke und Gatermann, 2005).

2.2.4 Toxikokinetik

Die Aufnahme von Acrylamid in den Säuger-Organismus erfolgt vor allem oral. Es kann jedoch auch zu einer dermalen oder inhalativen Acrylamid-Aufnahme kommen. Im Rahmen von *in vivo* Tierstudien erfolgt häufig auch eine intravenöse (i.v.) oder intraperitoneal (i.p.) Acrylamid-Applikation.

2.2.4.1 Resorption und Verteilung

Um Aussagen über die Resorption von Acrylamid nach oraler Aufnahme treffen zu können, wurden Studien mit Caco-2-Zellmonolayer als *in vitro* Modell für die menschliche intestinale Resorption durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Acrylamid rasch resorbiert wird und mittels passiver Diffusion Zellmembranen passieren kann (Schabacker *et al.*, 2004). In Tierversuchen zeigte sich nach Gabe von 0,1 mg/kg KG ebenfalls eine rasche Resorption und hohe Bioverfügbarkeit von Acrylamid. Für B6C3F1-Mäuse lag die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme über die Nahrung bei 23 % und nach Gabe per Schlundsonde bei 32 - 52 % (Doerge *et al.*, 2005b). F344-Ratten zeigten nach oraler Aufnahme über die Nahrung mit 28 - 48 % eine vergleichbare Bioverfügbarkeit. Nach Gabe per Schlundsonde lag die Bioverfügbarkeit bei 60 - 98 % (Doerge *et al.*, 2005c).

Zur Verteilung im Körper wurden verschiedene Tierstudien mit radioaktiv markiertem Acrylamid durchgeführt, bei denen eine i.v., orale, dermale oder inhalative Gabe des Acrylamids erfolgte und anschließend die Radioaktivität im Gewebe, Blut, Urin und Fäzes ermittelt wurde (Miller *et al.*, 1982; Kadry *et al.*, 1999; Sumner *et al.*, 2003).

Bei männlichen F344-Ratten lag die Gesamtwiederfindung der Radioaktivität nach i.v. Gabe von 10 mg/kg 2,3-¹⁴C-Acrylamid bei 97 ± 7 %. Untersuchungen zur Verteilung der Radioaktivität ergaben, dass nach i.v. Gabe eine schnelle Verteilung in alle Gewebe erfolgte. Gewebe, die hohe Anteile an Acrylamid aufwiesen, waren Muskelgewebe (48 %), Haut (15 %), Blut (12 %) und Leber (7 %). Nach 24 Stunden wurden 62 % der Radioaktivität im Urin wiedergefunden und 4,8 % im Fäzes. Am Ende des

Studienzeitraums von sieben Tagen lag die renale Ausscheidung bei 71 % und die biliäre Ausscheidung bei 6 % (Miller *et al.*, 1982).

In einer Studie an Sprague-Dawley-Ratten wurde bereits fünf Minuten nach oraler Gabe von 50 mg/kg $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acrylamid Radioaktivität im Blut detektiert, was auf eine rasche Resorption nach oraler Zufuhr hinwies. Hohe Gehalte an Radioaktivität wurden bei dieser Studie vor allem im Mageninhalt, im Magen- gewebe, der Haut, dem Knochenmark und der Lunge nachgewiesen. Die Gesamtausscheidung über den Urin lag nach sechs Tagen bei $61 \pm 3 \%$ und über den Fäzes bei $3,9 \pm 0,7 \%$ der verabreichten Menge (Kadry *et al.*, 1999).

Nach dermalen Applikation von 162 mg/kg $2,3\text{-}^{14}\text{C}$ -Acrylamid an Fischer 344 (F344) - Ratten über 24 Stunden wurde die absorbierte Menge anhand der Radioaktivität bestimmt. Sie lag bei 14 - 30 %. $36 \pm 4 \%$ davon wurden im Zeitraum von 0 - 24 h über den Urin und $0,7 \pm 0,4 \%$ über den Fäzes ausgeschieden. $1,8 \pm 0,2 \%$ wurden als Kohlenstoffdioxid (CO_2) und $1,1 \pm 0,7 \%$ als organische flüchtige Verbindungen über die Atemluft abgegeben. $53 \pm 5 \%$ der Radioaktivität wurde nach 24 Stunden im Körper der Tiere quantifiziert, wobei Blutzellen, gefolgt von Haut, Leber, Milz, Hoden und Niere die größten relativen Gehalte aufwiesen. Ebenfalls wurde Radioaktivität in Lungen, Thymus, Gehirn, Nebenhoden und Fettgewebe nachgewiesen (Sumner *et al.*, 2003).

An männlichen F344-Ratten wurde nach inhalativer Aufnahme von 2,9 ppm ($8 \mu\text{mol}$) $2,3\text{-}^{14}\text{C}$ -Acrylamid über sechs Stunden eine 6-fach geringere Radioaktivität nachgewiesen als nach dermalen Applikation von 162 mg/kg ($112 \mu\text{mol}$) $2,3\text{-}^{14}\text{C}$ -Acrylamid. Die Verteilung im Körper und die prozentuale Ausscheidung waren vergleichbar mit der nach der Acrylamid-Aufnahme über die Haut. Nach 24 Stunden lagen $56 \pm 3 \%$ der aufgenommenen Dosis noch im Körper vor, $31 \pm 3 \%$ waren im Urin und $3,1 \pm 2,2 \%$ im Fäzes nachweisbar. Über die Atemluft wurden $1,7 \pm 0,1 \%$ als CO_2 und $0,47 \pm 0,25 \%$ als organische flüchtige Verbindungen abgegeben. Bei männlichen B6C3F1-Mäusen war 24 Stunden nach inhalativer Aufnahme von 2,9 ppm ($8 \mu\text{mol}$) $2,3\text{-}^{14}\text{C}$ -Acrylamid über sechs Stunden $46 \pm 6 \%$ der aufgenommenen Dosis im Körper zu finden. $27 \pm 6 \%$ wurden über den Urin ausgeschieden, $5,2 \pm 1,1 \%$ über den Fäzes, $0,91 \pm 0,19 \%$ wurden als CO_2 und $1,7 \pm 0,6 \%$ als organische flüchtige Verbindungen abgeatmet (Sumner *et al.*, 2003).

Dass Acrylamid gut im Körper verteilt wird und sogar die Plazentaschranke überwinden kann wurde in einigen *in vitro* (Sörgel *et al.*, 2003; Annola *et al.*, 2008) sowie *in vivo* Studien (von Stedingk *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012) gezeigt. Auch ein Transfer in Kuhmilch (Pabst *et al.*, 2005) und humane Muttermilch (Sörgel *et al.*, 2003; Fohgelberg *et al.*, 2005) wurde nachgewiesen.

2.2.4.2 Metabolismus

Der Metabolismus von Acrylamid ist in Säugetieren und im Menschen weitgehend untersucht und lässt sich in einen reduktiven Metabolismus und in einen oxidativen Metabolismus unterteilen (siehe Abbildung 13).

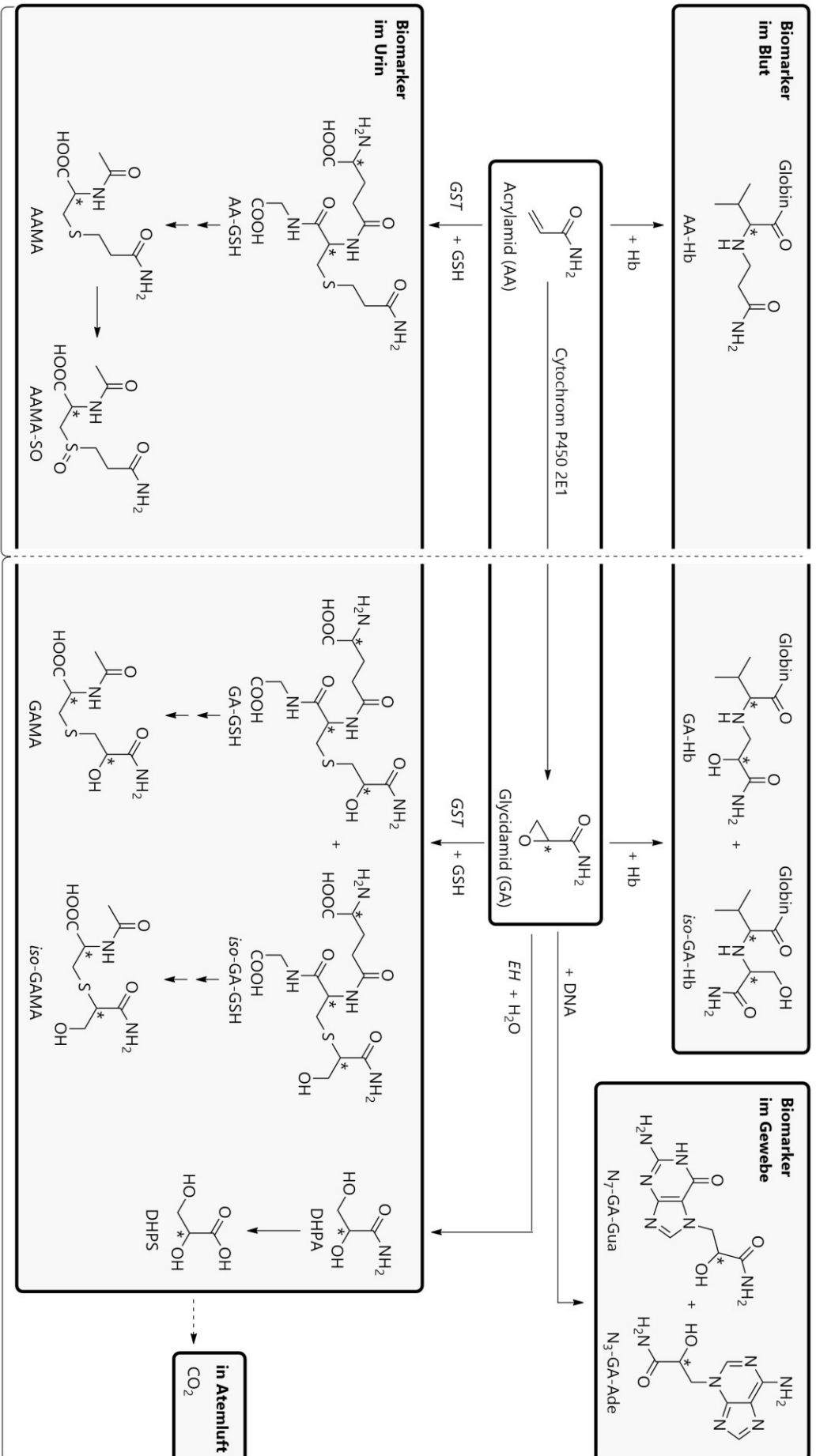


Abbildung 13: Metabolismus von Acrylamid, AA: Acrylamid, AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamylethyl)-L-cystein, AAMA-SO: N-Acetyl-S-(2-carbamylethyl)-L-cystein-S-oxid, Ade: Adenin, DHPA: 2,3-Dihydroxypropionamid, DHPA-SO: 2,3-Dihydroxypropionsäure, DNA: Desoxyribonucleinsäure, EH: Epoxidhydrilase, GA: Glycidamid, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, GSH: Glutathion, GST: Glutathion-S-Transferase, Gua: Guanin, Hb: Hämoglobin, iso-GAMA: N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein [modifiziert nach (FFSA, 2015a), ergänzt durch (Sumner et al., 2003; Doerge et al., 2005a; Tareke et al., 2006)]

Die direkte Konjugation von Acrylamid mit Glutathion und der folgende Abbau zu den Mercaptursäuren zählen zum reduktiven Metabolismus. Das Hauptausscheidungsprodukt ist die Mercaptursäure *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein (AAMA), welche im menschlichen Körper noch weiter zum Sulfoxid *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein-*S*-oxid (AAMA-SO) reagieren kann (Fennell und Friedman, 2005; Fennell *et al.*, 2005). Der oxidative Metabolismus beinhaltet die metabolische Aktivierung von Acrylamid mittels Cytochrom P450 2E1 zu 2,3-Epoxypropanamid (Glycidamid) sowie folgende Entgiftungsreaktionen. Zum einen erfolgt eine enzymatische Reaktion von Glycidamid mittels Epoxidhydrolase zu 2,3-Dihydroxypropanamid (DHPA) und 2,3-Dihydroxypropansäure (DHPS). Zum anderen wird auch Glycidamid mit Glutathion konjugiert und es erfolgt ein Abbau zu den Mercaptursäuren *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein (GAMA) und *N*-Acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein (*iso*-GAMA). Neben der Reaktion mit Glutathion können sowohl Acrylamid als auch Glycidamid mit dem Protein Hämoglobin kovalente Bindungen eingehen, sodass es zur Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukten kommt (Fennell und Friedman, 2005; Fennell *et al.*, 2006). Die reaktivere Verbindung Glycidamid kann ebenfalls Addukte mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) bilden. Das vorherrschende DNA-Addukt stellt dabei *N*7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (*N*7-GA-Gua) dar. Ebenfalls kommt es zur Bildung von *N*3-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (*N*3-GA-Ade) (Gamboa da Costa *et al.*, 2003).

Ein wichtiger Parameter, der den Umfang der metabolischen Aktivierung von Acrylamid zu Glycidamid angibt, ist das GA/AA-Verhältnis. Bei diesem Verhältnis kann es sich um das direkte Verhältnis von Glycidamid zu Acrylamid oder um das Verhältnis der über den Urin ausgeschiedenen Metaboliten von Acrylamid (AAMA und AAMA-SO = reduktiver Metabolismus) und der Metaboliten von Glycidamid (GAMA, *iso*-GAMA, DHPA und DHPS = oxidativer Metabolismus) handeln. Mit dem GA/AA-Verhältnis vergleichbar ist das Verhältnis der Glycidamid- und Acrylamid-Hämoglobin-Addukte (GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis), welches ebenfalls eine geeignete Größe darstellt, um den Umfang der Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid anzugeben (EFSA, 2015a).

Reaktion von Acrylamid zu Glycidamid mittels Cytochrom P450 2E1

Die Reaktion von Acrylamid zum genotoxischen Metaboliten Glycidamid stellt einen entscheidenden Schritt im Acrylamid-Metabolismus dar. Die Rolle des Enzyms Cytochrom P450 2E1 (EC 1.14.13.n7) bei dieser Reaktion wurde durch *in vivo* Versuche an Wildtyp-Mäusen (WT-Mäusen, $n = 3 - 5$) und an Mäusen, die kein Cytochrom P450 2E1 exprimieren (CYP2E1-null-Mäusen, $n = 3 - 5$) untersucht. Nach Gabe von 50 mg/kg ^{13}C -Acrylamid wurden im 24-h-Urin der WT-Mäuse sowohl Abbauprodukte des reduktiven (AAMA und *S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein) als auch des oxidativen (GA, GAMA, DHPA, DHPS) Metabolismus detektiert. Bei den CYP2E1-null-Mäusen und bei WT-Mäusen, die mit einem Cytochrom-Inhibitor behandelt wurden, konnten hingegen nur die Metaboliten des reduktiven Metabolismuswegs im Urin nachgewiesen werden (Sumner *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie wurden die Acrylamid- und Glycidamid-Plasmakonzentrationen von WT-Mäusen und CYP2E1-null-Mäusen sechs Stunden nach Gabe von 50 mg/kg Acrylamid untersucht. Im Plasma von WT-Mäusen wurden geringe Acrylamid-Konzentrationen ($0,84 \pm 0,80 \mu\text{M}$) und verglichen dazu höhere Glycidamid-Konzentrationen ($33 \pm 6,3 \mu\text{M}$) quantifiziert. Bei den CYP2E1-null-Mäusen waren die Acrylamid-Konzentrationen ($115 \pm 14 \mu\text{M}$) im Plasma hingegen um ein vielfaches höher als die Glycidamid-

Konzentrationen ($1,7 \pm 0,31 \mu\text{M}$). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung der Hämoglobin-Addukte. Das GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis lag bei WT-Mäusen bei 1,7 wohingegen es bei CYP2E1-null-Mäusen bei 0,02 lag. Auch wurde bei WT-Mäusen ein starker Anstieg der Glycidamid-DNA-Addukte N7-GA-Gua und N3-GA-Ade beobachtet, wohingegen bei CYP2E1-null-Mäusen kein N3-GA-Ade detektiert und N7-GA-Gua nur in Spuren nachgewiesen wurde (Ghanayem *et al.*, 2005b). Die Rolle von Cytochrom P450 2E1 bei der Reaktion von Acrylamid zu Glycidamid wurde ebenfalls *in vitro* unter Verwendung von humanen Lebermikrosomen und von humanen CYP P450-Enzymen (Supersomes™) untersucht. Nach Inkubation mit Acrylamid (0,2 - 20 mM), war bei den humanen Lebermikrosomen und unter Verwendung des humanen Enzyms Cytochrom P450 2E1 bei allen Acrylamid-Konzentrationen eine Glycidamid-Bildung messbar. Bei den Cytochrom P450 Isoformen 1A1, 1A2, 2C19 und 2D6 lag nur bei Inkubation mit der höchsten Konzentration von 20 mM Acrylamid eine geringfügige Glycidamid-Bildung vor. Bei allen anderen untersuchten Isoformen konnte innerhalb des gewählten Acrylamid-Konzentrationsbereichs keine Glycidamid-Bildung nachgewiesen werden. Dass Cytochrom P450 2E1 beim Menschen das Hauptenzym ist, welches die Reaktion von Acrylamid zu Glycidamid katalysiert, konnte auch dadurch gezeigt werden, dass der Cytochrom P450 2E1 Inhibitor Diethyldithiocarbamat (DDC), die Glycidamid-Bildung gleichermaßen in humanen Lebermikrosomen und unter Verwendung des humanen Cytochrom P450 2E1 hemmen konnte (Kraus *et al.*, 2013). An 16 gesunden Probanden wurde nach Gabe von Disulfiram, eines anderen Cytochrom P450 2E1 Inhibitors, eine um ein 1,34-faches erhöhte Acrylamid-Ausscheidung und eine um eine 1,15-faches erhöhte AAMA-Ausscheidung beobachtet. Die Glycidamid-Ausscheidung war hingegen um ein 0,44-faches verminderte. Somit konnte auch hier eine Beteiligung von Cytochrom P450 2E1 an der metabolischen Aktivierung von Acrylamid nachgewiesen werden (Doroshenko *et al.*, 2009).

Abbau von Glycidamid zu 2,3-Dihydroxypropanamid, 2,3-Dihydroxypropansäure und CO₂

Die Entgiftung von Glycidamid erfolgt unter anderem durch den enzymatischen Abbau mittels Epoxid-hydrolase zu DHPA. Nach oraler Aufnahme von 13,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG D₃-Acrylamid durch einen männlichen Probanden wurden nach 46 Stunden 5,4 % als D₃-DHPA im Urin ausgeschieden (Hartmann *et al.*, 2011). Zusätzlich zu DHPA konnte im Urin von männlichen F344-Ratten (n = 4) nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG 1,2,3-¹³C-Acrylamid mittels Schlundsonde auch DHPS detektiert werden (Sumner *et al.*, 2003). Im Jahr 2011 wurden Daten über ein DHPA-Screening von 30 Personen (14 Raucher, 16 Nicht-raucher) der Allgemeinbevölkerung veröffentlicht, bei dem DHPA in allen Urinproben nachgewiesen wurde. Die Konzentrationen waren mit 6,8 - 109 $\mu\text{g}/\text{l}$ jedoch um ein 10-faches höher als aufgrund der Acrylamid-Aufnahme und des Metabolismus erwartet. Daher ist davon auszugehen, dass Acrylamid bzw. Glycidamid nicht die einzige DHPA-Quelle darstellen (Latzin *et al.*, 2012).

Eine weitere Verbindung, die nach Acrylamid-Gabe nachgewiesen wurde, stellt CO₂ dar. Nach i.v. Gabe von 100 mg/kg isotoopenmarkiertem 1-¹⁴C-Acrylamid an männliche Albino-Ratten (n = 2) wurden innerhalb von 24 Stunden 6 % der 1-¹⁴C-Acrylamid-Dosis als ¹⁴CO₂ abgeatmet (Hashimoto und Aldridge, 1970). Nach i.v. Gabe von 10 mg/kg isotoopenmarkiertem 2,3-¹⁴C-Acrylamid an männlichen F344-Ratten (n = 2) konnte innerhalb des sechsständigen Untersuchungszeitraums hingegen kein ¹⁴CO₂ nachgewiesen werden (Miller *et al.*, 1982). Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass das Abbau-produkt CO₂ aus dem C1-Atom von Acrylamid stammt. Hierbei könnte DHPS ein Zwischenprodukt der

CO₂-Freisetzung darstellen. Genaue Untersuchungen, die diesen Abbauweg belegen würden, existieren bisher jedoch nicht.

Konjugation von Acrylamid und Glycidamid mit Glutathion sowie Abbau zu Mercaptursäuren

Neben der Epoxidhydrolyse erfolgt die Entgiftung von Acrylamid und Glycidamid auch durch die Reaktion mit Glutathion und den anschließenden Metabolismus zu den entsprechenden Mercaptursäuren (siehe Abbildung 14).

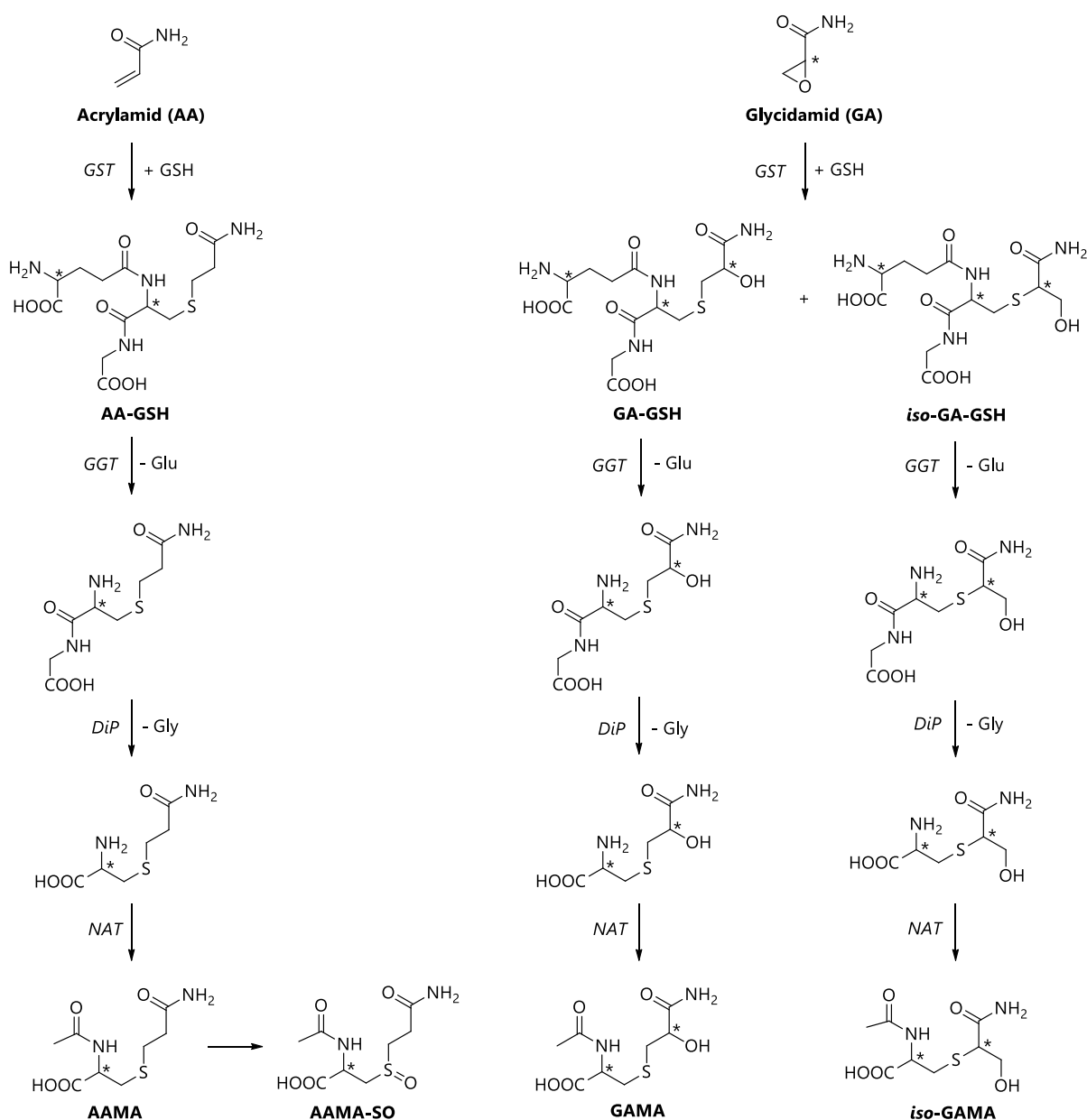


Abbildung 14: Bildung von AAMA und AAMA-SO aus Acrylamid und von GAMA und iso-GAMA aus Glycidamid, AA: Acrylamid, AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, AAMA-SO: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-cystein-*S*-oxid, DiP: Dipeptidase, GA: Glycidamid, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, GGT: γ-Glutamyltranspeptidase, Glu: Glutaminsäure, Gly: Glycin, GSH: Glutathion, GST: Glutathion-*S*-Transferase, iso-GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, NAT: *N*-Acetyltransferase [modifiziert nach (Duda-Chodak *et al.*, 2016)]

Die Konjugation von Acrylamid bzw. Glycidamid mit Glutathion erfolgt mittels Glutathion-S-Transferase (GST). Nachdem die Bildung der Acrylamid-, Glycidamid- und *iso*-Glycidamid-Glutathion-Addukte erfolgt ist, kommt es zur Abspaltung von Glutaminsäure mittels γ -Glutamyltranspeptidase und zur Abspaltung von Glycin mittels Dipeptidase. Durch *N*-Acetylierung mittels *N*-Acetyltransferase (NAT) kommt es zur Mercaptursäure-Bildung. Ausgehend von Acrylamid wird die Acrylamid-Mercaptursäure AAMA gebildet, die im humanen Organismus durch Oxidation weiter zu AAMA-SO reagieren kann. Die Mercaptursäuren, die ausgehend von Glycidamid gebildet werden, sind GAMA und *iso*-GAMA (Duda-Chodak *et al.*, 2016). Zur Ausscheidung dieser Mercaptursäuren existieren verschiedene Tier- und Humanstudien, auf die in Kapitel 2.2.4.3 näher eingegangen wird.

Die Acrylamid-Glutathion-Addukt-Bildung wurde *in vivo* bereits genauer untersucht, allerdings konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, welche GST-Isoformen hauptsächlich an der Reaktion beteiligt sind. In einer Humanstudie mit 47 Probanden zeigte sich, dass das GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis bei Individuen mit GSTM1-null Genotyp ($p = 0,039$) sowie mit GSTT1-null Genotyp ($p = 0,006$) bzw. mit der Kombination von beiden null-Genotypen ($p = 0,029$) signifikant höher war als bei denen mit WT-Genotypen (Duale *et al.*, 2009). Eine derartige Korrelation konnte in einer Humanstudie mit 16 Probanden nach Verzehr von Acrylamid-haltigen Kartoffelchips jedoch nicht nachgewiesen werden. Weder beim GSTM1- und beim GSTT1-null Genotyp noch durch Polymorphismen von GSTP1 wurde ein Einfluss auf den Acrylamid-Metabolismus beobachtet (Doroshenko *et al.*, 2009).

Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukten

Die Reaktion von Acrylamid bzw. Glycidamid mit Hämoglobin führt zu Bildung von Hämoglobin-Addukten. Sowohl Acrylamid als auch Glycidamid können an verschiedene Bindungsstellen des Hämoglobins binden, wobei die Hauptbindungsstellen SH-Gruppen von Cystein sind. Cystein-Hämoglobin-Addukte waren die ersten Addukte, die in Acrylamid-Biomarkerstudien verwendet wurden. Allerdings zeigte es sich, dass sich diese nicht als speziesübergreifende Biomarker eignen, da das Hämoglobin der Ratte einige reaktive Cystein-Reste aufweist, welche in anderen Spezies wie z. B. Menschen nicht vorhanden sind. Acrylamid- und Glycidamid-Valin-Hämoglobin-Addukte, im Folgenden als Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte bezeichnet, stellen hingegen geeignete Biomarker der Langzeitexposition dar. Bei der Langzeitexposition wird beim Menschen ein Zeitraum von bis zu 120 Tagen erfasst, welcher der Lebensdauer der humanen Erythrozyten und somit der der Hämoglobin-Addukte entspricht (EFSA, 2015a).

In B6C3F₁-Mäusen ($n = 10$ pro Dosisgruppe) wurden nach oraler Gabe von Acrylamid (0, 0,13; 0,25; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12; 16 oder 24 mg/kg KG/d), welches in Wasser gelöst wurde und per Schlundsonde über 28 Tage verabreicht wurde, die Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentration in peripheren Blutzellen bestimmt. Die Acrylamid-Hämoglobin-Konzentration lag in der Kontrollgruppe bei 28 ± 11 pmol/g Hämoglobin und stieg dosisabhängig auf 31.297 ± 3.413 pmol/g Hämoglobin in der höchsten Dosisgruppe (24 mg/kg KG). Die Glycidamid-Hämoglobin-Konzentration war um ein 5- bis 8-faches höher. Sie lag in der Kontrollgruppe bei 216 ± 32 pmol/g Hämoglobin und stieg dosisabhängig auf 170.156 ± 21.237 pmol/g Hämoglobin in der höchsten Dosisgruppe (24 mg/kg KG) (Zeiger *et al.*, 2009). Weitere Nagerstudien zeigten ebenfalls eine Korrelation von Acrylamid-Aufnahme und Hämoglobin-Addukt-Bildung (Tareke *et al.*, 2006; Vikström *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2011).

Fennell *et al.* (2005) bestimmte die Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentrationen in einer Humanstudie (n = 5 pro Dosisgruppe) nach oraler (0,5; 1,0 oder 3,0 mg/kg KG) sowie dermalen (3 x 3,0 mg/kg KG) Gabe von $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid. Nach oraler Gabe zeigte sich eine lineare Dosisabhängigkeit. Die Konzentration an $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid-Hämoglobin-Addukten lag 24 Stunden nach oraler Gabe von 0,5 mg/kg KG bei 514 ± 49 pmol/g Hämoglobin und 24 Stunden nach oraler Gabe von 3,0 mg/kg KG bei 2479 ± 685 pmol/g Hämoglobin. Entsprechend lagen die Konzentration an $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid-Hämoglobin-Addukten bei 186 ± 47 bzw. 1076 ± 237 pmol/g Hämoglobin. Das $^{13}\text{C}_3$ -GA-Hb/ $^{13}\text{C}_3$ -AA-Hb-Verhältnis lag nach oraler Gabe von 0,5 mg/kg KG bei $0,36 \pm 0,06$ und nach oraler Gabe von 3,0 mg/kg KG bei $0,44 \pm 0,06$. Nach dermalen $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid-Gabe (3 mg/kg KG an Tag 1, Tag 2 und Tag 3) stieg die $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid- und $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentration linear an. Am letzten Studientag (Tag 5) lagen die Konzentration an $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid-Hämoglobin-Addukten bei 464 ± 62 pmol/g Hämoglobin und die Konzentration an $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid-Hämoglobin-Addukten bei 316 ± 67 pmol/g Hämoglobin ($^{13}\text{C}_3$ -GA-Hb/ $^{13}\text{C}_3$ -AA-Hb: $0,68 \pm 0,11$). Der Vergleich mit einer Vorstudie an F344-Ratten zeigte, dass Acrylamid vom Menschen in geringerem Ausmaß zu Glycidamid metabolisiert wurde als von Nagern. Bei F344-Ratten (n = 4) lag die $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentrationen nach oraler Gabe von 3,0 mg/kg bei 907 ± 176 pmol/g Hämoglobin und die $^{13}\text{C}_3$ -Glycidamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentration bei 752 ± 106 pmol/g Hämoglobin ($^{13}\text{C}_3$ -GA-Hb/ $^{13}\text{C}_3$ -AA-Hb: $0,84 \pm 0,07$) (Fennell *et al.*, 2005).

Ebenfalls wurden Humanstudien durchgeführt, in denen die Hämoglobin-Addukte nach Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung untersucht wurden. Der tägliche Verzehr von 160 g Kartoffelchips mit einem Acrylamid-Gehalt von $980 \mu\text{g}/\text{kg}$ über vier Wochen durch 14 Probanden, von denen acht Nichtraucher und sechs Raucher waren, führte zu einem Anstieg der Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentration. Bei Nichtrauchern stieg die Konzentration der Addukte von 44 ± 31 pmol/g Hämoglobin auf 87 ± 47 pmol/g Hämoglobin und bei Rauchern von 203 ± 186 pmol/g Hämoglobin auf 262 ± 191 pmol/g Hämoglobin (Naruszewicz *et al.*, 2009). Durch eine tägliche Acrylamid-Aufnahme von $11 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG über die Nahrung über einen Zeitraum von vier Tagen stieg die Konzentration an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten bei Nichtrauchern (n = 9) von 57 ± 10 pmol/g Hämoglobin auf 114 ± 15 pmol/g Hämoglobin. Die Konzentration an Glycidamid-Hämoglobin-Addukten nahmen von 64 ± 27 pmol/g Hämoglobin auf 106 ± 25 pmol/g Hämoglobin zu. Die tägliche Acrylamid-Aufnahme von $2,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ KG über die Nahrung über einen Zeitraum von 28 Tagen durch neun Nichtraucher resultierte ebenfalls in einer Zunahme der Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukt-Konzentration. Die Konzentration an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten stieg von 36 ± 15 pmol/g Hämoglobin auf 81 ± 30 pmol/g Hämoglobin und die Konzentration an Glycidamid-Hämoglobin-Addukten von 35 ± 20 pmol/g Hämoglobin auf 62 ± 23 pmol/g Hämoglobin (Vikström *et al.*, 2011). Auf weitere Humanstudien, in denen Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte als Biomarker Anwendung fanden, wird in Kapitel 2.2.6.2 eingegangen.

Bildung von Glycidamid-DNA-Addukten

Die Bildung von Glycidamid-DNA-Addukten wurde bereits *in vitro* und *in vivo* an Nagern untersucht. Nach i.p. Acrylamid-Gabe von 50 mg/kg KG an männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen (n = 3 - 4 pro Geschlecht) wurde N7-GA-Gua in Konzentrationen von 840 - 2100 N7-GA-Gua pro 10^8 Nukleotide

in Gewebe und Leukozyten erfasst. Ebenfalls wurde das DNA-Addukt *N3-GA-Ade* quantifiziert, jedoch in 75-fach geringerer Konzentration verglichen zum DNA-Addukt *N7-GA-Gua*. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Acrylamid-Gabe von 50 mg/kg KG an männlichen und weiblichen F344-Ratten ($n = 3 - 4$ pro Geschlecht), wobei die detektierten DNA-Addukte ($270 - 960 / 10^8$ Nukleotide) geringer waren als bei Mäusen (Doerge *et al.*, 2005a). Eine Studie an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 54$) untersuchte die Dosisabhängigkeit der Bildung des *N7-GA-Gua*-DNA-Adduktes in Leber, Niere und Lunge nach einmaliger Acrylamid-Gabe von 0,1 - 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG per Schlundsonde. Ab einer Dosis von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG konnten *N7-GA-Gua*-Konzentrationen in Niere und Lunge detektiert werden und ab 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG in der Leber. Eine Acrylamid-Gabe von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG oder mehr resultierten in einer signifikanten Zunahme des DNA-Adduktes *N7-GA-Gua* verglichen zur vorherigen Dosisgruppe. Die *N7-GA-Gua*-Gehalte stiegen von nicht nachweisbar auf 122 - 236 Addukte pro 10^8 Nukleotide nach Acrylamid-Gabe von 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG an (Watzek *et al.*, 2012a). In einer Studie mit 33 Nichtrauchern und 30 Rauchern konnte *N7-GA-Gua* erstmals im Humanurin nachgewiesen werden. Bei Nichtrauchern lag der Gehalt bei 0,93 $\mu\text{g}/\text{g}$ Kreatinin und bei Rauchern bei 1,41 $\mu\text{g}/\text{g}$ Kreatinin (Huang *et al.*, 2015).

Nach *in vitro* Inkubationen von DNA, welche aus Lachshoden isoliert wurde, mit Glycidamid konnte neben *N7-GA-Gua* und *N3-GA-Ade* als weiteres Glycidamid-DNA-Addukt *N1-(2-Carboxy-2-hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin (N1-GA-dA)* quantifiziert werden. *In vivo* führte die Behandlung von männlichen C3H/HeNMTV-Mäusen, weiblichen C57B1/CN-Mäusen und neonatalen B6C3F1-Mäusen mit Acrylamid oder Glycidamid (50 mg/kg) jedoch zu keiner nachweisbaren *N1-GA-dA*-Bildung in der Leber der Tiere (Gamboa da Costa *et al.*, 2003).

DNA-Addukte mit Acrylamid konnten bisher weder in Tier- oder Humangewebe nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Reaktion von Acrylamid mit Kalbsthymus-DNA kam es unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,0) zur Bildung verschiedener Acrylamid-DNA-Addukte (Solomon *et al.*, 1985).

2.2.4.3 Ausscheidung

In Tierstudien konnte nach Gabe von radioaktiv markiertem Acrylamid gezeigt werden, dass die Elimination von Acrylamid hauptsächlich über den Urin und in geringen Mengen auch über den Fäzes erfolgt. Nach oraler Gabe von 1, 10 oder 100 mg/kg KG 2,3-¹⁴C-Acrylamid an männliche Fisher-344-Ratten ($n = 9$) wurde die Acrylamid-Ausscheidung durch Bestimmung der Radioaktivität im Urin und Fäzes ermittelt. Die Tiere der verschiedenen Dosisgruppen zeigten eine vergleichbare prozentuale Exkretion. Im Zeitraum von 24 Stunden wurden bereits 53 - 67 % der Dosis ausgeschieden und nach sieben Tagen 65 - 82 %. Die Exkretion über den Urin machte davon mehr als 90 % aus (Miller *et al.*, 1982). Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch eine Studie bei der 50 mg/kg KG 1-¹⁴C-Acrylamid oral an männliche Sprague-Dawley-Ratten ($n = 5 - 7$) verabreicht wurde. Hier lag die renale Exkretion im Zeitraum von 48 Stunden bei 61 % und die billäre bei 3,9 %. Außerdem wurde der Zeitraum der maximalen Ausscheidung ermittelt. Dieser war bei der Exkretion über den Urin der Zeitraum von 0 - 12 h und bei der Exkretion über den Fäzes der Zeitraum von 24 - 48 h (Kadry *et al.*, 1999).

Des Weiteren wurden Studien zur Elimination der einzelnen Metaboliten von Acrylamid durchgeführt (siehe Tabelle 2). Nach oraler Gabe von 50 mg/kg KG 1,2,3-¹³C-Acrylamid wurden im 24-h-Sammelurin von männlichen B6C3F1-Mäusen ($n = 3$) und F344-Ratten ($n = 4$) jeweils circa 50 % der aufgenommenen

Acrylamid-Menge erfasst indem die Metaboliten Glycidamid, AAMA, GAMA, *iso*-GAMA sowie DHPA bestimmt wurden. In beiden Spezies stellte die Entgiftung zu den Mercaptursäuren den Hauptmetabolismusweg dar. Bei den B6C3F1-Mäusen wurden über 38 % der Acrylamid-Dosis als Mercaptursäuren ausgeschieden. Die AAMA-Exkretion machte 21 % der Acrylamid-Dosis aus, womit AAMA den Hauptmetaboliten im 24-h-Sammelurin der Tiere darstellte. Die Exkretion von GAMA und *iso*-GAMA lagen in Summe bei 17 % der Acrylamid-Dosis. Glycidamid selbst machte 8,6 % der Acrylamid-Dosis aus und DHPA 2,7 %. Bei den F344-Ratten überwog der reduktive Metabolismus noch deutlicher. Die gesamte Mercaptursäure-Ausscheidung lag bei 46 % der Acrylamid-Dosis, wobei 34 % als AAMA und nur 12 % als GAMA und *iso*-GAMA ausgeschieden wurden. Weitere 2,8 % wurden als Glycidamid und 1,2 % als DHPA ausgeschieden (Sumner *et al.*, 1992).

Die Exkretion von Acrylamid und dessen Metaboliten wurde außerdem an männlichen Probanden (n = 5 pro Dosisgruppe) nach Gabe von 0,5; 1,0 und 3,0 mg/kg KG untersucht. Der Urin wurde von 0 - 24 h gesammelt und es wurden Acrylamid, Glycidamid, AAMA, AAMA-SO, GAMA und *iso*-GAMA bestimmt. Als Hauptausscheidungsprodukt wurde AAMA identifiziert, dessen Ausscheidung 28 - 34 % der Acrylamid-Dosis ausmachte. Weitere 7,2 - 8,7 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge wurden als AAMA-SO ausgeschieden, einem Metaboliten, der bisher nur in Humanurin nachgewiesen wurde. Als GAMA und *iso*-GAMA wurden weniger als 1 % der Acrylamid-Dosis ausgeschieden. 3,2 - 5,0 % wurden in Form der Ausgangsverbindung Acrylamid ausgeschieden und weniger als 1 % als Glycidamid (Fennell *et al.*, 2006).

Weitere Studien zur Exkretion von Acrylamid und dessen Metaboliten im Urin von Nagern und Menschen nach Aufnahme von markiertem Acrylamid sind in Tabelle 2 aufgeführt. Diese Tabelle enthält ebenfalls die GA/AA-Verhältnisse. Bei Mäusen lagen diese bei 1,3 - 4,2 und waren größer als bei Ratten, bei denen GA/AA-Verhältnisse von 0,8 - 1,1 bestimmt wurden. Der oxidative Metabolismus spielt bei Mäusen somit eine deutlich wichtigere Rolle als bei Ratten. Noch kleiner waren die in Humanstudien bestimmten GA/AA-Verhältnisse mit 0,03 - 0,16, woraus sich ergibt, dass die direkte Konjugation von Acrylamid mit Glutathion beim Menschen den Hauptmetabolismusweg darstellt.

Eine Dosisabhängigkeit der Ausscheidung der Hauptmetaboliten AAMA und GAMA wurde an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (n = 54) nach oraler Acrylamid-Gabe (0,1; 1; 10; 100; 500; 1000; 3000; 6000 und 10.000 µg/kg KG) im 16-h-Sammelurin untersucht. Nach Acrylamid-Gabe von 1 bis 10.000 µg/kg KG lag die Gesamtexkretion der Mercaptursäuren bei 20 - 57 %, wobei keine Dosisabhängigkeit der prozentualen Ausscheidung beobachtet wurde. Die absolut ausgeschiedenen AAMA- und GAMA-Mengen stiegen mit zunehmender Dosis an. Zwischen der geringsten Dosisgruppe (0,1 µg/kg KG) und der Kontrollgruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt und die Mercaptursäure-Elimination war in diesen beiden Gruppen höher als aufgrund der Acrylamid-Aufnahme zu erwarten war. Dies wurde als ein Hinweis auf eine mögliche endogene Bildung gesehen (siehe Kapitel 2.2.2.3). Das GAMA/AAMA-Verhältnis wies ebenfalls keine Dosisabhängigkeit auf und lag bei $0,4 \pm 0,1$ (Watzek *et al.*, 2012a). Eine weitere Tierstudie zur Dosisabhängigkeit sowie Geschlechtsspezifität der Mercaptursäure-Ausscheidung wurde an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (n = 30) durchgeführt. Nach oraler Acrylamid-Gabe von 1, 10 und 50 mg/kg KG mittels Schlundsonde wurde der Urin über 48 Stunden gesammelt und AAMA, GAMA sowie *iso*-GAMA quantifiziert. Die gesamte Mercaptursäure-Ausschei-

dung lag bei 38 - 73 % der Acrylamid-Dosis, wobei die Exkretion als AAMA bei 20 - 35 %, als GAMA bei 10 - 25 % und als *iso*-GAMA bei 6 - 13 % lag. Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der prozentualen Mercaptursäure-Exkretion und eine dosisabhängige Zunahme der absoluten Mercaptursäure-Exkretion. Das GAMA(+*iso*-GAMA)/AAMA-Verhältnis lag bei 0,5 - 1,2 (bzw. 0,7 - 1,8), wobei das größte Verhältnis in der mittleren Dosisgruppe beobachtet wurde. Das Verhältnis war bei männlichen Tieren höher als bei weiblichen Tieren mit statistisch signifikantem Unterschied in der mittleren Dosisgruppe. Ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied zeigte sich in der Eliminationskinetik der Mercaptursäuren. Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Mercaptursäure-Ausscheidung war bei männlichen Tieren geringer als bei weiblichen Tieren. Eine statistische Signifikanz wies dieser Effekt bei der AAMA-Exkretion in der geringsten Dosisgruppe auf (Wang *et al.*, 2016).

In einer Humanstudie mit einem Probanden wurde nach Gabe von 13,2 µg/kg KG D₃-Acrylamid der Urin für 46 Stunden gesammelt und die prozentuale Ausscheidung, die maximal ausgeschiedenen Konzentrationen (c_{max}), die Zeitpunkte der maximalen Ausscheidung (t_{max}) sowie $t_{1/2}$ von AAMA und GAMA bestimmt. Die AAMA-Exkretion macht 51,7 % der Acrylamid-Dosis aus und die GAMA-Exkretion weitere 4,6 %. Für AAMA wurde ein c_{max} von 1591 µg/l (6791 nmol/l) im Zeitraum von 8 - 18 h ($t_{max} = 11,5$ h) ermittelt und für GAMA ein c_{max} von 151 µg/l (603 nmol/l) im Zeitraum von 22 - 46 h ($t_{max} = 22,1$ h). $T_{1/2}$ lag für AAMA und GAMA jeweils bei 3,5 h (Boettcher *et al.*, 2006). Nach Acrylamid-Aufnahme über selbst hergestellte bzw. kommerziell erhältliche Kartoffelchips durch 13 bzw. fünf männliche Probanden wurden von Watzek *et al.* (2012b) ebenfalls c_{max} , t_{max} und $t_{1/2}$ von AAMA und GAMA ermittelt. Für AAMA lag c_{max} nach Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips (Acrylamid-Gehalt: 6230 ± 990 µg/kg), der mit einer sehr hohen Acrylamid-Aufnahme von 938 µg (14,8 µg/kg KG) verbunden war, bei 1,16 µmol/g Kreatinin (3378 nmol/l) mit einem t_{max} von 6 h und einem $t_{1/2}$ von 14 h. Der Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips (Acrylamid-Gehalt: 249 ± 12 µg/kg), welcher mit einer Acrylamid-Aufnahme von 44 µg (0,6 µg/kg KG) verbunden war, führte zu einem c_{max} von 0,16 µmol/g Kreatinin, einem t_{max} von 6 h und einem $t_{1/2}$ von 12 h. Für GAMA wurden nach Verzehr der selbst hergestellten Kartoffelchips ein c_{max} von 0,08 µmol/g Kreatinin (324 nmol/l), ein t_{max} von 22 h und ein $t_{1/2}$ von 16 h ermittelt. c_{max} lag nach Verzehr der kommerziellen Kartoffelchips bei 0,03 µmol/g Kreatinin, t_{max} konnte nicht bestimmt werden und $t_{1/2}$ lag bei 6 h (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Der Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips durch 19 männlichen und weiblichen Probanden, der mit einer mittleren Acrylamid-Aufnahme von 12,6 µg/kg KG verbunden war, resultierte in einem c_{max} von 1,5 µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 11,5$ h) für AAMA und von 0,32 µmol/g Kreatinin für AAMA-SO ($t_{max} = 18,5$ h). Für GAMA wurde ein c_{max} von 0,14 µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 19,4$ h) ermittelt und für *iso*-GAMA ein c_{max} von 0,05 µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 16,0$ h). Der Metabolismus von weiblichen Probanden war effizienter und schneller als der von männlichen Probanden (Wang *et al.*, 2016). Nach dem Verzehr von Lebkuchen durch drei Probanden (zwei Nichtraucher, ein Gelegenheitsraucher), welcher mit einer absoluten Acrylamid-Aufnahme von 123 µg verbunden war, wurde im Zeitraum von 6 - 8 h ein c_{max} von 1,71 µmol/g Kreatinin für AAMA und ein c_{max} von 0,06 µmol/g Kreatinin für GAMA ermittelt (Kellert *et al.*, 2006). Auf diese und weitere Humanstudien, in denen die Mercaptursäuren Anwendung fanden als Expositionsbiomarker, wird in Kapitel 2.2.6.2 nochmals eingegangen.

Tabelle 2: Ausscheidung von Acrylamid und dessen Metaboliten im Urin von Nagern (σ) und Menschen über 24 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von Acrylamid gelöst in Wasser. Daten sind in Molprozent der Dosis angegeben. [modifiziert nach (EFSA, 2015a)]

Spezies	Dosis	AA	AAMA	AAMA-SO	GA	GAMA ¹	DHPA ²	Σ	Σ AA	Σ GA	Σ GA/ Σ AA	Referenz
Maus	50 mg/kg	nq	21 ± 1,1	nb	8,6 ± 1,1	17 ± 0,6	2,7 ± 0,6	50,4	21	28	1,3	(Sumner <i>et al.</i> , 1992)
Maus	0,1 mg/kg	0,7	7	nb	16	16	nb	40	7,7	32	4,2	(Doerge <i>et al.</i> , 2007)
Ratte	50 mg/kg	nq	34 ± 1,8	nb	2,8 ± 0,5	12 ± 0,6	1,2 ± 0,4	50,7	34	16	0,5	(Sumner <i>et al.</i> , 1992)
Ratte	50 mg/kg	nq	38	nb	3,9	10,5	0,6	53	38	15	0,4	(Sumner <i>et al.</i> , 2003)
Ratte	3,0 mg/kg	nq	29 ± 4,5	nb	nb	21 ± 2,4	nb	50	29	21	0,7	(Fennell und Friedman, 2005)
Ratte	0,1 mg/kg	2	31	nb	6	28	nb	67	33	34	1,0	(Doerge <i>et al.</i> , 2007)
Ratte	0,1 mg/kg	nq	35 ± 7,4	nb	nb	27 ± 4,6	nb	62	35	27	0,8	(Kopp und Dekant, 2009)
Ratte	20 µg/kg	nq	30 ± 5,1	nb	nb	25 ± 6,2	nb	55	35	27	0,8	(Kopp und Dekant, 2009)
Mensch	3,0 mg/kg	nq	22,0 ± 5,3	4,2 ± 1,1	0,8 ± 0,2	nb	3,3 ± 1,1	34	26,2	4,1	0,16	(Fennell und Friedman, 2005)
Mensch	3,0 mg/kg	3,2	27,8 ± 8,0	7,2 ± 2,4	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	nb	39,9	35	1,4	0,04	(Fennell <i>et al.</i> , 2006)
Mensch	1,0 mg/kg	5	34,4 ± 5,2	8,7 ± 1,2	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1	nb	49,9	43,1	1,4	0,03	(Fennell <i>et al.</i> , 2006)
Mensch	0,5 mg/kg	4,7	31,2 ± 6,5	8,3 ± 2,4	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,2	nb	45,6	39,5	1,2	0,03	(Fennell <i>et al.</i> , 2006)
Mensch	20 µg/kg	nb	37,4 ± 2,9	6,3 ± 1,8	nb	3,2 ± 0,7	nb	46,9	43,7	3,2	0,07	(Kopp und Dekant, 2009)
Mensch	13 µg/kg	nb	45,1	nb	nb	2,8	nb	47,7	45,1	2,8	0,06	(Boettcher <i>et al.</i> , 2006)
Mensch	0,5 µg/kg	nb	41,4 ± 3,5	7,2 ± 1,4	nb	3,8 ± 0,8	nb	52,4	48,6	3,8	0,08	(Kopp und Dekant, 2009)

AA: Acrylamid, AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, AAMA-SO: N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein-S-oxid, DHPA: 2,3-Dihydroxypropionamid, GA: Glycidamid, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, nb: nicht bestimmt, nq: nicht quantifiziert, Σ : Gesamtausscheidung, Σ AA: AA+AAMA+AAMA-SO, Σ GA: GA+GAMA+DHPA, ¹beinhaltet N-cetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (iso-GAMA) wenn bestimmt, ²beinhaltet 2,3-Dihydroxypropansäure (DHPS) wenn bestimmt

2.2.5 Toxikodynamik

Für Acrylamid sind diverse toxische Wirkungen beschrieben, welche zum Teil auf die chemische Reaktivität von Acrylamid selbst sowie auf die chemische Reaktivität des Metaboliten Glycidamid zurückzuführen sind. Die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung Acrylamid stellt ein weiches Elektrophil dar und reagiert bevorzugt in einer Michael-Addition mit weichen Nucleophilen wie Cysteinresten von Enzymen und anderen funktionellen Proteinen. Das Epoxid Glycidamid reagiert als hartes Elektrophil auch mit harten Nucleophilen wie DNA-Basen (LoPachin und Gavin, 2008; LoPachin und Gavin, 2012).

Basierend auf diesen Reaktivitäten sind für Acrylamid genotoxische, mutagene und kanzerogene Effekte beschrieben. Ebenfalls ist Acrylamid neurotoxisch und wirkt sich auf die Entwicklung sowie auf die Reproduktionsfähigkeit von männlichen Tieren aus. Akute toxische Wirkungen wurden an verschiedenen Spezies nachgewiesen.

2.2.5.1 Akute Toxizität

Nach oraler Gabe wurde die akute Toxizität von Acrylamid an Ratten, Mäusen, Kaninchen sowie Meerschweinchen untersucht. Der ermittelte orale LD_{50} lag für Ratten zwischen 150 und 250 mg/kg KG (McCollister *et al.*, 1964; Fullerton und Barnes, 1966; Tilson und Cabe, 1979) und für Mäuse bei 107 mg/kg KG. Für Kaninchen und Meerschweinchen wurden ebenfalls LD_{50} Werte zwischen 150 und 180 mg/kg KG bestimmt (McCollister *et al.*, 1964).

2.2.5.2 Neurotoxizität

In verschiedenen Tierstudien mit wiederholter Acrylamid-Gabe wurden neurotoxische Effekte von Acrylamid nachgewiesen. Beschriebene neurotoxische Effekte waren histopathologische Veränderungen des peripheren sowie zentralen Nervensystems, Lähmung der hinteren Gliedmaßen und verminderte Rotarod-Leistung (Burek *et al.*, 1980; NTP, 2012; EFSA, 2015a). Ebenfalls wurden neurologische Effekte auch in einigen epidemiologischen Studien beobachtet (Hagmar *et al.*, 2001; EFSA, 2015a).

Eine subchronische Toxizitätsstudie wurde an männlichen und weiblichen F344-Ratten ($n = 10 - 29$ pro Geschlecht und Dosisgruppe) durchgeführt, wobei die Gabe von Acrylamid (0; 0,05; 0,2; 1; 5 oder 20 mg/kg KG/d) über einen Zeitraum von 92 bzw. 93 Tagen gelöst in Trinkwasser erfolgte. In der höchsten Dosisgruppe (20 mg/kg KG/d) wurden Effekte auf das periphere Nervensystem wie Demyelinisierung und Axonverlust beobachtet. Außerdem wurden in dieser Dosisgruppe Effekte auf das zentrale Nervensystem in Form eines leichten Rückgangs des Rückenmarks festgestellt. Ein Rückgang des Skelettmuskels und der Hoden sowie eine Ausdehnung der Blase wurden als mögliche sekundäre Effekte angesehen. Nach 144 Tagen zeigte sich eine partielle bzw. vollständige Reversibilität der Effekte. In der zweithöchsten Dosisgruppe (5 mg/kg KG) war die Schwere der Effekte geringer und eine Reversibilität wurde früher beobachtet (111 Tage). Die Acrylamid-Gabe von 1 mg/kg KG/d resultierte nur in geringen dosisabhängigen Effekten, wie sehr leichter Degeneration von Nervenzellen, welche bereits nach 25 Tagen reversibel waren (Burek *et al.*, 1980). Von der FAO/WHO wurde aus dieser Studie ein NOAEL von 0,2 mg/kg KG/d sowie ein *lowest observed adverse effect level* (LOAEL) von 1 mg/kg KG/d abgeleitet (FAO/WHO, 2006; FAO/WHO, 2011).

Zwei weitere Studien mit wiederholter Dosisgabe an F344-Ratten wurden durch das *National Toxicology Program* (NTP) des *United States Department of Health and Human Services* durchgeführt. Bei der ersten Studie handelte es sich um eine 13-wöchige Studie an männlichen und weiblichen Tieren ($n = 8$ pro Geschlecht und Dosisgruppe), bei der eine Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser und über die Nahrung erfolgte. Für männliche Tiere, die über Trinkwasser exponiert wurden, lag die Acrylamid-Dosis bei 0; 0,8; 2,1; 4,5; 8,6 oder 22 mg/kg KG/d und für weibliche Tiere bei 0; 1,1; 2,7; 6,0; 12,3 oder 26 mg/kg. Über die Nahrung lag die verabreichte Dosis von Acrylamid für männlichen Tiere bei 0; 0,5; 1,4; 2,8; 5,5 oder 14,2 mg/kg KG/d und für weiblichen Tiere bei 0; 0,6; 1,6; 3,2; 6,6 oder 17,9 mg/kg. Ab einer täglichen Acrylamid-Gabe von 8,6 mg/kg KG/d (σ) bzw. 18 mg/kg KG/d (φ) wurden Lähmungen der hinteren Gliedmaßen beobachtet. Radikuloneuropathien des Hüftnerves und des Lendenrückenmarks traten ab 6,6 mg/kg KG/d (σ) bzw. 18 mg/kg KG/d (φ) auf. Begleitet wurden diese Effekte durch einen Rückgang des Skelettmuskels der hinteren Gliedmaßen und eine Ausdehnung der Blase. Die zweite NTP-Studie an männlichen sowie weiblichen F344-Ratten ($n = 48$ pro Geschlecht und Dosisgruppe), bei der eine Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser erfolgte (σ : 0,3; 0,7; 1,3 oder 2,7 mg/kg KG/d, φ : 0,4; 0,9; 1,8 oder 4,0 mg/kg KG/d), umfasste einen Zeitraum von zwei Jahren, wobei im gegebenen Dosisbereich keine Lähmungen der hinteren Gliedmaßen festgestellt wurden. Beobachtet wurde hingegen ein dosisabhängiger Axonverlust des Hüftnervs, welcher in der höchsten Dosisgruppe (σ : 2,7 mg/kg KG/d, φ : 4,0 mg/kg KG/d) signifikant war (NTP, 2012). Aus diesem Endpunkt ergab sich nach Berechnungen der EFSA eine BMDL₁₀ von 0,43 mg/kg KG für nicht-neoplastische Effekte (EFSA, 2015a).

Analog zur Studie an F344-Ratten wurden im Rahmen des NTPs auch eine 13-wöchige Studie und eine zweijährige Studie an B6C3F1-Mäusen durchgeführt. Bei der 13-wöchigen Studie an männlichen und weiblichen Tieren ($n = 8$ pro Geschlecht und Dosisgruppe) erfolgte eine Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser bzw. über die Nahrung. Die Acrylamid-Dosen über das Trinkwasser lag für männliche Tiere bei 0; 3,2; 6,9; 13; 33 und 70 mg/kg KG/d und für weibliche Tiere bei 0; 3,5; 7,8; 16; 31 und 83 mg/kg KG/d. Über die Nahrung waren die Dosen für männliche Tiere 0; 3,3; 6,6; 12; 32 und 59 mg/kg KG/d und für weibliche Tiere 0; 3,7; 7,5; 14; 35 und 64 mg/kg KG/d. Nach Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser sowie über die Nahrung wurden in den höchsten Dosisgruppen (σ : 70 bzw. 59 mg/kg KG/d, φ : 83 bzw. 64 mg/kg KG/d) Lähmungen der hinteren Gliedmaßen, Radikuloneuropathien des Hüftnerves und des Lendenrückenmarks, einen Rückgang des Skelettmuskels der hinteren Gliedmaßen sowie eine Ausdehnung der Blase beobachtet (NTP, 2012). Der NOAEL lag für die Acrylamid-Aufnahme über Trinkwasser bei 13,3 mg/kg KG/d und für die Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung bei 12,0 mg/kg KG/d (EFSA, 2015a). Die zweijährige NTP-Studie an männlichen sowie weiblichen Tieren ($n = 48$ pro Geschlecht und Dosisgruppe), bei der die Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser (σ : 1,0; 2,2; 4,1 oder 8,9 mg/kg KG/d, φ : 1,1; 2,2; 4,7 oder 10 mg/kg KG/d) erfolgte, führte zu keinen vergleichbaren neurotoxischen Effekten. Mäuse waren für neurotoxische Effekte durch Acrylamid weniger sensitiv als Ratten (NTP, 2012).

Eine epidemiologische Studie, in der neurologische Effekte durch Acrylamid beobachtet wurden, ist die Studie von Hagmar *et al.* (2001), die ein Kollektiv von 210 Tunnelarbeitern umfasste, welche über zwei Monate mit Acrylamid und *N*-Hydroxymethylacrylamid exponiert waren. Beobachtet wurden Effekte auf das periphere Nervensystem wie Taubheit in Händen und Füßen, Beinkrämpfe, erhöhtes Schwitzen der Hände und Füße, Hautablösung an den Händen, Reizung von Augen, Nase, Hals und Haut, Husten,

Atemnot, Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel. Es wurde eine dosisabhängige Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Symptomen, die das periphere Nervensystem betreffen, und dem Level an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten im Blut beobachtet (Hagmar *et al.*, 2001).

2.2.5.3 Reproduktionstoxizität

Neben Effekten auf das Nervensystem, beeinflusst Acrylamid auch die Reproduktionsfähigkeit von männlichen Tieren. Reproduktionsparameter, die hauptsächlich durch eine Acrylamid-Exposition beeinflusst wurden, sind die Morphologie von Spermien und Hoden sowie die Spermienanzahl. Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der im Kapitel 2.2.5.2 bereits erwähnten NTP-Studien an Ratten und Mäusen näher eingegangen.

In der 13-wöchigen NTP-Studie an F344-Ratten und an B6C3F₁-Mäusen (siehe Kapitel 2.2.5.2) wurde ein dosisabhängiger Rückgang der Keimzellen in den Hoden von männlichen Ratten und Mäusen beobachtet. Bei Ratten lag der NOAEL für diesen Effekt bei 2,1 mg/kg KG/d (Acrylamid-Gabe über Trinkwasser) bzw. 0,5 mg/kg KG/d (Acrylamid-Gabe über die Nahrung) und bei Mäusen bei 33 mg/kg KG/d (Acrylamid-Gabe über Trinkwasser) bzw. 32 mg/kg KG/d (Acrylamid-Gabe über die Nahrung). Männliche Ratten der höchsten Dosisgruppe wiesen außerdem Hypospermie der Nebenhoden auf. In der Zwei-Jahres-NTP-Studie wurden im gegebenen Dosisbereich bei Ratten und Mäusen keine vergleichbaren reproduktionstoxischen Effekte dokumentiert. Zusätzlich zu den Zwei-Jahres- und 13-Wochen-Studien wurden auch NTP-Studien über zwei Wochen an männlichen und weiblichen F344-Ratten und B6C3F₁-Mäusen (n = 4 pro Tierart, Geschlecht und Dosisgruppe) durchgeführt, bei denen die Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser und die Nahrung erfolgte. Bei Ratten gab es pro Geschlecht sechs Dosisgruppen. Über Trinkwasser lag die Acrylamid-Aufnahme der männlichen Tiere bei 1,4; 3,8; 7,8; 15,4; 37,4 und 67,6 mg/kg KG/d und die der weiblichen Tiere bei 1,7; 4,3; 8,3; 16,9; 39,4 und 70,0 mg/kg KG/d. Die Acrylamid-Gabe über die Nahrung resultierte entsprechend in einer Aufnahme von 1,1; 2,7; 5,3; 11,4; 22,4 oder 51,7 mg/kg KG/d (♂) und 1,2; 2,7; 6,4; 11,5; 29,4 und 63,4 mg/kg KG/d (♀). Die Studie an Mäusen beinhaltete pro Geschlecht und Applikationsart fünf Dosisgruppen. Über das Trinkwasser lag die Acrylamid-Aufnahme der männlichen Mäuse bei 2,8; 6,8; 13,9; 26,9 und 66,7 mg/kg KG/d und die der weiblichen Mäuse bei 2,9; 7,1; 13,6; 31,0 und 75,8 mg/kg KG/d. Über die Nahrung waren die Dosisgruppen entsprechend 1,2; 3,1; 6,9; 13,5; 32,8 und 72,8 mg/kg KG (♂) und 1,4; 3,4; 7,0; 14,2; 36,4 und 75,7 mg/kg KG/d (♀). Bei männlichen Ratten kam es nach Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser und über die Nahrung in der höchsten Dosisgruppe (67,6 und 51,7 mg/kg KG/d) zu einem Rückgang des Keimepithels in den Samenkanälchen der Hoden. Der NOAEL für diesen Effekt lag bei 37,4 mg/kg KG/d nach Acrylamid-Aufnahme über das Trinkwasser und bei 22,4 mg/kg KG/d nach Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung. Bei Mäusen wurden keine reproduktionstoxischen Effekte beobachtet (NTP, 2012; EFSA, 2015a).

2.2.5.4 Entwicklungstoxizität

Als Endpunkte der Entwicklungstoxizität von Acrylamid wurden in verschiedenen Tierstudien Skelettveränderungen, histologische Veränderungen des zentralen Nervensystems, neurologische Verhaltensstörungen und eine geringfügig reduzierte Gewichtszunahme beobachtet.

Von Ferguson *et al.* (2010) wurde eine Studie zur Entwicklungstoxizität an F344-Ratten ($n = 48 - 58$ pro Dosisgruppe) durchgeführt. Die Muttertiere erhielten Acrylamid (0,0; 0,1; 0,3, 1,0 oder 5,0 mg/kg KG/d) per Schlundsonde von Tag 6 der Trächtigkeit bis zum Ende der Trächtigkeit. Die Nachkommen wurden ab Tag 1 bis Tag 21 nach der Geburt mit derselben Dosis an Acrylamid per Schlundsonde exponiert. Die Acrylamid-Exposition hatte keine Auswirkung auf Entwicklungsmarker wie Fellentwicklung, Außenohr-ablösung und Augenöffnung. Bei den Nachkommen der höchsten Dosisgruppe wurde jedoch eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes ($p < 0,05$) am postnatalen Tag (*postnatal day*, PND) 1 sowie am PND 21 verglichen zur Kontrollgruppe festgestellt. Ebenfalls wurde eine geringere Aktivität im Open-Field-Test beobachtet. Keine signifikanten Veränderungen konnten beim Aufrichtreflex, der Haltefähigkeit der Vordergliedmaßen sowie der Bewegungskoordination beobachtet werden (Ferguson *et al.*, 2010). Der aus dieser Studie von der EFSA ermittelte NOAEL lag bei 1,0 mg/kg KG/d (EFSA, 2015a).

In einer Zwei-Generationen-Studie an F344-Ratten ($n = 30$ pro Geschlecht und Dosisgruppe) erhielten frisch abgestillte Ratten für zehn Wochen täglich Acrylamid (0,0; 0,5; 2,0 oder 5,0 mg/kg KG/d) über das Trinkwasser und anschließend erfolgte die Verpaarung. Während der Trächtigkeit und der Stillzeit wurde die Exposition der weiblichen F0 Tiere fortgesetzt. Die F1 Nachkommen wurden für elf Wochen mit derselben Acrylamid-Dosis exponiert wie die F0 Generation und anschließend verpaart. In der F2 Generation wurden Spreizfüße in allen Acrylamid-Dosisgruppen sowie verstärkte Kopfneigung in den beiden höchsten Dosisgruppen festgestellt. Die Anzahl der lebenden Nachkommen pro Wurf war in der höchsten Dosisgruppe reduziert. Männliche Tiere der F1 Generation wiesen in der höchsten Dosisgruppe verstärkt Fragmentierung oder Anschwellung der Axone des peripheren Nervensystems auf. Sowohl in der F1 als auch in der F2 Generation war die Überlebensrate der Nachkommen von Tag 0 bis Tag 4 nach der Geburt im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Ein ebenfalls innerhalb der Studie durchgeführter Dominant-Letal-Test ergab einen *no observed effect level* (NOEL) von 2 mg/kg KG/d für die pränatale Entwicklungstoxizität. Der NOAEL für die systemische Toxizität der Eltern, inklusive Neurotoxizität, lag bei $\leq 0,5$ mg/kg KG/d (Tyl *et al.*, 2000).

Zu kognitiven und motivationalen Veränderungen durch Acrylamid-Exposition wurde eine weitere Zwei-Generationen-Studie an F344-Ratten ($n = 9 - 10$ pro Dosisgruppe) durchgeführt. Die F0 Muttertiere erhielten ab dem sechsten Tag der Trächtigkeit bis zum PND 85 täglich Acrylamid (0,0; 0,1; 0,3; 1,0 oder 5,0 mg/kg KG/d) mittels Schlundsonde. Die F1 Nachkommen wurden ab PND 1 bis PND 21 ebenfalls mittels Schlundsonde mit Acrylamid in den gleichen Dosen wie ihre Muttertiere exponiert. Am Tag 22 nach der Geburt wurden die F1 Nachkommen entwöhnt und verpaart. Die Acrylamid-Gabe wurde über das Trinkwasser fortgesetzt. Ein Konditionierungsexperiment, welches in einer Skinner-Box durchgeführt wurde, ergab für die Tiere der F2 Generation in der höchsten Dosisgruppe (5 mg/kg KG/d) eine verminderte Motivation (Garey und Paule, 2007). Der aus diesem Experiment ermittelte NOAEL für Entwicklungstoxizität wurde von der EFSA mit 1,0 mg/kg KG/d angegeben (EFSA, 2015a).

In einer Studie zur Lernleistung an F344-Ratten ($n = 8 - 9$ pro Dosisgruppe), wurden die Muttertiere ab dem sechsten Tag der Trächtigkeit bis zur Geburt der Nachkommen per Schlundsonde mit Acrylamid (0,0; 0,1; 0,3; 1,0 oder 5,0 mg/kg KG/d) exponiert. Die F1 Nachkommen erhielten ab PND 1 bis PND 21 Acrylamid mittels Schlundsonde in den gleichen Dosen wie ihre Muttertiere. Am PND 22 wurden die Nachkommen entwöhnt und die Acrylamid-Exposition wurde über das Trinkwasser fortgesetzt. Bei den

Nachkommen der höchsten Dosisgruppe wurde nach vier Monaten ein vermindertes Lernvermögen festgestellt und über den Zeitraum von einer bis acht Wochen eine verminderte Anzahl der prozentual gelösten Aufgaben sowie eine verminderte Antwortquote (Garey und Paule, 2010). Die Daten legen einen NOAEL für die Lernleistung von 1,0 mg/kg KG/d nahe, wobei von der EFSA angemerkt wurde, dass nur eine Reduktion der Lernleistung in der höchsten Dosisgruppe beobachtet wurde und die Daten somit nicht für Dosis-Wirkungs-Abschätzungen geeignet sind (EFSA, 2015a).

2.2.5.5 Genotoxizität und Mutagenität

Zur Genotoxizität und Mutagenität von Acrylamid sowie vom Acrylamid-Metaboliten Glycidamid existieren eine große Anzahl an *in vitro* und *in vivo* Studien. Einige Studien werden in diesem Abschnitt genauer beschrieben. *In vitro* wurde für Acrylamid in Säugerzellen eine schwache mutagene Wirkung und eine starke klastogene Wirkung beschrieben. In Bakterienzellen ist Acrylamid ohne metabolische Aktivierung nicht mutagen. Glycidamid weist hingegen eine stark mutagene Wirkung sowie klastogene Wirkung auf. *In vivo* konnte für Acrylamid eine genotoxische Wirkung in somatischen und Keimzellen nachgewiesen werden. Eine mutagene Wirkung basiert hauptsächlich auf der metabolischen Aktivierung von Acrylamid zu Glycidamid. In hohen Konzentrationen kann Acrylamid durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Induktion von oxidativem Stress auch als direktes Mutagen wirken.

Eine *in vitro* Studie zur Genotoxizität und Mutagenität von Acrylamid (0 - 14 mM) sowie Glycidamid (0 - 2,2 mM) an Säugerzellen wurde von Koyama *et al.* (2006) durchgeführt. Untersucht wurde die DNA-schädigende Wirkung von Acrylamid im Comet-Assay, die klastogene Wirkung im Mikrokern-Test sowie die mutagene Wirkung im Thymidinkinase (TK) - Test. Vier Stunden nach der Inkubation von humanen TK6-Lymphoblastoidzellen mit Acrylamid konnte eine schwache genotoxische Wirkung im Mikrokern- sowie im TK-Test ab Konzentrationen > 10 mM beobachtet werden. Die Inkubation mit Glycidamid führte bereits ab Konzentrationen von $\geq 0,5$ mM zu einer genotoxischen Wirkung bei allen Endpunkten. In dieser Studie konnte keine gesteigerte Genotoxizität von Acrylamid nach Zugabe von S9-Mix, welcher aus Rattenleber gewonnen wurde, festgestellt werden, wodurch angenommen wurde, dass dieser nicht zu einer metabolischen Aktivierung von Acrylamid führte (Koyama *et al.*, 2006).

Martins *et al.* (2007) führte *in vitro* einen Chromosomenaberrations- (CA) Test und einen Schwesterchromatidaustausch- (*sister chromatid exchange*, SCE) Test an V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylamid (0,25 - 2 mM) bzw. Glycidamid (0,001 - 1 mM) durch. Sowohl Acrylamid als auch Glycidamid führten nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden zu CAs, wobei Glycidamid bei gleicher Konzentration zu ausgeprägteren Effekten führte als Acrylamid. Die hauptsächlich detektierten CAs waren für beide Substanzen Chromatidbrüche und -lücken. SCEs wurden nach einer Inkubationszeit von 29 Stunden durch Acrylamid und Glycidamid induziert. Durch Acrylamid kam es zu einer geringfügigen Induktion von SCEs bei der höchsten Konzentration von 2 mM. Die SCEs waren um ein 1,6-faches erhöht verglichen zur Kontrolle. Inkubation mit Glycidamid führte hingegen zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Induktion von SCEs. Eine Konzentration von 1 mM führte zu 10-fach mehr SCEs verglichen zur Kontrolle. In der Studie wurden außerdem die Level der DNA-Addukte N7-GA-Gua und N3-GA-Gua untersucht. Nach Inkubation mit Glycidamid über 18 Stunden (CA-Test) und 29 Stunden (SCE-Test) konnten N7-GA-

Gua ab einer Konzentration von 1 μ M und N3-GA-Gua ab einer Konzentration von 0,25 mM detektiert werden. Die Bildung beider DNA-Addukte war dosisabhängig, wobei das N3-GA-Gua-DNA-Addukt in circa 100-fach geringerer Konzentration vorlag als das N7-GA-Gua-DNA-Addukt. Eine Inkubation mit Acrylamid resultierte nur in der höchsten Konzentration von 2 mM und einer Inkubationszeit von 18 Stunden (CA-Test) in einer geringfügigen N7-GA-Gua-DNA-Addukt-Bildung (Martins *et al.*, 2007).

Ein *in vitro* Comet-Assay (0; 2,5; 5; 10 oder 20 mM Acrylamid) und ein *in vitro* Mikrokern-Test (0; 0,63; 1,3 oder 2,5 mM Acrylamid) wurden an humanen HepG2-Zellen von Jiang *et al.* (2007) durchgeführt. Um den Mechanismus der Acrylamid-Genotoxizität aufzuklären wurden zusätzlich die intrazelluläre Bildung von ROS mittels 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) - Assay (0 - 40 mM Acrylamid) und das Level an oxidativen DNA-Schäden mittels immunochemischer Analyse von 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) (0 - 20 mM Acrylamid) bestimmt. Eine GSH-Depletion durch Buthioninsulfoximin (BSO) wurde angewandt, um den Einfluss von GSH auf den Acrylamid-induzierten oxidativen Stress zu untersuchen. Mittels Comet-Assay konnte eine dosisabhängige DNA-Schädigung und mittels Mikrokern-Test eine dosisabhängige Zunahme der Mikrokerne durch Acrylamid beobachtet werden. Die ROS-Bildung sowie oxidative DNA-Schädigung in Form von 8-OHdG stieg ebenfalls dosisabhängig nach Inkubation mit Acrylamid an. Eine GSH-Depletion durch BSO erhöhte die Zytotoxizität von Acrylamid. Die Studie zeigte, dass Acrylamid eine genotoxische Wirkung aufweist, die möglicherweise direkt durch Induktion von oxidativen DNA-Schäden auftreten kann, welche wiederum durch ROS und GSH-Depletion induziert sein können (Jiang *et al.*, 2007).

Weitere Studien, in denen *in vitro* Tests (Comet-Assay, Mikrokern-Test, Genmutationstest, CA-Test und SCE-Test) an Säugerzellen durchgeführt wurden, bestätigten eine schwach mutagene und stark klastogene Wirkung von Acrylamid sowie die stark mutagene und klastogene Wirkung von Glycidamid (Baum *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2005; Galdo *et al.*, 2006; Thielen *et al.*, 2006; Ao *et al.*, 2008; Baum *et al.*, 2008; Mei *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010; Katic *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2011b; Bandarra *et al.*, 2013; Pingarilho *et al.*, 2013; Nixon *et al.*, 2014).

In einer von Maniere *et al.* (2005) durchgeführten *in vivo* Studie an Sprague-Dawley-Ratten (n = 4 - 5 pro Dosisgruppe), wurde die DNA-schädigende Wirkung mittels Comet-Assay in verschiedenen Geweben nach Gabe von Acrylamid (0, 18, 36 oder 54 mg/kg KG) per Schlundsonde untersucht. Außerdem wurden die N7-GA-Gua- sowie die N3-GA-Gua-DNA-Adduktlevel nach Acrylamid-Gabe (18 oder 54 mg/kg KG) bestimmt. Eine DNA-schädigende Wirkung wurde mittels Comet-Assay 24 Stunden nach Acrylamid-Gabe in Leukozyten und im Gehirn ab einer Dosis von 36 mg/kg KG und in den Hoden ab einer Dosis von 54 mg/kg KG beobachtet. In der Nebenniere, im Knochenmark und in der Leber kam es 24 Stunden nach Acrylamid-Gabe weder zu einem signifikanten Anstieg des *olive tail moment* (OTM) noch zu einem signifikanten Anstieg des Prozentsatzes der DNA im Kometenschweif. Eine DNA-schädigende Wirkung konnte jedoch zwei bzw. fünf Stunden nach Acrylamid-Gabe (54 mg/kg KG) mittels Comet-Assay in der Nebenniere und im Knochenmark nachgewiesen werden. GA-DNA-Addukte wurden 5, 24, 48 und 72 Stunden nach Acrylamid-Gabe von 18 und 54 mg/kg KG im Gehirn, den Hoden und der Leber quantifiziert. N3-GA-Gua-DNA-Addukte wurden in 50- bis 100-fach geringeren Konzentrationen nachgewiesen als N7-GA-Gua-DNA-Addukte und wiesen eine geringere Halbwertszeit auf (20 - 30 h vs. 50 - 80 h) (Manière *et al.*, 2005).

Von Witt *et al.* (2008) wurden *in vivo* Mikrokern-Tests in peripherem Blut und in Knochenmark von männlichen B6C3F1-Mäusen (n = 5 pro Dosisgruppe) und männlichen F344-Ratten (n = 5 pro Dosisgruppe) nach Acrylamid-Gabe (0, 13, 25, 38 oder 50 mg/kg KG) per Schlundsonde durchgeführt. Bei Mäusen konnten mittels Mikroskopie- und Durchflusszytometrie-basiertem Mikrokern-Test ab einer Acrylamid-Gabe von 25 mg/kg KG eine Erhöhung der Mikrokerne in peripherem Blut und im Knochenmark verglichen zur Kontrolle festgestellt werden. Bei Ratten konnte eine Erhöhung der Mikrokerne nur in peripherem Blut mittels Mikroskopie-basiertem Mikrokern-Test beobachtet werden (Witt *et al.*, 2008).

Manjanatha *et al.* (2006) führte einen *in vivo* Mikrokern-Test in peripherem Blut und einen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*) - Mutationstest in Lymphozyten von *Big Blue* Mäusen (n = 6 - 7 pro Dosisgruppe und Geschlecht) durch. Außerdem isolierten sie die DNA aus der Leber der Tiere zur Bestimmung der Mutationshäufigkeit mittels chronisch lymphatische Leukämie (*cll*) - Mutationstests. Die Untersuchungen erfolgten nach täglicher Gabe von Acrylamid (0, 100 oder 500 mg/l) bzw. Glycidamid (0, 120 oder 600 mg/l) über das Trinkwasser für drei bis vier Wochen. Bei den männlichen Tieren der höchsten Dosisgruppen wurde 24 Stunden nach der letzten Acrylamid- bzw. Glycidamid-Gabe eine Erhöhung der Mikrokern-Retikulozyten um das 3,3- bzw. 1,7-fache festgestellt. Die Anzahl an *HPRT*-Mutanten war 21 Tage nach der letzten Acrylamid- bzw. Glycidamid-Gabe um ein 16- bis 25-faches erhöht. In der höchsten Acrylamid- und Glycidamid-Dosisgruppe wurde außerdem eine Erhöhung der *cll*-Mutationen um ein 2- bis 2,5-faches beobachtet. Eine zusätzlich durchgeführte Molekularanalyse ergab ein vergleichbares Mutationsspektrum für Acrylamid und Glycidamid, was darauf hindeutet, dass die mutagenen Effekte von Acrylamid auf einer metabolischen Aktivierung zu Glycidamid basieren könnten (Manjanatha *et al.*, 2006).

Mutagene Effekte von Acrylamid wurden durch einen Dominant-Letal-Test an Ratten untersucht. Männliche CYP2E1-null- und WT-Mäuse erhielten für fünf Tage Acrylamid i.p. (0, 13, 25 oder 50 mg/kg KG/d) und nach definierten Zeitpunkten erfolgte eine Verpaarung der exponierten männlichen Mäuse mit nicht exponierten weiblichen B6C3F1-Mäusen. Die nicht exponierten weiblichen B6C3F1-Mäuse wurden in der späten Trächtigkeit getötet und der Uterusinhalt wurde untersucht. Nach Verpaarung der nicht exponierten weiblichen B6C3F1-Mäusen mit den exponierten männlichen WT-Mäusen zeigte sich eine dosisabhängig gesteigerte Anzahl an Embryonen mit chromosomalen Anomalien sowie eine geringere Anzahl an trächtigen Mäusen und lebenden Föten. Bei Verpaarung von nicht exponierten weiblichen B6C3F1-Mäusen mit den exponierten männlichen CYP2E1-null-Mäusen wurde keine Veränderung dieser Parameter beobachtet. Eine Cytochrom P450 2E1 vermittelte Reaktion von Acrylamid zu Glycidamid ist somit Voraussetzung für die Mutagenität von Acrylamid (Ghanayem *et al.*, 2005c).

Weitere Studien bestätigen die beschriebenen genotoxischen und mutagenen Effekte von Acrylamid und Glycidamid unter Verwendung verschiedener *in vivo* Tests (Comet-Assay, Mikrokern-Test, Unplanmäßige-DNA-Synthese (UDS) - Test, Genmutationstest und Keimzell-Assay). Die genotoxische Wirkung von Glycidamid wurde ebenfalls durch Nachweis von Glycidamid-DNA-Addukten belegt (Sega *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1991; Butterworth *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1994; Adler *et al.*, 2004; Ghanayem *et al.*, 2005a; Dobrzynska, 2007; von Tungeln *et al.*, 2009; Yener und Dikmenli, 2009; Zeiger *et al.*, 2009; Recio *et al.*, 2010; Rothfuss *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Altaeva *et al.*, 2011; Koyama *et al.*, 2011a; Nixon *et al.*, 2012; Yener, 2013).

2.2.5.6 Kanzerogenität

Die kanzerogene Wirkung von Acrylamid wurde in *in vivo* Versuchen vor allem an Ratten und Mäusen untersucht. Zusätzlich zu den Tierstudien wurden auch einige epidemiologische Studien zur Korrelation der Acrylamid-Exposition mit dem humanen Krebsrisiko durchgeführt.

Johnson *et al.* (1986) führte eine Zwei-Jahres-Studie an F344-Ratten ($n = 90$ pro Dosisgruppe und Geschlecht) mit täglicher Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser (0,0; 0,01; 0,1; 0,5 oder 2,0 mg/kg KG/d) durch. In der höchsten Dosisgruppe wurde bei männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung der Inzidenz von Tumoren des Follikularepithels der Schilddrüse sowie des zentralen Nervensystems beobachtet und ab einer Acrylamid-Gabe von 0,5 mg/kg KG/d eine Erhöhung der Tumorzinzidenz von Skrotalmesothel-Tumoren. Bei weiblichen Tieren war in der höchsten Dosisgruppe die Inzidenz für Tumoren der Brustdrüse, des zentralen Nervensystems, des Follikularepithels der Schilddrüse, der Mundhöhle, der Gebärmutter sowie der Klitorisdrüse erhöht (Johnson *et al.*, 1986). Aus dieser Studie wurde von Doerge *et al.* ein BMDL₁₀ von 0,37 bzw. 0,90 mg/kg KG/d für männliche bzw. weibliche Tiere abgeleitet (Doerge *et al.*, 2008). Die FAO/WHO ermittelte aus dieser Studie außerdem für Tumore der Brustdrüse als niedrigsten BMDL₁₀ einen Wert von 0,30 mg/kg KG/d (FAO/WHO, 2006) und das BfR einen Wert von 0,31 mg/kg KG/d (BfR, 2011).

Eine weitere Zwei-Jahres-Studie an F344-Ratten ($n = 50 - 204$ pro Dosisgruppe) wurde von Friedman *et al.* (1995) durchgeführt. Die Acrylamid-Exposition der männlichen (0,0; 0,1; 0,5 oder 2,0 mg/kg KG/d) und weiblichen (0,0; 1,0 oder 3,0 mg/kg KG/d) Ratten erfolgte täglich über das Trinkwasser. Eine signifikante Erhöhung der Inzidenz wurde für Tumoren des Follikularepithels der Schilddrüse und Adenokarzinome und Fibroadenome der Brustdrüsen bei weiblichen Tieren sowie für Mesotheliome der Hodenhaut und Schilddrüsentumore bei männlichen Tieren festgestellt. Die Tumorzinzidenz war ab einer Acrylamid-Gabe von 1 mg/kg KG/d in der Brustdrüse signifikant erhöht, ab 2 mg/kg KG/d in der Hodenhaut und ab 3 mg/kg KG/d im Follikularepithels der Schilddrüse (Friedman *et al.*, 1995). Doerge *et al.* leiteten aus dieser Studie einen BMDL₁₀ von 0,65 bzw. 0,60 mg/kg KG/d für männliche bzw. weibliche Tiere ab (Doerge *et al.*, 2008). Der von der EFSA aus dieser Studie abgeleitete BMDL₁₀ für Mesotheliome der Hodenhaut von männlichen Tieren lag bei 0,51 mg/kg KG/d (EFSA, 2015a).

In der bereits in Kapitel 2.2.5.2 beschriebenen NTP-Studie über zwei Jahre an F344/N-Ratten wurde nach Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser bei männlichen Tieren in der höchsten Dosisgruppe (2,7 mg/kg KG/d) eine signifikant erhöhte Inzidenz für Nebenhoden- und Hodenhaut-Mesotheliome, Adenome der Langerhans-Inselzellen sowie Karzinome und Adenome des Follikularepithels der Schilddrüse nachgewiesen. Bei weiblichen Tieren wurden Karzinome der Klitorisdrüse, Fibroadenome der Brustdrüse, Papillome und Karzinome der Mundschleimhaut und Zunge, Fibrome, Fibrosarkome und Sarkome der Haut sowie Adenome und Karzinome des Follikularepithels der Schilddrüse festgestellt. Die Inzidenz für Karzinome der Klitorisdrüse war ab einer Acrylamid-Gabe von 0,4 mg/kg KG/d erhöht und die Inzidenz für Fibroadenome der Brustdrüse ab einer Acrylamid-Gabe von 0,9 mg/kg KG/d. Alle anderen neoplastischen Effekte traten erst in der höchsten Dosisgruppe (4,0 mg/kg KG) auf (NTP, 2012). Aus dieser Studie wurde durch das BfR und die FAO/WHO als geringster BMDL₁₀-Wert für Brusttumore bei weiblichen Tieren 0,30 bzw. 0,31 mg/kg KG/d abgeleitet (FAO/WHO, 2006; BfR, 2011). Die EFSA ermittelte aus dieser Studie einen BMDL₁₀ von 0,30 mg/kg KG/d für Brusttumore bei weiblichen Tieren sowie ein

BMDL₁₀ von 1,13 mg/kg KG/d für Nebenhoden- und Hodenhaut-Mesotheliome bei männlichen Tieren (EFSA, 2015a).

Die Zwei-Jahres-NTP-Studie an B6C3F1-Mäusen, welche ebenfalls bereits in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben wurde, ergab für männliche Tiere nach Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser eine erhöhte Inzidenz an Adenomen und Adenokarzinomen der harderschen Drüse, Lungenadenomen und -karzinomen sowie Magen-Plattenepithel-Papillomen und -Karzinomen. Die Adenome und Adenokarzinome der harderschen Drüse waren in allen Dosisgruppen (1,0 - 8,9 mg/kg KG/d) signifikant erhöht. Die Inzidenz der Lungenadenome und -karzinome war nach Acrylamid-Gabe von 2,2 mg/kg KG und 8,9 mg/kg KG/d erhöht und die der Magen-Plattenepithel-Papillome und -Karzinome ab Acrylamid-Gabe von 4,1 mg/kg KG/d. Weibliche B6C3F1-Mäusen wiesen nach Acrylamid-Gabe über das Trinkwasser Adenome der harderschen Drüse, Adenoakanthome und Adenokarzinome der Brustdrüse, Lungenadenome, Hautsarkome, beginnende Eierstockgranulosazelltumore sowie Magen- und Vormagen-Plattenepithel-Papillome auf. Die Inzidenz für Adenome der harderschen Drüse war auch bei weiblichen Tieren in allen Dosisgruppen (1,1 - 10 mg/kg KG/d) signifikant erhöht, für Adenoakanthome und Adenokarzinome der Brustdrüse ab einer Acrylamid-Gabe von 2 mg/kg KG/d, für Lungenadenome und Hautsarkome ab 5 mg/kg KG/d und für beginnende Eierstockgranulosazelltumore und Magen- und Vormagen-Plattenepithel-Papillome nur in der höchsten Dosisgruppe (NTP, 2012). Tumore der harderschen Drüse stellten den sensitivsten Endpunkt dar und wurden von der FAO/WHO, vom BfR sowie von der EFSA zur Berechnung eines BMDL₁₀ herangezogen. Für männliche Tiere ergab sich durch Berechnung der FAO/WHO als geringsten BMDL₁₀ ein Wert von 0,18 mg/kg KG/d (FAO/WHO, 2006) und nach Berechnungen des BfRs ein Wert von 0,16 mg/kg KG/d (BfR, 2011). Der ermittelte BMDL₁₀-Wert der EFSA lag bei 0,17 mg/kg KG/d für männliche Tiere und bei 0,28 mg/kg KG/d für weibliche Tiere. Weitere aus dieser Studie durch die EFSA abgeleitete BMDL₁₀-Werte waren 1,13 mg/kg KG/d für Lungentumore an männlichen Tieren und 1,56 mg/kg KG/d für verschiedenen Sarkomtypen bei weiblichen Tieren (EFSA, 2015a).

Epidemiologische Studien (32 Publikationen) zur Korrelation der Acrylamid-Exposition über die Nahrung und dem Risiko an Krebs zu erkranken, wurde von Pelucchi *et al.* zusammengefasst und einer Meta-Analyse unterzogen. Für die meisten Krebsarten konnte keine Korrelation mit einer acrylamidreichen Ernährung festgestellt werden. Eine schwache Korrelation zeigte sich für Nierenkrebs (relatives Risiko (RR): 1,20) sowie für Gebärmutterkrebs (RR: 1,23) und Eierstockkrebs (RR: 1,39) bei Nichtrauchern (Pelucchi *et al.*, 2015).

Bereits 1994 wurde Acrylamid von der IARC als Kanzerogen der Gruppe 2A d. h. als möglicherweise krebserzeugend beim Menschen eingestuft (IARC, 1994). Dieser Einstufung stimmen auch das *United States Department of Health and Human Services* sowie die *United States Environmental Protection Agency* (US-EPA) zu, die Acrylamid ebenfalls als wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen klassifizierten (US-EPA, 2010; NTP, 2011). Dies entspricht auch der Einordnung in die Kategorie 1B nach der europäischen Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (Verordnung (EU) Nr. 366/2011). Von der „Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“ (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurde Acrylamid in Kategorie 2 eingeordnet, welche Stoffe umfasst für die experimentellen Daten aus dem

Tierversuch vorliegen und die als krebserzeugend beim Menschen angesehen werden (MAK-Kommission, 2012b).

2.2.6 Expositionsabschätzung

2.2.6.1 Expositionsabschätzung mittels Umweltmonitoring

Mittels Umweltmonitoring ist eine Abschätzung der Acrylamid-Exposition aus verschiedenen Expositionsquellen möglich. Hierzu werden die Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln, Tabakrauch oder Raumluft ermittelt, welche dann zur Expositionsabschätzung verwendet werden.

Exposition durch Lebensmittel

Die Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln sind in Kapitel 2.2.3 in Tabelle 1 zusammengefasst. Eine erste Abschätzung der täglichen Acrylamid-Exposition durch Lebensmittel in Industrieländern erfolgte im Jahr 2002 durch die FAO/WHO und ergab eine geschätzte tägliche alimentäre Acrylamid-Exposition von 0,3 - 0,8 µg/kg KG (FAO/WHO, 2002). Die folgende Einschätzung der FAO/WHO fand im Jahr 2006 statt und es wurde eine Acrylamid-Exposition der allgemeinen Bevölkerung durch Lebensmittel von 1 µg/kg KG/d abgeschätzt. Die Acrylamid-Exposition der Verbraucher mit hoher Acrylamid-Aufnahme durch Lebensmittel lag dabei bei 4 µg/kg KG/d (FAO/WHO, 2006). Bis zum Jahr 2011 konnte die FAO/WHO zwar eine Reduktion der Acrylamid-Exposition von einigen Bevölkerungsuntergruppen feststellen, dennoch blieben sowohl die durchschnittliche tägliche alimentäre Acrylamid-Exposition der allgemeinen Bevölkerung als auch die der Verbraucher mit hoher Acrylamid-Aufnahme durch Lebensmittel konstant (FAO/WHO, 2011). Ebenfalls verfasste das BfR im Jahr 2011 eine Stellungnahme zu Acrylamid in der eine durchschnittliche tägliche Acrylamid-Exposition in Europa von 0,14 µg/kg KG ermittelt wurde und das 95. Perzentil der Exposition bei 0,39 µg/kg KG lag (BfR, 2011). Die im selben Jahr erfolgte Abschätzung durch die EFSA ergab eine Acrylamid-Exposition von 0,34 µg/kg KG/d bzw. 0,83 µg/kg KG/d (EFSA, 2011). Eine erneute Abschätzung durch die EFSA im Jahr 2015 ergab eine mittlere tägliche Acrylamid-Exposition von 0,4 - 1,9 µg/kg KG und ein 95. Perzentil der Exposition von 0,6 - 3,4 µg/kg KG. Die Acrylamid-Aufnahme von Säuglingen, Kleinkindern und andere Kindern lag bei dieser Abschätzung mit einer mittleren Aufnahme von 0,5 - 1,9 µg/kg KG und einem 95. Perzentil von 1,4 - 3,4 µg/kg KG über der von Jugendlichen, Erwachsenen, alten und sehr alten Menschen, deren mittlere Acrylamid-Aufnahme bei 0,4 - 0,9 µg/kg KG und deren 95. Perzentil der Acrylamid-Aufnahme bei 0,6 - 2,0 µg/kg KG lag. Je nach Personengruppe wurden unterschiedliche Lebensmittel identifiziert, die zur Acrylamid-Exposition beitragen. Bei Säuglingen war dies besonders Babynahrung. Kleinkinder, ältere Kinder, Jugendliche, Erwachsene, alte und sehr alte Menschen nahmen das meiste Acrylamid durch die Produktgruppe „frittierte und gebratene Kartoffelprodukte (ausgenommen Kartoffelchips und Snacks)“ auf. Außerdem stellten Brot, Frühstückscerealien, Kekse, Kräcker und Knäckebrot sowie andere cerealienbasierte und kartoffelbasierte Produkte weitere Acrylamid-Quellen dar. Bei Erwachsene erfolgte die Acrylamid-Aufnahme zusätzlich über Kaffee. Um den Einfluss von spezifischem Verhalten wie Markentreue und Zubereitungsart zu überprüfen, wurde von der EFSA eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Bei Kartoffelchips führte Markentreue zu einer Abweichung von der abgeschätzten Acrylamid-Exposition von weniger als 4 % und bei Kaffee zu einer Abweichung von weniger als 14 %. Die Abweichung von der abgeschätzten Acrylamid-Exposition durch die Zubereitungsart, lag beim Toasten von Brot bei weniger als

8 %. Der Zubereitungsprozess des Frittieren bzw. Anbratens von Kartoffeln im Haushalt (*home cooking*) führte zu einer Abweichung von der abgeschätzte Acrylamid-Exposition von bis zu 80 % (EFSA, 2015a).

Exposition durch Tabakrauch

Neben der Acrylamid-Exposition über Lebensmittel erfolgt eine Acrylamid-Aufnahme vor allem durch das Rauchen von Zigaretten und anderen Tabakprodukten. In Tabak von Zigaretten lag der Acrylamid-Gehalt bei 50 - 120 ng/g und in Tabak aus anderen Tabakprodukten bei 46 - 367 ng/g. Im Hauptstrom des Zigarettenrauchs wurden 497 - 8019 ng Acrylamid pro Zigarette quantifiziert (Moldoveanu und Gerardi, 2011). Eine Expositionsabschätzung durch die Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) der DFG ergab bei starken Rauchern (20 Zigaretten/d) eine zusätzliche Acrylamid-Exposition von 40 µg/d (SKLM, 2012), was bei einem Körpergewicht von 60 kg 0,7 µg/kg KG entspricht.

Exposition am Arbeitsplatz

Bei Arbeitern, die Acrylamid oder Polyacrylamid verarbeiten, kommt es zusätzlich zu einer Acrylamid-Exposition am Arbeitsplatz. Von Manson *et al.* (2005) wurde eine Arbeitsplatzkonzentration (geometrisches Mittel) von 0,09 - 0,13 mg/m³ während der Produktion von Acrylamid und von 0,01 - 0,02 mg/m³ während der Produktion von Polyacrylamid ermittelt. Daraus ergab sich bei einer Annahme von einem achtstündigen Arbeitstag, einem Inhalationsvolumen von 10 m³/Arbeitstag und einem Körpergewicht von 70 kg eine mittlere tägliche Aufnahme von 1,4 - 18,6 µg/kg KG. Unter Verwendung des zulässigen Grenzwertes für die Exposition am Arbeitsplatz von 0,3 mg/m³ ergab sich eine tägliche Exposition von 43 µg/kg KG (Manson *et al.*, 2005).

2.2.6.2 Expositionsabschätzung mittels Humanbiomonitoring

Humanbiomonitoring ermöglicht eine Abschätzung der gesamten Acrylamid-Exposition. Es kann jedoch nicht zwischen den verschiedenen Expositionsquellen unterschieden werden. Eine endogene Exposition wird miterfasst.

Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukte im Blut stellen Expositionsbiomarker einer Langzeitexposition mit Acrylamid dar (siehe Kapitel 2.2.4.2, S. 21 f.). Die Mercaptursäuren AAMA und GAMA, welche in Urin bestimmt werden können, sind Expositionsbiomarker der Kurzzeitexposition (siehe Kapitel 2.2.4.2, S. 20 f.). Glycidamid-DNA-Addukte, wie das N7-GA-Gua-DNA-Addukt, können als Biomarker einer mittelfristigen Acrylamid-Exposition angesehen werden (siehe Kapitel 2.2.4.2, S. 22 f.) (EFSA, 2015a).

Hämoglobin-Addukte als Expositionsbiomarker

Die Untersuchung von Acrylamid-Hämoglobin-Addukten als Expositionsbiomarker lieferte im Jahr 1997 die ersten Hinweise auf eine konstant vorhandene Acrylamid-Exposition der Bevölkerung. Bestimmt wurden die Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Level von 40 Probanden, bei denen es sich um Laborarbeiter, die mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) arbeiteten sowie um Raucher und Nichtraucher aus der allgemeinen Bevölkerung handelte. Für die Laborarbeiter ergaben sich mittlere Gehalte an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten von 54 pmol/g Hämoglobin verglichen zu 116 pmol/g

Hämoglobin bei Rauchern. Die Gehalte an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten von Nichtrauchern waren mit 31 pmol/g Hämoglobin höher als erwartet und wies auf eine bis dahin nicht bekannte Acrylamid-Belastung der allgemeinen Bevölkerung hin (Bergmark, 1997).

Eine Korrelation der Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Gehalte von Nichtrauchern (n = 70) und Rauchern (n = 72) und der abgeschätzten Acrylamid-Exposition über die Nahrung wurde in einer Humanstudie von Hagmer *et al.* (2005) untersucht. Zur retrospektiven Abschätzung der Acrylamid-Exposition wurden Fragebögen, die den Zeitraum von einem Jahr umfassten, und Ernährungsprotokollen, die einen Zeitraum von sieben Tage umfassten, verwendet. Der Gehalt an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten lag für Nichtraucher im Mittel bei 31 pmol/g Hämoglobin und reichte von 20 bis 100 pmol/g Hämoglobin. Bei Rauchern wurden mittlere Gehalte von 152 pmol/g Hämoglobin mit einem minimalen und maximalen Gehalt von 30 bzw. 430 pmol/g Hämoglobin ermittelt. Es wurde ein signifikanter Unterschied ($p = 0,04$) zwischen den Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Gehalten von männlichen Nichtrauchern mit geringer und hoher abgeschätzter Acrylamid-Exposition über die Nahrung festgestellt. Ebenfalls ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) zwischen den Acrylamid-Hämoglobin-Addukt-Gehalten von weiblichen Rauchern mit geringer und hoher abgeschätzter Acrylamid-Exposition über die Nahrung (Hagmar *et al.*, 2005). Einige weitere Studien zeigten ebenfalls eine schwache (Kütting *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2013) bis deutliche (Wirfält *et al.*, 2008) Korrelation zwischen der Konzentration an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten und der abgeschätzten Acrylamid-Exposition über die Nahrung. Von Ferrari *et al.* wurde auch eine Korrelation zwischen den Gehalten an Glycidamid-Hämoglobin-Addukten und der Acrylamid-Exposition über die Nahrung, welche anhand von verschiedenen nicht standardisierten Fragebögen sowie unter Verwendung einer standardisierten 24-h-Recall-Methode abgeschätzt wurde, festgestellt (Ferrari *et al.*, 2013). Ebenfalls konnte eine Korrelation der Gehalte an Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobin-Addukten mit dem Verzehr von einzelnen Acrylamid-haltigen Lebensmittel wie frittierten Kartoffelprodukten, Backwaren oder Kaffee gezeigt werden. Die Verzehrsmengen wurden retrospektiv mittels Fragebögen, die einen Zeitraum von einem Jahr umfassten, ermittelt (Bjellaas *et al.*, 2007a; Outzen *et al.*, 2011).

Mercaptursäuren als Expositionsbiomarker

Unter Verwendung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Biomarkern war es möglich zu zeigen, dass die wichtigsten Acrylamid-Expositionsquellen Tabakkonsum, die Ernährung und die arbeitsbedingte Exposition sind. Eine Übersicht über die Studien, bei denen AAMA als Biomarker verwendet wurde, gibt Tabelle 3. Analog sind die Ergebnisse zu Studien, bei denen GAMA als Biomarker verwendet wurde, in Tabelle 4 dargestellt.

Diverse Biomarkerstudien an Nichtrauchern und Raucher zeigten, dass Raucher deutlich mehr AAMA und GAMA ausscheiden als Nichtraucher. Die mittlere AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern lag bei 93 - 225 nmol/l bzw. 0,13 - 0,32 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und die von Rauchern bei 277 - 1438 nmol/l bzw. 0,18 - 0,76 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin. Die ermittelte mittlere GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern war 12 - 68 nmol/l bzw. 0,02 - 0,09 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und die von Rauchern 36 - 444 nmol/l bzw. 0,03 - 0,16 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Bjellaas *et al.*, 2005; Boettcher *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Bjellaas *et al.*, 2007b; Huang *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2008; Schettgen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014).

Tabelle 3: Humanstudien zur AAMA-Ausscheidung, (1) AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern, (2) AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern vs. Rauchern, (3) AAMA-Ausscheidung nach alimentärer Acrylamid-Aufnahmen, (4) AAMA-Ausscheidung nach arbeitsbedingter Acrylamid-Exposition, (5) AAMA-Ausscheidung von Kindern und Jugendlichen

Personengruppe	n	AAMA - Mittelwert/Median (min - max)		Literatur
		[nmol/l]	[μ mol/g Kreatinin]	
(1) Nichtraucher	91	124 [□] (< LOD - 977)	0,13 [□] (< LOD - 0,59)	(Hartmann <i>et al.</i> , 2008)
Nichtraucher	6	102 [□] (34 - 341)	0,17 [□] (0,06 - 0,38)	(Kopp <i>et al.</i> , 2008)
(2) Nichtraucher	405	93*		(Lee <i>et al.</i> , 2014)
Ehemalige Raucher	230	120*		
Raucher	1238	227*		
Nichtraucher	14	225 [□] (54 - 729)	0,24 [□] (0,04 - 0,73)	(Schettgen <i>et al.</i> , 2008)
Raucher	14	1036 [□] (129 - 1908)	0,76 [□] (0,15 - 1,71)	
Nichtraucher	47	137 [□] (9 - 1310)		(Bjellaas <i>et al.</i> , 2007b)
Raucher	6	785 [□] (102 - 2373)		
Nichtraucher	33	478 [□]	0,29 [□]	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
Raucher	30	651 [□]	0,42 [□]	
Nichtraucher	76	124 [□] (43 - 760)	0,22 [□] (0,08 - 0,45)	(Bjellaas <i>et al.</i> , 2005)
Raucher	11	1438 [□] (273 - 2134)	0,64 [□] (0,49 - 0,79)	
Nichtraucher	16	124 [□] (13 - 354)		(Boettcher <i>et al.</i> , 2005)
Raucher	13	542 [□] (73 - 1443)		
Nichtraucher	33	482*	0,32*	(Li <i>et al.</i> , 2005)
Raucher	37	679*	0,58*	
(3) Nichtraucher + Raucher + Diät (24 h) ¹	110	176*	0,24*	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Nichtraucher + Raucher + Diät (24 h) ¹	19		0,24* ($C_{predose}$)	
+ Chips ²	19		1,53* (C_{max})	
Nichtraucher + Fasten (11 h)	13	207 [□] ($C_{predose}$)	0,08* ($C_{predose}$)	(Watzek <i>et al.</i> , 2012b)
+ Chips (938 μ g AA) ³	13	3378 [□] (C_{max})	1,16* (C_{max})	
+ Fasten (11 h)	5		0,05* ($C_{predose}$)	
+ Chips (44 μ g AA) ⁴	5		0,16* (C_{max})	
Nichtraucher	13	111 [□] (60 - 435)	0,16 [□] (0,06 - 90,42)	(Kellert <i>et al.</i> , 2006)
Raucher	13	1208 [□] (260 - 3014)	0,70 [□] (0,34 - 1,52)	
Raucher (gelegentlich)	12	239 [□] (68 - 2689)	0,18 [□] (0,14 - 1,73)	
Nichtraucher + Lebkuchen (123 μ g AA)	3	4286 [□] (C_{max})	1,71 [□] (C_{max})	
(4) Nichtraucher + Raucher				(Huang <i>et al.</i> , 2011)
AA-exponierte Arbeiter	51	2976* (< LOD - 1589650)	2,91* (< LOD - 492,15)	
Verwaltungsangestellte	34	355* (< LOD - 5473)	0,46* (< LOD - 2,82)	
(5) Kinder	417	169* (σ) / 171* (φ)		(Jain, 2015b)
Jugendliche	195		0,28* (0,08 - 3,13)	(Brisson <i>et al.</i> , 2014)
Kinder	39	291 [□] (66 - 838)	0,36 [□] (0,09 - 0,90)	(Ji <i>et al.</i> , 2013)
Kinder	110	153 [□] (na - 5230)	0,25 [□] (na - 4,32)	(Heudorf <i>et al.</i> , 2009)

AA: Acrylamid, AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein, C_{max} : maximale Konzentration, $C_{predose}$: Ausgangskonzentration vor Chipsverzehr, LOD: Nachweisgrenze, n: Anzahl der Probanden, na: nicht angegeben, *Mittelwert, [□]Median, ¹Verzicht auf frittierte und gebackene Lebensmittel, ²Acrylamid-Aufnahme: 12,6 μ g/kg KG, ³Acrylamid-Aufnahme: 14,8 μ g/kg KG, ⁴Acrylamid-Aufnahme: 0,6 μ g/kg KG, AAMA-Konzentrationen in μ g/l bzw. μ g/g Kreatinin wurden unter Verwendung der molaren Masse von AAMA (234,27 g/mol) in nmol/l bzw. μ mol/g Kreatinin umgerechnet.

Tabelle 4: Humanstudien zur GAMA-Ausscheidung, (1) GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern, (2) GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern vs. Rauchern, (3) GAMA-Ausscheidung nach alimentärer Acrylamid-Aufnahmen, (4) GAMA-Ausscheidung nach arbeitsbedingter Acrylamid-Exposition, (5) GAMA-Ausscheidung von Kindern und Jugendlichen

Personengruppe	n	GAMA - Mittelwert/Median (min - max)		Literatur
		[nmol/l]	[μ mol/g Kreatinin]	
(1) Nichtraucher	91	28 [□] (< LOD - 340)	0,04 [□] (< LOD - 0,15)	(Hartmann <i>et al.</i> , 2008)
Nichtraucher	6	16 [□] (4 - 96)	0,03 [□] (0,01 - 0,05)	(Kopp <i>et al.</i> , 2008)
(2) Nichtraucher	47	12 [□] (< LOQ - 68)		(Bjellaas <i>et al.</i> , 2007b)
Raucher	6	435 [□] (< LOQ - 180)		
Nichtraucher	76	68 [□] (0 - 571)	0,09 [□] (0 - 0,39)	(Bjellaas <i>et al.</i> , 2005)
Raucher	11	444 [□] (0 - 1051)	0,16 [□] (0 - 0,43)	
Nichtraucher	16	20 [□] (< LOD - 56)		(Boettcher <i>et al.</i> , 2005)
Raucher	13	76 [□] (12 - 180)		
(3) Nichtraucher + Raucher + Diät (24 h) ¹	110	39*	0,05*	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Nichtraucher + Raucher + Diät (24 h) ¹	19		0,04* ($c_{predose}$)	
+ Chips ¹	19		0,14* (c_{max})	
Nichtraucher + Fasten (11 h)	13	39 [□] ($c_{predose}$)	0,02* ($c_{predose}$)	(Watzek <i>et al.</i> , 2012b)
+ Chips (938 μ g AA) ²	13	324 [□] (c_{max})	0,08* (c_{max})	
+ Fasten (11 h)	5		0,02* ($c_{predose}$)	
+ Chips (44 μ g AA) ³	5		0,03* (c_{max})	
Nichtraucher	13	12 [□] (4 - 44)	0,02 [□] (0,01 - 0,03)	(Kellert <i>et al.</i> , 2006)
Raucher	13	80 [□] (20 - 216)	0,05 [□] (0,03 - 0,09)	
Raucher (gelegentlich)	12	36 [□] (12 - 56)	0,03 [□] (0,01 - 0,06)	
Nichtraucher + Lebkuchen (123 μ g AA)	3	39 [□] (c_{max})	0,06 [□] (c_{max})	
(4) Nichtraucher + Raucher AA-exponierte Arbeiter	51	531* (< LOD - 22703)	0,40* (< LOD - 7,03)	(Huang <i>et al.</i> , 2011)
(5) Kinder	417	59* (σ) / 61* (φ)		(Jain, 2015b)
Jugendliche	195		0,03* (0,02 - 0,17)	(Brisson <i>et al.</i> , 2014)
Kinder	110	54 [□] (na - 360)	0,09 [□] (na - 0,31)	(Heudorf <i>et al.</i> , 2009)

AA: Acrylamid, c_{max} : maximale Konzentration, $c_{predose}$: Ausgangskonzentration vor Chipsverzehr, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, LOD: Nachweisgrenze, LOQ: Bestimmungsgrenze, n: Anzahl der Probanden, na: nicht angegeben, *Mittelwert, [□]Median, ¹Verzicht auf frittierte und gebackene Lebensmittel, ²Acrylamid-Aufnahme: 12,6 μ g/kg KG, ³Acrylamid-Aufnahme: 14,8 μ g/kg KG, ⁴Acrylamid-Aufnahme: 0,6 μ g/kg KG, GAMA-Konzentrationen in μ g/l bzw. μ g/g Kreatinin wurden unter Verwendung der molaren Masse von GAMA (250,27 g/mol) in nmol/l bzw. μ mol/g Kreatinin umgerechnet.

Studien zur Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit der Acrylamid-Aufnahme über Lebensmittel zeigten nach dem Verzehr von Kartoffelchips oder Lebkuchen einen Anstieg der AAMA- und GAMA-Konzentration im Urin. Nach 11-stündiger Fastenzeit wurde an fünf Probanden eine mittlere AAMA-Konzentration von 0,05 μ mol/g Kreatinin ermittelt. Diese stieg nach Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips, welcher mit einer Acrylamid-Aufnahme von 44 μ g (\emptyset : 0,6 μ g/kg KG) verbunden war, auf 0,16 μ mol/g Kreatinin. Die GAMA-Konzentration lag nach 11-stündiger Fastenzeit bei 0,02 μ mol/g Kreatinin und stieg nach dem Verzehr der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips auf 0,03 μ mol/g Kreatinin. Ebenfalls nach 11-stündigem Fasten wurden von 13 Probanden selbst hergestellten Kartoffelchips verzehrt, was mit einer Acrylamid-Aufnahme von 938 μ g (\emptyset : 14,8 μ g/kg KG)

verbunden war. Die mittlere AAMA-Ausscheidung der Probanden stieg von 0,08 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin auf 1,16 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und die mittlere GAMA-Ausscheidung von 0,02 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin auf 0,08 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Watzek *et al.*, 2012b). Der Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurde in einer weiteren Humanstudie an 19 Probanden nach 24-stündigem Verzicht auf gebackene und frittierte Lebensmittel untersucht. Der Verzehr der Kartoffelchips ging einher mit einer mittleren Acrylamid-Aufnahme von 12,6 $\mu\text{g/kg KG}$ und resultierte in einer mittleren maximalen AAMA-Ausscheidung von 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und einer mittleren maximalen GAMA-Ausscheidung von 0,14 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin. Ebenfalls wurden AAMA-SO und *iso*-GAMA im Urin der Probanden bestimmt. Die maximale Ausscheidung dieser beiden Metaboliten lag im Mittel bei 0,32 und 0,05 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Wang *et al.*, 2016). In einer Humanstudie mit drei Probanden wurde die AAMA- und GAMA-Ausscheidung nach Verzehr von 167 g Lebkuchen mit einem Acrylamid-Gehalt von 735 $\mu\text{g/kg}$ (Acrylamid-Aufnahme: 123 μg) untersucht. Die maximale AAMA-Ausscheidung lag nach dem Verzehr der Lebkuchen bei 1,71 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und die maximale GAMA-Ausscheidung bei 0,06 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Kellert *et al.*, 2006).

Durch die Bestimmung der Mercaptursäuren als Biomarker ist es nicht nur möglich die Exposition von verschiedenen Bevölkerungsgruppen zu vergleichen, in Zusammenhang mit den täglichen Aufnahmemengen kann über die Mercaptursäure-Ausscheidung auch die Acrylamid-Exposition abgeschätzt werden. Sowohl Ji *et al.* (2005) als auch Heudorf *et al.* (2009) nutzen diesen Ansatz. Die Studie von Ji *et al.* umfasst ein Kollektiv von 39 Kindern im Alter von 10 bis 13 Jahren, die im Median eine AAMA-Ausscheidung von 84 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (0,36 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) aufwiesen. Aus dieser ergab sich im Median eine tägliche Acrylamid-Aufnahme von 1,04 $\mu\text{g/kg KG}$. Das 95. Perzentil der Acrylamid-Aufnahme lag bei 2,47 $\mu\text{g/kg KG}$ (Ji *et al.*, 2013). In der Studie von Heudorf *et al.* mit 110 Kindern im Alter von 5 bis 6 Jahren resultierte aus dem Median der AAMA- und GAMA-Ausscheidung von 59 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (0,25 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und 22 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (0,09 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) eine tägliche Acrylamid-Aufnahme von 0,88 $\mu\text{g/kg KG}$. Das entsprechend berechnete 95. Perzentil der täglichen Acrylamid-Aufnahme lag bei 2,27 $\mu\text{g/kg KG}$. Unter Verwendung eines Volumen-basierten Ansatzes ergab sich aus dem Median der AAMA-Ausscheidung von 36 $\mu\text{g/l}$ (153 nmol/l) sowie dem der GAMA-Ausscheidung von 13 $\mu\text{g/l}$ (54 nmol/l) eine tägliche Acrylamid-Exposition von 0,54 $\mu\text{g/kg KG}$. Die analog ermittelte Acrylamid-Exposition des 95. Perzentils lag bei 1,91 $\mu\text{g/kg KG}$ (Heudorf *et al.*, 2009).

In der Studie von Heudorf *et al.* (2009) konnte außerdem eine Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit dem Verzehr von Pommes frites, Kartoffelchips, anderen frittierten Kartoffelprodukten sowie Keksen beobachtet werden (Heudorf *et al.*, 2009). Eine derartige Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit dem Verzehr von Acrylamid-haltigen Lebensmitteln oder mit der abgeschätzten Acrylamid-Aufnahme konnte auch in einigen weiteren Studien bestätigt werden (Brantsæter *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2013; Brisson *et al.*, 2014).

DNA-Addukte als Expositionsbiomarker

Im Jahr 2015 konnte das DNA-Addukt N7-GA-Gua erstmals im Humanurin von Nichtrauchern ($n = 33$) und Rauchern ($n = 30$) nachgewiesen werden. Bei Nichtrauchern lag der Gehalt im Median bei 0,93 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin und bei Rauchern bei 1,41 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (Huang *et al.*, 2015).

2.2.7 Risikocharakterisierung und Risikomanagement

Für Substanzen, die sowohl genotoxisch als auch kanzerogen sind, wird zur Risikocharakterisierung ein MOE ausgehend von einem im Tierversuch ermittelten toxischen Endpunkt und der abgeschätzten Exposition ermittelt (siehe Kapitel 2.1.1). Zur Ableitung des MOEs von Acrylamid wurde für neoplastische Effekte als Referenzwert ein BMDL₁₀-Wert von 0,17 mg/kg KG/d für Adenome und Adenokarzinome der harderschen Drüse von männlichen B6C3F1-Mäusen nach Exposition mit Acrylamid über das Trinkwasser für zwei Jahre verwendet. Für Personen mit mittlerer Acrylamid-Exposition (0,4 - 1,9 µg/kg KG/d) ergab sich ein MOE von 425 bis 89 und für das 95. Perzentil (0,6 - 3,4 µg/kg KG/d) ein MOE von 283 bis 50 (EFSA, 2015a). Für Substanzen, die genotoxisch sowie kanzerogen sind, wird bei einem MOE von mehr als 10.000 von einem geringen Risiko ausgegangen. Je weiter der MOE unter 10.000 liegt, desto größer wird das Risiko und desto größer wird die Priorität für das Risikomanagement Minimierungsmaßnahmen einzuleiten (BfR, 2005; EFSA, 2005). Acrylamid wies für neoplastische Effekte einen MOE deutlich unter 10.000 auf und ist entsprechend eine Substanz mit hoher Priorität für das Risikomanagement.

Die EFSA berechnete ebenfalls einen MOE für nicht neoplastische Effekte. Als Endpunkt wurde Axonverlust bei männlichen F344-Ratten nach Exposition mit Acrylamid über das Trinkwasser für zwei Jahre herangezogen und ein BMDL₁₀ von 0,43 mg/kg KG/d zugrunde gelegt. Bei mittlere Acrylamid-Exposition (0,4 - 1,9 µg/kg KG/d) ergaben sich ein MOE von 1075 bis 226 und für das 95. Perzentil (0,6 - 3,4 µg/kg KG/d) ein MOE von 717 bis 126. Für nicht-genotoxische Endpunkte wird von der EFSA bei einem MOE größer als 100 angenommen, dass kein Gesundheitsrisiko besteht. Die berechneten MOE-Werte für Acrylamid zeigen somit, dass bei der momentanen Acrylamid-Exposition nicht von einem Gesundheitsrisiko bezogen auf nicht-neoplastische Effekte auszugehen ist. Die EFSA merkte jedoch an, dass die MOEs des 95. Perzentils für Kleinkinder und andere Kinder nah an dem MOE-Wert liegen, der mit einem Gesundheitsrisiko verbunden sein kann (EFSA, 2015a).

Im Rahmen des Risikomanagements findet für Acrylamid, einen genotoxischen und kanzerogenen Stoff für den es keine Dosis ohne Wirkung gibt, das ALARA-Prinzip Anwendung. Dieses besagt, dass der Gehalt der Substanz im Lebensmittel, soweit minimiert werden soll wie es vernünftigerweise erreichbar ist (BfR, 2005). Ein wichtiges Instrument mit Ansatzpunkten und Maßnahmen zur Reduktion von Acrylamid stellt die Acrylamid-Toolbox des Ernährungsverbandes FoodDrinkEurope dar. Die Toolbox wurde zusammen mit Lebensmittelherstellern in Zusammenarbeit mit nationalen Behörden der Europäischen Union entwickelt und umfasst ausführliche Informationen zur Reduktion des Acrylamid-Gehaltes in Keksen, Brot, Frühstückscerealien, Kartoffelchips und Pommes frites (FoodDrinkEurope, 2014).

Zum Risikomanagement von Acrylamid gibt es wenige gesetzliche Regelungen sowie einige nationale und internationale Empfehlungen. Für Trinkwasser gilt ein Grenzwert von 0,1 mg/l (98/83/EG). In Kosmetikprodukten ist Acrylamid selbst nicht zugelassen und für Polyacrylamid liegt der erlaubte Restacrylamid-Gehalt bei 0,1 mg/kg für Produkte, die auf dem Körper verbleiben, und bei 0,5 mg/kg für andere Kosmetikprodukte (Verordnung (EG) Nr. 1223/2009). In Lebensmittelkontaktmaterialien darf Acrylamid nicht in detektierbaren Mengen migrieren, wobei der LOD bei 0,01 mg/kg Lebensmittel liegt (Verordnung (EU) Nr. 10/2011).

Seit 2002 gibt es in Deutschland ein Acrylamid-Minimierungskonzept, welches auf einem Signalwertprinzip basiert. Hierzu werden Lebensmittelkategorien gebildet und die 10 % der am meisten belasteten Lebensmittel der Kategorie bestimmt. Von diesen wird der geringste ermittelte Acrylamid-Gehalt als Signalwert gesetzt. Überschreitet dieser Wert 1000 µg/kg wird der Signalwert 1000 µg/kg gesetzt. Die Signalwerte sind keine rechtsverbindlichen Grenzwerte. Für Lebensmittel, die den Signalwert überschreiten, soll dennoch eine Acrylamid-Minimierung angestrebt werden (Göbel und Kliemant, 2007). Einige Signalwerte aus der letzten Signalwertberechnung sind in Tabelle 5 gegeben (BVL, 2010). Im Jahr 2007 gab es erstmals eine Empfehlung der Kommission der europäischen Gemeinschaften, die dazu aufgerufen hat, die Acrylamid-Gehalte von Lebensmitteln, die bekannterweise hohe Acrylamid-Gehalte aufweisen, zu überwachen und die Daten an die EFSA zu übermitteln (2007/331/EG). Im Jahr 2011 wurden aus diesen Daten erstmals Richtwerte (*indicative values*) für Acrylamid abgeleitet und in einer weiteren Empfehlung der europäischen Kommission veröffentlicht (Europäische Kommission, 2011). Eine Aktualisierung der EU-Richtwerte erfolgte im Jahr 2013 durch einer weiteren Empfehlung der europäischen Kommission (2013/647/EU) sowie im Jahr 2017 durch eine EU-Verordnung (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158). Die EU-Verordnung legt fest, dass eine Reduktion der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln durch Minimierungsmaßnahmen erfolgen soll und dass die Wirksamkeit dieser Maßnahmen durch Probenahmen und Analysen überprüft werden soll. Die Richtwerte dienen als Leistungsindikatoren zur Überprüfung der Wirksamkeit der Minimierungsmaßnahmen (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158). In Tabelle 5 sind die europäischen Richtwerte für Acrylamid in einigen Lebensmitteln im Vergleich zu den deutschen Signalwerten angegeben.

Tabelle 5: Deutsche Signalwerte (BVL, 2010) und europäische Richtwerte (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158) für Acrylamid in Frühstückscerealien, Kartoffelchips, Gebäck, Knäckebrötchen, Lebkuchen, Pommes frites, Röstkaffee und weichem Brot

Lebensmittel	Signalwert [µg/kg]	Richtwert [µg/kg]
Frühstückscerealien	260	150 - 300
Kartoffelchips	790	750
Gebäck ¹	260	350
Knäckebrötchen	480	350
Lebkuchen	1000	800
Pommes frites	530	500
Röstkaffee	280	400
Weiches Brot	-	50 - 100

¹Feine Backwaren aus Mürbeteig (BVL, 2010) bzw. Kekse und Waffeln (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158)

2.3 Acrolein

2.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Acrolein (Prop-2-enal, CAS: 107-02-8) besitzt die Summenformel C_3H_4O und weist ein Molekulargewicht von 56,06 g/mol auf. Mit einem Siedepunkt von 52 °C liegt Acrolein bei Raumtemperatur als farblose bis gelbliche Flüssigkeit mit stechendem Geruch vor. Es ist in Wasser gut löslich (SKLM, 2012; IFA, 2017). Wie auch Acrylamid zählt Acrolein zu den α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Es ist reaktiver als Acrylamid und stellt einen noch stärkeren Michael-Adduktbildner dar (LoPachin und Gavin, 2008; LoPachin und Gavin, 2012).

2.3.2 Bildung

2.3.2.1 Industrielle Synthese

Herstellung aus Formaldehyd und Acetaldehyd

Die industrielle Herstellung von Acrolein begann in Deutschland im Jahr 1942. Das damals angewandte Verfahren basierte auf der Aldolkondensation von Formaldehyd und Acetaldehyd (IARC, 1995). Wie in Abbildung 15 dargestellt, führt die Additionsreaktion von Formaldehyd und Acetaldehyd zu einer Aldol-Verbindung, aus der durch Wasserabspaltung Acrolein gebildet werden kann (Umano und Shibamoto, 1987).

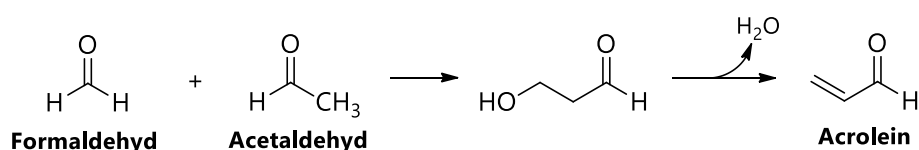


Abbildung 15: Herstellung von Acrolein aus Formaldehyd und Acetaldehyd [erstellt nach (Umano und Shibamoto, 1987)]

Herstellung aus Propen

Ein moderneres industrielles Herstellungsverfahren für Acrolein stellt das SOHIO-Verfahren dar. Wie in Abbildung 16 dargestellt erfolgt eine katalysierte Oxidation von Propen zu Acrolein. Als Katalysoren werden Bismut-Molybdän-Verbindungen sowie Metalloxide verwendet (IARC, 1995; Limberg, 2006).

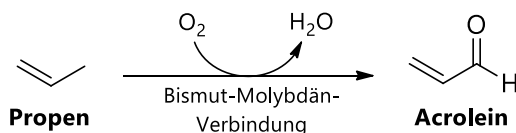


Abbildung 16: Herstellung von Acrolein aus Propen [modifiziert nach (Limberg, 2006)]

2.3.2.2 Exogene Bildung

Neben der industriellen Synthese entsteht Acrolein auch als Nebenprodukt von Verbrennungsprozessen. Acrolein ist ein Hauptbestandteil von Tabak- und Feuerrauch sowie von Autoabgasen (IARC, 1995). Ebenfalls führen Erhitzungsprozesse bei Lebensmitteln, insbesondere in Fetten und Ölen, zur Acrolein-Bildung (Ewert *et al.*, 2011; Granvogel, 2014). Eine exogene Acrolein-Bildung ist ausgehend von Triacylglyceriden, Kohlenhydraten sowie Aminosäuren beschrieben.

Bildung aus Triacylglyceriden

Zur Bildung von Acrolein aus Triacylglyceriden existieren verschiedene Studien, in denen die Acrolein-Freisetzung nach Erhitzen von Ölen und Fetten untersucht wurde (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Als möglicher Bildungsweg wird die Bildung von Acrolein aus dem Glycerin-Grundgerüst sowie aus den Fettsäureresten von Triacylglyceriden diskutiert.

Postulierte Bildungsmechanismen aus dem Glycerin-Grundgerüst sind in Abbildung 17 dargestellt. Ein möglicher Bildungsweg geht von einer Abspaltung der Fettsäuren durch Hydrolyse aus. Zur Acrolein-Bildung kann es durch die folgende Dehydratisierung des Glycerins kommen. Ebenfalls postuliert ist ein radikalischer Mechanismus, bei dem es durch homolytische Spaltung zur Acrolein-Bildung kommt (Umano und Shibamoto, 1987).

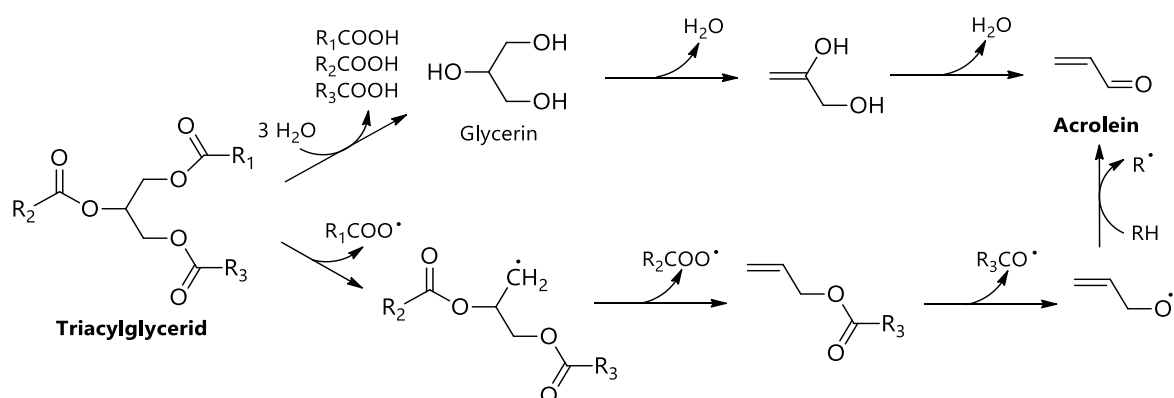


Abbildung 17: Postulierte Bildungswege von Acrolein aus dem Glycerin-Grundgerüst von Triacylglyceriden, R₁, R₂ und R₃: Alkyl- oder Alkenylgruppe [modifiziert nach (Umano und Shibamoto, 1987)]

Dass die Acrolein-Bildung aus den Fettsäureresten der Triacylglyceride verglichen zur Acrolein-Bildung aus dem Glycerin-Grundgerüst überwiegt, konnte in einer Studie mit isotope markierten Verbindungen gezeigt werden. Im Rahmen dieser Studie wurden ¹³C₃-markierte Triacylglyceridverbindungen von Sterin-, Öl-, Linol- und Linolensäure verwendet, die am Glycerin markiert waren, und ¹³C₅₄-markierte Verbindungen, bei denen nur die Fettsäurereste isotope markiert waren, nicht jedoch die C-Atome des Glycerin-Grundgerüsts. Das Erhitzen dieser unterschiedlich markierten Verbindungen zeigte, dass die Acrolein-Bildung vor allem aus den Fettsäureresten der Triacylglyceride erfolgt. Ebenfalls konnte unter Verwendung von Fettsäure-Hydroperoxiden gezeigt werden, dass ein radikalinduzierter Mechanismus an der Acrolein-Bildung beteiligt ist (Ewert *et al.*, 2014).

Den Hauptmechanismus der zur Bildung von Acrolein aus Fettsäuren führt stellt wahrscheinlich die β -Spaltungen von Hydroperoxiden, genauer gesagt von Lipidalkoxy-Radikalen dar. Ein entsprechender Metabolismus ausgehend von Arachidonsäure wurde Esterbauer *et al.* (1991) postuliert und von Stevens und Maier (2008) aufgegriffen (siehe Abbildung 18A). Abgeleitet vom Acrolein-Bildungsweg aus Arachidonsäure, postuliert Ewert *et al.* (2014) eine Acrolein-Bildung aus Linolsäure (siehe Abbildung 18B).

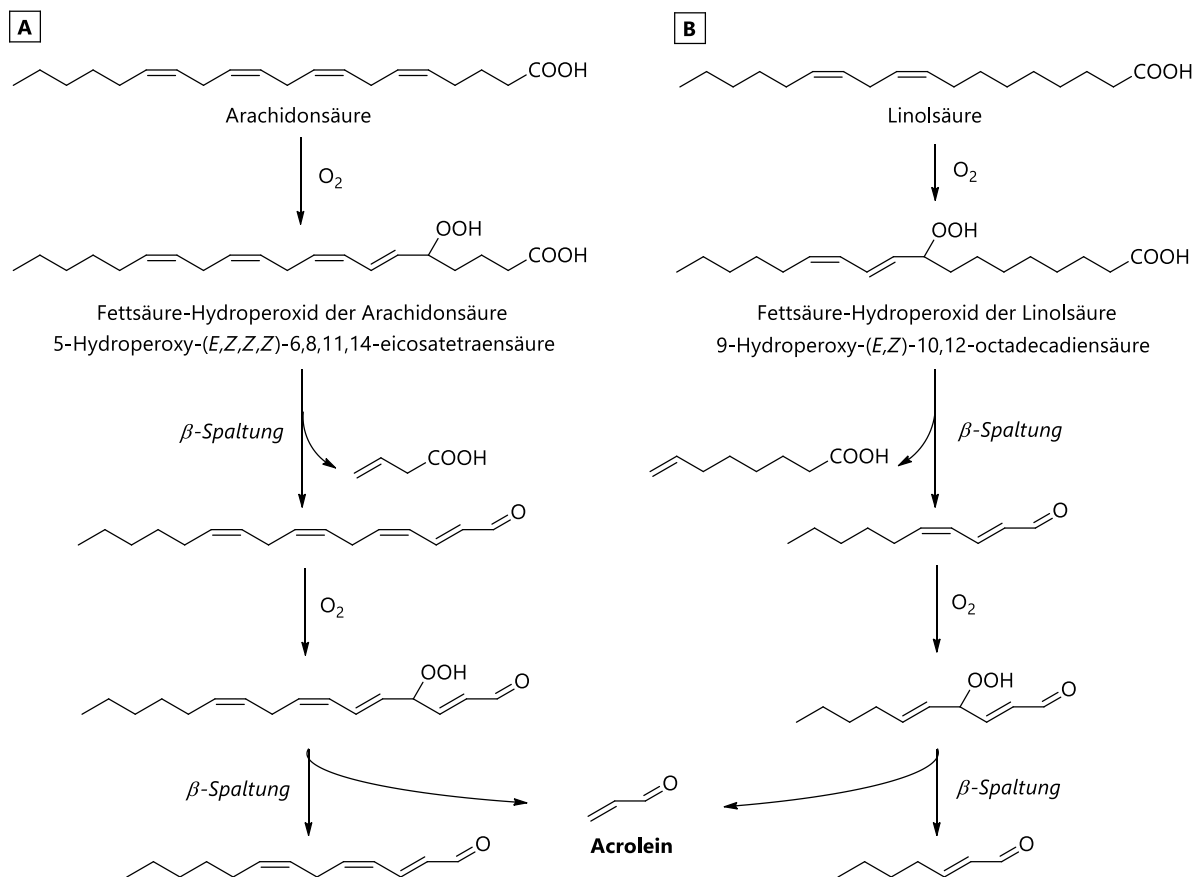


Abbildung 18: Postulierte Bildungswege von Acrolein aus Arachidonsäure (A) bzw. Linolsäure (B) [A: modifiziert nach (Stevens und Maier, 2008), basierend auf (Esterbauer *et al.*, 1991); B: modifiziert nach (Ewert *et al.*, 2014), basierend auf (Esterbauer *et al.*, 1991)]

Bildung aus Kohlenhydraten

Neben der Bildung aus Triacylglyceriden ist auch aus Kohlenhydraten eine Acrolein-Bildung beschrieben. Nach Dehydrierung kann aus Kohlenhydraten durch Retroaldol-Spaltung Acrolein entstehen. In Abbildung 19 sind verschiedene Acrolein-Bildungswege ausgehend von Glucose dargestellt. Durch Erhitzen kann es zur Abspaltung der Hydroxylgruppe an Position 4 der Glucose kommen. Diese Dehydratisierung resultiert in einer β -Hydroxyketon-Verbindung, die nach 3,4-Retroaldol-Spaltung die Acrolein-Vorläuferverbindung Hydroxyaceton liefern kann. Hydroxyaceton kann durch 2,3-Enolisierung in ein Endiol umgewandelt werden, welches im Gleichgewicht mit 2-Hydroxypropanal vorliegt. Eine folgende Dehydratisierung führt zur Bildung von Acrolein. Ein weiterer Weg, der die Acrolein-Bildung zur Folge hat, beginnt mit der Reaktion von Glucose und einer Aminoverbindung und führt unter Dehydratisierung zum Amadoriprodukt. Durch Abspaltung von Wasser und 3,4-Retroaldol-Spaltung kann aus dem Amadoriprodukt Hydroxyaceton gebildet werden, welches wie beschrieben zu Acrolein weiterreagieren kann. Ebenfalls kann ausgehend vom Amadoriprodukt, die Abspaltung der Aminoverbindung, gefolgt von einer 3,5-Enolisierung und einer 3,4-Retroaldol-Spaltung zur Bildung von Hydroxyaceton führen (Stevens und Maier, 2008). Die Untersuchung der verschiedenen Reaktionswege von Glucose zur Vorläuferverbindung Hydroxyaceton und die Identifikation der beteiligten C-Atome erfolgte unter Verwendung von Maillard-Modellsystemen mit D-[^{13}C]-Glucose und L-[^{13}C]-Alanin (Yaylayan und Keyhani, 2000). Die folgenden Umlagerungen von Hydroxyaceton zu 2-Hydroxypropanal wurde mittels Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) belegt (Yaylayan *et al.*, 1999).

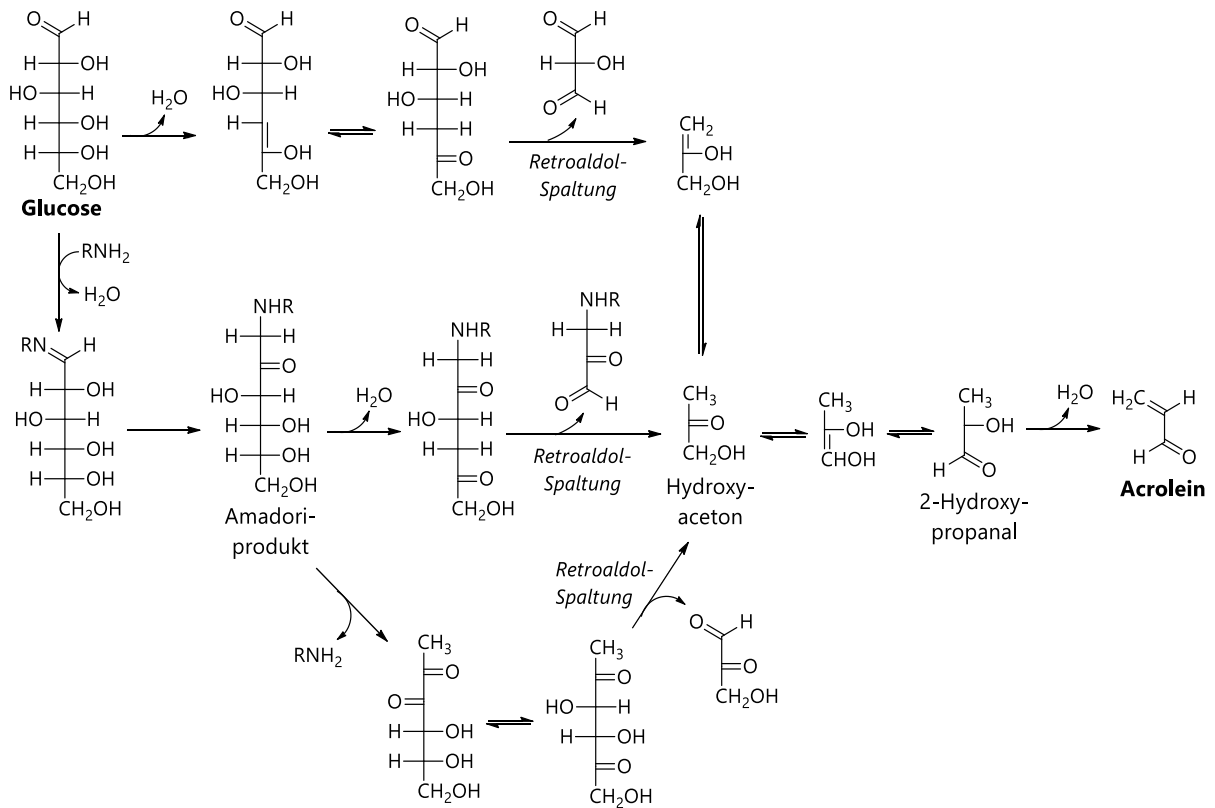


Abbildung 19: Postulierte Bildungswege von Acrolein aus Glucose [modifiziert nach (Stevens und Maier, 2008)]

Bildung aus Aminosäuren und anderen Aminoverbindungen

Bildung aus Methionin

Eine hitzeinduzierte Bildung von Acrolein ist auch im Rahmen des Strecker-Abbaus der Aminosäure Methionin beschrieben (siehe Abbildung 20). Im Rahmen der Maillard-Reaktion kann aus Methionin und einer Dicarboxylverbindung eine Schiffsche Base entstehen, die durch Hydrolyse zum Strecker-Aldehyd Methional wird. Methional kann durch Retro-Michaelspaltung weiter zu Methanethiol und Acrolein reagieren (Stevens und Maier, 2008).

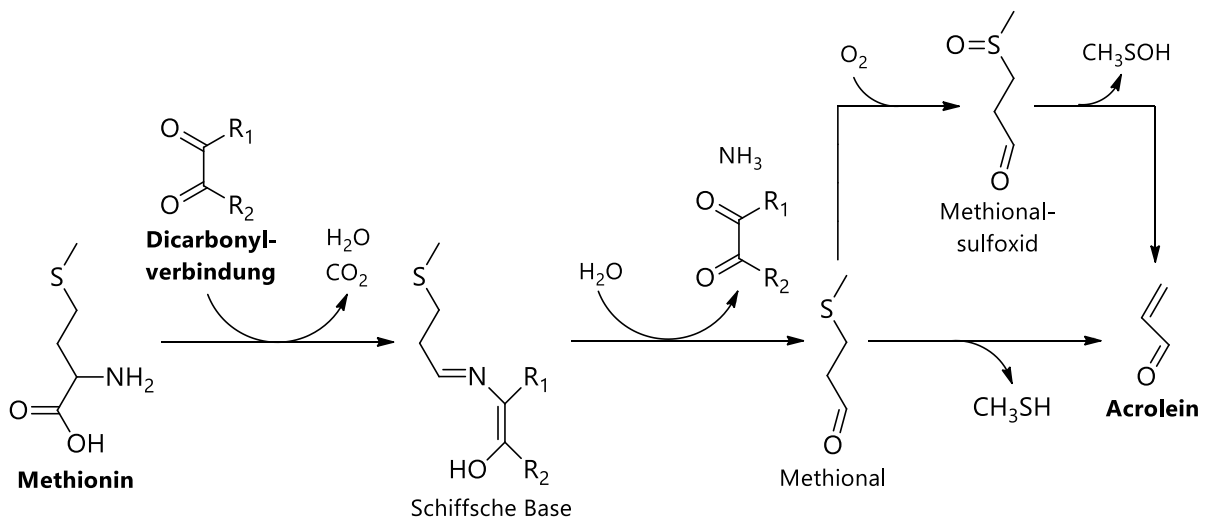


Abbildung 20: Postulierter Bildungsweg von Acrolein aus Methionin, R₁ und R₂: Alkyl- oder Alkenylgruppe [modifiziert nach (Stevens und Maier, 2008)]

Des Weiteren kann durch Oxidation aus Methional auch Methionalsulfoxid entstehen, welches zu Methansulfensäure und Acrolein weiterreagiert. Eine Dicarbonylverbindung, die nach diesem Mechanismus zusammen mit Methionin zu Acrolein reagieren könnte, stellt z. B. Vitamin C dar (Stevens und Maier, 2008). In Anwesenheit von Wasser, Natriumchlorid und Natriumhydrogenphosphat wurde bereits eine Acrolein-Bildung aus Methionin und der Dicarbonylverbindung Ninhydrin nachgewiesen (Ballance, 1961).

Bildung aus Formaldehyd und Acetaldehyd

In Kapitel 2.3.2.1 wurde bereits die Herstellung von Acrolein aus Formaldehyd und Acetaldehyd im Rahmen der industriellen Synthese beschrieben. Da diese Verbindungen Bestandteile von Tabakprodukten sind, ist es wahrscheinlich, dass es bei dem mit dem Konsum von Tabakprodukten verbundenen Verbrennungsprozess ebenfalls zur Acrolein-Bildung nach dem beschriebenen Mechanismus kommt (Stevens und Maier, 2008). Des Weiteren können Formaldehyd und Acetaldehyd auch aus Triacylglyceriden freigesetzt werden, sodass eine entsprechende Acrolein-Bildung im Lebensmittel aus diesen Verbindungen ebenfalls denkbar ist (Umano und Shibamoto, 1987).

2.3.2.3 Endogene Bildung

Eine endogene Acrolein-Bildung wurde bisher aus Threonin mittels Myeloperoxidase (Anderson *et al.*, 1997), aus Spermin und Spermidin mittels Aminooxidase (Lee und Sayre, 1998), im Rahmen der Lipidperoxidation (Uchida *et al.*, 1998), sowie aus Glycerin mittels Glycerin-/Dioldehydratase (Engels *et al.*, 2016) postuliert und wird im Folgenden näher beschrieben.

Bildung aus Threonin

Das Enzym Myeloperoxidase (MPO) wird in humanen Neutrophilen exprimiert und katalysiert die Reaktion von Threonin zu Acrolein. Der postulierte Mechanismus der endogenen Acrolein-Bildung aus Threonin ist in Abbildung 21 dargestellt. Ausgehend von Threonin kann es in Anwesenheit von H_2O_2 und Chloridionen zur Bildung von 3-Hydroxypropenal kommen, aus dem unter Wasserabspaltung Acrolein entstehen kann (Anderson *et al.*, 1997).

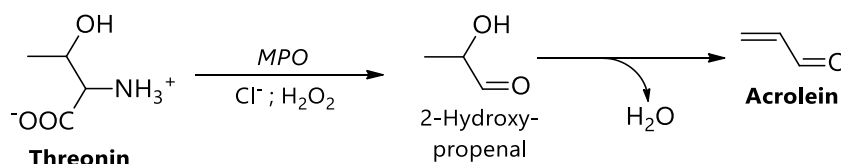


Abbildung 21: Postulierter Bildungsweg von Acrolein aus Threonin mittels Myeloperoxidase (MPO) in Gegenwart von H_2O_2 und Chloridionen [modifiziert nach (Anderson *et al.*, 1997)]

Der Nachweis dieses Acrolein-Bildungswegs erfolgte *in vitro* unter Verwendung eines MPO- H_2O_2 -Chlorid-Systems sowie unter Verwendung von aktivierten humanen Neutrophilen. Nach Inkubation von Threonin, MPO, H_2O_2 und NaCl in Natriumphosphat-Puffer (pH 7) für zwei Stunden bei 37 °C, konnte 2-Hydroxypropenal und Acrolein im Reaktionsgemisch identifiziert werden. Ebenfalls konnte 2-Hydroxypropenal sowie Acrolein nach Inkubation von Neutrophilen mit dem Aktivator Phorbolmyristat-acetat (PMA) und der Aminosäure Threonin für 90 Minuten bei 37 °C nachgewiesen werden. In beiden

Testsystemen konnte gezeigt werden, dass für die MPO-katalysierte Reaktion H_2O_2 sowie Chloridionen erforderlich sind (Anderson *et al.*, 1997). Ebenfalls konnte die Rolle der MPO *in vivo* bestätigt werden. Bei Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen einer MPO-vermittelten Aldehyd-Bildung und Herzinfarkten zeigte sich, dass die Acrolein-Gehalte in ventrikulär Gewebe von MPO-Knockout-Mäusen nach akutem Herzinfarkt signifikant verringert waren verglichen zu den Acrolein-Gehalten bei WT-Mäusen nach akutem Herzinfarkt (Vasilyev *et al.*, 2005).

Bildung aus Spermin und Spermidin

Eine weitere bekannte Quelle der endogenen Acrolein-Bildung stellen Polyamine dar. Acrolein kann durch enzymatische Oxidation aus Spermin und Spermidin entstehen. *In vitro* konnte nach Inkubation von Spermin bzw. Spermidin mit Aminooxidase Acrolein in der Gasphase nachgewiesen werden. Nach vierstündiger statischer Inkubation (37 °C) von 6 μmol Spermin bzw. Spermidin in Phosphat- oder Tris-HCl-Puffer (pH 6,8 - 7) mit Aminooxidase (100 Enzymeinheiten) wurden 0,6 bzw. 0,2 μmol Acrolein in der Gasphase nachgewiesen. Eine auf 22 Stunden verlängerte Inkubationszeit resultierte in 1,4 bzw. 0,8 μmol Acrolein in der Gasphase. Ebenfalls erfolgte ein Nachweis von Acrolein in der Gasphase nach Inkubation mit Kälberserum. Unter den gleichen Inkubationsbedingungen lag die gebildete Acrolein-Menge nach vier Stunden bei 0,2 μmol aus Spermin und 0,1 μmol aus Spermidin. Die entsprechenden Gehalte nach 22-stündiger Inkubation waren 0,5 bzw. 0,3 μmol (Alarcon, 1970).

Der Mechanismus der Acrolein-Bildung aus Spermin und Spermidin wurde vielfach diskutiert. Der wahrscheinlichste Bildungsmechanismus ist in Abbildung 22 dargestellt. Aus dem Polyamin Spermin kann durch oxidative Deaminierung mittels Aminooxidase Spermidin und Acrolein entstehen. Spermidin kann wiederum durch weitere oxidative Deaminierung mittels Aminooxidase zu Putrescin und Acrolein abgebaut werden (Lee und Sayre, 1998).

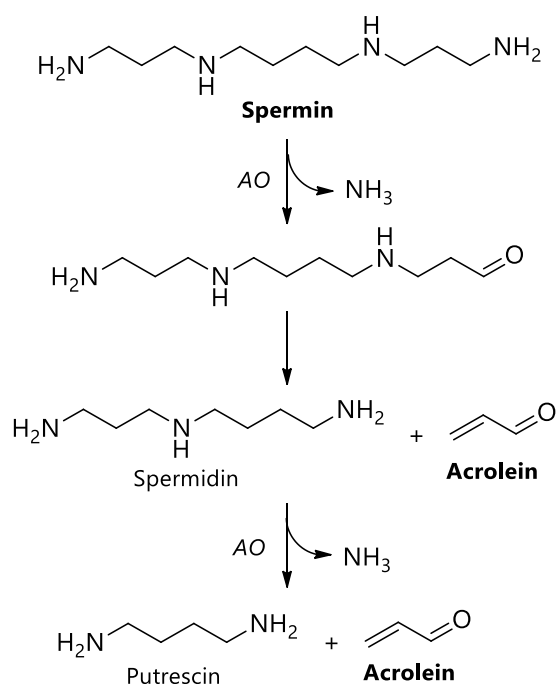


Abbildung 22: Postulierter Bildungsweg von Acrolein aus Spermin [modifiziert nach (Lee und Sayre, 1998)], AO: Aminooxidase

Bildung im Rahmen der Lipidperoxidation

Eine Acrolein-Bildung im Rahmen der Lipidperoxidation kann exogen im Lebensmittel erfolgen (siehe Kapitel 2.3.2.2), ebenfalls ist jedoch auch ein entsprechender endogener Acrolein-Bildungsmechanismus postuliert. Mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) konnte eine Acrolein-Bildung nach Inkubation von *low density lipoprotein* (LDL) mit Cu^{2+} nachgewiesen werden. Hierzu wurden 100 ml LDL-Lösung (0,5 mg Protein/ml) in Anwesenheit von 5 mM Cu^{2+} bei 37 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden war die Acrolein-Bildung maximal und lag bei 22 μmol . In Abwesenheit von Cu^{2+} wurde keine Acrolein-Bildung beobachtet. Die Inkubation von 100 ml Arachidonsäure (2 mM) in Anwesenheit von 10 mM Fe^{2+} und 1 mM Ascorbat bei 37 °C resultierte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in einer Acrolein-Bildung von circa 200 μmol . Ohne Zugabe von Ascorbat war eine Acrolein-Bildung nahezu nicht festzustellen. Neben Arachidonsäure wurde auch für andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure, *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure und *cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure eine Acrolein-Bildung im Rahmen der Lipidperoxidation beobachtet. Diese Untersuchungen wurden als ersten Hinweis darauf gewertet, dass eine endogene Bildung von Acrolein im Rahmen der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren erfolgen kann (Uchida *et al.*, 1998).

Bildung aus Glycerin

Einen weiteren endogenen Bildungsweg stellt die Acrolein-Bildung aus Glycerin dar. Ausgehend von Glycerin kann es katalysiert durch Glycerin-/Dioldehydratase zur Bildung von 3-Hydroxypropionaldehyd kommen, welcher in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Acrolein vorliegt (siehe Abbildung 23).

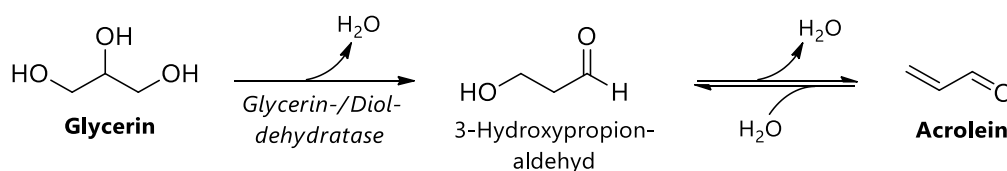


Abbildung 23: Postulierter Bildungsweg von Acrolein aus Glycerin [modifiziert nach (Engels *et al.*, 2016)]

Die Umwandlung von Glycerin in 3-Hydroxypropionaldehyd kann durch im Darm vorliegende Bakterien der Gattungen *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium* *Lactobacillus* sowie *Eubacterium hallii* erfolgen. Neben der Reaktion von 3-Hydroxypropionaldehyd zu Acrolein, kann es auch zur Bildung des 3-Hydroxypropionaldehyd-Hydrates sowie zur Bildung eines 3-Hydroxypropionaldehyd-Dimers kommen (Engels *et al.*, 2016). Hinweise darauf, dass die Acrolein-Bildung *in vivo* im Darm erfolgen kann, liefern Untersuchungen mit dem heterozyklischen aromatischen Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin (PhIP) bzw. dem PhIP-Konjugat Hydroxy-5-methyl-3-phenyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido-[3',2':4,5]imidazo[1,2- α]pyrimidin-5-ium-chlorid (PhIP-M1). Die mikrobielle Bildung von PhIP-M1 aus PhIP in Anwesenheit von Glycerin wurde *in vitro* nachgewiesen (Fekry *et al.*, 2016). Ebenfalls wurde PhIP-M1 im Urin und Fäzes von Probanden nach Verzehr von gekochtem Hähnchenfleisch quantifiziert (Vanhaecke *et al.*, 2008). Dass PhIP-M1 nicht wie bisher vermutet durch Reaktion mit 3-Hydroxypropionaldehyd sondern durch Reaktion mit Acrolein entsteht, konnte Engels *et al.* in *in vitro* Versuchen durch Reaktion von PhIP mit 3-Hydroxypropionaldehyd und/oder Acrolein bei verschiedenen Reaktions-

bedingungen zeigen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Acrolein kontinuierlich im Darm gebildet wird (Engels *et al.*, 2016).

2.3.3 Gehalte in Lebensmitteln

Zuverlässige analytische Methoden zur Bestimmung der flüchtigen Verbindung Acrolein in der Lebensmittelmatrix existieren nur für wenige Lebensmittelgruppen (SKLM, 2012). Einige existierende Literaturangaben zu Acrolein-Gehalten in Lebensmitteln sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Acrolein-Gehalte in Lebensmitteln

Lebensmittelkategorie	Lebensmittel	Acrolein [µg/kg]	Literatur
Früchte, roh	Apfel, Traube, Beeren	< 10 - 50	(Feron <i>et al.</i> , 1991)
Gemüse, roh	Kartoffel, Kohl, Möhre, Tomate	≤ 590	(Feron <i>et al.</i> , 1991)
Käse	Domiat-Käse	290 - 1300	(Collin <i>et al.</i> , 1993)
Alkoholische Getränke	Lagerbier	1,1 - 2,0	(Greenhoff und Wheeler, 1981)
	Rotwein	≤ 3800	(Feron <i>et al.</i> , 1991)
	Whiskey	670 - 11.100	(Miller und Danielson, 1988)
	Cognac	1420 - 1500	(Panosyan <i>et al.</i> , 2001)
	Spirituosen	< 14 - 5000	(Kuballa <i>et al.</i> , 2012; SKLM, 2012)
Fette, erhitzt	Frittierfett	39.400 - 88.100	(Ewert <i>et al.</i> , 2011)
	Frittierfett ¹	610 - 1020	(Ewert <i>et al.</i> , 2011)
Pflanzenöle, erhitzt	Pflanzenöle ²	151 - 521	(Casella und Contursi, 2004)
	Pflanzenöle ³	1100 - 242.300	(Ewert <i>et al.</i> , 2011)
	Pflanzenöle ³	20 - 97.500	(Granvogl, 2014)
	Pflanzenöle ^{1,3}	160 - 5440	(Ewert <i>et al.</i> , 2011)
Pflanzenöle, nicht erhitzt	Pflanzenöle ²	< 8,4 - 62	(Casella und Contursi, 2004)
Pommes frites, verzehrfertig		1 - 5	(Osório und de Lourdes Cardeal, 2011)
		13 - 23	(Ewert <i>et al.</i> , 2014)
Kartoffelchips, verzehrfertig		27	(Watzek <i>et al.</i> , 2012b)
		15 - 25	(Ewert <i>et al.</i> , 2014)
		23 - 26	(Granvogl, 2014)
Donuts, verzehrfertig		100 - 900	(Lane und Smathers, 1990)
		11 - 18	(Ewert <i>et al.</i> , 2014)
		14 - 15	(Granvogl, 2014)
Fischpanade, verzehrfertig	Kabeljaufiletpanade	100	(Lane und Smathers, 1990)

¹nach Gebrauch, ²Maiskeim-, Erdnuss-, Oliven- und Sonnenblumenöl, ³Kokos-, Oliven-, Raps-, Distel- und Leinsamenöl

In unverarbeiteten Lebensmitteln wurden geringe Acrolein-Gehalte nachgewiesen. Früchte wie Apfel, Traube, Erdbeere, Himbeere und Brombeere enthielten Acrolein-Gehalte von bis zu 50 µg/kg und Gemüse wie Kohl, Möhre, Kartoffel oder Tomate Gehalte von bis zu 590 µg/kg (Feron *et al.*, 1991). Einen höheren Acrolein-Gehalt wies Domiat-Käse, ein ägyptischer Weichkäse, mit 290 - 1300 µg/kg auf (Collin *et al.*, 1993).

Ebenfalls wurden verschiedene alkoholische Getränke wie Bier, Rotwein und Spirituosen auf ihren Acrolein-Gehalt untersucht. Der Acrolein-Gehalt von Lagerbier lag bei 1,1 - 2,0 µg/kg (Greenhoff und Wheeler, 1981). In Rotwein wurden Acrolein-Gehalte von bis zu 3800 µg/kg nachgewiesen (Feron *et al.*, 1991; Kuballa *et al.*, 2012). Hochprozentiger Alkohol enthielt bis zu 11,1 mg/kg Acrolein (Miller und Danielson, 1988; Feron *et al.*, 1991; Panosyan *et al.*, 2001).

Die Lebensmittelgruppe, zu der die meisten Daten zu Acrolein-Gehalten existieren, sind Fette und Öle. In nicht erhitzten Fetten und Ölen reichten die Acrolein-Gehalte von nicht detektierbar (< 8,4 µg/kg) bis zu 62 µg/kg (Casella und Contursi, 2004), erhitze Fette und Öle wiesen Gehalte bis zu 242 mg/kg auf (Casella und Contursi, 2004; Ewert *et al.*, 2011; Granvogl, 2014). Die Untersuchung von frittierten Lebensmitteln ergab Acrolein-Gehalte von 1 - 23 µg/kg für Pommes frites (Osório und de Lourdes Cardeal, 2011; Ewert *et al.*, 2014), von 15 - 27 µg/kg für Kartoffelchips (Watzek *et al.*, 2012b; Ewert *et al.*, 2014; Granvogl, 2014), von 11 - 900 µg/kg für Donuts (Lane und Smathers, 1990; Ewert *et al.*, 2014; Granvogl, 2014) und von 100 µg/kg für Fischpanade (Lane und Smathers, 1990).

2.3.3.1 Einflussfaktoren auf die Gehalte in Lebensmitteln

Die einzige Lebensmittelgruppe, bei der bisher Einflussfaktoren auf den Acrolein-Gehalt untersucht wurden, sind Fette und Öle. Es zeigte sich, dass die Erhitzungstemperatur, die Erhitzungszeit, die Fettsäurezusammensetzung sowie die Zugabe von Antioxidantien einen Einfluss auf den Acrolein-Gehalt von Fetten und Ölen haben.

Erhitzungstemperatur und Erhitzungszeit

Der Einfluss der Erhitzungstemperatur auf den Acrolein-Gehalt von Maiskeimöl wurde bereits 1987 untersucht. Beim Erhitzen auf verschiedenen Temperaturen (180 °C, 240 °C, 280 °C, 300 °C und 320 °C) für zwei Stunden zeigte sich eine Zunahme der Acrolein-Menge im Gasraum über der Probe von 0 mg auf 142 mg (Umano und Shibamoto, 1987). Ebenfalls wurde der Einfluss der Erhitzungstemperatur (100 °C, 140 °C, 180 °C, 220 °C und 260 °C) beim Erhitzen von Raps-, Leinsamen-, Distel-, Oliven- und Kokosöl sowie Frittierfett für 24 Stunden untersucht. Für Raps- und Leinsamenöl erfolgte eine maximale Acrolein-Bildung von 165 bzw. 242 mg/kg bei 140 °C und für Distelöl von 46 mg/kg bei 180 °C. Bei Erhitzen auf höhere Temperaturen nahm die Acrolein-Bildung bei diesen Ölen ab. Auch bei Olivenöl führte eine Steigerung der Erhitzungstemperatur von 100 °C bis auf 180 °C zu einer Zunahme der Acrolein-Bildung von 3 mg/kg auf bis zu 29 mg/kg. Bei einer Erhitzungstemperatur von 220 °C wurde nur eine Acrolein-Bildung von 6 mg/kg nachgewiesen, wohingegen bei 260 °C die Acrolein-Bildung mit 33 mg/kg am höchsten war. Für Kokosöl und Frittierfett wurde die maximale Acrolein-Bildung von 48 bzw. 88 mg/kg bei der höchsten untersuchten Erhitzungstemperatur von 260 °C nachgewiesen (Ewert *et al.*, 2011). Eine weitere Studie, bei der Pflanzenöle auf verschiedenen Temperaturen (100 °C, 140 °C, 180 °C und 220 °C) erhitzt wurden, zeigte ebenfalls einen Einfluss der Erhitzungstemperatur auf die Acrolein-Gehalte. Für Oliven-, Raps-, Distel- und Leinöl wurde ein Anstieg der Acrolein-Bildung mit zunehmender Erhitzungstemperatur von 100 °C bis auf 180 °C beobachtet. Die maximalen Acrolein-Gehalte lagen bei 4, 23, 9 und 52 mg/kg. Eine noch höhere Erhitzungstemperatur von 220 °C führte zu geringeren Acrolein-Gehalten. Im Kokosöl wurde die maximale Acrolein-Bildung von 3 mg/kg bei der höchsten untersuchten Erhitzungstemperatur von 220 °C nachgewiesen (Granvogl, 2014).

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Erhitzungszeit auf den Acrolein-Gehalt. Beim Erhitzen von Maiskeimöl auf 300 °C für eine bis sechs Stunden zeigte sich mit zunehmender Erhitzungszeit eine Zunahme der Acrolein-Bildung im Gasraum über der Probe von 24 mg auf 165 mg (Umano und Shibamoto, 1987). In einer Studie, in der weitere Pflanzenöle sowie Frittierfett für zwei bis 96 Stunden bei 180 °C erhitzt wurden, ergab sich für Kokos-, Oliven-, Raps-, Distel- und Leinsamenöl eine maximale Acrolein-Bildung von 8, 29, 157, 47 und 208 mg/kg bei einer Erhitzungszeit von 24 Stunden, wobei Lein- und Rapsöl auch bereits nach zwei Stunden hohe Acrolein-Gehalte von 103 bzw. 94 mg/kg aufwiesen. Die Acrolein-Bildung in Kokosöl (1 - 8 mg/kg) und Frittierfett (44 - 75 mg/kg) variierte nur geringfügig bei den verschiedenen Erhitzungszeiten (Ewert *et al.*, 2011). Dass die Erhitzungstemperatur die Acrolein-Gehalte beeinflussen kann, wurde auch in einer Studie gezeigt, bei der Pflanzenöle für zwei bis 55 Stunden auf 180 °C erhitzt wurden. In dieser Studie wurden für Oliven-, Raps- und Distelöl bei einer Erhitzungszeit von vier Stunden maximale Acrolein-Gehalte von 18, 63 und 16 mg/kg ermittelt und für Kokosöl- und Leinsamenöl bei einer achtstündigen Erhitzungszeit von 3 und 98 mg/kg (Granvogel, 2014).

Fettsäurezusammensetzung

Einen weiteren Einflussfaktor auf die Acrolein-Gehalte von erhitzten Pflanzenöle und Frittierfett stellt die Fettsäurezusammensetzung dar. Um diesen Einflussfaktor zu untersuchen wurden Pflanzenöle und Frittierfett mit unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen für 24 Stunden bei 180 °C erhitzt und der Acrolein-Gehalt bestimmt. Die höchsten Acrolein-Gehalte wiesen Lein- (208 mg/kg) und Rapsöl (157 mg/kg) auf, in denen hohe Gehalte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Linolen- und Linolsäure nachgewiesen wurden. Für Distelöl, welches den höchsten Anteil an Linolsäure enthielt, wurde allerdings ein deutlich geringer Acrolein-Gehalt (47 mg/kg) bestimmt. Vermutet wurde, dass der hohe Gehalt an Antioxidantien im Distelöl für die geringeren Acrolein-Gehalte verantwortlich sein könnte. Kokosöl (8 mg/kg) und Olivenöl (29 mg/kg), welche vor allem gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren enthielten, wiesen die geringsten Acrolein-Gehalte auf (Ewert *et al.*, 2011).

Zugabe von Antioxidantien

Die Zugabe von Antioxidantien hat ebenfalls einen Einfluss auf die Acrolein-Bildung. In Rapsöl lag der Acrolein-Gehalt nach Erhitzen für vier Stunden auf 180 °C ohne Zusatz von Antioxidantien bei 68 mg/kg, wohingegen er nach Zugabe von 100 mg α -Tocopherol bzw. Ascorbinsäure pro 100 g Öl auf 10 bzw. 17 mg/kg reduziert wurde. Dieser Effekt konnte auch für Frittierfett beobachtet werden. Der Acrolein-Gehalt lag ohne Antioxidantien bei 52 mg/kg, mit α -Tocopherol bei 20 mg/kg und nach Ascorbinsäure-Zusatz bei 35 mg/kg (Ewert *et al.*, 2014).

2.3.4 Toxikokinetik

Die Acrolein-Aufnahme in den Organismus kann durch eine orale, dermale oder inhalative Exposition erfolgen. Innerhalb von Tierstudien wird Acrolein häufig auch i.v. oder i.p. verabreicht.

2.3.4.1 Resorption und Verteilung

Studien zur Aufnahme und Verteilung von Acrolein nach oraler Aufnahme wurden an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (n = 5 pro Dosisgruppe und Geschlecht) mit 2,3-¹⁴C-Acrolein

(2,5 oder 15 mg/kg KG) durchgeführt. Nach Acrolein-Gabe von 2,5 mg/kg KG mittels Schlundsonde wurden innerhalb von 24 Stunden 59 % der Radioaktivität im Urin wiedergefunden, 12 % im Fäzes und 27 % wurden als CO₂ ausgeatmet. Diese Verteilung veränderte sich bis zum Ende des gesamten Studienzeitraum von sieben Tagen nur geringfügig. Nach sieben Tagen wurde ebenfalls das Gewebe und Blut der Tiere untersucht. Die wiedergefundene Radioaktivität lag bei 0,6 %, wobei die höchste Radioaktivität in der Leber bestimmt wurde. Außerdem wurde Radioaktivität im Fettgewebe, im Blut, im Magen, der Nebenniere, der Niere, der Milz, der Lunge sowie in den Eierstöcken der weiblichen Tiere nachgewiesen. Die orale Acrylamid-Gabe von 15 mg/kg KG mittels Schlundsonde führte zu einer 24-h-Ausscheidung der Radioaktivität von 28 % über den Urin, 2 % über den Fäzes und 21 % abgeatmet als CO₂. Über den gesamten Studienzeitraum von sieben Tagen wurden nach der oralen Acrolein-Gabe von 15 mg/kg KG 39 % der Radioaktivität über den Urin und 29% über den Fäzes ausgeschieden. 27 % wurden als CO₂ abgeatmet und 0,6 % im Gewebe wiedergefunden wurde. Die Gewebeverteilung der Radioaktivität war vergleichbar zur niedrigeren Dosisgruppe (Parent *et al.*, 1996).

Ebenfalls wurde die Aufnahme und Verteilung nach i.v. Gabe von 2,3-¹⁴C-Acrolein (2,5 mg/kg KG) an Sprague-Dawley-Ratten (n = 10) untersucht. Innerhalb von 24 Stunden bzw. sieben Tagen wurden 51 bzw. 58 % der Radioaktivität im Urin und 2,2 bzw. 1,7 % im Fäzes nachgewiesen und 21 bzw. 27 % wurden als CO₂ abgeatmet. Im Gewebe und Blut lagen nach sieben Tagen 1,1 % der Radioaktivität vor. Auch nach i.v. Gabe war die Leber das Organ mit der höchsten Radioaktivität und es konnte außerdem Radioaktivität im Fettgewebe, im Blut, im Magen, der Nebenniere, der Niere, der Milz, der Lunge sowie in den Eierstöcken der weiblichen Tiere nachgewiesen werden (Parent *et al.*, 1996).

2.3.4.2 Metabolismus

Der Metabolismus von Acrolein (siehe Abbildung 24) lässt sich analog zum Metabolismus von Acrylamid in einen reduktiven und in einen oxidativen Teil unterteilen (SKLM, 2012). Die Oxidation von Acrolein zu Acrylsäure und die Folgereaktionen über 3-Hydroxypropionsäure und Malonsäure zu Oxalsäure sind Teil des reduktiven Metabolismus (Parent *et al.*, 1998), ebenso wie die detoxifizierende Konjugation von Acrolein mit Glutathion und der anschließende Abbau zu den Mercaptursäuren (Horvath *et al.*, 1992; Stevens und Maier, 2008). *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein (OPMA) stellt dabei die Mercaptursäure dar, aus der durch Reduktion der Hauptmetabolit *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein (HPMA) gebildet wird und durch Oxidation *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein (CEMA) entsteht. Ebenfalls ist die Bildung von *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein-S-oxid (OPMA-SO) aus OPMA postuliert (Hashmi *et al.*, 1992; Abraham *et al.*, 2011). Der oxidative Metabolismus beginnt mit der Epoxidierung von Acrolein zu Glycidaldehyd mittels Cytochrom P450 2E1. Eine Entgiftung von Glycidaldehyd erfolgt durch Konjugation mit Glutathion und anschließendem Abbau zur *N*-Acetyl-S-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-L-cystein (Glycidaldehyd-MA). Ebenfalls stellt die Reaktion von Glycidaldehyd mittels Epoxidhydrolase zu Glycerinaldehyd eine Entgiftungsreaktion dar (Parent *et al.*, 1998; Abraham *et al.*, 2011). Ausgehend von Acrolein ist außerdem eine Bildung von DNA-Addukten beschrieben. Das vorwiegend gebildete DNA-Addukt ist γ -Hydroxy-1*N*²-propano-2'-deoxyguanosin (γ -OH-PdG). Ein weiteres DNA-Addukt stellt α -Hydroxy-1*N*²-propano-2'-deoxyguanosin (α -OH-PdG) dar (Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011).

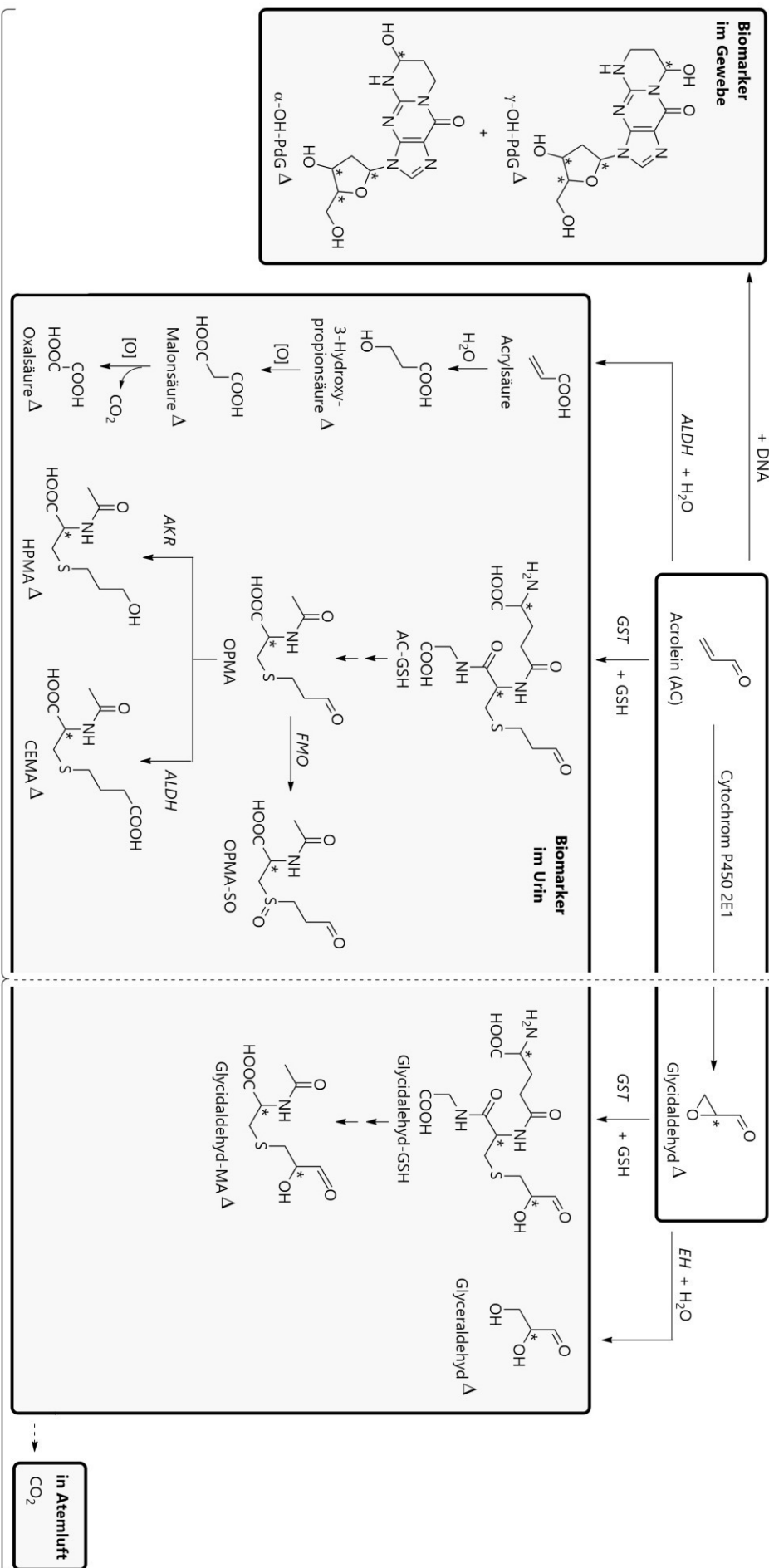


Abbildung 24: Metabolismus von Acrolein. AC: Acrolein, AC-GSH: AKR: Aldo-Keto-Reduktase, ALDH: Aldehyddehydrogenase, CEMA: N-Acetyl-5-(2-carboxyethyl)-L-cystein, DNA: Desoxy-ribonucleinsäure, EH: Epoxidhydrrolase, FMO: Flavin-abhängige Monooxygenase, Glycidaldehyd-MA: N-Acetyl-5-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-L-cystein, GSH: Glutathion, GST: Glutathion-5-Transferase, HPMA: N-Acetyl-5-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, OPMA: N-Acetyl-5-(3-oxopropyl)-L-cystein, OPMA-SO: N-Acetyl-5-(3-oxopropyl)-L-cystein-5-oxid, α-OH-PdG: α-Hydroxy-1N²-propano-2-deoxyguanosin, γ-OH-PdG, γ-Hydroxy-1N²-propano-2-deoxyguanosin, Δ: in vivo nachgewiesen [modifiziert nach (Parent et al., 1998; Stevens und Maier, 2008)]

Abbau von Acrolein zu Acrylsäure, 3-Hydroxypropionsäure, Malonsäure & Oxalsäure

In einer Studie an Sprague-Dawley-Ratten wurden nach oraler Gabe ($n = 10$) und nach i.v. Gabe ($n = 10$) von 2,5 mg/kg KG 2,3- ^{14}C -Acrolein die Ausscheidungsprodukte im Urin untersucht (siehe Kapitel 2.3.4.3). Nach oraler Gabe konnten 3-Hydroxypropionsäure, Oxalsäure und Malonsäure im Urin nachgewiesen werden, wohingegen nach i.v. Gabe nur 3-Hydroxypropionsäure im Urin detektiert wurde. Dies deutet daraufhin, dass die Bildung der Metaboliten Oxalsäure und Malonsäure durch die Mikroflora im Magen-darmtrakt erfolgen könnte (Parent *et al.*, 1998).

Die Bildung von Acrylsäure aus Acrolein konnte bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden. Im Reaktionsgemisch aus Acrolein (5 mM), 9000 g Leber-Überstand, Mg^{2+} , NAD^+ bzw. NADP^+ wurden circa 20 bzw. 7 % des Acroleins zu Acrylsäure metabolisiert. Die Zugabe von Disulfiram inhibierte die Reaktion um 60 % (NAD^+) bzw. 80 % (NADP^+) (Patel *et al.*, 1980).

Konjugation von Acrolein und Glycidaldehyd mit Glutathion sowie Abbau zu Mercaptursäuren

Die Konjugation von Acrolein mit Glutathion kann ohne enzymatische Katalyse oder katalysiert durch GST erfolgen. Durch *in vitro* Untersuchungen zur Glutathionkonjugation von Acrolein konnten die humanen Isoenzyme GST A1-1, GST M1-1 und GST P1-1 als die GST-Isoenzyme identifiziert werden, die die Acrolein-GSH-Addukt-Bildung katalysieren (Berhane *et al.*, 1994). Untersuchungen an murinen Pankreaszellen (MS1), welche eine stabile Transfektion mit mGSTA4-4 cDNA aufwiesen, zeigten, dass auch GSTA4-4 ein weiteres GST-Isoenzym ist, welches die Reaktion von Acrolein mit Glutathion katalysiert. Unter Verwendung der stabil transfizierten MS1-Zellen (mGSTA4-4 Überexpression) lag die Acrolein-Konzentration, die nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C zu einer 50%igen Reduktion der Zellviabilität führte (LC_{50}), bei 38 μM , verglichen zu 5 μM bei WT-Zellen (keine mGSTA4-4 Expression) (Yang *et al.*, 2004).

Als Folgereaktionen der Konjugation von Acrolein mit Glutathion sind, die Glutamat-Abspaltung mittels γ -Glutamyltranspeptidase, die Glycin-Abspaltung mittels Dipeptidase sowie anschließend die Acetylierung mittels NAT postuliert (Horvath *et al.*, 1992). *In vivo* wurden bisher jedoch weder das Acrolein-GSH-Addukt, noch die Zwischenabbauprodukte oder die abschließend durch Acetylierung gebildete Mercaptursäure OPMA detektiert. HPMA und CEMA, welche das Reduktions- bzw. Oxidationsprodukt von OPMA darstellen, wurden hingegen bereits im Urin von Nagern sowie von Menschen quantifiziert (siehe Kapitel 2.3.4.3).

OPMA-SO wurde bisher nicht *in vivo* nachgewiesen. Hinweise auf eine OPMA-SO-Bildung lieferten jedoch *in vitro* Experimente. Für OPMA und OPMA-SO wurden zytotoxische Effekte an LLC-PK1-Zellen und an isolierten proximalen Nierentubulizellen von Ratten festgestellt, wobei nur bei OPMA die Zytotoxizität durch Zugabe eines Flavinmonooxygenase-Hemmers reduziert werden konnte. Es ist also davon auszugehen, dass die FMO-katalysierte Bildung von OPMA-SO aus OPMA Teil des Acrolein-Metabolismus ist (Hashmi *et al.*, 1992). Ebenfalls wäre eine Cytochrom-katalysierte Oxidation von OPMA zu OPMA-SO denkbar (Stevens und Maier, 2008).

Zur Konjugation des Acrolein-Metaboliten Glycidaldehyd mit Glutathion und zum folgenden Abbau zur Glycidaldehyd-Mercaptursäure existieren weniger Studien als zu Konjugation von Acrolein mit Glutathion. Die Glycidaldehyd-Mercaptursäure wurde jedoch ebenfalls bereits im Urin nachgewiesen (siehe

Kapitel 2.3.4.3). Der Mechanismus der Glycidaldehyd-Mercaptursäure-Bildung aus Glycidaldehyd ist analog zum Mechanismus ausgehend von Acrolein in Abbildung 25 dargestellt.

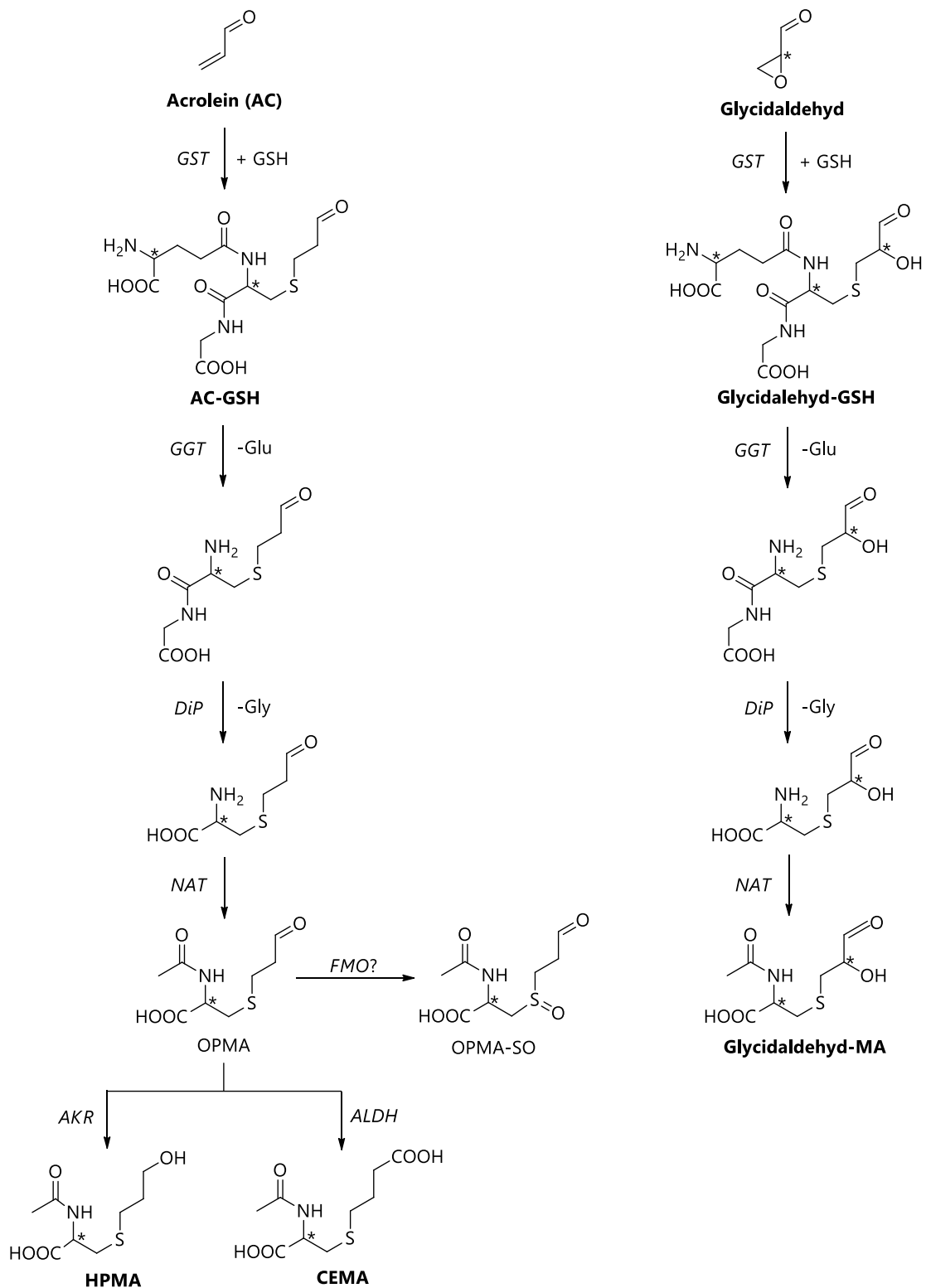


Abbildung 25: Bildung von HPMA und CEMA aus Acrolein sowie von Glycidaldehyd-MA aus Glycidaldehyd, AC: Acrolein, AKR: Aldo-Keto-Reduktase, ALDH: Aldehyddehydrogenase, CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, DiP: Dipeptidase, FMO: Flavin-abhängige Monooxygenase, Glycidaldehyd-MA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, GGT: γ -Glutamyltranspeptidase, Glu: Glutaminsäure, Gly: Glycin, GSH: Glutathion, GST: Glutathion-*S*-Transferase, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, NAT: *N*-Acetyltransferase, OPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-*L*-cystein, OPMA-SO: *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-*L*-cystein-*S*-oxid [modifiziert nach (Horvath *et al.*, 1992; Stevens und Maier, 2008)]

Bildung von Acrolein-DNA-Addukten

Acrolein-DNA-Addukte wurden bereits *in vitro* und *ex vivo* nachgewiesen. In Hähnen (n = 12 pro Dosisgruppe) wurde die Bildung von γ -OH-PdG nach inhalativer Exposition mit Acrolein (0, 1 oder 10 ppm) gemischt mit Schwebstofffilter (*high efficiency particulate air filter*, HEPA) - Luft über sechs Stunden erfasst. In DNA, welche aus der Bauchorta der Tiere isoliert wurde, war die Menge an DNA-Addukten direkt nach der Exposition mit 1 bzw. 10 ppm 5-fach höher als in der Kontrollgruppe, in der die Tiere nur mit HEPA-Luft exponiert waren. Zehn Tage nach der Exposition sanken sie wieder auf das DNA-Addukt-Level der Kontrollgruppe (Penn *et al.*, 2001). Bei A/J-Mäusen und F344-Ratten wurde ohne spezifische Acrolein-Exposition γ -OH-PdG in Leber, Lunge, Niere, Gehirn, Brust, Prostata, Kolon, Haut und in Leukozyten nachgewiesen (Nath und Chung, 1994; Nath *et al.*, 1996). Ebenfalls erfolgte auch in verschiedenen Humangeweben der Nachweis von γ -OH-PdG und α -OH-PdG (siehe Kapitel 2.3.6.2 Abschnitt *DNA-Addukte als Expositionsbiomarker*, S. 68).

2.3.4.3 Ausscheidung

Die Ausscheidung von Acrolein wurde nach oraler Gabe mittels Schlundsonde und nach i.v. Gabe von 2,3-¹⁴C-Acrolein (2,5 oder 15 mg/kg KG) an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (n = 5 pro Dosisgruppe und Geschlecht) untersucht (Parent *et al.*, 1996; Parent *et al.*, 1998).

Nach dem Studienzeitraum von sieben Tagen erfolgte die Ausscheidung hauptsächlich über den Urin (39 - 59 % der Radioaktivität). Außerdem erfolgte eine Ausscheidung über den Fäzes und eine Abatmung als CO₂ (siehe Kapitel 2.3.4.1) (Parent *et al.*, 1996).

Als Ausscheidungsprodukte im Urin wurden nach oraler (2,5 oder 15 mg/kg KG) und i.v. (2,5 mg/kg KG) Gabe von 2,3-¹⁴C-Acrolein an Sprague-Dawley-Ratten die Metaboliten HPMA, CEMA, Glycidaldehyd-Mercaptursäure und 3-Hydroxypropionsäure nachgewiesen. Nach oraler Gabe konnte außerdem Oxalsäure und Malonsäure detektiert werden. Sowohl nach oraler als auch nach i.v. Gabe stellte HPMA das Hauptausscheidungsprodukt dar. Es machte nach oraler Gabe je nach Ausscheidungszeitraum und Dosis 28 bis 40 % und nach i.v. Gabe 61 bis 74 % der im Urin detektierten Radioaktivität aus. Nach oraler Gabe von 2,5 mg/kg KG erfolgte die maximale Ausscheidung von HPMA, CEMA und Oxalsäure im Zeitraum 0 - 4 h, von 3-Hydroxypropionsäure im Zeitraum 12 - 24 h und von Glycidaldehyd-Mercaptursäure im Zeitraum 8 - 12 h. Die orale Acrolein-Gabe von 15 mg/kg KG resultierte in einer verzögerten maximalen Ausscheidung der Acrolein-Metaboliten. Für HPMA war die Ausscheidung nach orale Acrolein-Gabe von 15 mg/kg KG im Zeitraum von 8 - 12 h maximal und für alle anderen Metabolite im letzten Sammelzeitraum von 24 - 48 h. Malonsäure konnte nach oraler Gabe unabhängig von der Dosis nur in Spuren nachgewiesen werden. Nach i.v. Acrolein-Gabe von 2,5 mg/kg erfolgte die maximale HPMA-, CEMA- sowie Glycidaldehyd-Mercaptursäure-Ausscheidung im Zeitraum 12 - 24 h. 3-Hydroxypropionsäure wurde vor allem im Zeitraum 8 - 12 h ausgeschieden (Parent *et al.*, 1998).

An männlichen Wistar-Ratten (n = 3 - 5 pro Dosisgruppe) wurde die Acrolein-Ausscheidung nach i.p. sowie nach inhalativer Gabe untersucht. Die i.p. Acrolein-Gabe von 0,47; 0,8 oder 2,0 mg/kg KG resultierte in einer Ausscheidung von circa 30 % der Acrolein-Dosis als HPMA und CEMA. Wurde i.p. eine höhere Acrolein-Dosis von 4 mg/kg KG appliziert, lag die Ausscheidung als HPMA und CEMA nur noch bei 11 %. Die inhalative Acrolein-Gabe von 23, 48, 77 oder 126 mg/m³ (0,45 - 1,86 mg/kg KG) für eine

Stunde resultierte in einer mit der Dosis zunehmenden prozentualen HPMA- und CEMA-Ausscheidung von 11 - 22 % der aufgenommenen Acrolein-Menge. Sowohl nach i.p. Acrolein-Gabe als auch nach inhalativer Aufnahme betrug die CEMA-Ausscheidung weniger als ein Zehntel der Gesamt-Mercaptursäure-Ausscheidung (Linhart *et al.*, 1996).

Die Eliminationskinetik von HPMA und CEMA wurde ebenfalls in einer Humanstudie an einem männlichen Probanden nach oraler Gabe von Acrolein gelöst in Trinkwasser untersucht. Der Acrolein-Aufnahme war eine 24-stündige Acrylamid- und Acrolein-arme Ernährung vorangestellt. Die Aufnahme-menge an Acrolein lag bei 615 µg, was 7,5 µg/kg KG und somit dem TDI von Acrolein entsprach. Diese Acrolein-Aufnahme führte sowohl zu einem Anstieg der HPMA- als auch der CEMA-Ausscheidung. Die maximale Ausscheidung der beiden Mercaptursäuren erfolgte im Zeitraum 0 - 2 h. In diesem Zeitraum lag die HPMA-Ausscheidung ($1,61 \pm 0,34$ µmol/g Kreatinin) über der CEMA-Ausscheidung ($1,05 \pm 0,06$ µmol/g Kreatinin). In den folgenden Urinsammelzeiträumen (2 - 24 h) war die HPMA-Ausscheidung vergleichbar zur CEMA-Ausscheidung oder lag unter dieser (HPMA: 0,4 - 0,9 µmol/g Kreatinin, CEMA: 0,4 - 1,0 µmol/g Kreatinin). Innerhalb von 24 Stunden wurden 26 % der Acrolein-Dosis als HPMA und CEMA ausgeschieden, wobei in vergleichbaren Anteilen HPMA und CEMA ausgeschieden wurde (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). In einer weiteren Humanstudie wurde die Eliminationskinetik der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA nach Aufnahme von 4,6 µg Acrolein über Kartoffelchips untersucht. Vor Verzehr der Kartoffelchips fasteten die Probanden (n = 5) für zwölf Stunden. Nach dem Verzehr der Kartoffelchips stieg die HPMA-Ausscheidung von $0,18 \pm 0,02$ µmol/g Kreatinin auf $0,47 \pm 0,15$ µmol/g Kreatinin (t_{max} : 2 - 4 h) und die CEMA-Ausscheidung stieg von $0,06 \pm 0,01$ µmol/g Kreatinin auf $0,35 \pm 0,11$ µmol/g Kreatinin (t_{max} : 4 - 6 h). Ein Anstieg der HPMA-Ausscheidung wurde auch nach Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips mit unbekanntem Acrolein-Gehalt durch 13 Probanden beobachtet. Dem Verzehr der selbst hergestellten Kartoffelchips war ebenfalls eine 12-stündige Fastenperiode vorangestellt und die maximale HPMA-Ausscheidung ($66,6 \pm 44,1$ µmol/g Kreatinin) erfolgte im Zeitraum von 2 - 4 h nach Verzehr der Kartoffelchips (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Diese und weitere Humanstudien in denen HPMA und CEMA als Biomarker bestimmt wurden sind im Kapitel 2.3.6.2 Abschnitt *Mercaptursäuren als Expositionsbiomarker* (S. 65 ff.) nachmals aufgeführt.

2.3.5 Toxikodynamik

Für Acrolein sind akute, subchronische und chronische Effekte sowie ein genotoxisches und mutagenes Potential beschrieben. Ob Acrolein ein humanes Kanzerogen darstellt, ist nicht geklärt.

Acrolein ist ein deutlich stärkerer Michael-Adduktbildner als Acrylamid und reagiert rascher mit SH-Gruppen von Glutathion. Außerdem reagiert Acrolein auch mit Cysteinresten in Enzymen und funktionellen Proteinen, was zur Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse wie Signaltransduktion, Transkription oder DNA-Reparatur führt. Auch die Reaktion mit DNA-Basen und die DNA-Addukt-Bildung wurden nachgewiesen (SKLM, 2012).

2.3.5.1 Akute Toxizität

Die akute Toxizität von Acrolein wurde *in vivo* an Ratten, Mäusen und Hamstern untersucht. Es wurden LD₅₀-Werte von 7 - 46 mg/kg KG nach oraler Gabe und von 18 - 151 mg/m³ (8 - 66 ppm) nach inhalativer Exposition für vier oder sechs Stunden bestimmt (WHO, 2002).

2.3.5.2 Subchronische Toxizität

Zur subchronischen Toxizität von Acrolein wurde durch das NTP eine 14-wöchige Studie an F344/N-Ratten (n = 10 pro Geschlecht und Dosisgruppe) durchgeführt, bei der die Acrolein-Gabe (0; 0,75; 1,25; 2,5; 5 oder 10 mg/kg KG/d) per Schlundsonde in 0,5 % Methylcellulose an fünf Tagen die Woche erfolgte. In der höchsten Dosisgruppe wurde am Ende der Studie ein reduziertes Körpergewicht verglichen zur Kontrollgruppe festgestellt und 16 von 20 Tieren verstarben in der neunten Studienwoche. Bei weiblichen Tieren wurde ab Acrolein-Gabe von 1,25 mg/kg KG/d eine erhöhte Inzidenz für Hyperplasien des Plattenepithels des Vormagens festgestellt. Diese war ab Acrolein-Gabe von 2,5 mg/kg KG/d signifikant. Männliche Tiere wiesen ab Acrolein-Gabe von 2,5 mg/kg KG/d eine erhöhte Inzidenz für Hyperplasien des Plattenepithels des Vormagens auf, welche ab 5,0 mg/kg KG/d signifikant war. Die Inzidenz für Magenblutungen, Entzündungen der Nase und Hyperplasien des Knochenmarks war bei beiden Geschlechtern in der höchsten Dosisgruppe signifikant erhöht. Weibliche Tiere der höchsten Dosisgruppe wiesen außerdem vermehrt Nekrosen von Thymozyten auf. Über den gesamten Dosisbereich wurde keine erhöhte Tumorzinzidenz festgestellt (NTP, 2006; Auerbach *et al.*, 2008).

Analog zur Studie an Ratten wurde auch eine 14-wöchige Studie an B6C3F1-Mäusen (n = 10 pro Geschlecht und Dosisgruppe) im Rahmen des NTPs durchgeführt. Die Acrolein-Gabe (0; 1,25; 5; 10 oder 20 mg/kg KG/d) erfolgte ebenfalls an fünf Tagen pro Woche per Schlundsonde in 0,5 % Methylcellulose. Die Mäuse der höchsten Dosisgruppe verstarben innerhalb der ersten Studienwoche. Ab einer Acrolein-Gabe von 1,25 mg/kg KG/d wurden Hyperplasien des Plattenepithels des Vormagens festgestellt. Eine signifikant gesteigerte Inzidenz dieses Effektes wurde ab einer Acrolein-Gabe von 2,5 mg/kg KG/d nachgewiesen. In der höchsten Dosisgruppe kam es außerdem zu einer erhöhten Inzidenz für Magenblutungen sowie für Nekrosen der Lymphknoten und des Thymus. Bei weiblichen Tieren war in der höchsten Dosisgruppe auch die Inzidenz für Epithelnekrosen und Entzündungen des Drüsenmagens erhöht und hat zu der beobachteten Mortalität beigetragen (NTP, 2006; Auerbach *et al.*, 2008).

An männliche und weibliche Beagle-Hunden (n = 6 pro Dosisgruppe und Geschlecht) gab es eine Ein-Jahres-Studie mit oraler gelatineverkapselter Acrolein-Gabe (0,1; 0,5 oder 1,5 mg/kg KG/d). Die tägliche Gabe an Acrolein in der höchsten Dosisgruppe wurde nach 4 Wochen von 1,5 auf 2,0 mg/kg KG/d erhöht. Als Haupteffekt, wurde mit zunehmender Dosis ein vermehrtes Erbrechen der Tiere festgestellt, wobei die Häufigkeit des Erbrechens über die Zeit abnahm, was wahrscheinlich auf eine Gewöhnung zurückzuführen war. Ein weibliches Tier der mittleren Dosisgruppe (0,5 mg/kg KG) verstarb an einer schweren Lungenentzündung, welche möglicherweise auf das Einatmen von Erbrochenem zurückzuführen war. In der höchsten Dosisgruppe (1,5 bzw. 2,0 mg/kg KG/d) wurde eine Veränderung der biochemischen Parameter (Albumin, Calcium und Gesamtprotein im Serum) festgestellt. Die pathologische Untersuch-

ung der Tiere ergab mit Ausnahme des verstorbenen Tiers der mittleren Dosisgruppe keine substanzspezifischen Befunde (Parent *et al.*, 1992a).

Eine Studie zur subchronischen Toxizität von Acrolein nach inhalativer Exposition wurde an männlichen F344-Ratten (n = 12 pro Dosisgruppe und Zeitpunkt) durchgeführt. Die Exposition mit Acrolein (0; 0,02; 0,06; 0,2; 0,6 oder 1,8 ppm) erfolgte für sechs Stunden am Tag, an fünf Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 13 Wochen. Histopathologische Untersuchungen des Respirationstraktes wurden nach 4, 14, 30 und 65 Expositionstagen durchgeführt sowie 60 Tage nach der letzten Exposition. Ab einer Acrolein-Exposition von 0,06 ppm wurde ein reduziertes Körpergewicht verglichen zur Kontrollgruppe festgestellt. Dosis-, zeit- und ortabhängig wurden Entzündungen, Hyperplasien und Metaplasien des olfaktorischen Epithels beobachtet. Für die nasalpathologischen Effekte wurde ein NOAEL von 0,2 ppm ermittelt (Dorman *et al.*, 2008).

2.3.5.3 Chronische Toxizität

Zur Untersuchung der chronischen Toxizität wurde Sprague-Dawley-Ratten (n = 70 pro Dosisgruppe und Geschlecht) über zwei Jahre Acrolein (0; 0,05; 0,5 oder 2,5 mg/kg KG/d) gelöst in Wasser per Schlundsonde verabreicht. Nach Acrolein-Gabe wurden bei allen Ratten reduzierte Kreatinin-Phosphokinase-Level verglichen zur Kontrollgruppe festgestellt, welche nicht erklärt werden konnten. Außerdem wurde eine gesteigerte frühe kumulative Mortalität beobachtet. Histopathologische Untersuchungen zeigten keine Auffälligkeiten (Parent *et al.*, 1992b).

2.3.5.4 Genotoxizität und Mutagenität

Zur Genotoxizität und Mutagenität von Acrolein wurde eine Vielzahl an *in vitro* Tests an tierischen sowie humanen Zelllinien durchgeführt und kontroverse Ergebnisse erhalten. Ebenfalls wurden *in vitro* sowie *ex vivo* DNA-Addukt nachgewiesen, welche auf die Reaktion von Acrolein mit DNA-Basen zurückzuführen waren. Mutagene Effekte zeigten sich *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. Auf einige ausgewählte Studienergebnisse wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

In vitro Tests, die mit tierischen Zelllinie durchgeführt wurden und kein mutagenes Potential von Acrolein zeigten, waren ein *cil*-Mutationstest in Fibroblastenzellen von BB-Mäusen (Kim *et al.*, 2007) und ein HPRT-Mutationstest mit und ohne metabolische Aktivierung durch S9-Mix an *chinese hamster ovary* (CHO)-K₁-BH₄-Säugerzellen (Parent *et al.*, 1991a). Ein mutagenes Potential von Acrolein konnte hingegen in der Hamster-Lungenzelllinie V79 nachgewiesen werden. Nach Inkubation der V79 Zellen mit Acrolein (0,1; 0,5; 1,0 oder 2,0 µM) wurde die Mutagenität ermittelt, in dem die Resistenz der Zellen gegenüber 6-Thioguanin bestimmt wurde. In Medium ohne FKS konnte ab einer Acrolein-Konzentration von 0,5 µM ein dosisabhängiger Anstieg der Mutagenität beobachtet werden. In FKS-haltigem Medium erfolgte nur bei der höchsten Konzentration von 2 µM ein Anstieg der Mutagenität. Es wurde vermutet, dass die in FKS enthaltenen Thiole und Proteine mit Lysin- und Histidin-Aminogruppen verantwortlich für den protektiven Effekt von FKS waren (Smith *et al.*, 1990). Ein SCE-Test in CHO-Zellen ohne S9-Mix zeigte ebenfalls mutagene Effekte bei der höchsten getesteten Acrolein-Konzentration von 1 µM, wohingegen im CA-Test in CHO-Zellen mit und ohne S9-Mix kein mutagenes Potential nachgewiesen werden konnte (Galloway *et al.*, 1987).

Auch *in vitro* Test, die mit humanen Zelllinien durchgeführt wurden, zeigten kontroverse Ergebnisse. Kein mutagenes Potential von Acrolein zeigten sich in ein *supF*-Mutationstest an humanen Fibroblasten (Kim *et al.*, 2007) sowie in ein HPRT-Mutationstest an humanen Fibroblasten (Curren *et al.*, 1988). Der HPRT-Mutationstest zeigte jedoch ein mutagenes Potential von Acrolein in humanen Fibroblastenzellen von Xeroderma Pigmentosum (XP) - Patienten. Hier wurde im Konzentrationsbereich von 0,2 - 0,8 μM Acrolein eine dosisabhängige Zunahme der Mutationsrate festgestellt (Curren *et al.*, 1988). Zu DNA-Schäden in Form von DNA-Strangbrüchen kam es in HepG2-Zellen durch Acrolein in geringen Konzentrationen (12,5 - 25 μM). DNA-Protein-Crosslinks wurden in HepG2-Zellen nach Inkubation mit höheren Acrolein-Konzentrationen (50 - 100 μM) nachgewiesen (Li *et al.*, 2008).

DNA-Addukte, welche auf die Reaktion von Acrolein mit DNA-Basen zurückzuführen waren, wurden *in vitro* und *ex vivo* nachgewiesen. Für die DNA-Addukte γ -OH-PdG und α -OH-PdG wurden Untersuchungen zur Genotoxizität und Mutagenität durchgeführt. γ -OH-PdG bildete im Gegensatz zu α -OH-PdG DNA-DNA-, DNA-Peptid- und DNA-Protein-Crosslinks, welche zu einer hohen Mutagenität führen können. In COS-7-Zellen wurden mittels Mutagenitätstests jedoch keine erhöhte Mutationsrate für γ -OH-PdG (7,4 %) verglichen zu α -OH-PdG (8,3 %) festgestellt (Sanchez *et al.*, 2003). Eine erhöhte Genotoxizität für α -OH-PdG verglichen zu γ -OH-PdG wurde in humanen Zellen festgestellt. α -OH-PdG führte zu einer deutlichen Blockade der DNA-Synthese und zum DNA-Basenaustausch. Diese Effekte wurden für γ -OH-PdG nicht festgestellt (Yang *et al.*, 2002).

In vivo Studien zur Genotoxizität und Mutagenität von Acrolein wurden an *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Keimzellmutagenität konnte im X-chromosomal-rezessiven-Letalmutationentest (*sex linkes recessive letal test*, SLRLT) nachgewiesen werden (Sierra *et al.*, 1991; Barros *et al.*, 1994a; Barros *et al.*, 1994b) und somatische Mutationen im w^+/w Test (Augenflecken-Test) sowie im *mwh/flr*-Test (Flügelflecken-Test) (Sierra *et al.*, 1991).

2.3.5.5 Kanzerogenität

Zur Kanzerogenität von Acrolein wurden verschiedenen Tierstudien durchgeführt, die keine kanzerogenen Effekte von Acrolein nachweisen konnten (Parent *et al.*, 1991b; Parent *et al.*, 1992b; von Tungeln *et al.*, 2002). Eine Studie liefert Hinweise auf eine mögliche Tumor-induzierende Aktivität von Acrolein (Cohen *et al.*, 1992).

An männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 70$ pro Dosisgruppe und Geschlecht) wurde eine Zwei-Jahres-Toxizitäts- und Kanzerogenitätsstudie durchgeführt, bei der die Tiere über 18 Monate täglich Acrolein in Wasser (0; 0,5; 2,0 oder 5,0 mg/kg KG/d) erhielten. Es wurde eine erhöhte Mortalität, jedoch kein signifikanter Anstieg von nicht-neoplastischen oder neoplastischen Läsionen festgestellt (Parent *et al.*, 1992b).

Ebenfalls wurde eine Studie an CD-1-Mäusen ($n = 70 - 75$ pro Dosisgruppe und Geschlecht) durchgeführt, bei der die orale Acrolein-Gabe (0; 0,5; 2,0 oder 4,5 mg/KG/d) mittels Schlundsonde über 18 Monate erfolgte. Bei exponierten Tieren wurde ein vermindertes Körpergewicht und bei männlichen Tieren vor allem bei hohen Acrolein-Dosen eine erhöhte Mortalität festgestellt. Es wurde keine erhöhte Inzidenz von nicht-neoplastischen oder neoplastischen Läsionen beobachtet (Parent *et al.*, 1991b).

Auch die Untersuchung von B6C3F1-Mäusen ($n = 23 - 24$ pro Dosisgruppe) auf Lebertumore nach i.p. Gabe von Acrolein an Tag 8 und Tag 15 nach der Geburt, welche zu einer Acrolein-Aufnahme von insgesamt 75 bzw. 150 nmol führte, resultierte im Zeitraum von 15 bzw. 12 Monaten nicht in einer signifikanten Erhöhung der Tumorinzidenz verglichen zur Kontrollgruppe (von Tungeln *et al.*, 2002).

Eine mögliche Tumor-induzierende Aktivität von Acrolein wurde in einer Studie an männlichen F344-Ratten ($n = 30 - 40$ je Gruppe) nach Acrolein- und Uracil-Gabe festgestellt. Es erfolgte für sechs Wochen zweimal wöchentlich eine i.p. Acrolein-Gabe (2 mg/kg KG), anschließend folgte für 20 Wochen eine Uracil-Gabe (3 % der Nahrung), gefolgt von der Gabe einer Kontrollnahrung für weitere sechs Wochen. Durch die Acrolein-Gabe und die nachfolgende Uracil-Gabe war die Inzidenz für Papillome um 60 % erhöht. Die alleinige Uracil-Gabe führte zu einer erhöhten Inzidenz für Papillome von 27 % verglichen zur Kontrollgruppe, in der keine Tumore beobachtet wurden (Cohen *et al.*, 1992).

Aufgrund der vorliegenden Daten wurde Acrolein durch die IARC in die Gruppe 3 eingestuft, was bedeutet, dass Acrolein nicht als Humankarzinogen klassifizierbar ist (IARC, 1995). Die US-EPA schlussfolgerte ebenfalls, dass die Daten für eine Bewertung von Acrolein als Humankarzinogen unzureichend seien (US-EPA, 2003). Die MAK-Kommission der DFG stufte Acrolein in die Kategorie 3B ein, welche für unzureichend untersuchte Stoffe mit Verdacht auf eine krebserzeugende Wirkung gedacht ist. Begründet wurde diese Einordnung durch die *in vitro* und in Drosophila-Tests nachgewiesene Genotoxizität, die hohe Reaktivität sowie die nicht ausreichend untersuchte endogene Belastung mit Acrolein (MAK-Kommission, 2012a).

2.3.6 Expositionsabschätzung

2.3.6.1 Expositionsabschätzung mittels Umweltmonitoring

Als Luftschadstoff, der durch Verbrennungsprozesse entsteht, wurde Acrolein in geringen Konzentrationen in Außen- sowie in Raumluft nachgewiesen. Des Weiteren kann es durch Verzehr von Acrolein-haltigen Lebensmitteln und durch Tabakkonsum zu einer Acrolein-Exposition kommen. Eine erhöhte Exposition kann auch am Arbeitsplatz z. B. durch Kochdämpfe in Großküchen erfolgen. Eine Abschätzung der Acrolein-Exposition ist basierend auf den Acrolein-Konzentrationen bzw. -gehalten in Außen- oder Raumluft, Lebensmitteln, Tabakrauch oder Kochdämpfen möglich.

Exposition über Außenluft

In Außenluft wurde durch die US-EPA Acrolein-Konzentrationen im Bereich von 8,2 bis 24,6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mit einer durchschnittlichen Konzentration von 14,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ermittelt. Bestimmt wurden diese Acrolein-Konzentrationen in zwei städtischen Regionen von 1961 bis 1980 ((US-EPA, 1993) aus (US-EPA, 2003)). Basierend auf dieser durch die US-EPA ermittelten durchschnittlichen Acrolein-Konzentration und einem Atemvolumen von 10,8 m^3/d ergab sich nach Stevens und Maier eine mittlere Acrolein-Exposition über die Außenluft von 154 $\mu\text{g}/\text{d}$ (Stevens und Maier, 2008), die bei einem Körpergewicht von 60 kg einer Exposition von 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ entspricht. Von der SKLM (2012) wurde ebenfalls die durch die US-EPA ermittelte durchschnittliche Acrolein-Konzentration von 14,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zugrunde gelegt und unter Annahme eines Atemvolumens von 20 m^3/d eine mittlere Acrolein-Exposition über die Außenluft von

286 µg/d ermittelt (SKLM, 2012), welche bei einem Körpergewicht von 60 kg einer Exposition von 4,8 µg/kg KG/d entspricht.

Umfangreichere Untersuchungen zur Acrolein-Konzentration in Außenluft wurden in Kanada durchgeführt. Im Rahmen des *National Air Pollution Surveillance* (NAPS) Programm wurden im Zeitraum von acht Jahren (1989 - 1996) 2816 Proben in ländlichen, vorstädtischen und städtischen Regionen (n = 15) genommen und auf ihren Acrolein-Gehalt untersucht. In städtischen Regionen reichten die Konzentrationen von < 0,05 bis 2,47 µg/m³, in vorstädtischen Regionen von < 0,05 bis 1,85 µg/m³, in ländlichen Regionen von < 0,05 bis 0,5 µg/m³. Die mittlere Acrolein-Konzentration aller Proben lag bei 0,18 µg/m³ ((Enviroment Canada, 1996) aus (Enviroment Canada, 2000)). Wird diese mittlere Acrolein-Konzentration, ein Atemvolumen von 20 m³/d sowie ein Körpergewicht von 60 kg zugrunde gelegt, ergibt sich eine Acrolein-Exposition über die Außenluft von nur 0,06 µg/kg KG/d.

Exposition über Raumluf

In verschiedenen Studien wurden die Acrolein-Konzentrationen in Außenluft sowie in Innenräumen bestimmt. In Windsor (Ontario, Kanada) wurden Außenluftproben (n = 29) verglichen mit Raumlufproben (n = 29) untersucht, wobei die Acrolein-Konzentrationen in Raumluf 2- bis 20-fach höher waren. In Außenluftproben wurden Acrolein-Konzentrationen von < 0,05 bis 0,5 µg/m³ bestimmt mit einer mittleren Acrolein-Konzentration von 0,16 µg/m³. Die Konzentrationen in Raumluf reichten von 0,4 bis 8,1 µg/m³ und lagen im Mittel bei 3,0 µg/m³ ((Bell *et al.*, 1994; Bell, 1995) aus (Enviroment Canada, 2000)). Untersuchungen in Wohnungen (n=11) in Hamilton (Ontario, Kanada) ergaben Acrolein-Konzentrationen in der Raumluf von < 0,05 bis 5,4 µg/m³ mit einer mittleren Konzentration von 1,1 µg/m³, wobei in der Außenluft kein Acrolein detektiert wurde (LOD: 0,05 µg/m³) ((Bell, 1996; Bell, 1997) aus (Enviroment Canada, 2000)). In Wohnungen (n=9) in Los Angeles, Placer und Yolo (USA) lagen die Acrolein-Konzentrationen in der Raumluf bei 2,1 bis 12,2 µg/m³. Erhöhte Konzentrationen wurden nach dem Kochen beobachtet. Die Acrolein-Konzentrationen in der Raumluf waren 3- bis 40-fach höher als die Konzentrationen in der Außenluft, welche bei 0,09 bis 1,7 µg/m³ lagen (Seaman *et al.*, 2007). Bei Annahme eines Atemvolumens von 20 m³/d sowie eines Körpergewichts von 60 kg ergibt sich aus den bestimmten Acrolein-Konzentrationen in der Raumluf (< 0,05 bis 12,2 µg/m³) eine Acrolein-Exposition von < 0,02 bis 4,1 µg/kg KG/d.

Von der IARC wurden Daten zu Raumlufkonzentrationen von Acrolein in rauchbelasteten Innenräumen von Cafés und Restaurants zusammengetragen. Die Acrolein-Konzentrationen reichten von 2 bis 275 µg/m³ (IARC, 1995). Wird von einem Atemvolumen von 20 m³/d sowie einem Körpergewicht von 60 kg ausgegangen ergeben sich für die Acrolein-Exposition durch rauchbelastete Raumluf Werte von 0,7 bis 92 µg/kg KG/d.

Exposition durch Lebensmittel

Die Gehalte von Acrolein in einigen Lebensmitteln sind in Kapitel 2.3.3 in Tabelle 6 zusammengefasst. Da bisher jedoch nur in wenigen Lebensmitteln Acrolein-Gehalte bestimmt wurden, ist keine zuverlässige Abschätzung der Acrolein-Exposition durch die Nahrung möglich. Eine *worst case* Expositionsabschätzung unter Verwendung der bestimmten maximalen Acrolein-Gehalte und hohem Verzehr von

Acrolein-haltigen Lebensmitteln ergab eine *worst case* Acrolein-Exposition von 17 µg/kg KG/d (SKLM, 2012).

Exposition durch Tabakkonsum

Eine weitere Acrolein-Expositionsquelle stellt Tabakrauch dar. Im Zigarettenrauch wurden Acrolein-Konzentrationen von 3 - 220 µg/Zigarette nachgewiesen (IARC, 1995). Die SKLM hat basierend auf einem mittleren Acrolein-Gehalt in Zigarettenrauch von 100 µg/Zigarette und einem Zigarettenkonsum von 20 Zigaretten/Tag eine Acrolein-Exposition von 2 mg/d berechnet (SKLM, 2012), was bei einem Körpergewicht von 60 kg einer Exposition von 33 µg/kg KG/d entspricht.

Exposition am Arbeitsplatz

Angestellte in Großküchen sind einer erhöhten Acrolein-Exposition ausgesetzt. Die Acrolein-Konzentrationen in gewerblichen Großküchen, in denen Acrolein vor allem durch Erhitzen von Speiseölen entsteht, lagen bei bis zu 547 µg/m³ (Schuh, 1992). Wird von einer Exposition über acht Stunden, einem Atemvolumen von 10 m³ innerhalb dieser acht Stunden und einem Körpergewicht von 60 kg ausgegangen, entspricht dies einer täglichen Acrolein-Aufnahme von bis zu 91 µg/kg KG/d.

2.3.6.2 Expositionsabschätzung mittels Humanbiomonitoring

Zum Humanbiomonitoring können verschiedenen Biomarker verwendet werden. Bisher wurden sowohl Mercaptursäuren in Urin als auch DNA-Addukte in Blut oder Gewebe als Biomarker der Acrolein-Exposition genutzt. Mittels Humanbiomonitoring wird sowohl die exogene als auch die endogene Acrolein-Exposition erfasst.

Mercaptursäuren als Expositionsbiomarker

Die Mercaptursäuren HPMA und CEMA wurden in verschiedenen Humanstudien als Kurzzeitbiomarker verwendet. Eine Übersicht über einige Biomarkerstudien gibt Tabelle 7 (HPMA) und Tabelle 8 (CEMA). Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Mercaptursäure-Ausscheidungen einheitlich in nmol/l bzw. µmol/g Kreatinin angegeben, wenn nötig erfolgte eine Umrechnung. Die angebenen Biomarkerstudien ermöglichten es, Unterschiede der Acrolein-Exposition von Rauchern und Nichtrauchern zu untersuchen. Ebenfalls konnte ein Einfluss der Ernährung sowie von häufigem Kochen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung nachgewiesen werden.

Bei Nichtrauchern lag die bestimmte mittlere HPMA-Ausscheidung bei 700 - 2746 nmol/l bzw. 0,51 - 2,23 µmol/g Kreatinin. Die mittlere Ausscheidung von Rauchern war mit 2394 - 7597 nmol/l bzw. 4,00 - 13,11 µmol/g Kreatinin deutlich höher. Auch die CEMA-Ausscheidung war bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern. Nichtraucher wiesen im Mittel eine CEMA-Ausscheidung von 15 - 505 nmol/l bzw. 0,18 µmol/g Kreatinin auf und Raucher eine Ausscheidung von 215 - 1478 nmol/l bzw. 1,02 µmol/g Kreatinin (Carmella *et al.*, 2007; Schettgen *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Eckert *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Jain, 2015a; Li *et al.*, 2015; Higashi *et al.*, 2016).

Zwei Biomarkerstudien mit dem Ziel, den Einfluss der Ernährung auf die Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren zu untersuchen, konnten zeigen, dass die Ausscheidung von HPMA und

CEMA nach Verzehr von Kartoffelchips anstieg. Der Verzehr von 150 g selbst hergestellten Kartoffelchips mit unbekanntem Acrolein-Gehalt resultierte in einem Anstieg der HPMA-Ausscheidung von $11,6 \pm 28,8 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin auf $66,6 \pm 44,1 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin. Nach dem Verzehr von 175 g kommerziell erhältlichen Kartoffelchips mit einem Acrolein-Gehalt von $26,5 \pm 2,1 \mu\text{g/kg}$ stieg die HPMA-Ausscheidung von $0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin auf $0,47 \pm 0,15 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin und die CEMA-Ausscheidung von $0,06 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin auf $0,35 \pm 0,11 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin. In beiden Studien war dem Verzehr der Kartoffelchips eine elfstündige Fastenperiode vorangegangen (Watzek *et al.*, 2012b).

Tabelle 7: Humanstudien zur HPMA-Ausscheidung, (1) HPMA-Ausscheidung von Nichtrauchern vs. Rauchern (2), HPMA-Ausscheidung nach Verzehr von hocherhitzten Lebensmitteln, (3) HPMA-Ausscheidung abhängig vom Kochverhalten, (4) HPMA-Ausscheidung von Kindern

Personengruppe	n	HPMA - Mittelwert/Median (min - max)		Literatur
		[nmol/l]	[$\mu\text{mol/g}$ Kreatinin]	
(1) Nichtraucher	74		2,23*	(Higashi <i>et al.</i> , 2016)
Raucher	16		7,40*	
Nichtraucher	1260	1805* (σ) / 1544* (φ)		(Jain, 2015a)
Raucher	888	2394* (σ) / 3071* (φ)		
Nichtraucher	8	1846*		(Li <i>et al.</i> , 2015)
Raucher	20	6684*		
Nichtraucher	58	2746*		(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
Raucher	246	6694*		
Nichtraucher	54	809 [□] (147 - 10.507)	0,66 [□] (0,18 - 7,06)	(Eckert <i>et al.</i> , 2011)
Raucher	40	5509 [□] (242 - 17.151)	4,00 [□] (0,47 - 19,99)	
Nichtraucher	6	1544*	1,40*	(Yan <i>et al.</i> , 2010)
Raucher	7	6919*	9,35*	
Nichtraucher	59	(< LOD - 578)	0,20* (< LOD - 1,11)	(Ding <i>et al.</i> , 2009)
Raucher	61	(366 - 18.213)	4,89* (0,34 - 16,62)	
Nichtraucher	14	700 [□] (167 - 3299)	0,51 [□] (0,26 - 4,93)	(Schettgen <i>et al.</i> , 2008)
Raucher	14	7597 [□] (597 - 24.156)	7,37 [□] (0,96 - 19,17)	
Nichtraucher	21		0,68 [□]	(Carmella <i>et al.</i> , 2007)
Raucher	35 (25)		2,90 [□] (1,33 - 10,10)	
+ Abstinenz (4 Wochen)	25		(0,30 - 1,30)	
<hr/>				
(2) Nichtraucher				(Watzek <i>et al.</i> , 2012b)
+ Fasten (11 h)	6		11,6* / 1,96 [□] (C_{predose})	
+ Chips (? μg AC)	6		66,6* (C_{max})	
+ Fasten (11 h)	5		0,18* (C_{predose})	
+ Chips (4,6 μg AC)	5		0,47* (C_{max})	
<hr/>				
(3) Nichtraucher				(Hecht <i>et al.</i> , 2015)
+ Kochen (\leq 1 Mal/Woche)	100		1,90 (1,5 - 2,3)	
+ Kochen (2 - 6 Mal/Woche)	150		1,99 (1,73 - 2,30)	
+ Kochen (\geq 7 Mal/Woche)	100		2,60 (2,19 - 3,09)	
<hr/>				
(4) Kinder	417	1127* (σ) / 1095* (φ)		(Jain, 2015b)

AC: Acrolein, C_{max} : maximale Konzentration, C_{predose} : Ausgangskonzentration vor Chipsverzehr, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, LOD: Nachweisgrenze, n: Anzahl der Probanden, *Mittelwert, [□]Median, HPMA-Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$ bzw. $\mu\text{g/g}$ Kreatinin wurden unter Verwendung der molaren Masse von HPMA (221,27 g/mol) in mol/l bzw. $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin umgerechnet.

Tabelle 8: Humanstudien zur CEMA-Ausscheidung, (1) CEMA-Ausscheidung von Nichtrauchern vs. Rauchern, (2) CEMA-Ausscheidung nach Verzehr von hocherhitzten Lebensmitteln, (3) CEMA-Ausscheidung von Kindern

Personengruppe	n	CEMA - Mittelwert/Median (min - max)		Literatur
		[nmol/l]	[μ mol/g Kreatinin]	
(1) Nichtraucher	1260	505* (σ) / 430* (φ)		(Jain, 2015a)
Raucher	888	641* (σ) / 802* (φ)		
Nichtraucher	8	845*		(Li <i>et al.</i> , 2015)
Raucher	20	1478*		
Nichtraucher	58	15*		(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
Raucher	246	215*		
Nichtraucher	59	(< LOD - 400)	0,18* (< LOD - 0,67)	(Ding <i>et al.</i> , 2009)
Raucher	61	(123 - 5271)	1,02* (0,11 - 3,16)	

(2) Nichtraucher				(Watzek <i>et al.</i> , 2012b)
+ Fasten (11 h)	5		0,06 [□] ($C_{predose}$)	
+ Chips (4,6 μ g AC)	5		0,35* (C_{max})	

(3) Kinder	417	320* (σ) / 354* (φ)		(Jain, 2015b)

AC: Acrolein, CEMA: N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, C_{max} : maximale Konzentration, $C_{predose}$: Ausgangskonzentration vor Chipsverzehr, LOD: Nachweisgrenze, n: Anzahl der Probanden, *Mittelwert, [□]Median, [†]Verzicht auf frittierte und gebackene Lebensmittel, CEMA-Konzentrationen in μ g/l bzw. μ g/g Kreatinin wurden unter Verwendung der molaren Masse von CEMA (235,26 g/mol) in mol/l bzw. μ mol/g Kreatinin umgerechnet.

Der Einfluss des Kochverhaltens auf die Acrolein-Exposition wurde ebenfalls durch eine Biomarkerstudie untersucht. Asiatische Frauen, die nicht oder maximal einmal die Woche selbst gekocht hatten, wiesen eine mittlere HPMA-Ausscheidung von 1,90 μ mol/g Kreatinin auf und Frauen, die zwei- bis sechsmal pro Wochen gekocht hatten, hatten eine mittlere HPMA-Ausscheidung von 1,99 μ mol/g Kreatinin. Die Frauen, die mehr als siebenmal pro Woche selbst gekocht hatten, wiesen eine nochmals gesteigerte mittlere HPMA-Ausscheidung von 2,60 μ mol/g Kreatinin auf (Hecht *et al.*, 2015).

Neben dem Vergleich von verschiedenen Bevölkerungsgruppen ermöglichen Biomarkerstudien auch eine Expositionsabschätzung. Zur Abschätzung der Acrolein-Exposition wurde von Abraham *et al.* (2011) eine mittlere HPMA-Ausscheidung bei Nichtrauchern von 155 μ g/l (Schettgen *et al.*, 2008) und 179 μ g/l (Eckert *et al.*, 2011) zugrunde gelegt. Außerdem wurden ein Körpergewicht von 60 kg, ein Tagesurinivolumen von 1,5 l und eine HPMA-Ausscheidung von 50 % des aufgenommenen Acroleins angenommen. Aus diesen Annahmen ergab sich eine Acrolein-Exposition von 124 - 143 μ g/d bzw. von 2,1 - 2,4 μ g/kg KG/d. Berechnungen ausgehend von maximalen ermittelten HPMA-Konzentrationen ergaben, dass eine Exposition von bis zu 30 μ g/kg KG/d erreicht werden kann. Die Autoren merkten an, dass diese Expositionsabschätzung mit gewissen Unsicherheiten behaftet sei. Unsicherheiten ergeben sich dadurch, dass die prozentuale Ausscheidung von Acrolein als HPMA beim Menschen nicht bekannt ist. Außerdem kann es, wenn zur Expositionsabschätzung Acrolein-Gehalten im Morgenurin verwendet werden, zur Unterschätzung der Exposition kommen, falls die Acrolein-Aufnahme am Vortag um die Mittagszeit erfolgt ist, da die Halbwertszeit von Acrolein bei circa fünf Stunden liegt. Zur Überschätzung der oralen Acrolein-Exposition kann es dadurch kommen, dass bei der Bestimmung der Mercaptursäuren als Biomarker auch eine inhalative Exposition sowie eine endogene Bildung mit erfasst wird (Abraham *et al.*, 2011).

Die SKLM-Kommission der DFG führte ebenfalls eine Expositionsabschätzung für Acrolein durch. Bei dieser Abschätzung wurde die 24-h-HPMA-Ausscheidung zugrunde gelegt. Als unteres Level der HPMA-

Ausscheidung wurden 200 - 300 µg/d angesehen und als oberes Level 800 - 1000 µg/d. Für die Ausscheidung von HPMA wurde analog zur Ratte eine Ausscheidung von 20 % des aufgenommenen Acroleins als HPMA angenommen. Es ergab sich eine Acrolein-Exposition von 300 - 1400 µg/d, welche bei einem Körpergewicht von 60 kg einer Exposition von 5 - 24 µg/kg KG/d entspricht (SKLM, 2012).

DNA-Addukte als Expositionsbiomarker

Neben den Mercaptursäuren HPMA und CEMA eignen sich auch die DNA-Addukte γ -OH-PdG und α -OH-PdG als Biomarker einer Acrolein-Exposition.

Das DNA-Addukt γ -OH-PdG, welches auf die Reaktion von Acrolein mit der DNA-Base Guanin zurückzuführen ist, stellt das vorwiegend gebildete DNA-Addukt dar und wurde bereits in verschiedenen Humangeweben quantifiziert. In der DNA, welche aus den Lungengewebe von männlichen und weiblichen Probanden (n = 30) isoliert wurde, wurden γ -OH-PdG-Gehalte von 6 - 159 Addukten/10⁹ Nukleotiden nachgewiesen. Zwischen Rauchern und Nichtrauchern ergab sich kein signifikanter Unterschied (Zhang *et al.*, 2007). Ebenfalls kein signifikanter Unterschied zeigte der Vergleich der γ -OH-PdG-Gehalte von Rauchern (n = 25) und Nichtrauchern (n = 25) in DNA, welche aus Leukozyten isoliert wurde. Es wurden Gehalte von 3 - 26 Addukten/10⁹ Nukleotiden bestimmt (Zhang *et al.*, 2011). In der DNA aus Zahnfleischgewebe von Rauchern (n = 12) wurden hingegen signifikant höhere Gehalte an γ -OH-PdG verglichen zu Nichtrauchern (n = 11) nachgewiesen. Die γ -OH-PdG-Gehalte von Rauchern lagen bei $1,36 \pm 0,90$ µmol/mol Guanin und die der Nichtraucher bei $0,46 \pm 0,26$ µmol/mol Guanin (Nath *et al.*, 1998). In der DNA, welche aus Lebergewebe von fünf Probanden isoliert wurde, wurden γ -OH-PdG-Gehalte von 0,3 - 2,0 Addukten/10⁶ Guanin bestimmt. Über den Raucherstatus der Probanden lag keine Information vor (Nath und Chung, 1994).

Als weiteres DNA-Addukt wurde auch α -OH-PdG, welches ebenfalls auf die Reaktion von Acrolein mit der DNA-Base Guanin zurückzuführen ist, in der DNA, welche aus Lungengewebe oder Leukozyten isolierte wurde, nachgewiesen. Zwischen Rauchern und Nichtrauchern ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die α -OH-PdG-Gehalte in der DNA, welche aus Lungengewebe isoliert wurde, lagen bei 13 - 54 Addukte/10⁹ Nukleotide (Zhang *et al.*, 2007) und in der aus Leukozyten isolierten DNA reichten sie von nicht nachweisbar bis 8 Addukte/10⁹ Nukleotide (Zhang *et al.*, 2011).

2.3.7 Risikocharakterisierung

Zur Risikocharakterisierung von Acrolein wurde von der WHO ein TDI ermittelt. Hierzu wurde als empfindlichster Endpunkt Hyperplasien im Epithel des Vormagens von F344-Ratten festgelegt. Der aus einer 13-wöchigen NTP-Studie ermittelte NOAEL lag bei 0,75 mg/kg KG/d und resultierte in einem TDI von 7,5 µg/kg KG/d (WHO, 2002).

Die SKLM verglich in einer Stellungnahme (2012) den ermittelten TDI-Wert mit der über Biomarker abgeschätzten Acrolein-Exposition von circa 2 - 30 µg/kg KG/d. Es wurde zeigt sich, dass die abgeschätzte Acrolein-Exposition nahe an bzw. über dem TDI lag. Dies lieferte Hinweise auf ein Gesundheitsrisiko durch Acrolein, allerdings sind zu einer endgültigen Risikocharakterisierung weitere Daten nötig. Speziell die Frage, zu welchen Anteilen die verschiedenen Expositionsquellen wie Acrolein-haltige Lebensmittel, belastete Außen- und Raumluft oder eine endogene Bildung zur Exposition beitragen, bleibt zu klären (SKLM, 2012).

3 Problemstellung

Die α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen Acrylamid und Acrolein besitzen beide eine große toxikologische Relevanz. Für Acrylamid sind im Tierversuch kanzerogene, neurotoxische und reproduktionstoxische Wirkungen beschrieben und es wurde von der IARC als „möglicherweise krebserzeugend beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft (IARC, 1994). Acrolein ist aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht als Humankanzerogen klassifizierbar (Gruppe 3) (IARC, 1995). Basierend auf nicht-neoplastischen Effekten im Gastrointestinaltrakt der Ratte wurde für Acrolein jedoch ein TDI von 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ abgeleitet (WHO, 2002), der im Bereich der abgeschätzten Verbraucherexposition liegt (SKLM, 2012).

Sowohl Acrylamid als auch Acrolein stellen hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminanten dar. Acrylamid entsteht hauptsächlich während der Maillard-Reaktion aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren wie Asparagin (Mottram *et al.*, 2002). Lebensmittel, die hohe Acrylamid-Gehalte aufweisen, sind hochoverhitzte Kartoffelprodukte wie Chips oder Pommes frites und Getreideprodukten wie Knäckebrot oder Lebkuchen (EFSA, 2015a). Acrolein wurde in hohen Gehalten in erhitzten Fetten und Ölen nachgewiesen (Granvogl, 2014), wobei der zugrundeliegende Bildungsmechanismus vor allem auf einer Acrolein-Bildung ausgehend von ungesättigten Fettsäure-Resten von Triacylglyceriden basiert (Ewert *et al.*, 2014).

Eine möglichst genaue Abschätzung der Exposition ist zur Risikobewertung unerlässlich. Zur Expositionsabschätzung können die Gehalte in der Umwelt bzw. in Lebensmitteln bestimmt werden (Umwelt- bzw. Lebensmittelmonitoring) oder es kann eine Expositionsabschätzung durch Bestimmung von Biomarkern in biologischen Proben wie Blut oder Urin erfolgen (Humanbiomonitoring).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Biomarker der alimentären Acrylamid-Exposition zu etablieren. Hierzu wurde eine Studie (Humanstudie I) durchgeführt, bei der die Acrylamid-Aufnahme über hochoverhitzte Lebensmittel im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung erfolgte. Eine vergleichbare Humanstudie existierte bis zu diesem Zeitpunkt nicht. Die Studie wurde mit 14 männlichen Probanden in einer kontrollierten Umgebung mit einem vorgegebenen Ernährungsplan durchgeführt. Der Ernährungsplan beinhaltete mehrere Tage, an denen eine Acrylamid-minimierte Ernährung (*washout*) verzehrt wurde, sowie einen Tag mit einer mittleren alimentären Acrylamid-Aufnahme (*medium AA*) und einen Tag mit einer hohen alimentären Acrylamid-Aufnahme (*high AA*). Wie von der EFSA (2015a) empfohlen handelte es sich bei Humanstudie I um eine Duplikatstudie, bei der sowohl eine Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in den verzehrfertigen Lebensmitteln (Duplikat-Mahlzeiten) als auch eine Bestimmung der Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Urin der Probanden erfolgt ist. Anhand der ermittelten Acrylamid-Gehalte in den Duplikat-Mahlzeiten wurde die tägliche alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probanden bestimmt. Die AAMA- und GAMA-Ausscheidung der Probanden wurde mit der ermittelten mittleren (*medium AA*, Tag 4) sowie hohen (*high AA*, Tag 7) alimentären Acrylamid-Aufnahme korreliert. Ebenfalls wurde die Kinetik der AAMA- und GAMA-Ausscheidung nach mittlerer und hoher Acrylamid-Aufnahme betrachtet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es den Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA und der Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln zu untersuchen. Hinweise auf einen derartigen Zusammenhang lieferten Studien von Watzek *et al.* (2012b), bei denen nach Verzehr von Kartoffelchips eine gesteigerte HPMA- und CEMA-Ausscheidung

nachgewiesen wurde. Im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung wurde der Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln bisher nicht untersucht. Hierzu wurde zunächst die HPMA- und CEMA-Ausscheidung im Urin der Probanden aus Humanstudie I bestimmt und es wurde überprüft, ob diese an Tagen, an denen von den Probanden hocherhitzte Lebensmittel verzehrt wurden (*medium AA & high AA*), höher war als an den Tagen, an denen der Ernährungsplan nur nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel beinhaltete (*washout*). Neben den Urinproben aus Humanstudie I wurden auch Urinproben aus einer weiteren Duplikatstudie (Humanstudie II) auf ihre HPMA- und CEMA-Gehalte hin analysiert. Bei Humanstudie II handelte es sich um eine zehntägige Studie mit 20 Probanden (10 Gemischtköstler, 10 Veganer), die während des gesamten Studienzeitraums ihre Lebens- und Ernährungsgewohnheiten beibehielten und ihre Nahrungsaufnahme in Ernährungsprotokollen dokumentierten. Unter Verwendung der Urinproben aus Humanstudie II wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln im Rahmen einer uneingeschränkten Ernährung (Gemischtköstler vs. Veganer) auf die Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA untersucht.

Ebenfalls sollte der Einfluss der Lebensgewohnheiten bzw. von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Quellen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung untersucht werden. Hierzu wurde die HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Probanden von Humanstudie I, welche in einer kontrollierten Umgebung mit minimierter Acrolein-Exposition durchgeführt wurde, mit der HPMA- und CEMA- Ausscheidung der Probanden von Humanstudie II, bei der die Probanden ihre Lebensgewohnheiten beibehielten, verglichen. Durch einen Fragebogen wurde außerdem aufgeklärt, ob und wann sich die Probanden aus Humanstudie II während des Studienzeitraums in der Nähe von exogenen Acrolein-Quellen wie Autoabgasen, Feuer oder Zigarettenrauch aufgehalten hatten. Die Ergebnisse des Fragebogens wurden mit der HPMA- und CEMA-Ausscheidung korreliert.

Des Weiteren galt es unter Verwendung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA, welche in den Urinproben der Probanden aus Humanstudie I und Humanstudie II bestimmt wurden, die Acrolein-Exposition unter kontrollierten und *free living* Bedingungen abzuschätzen. Humanstudie II ermöglichte zudem erstmals einen Vergleich der HPMA- und CEMA-Ausscheidung bzw. abgeschätzten Acrolein-Exposition von Gemischtköstlern mit der entsprechenden Ausscheidung bzw. Exposition von Veganern.

Sowohl die Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln als auch die Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin sollte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) unter Verwendung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gekoppelt mit Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) erfolgen. Die benötigten HPLC-ESI-MS/MS-Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und validiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung und Validierung von HPLC-ESI-MS/MS-Methoden

4.1.1 Acrylamid in Lebensmitteln

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Acrylamid-Gehalt in verschiedenen Lebensmittelproben, bei denen es sich um die verzehrfertigen Mahlzeiten der Humanstudie I (siehe Kapitel 4.2) handelte, bestimmt werden. Hierzu wurden geeignete Analysemethoden entwickelt und validiert.

Die Analytik von Acrylamid stellt aufgrund des geringen Molekulargewichtes, der hohen Reaktivität und des Fehlens eines Chromophors eine Herausforderung dar. Gängige Methoden zur Bestimmung von Acrylamid basieren auf einer chromatographischen Trennung mittels HPLC oder Gaschromatographie (GC) und einer anschließenden Detektion mittels Massenspektrometrie (MS). Diesen Analysemethoden vorangestellt wird meist eine Extraktion von Acrylamid mit Wasser oder einem Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, gefolgt von einer Probenaufreinigung z. B. mittels Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*) (EFSA, 2015a).

In der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie am Fachbereich Chemie an der Technischen Universität Kaiserslautern existierte zu Beginn dieser Arbeit bereits eine Analysemethode zur Bestimmung von Acrylamid. Diese Methode basierte auf einer chromatographischen Trennung mittels HPLC, einer positiven Elektrosprayionisation (ESI_{pos}) und einer Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) im *multiple reaction monitoring* (MRM) - Modus. Vorangestellt war eine Probenaufarbeitung mittels Wasserextraktion und SPE (Watzek *et al.*, 2012a).

Bei der Methode von Watzek *et al.* (2012b) handelte es sich um eine SIVA-Methode d. h. der zu analysierenden Probe wurde zu Beginn der Probenaufarbeitung ein isotope markierter Standard (D_3 -Acrylamid) zugesetzt. SIVA-Methoden weisen eine hohe Genauigkeit auf, da Verluste des Analyten durch die Verwendung des isotope markierten Standards korrigiert werden können (EFSA, 2015a).

Die Methode von Watzek *et al.* (2012b) stellt die Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln dar. Die Probenaufarbeitung mittels Wasserextraktion sowie SPE wurde im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode von Watzek *et al.* (2012b) durchgeführt (siehe Kapitel 7.1.1). Zur Vermessung der aufgearbeiteten Probe wurden basierend auf der Methode von Watzek *et al.* (2012b) zwei HPLC- ESI_{pos} -MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Acrylamid (Methode A und Methode B) entwickelt und validiert. Details zur Methodenentwicklung sowie -validierung und die optimierten Parameter der HPLC- ESI_{pos} -MS/MS-Methoden finden sich in Kapitel 7.1.2.

Die entwickelte Messmethode A fand Anwendung zur Acrylamid-Bestimmung von Lebensmitteln mit erwartungsgemäß hohem Acrylamid-Gehalt. Zur Steigerung der Sensitivität wurde Methode A zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen dieser Arbeit auf ein neueres, sensitiveres HPLC-MS/MS-System übertragen. Die entsprechende Messmethode B wurde zur Analyse von Lebensmitteln, in denen kein oder nur geringe Mengen an Acrylamid erwartet wurden, verwendet.

Methode B wies mit einem absoluten LOD von 0,05 pmol und einem absoluten LOQ von 0,15 pmol im Fließmittel eine circa 50-fach höhere Sensitivität auf als Methode A mit einem absoluten LOD von

2,7 pmol und einen absoluten LOQ von 8,8 pmol (siehe Kapitel 7.1.2.2). In Lebensmittelmatrix ergaben sich für Methode B LODs von 0,1 - 0,8 µg/kg Lebensmittel und LOQs von 0,3 - 2,5 µg/kg Lebensmittel. Methode A wies LODs von 2,9 - 33 µg/kg Lebensmittel und LOQs von 5,0 - 53 µg/kg Lebensmittel auf (siehe Kapitel 7.1.2.2). Die LOQs von Methode A waren vergleichbar zu denen von Messmethoden der europäischen Länder und Lebensmittelverbände, welche laut Stellungnahme der EFSA (2015a) im Median bei 10 - 80 µg/kg lagen, wobei es sich bei den Messmethoden überwiegend um HPLC-basierte Messmethoden (99,9 %) sowie um GC-basierte Methoden (0,1 %) handelte. Methode B war deutlich sensitiver als diese Messmethoden der europäischen Länder und Lebensmittelverbände. Neben der hohen Sensitivität wiesen Methode A sowie Methode B mit einer Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität von < 2 % ebenfalls eine sehr gute Messpräzision auf (siehe Kapitel 7.1.2.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit erfolgreich zwei HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln entwickelt und validiert, welche zur Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in verzehrfertigen Mahlzeiten aus Humanstudie I angewandt wurden (siehe Kapitel 4.2.3.1).

4.1.2 Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin

Zusätzlich zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Bestimmung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) sowie Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (HPMA und CEMA) in den Urinproben der Humanstudie I (siehe Kapitel 4.2) erfolgen. Hierzu wurde eine entsprechende Analysemethode entwickelt und validiert.

In der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie am Fachbereich Chemie an der Technischen Universität Kaiserslautern existierte bereits eine etablierte SIVA-Methode zur Mercaptursäure-Bestimmung (Watzek *et al.*, 2012b). Die Probenaufarbeitung umfasst eine pH-Wert-Einstellung sowie eine SPE und wurde nur geringfügig modifiziert (siehe Kapitel 7.2.1). Die Quantifizierung der Mercaptursäure-Gehalte in den aufgearbeiteten Urinproben erfolgte durch chromatographische Trennung mittels HPLC, Elektrosprayionisation im negativen Ionisationsmodus (ESI_{neg}) und anschließender Vermessung mittels MS/MS im MRM-Modus. Um die Sensitivität der Messmethode zu erhöhen, wurde die Methode von Watzek *et al.* (2012b) im Rahmen dieser Arbeit auf ein neueres HPLC-ESI-MS/MS-System übertragen (Methode C). Details zur Methodenentwicklung sowie -validierung und die Messparameter der HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode finden sich in Kapitel 7.2.2.

Die Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS stellt eine gängige Methode zur Bestimmung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) in Urin dar (EFSA, 2015a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren auch Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (HPMA und CEMA) bestimmt.

Die absoluten LODs im Fließmittel lagen für Methode C bei 0,9 - 3,3 fmol und die LOQs bei 2,9 - 11 fmol (siehe Kapitel 7.2.2.2). Somit wies die in dieser Arbeit entwickelte Messmethode C eine vergleichbare Sensitivität zu anderen Methoden auf, die in den letzten Jahren zur AAMA-, GAMA-, HPMA- und/oder CEMA-Bestimmung veröffentlicht wurden (Lee *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Chiang *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2016). Neben der guten Sensitivität zeigte die Messmethode C eine sehr gute Messpräzision. Die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität lag für alle Analyten bei < 2 % (siehe Kapitel 7.2.2.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Methode C somit erfolgreich eine HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urinproben entwickelt. Anwendung fand diese Methode zur Vermessung der Urinproben aus Humanstudie I (siehe Kapitel 4.2.6.3 und Kapitel 4.2.6.4).

Außerdem wurde noch eine weitere Messmethode, Methode D, zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in dieser Arbeit verwendet. Methode D wurde von Katharina Gömpel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Elke Richling in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern entwickelt und zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (HPMA und CEMA) in Urinproben aus Humanstudie II verwendet. Bei Methode D handelte es sich um eine *scheduled multiple reaction monitoring* (sMRM) - Methode mit LODs von 0,2 - 0,4 fmol und LOQs von 0,6 - 1,3 fmol. Die verwendeten HPLC- und ESI_{neg}-MS/MS-Messparameter der Methode D finden sich in Kapitel 4.4.3.3.

4.2 Humanstudie I

Dieses Kapitel beinhaltet bereits publizierte Inhalte aus Ruenz et al. (2016). Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung von Springer Nature (siehe S. 292).

Bei Humanstudie I handelt es sich um eine neuntägige Duplikatstudie mit 14 männlichen Probanden, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurde.

Hauptziel der Studie war es die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA mit der alimentären Acrylamid-Aufnahme zu korrelieren. Ein weiteres Ziel war die Korrelation der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA mit der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln.

Die Studiendurchführung erfolgte vom 4. März 2013 (8:00 Uhr) bis zum 13. März 2013 (8:00 Uhr). Studienort war das „Naturfreundehaus Finsterbrunnertal“ in 67705 Finsterbrunnertal, Deutschland, ein Gästehaus des Pfälzerwald-Vereins ohne Fahrzeugverkehr, Tabakrauch, offene Feuerstellen oder andere mögliche Quellen einer exogenen Acrylamid- und Acrolein-Exposition.

Das Design der Humanstudie I ist in Abbildung 26 dargestellt.

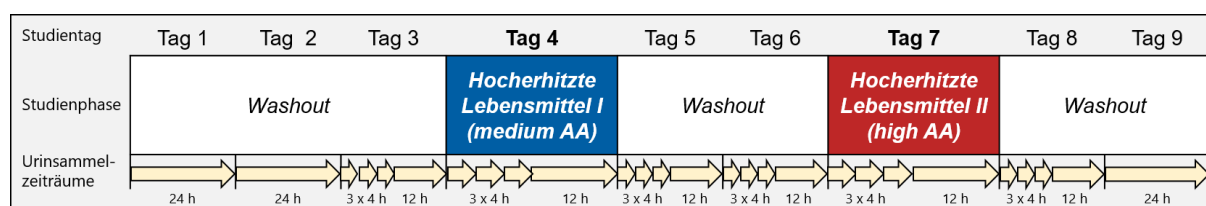


Abbildung 26: Studiendesign der Humanstudie I, *washout*: Ernährungsplan beinhaltet nicht erhitze und geringfügig erhitze Lebensmittel (≤ 100 °C, Acrylamid-minimierte Ernährung), *hoherhitzte Lebensmittel I (medium AA)*: Ernährungsplan beinhaltet hocherhitzte Lebensmittel (> 100 °C, Acrylamid-haltige Ernährung, mittlere Acrylamid-Aufnahme), *hoherhitzte Lebensmittel II (high AA)*: Ernährungsplan beinhaltet hocherhitzte Lebensmittel (> 100 °C, Acrylamid-haltige Ernährung, hohe Acrylamid-Aufnahme), Urinsammelzeiträume: Tag 1, Tag 2 und Tag 9: 8:00 - 8:00 Uhr des Folgetages (24 h), Tag 3 - Tag 9: 8:00 - 12:00 Uhr, 12:00 - 16:00 Uhr, 16:00 - 20:00 Uhr und 20:00 - 8:00 Uhr des Folgetages (3 x 4 h + 12 h)

Die Studie beinhaltete drei *Washout*-Phasen (Tag 1 - 3, Tag 5 - 6 und Tag 8 - 9), während denen die Probanden nicht erhitze und geringfügig erhitze Lebensmittel (≤ 100 °C) verzehrten und zwei Tage (Tag 4 und Tag 7), an denen der Ernährungsplan hocherhitzte Lebensmittel (> 100 °C) beinhaltete. Die nicht erhitzten und geringfügig erhitzten Lebensmittel wurden so ausgewählt, dass sie zu einer Acrylamid-minimierten Ernährung (*washout*) führten und die hocherhitzten Lebensmittel derart, dass an Tag 4 (*hoherhitzte Lebensmittel I*) eine mittlere Acrylamid-Aufnahme (*medium AA*) und an Tag 7 (*hoherhitzte Lebensmittel II*) eine hohe Acrylamid-Aufnahme (*high AA*) erfolgte. Alle Probanden verzehrten entsprechend des Ernährungsplans (siehe Tabelle 60 im Anhang) alle Mahlzeiten zur gleichen Uhrzeit und in den gleichen Portionsgrößen, wobei die einzelnen Essenskomponenten auf 10 g genau abgewogen wurden. Wasser durfte von den Probanden *ad libitum* konsumiert werden. Alle verzehrfertigen Mahlzeiten wurden als Duplikate gesammelt, homogenisiert und bei -20 °C eingefroren.

Ebenfalls wurde der gesamte Urin der Probanden gesammelt, gewogen, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Urinsammlung begann an Tag 1, Tag 2 und Tag 9 jeweils um 8:00 Uhr und endete um 8:00 Uhr des Folgetages (24 h). An allen anderen Studientagen gab es vier Urinsammelzeiträume. Der

Urin wurde an diesen Tagen von 8:00 bis 12:00 Uhr (4 h), von 12:00 bis 16:00 Uhr (4 h), von 16:00 bis 20:00 Uhr (4 h) sowie von 20:00 bis 8:00 Uhr des Folgetages (12 h) gesammelt.

Während des Studienzeitraums wogen sich die Probanden täglich vor dem Frühstück. Außerdem dokumentierten sie ihre physischen Aktivitäten in Aktivitätsprotokollen.

Weitere Informationen zur Humanstudie I finden sich in Kapitel 8.1.

4.2.1 Analyse der Gewichtsentwicklung

Während des Studienzeitraums sollte es zu keiner Veränderung der Körpergewichte der Probanden kommen. Hierzu wurde der Ernährungsplan der Probanden (siehe Tabelle 60 im Anhang) so erstellt, dass die Ernährung der Probanden möglichst isokalorisch war und die Energie-Aufnahme den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE, 2016) entsprach (siehe Kapitel 4.2.4.7). Ausgeschlossen werden sollte eine Veränderung der Körpergewichte, da ein erhöhtes Körpergewicht mit oxidativem Stress verbunden sein kann (Marseglia *et al.*, 2015), welcher wiederum möglicherweise im Zusammenhang mit einer endogenen Acrylamid-Bildung steht (Tareke *et al.*, 2008).

Um zu überprüfen, dass die Studienernährung zu keiner Veränderung des Körpergewichts führte, wogen sich die Probanden täglich vor dem Frühstück (vor 8:00 Uhr) auf einer handelsüblichen Personenwaage. Die dokumentierten Körpergewichte finden sich im Anhang in Tabelle 61. Weder die *Washout*-Ernährung (Tag 1 - 3, Tag 5 - 6 und Tag 8 - 9) noch der Verzehr von hochoverhitzten Lebensmitteln an Tag 4 (*medium AA*) und Tag 7 (*high AA*) führte zu einer Veränderung der Körpergewichte der Probanden. Es ist somit davon auszugehen, dass es zu keiner endogenen Acrylamid-Bildung durch oxidativen Stress, welcher durch eine Körpergewichtsveränderung ausgelöst wurde, kam.

4.2.2 Analyse der Aktivitätsprotokolle

Ein weiterer Faktor, der zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses führen kann ist extensive körperliche Aktivität (Urso und Clarkson, 2003). Um oxidativen Stress bzw. die mit oxidativen Stress im Zusammenhang stehende endogene Bildung von Acrylamid zu verhindern (Tareke *et al.*, 2008), sollten die Probanden während der Studie keinen extensiven körperlichen Aktivitäten nachgehen.

Zur Überprüfung ob sich die Probanden an diese Studienvorgabe gehalten hatten, wurden von allen Probanden Aktivitätsprotokolle geführt. Eine Zusammenfassung der Aktivitäten der Probanden ist im Anhang in Tabelle 62 zu finden. Die Aktivitäten aller Probanden waren vergleichbar und umfassten Spazieren gehen (14/14), Filme ansehen (13/14), Lernen (13/14), Computernutzung (9/15), Lesen (5/14), Spielen von Brettspielen oder Karten (5/14), Telefonieren (2/14), Zeichnen (1/14) und Gitarre spielen (1/14). Außerdem verließen fünf Probanden unter Aufsicht den Studienort um eine Klausur an der Technischen Universität Kaiserslautern zu schreiben bzw. an einer Klausurvorbereitung teilzunehmen. Die Aktivitätsprotokolle zeigen somit, dass sich alle Probanden an die Studienvorgaben gehalten hatten. Es fanden keine extensiven körperlichen Aktivitäten statt. Es ist somit davon auszugehen, dass es zu keiner endogenen Acrylamid-Bildung durch oxidativen Stress, welcher durch extensive körperlichen Aktivitäten ausgelöst wurde, kam.

4.2.3 Analyse der Lebensmittel

Von allen verzehrfertigen Mahlzeiten (siehe Ernährungsplan, Tabelle 60 im Anhang) wurden Duplikate homogenisiert und bei -20 °C gelagert. In diesen Duplikaten wurde der Acrylamid-Gehalt mittels SIVA (siehe Kapitel 7.1) bestimmt. Ebenfalls erfolgte eine Bestimmung der Protein- sowie der Asparagin-Gehalte. Die Analyse der Protein-Gehalte wurde durch die Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland) durchgeführt und die Analyse der Asparagin-Gehalte durch die Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland). Auf die Analysen-Ergebnisse wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

Zusätzlich zu diesen Analysen erfolgte eine Abschätzung der Protein-, Kohlenhydrat-, Fett- und Energie-Gehalte der verzehrten Lebensmittel unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), welche auf Daten des Bundeslebensmittelschlüssels und auf Produktdaten aus der Lebensmittelindustrie zurückgreift. Nähere Informationen zur Abschätzung der Nährstoff- und Energie-Gehalte mittels Prodi 5.8 Expert finden sich in Kapitel 7.3 und die Ergebnisse sind in Tabelle 63 im Anhang angegeben. Die abgeschätzten Gehalte wurden zusätzlich zu den Analyse-Daten zur Ermittlung der täglichen Nährstoff- und Energie-Aufnahmemengen (siehe Kapitel 4.2.4) herangezogen.

4.2.3.1 Acrylamid

Zur Auswahl der Lebensmittel, die von den Probanden an Tag 4 (*medium AA*) und Tag 7 (*high AA*) der Humanstudie I verzehrt werden sollten, wurde vor Beginn der Studie einige Lebensmittel, bei denen ein hoher Acrylamid-Gehalt erwartet wurde, durch die Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse des Lebensmittel-Screenings finden sich in Kapitel 8.1.4.

Während der Studie wurden alle verzehrfertigen Lebensmittel bzw. Mahlzeiten als Duplikate gesammelt, homogenisiert und bei -20 °C eingefroren. Nach der Durchführung der Studie wurde in diesen Duplikaten unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden (siehe Kapitel 7.1) der Acrylamid-Gehalt bestimmt. Die Acrylamid-Bestimmung wurde durchgeführt um zu überprüfen, ob die hochoerhitzten Lebensmittel, welche an Tag 4 und Tag 7 von den Probanden verzehrt wurden, tatsächlich Acrylamid-Gehalte aufwiesen, die zu einer mittleren (*medium AA*, Tag 4) bzw. hohen (*high AA*, Tag 7) Acrylamid-Aufnahme führten, sowie um zu überprüfen, ob die nicht erhitzten und geringfügig erhitzten Lebensmittel, welche an den *Washout*-Tagen verzehrt wurden, kein bzw. nur minimale Mengen an Acrylamid aufwiesen. Außerdem wurden die ermittelten Acrylamid-Gehalte mit durchschnittlichen Gehalten von Lebensmittel in Europa (EFSA, 2015a) und Deutschland (BVL, 2015) verglichen. Unter Verwendung der ermittelten Acrylamid-Gehalte konnte auch die tägliche Acrylamid-Aufnahme bestimmt werden (siehe Kapitel 4.2.4.1), welche mit der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren korreliert wurde (siehe Kapitel 4.2.6.3).

Die Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten erfolgte als Dreifachbestimmung mittels SIVA. Hierzu wurden zur Probenaufarbeitung eine Wasserextraktion sowie eine SPE durchgeführt (siehe Kapitel 7.1.1). Die Vermessung der aufgearbeiteten Proben erfolgte mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS (siehe Kapitel 7.1.2). Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Acrylamid-Gehalte der untersuchten verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten sowie über die zugehörigen LODs und LOQs.

Tabelle 9: Acrylamid-Gehalte der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten sowie Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) (Humanstudie I)

Lebensmittelkategorie Verzehrfertiges Lebensmittel*	Acrylamid [µg/kg]	LOD [µg/kg]	LOQ [µg/kg]
Frittierte bzw. gebratene Kartoffelprodukte 🔥			
Bratkartoffeln ¹	23,4 ± 0,8	14,4	22,6
Kartoffelchips ¹	332,8 ± 6,4	26,9	48,4
Pommes frites ¹	85,2 ± 10,3	28,0	42,5
Backwaren 🔥			
Knäckebrötchen ¹	221,8 ± 8,0	31,3	53,2
Spritzgebäck ¹	107,8 ± 2,4	23,7	48,0
Frühstückscerealien 🔥			
Haferfleks ¹	97,2 ± 0,8	17,4	27,9
Kaffeepulver und -getränk 🔥			
Kaffegetränk ^{**1}	19,1 ± 3,6	2,9	5,0
Kaffeepulver ¹	313,7 ± 2,1	33,0	53,3
Fleischprodukte 🔥			
Bratwurst ²	3,0 ± 0,1	0,4	1,3
Hühnerbrust ²	< LOQ	0,6	1,9
Rindersteak ²	4,9 ± 0,1	0,7	2,5
Milch und Milchprodukte			
Joghurt (Vanille) ²	1,0 ± 0,02	0,2	0,7
Käse (Emmentaler) ²	< LOD	0,5	1,8
Milch ²	< LOQ	0,1	0,3
Obst und Fruchtsäfte			
Apfelsaft ²	< LOQ	0,1	0,3
Orangensaft ²	< LOD	0,2	0,6
Obst I (Banane + Orange) ²	< LOD	0,2	0,8
Obst II (Apfel + Banane) ²	< LOD	0,2	0,8
Obstsalat (Apfel, Birne + Banane) und Joghurt (Natur) ²	< LOQ	0,2	0,7
Gemüse und Gemüseintopf			
Gemüseintopf ²	< LOQ	0,3	0,9
Kaisergemüse ²	< LOQ	0,3	1,0
Kartoffel-, Nudel- und Reisgerichte			
Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße ²	< LOQ	0,2	0,8
Kartoffeln ²	< LOQ	0,3	0,9
Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter ²	< LOQ	0,4	1,4
Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch ²	< LOQ	0,3	1,2
Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße ²	< LOQ	0,4	1,4
Nudeln, Putenbrust und Sahnesoße ²	< LOQ	0,4	1,5
Reis mit Hühnerfrikassee ²	< LOQ	0,6	2,1

*Informationen zu den Zubereitungsarten finden sich in Tabelle 60 (S. 212), **Padkaffee: 125 ml Kaffegetränk \cong 7,5 g Kaffeepulver \cong 1 Kaffeepad, 🔥hoherhitztes Lebensmittel (> 100 °C), ¹analysiert unter Verwendung von Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (siehe Kapitel 7.1), ²analysiert unter Verwendung von Methode B zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (siehe Kapitel 7.1)

Quantifizierbare Mengen an Acrylamid fanden sich in frittierten bzw. gebratenen Kartoffelprodukten (23 - 333 µg/kg), Backwaren (108 - 222 µg/kg), Frühstückscerealien (97 µg/kg), Kaffee (Pulver: 314 µg/kg, Getränk: 19 µg/kg), Fleischprodukten (3,0 - 4,9 µg/kg) und Vanille-Joghurt (1 µg/kg). Mit Ausnahme des Vanille-Joghurts handelt es sich bei den Lebensmitteln um hochoverhitze Lebensmittel (> 100 °C), welche an Tag 4 (*medium AA*) und/oder Tag 7 (*high AA*) verzehrt wurden. An den *Washout*-Tagen beinhaltete der Ernährungsplan nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel (≤ 100 °C) wie Milchprodukte, Obst und Fruchtsäfte, Gemüse und Gemüseeintopf sowie Kartoffel-, Nudel- und Reisgerichte. Die Überprüfung des Acrylamid-Gehaltes dieser Lebensmittel ergab, dass sie kein oder nur sehr geringe Mengen an Acrylamid (< 2,1 µg/kg) enthielten.

Den höchsten Acrylamid-Gehalt von $332,8 \pm 6,4$ µg/kg wiesen die kommerziell erhältlichen **Kartoffelchips** auf, welche von den Probanden an Tag 7 verzehrt wurden. Der Acrylamid-Gehalt war vergleichbar mit dem von der EFSA ermittelten durchschnittlichen Acrylamid-Gehalten in Kartoffelchips und Snacks von 389 µg/kg (EFSA, 2015a). Ebenfalls lag er im Bereich der mittleren Acrylamid-Gehalte von Kartoffelchips, die im Untersuchungszeitraum von 2013 bis 2015 durch das Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Deutschland ermittelt wurden. Diese reichten von 143 µg/kg (Kartoffelchips aus Kartoffelteil) bis 336 µg/kg (Kartoffelchips aus frischen Kartoffeln) (BVL, 2015). Der Acrylamid-Gehalt der im Rahmen der Humanstudie I verzehrten Kartoffelchips lag zu dem deutlich unter dem 2017 festgelegten europäischen Richtwert für Kartoffelchips von 750 µg/kg (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158). Hohe Gehalte an Acrylamid entstehen in frittierten Kartoffelprodukten durch eine hohe Erhitzungstemperatur und eine lange Erhitzungszeit. Außerdem sind die Gehalte an Vorläuferverbindungen (v. a. an reduzierenden Zuckern und Aminosäuren wie Asparagin) Einflussfaktoren der Acrylamid-Bildung (Rydberg *et al.*, 2003).

Weitere Kartoffelprodukte, die von den Probanden verzehrt wurden, waren **Bratkartoffeln** und **Pommes frites**. Der durchschnittliche Acrylamid-Gehalt dieser Kartoffelprodukte wurde im Jahr 2015 von der EFSA ermittelt und lag bei 308 µg/kg (EFSA, 2015a). In Deutschland lag der Gehalt laut BVL bei 161 - 287 µg/kg (BVL, 2015). Die bestimmten Gehalte, die im Rahmen der Humanstudie I verzehrten Bratkartoffeln und Pommes frites, lagen mit $23,4 \pm 0,8$ µg/kg und $85,2 \pm 10,3$ µg/kg deutlich unter diesen Erwartungswerten. Der europäische Richtwert für verzehrfertige Pommes frites von 500 µg/kg, wurde von den Pommes frites, die während der Humanstudie I verzehrt wurden deutlich unterschritten. Für Bratkartoffeln wurde von der Europäischen Kommission kein Richtwert festgelegt (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158).

Die während der Studie verzehrten Bratkartoffeln wurden durch das Küchenpersonal am Studienort aus frischen Kartoffeln hergestellt. Nach dem Schälen der Kartoffeln wurden diese in frischem Wasser für circa eine Stunde gewässert und anschließend in heißem Fett in einer Bratpfanne bis zu einem mittleren Bräunungsgrad angebraten. Pedreschi *et al.* konnte zeigen, dass Wässern von Kartoffeln zu einer Reduktion der Acrylamid-Vorläuferverbindung Glucose und so zu einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes führt. Wässern von Kartoffelchips für 90 Minuten resultierte in einem um 23 % reduzierten Glucose-Gehalt und in einem um 20 - 38 % reduzierten Acrylamid-Gehalt (Pedreschi *et al.*, 2004). Das Wässern der Kartoffeln durch das Küchenpersonal am Studienort, kann somit einen Grund für den geringen Acrylamid-Gehalt in den verzehrten Bratkartoffeln sein.

Zur Herstellung der Pommes frites wurden kommerziell bezogene, vorfrittiert Pommes frites verwendet. Am Studienort wurden diese in einer handelsüblichen Gastronomie-Fritteuse bei 160°C bis zu einem mittleren Bräunungsgrad frittiert. Die Frittiertemperatur lag mit 160 °C im von der Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) empfohlenen Temperaturbereich von 160 bis 175 °C (DGF, 2012). Dass die Frittiertemperatur einen großen Einfluss auf die Acrylamid-Bildung hat, zeigten Untersuchungen von Matthäus *et al.* Bei einer mittleren Frittierzeit von acht Minuten führte die Reduktion der Frittier-temperatur von 180 °C auf 160 °C zu einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes in Pommes frites um 75 % (1200 µg/kg auf 300 µg/kg) (Matthäus *et al.*, 2004). Die relativ geringe Frittiertemperatur von 160 °C, der von den Probanden verzehrten Pommes frites, kann somit ein Grund für deren geringen Acrylamid-Gehalt sein.

Um weitere Gründe für den geringen Acrylamid-Gehalt der Pommes frites zu ermitteln, wurde die Herstellerfirma (Wernsing Feinkost GmbH, Essen, Deutschland) der vorfrittierten Pommes frites kontaktiert. Diese gab an, dass seit 2003 eine Prozessoptimierung zur Reduktion des Acrylamid-Gehaltes in Pommes frites durchgeführt wird und die Acrylamid-Gehalte der nach Herstellerangaben zubereiteten Pommes frites von 400 - 500 µg/kg auf < 30 - 60 µg/kg reduziert werden konnten (Willenborg, 2015).

Eine Möglichkeit den Acrylamid-Gehalt in Kartoffelprodukten zu reduzieren, stellt die Verwendung von Kartoffelsorten mit geringen Zuckergehalten dar (Ohara-Takada *et al.*, 2005). Die Herstellerfirma der vorfrittierten Pommes frites, welche im Rahmen der Humanstudie I zubereitet und von den Probanden verzehrt wurden, gab an, dass im Rahmen der Prozessoptimierung zur Acrylamid-Reduzierung eine Umstellung auf gelbfleischige Kartoffelsorten wie Agria oder Fontana, mit geringem Zuckergehalt, vorgenommen zu haben (Willenborg, 2015). Eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) des Gehaltes an reduzierenden Zuckern (Glucose: $r^2 = 0,836$, Fructose: $r^2 = 0,873$) und der Acrylamid-Bildung wurde von Ohara-Takada *et al.* (2005) nachgewiesen. Der geringe Zuckergehalt bzw. der geringe Gehalt an reduzierenden Zuckern wie Glucose oder Fructose in den verwendeten Kartoffeln, kann somit ein Grund für den geringen Acrylamid-Gehalt in den Pommes frites sein, welche während der Studie von den Probanden verzehrt wurden.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den Gehalt an Acrylamid in Kartoffelprodukten stellt die Vorbehandlung der Kartoffeln dar. Blanchieren von Kartoffelchips für 2 - 70 Minuten bei 50 - 90 °C führte im Mittel zu einer Reduktion des Glucose-Gehaltes um 24 % und zu einer Reduktion des Asparagin-Gehaltes um 32 %. Diese Reduktion der Vorläuferverbindungen der Acrylamid-Bildung resultierte wiederum in einer Reduktion des Acrylamid-Gehaltes um bis zu > 90 % (Pedreschi *et al.*, 2004). Der Hersteller der vorfrittierten Pommes frites gab an, dass die Kartoffeln für 30 Minuten bei einer definierten Temperatur mit permanent zulaufendem frischem Wasser blanchiert wurden (Willenborg, 2015). Es ist wahrscheinlich, dass dieses Blanchieren der Kartoffeln ebenfalls ein Grund für den geringen Acrylamid-Gehalt der zubereiteten Pommes frites war, die von den Probanden verzehrt wurden.

Hohe Acrylamid-Gehalte fanden sich wie erwartet in den während der Studie verzehrten Backwaren. **Knäckebrot** wies einen Acrylamid-Gehalt von $221,8 \pm 8,0$ µg/kg und **Spritzgebäck** einen Acrylamid-Gehalt von $107,8 \pm 2,4$ µg/kg auf. Die von der EFSA ermittelten Durchschnittsgehalte lagen bei 171 µg/kg für Knäckebrot und bei 201 µg/kg für Kekse und Waffeln (EFSA, 2015a). Das BVL ermittelte im Untersuchungszeitraum von 2013 bis 2015 durchschnittliche Acrylamid-Gehalte von 225 µg/kg für

Knäckebrot und von 114 µg/kg für Gebäck (BVL, 2015). Von der Europäischen Kommission wurde für Knäckebrot sowie für die Produktkategorie „Kekse und Waffeln“ ein Richtwert von 350 µg/kg festgelegt (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158). Auch bei Backwaren stellen das Vorhandensein von Acrylamid-Vorläuferverbindungen (reduzierende Zucker und Aminosäuren) und die Erhitzungstemperatur entscheidende Einflussfaktoren der Acrylamid-Bildung dar (Gökmen *et al.*, 2007).

Ein weiteres hitzebehandeltes Getreideprodukt, welches während der Studie verzehrt wurde, waren **Haferfleks**. Diese wiesen mit $97,2 \pm 0,8$ µg/kg einen Acrylamid-Gehalt auf, der vergleichbar war zu Literaturdaten. Für Frühstückscerealien auf Mais-, Hafer-, Dinkel-, Gersten- und Reisbasis wurde von der EFSA ein durchschnittlicher Acrylamid-Gehalt von 102 µg/kg ermittelt (EFSA, 2015a) und vom BVL ein durchschnittlicher Gehalt von 81 µg/kg (BVL, 2015). Die europäischen Richtwerte liegen für Frühstückscerealien bei 150 - 300 µg/kg (2013/647/EU).

Sowohl das **Kaffegetränk** als auch das zur Herstellung des Getränkes verwendete **Kaffeepulver** wurden auf ihren Acrylamid-Gehalt hin untersucht. Das Kaffeepulver wies mit $313,7 \pm 2,1$ µg/kg den zweithöchsten Acrylamid-Gehalt der untersuchten Lebensmittel auf. Dieser Gehalt lag im Bereich der von der EFSA bzw. dem BVL ermittelten durchschnittlichen Acrylamid-Gehalte in Röstkaffee (trocken) von 249 µg/kg (EFSA, 2015a) bzw. 407 µg/kg (BVL, 2015). Der europäische Richtwert für Acrylamid in Röstkaffee von 400 µg/kg (Verordnung (EU) Nr. 2017/2158) wurde nicht überschritten. Kaffeepulver stellt jedoch nicht das verzehrfertige Endprodukt dar. Die Analyse des verzehrfertigen Kaffegetränks ergab einen Acrylamid-Gehalt von $19,1 \pm 3,6$ µg/kg, der um ein 16-faches geringer war verglichen zum Kaffeepulver. Der Gehalt des Kaffegetränks war vergleichbar mit dem durch die FAO/WHO ermittelten durchschnittlichen Acrylamid-Gehalt von Kaffegetränken, welcher bei 17 µg/kg lag (FAO/WHO, 2011). Der analytisch bestimmte Acrylamid-Gehalt des Kaffegetränkes stimmt gut mit dem Acrylamid-Gehalt überein, der sich ausgehend vom analytisch bestimmten Acrylamid-Gehalt des verwendeten Kaffeepulvers berechnen lässt. Für diese Rechnung wurde zugrunde gelegt, dass ein Kaffeepad à 7,5 g Kaffeepulver zur Herstellung von 125 ml Kaffegetränk verwendet wurde, dass die Dichte des Kaffegetränks 1 g/ml war sowie dass das Gesamte im Kaffeepulver vorliegende Acrylamid ins Kaffegetränk übergegangen ist. Entsprechend ergab sich basierend auf dem Acrylamid-Gehalt des Kaffeepulvers von $313,7 \pm 2,1$ µg/kg ein errechneter Acrylamid-Gehalt des Kaffegetränkes von $18,8 \pm 0,1$ µg/kg.

Geringe Acrylamid-Gehalte wiesen die untersuchten Fleischprodukte auf. Der Acrylamid-Gehalt von **Rindersteak** lag bei $4,9 \pm 0,1$ µg/kg und der von **Bratwurst** bei $3,0 \pm 0,1$ µg/kg. **Hühnerbrust** wies keine quantifizierbaren Mengen ($< 1,9$ µg/kg) an Acrylamid auf. Für alle drei Fleischprodukte erfolgte eine Zubereitung durch Braten in einer Pfanne. Zu Acrylamid-Gehalten in Fleischprodukten existieren nur wenige Vergleichsdaten. Die FAO/WHO gab mittlere Acrylamid-Gehalte von Fleischprodukten von 42 µg/kg an, wobei in die Kategorie panierte, gekochte sowie frittierte Fleischprodukte fielen (FAO/WHO, 2011). In rohem oder gekochtem Rindfleisch konnte Tareke *et al.* (2002) kein Acrylamid detektieren (< 5 µg/kg), wohingegen in gebratenem Rinderhackfleisch im Median ein Acrylamid-Gehalt von 17 µg/kg quantifiziert wurde. In gebratenem Hühnerhackfleisch lag der Median der Acrylamid-Gehalte bei 28 µg/kg und in gebratenem Schweinehackfleisch wurde ein Acrylamid-Gehalt von 52 µg/kg bestimmt. Auch hier zeigt sich, dass die Erhitzungstemperatur ein entscheidender Einflussfaktor der Acrylamid-Bildung ist. Generell waren die bestimmten Acrylamid-Gehalte in Fleisch gering. Dies kann

unter anderen daran liegen, dass Fleisch zwar in hochoverhitztem Öl ($\approx 200\text{ °C}$) angebraten wird oder bei vergleichbaren Temperaturen gegrillt wird, die Kerntemperatur des Fleisches ($51 - 85\text{ °C}$) jedoch deutlich geringer ist (Marquard *et al.*, 2010). Zudem enthält Fleisch nur geringe Mengen an Kohlenhydraten bzw. reduzierenden Zuckern, welche wichtige Vorläuferverbindungen der Acrylamid-Bildung darstellen (Tareke *et al.*, 2002).

Die Untersuchung der Milchprodukte ergab für **Milch** einen Acrylamid-Gehalt von $< 0,3\text{ }\mu\text{g/kg}$, für **Käse** einen Acrylamid-Gehalt von $< 0,5\text{ }\mu\text{g/kg}$ sowie für **Joghurt (Vanille)** einen Acrylamid-Gehalt von $1,0 \pm 0,02\text{ }\mu\text{g/kg}$. Diese Gehalte sind vergleichbar mit den von der EFSA angegebenen Acrylamid-Gehalten von Milch und Milchprodukte. Im Mittel lagen diese bei $6\text{ }\mu\text{g/kg}$, wobei 85 % der Proben Acrylamid-Gehalte unterhalb des *limit of reporting* (LOR) aufwiesen (EFSA, 2015a).

In allen weiteren untersuchten Duplikat-Mahlzeiten und dem Wasser, welches von den Probanden *ad libitum* konsumiert werden durfte, ergab die Acrylamid-Bestimmung keine quantifizierbaren Gehalte. Es handelte sich bei den Duplikat-Mahlzeiten um Gemüse, Gemüse Eintopf, Obst, Fruchtsäfte, Kartoffel-, Reis- und Nudelgerichte. All diese Mahlzeiten wurden nicht oder nur geringfügig ($\leq 100\text{ °C}$) erhitzt.

4.2.3.2 Acrolein

Eine Analyse der Acrolein-Gehalte der Lebensmittel war zu Studienbeginn nicht geplant. Eine solche wurde jedoch im späteren Verlauf der Studienauswertung angestrebt, um analog zur Korrelation der alimentären Acrylamid-Aufnahme mit der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (siehe Kapitel 4.2.6.3) auch eine Korrelation der alimentäre Acrolein-Aufnahme der Probanden mit der Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren durchzuführen.

Zu Acrolein-Gehalten in Lebensmitteln existieren bisher nur wenige Daten (siehe Kapitel 2.3.3), da die zuverlässige Bestimmung in Lebensmitteln aufgrund der Flüchtigkeit, chemischen Reaktivität, hohen Wasserlöslichkeit sowie Neigung zur Polymerisation dieser Verbindung eine große Herausforderung darstellt (Abraham *et al.*, 2011; SKLM, 2012). Eine etablierte SIVA-Methode, bei der eine Analyse der Proben mittels Headspace (HS) - GC-MS erfolgt, existiert für die Bestimmung von Acrolein in Fetten und Ölen (Ewert *et al.*, 2011). Mit dieser Methode konnten in hochoverhitzten Fetten und Ölen Acrolein-Gehalte von bis zu 242 mg/kg quantifiziert werden und in frittierten hochoverhitzten Lebensmittel wie Pommes frites, Kartoffelchips und Donuts Acrolein-Gehalte von $11 - 25\text{ }\mu\text{g/kg}$ (Ewert *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Methode von Ewert *et al.* (2011) zur Bestimmung der Acrolein-Gehalte in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten der Humanstudie I zu verwenden. Zur Analyse der Acrolein-Gehalte in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten von Humanstudie I stand ein vergleichbares HS-GC-MS-Gerät (HS-GC: Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA; MS: Saturn 2000, Varian, Palo Alto, USA), wie von Ewert *et al.* (2011) verwendet, zur Verfügung. Dieses beinhaltete jedoch keine funktionierende Ofenkühlung, sodass die die Ausgangstemperatur des GC-Temperaturprogramms von -5 °C auf $+30\text{ °C}$ modifiziert werden musste. Einen weiteren Unterschied stellten die zu untersuchenden Lebensmittel bzw. Mahlzeiten dar. Die Methode von Ewert *et al.* (2011) wurde für die Analyse von Fetten und Ölen etabliert. Bei den zu analysierenden Duplikat-Mahlzeiten handelte es sich um eine Vielzahl an verschiedenen Lebensmittelmatrixen, genauer gesagt um fettreiche Lebensmittel (z. B. Käse und Kartoffelchips), proteinreiche Lebensmittel (z. B. Rindersteak und Hühnerbrust), kohlenhydratreiche

Lebensmittel (z. B. Knäckebrot und Spritzgebäck) sowie wässrige Lebensmittel (z. B. Apfel- und Orangensaft). Es zeigte sich, dass sich die modifizierte Methode nach Ewert *et al.* (2011) unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Bestimmung der Acrolein-Gehalte in den verzehrfertigen Studien-Mahlzeiten der Humanstudie I eignete. Die Acrolein-Gehalte lagen unterhalb der LODs oder waren im Bereich der LOQs, wobei sich der LOD/LOQ je nach Lebensmittelmatrix stark unterschied und die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren.

Die Analytik mittels HS-GC-MS stellt nicht die einzige Möglichkeit zur Acrolein-Bestimmung in Lebensmitteln dar. Diese Methode wurde jedoch aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial (5 g), die zur Analyse benötigt wird, und aufgrund der beschriebenen Sensitivität (LOD (in Olivenöl): 15 µg/kg (Ewert *et al.*, 2011) bzw. 3 µg/kg (Granvogl, 2014)) ausgewählt. Weitere Möglichkeiten zur Acrolein-Bestimmung sind die Derivatisierung mittels Pentafluorphenylhydrazin (PFPH) oder Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließende Analytik mittels GC-MS bzw. HPLC-ESI-MS/MS. Nach Granvogl *et al.* (2014) weisen diese Methoden eine vergleichbare Sensitivität auf wie die Acrolein-Bestimmung mittels HS-GC-MS. Die Probenvorbereitung ist jedoch aufwendiger und es wird in der Regel mehr Probenmaterial benötigt. Nach Derivatisierung ist eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, eine Extraktion mittels *solvent assisted flavor evaporation* (SAFE) - Technik und eine Trocknung und Aufkonzentrierung durch Destillation erforderlich (Granvogl, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, da die Acrolein-Bestimmung nicht Teil des ursprünglichen Studiendesigns war und für weitere Analysen nicht ausreichend Probenmaterial der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten vorlag. Für zukünftige Untersuchungen wäre es jedoch interessant zu überprüfen, ob diese Methoden zur Bestimmung von geringen Acrolein-Konzentrationen in Lebensmitteln mit verschiedenen Matrices geeignet sind bzw. mit ausreichendem Probenmaterial neue entsprechende Methoden zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ursprüngliche Studienziel weiterverfolgt indem der Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren und der Aufnahme von hoch-erhitzten Lebensmitteln untersucht wurde (siehe Kapitel 4.2.6.4).

4.2.3.3 Protein

Eine Bestimmung des Protein-Gehaltes in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten erfolgte, um die tägliche Protein-Aufnahme der Probanden zu ermitteln (siehe Kapitel 4.2.4.3) und um diese anschließend mit der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (siehe Kapitel 4.2.6.3) sowie Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (siehe Kapitel 4.2.6.4) zu korrelieren.

Die Bestimmung des Protein-Gehaltes wurde von der Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Analysen erfolgten als Einfachbestimmung nach §64 Methode L 06.00-7 mod. des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFBG). Zusätzlich wurden die Protein-Gehalte der Duplikat-Mahlzeiten unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert abgeschätzt. Die Ergebnisse der Protein-Bestimmung durch die Eurofins Analytik GmbH sowie die unter Verwendung von Prodi 5.8 Expert erhaltenen Vergleichsdaten finden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Protein-Gehalte der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten (Humanstudie I)

Lebensmittelkategorie Verzehrbares Lebensmittel*	Protein [g/100 g]	
	Eurofins ¹	Prodi ²
Frittierte bzw. gebratene Kartoffelprodukte 🔥		
Bratkartoffeln	2,3	2,9
Kartoffelchips	4,5	4,0
Pommes frites	3,3	2,1
Backwaren 🔥		
Knäckebrötchen	12,4	9,7
Spritzgebäck	5,8	6,0
Frühstückscerealien 🔥		
Haferflocken	12,4	9,7
Kaffeepulver und -getränk 🔥		
Kaffegetränk**	0,3	0,2
Kaffeepulver	15,6	14,0
Fleischprodukte 🔥		
Bratwurst	16,1	13,7
Hühnerbrust	30,3	24,1
Rindersteak	36,3	22,5
Milch und Milchprodukte		
Joghurt (Vanille)	3,7	3,6
Käse (Emmentaler)	27,1	29,0
Milch	3,4	3,3
Obst und Fruchtsäfte		
Apfelsaft	0,1	0,5
Orangensaft	0,7	0,7
Obst I (Banane + Orange)	1,1	1,1
Obst II (Apfel + Banane)	0,7	0,7
Obstsalat (Apfel, Birne + Banane) und Joghurt (Natur)	1,9	1,9
Gemüse und Gemüse Eintopf		
Gemüse Eintopf	0,6	5,3
Kaisergemüse	2,0	2,3
Kartoffel-, Nudel und Reisgerichte		
Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße	2,2	2,7
Kartoffeln	1,9	1,9
Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter	2,2	2,0
Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch	4,3	4,6
Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße	8,9	9,5
Nudeln, Putenbrust und Sahnesoße	13,6	11,2
Reis mit Hühnerfrikassee	11,4	5,7

*Informationen zu den Zubereitungsarten finden sich in Tabelle 60 (S. 212), **Padkaffee: 125 ml Kaffegetränk \pm 7,5 g Kaffeepulver \pm 1 Kaffeepad, 🔥hocherhitztes Lebensmittel (> 100 °C), ¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH, Hamburg, Deutschland, ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland)

Die Protein-Bestimmung durch die Eurofins Analytik GmbH zeigte, dass Fleischprodukte die höchsten Protein-Gehalte aufwiesen. Rindersteak hatte einen Protein-Gehalt von 36,3 g/100 g, Hühnerbrust von 30,3 g/100 g und Bratwurst von 16,1 g/100 g. Weitere Fleischgerichte mit erhöhtem Protein-Gehalt waren „Nudeln, Putenbrust und Sahnesoße“ mit einem Protein-Gehalt von 13,6 g/100 g, „Reis mit Hühnerfrikassee“ mit einem Protein-Gehalt von 11,4 g/100 g und die Duplikat-Mahlzeit „Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße“ mit einem Protein-Gehalt von 8,9 g/100 g. Neben diesen Fleischgerichten zählte Käse mit einem Protein-Gehalt von 27,1 g/100 g ebenfalls zu den proteinreichen Lebensmitteln.

Kaffeepulver hatte einen Protein-Gehalt von 15,6 g/100 g. Im verzehrfertigen Kaffeegetränk lag der Protein-Gehalt nur noch bei 0,3 g/100 g. Produkte auf Cerealienbasis wiesen Protein-Gehalte von 5,8 - 12,4 g/100 g auf. Alle weiteren Duplikat-Mahlzeiten (Joghurt, Milch, Obst, Fruchtsäfte, Gemüse, Gemüseintopf, fleischlose Kartoffel-, Nudel- und Reisgerichte) wiesen geringe Protein-Gehalte (< 4,3 g/100 g) auf.

Die durch die Eurofins Analytik GmbH bestimmten Protein-Gehalte waren weitgehend vergleichbar mit den Protein-Gehalten, die unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8. Expert abgeschätzt wurden. Abweichungen der analysierten Protein-Gehalte von den mittels Prodi 5.8. Expert abgeschätzten Gehalten, bei denen es sich u. a. um gemittelte Literatur- bzw. Produktdaten handelt, können darauf zurückzuführen sein, dass der Protein-Gehalte eines Lebensmittels je nach Zusammensetzung des Rohproduktes (Rindersteak, Hühnerbrust) und aufgrund einer unterschiedlichen Rezeptur (Gemüseintopf, Reis mit Hühnerfrikassee) variieren kann.

4.2.3.4 Asparagin

Im Rahmen der hitzeinduzierten Acrylamid-Bildung aus Aminosäuren und reduzierenden Zuckern stellt Asparagin, die Aminosäure dar, die zu den höchsten Acrylamid-Gehalten in Lebensmitteln führt (Stadler *et al.*, 2002). Ebenfalls ist eine endogene Acrylamid-Bildung ausgehend von Asparagin postuliert (Tareke *et al.*, 2008; Tareke *et al.*, 2009; Watzek *et al.*, 2012a). Der Gehalt an Asparagin wurde in allen verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten bestimmt, um die tägliche Asparagin-Aufnahme der Probanden berechnen zu können (siehe Kapitel 4.2.4.4) und diese mit der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren zu korrelieren (siehe Kapitel 4.2.6.3).

Asparagin wurde nach §64 Methode L 49.07-2 des LFVG mit einem Aminosäureanalysator durch die Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) als Einfachbestimmung analysiert. Der LOQ der Methode lag bei 5 mg/100 g. Die Ergebnisse der Asparagin-Bestimmung sind in Tabelle 11 dargestellt. Die verwendete Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert beinhaltete keine Daten zu den Asparagin-Gehalten der Duplikat-Mahlzeiten.

Die höchsten Asparagin-Gehalte wiesen kartoffelhaltige Gerichte sowie kartoffelbasierte Produkte auf. Der Asparagin-Gehalt der gekochten Kartoffeln lag bei 240 mg/100 g und war somit vergleichbar zu Literaturdaten von frischen Kartoffeln. Diese lagen je nach Kartoffelsorte bei 158 bis 1137 mg/100 g (Rodriguez-Saona und Wrolstad, 1997; Oruna-Concha *et al.*, 2001; Becalski *et al.*, 2004).

Tabelle 11: Asparagin-Gehalte der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten (Humanstudie I)

Lebensmittelkategorie	Asparagin¹
Verzehrfertiges Lebensmittel*	[mg/100 g]
Frittierte bzw. gebratene Kartoffelprodukte 🔥	
Bratkartoffeln	290
Kartoffelchips	350
Pommes frites	320
Backwaren 🔥	
Knäckebrötchen	63
Spritzgebäck	6,7
Frühstückscerealien 🔥	
Haferfleks	24
Kaffeepulver und -getränk 🔥	
Kaffegetränk**	< LOQ
Kaffeepulver	< LOQ
Fleischprodukte 🔥	
Bratwurst	< LOQ
Hühnerbrust	9,2
Rindersteak	8,6
Milch und Milchprodukte	
Joghurt (Vanille)	< LOQ
Käse (Emmentaler)	97
Milch	< LOQ
Obst und Fruchtsäfte	
Apfelsaft	50
Orangensaft	42
Obst I (Banane + Orange)	41
Obst II (Apfel + Banane)	24
Obstsalat (Apfel, Birne + Banane) und Joghurt (Natur)	27
Gemüse und Gemüseintopf	
Gemüseintopf	21
Kaisergemüse	25
Kartoffel-, Nudel und Reisgerichte	
Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße	27
Kartoffeln	240
Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter	162
Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch	117
Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße	20
Nudeln, Putenbrust und Sahnsoße	5,2
Reis mit Hühnerfrikassee	< LOQ

*Informationen zu den Zubereitungsarten finden sich in Tabelle 60 (S. 212), **Padkaffee: 125 ml Kaffegetränk \pm 7,5 g Kaffeepulver \pm 1 Kaffeepad, 🔥hoherhitztes Lebensmittel (> 100 °C), LOQ: Bestimmungsgrenze (5 mg/100 g), ¹analysiert von der Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Die Gehalte von Kartoffelchips Bratkartoffeln, und Pommes frites lagen bei 350 mg/100 g, 320 mg/100 g und 290 mg/100 g. Die kartoffelhaltigen Duplikat-Mahlzeiten „Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter“ sowie „Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch“ wiesen mit 162 mg/100 g und 117 mg/100 g ebenfalls erhöhte Asparagin-Gehalte auf. Die Duplikat-Mahlzeit „Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße“ wies hingegen einen geringeren Asparagin-Gehalt von 27 mg/100 g auf. Der Emmentaler-Käse hatte einen mit Asparagin-Gehalte von 97 mg/100 g und das Knäckebrot von 63 mg/100 g. Alle anderen untersuchten Duplikat-Mahlzeiten wiesen Asparagin-Gehalte < 50 mg/100 g auf.

4.2.4 Berechnung der täglichen alimentären Aufnahmemengen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die tägliche alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probanden bestimmt. Ebenfalls wurden die täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln sowie die tägliche alimentäre Protein-, Asparagin-, Kohlenhydrat-, Fett- und Energie-Aufnahme der Probanden ermittelt.

4.2.4.1 Acrylamid-Aufnahme

Ein Ziel der Berechnung der täglichen Acrylamid-Aufnahmemengen der Probanden war es, die Acrylamid-Aufnahme während der verschiedenen Studientage (*washout*, *medium AA*, *high AA*) vergleichen zu können. Die ermittelte Acrylamid-Aufnahme der Probanden wurde außerdem mit der Acrylamid-Exposition von Erwachsenen (FAO/WHO, 2011) bzw. erwachsenen Europäern (EFSA, 2015a) verglichen. Ebenfalls wurden die Lebensmittel ermittelt, die den Hauptbeitrag zur täglichen Acrylamid-Aufnahme leisteten. Ein weiteres Ziel war es, die tägliche Acrylamid-Aufnahme mit der täglichen Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren zu korrelieren (siehe Kapitel 4.2.6.3).

Zur Berechnung der täglichen Acrylamid-Aufnahme wurde die Summe der Acrylamid-Mengen aller an diesem Tag verzehrten Duplikat-Mahlzeiten gebildet. Die Acrylamid-Menge einer verzehrten Duplikat-Mahlzeit ergab sich aus dem bestimmten Acrylamid-Gehalte (siehe Kapitel 4.2.3.1) multipliziert mit der aufgenommenen Menge der Duplikat-Mahlzeit (siehe Ernährungsplan, Tabelle 60 im Anhang). Für Lebensmittel, deren Acrylamid-Gehalt unter dem LOD lag, wurde der LOD-Wert zu Berechnung der täglichen Acrylamid-Aufnahmemenge verwendet und für Lebensmittel, deren Acrylamid-Gehalt zwischen LOD und LOQ lag, wurde der LOQ-Wert verwendet. Diese Annahmen entsprachen dem UB-Ansatz der EFSA (2015a).

Vergleich der täglichen Acrylamid-Aufnahmemengen

Die täglichen Acrylamid-Aufnahmemengen der Probanden sind in Tabelle 12 angegeben. Eine detaillierte Übersicht über die Acrylamid-Aufnahme pro Duplikat-Mahlzeit findet sich in Tabelle 13 (Tag 4, *medium AA*), Tabelle 14 (Tag 7, *high AA*) bzw. in Tabelle 64 bis Tabelle 66 (*washout*) im Anhang (S. 216 - 218).

An Tag 4 (*medium AA*) sowie an Tag 7 (*high AA*) beinhaltete der Ernährungsplan der Probanden unterschiedliche Mengen an hocherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C). Dies resultierte an Tag 4 in einer täglichen Acrylamid-Aufnahme von 54,1 µg (761 nmol) bzw. 0,6 - 0,9 µg/kg KG. An Tag 7 war die Acrylamid-Aufnahme mit 108,4 µg (1526 nmol) bzw. 1,3 - 1,8 µg/kg KG circa doppelt so hoch. Die Acrylamid-

Aufnahme der Probanden an Tag 4 lag im Bereich der mittleren täglichen Acrylamid-Aufnahme von Erwachsenen in Europa, welche von der EFSA auf 0,4 - 0,9 µg/kg KG abgeschätzt wurde (EFSA, 2015a). Die Aufnahme war ebenfalls vergleichbar mit der mittleren Acrylamid-Aufnahme der Allgemeinbevölkerung, welche 2011 von der FAO/WHO auf 1 µg/kg KG abgeschätzt wurde (FAO/WHO, 2011). Die Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 spiegelte das 95. Perzentil der täglichen Exposition von Erwachsenen in Europa wieder, welches nach Abschätzung der EFSA bei 0,6 - 2,0 µg/kg KG liegt (EFSA, 2015a). Die von der FAO/WHO (2011) abgeschätzte Acrylamid-Aufnahme von Konsumenten mit hoher Exposition lag mit 4 µg/kg über der Acrylamid-Aufnahme der Probanden an Tag 7.

An den *Washout*-Tagen der Studie konnte die Acrylamid-Aufnahme durch Einschränkungen im Ernährungsplan, welcher an diesen Tagen nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel (≤ 100 °C) beinhalte, im Mittel auf $2,2 \pm 0,3$ µg/d (32 ± 5 nmol/d) bzw. 0,03 - 0,04 µg/kg KG/d reduziert werden. Die Acrylamid-Aufnahme war an den *Washout*-Tagen somit im Mittel 96 % geringer als an Tag 4 (*medium AA*) und 98 % geringer als an Tag 7 (*high AA*). Die Verwendung des UB-Ansatzes (EFSA, 2015a) zur Berechnung der täglichen Acrylamid-Aufnahmemengen d. h. die Verwendung der LOD-Werte für Lebensmittel, deren Acrylamid-Gehalte unterhalb des LODs lagen, und die Verwendung der LOQ-Werte für Lebensmittel, deren Acrylamid-Gehalte zwischen dem LOD und LOQ lagen, führte zu einer Überbewertung der Acrylamid-Aufnahme der Probanden an den *Washout*-Tagen. Dieser Ansatz wurde gewählt, um die maximale Acrylamid-Aufnahme (*worst case*) an den *Washout*-Tagen zu ermitteln.

Tabelle 12: Tägliche Acrylamid-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Acrylamid-Aufnahme		
	[µg]	[nmol]	[µg/kg KG]
Tag 1 (<i>washout</i>)	2,2	31	0,03 - 0,04
Tag 2 (<i>washout</i>)	2,6	37	0,03 - 0,04
Tag 3 (<i>washout</i>)	1,8	26	0,02 - 0,03
Tag 4 (<i>medium AA</i>)	54,1	761	0,64 - 0,89
Tag 5 (<i>washout</i>)	2,2	31	0,03 - 0,04
Tag 6 (<i>washout</i>)	2,6	37	0,03 - 0,04
Tag 7 (<i>high AA</i>)	108,4	1526	1,28 - 1,78
Tag 8 (<i>washout</i>)	2,6	37	0,03 - 0,04
Tag 9 (<i>washout</i>)	1,8	26	0,02 - 0,03
$\bar{\emptyset}$ (<i>washout</i>)	$2,2 \pm 0,3$	32 ± 5	$0,03 \pm 0,004 - 0,04 \pm 0,006$

washout: minimierte Acrylamid-Aufnahme, *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme, *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme, KG: Körpergewicht

Hauptquellen der täglichen Acrylamid-Aufnahme

Eine detaillierte Übersicht der an Tag 4 (*medium AA*) verzehrten Lebensmittel inklusive Verzehrmenngen und Acrylamid-Aufnahmemengen gibt Tabelle 13. Knäckebrot, welches von den Probanden zum Mittagessen verzehrt wurde, stellte die Hauptquelle der Acrylamid-Aufnahme dar. Über Knäckebrot wurden 22,2 µg Acrylamid aufgenommen, was 41 % der Acrylamid-Aufnahme an diesem Tag entsprach. Ebenso einen großen Beitrag zur Acrylamid-Aufnahme leisteten die zum ersten Frühstück verzehrten Haferflecks

mit 9,7 µg (18 %) sowie das zum Nachmittagssnack verzehrte Spritzgebäck mit 10,8 µg (20 %). Die Acrylamid-Aufnahme über das Kaffeegetränk, welches zum ersten und zweiten Frühstück sowie zum Nachmittagssnack konsumiert wurde, lag bei insgesamt 9,6 µg (18 %). Alle weiteren verzehrten Lebensmittel leisteten nur einen geringfügigen Betrag von 1,8 µg (3 %) zur Acrylamid-Aufnahme an Tag 4.

Tabelle 14 gibt eine Übersicht über den Ernährungsplan von Tag 7 (*high AA*) inklusive der entsprechenden Acrylamid-Aufnahmemengen. An Tag 7 leisteten Kartoffelchips, welche als Snack am Abend verzehrt wurden, mit 41,6 µg (38 %) den größten Beitrag zur Acrylamid-Aufnahme. Wie an Tag 4 führten Knäckebrot, Spritzgebäck, Haferfleks und die verzehrten Kaffeegetränke zu einer Acrylamid-Aufnahme von jeweils 22,2 µg (21 %), 10,8 µg (10 %), 9,7 µg (9 %) und 9,6 µg (9 %). Zusätzliche Acrylamid-Quellen waren die zum Mittagessen verzehrten Pommes frites, die zu einer Acrylamid-Aufnahme von 8,9 µg (8 %) führten, sowie die zum Abendessen verzehrte Bratkartoffeln, die in einer Acrylamid-Aufnahme von 4,7 µg (4 %) resultierten. Der Betrag aller sonstigen verzehrten Lebensmittel zur Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 war mit 0,9 µg (1 %) gering.

Die FAO/WHO (2011) sowie die EFSA (2015a) haben in ihren letzten Stellungnahmen zu Acrylamid die Lebensmittel identifiziert, die den Hauptbeitrag zur Acrylamid-Exposition leisteten. Dies waren vor allem kartoffel- und cerealienbasierte Produkte. Hoherhitzte kartoffelbasierte Produkte wurden von den Probanden nur an Tag 7 verzehrt, hoherhitzte cerealienbasierte Produkte an Tag 4 sowie an Tag 7.

Die beiden Kartoffelprodukte, die laut FAO/WHO den größten Beitrag zur Acrylamid-Aufnahme leisteten, waren Pommes frites (10 - 60 %) und Kartoffelchips (10 - 22 %). Der Beitrag der Pommes frites zur Acrylamid-Aufnahme der Probanden der Humanstudie I war mit 8 % geringer als der von der FAO/WHO angegebene Wert. Der Beitrag der Kartoffelchips zur Acrylamid-Aufnahme der Probanden war mit 38 % hingegen höher als bei der Allgemeinbevölkerung gemäß FAO/WHO (2011). Laut EFSA trug bei den kartoffelbasierten Produkten die Lebensmittelgruppe „Frittierte Kartoffelprodukte außer Kartoffelchips und Snacks“ mit einem Beitrag von 9,5 - 49 % am meisten zur Acrylamid-Aufnahme von erwachsenen Europäern bei, gefolgt von „Sonstigen kartoffelbasierten Produkten“, welche einen Beitrag von 2,2 - 18 % leisteten. „Kartoffelchips und Snacks“ machten bei erwachsenen Europäern 0,7 - 6,7 % der Acrylamid-Aufnahme aus (EFSA, 2015a). Die Pommes frites und Bratkartoffeln, die von den Probanden an Tag 7 verzehrt wurden, konnten der EFSA-Kategorie „Frittierte Kartoffelprodukte außer Kartoffelchips und Snacks“ zugeordnet werden und machten zusammen 13 % der täglichen Acrylamid-Aufnahme aus. Dies war vergleichbar zu dem Beitrag dieser Produktkategorie zur Acrylamid-Aufnahme, der von der EFSA für erwachsene Europäer angegeben wurde. Die Kartoffelchips, die von den Probanden verzehrt wurden, fielen in die EFSA-Kategorie „Kartoffelchips und Snacks“. Ihr Beitrag zur Acrylamid-Aufnahme der Probanden war mit 8 % höher als durchschnittlich bei Erwachsenen in Europa gemäß EFSA (2015a).

Cerealienbasierte Produkte, die einen großen Beitrag zur Acrylamid-Exposition leisteten, waren laut FAO/WHO Brot, Brötchen und Toast (13 - 34 %) sowie süße Kekse (10 - 15 %). Der Beitrag von Knäckebrot und Spritzgebäck zur Acrylamid-Aufnahme der Probanden war an Tag 4 (Knäckebrot: 41 %; Spritzgebäck: 20 %) höher und an Tag 7 (Knäckebrot: 21 %; Spritzgebäck: 10 %) im Bereich des Beitrags zur Acrylamid-Aufnahme, der von der FAO/WHO für die Allgemeinbevölkerung angegeben wurde (FAO/WHO, 2011).

Tabelle 13: Acrylamid-Aufnahme der Probanden am Tag 4 (*medium AA*) (Humanstudie I)

Mahlzeit	Verzehrfertiges Lebensmittel	Acrylamid-Aufnahme	
		[µg]	[%]
Erstes Frühstück (8 h)	Haferfleks (100 g) 🔥	9,7	18,0
	Honig (20 g)	na	na
	Milch (150 ml)	0,1	0,1
	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,1
	Kaffeetrink, aufgebriiht* (125 ml) 🔥	2,4	4,4
Zweites Frühstück (10:30 h)	Kaffeetrink, aufgebriiht* (125 ml) 🔥	2,4	4,4
Mittagessen (12 h)	Gemuseeintopf, gekocht (350 g)	0,3	0,6
	Rindersteak, gebraten (150 g) 🔥	0,7	14
	Knackebrot (100 g) 🔥	22,2	41,0
Snack (14 h)	Spritzgebäck (100 g) 🔥	10,8	19,9
	Joghurt (Vanille) (125 g)	0,2	0,1
	Kaffeetrink, aufgebriiht* (250 ml) 🔥	4,8	8,8
Abendessen (18 h)	Kartoffeln, gekocht (250 g)	0,2	0,4
	Krauterbutter (25 g)	na	na
	Huhenbrust, gebraten (150 g) 🔥	0,3	0,5
	Kaisergemuse, dampfgegart (100 g)	0,1	0,2
	Kaese (Emmentaler) (50 g)	0,03	0,05
Summe		54,1	100,0

*Padkaffee: 125 ml Kaffeetrink \cong 7,5 g Kaffeepulver \cong 1 Kaffeepad, 🔥 hochehitztes Lebensmittel (> 100 °C), na: nicht analysiert

Tabelle 14: Acrylamid-Aufnahme der Probanden an Tag 7 (*high AA*) (Humanstudie I)

Mahlzeit	Verzehrfertige Lebensmittel	Acrylamid-Aufnahme	
		[µg]	[%]
Erstes Frühstück (8 h)	Haferfleks (100 g) 🔥	9,7	9,0
	Honig (20 g)	na	na
	Milch (150 ml)	0,1	0,05
	Knackebrot (100 ml) 🔥	22,2	20,5
	Erdbeermarmelade (15 g)	na	na
	Kaffeetrink, aufgebriiht* (125 ml) 🔥	2,4	2,2
Zweites Frühstück (10:30 h)	Kaffeetrink, aufgebriiht* (125 ml) 🔥	2,4	2,2
Mittagessen (12 h)	Pommes frites, frittiert (150 g) 🔥	8,9	8,2
	Rindersteak, gebraten (150 g) 🔥	0,7	0,7
	Ketchup (30 g)	na	na
Snack (14 h)	Spritzgebäck (100 g) 🔥	10,8	9,9
	Kaffeetrink, aufgebriiht* (250 ml) 🔥	4,8	4,4
Abendessen (18 h)	Bratkartoffeln, gebraten (200 g) 🔥	4,7	4,3
	Bratwurst, gebraten (100 g) 🔥	0,3	0,3
Snack (20 h)	Kartoffelchips (125 g) 🔥	41,6	38,4
Summe		108,4	100,0

*Padkaffee: 125 ml Kaffeetrink \cong 7,5 g Kaffeepulver \cong 1 Kaffeepad, 🔥 hochehitztes Lebensmittel (> 100 °C), na: nicht analysiert

Laut EFSA waren cerealienbasierte Produkte, die einen großen Beitrag zur Acrylamid-Exposition von erwachsenen Europäern leisteten, weiches Brot (9,7 - 22 %), Frühstückscerealien (0,9 - 10 %), Kekse und Waffeln (0,8 - 9,3 %), Kräcker (0 - 7,3 %), Knäckebrot (0 - 7,3 %) sowie Lebkuchen (0 - 5,9 %). Der Beitrag von Knäckebrot und Spritzgebäck zur Acrylamid-Aufnahme der Probanden war an Tag 4 und an Tag 7 höher als bei erwachsenen Europäern gemäß EFSA (2015a). Der Anteil der Acrylamid-Aufnahme über Frühstückscerealien lagen für Tag 4 im oberen Bereich der Vergleichsdaten von erwachsenen Europäern und war für Tag 7 oberhalb der Vergleichsdaten von erwachsenen Europäern (EFSA, 2015a).

Ein weiteres Lebensmittel, welches durch die EFSA als eine Acrylamid-Quelle identifiziert wurde, war Kaffee. Kaffee leistete bei Erwachsenen einen Betrag von 3 - 24 % zur alimentären Acrylamid-Aufnahme (EFSA, 2015a). Der Kaffeeconsum der Probanden entsprach an Tag 4 (*medium AA*) 18 % und Tag 7 (*high AA*) 9 % der Gesamtaufnahme von Acrylamid.

4.2.4.2 Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln

Die täglichen Aufnahmemengen an hochoverhitzten Lebensmittel der Probanden wurden zur Korrelation mit der Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (siehe Kapitel 4.2.6.4) bestimmt.

Die Berechnung erfolgte durch Aufsummieren der Aufnahmemengen aller am jeweiligen Studientag verzehrten hochoverhitzten Lebensmittel (siehe Ernährungsplan, Tabelle 60 im Anhang). Der Kategorie „hochoverhitzte Lebensmittel“ wurden alle Lebensmittel zugeordnet, deren Herstellungs- bzw. Zubereitungsprozess ein Erhitzen auf > 100 °C beinhaltete. Bei diesem Erhitzungsprozess kann es sich um Backen (Knäckebrot und Spritzgebäck), Frittieren (Pommes frites und Kartoffelchips), Braten (Rindersteak, Bratwurst und Bratkartoffeln), Trocknen (Haferflakes) oder Rösten (Kaffee) gehandelt haben. Sowohl die Erhitzungs- und Kerntemperaturen der Lebensmittel als auch die Erhitzungsdauern unterschieden sich bei diesen Prozessen.

Eine Übersicht über die täglichen Aufnahmemengen an hochoverhitzten Lebensmitteln gibt Tabelle 15.

Tabelle 15: Tägliche Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln der Probanden (Humanstudie I)

	Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln [g]
Tag 1 (<i>washout</i>)	0
Tag 2 (<i>washout</i>)	0
Tag 3 (<i>washout</i>)	0
Tag 4 (hochoverhitzte Lebensmittel I)	1100
Tag 5 (<i>washout</i>)	0
Tag 6 (<i>washout</i>)	0
Tag 7 (hochoverhitzte Lebensmittel II)	1525
Tag 8 (<i>washout</i>)	0
Tag 9 (<i>washout</i>)	0

washout: keine Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln, *hochoverhitzte Lebensmittel I/II*: mittlere/hohe Aufnahme von hochoverhitzten Lebensmitteln

An den *Washout*-Tagen wurden von den Probanden nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel (≤ 100 °C) verzehrt. Die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln lag somit an diesen Tagen bei 0 g. An Tag 4 (*hocherhitzte Lebensmittel I*) wurden als hocherhitzte Lebensmittel (> 100 °C) Haferfleks, Knäckebrot, Spritzgebäck, Rindersteak, Hühnerbrust und Kaffee verzehrt. Dies resultierte in einer Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln von 1100 g. An Tag 7 (*hocherhitzte Lebensmittel II*) beinhaltete der Ernährungsplan wie an Tag 4 Haferfleks, Knäckebrot, Spritzgebäck, Rindersteak und Kaffee sowie zusätzlich Pommes frites, Bratkartoffeln, Kartoffelchips und Bratwurst. Die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln lag an diesem Tag bei 1525 g.

4.2.4.3 Protein-Aufnahme

Eine Bestimmung der täglichen Protein-Aufnahme der Probanden erfolgte zur Korrelation mit der täglichen Mercaptursäure-Ausscheidung (siehe Kapitel 4.2.6.3 und Kapitel 4.2.6.4). Außerdem wurde die Protein-Aufnahme der Probanden zum Vergleich mit der durchschnittlichen Protein-Aufnahme von Erwachsenen und zum Vergleich mit Zufuhrempfehlungen der EFSA und DGE bestimmt.

Zur Berechnung der Protein-Aufnahme wurden die durch die Eurofins Analytik GmbH bestimmten bzw. die mittels der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert abgeschätzten Protein-Gehalte der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten (siehe Kapitel 4.2.3.3) zugrunde gelegt. Durch Multiplikation mit den Aufnahmemengen (siehe Ernährungsplan, Tabelle 60 im Anhang) und Aufsummieren ergaben sich die täglichen Protein-Aufnahmemengen der Probanden.

Tabelle 16 gibt eine Übersicht über die täglichen Protein-Aufnahmemengen der Probanden. Zusätzlich findet sich im Anhang (Tabelle 64 bis Tabelle 68) für jeden Studientag eine detaillierte Darstellung der Protein-Aufnahmemengen pro Duplikat-Mahlzeit.

Tabelle 16: Tägliche Protein-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Protein-Aufnahme			
	[g] Eurofins ¹	[g] Prodi ²	[g/kg KG] Eurofins ³	[E%] Prodi ²
Tag 1	101	97	1,2 - 1,7	16
Tag 2	125	106	1,5 - 2,1	18
Tag 3	56	72	0,7 - 0,9	13
Tag 4	164	150	1,9 - 2,7	24
Tag 5	101	97	1,2 - 1,7	16
Tag 6	125	106	1,5 - 2,1	18
Tag 7	123	93	1,4 - 2,0	14
Tag 8	125	106	1,5 - 2,1	18
Tag 9	56	72	0,7 - 0,9	13
Ø	112 ± 34	100 ± 23	1,3 ± 0,4 - 1,8 ± 0,6	17 ± 3

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH, Hamburg, Deutschland, ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³berechnet aus Protein-Aufnahme [g] Eurofins, E%: Energieprozent, KG: Körpergewicht

Die durchschnittliche tägliche Protein-Aufnahme der Probanden lag bei 112 ± 34 g (Eurofins Analytik GmbH) bzw. 100 ± 23 g (Prodi 5.8 Expert). Die tägliche Protein-Aufnahme, welche unter Verwendung der durch die Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert abgeschätzten Protein-Gehalte berechnet wurde, wich um 8 - 24 % von der täglichen Protein-Aufnahme ab, welche unter Verwendung der durch die Eurofins Analytik GmbH bestimmten Protein-Gehalte berechnet wurde. Diese Abweichungen sind auf Abweichung der ermittelten Protein-Gehalte der Duplikat-Mahlzeiten zurückzuführen (Eurofins vs. Prodi 5.8. Expert, siehe Kapitel 4.2.3.3).

Für die Berechnung der körpergewichtsbezogenen Protein-Aufnahme wurden die durch die Eurofins Analytik GmbH bestimmten Protein-Gehalte verwendet. Es ergab sich eine durchschnittliche tägliche Protein-Aufnahme von 1,3 - 1,8 g/kg KG. Diese lag über der durchschnittlichen Protein-Aufnahme von Erwachsenen in europäischen Ländern, welche laut EFSA bei 0,8 - 1,25 g/kg KG liegt (EFSA, 2015b). Außerdem überschritt die Protein-Aufnahme der Probanden die Referenzwerte für die Nährstoffaufnahme der Bevölkerung. Der von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) angegebene Referenzwert für die Proteinzufuhr von Erwachsene liegt bei 0,8 g/kg KG (DGE, 2016). Von der EFSA wird ein Referenzwert für die Proteinzufuhr der Bevölkerung von 0,83 g/kg KG angegeben (EFSA, 2015b).

Unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert wurde auch der Beitrag der Protein-Aufnahme zur Energie-Aufnahme berechnet. Dieser lag durchschnittlich bei 17 ± 3 Energieprozent (E%), was vergleichbar war mit Durchschnittswerten (12 - 20 E%) von Erwachsenen in europäischen Ländern (EFSA, 2015b). Ebenfalls war der Beitrag der Protein-Aufnahme zur Energie-Aufnahme der Probanden im Bereich der DGE-Empfehlung. Für Erwachsene soll der Beitrag der Protein-Aufnahme zur Energie-Aufnahme bei circa 15 E% liegen (DGE, 2016).

4.2.4.4 Asparagin-Aufnahme

Die tägliche Asparagin-Aufnahme wurde bestimmt, um herauszufinden, ob diese mit der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren korreliert (siehe Kapitel 4.2.6.3).

Zur Berechnung wurden die Asparagin-Gehalte der verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten, welche durch die Institut Kuhlmann GmbH bestimmt wurden (siehe Kapitel 4.2.3.4), mit den Aufnahmemengen (siehe Ernährungsplan im Anhang in Tabelle 60) multipliziert und aufsummiert.

Eine Zusammenfassung der täglichen Asparagin-Aufnahmemengen der Probanden ist in Tabelle 17 gegeben. Eine detaillierte Auflistung der Asparagin-Aufnahmemenge pro Duplikat-Mahlzeit für jeden Studientag findet sich in Tabelle 64 bis Tabelle 68 im Anhang.

Die mittlere tägliche Asparagin-Aufnahme der Probanden lag bei 1047 ± 476 mg bzw. 12 - 17 mg/kg KG. Sie variierte deutlich zwischen den Studientagen. An Tag 2, Tag 6 und Tag 8 war die tägliche Asparagin-Aufnahme mit 452 mg bzw. 5 - 7 mg/kg KG am geringsten. An Tag 7 (*hocherhitzte Lebensmittel II, high AA*) war sie mit 1604 mg bzw. 19 - 26 mg/kg KG am höchsten. Asparagin kann vom Körper gebildet werden und zählt daher zu den nicht-essentiellen Aminosäuren. Es existieren keine Zufuhrempfehlung durch die EFSA oder DGE.

Tabelle 17: Tägliche Asparagin-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Asparagin-Aufnahme	
	[mg]	[mg/kg KG]
Tag 1	1403	17 - 20
Tag 2	452	5 - 7
Tag 3	1346	16 - 22
Tag 4	967	17 - 23
Tag 5	1403	17 - 20
Tag 6	452	5 - 7
Tag 7	1604	19 - 26
Tag 8	452	5 - 7
Tag 9	1346	16 - 22
Ø	1047 ± 476	12 ± 6 - 17 ± 8

KG: Körpergewicht

4.2.4.5 Kohlenhydrat-Aufnahme

Eine Abschätzung der täglichen Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden erfolgte, um sie mit der täglichen Mercaptursäure-Ausscheidung zu korrelieren (siehe Kapitel 4.2.6.3 und Kapitel 4.2.6.4). Ebenfalls sollte die Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden mit der durchschnittlichen Kohlenhydrat-Aufnahme von Erwachsenen sowie mit Zufuhrempfehlungen der EFSA und DGE verglichen werden.

Die Abschätzung der Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden erfolgte mit der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert.

Tabelle 18 gibt eine Zusammenfassung der täglichen Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden. Im Anhang in Tabelle 64 bis Tabelle 68 sind die täglichen Kohlenhydrat-Aufnahmemengen pro Duplikat-Mahlzeit für jeden Studientag detailliert aufgeführt.

Tabelle 18: Tägliche Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Kohlenhydrat-Aufnahme		
	[g]	[g/kg KG]	[E%]
Tag 1	380	4,5 - 6,2	63
Tag 2	353	4,1 - 5,8	59
Tag 3	399	4,7 - 6,6	71
Tag 4	333	3,9 - 5,5	53
Tag 5	380	4,5 - 6,2	63
Tag 6	353	4,1 - 5,8	59
Tag 7	368	4,3 - 6,1	54
Tag 8	353	4,1 - 5,8	59
Tag 9	399	4,7 - 6,6	71
Ø	369 ± 23	4,3 ± 0,3 - 6,1 ± 0,4	64 ± 5

E%: Energieprozent, KG: Körpergewicht

Die Kohlenhydrat-Aufnahme der Probanden war an den verschiedenen Studientagen vergleichbar und lag im Durchschnitt bei 369 ± 23 g bzw. 4,3 - 6,1 g/kg KG. Der durchschnittliche Beitrag der täglichen Kohlenhydrat-Aufnahme zur Energie-Aufnahme lag bei 64 ± 5 E%. Dieser Wert lag über dem Durchschnittswert der europäischen Bevölkerung von 38 - 56 E% und dem von der EFSA vorgeschlagenen Referenzbereich für Kohlenhydrate von 45 - 60 E% (EFSA, 2010a). Von der DGE wurde empfohlen, dass die Energie-Aufnahme in Form von Kohlenhydraten mehr als 50 % betragen soll (DGE, 2016). Im Rahmen von Humanstudie I war dies der Fall.

4.2.4.6 Fett-Aufnahme

Genauso wie die Protein- und Kohlenhydrat-Aufnahme wurde auch die Fett-Aufnahme der Probanden zur Korrelation mit der täglichen Mercaptursäure-Ausscheidung (siehe Kapitel 4.2.6.3 und Kapitel 4.2.6.4) und zum Vergleich mit der durchschnittlichen Aufnahme von Erwachsenen sowie zum Vergleich mit Zufuhrempfehlungen der EFSA und DGE bestimmt.

Die Abschätzung der Fett-Aufnahme der Probanden erfolgte unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert.

Tabelle 19 zeigt die ermittelte Fett-Aufnahmemengen der Probanden pro Tag. Detaillierte Informationen zu den täglichen Fett-Aufnahmemengen aufgeschlüsselt nach Duplikat-Mahlzeiten finden sich im Anhang in Tabelle 64 bis Tabelle 68.

Die Probanden hatten täglich 68 ± 19 g bzw. 0,8 - 1,1 g/kg KG Fett aufgenommen. Die Fett-Aufnahme an Tag 4 (*hocherhitzte Lebensmittel I, medium AA*) lag bei 75 g bzw. 0,8 - 1,2 g/kg KG und an Tag 7 (*hocherhitzte Lebensmittel II, high AA*) bei 105 g bzw. 1,3 - 1,7 g/kg KG. Vor allem an Tag 7 war sie somit erhöht verglichen zur Aufnahme an den *Washout*-Tagen, an denen die Fett-Aufnahme bei 61 ± 13 g/d bzw. 0,7 - 1,0 g/kg KG/d lag. Zu dieser erhöhten Fett-Aufnahme kam es vor allem durch den Verzehr von hocherhitzen acrylamidreichen Produkten, welche gleichzeitig auch einen hohen Fettgehalt aufwiesen (siehe Tabelle 63 im Anhang).

Tabelle 19: Tägliche Fett-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Fett-Aufnahme		
	[g]	[g/kg KG]	[E%]
Tag 1	67	0,8 - 1,1	25
Tag 2	71	0,8 - 1,1	26
Tag 3	43	0,5 - 0,7	17
Tag 4	75	0,8 - 1,2	26
Tag 5	67	0,8 - 1,1	25
Tag 6	71	0,8 - 1,1	26
Tag 7	105	1,3 - 1,7	35
Tag 8	71	0,8 - 1,1	26
Tag 9	43	0,5 - 0,7	17
Ø	68 ± 19	0,8 ± 0,2 - 1,1 ± 0,3	25 ± 5

E%: Energieprozent, KG: Körpergewicht

Der Bezug der täglichen Fett-Aufnahme auf die tägliche Energie-Aufnahme ergab, dass die Fett-Aufnahme der Probanden durchschnittlich 25 ± 5 E% betrug. Somit lag sie im Bereich der durchschnittlichen Fett-Aufnahme von Erwachsenen in Europa ($< 30 - 47$ E%). Ebenfalls stimmt die Fett-Aufnahme der Probanden weitgehend mit dem von der EFSA angegebenen Referenzbereich (20 - 35 E%) für die Fett-Aufnahme (EFSA, 2010b) sowie mit der Empfehlung der DGE (30 E%) überein (DGE, 2016).

4.2.4.7 Energie-Aufnahme

Die Energie-Aufnahme der Probanden wurde bereits vor Studienbeginn abgeschätzt um sicherzustellen, dass der Energiebedarf der Probanden gedeckt und dass die tägliche Energieaufnahme möglichst isokalorisch war.

Zur Abschätzung der täglichen Energie-Aufnahme der Probanden wurde die Software Prodi 5.8 Expert verwendet.

Die tägliche Energie-Aufnahme der Probanden ist in Tabelle 20 angegeben. Eine detaillierte Aufstellung pro Studientag findet sich im Anhang in Tabelle 64 bis Tabelle 68.

Tabelle 20: Tägliche Kalorien-Aufnahme der Probanden (Humanstudie I)

	Kalorien-Aufnahme [kcal]
Tag 1	2540
Tag 2	2501
Tag 3	2361
Tag 4	2634
Tag 5	2540
Tag 6	2501
Tag 7	2837
Tag 8	2501
Tag 9	2361
Ø	2531 ± 143

Durchschnittlich betrug die Energie-Aufnahme 2532 ± 143 kcal/d. An Tag 4 (*hocherhitzte Lebensmittel I, medium AA*) und Tag 7 (*hocherhitzte Lebensmittel II, high AA*) war sie mit 2634 kcal/d und 2837 kcal/d verglichen zur Energie-Aufnahme an den *Washout*-Tagen, welche bei 2472 ± 78 kcal lag, erhöht. Zu dieser erhöhten Energiezufuhr kam es vor allem dadurch, dass an Tag 4 und Tag 7 hocherhitzte acrylamidreiche Lebensmittel verzehrt wurden, bei denen es sich überwiegend frittierte oder in Fett angebratene Lebensmittel handelte, die einen hohen Energie-Gehalt aufwiesen (siehe Tabelle 63 im Anhang).

Das Alter der Probanden lag zwischen 20 und 31 Jahren und die Aktivität der Probanden während der Studie wurde als gering bis moderat eingestuft (*physical activity level* (PAL): 1,4 - 1,6). Die entsprechende tägliche Energieaufnahme sollte nach DGE 2400 - 2800 kcal/d für Männer im Alter von 19 bis 24 Jahren bzw. 2300 - 2700 kcal/d für Männer im Alter von 25 bis 50 Jahren betragen (DGE, 2016). Die EFSA gibt

entsprechend den durchschnittlichen Energiebedarf von Männern im Alter von 18 bis 29 Jahren mit 2338 - 2818 kcal/d und den von Männern im Alter von 30 bis 39 Jahren mit 2264 - 2679 kcal/d an (EFSA, 2013). Die Energie-Aufnahme der Probanden an den *Washout*-Tagen und an Tag 4 lag somit im Bereich der empfohlenen Referenzwerte. An Tag 7 wurden die Referenzwerte der täglichen Energie-Aufnahme geringfügig überschritten.

4.2.5 Analyse der Raumluft

4.2.5.1 Acrolein

Die Acrolein-Konzentration in der Raumluft wurde am Studienort bestimmt, um zu überprüfen, ob diese einen signifikanten Beitrag zur Acrolein-Aufnahme der Probanden geleistet haben könnte.

Die Bestimmung erfolgte durch die SGS-TÜV Saar GmbH (Kaiserslautern, Deutschland). Zur Probenahme wurde eine DNPH-Kartusche verwendet und die anschließende Analyse erfolgte mittels HPLC. Der LOD der Methode lag bei $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Es erfolgten Einzelbestimmungen in einem Schlafraum, im Aufenthaltsraum, im Essensraum und in der Küche. Die ermittelten Acrolein-Gehalte sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Acrolein-Konzentration der Raumluft am Studienort (Humanstudie I)

Ort der Probenahme	Acrolein [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Schlafraum	< LOD
Aufenthaltsraum	< LOD
Essensraum	< LOD
Küche	< LOD

LOD: Nachweisgrenze ($1 \mu\text{g}/\text{m}^3$)

In allen Räumen war die Acrolein-Konzentration in der Raumluft unter dem LOD von $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Es konnte somit gezeigt werden, dass keine unerwünschte exogene Acrolein-Exposition über $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ stattfand. Erreicht wurde dies durch die Wahl des abgelegenen Studienortes, an dem Rauchverbot herrschte, es keine offenen Feuerstellen gab und die Küche mit einer leistungsstarken Belüftungsanlage ausgestattet war.

Vergleichbar geringe Acrolein-Konzentration von $< 0,05$ bis $8,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ wurden in Wohnhäusern in Kanada gemessen ((Bell *et al.*, 1994; Bell, 1995; Bell, 1996; Bell, 1997) aus (Enviroment Canada, 2000)). Messungen in Wohnhäusern in den USA ergaben mit $2,1$ bis $12,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ geringfügig höhere Acrolein-Konzentrationen (Seaman *et al.*, 2007). Zum Teil deutlich höhere Konzentrationen von 2 bis $275 \mu\text{g}/\text{m}^3$ wurden in rauchbelasteten Cafés und Restaurants in Deutschland nachgewiesen (IARC, 1995).

4.2.6 Analyse des Urins der Probanden

4.2.6.1 Urinvolumina

Die Konzentration von Fremdstoffen in Urin unterliegt diuresebedingten Schwankungen (HBC, 2005). Um diese Schwankungen auszugleichen wurde der gesamte Urin der Probanden gesammelt und das Urinvolumen als Bezugsgröße für die Acrolein- und Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren bestimmt.

Zur Bestimmung der Urinvolumina wurden die Uringewichte ermittelt und unter Annahme einer Dichte von 1 kg/l umgerechnet.

Das mittlere Urinvolumen, welches pro Tag von den Probanden ausgeschieden wurde, lag bei $2,4 \pm 0,6$ l. Einen Überblick über die bestimmten Urinvolumina geben Tabelle 69 und Tabelle 70 im Anhang.

4.2.6.2 Kreatinin

Neben dem Urinvolumen stellt Kreatinin eine weitere anerkannte Bezugsgröße für Stoffgehalte in Urin dar. Kreatinin wird als Nebenprodukt des Proteinstoffwechsels in der Niere überwiegend glomerulär filtriert und nicht rückresorbiert. Die Kreatinin-Bildung ist weitgehend proportional zur Muskelmasse und die 24-h-Ausscheidung individuell relativ konstant (HBC, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Kreatinin als Bezugsgröße für die Acrolein- und Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren bestimmt.

Die Bestimmung von Kreatinin im Urin der Probanden erfolgte als Zweifachbestimmung mittels Kreatinin-Assay-Kit (siehe Kapitel 7.4).

Durchschnittlich lag die Kreatinin-Ausscheidung der Probanden bei $0,97 \pm 0,20$ g/l. Die Ergebnisse der Kreatinin-Bestimmungen sind im Anhang in Tabelle 71 bis Tabelle 73 zu finden.

4.2.6.3 Acrylamid-assoziierte Mercaptursäuren

Die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA wurden im Urin der Probanden bestimmt und mit der alimentären Acrylamid-Aufnahme der Probanden an Tag 4 (*medium AA*) von $0,6 - 0,9$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ (761 nmol/d) sowie an Tag 7 (*high AA*) von $1,3 - 1,8$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ (1526 nmol/d) verglichen. Dieser Vergleich erfolgte um die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Biomarker der alimentären Acrylamid-Aufnahme zu etablieren. Die alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probanden lag an Tag 4 im Bereich der mittleren täglichen Aufnahme von Erwachsenen in Europa ($0,4 - 0,9$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) und an Tag 7 spiegelte sie das 95. Perzentil der täglichen Exposition von Erwachsenen in Europa ($0,6 - 2,0$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) wider (EFSA, 2015a). Die Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA wurde nicht nur nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme an Tag 4 und Tag 7 bestimmt, sondern auch an den anderen Studientagen, an denen der Studienplan eine Acrylamid-minimierte Ernährung (*washout*) vorsah. Es wurde untersucht, ob diese Ernährung, die mit einer Acrylamid-Aufnahme von $0,02 - 0,04$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ ($26 - 37$ nmol/d) einherging, zu einer Reduktion der AAMA- und GAMA-Ausscheidung führte. Ebenfalls wurde die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA mit der Aufnahme von Proteinen, Asparagin, Fett und Kohlenhydraten korreliert.

Die Bestimmung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Probandenurin erfolgte mittels SIVA. Zur Probenaufarbeitung wurde eine SPE durchgeführt (siehe Kapitel 7.2.1) und die anschließende Quantifizierung der Gehalte erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS (siehe Kapitel 7.2.2). Die Bestimmung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

AAMA-Ausscheidung

Die tägliche AAMA-Ausscheidung der Probanden ($n = 14$) ist in Abbildung 27 dargestellt. Über alle Studientage gemittelt lag sie bei 206 ± 34 nmol ($0,10 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin). An Tag 1 lag sie bei

200 ± 136 nmol (0,10 ± 0,06 µmol/g Kreatinin) und sank nach initialer *Washout*-Phase an Tag 3 auf 93 ± 31 nmol (0,05 ± 0,02 µmol/g Kreatinin). An Tag 4 (*medium AA*) wurde eine AAMA-Ausscheidung von 225 ± 37 nmol (0,11 ± 0,01 µmol/g Kreatinin) und an Tag 7 (*high AA*) von 404 ± 78 nmol (0,17 ± 0,04 µmol/g Kreatinin) bestimmt.

Die AAMA-Ausscheidung der Probanden lag nach der initialen dreitägigen *Washout*-Phase unter der mittleren Ausscheidung von Nichtrauchern von 0,13 - 0,32 µmol/g (Bjellaas *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2008; Schettgen *et al.*, 2008). Nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*medium AA* und *high AA*) war die AAMA-Ausscheidung der Probanden vergleichbar zu der von Nichtrauchern.

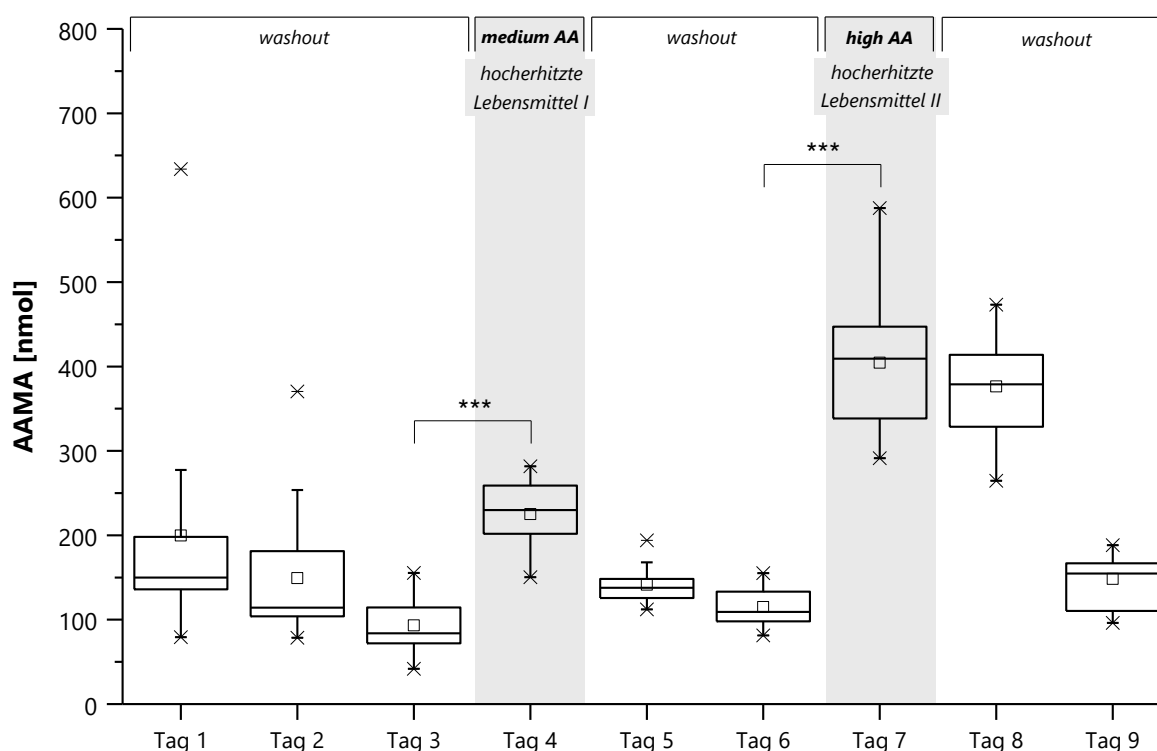


Abbildung 27: Tägliche AAMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den täglichen Gesamtausscheidungen der einzelnen der Probanden (n = 14) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des 1,5 x IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: minimierte Acrylamid-Aufnahme, 26 - 37 nmol/d (0,02 - 0,04 µg/kg KG/d); *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme, 761 nmol/d (0,6 - 0,9 µg/kg KG/d); *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme, 1526 nmol/d (1,3 - 1,8 µg/kg KG/d); AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, ***p < 0,001

GAMA-Ausscheidung

Abbildung 28 stellt die tägliche GAMA-Ausscheidung der Probanden (n = 14) dar. Diese lag über den gesamten Studienzeitraum im Mittel bei 31 ± 8 nmol (0,02 ± 0,004 µmol/g Kreatinin). Am ersten Studientag lag die GAMA-Ausscheidung der Probanden bei 33 ± 14 nmol (0,02 ± 0,01 µmol/g Kreatinin). Die geringste tägliche GAMA-Ausscheidung erfolgte mit 23 ± 8 nmol (0,01 ± 0,004 µmol/g Kreatinin) nach dreitägiger *Washout*-Phase an Tag 3. An Tag 4 (*medium AA*) lag die GAMA-Ausscheidung der Probanden bei 29 ± 7 nmol (0,01 ± 0,003 µmol/g Kreatinin) und an Tag 7 (*high AA*) bei 40 ± 9 nmol (0,02 ± 0,004 µmol/g Kreatinin). Die höchste GAMA-Ausscheidung der Probanden von 51 ± 9 nmol

($0,03 \pm 0,004 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin) wurde am Tag 8 ermittelt, am Tag nach dem die höchste Acrylamid-Aufnahme (*high AA*, Tag 7) erfolgt ist.

Die GAMA-Ausscheidung der Probanden war an Tag 3 nach der initialen *Washout*-Phase etwas geringer als die GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern und nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme vergleichbar zur GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern, die nach Literaturangaben bei $0,02 - 0,09 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin liegt (Bjellaas *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2008; Kopp *et al.*, 2008).

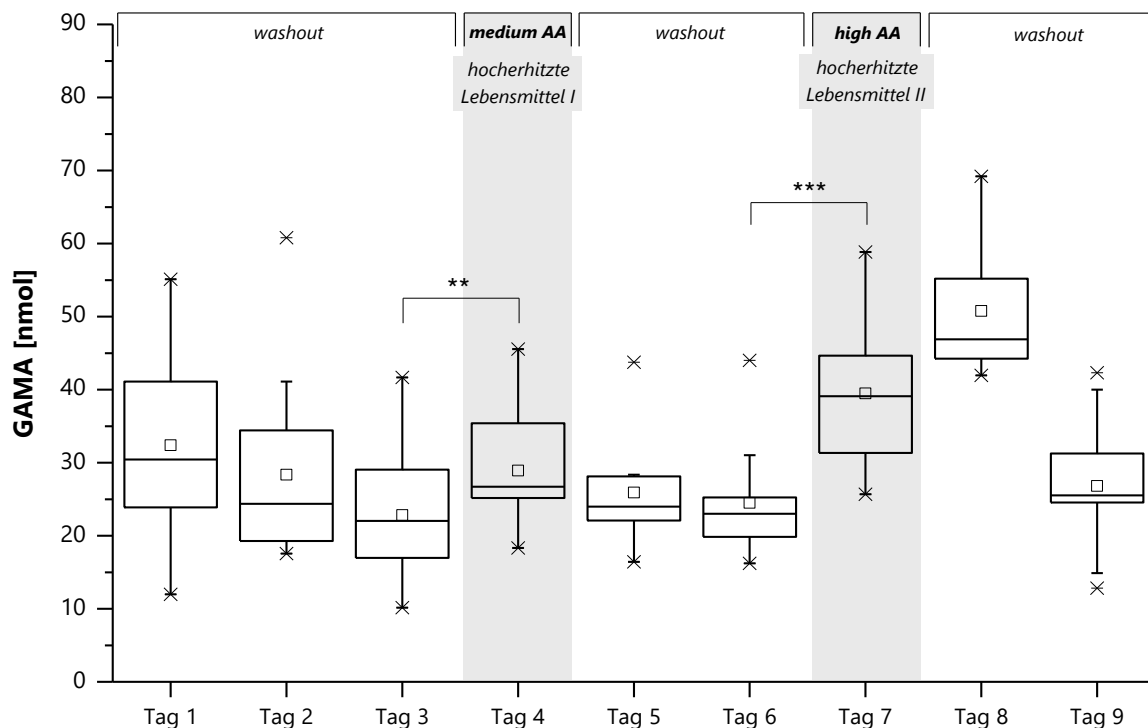


Abbildung 28: Tägliche GAMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den täglichen Gesamtausscheidungen der einzelnen Probanden ($n = 14$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times \text{IQR}$ Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: minimierte Acrylamid-Aufnahme, $26 - 37 \text{ nmol/d}$ ($0,02 - 0,04 \mu\text{g/kg KG/d}$); *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme, 761 nmol/d ($0,6 - 0,9 \mu\text{g/kg KG/d}$); *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme, 1526 nmol/d ($1,3 - 1,8 \mu\text{g/kg KG/d}$); GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Verhältnis der GAMA-/AAMA-Ausscheidung

Aus den täglichen AAMA- und GAMA-Ausscheidungen der Probanden wurden deren Verhältnisse (GAMA/AAMA-Ausscheidung) ermittelt (siehe Abbildung 29). Es ergab sich ein mittleres tägliches GAMA/AAMA-Verhältnis von $0,18 \pm 0,13$. Das Verhältnis variierte intraindividuell von Tag zu Tag (Standardabweichung: 17 - 32 %) und unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) zwischen den Tagen mit Acrylamid-reicher Ernährung (Tag 4: $0,13 \pm 0,03$; Tag 7: $0,10 \pm 0,02$) und den übrigen Tagen, an denen der Ernährungsplan eine Acrylamid-minimierte Ernährung vorsah ($0,19 \pm 0,04$). Ebenfalls variierte das GAMA/AAMA-Verhältnis interindividuell von Proband zu Proband (Standardabweichung: 16 - 31 %). Solche interindividuellen Unterschieden wurden auch von Duale *et al.* (2009) für das GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis beobachtet. Ein Grund für diese interindividuellen Unterschiede können Polymorphismen von Enzymen sein, welche am Acrylamid-Metabolismus beteiligt sind. Duale *et al.* konnte eine signifikante Assoziation zwischen GSTM1- und GSTT1-Genotypen und dem GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis nachgewiesen.

Ebenfalls zeigte sich eine Assoziation zwischen verschiedenen Kombinationen von GST-, Cytochrom- und Epoxidhydrolase-Genotypen und dem GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis (Duale *et al.*, 2009).

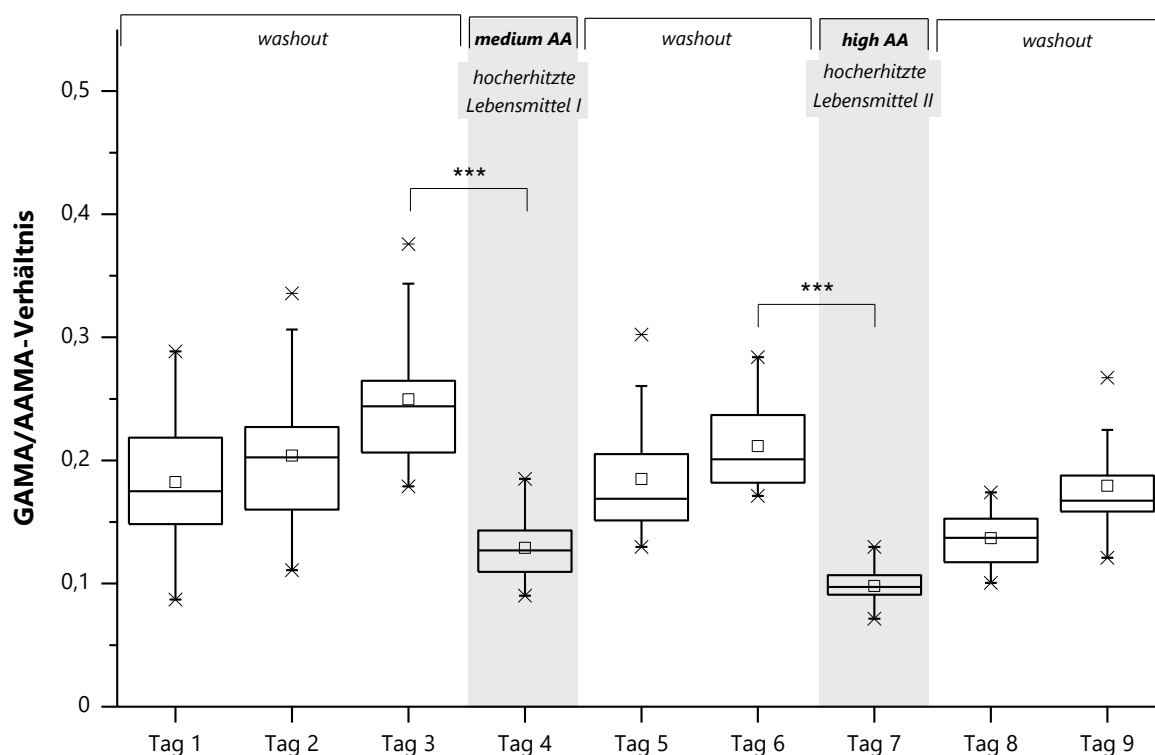


Abbildung 29: Verhältnisse der GAMA-/AAMA-Ausscheidung aller Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den GAMA/AAMA-Verhältnissen der einzelnen Probanden ($n = 14$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: minimierte Acrylamid-Aufnahme, 26 - 37 nmol/d (0,02 - 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg KG/d}$); *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme, 761 nmol/d (0,6 - 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG/d}$); *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme, 1526 nmol/d (1,3 - 1,8 $\mu\text{g}/\text{kg KG/d}$); AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, *** $p < 0,001$

Korrelation der AAMA- und GAMA-Ausscheidung mit der alimentären Acrylamid-Aufnahme

In Abbildung 30 ist die tägliche AAMA- und GAMA-Ausscheidung der Probanden der täglichen alimentären Acrylamid-Aufnahme gegenübergestellt.

Initiale Washout-Phase (Tag 1 - Tag 3)

Die ersten drei Tage der neuntägigen Humanstudie I stellten eine *Washout*-Phase dar, während der sich die Probanden an einen Acrylamid-minimierten Ernährungsplan hielten, welcher nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel ($\leq 100^\circ\text{C}$) beinhaltete und zu einer täglichen Acrylamid-Aufnahme von 26 - 37 nmol/d (0,02 - 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg KG/d}$) führte. Die mittlere AAMA-Ausscheidung der Probanden reduzierte sich in diesem Zeitraum von 200 ± 136 nmol an Tag 1 auf 93 ± 31 nmol an Tag 3. Analog kam es zu einer Abnahme der GAMA-Ausscheidung von 32 ± 13 nmol an Tag 1 auf 23 ± 8 nmol an Tag 3.

Mittlere Acrylamid-Aufnahme (Tag 4) und folgende Washout-Phase (Tag 5 - Tag 6)

Nach Verzehr von hocharhitzten Lebensmitteln ($> 100^\circ\text{C}$) an Tag 4 (*medium AA*) und einer entsprechend erhöhten täglichen Acrylamid-Aufnahme von 761 nmol (0,6 - 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG/d}$) stieg die AAMA-Aus-

scheidung auf 225 ± 37 nmol und die GAMA-Ausscheidung auf 29 ± 7 nmol. Innerhalb der folgenden zweitägigen *Washout*-Phase mit einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 31 - 37 nmol/d ($0,03 - 0,04 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) sank die Mercaptursäure-Ausscheidung an Tag 6 wieder bis auf 115 ± 21 nmol AAMA und 25 ± 7 nmol GAMA.

Hohe Acrylamid-Aufnahme (Tag 7) und folgende Washout-Phase (Tag 8 - Tag 9)

Die höchste Acrylamid-Aufnahme durch Verzehr von hocherhitzten Lebensmitteln ($> 100 \text{ }^\circ\text{C}$) erfolgte an Tag 7 (*high AA*) und lag bei 1526 nmol ($1,3 - 1,8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) und resultierte in der höchsten Mercaptursäure-Ausscheidung. An Tag 7 lag die AAMA-Ausscheidung bei 404 ± 78 nmol und die GAMA-Ausscheidung bei 40 ± 9 nmol. An den folgenden zwei Tagen folgten die Probanden einem Acrylamid-minimierten Ernährungsplan (*Washout*-Phase), welcher in einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 26 - 37 nmol/d ($0,2 - 0,4 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) resultierte. Trotz dieser Acrylamid-minimierten Ernährung kam es an Tag 8 nur zu einer geringfügigen Abnahme der AAMA-Ausscheidung auf 376 ± 57 nmol und die GAMA-Ausscheidung erreichte an diesem Tag ihr Maximum von 51 ± 9 nmol. Am letzten Studientag sank die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren auf 148 ± 30 nmol AAMA und 27 ± 8 nmol GAMA.

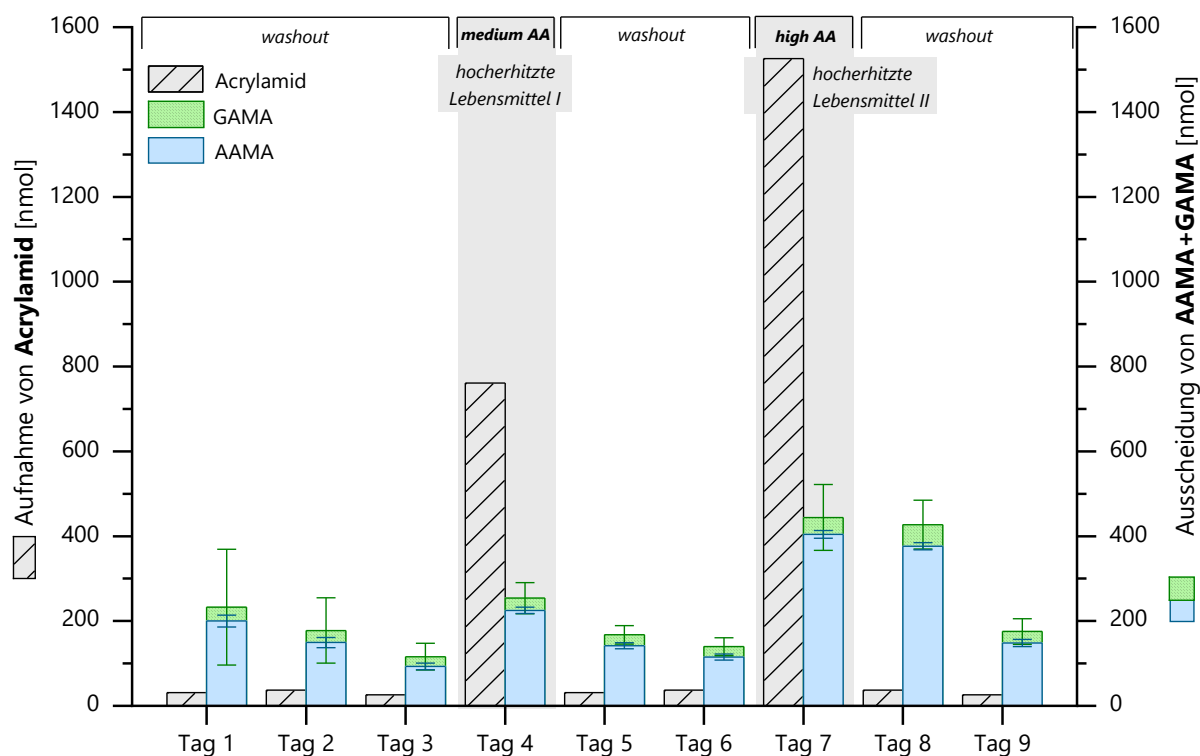


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der täglichen Acrylamid-Aufnahme [nmol] und der täglichen AAMA- und GAMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichungen ($\pm\text{SD}$) berechnet aus den täglichen Gesamtaufnahmen bzw. -ausscheidungen der einzelnen Probanden ($n = 14$) dar. *washout*: minimierte Acrylamid-Aufnahme, 26 - 37 nmol/d ($0,02 - 0,04 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$); *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme, 761 nmol/d ($0,6 - 0,9 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$); *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme, 1526 nmol/d ($1,3 - 1,8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$); AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein

AAMA und GAMA als Biomarker der alimentären Acrylamid-Aufnahme

Um AAMA und GAMA als Biomarker der alimentären Acrylamid-Aufnahme zu etablieren, erfolgte die Berechnung der prozentualen Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA nach mittlerer (0,6 - 0,9 µg/kg KG/d) sowie hoher Acrylamid-Aufnahme (1,3 - 1,8 µg/kg KG/d). Diese ermittelten prozentualen Ausscheidungen wurden verglichen (mittlere vs. hohe Acrylamid-Aufnahme). Ebenfalls erfolgte ein Vergleich mit Literaturdaten.

Die Acrylamid-Ausscheidung über 24 Stunden als AAMA lag nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme bei $30 \pm 5 \%$ und nach hoher Acrylamid-Aufnahme bei $27 \pm 5 \%$. Im Zeitraum von 48 Stunden wurden nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme $46 \pm 7 \%$ und nach hoher Acrylamid-Aufnahme $50 \pm 4 \%$ des aufgenommenen Acrylamids als AAMA ausgeschieden. Die Acrylamid-Ausscheidung über 72 Stunden als AAMA lag nach mittlerer und hoher Acrylamid-Aufnahme bei $58 \pm 3 \%$. Entsprechend ergab sich nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme eine Acrylamid-Ausscheidung als GAMA über 24 Stunden von $4 \pm 1 \%$ und nach hoher Acrylamid-Aufnahme von $3 \pm 1 \%$. Über den Zeitraum von 48 Stunden lagen die Acrylamid-Ausscheidung als GAMA nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme bei $7 \pm 1 \%$ und nach hoher Acrylamid-Aufnahme bei $6 \pm 1 \%$. Im Zeitraum von 72 Stunden wurden nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme $10 \pm 1 \%$ des aufgenommenen Acrylamids als GAMA ausgeschieden und nach hoher Acrylamid-Aufnahme $7 \pm 1 \%$.

Somit ergaben sich eine vergleichbare prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA nach mittlerer sowie hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme.

Während Humanstudie I erfolgte die Acrylamid-Aufnahme über hoch erhitzte Lebensmittel im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie existierten keine vergleichbaren Studien. Es existierten jedoch Studien, bei denen eine Acrylamid-Aufnahme durch Aufnahme einzelner hoch erhitzter Lebensmittel (Kartoffelchips, Lebkuchen) erfolgte (Fuhr *et al.*, 2006; Kellert *et al.*, 2006; Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Bei zwei dieser Studien wurde die prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA bestimmt. Zum einen wurde diese nach Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips durch sechs Probanden, welcher zu einer Acrylamid-Aufnahme von $12,4 \mu\text{g/kg KG}$ führte, untersucht. Hier lag die AAMA-Ausscheidung über 72 Stunden bei $50 \pm 9 \%$ und die GAMA-Ausscheidung bei $6 \pm 1 \%$ (Fuhr *et al.*, 2006). Zum anderen erfolgte eine Bestimmung der prozentualen Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA nach dem Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips durch fünf Probanden, welcher mit einer Acrylamid-Aufnahme von $0,6 \mu\text{g/kg KG}$ verbunden war. Diese ermittelte prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA lag über einen Zeitraum von 24 Stunden bei $44,1 \pm 7,1 \%$ (Watzek, 2012).

Ebenfalls existieren Studien bei denen die Acrylamid-Aufnahme durch orale Gabe der isotonen markierten Reinsubstanz erfolgt ist und die prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA bestimmt wurden. Nach Gabe von $3 \text{ mg/kg KG } ^{13}\text{C}_3\text{-Acrylamid}$ wurden in einem Zeitraum von 24 Stunden $22 \pm 5 \%$ der Dosis als AAMA ausgeschieden (Fennell und Friedman, 2005; EFSA, 2015a). Die Gabe von 0,5; 1,0 und $3,0 \text{ mg/kg KG } ^{13}\text{C}_3\text{-Acrylamid}$ resultierte einer Acrylamid-Ausscheidung über 24 Stunden als AAMA von $31 \pm 7 \%$, $34 \pm 5 \%$ und $28 \pm 8 \%$ und als GAMA von $0,8 \pm 0,2 \%$, $0,8 \pm 0,1 \%$ und $0,7 \pm 0,2 \%$ (Fennell *et al.*, 2006). In einer weiteren Studie, in der eine Acrylamid-Gabe von 0,5 bzw. $20 \mu\text{g/kg KG } ^{13}\text{C}_3\text{-Acrylamid}$ erfolgte, lag die Acrylamid-Ausscheidung über 24 Stunden als AAMA bei

41 ± 4 % bzw. 37 ± 3 % und als GAMA bei 4 ± 1 % bzw. 3 ± 1 % (Kopp und Dekant, 2009). Ein Ausscheidungszeitraum von 46 Stunden wurde nach Gabe von 13,2 µg/kg KG D₃-Acrylamid betrachtet. In diesem Zeitraum wurden 52 % des aufgenommenen Acrylamids als AAMA ausgeschieden und 5 % als GAMA (Boettcher *et al.*, 2006).

Die im Rahmen von Humanstudie I ermittelte prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA ist somit nicht nur vergleichbar mit der Ausscheidung nach Verzehr von Kartoffelchips, sondern auch mit der Ausscheidung nach Acrylamid-Aufnahme durch orale Gabe der isotopenmarkierten Reinsubstanz. Die Mercaptursäuren AAMA und GAMA stellen somit geeignete Biomarker einer mittleren (0,6 - 0,9 µg/kg KG/d) und hohen alimentären Acrylamid-Exposition (1,3 - 1,8 µg/kg KG/d) dar, wobei die mittlere Acrylamid-Aufnahme der Probanden im Bereich der mittleren täglichen Aufnahme von Erwachsenen in Europa (0,4 - 0,9 µg/kg KG) lag und die hohe Acrylamid-Aufnahme der Probanden das 95. Perzentil der täglichen Exposition von Erwachsenen in Europa (0,6 - 2,0 µg/kg KG/d) widerspiegelte (EFSA, 2015a).

Als Biomarker der alimentären Acrylamid-Exposition fanden AAMA und GAMA auch in der Nachfolgestudie von Humanstudie I Anwendung. In dieser Studie erfolgte eine sehr hohe alimentäre Acrylamid-Aufnahme (14,1 - 15,9 µg/kg KG/d), welche in einer Acrylamid-Ausscheidung als AAMA von 23 % (24 h) bzw. 44 % (96 h) resultierte. Entsprechend wurde eine Acrylamid-Ausscheidung als GAMA von 2 % (24 h) bzw. 5 % (96 h) ermittelt (Goempel *et al.*, 2017). Diese prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA war vergleichbar mit der in Humanstudie I ermittelten prozentualen Ausscheidung nach mittlerer und hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme sowie mit der prozentualen Ausscheidung nach Acrylamid-Aufnahme durch orale Gabe der isotopenmarkierten Reinsubstanz. Die Eignung von AAMA und GAMA als Biomarker einer alimentären Acrylamid-Exposition (Humanstudie I: 0,6 - 1,8 µg/kg KG/d, Goempel *et al.* (2017): 14,1 - 15,9 µg/kg KG/d) wurde somit bestätigt (Goempel *et al.*, 2017).

Eine Korrelation der AAMA- und GAMA-Ausscheidung mit der alimentären Acrylamid-Aufnahme über den gesamten Studienzeitraum, welcher auch *Washout*-Phasen mit einer alimentären Acrylamid-Exposition von 0,02 - 0,04 µg/kg KG/d beinhaltete, wurde durch Berechnung von Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman überprüft. Nach Pearson ergaben sich für die AAMA-Ausscheidung und die Acrylamid-Aufnahme ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,660$ ($p = 0,053$). Der Korrelationskoeffizient für die GAMA-Ausscheidung und die Acrylamid-Aufnahme war nach Pearson $r = 0,296$ ($p = 0,439$). Nach Spearman waren die Korrelationskoeffizienten entsprechend $r = 0,701$ ($p = 0,035$) und $r = 0,573$ ($p = 0,107$). Somit ergab sich nur eine schwache bis keine signifikante Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit der Acrylamid-Aufnahme. Grund für diese geringen Korrelationskoeffizienten sind die hohe Anzahl an *Washout*-Tagen (Tag 1 - Tag 3, Tag 5 - Tag 6 und Tag 8 - Tag 9), an denen nur eine sehr geringe Menge an Acrylamid (0,02 - 0,04 µg/kg KG) aufgenommen wurde und trotzdem signifikante Mengen an AAMA und GAMA ausgeschieden wurden. Auf diese beobachtete AAMA- und GAMA-Ausscheidung an den *Washout*-Tagen (Basislevel) wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Basislevel der AAMA- und GAMA-Ausscheidung

Am letzten Tag der dreitägigen initialen *Washout*-Phase der Humanstudie I lag die Mercaptursäure-Ausscheidung (AAMA: 93 ± 31 nmol, GAMA: 29 ± 7 nmol) der Probanden noch deutlich über der

Acrylamid-Aufnahme (26 nmol) (siehe Abbildung 30). Ausgehend von einer Acrylamid-Ausscheidungsrate von 30 % als AAMA über 24 Stunden, entsprach die AAMA-Ausscheidung an Tag 3 einer Acrylamid-Aufnahme von 311 nmol/d bzw. 22 µg/d (0,3 - 0,4 µg/kg KG/d). Abzüglich der täglichen alimentären Acrylamid-Aufnahme während der initialen *Washout*-Phase (2,2 µg/d) ergab sich ein Basislevel, welches einer Acrylamid-Aufnahme von 20 µg/d (0,2 - 0,3 µg/kg KG/d) entsprach.

Dass es sich beim beobachteten Basislevel nach dreitägiger *Washout*-Phase um ein „tatsächliches“ Basislevel handelt und nicht um eine Mercaptursäure-Ausscheidung bedingt durch eine hohe alimentäre und/oder nicht-alimentäre Acrylamid-Aufnahme vor Studienbeginn, bestätigen eine Tierstudie (Watzek *et al.*, 2012a) und eine Folgestudie, welche nach der Humanstudie I durchgeführt wurde und längere *Washout*-Phasen sowie die Gabe von isotoopenmarkiertem Acrylamid beinhaltete (Goempel *et al.*, 2017).

In der Studie von Watzek *et al.* (2012a) wurde nachdem Sprague-Dawley-Ratten (n = 54) über zwei Wochen eine Acrylamid-minimierte Ernährung erhalten hatten, ein Basislevel der Mercaptursäure-Ausscheidung beobachtet, welches nicht auf die Acrylamid-Aufnahme aus dem Futter zurückzuführen war. Der Acrylamid-Gehalt des Futters lag unterhalb des LODs von 0,5 µg/kg und basierend auf diesem Wert wurde eine maximale Acrylamid-Aufnahme der Kontrollgruppe von 0,1 µg/kg KG/d berechnet. Die ermittelte Ausscheidung der Mercaptursäuren ließ sich jedoch auf eine Acrylamid-Aufnahme von 0,6 - 0,7 µg/kg KG/d zurückrechnen (Watzek *et al.*, 2012a). Durch Subtraktion der maximalen Acrylamid-Aufnahme über das Futter ergibt sich ein Basislevel der Mercaptursäure-Ausscheidung, welches einer Acrylamid-Aufnahme von 0,5 - 0,6 µg/kg KG/d entspricht.

Ebenfalls wurde ein Basislevel der Mercaptursäure-Ausscheidung in der Humanstudie von Goempel *et al.* (2017) beobachtet. Die Humanstudie beinhaltet zwei Studiengruppen, wobei Studiengruppe B (n = 6) über den gesamten 13-tägigen Studienzeitraum einem Acrylamid-minimierten Ernährungsplan (*washout*) folgte und zusätzlich an Tag 6 oral 1 µg/kg KG ¹³C₃-D₃-Acrylamid aufnahm. Studiengruppe A (n = 6) befolgte an Tag 1 bis Tag 9 und an Tag 11 bis Tag 13 den gleichen Acrylamid-minimierten Ernährungsplan wie Studiengruppe B. An Tag 6 verzehrte Studiengruppe A zusätzlich zur Acrylamid-minimierten Nahrung ein Kaffeegetränk (4 x 125 ml) und an Tag 10 Acrylamid-reiche Lebensmittel. Studiengruppe B zeigte an *Washout*-Tag 13 ein AAMA-Basislevel von 140 ± 100 nmol/d und Studiengruppe A am *Washout*-Tag 5 ein AAMA-Basislevel von 120 ± 50 nmol/d und an *Washout*-Tag 9 ein AAMA-Basislevel von 91 ± 54 nmol/d. Unter Annahme einer 30%igen Acrylamid-Ausscheidung als AAMA über 24 Stunden und unter Abzug der maximalen Acrylamid-Aufnahme während der *Washout*-Phase von 4,2 µg/d (= 59 nmol/d) entsprach das Basislevel der Gruppe B einer Acrylamid-Aufnahme von 0,3 - 0,4 µg/kg KG/d (Tag 13) und die Basislevel der Gruppe A einer Acrylamid-Aufnahme von 0,3 µg/kg KG/d (Tag 5) bzw. 0,2 µg/kg KG/d (Tag 9) (Goempel *et al.*, 2017).

Für das in Humanstudie I beobachtete Basislevel der AAMA- und GAMA-Ausscheidung kann es verschiedene Ursachen geben, die im Folgenden diskutiert werden.

Ein Betrag von nicht-alimentären exogenen Acrylamid-Expositionsquellen zum Basislevel der Mercaptursäure-Ausscheidung wurde durch die Wahl des Studienortes ausgeschlossen. Als Studienort wurde ein Gästehaus des Pfälzerwald-Vereins (Naturfreundehaus Finsterbrunnertal) ohne Fahrzeugverkehr, Tabakrauch, offene Feuerstellen oder andere mögliche Quellen einer exogenen Acrylamid-Exposition ausgewählt.

Eine weitere Überlegung war, dass alimentär aufgenommenes Acrylamid, an Nahrungsbestandteile gebunden aufgenommen wurde bzw. im Körper an körpereigene Verbindungen gebunden hat und kontinuierlich aus diesen Verbindungen freigesetzt wurde und so zum Basislevel der Mercaptursäure-Ausscheidung beigetragen haben könnte. Diese Theorie wurde jedoch in der Studie von Goempel *et al.* (2017) widerlegt, in der sechs männliche Probanden oral 1 µg/kg KG isotonenmarkiertes ¹³C₃-D₃-Acrylamid aufnahmen. Die Ausscheidung der isotonenmarkierten Mercaptursäure ¹³C₃-D₃-AAMA fiel bereits nach 30 Stunden unter das in dieser Studie ebenfalls beobachtete AAMA-Basislevel und erreichte bis zum Studienende Werte < LOD bzw. < LOQ (Goempel *et al.*, 2017).

Als eine weitere Erklärung für das Basislevel der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren wurde ein vorliegender endogener Acrylamid-Bildungsmechanismus vermutet. Unterstützung findet diese Vermutung in einer Studie an B6C3F1-Mäusen (n = 29). Nach Exposition mit Substanzen, die freie Radikale induzieren (FeSO₄, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Salzsäure (MPTP) oder Methamphetamin (METH)) wurde eine Zunahme an Acrylamid-Hämoglobin-Addukten festgestellt, welche als Hinweis auf eine endogene Acrylamid-Bildung gewertet wurde (Tareke *et al.*, 2008). Auch *in vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) deuten darauf hin, dass eine endogene Acrylamid-Bildung erfolgen könnte. Nach Inkubation von Asparagin mit H₂O₂ konnte unter den oben genannten Bedingungen eine Acrylamid-Bildung beobachtet werden (Tareke *et al.*, 2009). Einen weiteren vermuteten endogenen Bildungsmechanismus stellte die Reaktion von reduzierenden Zuckern oder anderen reduzierenden Verbindungen mit Aminoverbindungen zu Acrylamid analog zur Maillard-Reaktion dar (Goempel *et al.*, 2017). Derartige Reaktionen wurde bereits im Rahmen der Bildung von sogenannten *advanced glycation endproducts* (AGE) im Körper beschrieben (Vistoli *et al.*, 2013).

AAMA- und GAMA-Ausscheidungskinetik nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme

Zum Erstellen der Ausscheidungskinetik von Acrylamid als AAMA und GAMA nach mittlerer (0,6 - 0,9 µg/kg KG/d) und hoher alimentärer Aufnahme (1,3 - 1,8 µg/kg KG/d) wurde die Kreatinin-bezogene Mercaptursäure-Ausscheidung verwendet. Die AAMA-Ausscheidungskinetik ist in Abbildung 31 und die GAMA-Ausscheidungskinetik in Abbildung 32 dargestellt. Eine Übersicht über die ermittelten Kinetikdaten gibt Tabelle 22.

An Tag 3, nach der initialen *Washout*-Phase und vor Beginn der alimentären Acrylamid-Aufnahme (-12 - 0 h), lag die Konzentration ($c_{washout}$) von AAMA bei $0,05 \pm 0,02$ µmol/g Kreatinin und stieg nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme von 0,6 - 0,9 µg AA/kg KG auf ein c_{max} von $0,15 \pm 0,02$ µmol/g Kreatinin an ($t_{max} = 8 - 12$ h). Die verglichen zur mittleren Aufnahme circa doppelt so hohe Acrylamid-Aufnahme von 1,3 - 1,8 µg AA/kg KG resultierte in einem circa doppelt so hohen c_{max} von $0,29 \pm 0,07$ µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 24 - 28$ h). Die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC, Berechnung siehe Kapitel 7.7.1) lag nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme der Probanden bei $0,58$ µmol/g Kreatinin × 4 h und nach hoher Acrylamid-Aufnahme bei $1,72$ µmol/g Kreatinin × 4 h. Für GAMA lag $c_{washout}$ vor Beginn der alimentären Acrylamid-Aufnahme bei $0,01 \pm 0,005$ µmol/g Kreatinin und stieg nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme auf ein c_{max} von $0,02 \pm 0,003$ µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 12 - 24$ h) und nach hohe Acrylamid-Aufnahme auf ein c_{max} von $0,03 \pm 0,01$ µmol/g Kreatinin ($t_{max} = 24 - 28$ h). Die AUCs waren entsprechend $0,01$ µmol/g Kreatinin × 4 h nach mittlerer und $0,12$ µmol/g Kreatinin × 4 h nach hoher Acrylamid-Aufnahme.

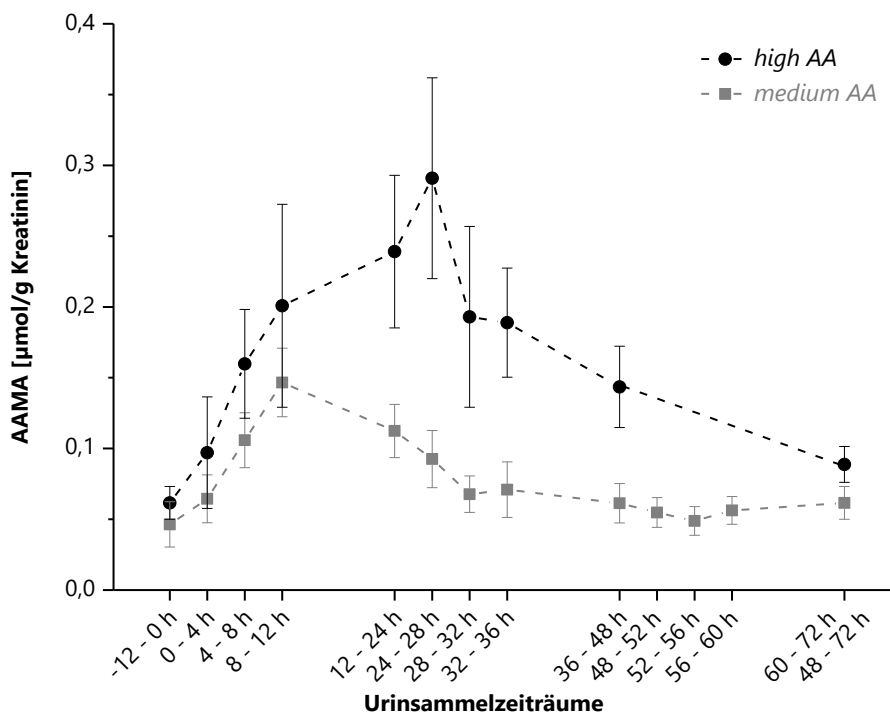


Abbildung 31: AAMA-Ausscheidungskinetik [$\mu\text{mol/g}$ Kreatinin] nach mittlerer alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*medium* AA) und hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*high* AA) (Humanstudie I). Kreise bzw. Quadrate stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichung (\pm SD) berechnet aus den Ausscheidungen der einzelnen Probanden ($n=14$) dar. *medium* AA: $0,6 - 0,9 \mu\text{g/kg KG}$ (Tag 4), *high* AA: $1,3 - 1,8 \mu\text{g/kg KG}$ (Tag 7), AA: Acrylamid, AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein

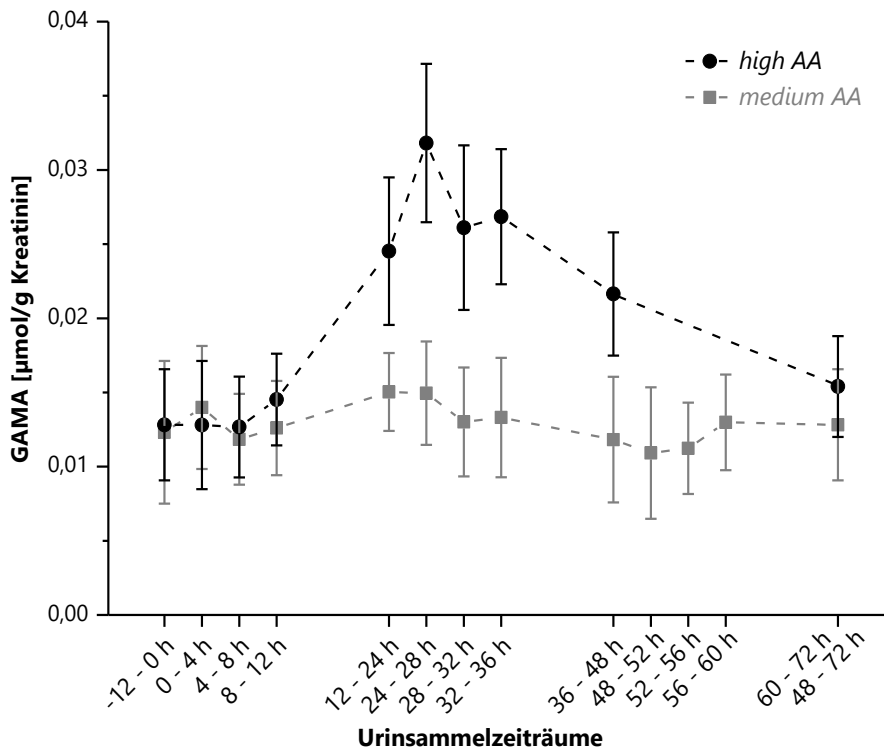


Abbildung 32: GAMA-Ausscheidungskinetik [$\mu\text{mol/g}$ Kreatinin] nach mittlerer alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*medium* AA) und hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*high* AA) (Humanstudie I), Kreise bzw. Quadrate stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichung (\pm SD) berechnet aus den Ausscheidungen der einzelnen Probanden ($n=14$) dar. *medium* AA: $0,6 - 0,9 \mu\text{g/kg KG}$ (Tag 4), *high* AA: $1,3 - 1,8 \mu\text{g/kg KG}$ (Tag 7), AA: Acrylamid, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein

Tabelle 22: Kinetikdaten zur AAMA- und GAMA-Ausscheidungskinetik nach mittlerer alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*medium AA*) und hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*high AA*) (Humanstudie I, n = 14)

		medium AA ¹	high AA ²
AAMA	<i>c_{washout}</i> [µmol/g Kreatinin]	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01
	<i>c_{max}</i> [µmol/g Kreatinin]	0,15 ± 0,02	0,29 ± 0,07
	<i>t_{max}</i> [h]	8 - 12	24 - 28
	AUC [µmol/g Kreatinin × 4 h]	0,58	1,72
GAMA	<i>c_{washout}</i> [µmol/g Kreatinin]	0,01 ± 0,005	0,01 ± 0,004
	<i>c_{max}</i> [µmol/g Kreatinin]	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,01
	<i>t_{max}</i> [h]	12 - 24	24 - 28
	AUC [µmol/g Kreatinin × 4 h]	0,01	0,12

¹medium AA: 0,6 - 0,9 µg AA/kg KG (Tag 4), ²high AA: 1,3 - 1,8 µg AA/kg KG (Tag 7); AA: Acrylamid, AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, AUC: Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, Berechnung siehe Kapitel 7.7.1), *c_{max}*: maximale Konzentration, *c_{washout}*: Washout-Konzentration (-12 - 0 h), GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, KG: Körpergewicht, *t_{max}*: Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung

c_{washout}-Werte für AAMA und GAMA wurden bisher noch in einer weiteren Humanstudie ermittelt. Nach einer fünftägigen *Washout*-Phase, während der eine Acrylamid-minimierte Ernährung vergleichbar zu der in Humanstudie I konsumiert wurde, lag die AAMA-Konzentration bei 0,06 ± 0,04 µmol/g Kreatinin (Gruppe A, n = 6) bzw. 0,08 ± 0,06 µmol/g Kreatinin (Gruppe B, n = 6). Für GAMA ergab sich nach fünftägiger *Washout*-Phase für Gruppe A und Gruppe B eine *Washout*-Konzentration von jeweils 0,02 ± 0,01 µmol/g (Goempel *et al.*, 2017). Nach elfstündigem Fasten vor Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips (n = 13) bzw. kommerziell erhältlichen Kartoffelchips (n = 5) wurden für AAMA mittlere *Predose*-Konzentrationen von 0,05 ± 0,02 µmol/g Kreatinin und 0,08 ± 0,05 µmol/g Kreatinin ermittelt. Die entsprechenden mittleren *Predose*-Konzentrationen für GAMA lagen jeweils bei 0,02 ± 0,01 µmol/g Kreatinin (Watzek *et al.*, 2012b). Die *Washout*-Konzentrationen, die in Humanstudie I ermittelt wurden, waren somit vergleichbar zu den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen nach *Washout* bzw. Fasten.

Die bestimmten *c_{max}*-Werte waren abhängig von der aufgenommenen Acrylamid-Menge. Eine doppelt so hohe Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 (*high AA*) verglichen zu Tag 4 (*medium AA*) resultierte in einem circa doppelt so hohen *c_{max}*-Wert für AAMA. Die *c_{max}*-Werte für AAMA und GAMA nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme (0,6 - 0,9 µg/kg KG, 54 µg) an Tag 4 waren vergleichbar zu *c_{max}*-Werten nach Acrylamid-Aufnahme (0,6 µg/kg KG, 44 µg) durch Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips durch fünf Probanden. Für AAMA lag *c_{max}* nach dem Verzehr der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips bei 0,16 ± 0,03 µmol/g Kreatinin und für GAMA bei 0,03 ± 0,02 µmol/g Kreatinin (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b).

Höhere *c_{max}*-Werten ergaben sich nach höherer alimentärer Acrylamid-Aufnahme. Die Acrylamid-Aufnahme (123 µg) durch den Verzehr von Lebkuchen durch drei Probanden resultierte in einem *c_{max}* von 401 ng/mg Kreatinin (1,71 µmol/g Kreatinin) für AAMA und von 15 ng/mg Kreatinin (0,06 µmol/g Kreatinin) für GAMA (Kellert *et al.*, 2006). Nach Acrylamid-Aufnahme (14,8 µg/kg KG, 938 µg) durch den Verzehr der selbst hergestellten Kartoffelchips durch 13 Probanden ergaben ein *c_{max}* von 1,16 ± 0,47 µmol/g Kreatinin für AAMA und 0,08 ± 0,05 µmol/g Kreatinin für GAMA (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Eine vergleichbare Acrylamid-Aufnahme (14,1 - 15,9 µg/kg KG) durch den Verzehr

verschiedener Acrylamid-haltiger Lebensmittel über einen Studientag verteilt führte zu einem c_{max} von 2,79 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin für AAMA und 0,28 $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin für GAMA (Goempel *et al.*, 2017).

Während Humanstudie I wurde die maximalen AAMA- und GAMA-Konzentrationen nach mittlerer Acrylamid-Aufnahme nach einer kürzeren Zeit erreicht (t_{max} : AAMA: 8 - 12 h, GAMA: 12 - 24 h) als nach hoher Aufnahme (t_{max} : AAMA: 24 - 28 h, GAMA: 24 - 28 h). Ein Grund für die frühere maximale AAMA-Ausscheidung stellt die frühere Acrylamid-Aufnahme dar. Am Tag der mittleren Acrylamid-Aufnahme (Tag 4, *medium AA*) begann der Acrylamid-Aufnahme-Zeitraum mit dem Frühstück um 8:00 Uhr (0 h) und endete mit dem Abendessen um 18:00 Uhr (10 h). Die Hauptaufnahme von Acrylamid (55 %) erfolgte während des Mittagessens um 12:00 Uhr (4 h). Am Tag der hohen Acrylamid-Aufnahme (Tag 7, *high AA*) begann der Acrylamid-Aufnahme-Zeitraum mit dem Frühstück um 8:00 Uhr (0 h) und endete mit einem Snack, der zwischen 20:00 und 21:00 Uhr (12 - 13 h) verzehrt wurde. Dieser am Abend verzehrte Snack führte zur Hauptaufnahme von Acrylamid (43 %) an diesem Tag.

Die ermittelten t_{max} -Werte waren vergleichbar zu den t_{max} -Werten nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 14,1 - 15,9 $\mu\text{g/kg KG}$ durch Verzehr verschiedener Acrylamid-haltiger Lebensmittel durch sechs Probanden. T_{max} lag bei dieser Studie für AAMA bei 25 h und für GAMA bei 28 h (Goempel *et al.*, 2017). Nach Acrylamid-Aufnahme (0,6 $\mu\text{g/kg KG}$, $n = 5$) durch Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurde für AAMA und GAMA ein t_{max} von 6 h ermittelt. Die Acrylamid-Aufnahme (14,8 $\mu\text{g/kg KG}$, $n = 13$) durch Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips resultierte in einem t_{max} von 6 h für AAMA und von 16 h für GAMA (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Dass die t_{max} -Werte in diesen Vergleichsstudien kleiner waren als in Humanstudie I, lässt sich dadurch erklären, dass die Acrylamid-Aufnahme durch Verzehr von hochoverhitzten Lebensmitteln in Humanstudie I über den ganzen Tag verteilt (0 - 14 h) erfolgte und nicht wie bei den Vergleichsstudien zu einem definierten Zeitpunkt (0 h).

Neben Studien die eine alimentäre Acrylamid-Aufnahme beinhalteten, existieren auch Studien in denen die Acrylamid-Aufnahme durch orale Gabe von isopenmarkierter Reinsubstanz erfolgte. Auch in diesen Studien waren die t_{max} -Werte kleiner als bei Humanstudie I, denn auch bei diesen Studien erfolgte die Acrylamid-Aufnahme zu einem definierten Zeitpunkt (0 h). Nach Acrylamid-Aufnahme (1 $\mu\text{g/kg KG}$, $n = 6$) in Form von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid ergab sich ein t_{max} von 11 h für AAMA (Goempel *et al.*, 2017). Die Aufnahme von D_3 -Acrylamid (13,2 $\mu\text{g/kg KG}$, $n = 1$) ergab ein t_{max} von 11,5 h für AAMA und 22,5 h für GAMA (Boettcher *et al.*, 2006). T_{max} -Werte von $10,2 \pm 0,4$ h (AAMA) und $22,7 \pm 0,69$ h (GAMA) wurden nach $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid-Aufnahme (20 $\mu\text{g/kg KG}$, $n = 6$) ermittelt (Kopp und Dekant, 2009).

Korrelation der AAMA- und GAMA-Ausscheidung mit der Nährstoff-Aufnahme

Zur Bestimmung einer Korrelation zwischen der AAMA- und GAMA-Ausscheidung und der Aufnahme von Proteinen, Asparagin, Kohlenhydraten oder Fett, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman ermittelt. Es sollte überprüft werden ob eine Korrelation zwischen der Aufnahmemenge an Vorläuferverbindungen der Acrylamid-Bildung und der Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA besteht. Ein Ziel war es außerdem, Hinweise auf mögliche Ausgangsverbindungen einer endogenen Acrylamid-Bildung zu erhalten.

Im Lebensmittel ist eine hitzeinduzierte Acrylamid-Bildung ausgehend von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten beschrieben. Der Hauptbildungsweg ist die Acrylamid-Bildung aus Aminover-

bindungen und reaktiven Carbonylverbindungen bei hohen Temperaturen im Rahmen der Maillard-Reaktion (Xu *et al.*, 2014). Aminoverbindungen (Proteine, Asparagin) und reduzierte Carbonylverbindungen (Kohlenhydrate) stellen somit wichtige Vorläuferverbindungen der Acrylamid-Bildung dar. Dass keine Korrelation (siehe Tabelle 23) zwischen der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren und der Aufnahme dieser Vorläuferverbindungen festgestellt wurde, ist vor allem darauf zurückzuführen, dass ein entscheidender Faktor für die Acrylamid-Bildung eine ausreichend hohe Erhitzungstemperatur ist. Das Erhitzen der Acrylamid-Vorläuferverbindungen Asparagin und Glucose bei verschiedenen Temperaturen zeigte, dass eine Acrylamid-Bildung bevorzugt ab Temperaturen ≥ 120 °C erfolgt (Mottram *et al.*, 2002). Ebenfalls wurde in Pommes frites kein Anstieg des Wasserverlust-korrigierten Acrylamid-Gehaltes bei Erhitzen auf 100 °C festgestellt, wohingegen es bei Erhitzen auf Temperaturen ≥ 120 °C zu einem Anstieg des Acrylamid-Gehaltes in den Pommes frites kam (Tareke *et al.*, 2002).

Über endogene Acrylamid-Bildungsmechanismen ist bisher wenig bekannt. *In vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) haben gezeigt, dass die Inkubation von Asparagin mit H_2O_2 zu einer Acrylamid-Bildung führte (Tareke *et al.*, 2009). Die Auswertung von Humanstudie I zeigte jedoch keine Korrelation der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren und der Asparagin-Aufnahme über Lebensmittel. Die beobachtete schwache Korrelation der AAMA-Ausscheidung und Fett-Aufnahme (Pearson: $r = 0,721$, $p = 0,028$; Spearman: $r = 0,701$, $p = 0,035$) könnte ein Hinweis auf einen endogenen Acrylamid-Bildungsmechanismus ausgehend von Fetten sein. Wahrscheinlicher scheint jedoch, dass die Korrelation der AAMA-Ausscheidung und Fett-Aufnahme darauf zurückzuführen ist, dass eine erhöhte Acrylamid-Aufnahme mit einer erhöhten Fettaufnahme einherging. Dies war der Fall, weil die acrylamidreichen hocherhitzten Lebensmittel überwiegend frittierte oder in Fett angebratene Lebensmittel waren (siehe Tabelle 63 im Anhang).

Die nach Person und Spearman ermittelten Korrelationskoeffizienten zeigten somit keine Korrelation zwischen der Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA und der Aufnahme von Vorläuferverbindungen der Acrylamid-Bildung. Ebenfalls ergaben sich keine eindeutigen Hinweise auf mögliche Ausgangsverbindungen einer endogenen Acrylamid-Bildung.

Tabelle 23: Korrelation der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren mit der Aufnahme von Proteinen, Asparagin, Kohlenhydraten und Fett (Humanstudie I)

Korrelation		nach Pearson		nach Spearman	
Ausscheidung	Aufnahme	r	p	r	p
AAMA	Protein	0,439	0,237	0,462	0,211
GAMA	Protein	0,347	0,360	0,402	0,283
AAMA	Asparagin	0,098	0,802	0,393	0,295
GAMA	Asparagin	-0,187	0,630	0,248	0,520
AAMA	Kohlenhydrate	-0,352	0,237	-0,462	0,211
GAMA	Kohlenhydrate	-0,325	0,393	-0,402	0,283
AAMA	Fett	0,721	0,028 (*)	0,701	0,035 (*)
GAMA	Fett	0,406	0,278	0,573	0,107

AAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, p: Signifikanzwert, r: Korrelationskoeffizient, *: $p < 0,05$

4.2.6.4 Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren

Die Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA wurden im Urin der Probanden bestimmt, um einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung dieser Biomarker und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln zu untersuchen. Anhand der ermittelten Biomarker-Ausscheidung sollte außerdem eine Abschätzung der Acrolein-Exposition der Probanden erfolgen. Die HPMA- und CEMA-Ausscheidung wurden ebenfalls mit der Aufnahme von Protein, Fett und Kohlenhydraten korreliert.

Zur Bestimmung der Mercaptursäuren wurden die Urinproben mittels SPE (siehe Kapitel 7.2.1) aufgearbeitet und die anschließende Quantifizierung der Gehalte erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS (siehe Kapitel 7.2.2). Die Bestimmung erfolgte als Dreifachbestimmung.

HPMA-Ausscheidung

Die HPMA-Ausscheidung der Probanden (n = 14) ist in Abbildung 33 dargestellt. Die mittlere tägliche Ausscheidung der Probanden reichte von 1356 ± 455 nmol (0,77 ± 0,15 µmol/g Kreatinin) an Tag 9 bis zu 2298 ± 395 nmol (1,09 ± 0,22 µmol/g Kreatinin) an Tag 2. Im Mittel lag sie bei 1952 ± 354 nmol (0,98 ± 0,18 µmol/g Kreatinin). Mittel- bzw. Medianwerte der HPMA-Ausscheidung von Nichtrauchern lagen bei 0,20 - 2,23 µmol/g Kreatinin (Carmella *et al.*, 2007; Schettgen *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Eckert *et al.*, 2011; Higashi *et al.*, 2016). Die HPMA-Ausscheidung der Probanden von Humanstudie I war somit vergleichbar zur HPMA-Ausscheidung von Nichtrauchern.

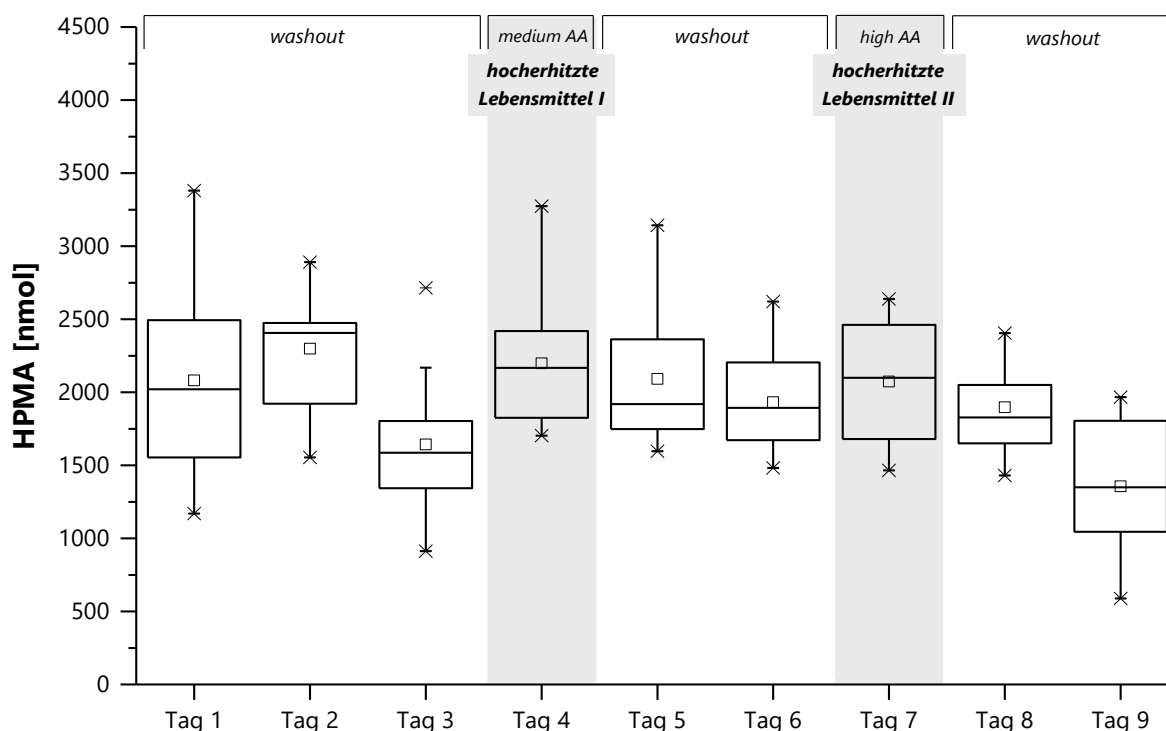


Abbildung 33: Tägliche HPMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den täglichen Gesamtausscheidungen der einzelnen Probanden (n = 14) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des 1,5 x IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: keine Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (Acrylamid-minimierte Ernährung); *hocherhitzte Lebensmittel I/II*: mittlere/hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (Acrylamid-haltige Ernährung, *medium AA* / *high AA*); HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

CEMA-Ausscheidung

Eine Darstellung der tägliche CEMA-Ausscheidung der Probanden ($n = 14$) gibt Abbildung 34. Analog zu HPMA erfolgte die geringste CEMA-Ausscheidung an Tag 9 mit 456 ± 257 nmol ($0,25 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und die höchste CEMA-Ausscheidung an Tag 2 mit 854 ± 399 nmol ($0,40 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin). Im Mittel lag die tägliche CEMA-Ausscheidung der Probanden bei 648 ± 263 nmol ($0,32 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und war somit etwas höher als die mittlere CEMA-Ausscheidung von 42 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin ($0,18$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin), die in einer Studie mit 59 Nichtrauchern ermittelt wurde (Ding *et al.*, 2009).

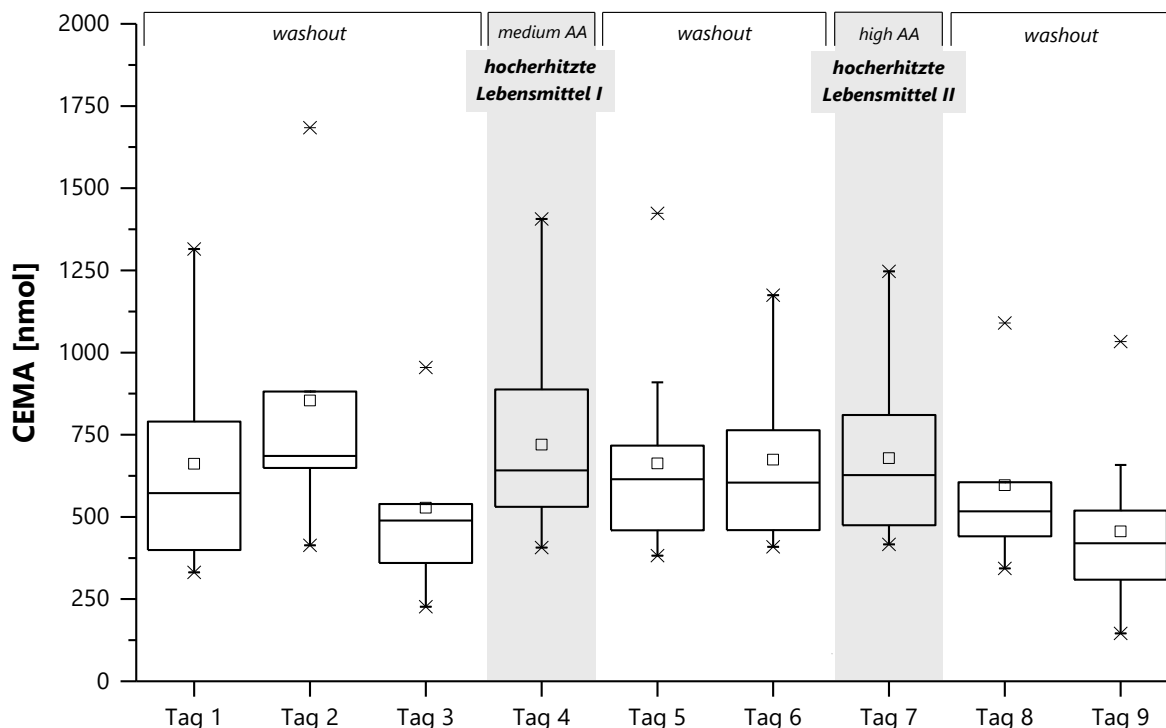


Abbildung 34: Tägliche CEMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den täglichen Gesamtausscheidungen der einzelnen Probanden ($n = 14$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: keine Aufnahme von hoherhitzten Lebensmitteln (Acrylamid-minimierte Ernährung); *hoherhitzte Lebensmittel I/II*: mittlere/hohe Aufnahme von hoherhitzten Lebensmitteln (Acrylamidhaltige Ernährung, *medium AA* / *high AA*); CEMA: N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein

Verhältnis der CEMA-/HPMA-Ausscheidung

Aus den HPMA- und CEMA-Ausscheidungen der Probanden an den einzelnen Studientagen wurden die CEMA/HPMA-Verhältnisse berechnet (siehe Abbildung 35). Es ergab sich ein mittleres tägliches Verhältnis von $0,33 \pm 0,13$. Die CEMA/HPMA-Verhältnisse der einzelnen Probanden variierte intraindividuell (von Tag zu Tag) nur geringfügig (Standardabweichung: 5 - 16 %), wohingegen die interindividuellen Abweichungen der CEMA/HPMA-Verhältnisse der Probanden größer waren (Standardabweichung: 32 - 44 %). Eine mögliche Erklärung für diese interindividuellen Unterschiede können Polymorphismen von Enzymen sein, die im Acrolein-Metabolismus involviert sind. Polymorphismen sind z. B. beschrieben für Cytochrom P450 2E1 (Neafsey *et al.*, 2009), GSTM1, GSTT1, GSTP1 (Ginsberg *et al.*, 2009), NAT1 und NAT2 (Walker *et al.*, 2009).

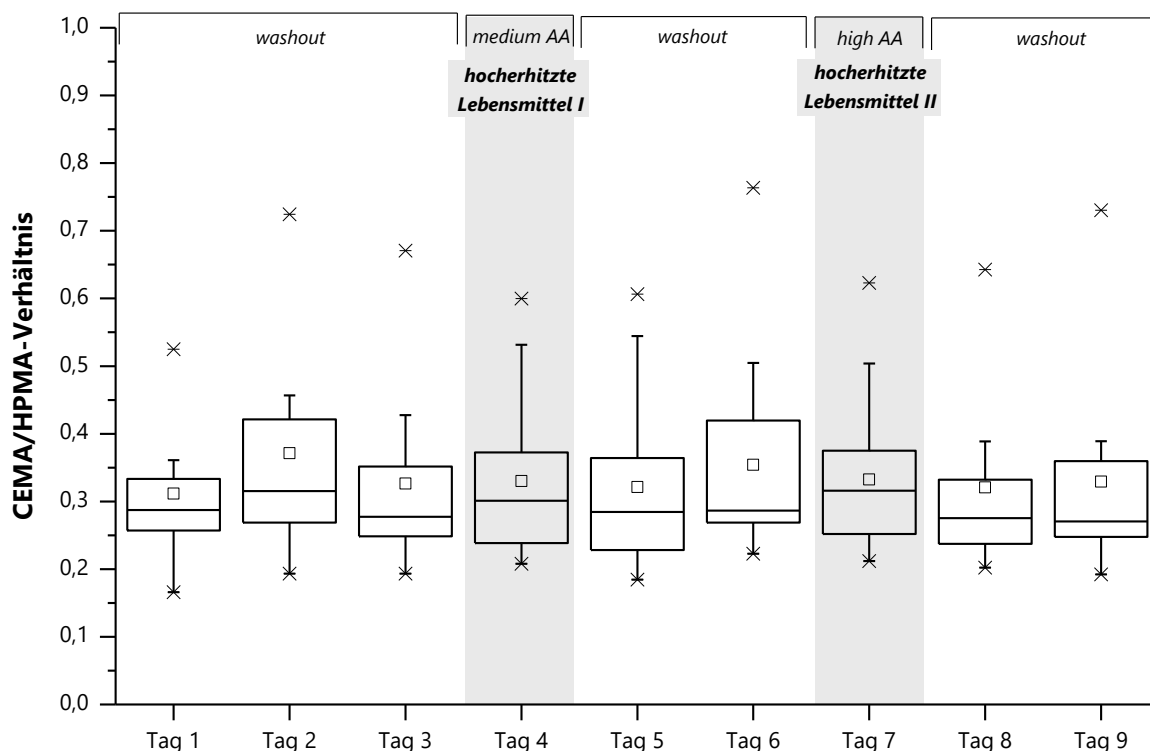


Abbildung 35: Verhältnisse der CEMA-/HPMA-Ausscheidung aller Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Die dargestellten Werte sind aus den CEMA/HPMA-Verhältnissen der einzelnen Probanden ($n = 14$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. *washout*: keine Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln (Acrylamid-minimierte Ernährung); *hochehitzte Lebensmittel I/II*: mittlere/hohe Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln (Acrylamid-haltige Ernährung, *medium AA* / *high AA*); CEMA: *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln

Im Rahmen von Humanstudie I sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-Metaboliten HPMA und CEMA und der Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln gibt. Im späteren Verlauf der Studiauswertung wurde auch angedacht die HPMA- und CEMA-Ausscheidung mit der alimentären Acrolein-Aufnahme zu korrelieren. Da die Acrolein-Bestimmung in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich war (siehe Kapitel 4.2.3.2), wurde nur das ursprüngliche Studienziel, die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln, weiterverfolgt.

Eine vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahmemengen an hochehitzten Lebensmitteln und der HPMA- und CEMA-Ausscheidung gibt Abbildung 36. Es ist zu beachten, dass die Aufnahmemenge an hochehitzten Lebensmitteln keine Information über die „Erhitzungsstärke“ (Erhitzungsdauer und -temperatur) und die Art der hochehitzten Lebensmittel gibt. Diese Limitierung konnte jedoch im Fall von Humanstudie I vernachlässigen werden, da Tage, an denen eine Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln (Tag 4: 1100 g/d, Tag 7: 1525 g/d) erfolgte, mit *Washout*-Tagen, an denen keine Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln (0 g/d) stattfand, verglichen wurden.

Verzehr nicht erhitzter oder geringfügig erhitzter Lebensmittel ($\leq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$)

An den *Washout*-Tagen, an denen keine Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (0 g/d) erfolgte, sondern von den Probanden nur nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel ($\leq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) verzehrt wurden, reichte die tägliche mittlere HPMA-Ausscheidung von $1356 \pm 455\text{ nmol}$ ($0,77 \pm 0,15\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) bis $2298 \pm 395\text{ nmol}$ ($1,09 \pm 0,22\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin). Entsprechend lag die tägliche mittlere CEMA-Ausscheidung im Bereich von $456 \pm 257\text{ nmol}$ ($0,25 \pm 0,12\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) bis $854 \pm 399\text{ nmol}$ ($0,40 \pm 0,18\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin).

Verzehr hocherhitzter Lebensmittel ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Die Mercaptursäure-Ausscheidung an Tag 4 und Tag 7, an denen hocherhitzte Lebensmittel ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) verzehrt wurden, lag im Bereich der Ausscheidung an den *Washout*-Tagen. An Tag 4, welcher mit einer Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (1100 g) verbunden war, lag die HPMA-Ausscheidung bei $2198 \pm 437\text{ nmol}$ ($1,08 \pm 0,24\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und die CEMA-Ausscheidung bei $720 \pm 270\text{ nmol}$ ($0,35 \pm 0,11\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin). An Tag 7, an dem 1525 g an hocherhitzten Lebensmitteln aufgenommen wurden, lag die HPMA-Ausscheidung bei $2073 \pm 397\text{ nmol}$ ($0,99 \pm 0,22\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin) und die CEMA-Ausscheidung bei $679 \pm 238\text{ nmol}$ ($0,33 \pm 0,12\text{ }\mu\text{mol/g}$ Kreatinin).

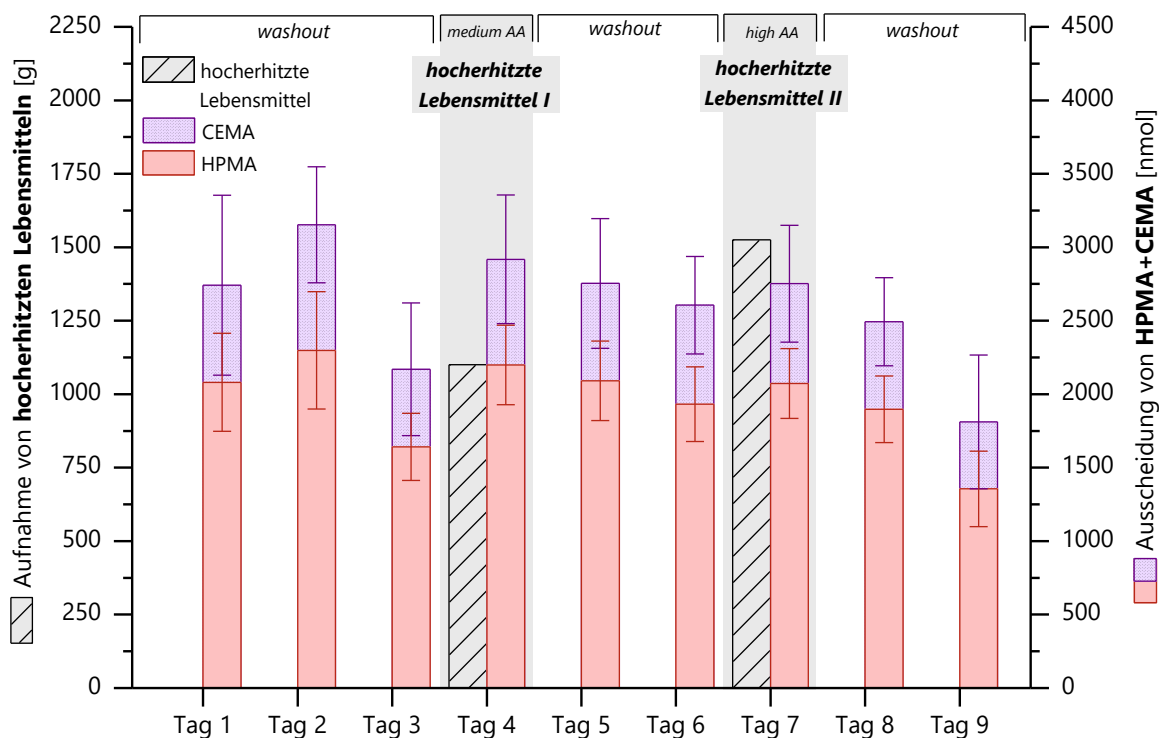


Abbildung 36: Vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) [g] und der täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] der Probanden über den Studienzeitraum von neun Tagen (Humanstudie I). Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichungen ($\pm\text{SD}$) berechnet aus der täglichen Gesamtaufnahmen bzw. -ausscheidungen der einzelnen Probanden ($n = 14$) dar. *washout*: keine Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (0 g/d); *hocherhitzte Lebensmittel I*: mittlere Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (1100 g/d); *hocherhitzte Lebensmittel II*: hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (1525 g/d); *medium AA*: mittlere Acrylamid-Aufnahme ($0,6 - 0,9\text{ }\mu\text{g/kg KG/d}$), *high AA*: hohe Acrylamid-Aufnahme ($1,3 - 1,8\text{ }\mu\text{g/kg KG/d}$); CEMA: *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Es zeigte sich kein Einfluss der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln auf die Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren. Diese Beobachtung wich von den Erwartungen aufgrund von Literaturdaten ab. In zwei Humanstudien wurde nach Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (selbst hergestellte und kommerziell erhältliche Kartoffelchips) ein Anstieg der Ausscheidung von HPMA bzw. HPMA und CEMA beobachtet (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). In der ersten Studie erfolgte ein Verzehr von 150 g hocherhitzten selbst hergestellten Kartoffelchips mit unbekanntem Acrolein-Gehalt durch 13 männliche Probanden. Durch die Aufnahme der Kartoffelchips stieg die HPMA-Ausscheidung der Probanden von $11,6 \pm 28,8 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Median: $1,96 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin, *predose*) auf $66,6 \pm 44,1 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin (2 - 4 h) (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Die zweite Studie beinhaltete eine Aufnahme von je 175 g kommerziell erhältlichen Kartoffelchips durch fünf männliche Probanden. In den kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurde ein Gehalt an freiem Acrolein von $27 \mu\text{g/kg}$ bestimmt. Anders als in der ersten Studie von Watzek *et al.* und anders als in Humanstudie I, wurde in dieser Studie nicht der gesamte Urin der Probanden gesammelt, sondern es wurden nur Spoturinproben abgegeben. Vor dem Verzehr der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips lag die HPMA-Ausscheidung der Probanden bei $0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin (*predose*, Spoturin). Nach dem Verzehr der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurde ein Anstieg der HPMA-Ausscheidung beobachtet, wobei die maximale HPMA-Ausscheidung von $0,47 \pm 0,15 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin im Urinsammelzeitraum 2 - 4 h (Spoturin) erfolgte (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b).

Im Rahmen der Humanstudie I wurden mehr hocherhitzte Lebensmittel (Tag 4: 1100 g, Tag 7: 1525 g) verzehrt als in den Studien von Watzek *et al.* (selbst hergestellte Kartoffelchips: 150 g, kommerziell erhältliche Kartoffelchips: 175 g), dennoch wurde anders als von Watzek *et al.* kein Anstieg der HPMA- und CEMA-Ausscheidung beobachtet. Ein Grund dafür, dass es zu keinem Anstieg der HPMA- und CEMA-Ausscheidung nach dem Verzehr der hocherhitzten Lebensmittel kam, könnte eine geringere „Erhitzungsstärke“ (Erhitzungstemperatur, Erhitzungsdauer) sein. In Humanstudie I wurden zwar mehr hocherhitzte Lebensmittel verzehrt als in den Studien von Watzek *et al.*, es könnte jedoch sein, dass diese weniger stark erhitzt wurden. Ein Hinweis auf die Erhitzungsstärke kann der Gehalt an Acrylamid, welches hitzeinduziert in Lebensmitteln gebildet wird, geben. Der Acrylamid-Gehalt der selbst hergestellten Kartoffelchips lag bei $6230 \mu\text{g/kg}$ (Watzek, 2012) und der Acrylamid-Gehalt der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips bei $249 \mu\text{g/kg}$ (Watzek, 2012). In Humanstudie I wurden verschiedene hocherhitzte Lebensmittel verzehrt. Diese wiesen unterschiedlich hohe Acrylamid-Gehalte auf (siehe Kapitel 4.2.3.1). Das Lebensmittel mit dem höchsten Acrylamid-Gehalt war in Humanstudie I Kartoffelchips ($333 \mu\text{g/kg}$), gefolgt von Knäckebrot ($222 \mu\text{g/kg}$). Diese Acrylamid-Gehalte waren zwar geringer als der Acrylamid-Gehalt der selbst hergestellten Kartoffelchips, die von den Probanden in der ersten Studie von Watzek *et al.* verzehrt wurden, jedoch vergleichbar zum Acrylamid-Gehalt der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips, die in der zweiten Studie von Watzek *et al.* von den Probanden verzehrt wurden (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Der Acrylamid-Gehalt der während der Humanstudie I verzehrten Lebensmittel (Kartoffelchips und Knäckebrot) deutet somit nicht darauf hin, dass die Erhitzungsstärke, der in Humanstudie I verzehrten Lebensmittel, geringer war als in der Studie von Watzek *et al.*, in der kommerziell erhältliche Kartoffelchips verzehrt wurden.

Eine weitere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der Humanstudie I und den Studien von Watzek *et al.* (2012; 2012b) kann das unterschiedliche Studiendesign sein. In den Studien von Watzek *et al.* wurde

nur ein hocherhitztes Lebensmittel (Kartoffelchips) zu einem definierten Zeitpunkt (0 h) von den Probanden verzehrt und in Humanstudie I erfolgte die Aufnahme verschiedener hocherhitzten Lebensmittel über den Tag verteilt (0 - 13 h). Es ist möglich, dass aufgrund dieser kontinuierlichen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln sowie aufgrund der unterschiedlichen Urinsammelzeiträume kein Anstieg der HPMA- und CEMA-Ausscheidung beobachtet werden konnte. Der Verzehr der Kartoffelchips erfolgte in Humanstudie I z. B. an Tag 7 zwischen 20:00 und 21:00 Uhr (12 - 13 h), wobei der folgende Urinsammelzeitraum zwölf Stunden (12 - 24 h) umfasste. In den Studien von Watzek *et al.* erfolgte die Urinsammlung in den ersten zwölf Stunden nach Verzehr der selbst hergestellten Kartoffelchips in kurzen Sammelzeiträumen (0 - 2 h, 2 - 4 h, 4 - 6 h, 6 - 8 h, 8 - 10 h, 10 - 12 h) und nach Verzehr der kommerziell erhältlichen Kartoffelchips wurden Spoturinproben in kurzen Abständen (0 - 2 h, 2 - 4 h, 4 - 6 h, 6 - 8 h, 8 - 12 h) abgegeben. Es könnte sein, dass aufgrund des langen Urinsammelzeitraums in Humanstudie I nach Verzehr der Kartoffelchips ein Anstieg der HPMA- und CEMA-Ausscheidung nicht nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren fasteten die Probanden in den Studien von Watzek *et al.* von zwölf Stunden vor Verzehr der Kartoffelchips bis sechs Stunden nach Verzehr der Kartoffelchips. In Humanstudie I war der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln kein Fasten voran- bzw. nachgestellt. Vor Verzehr der hocherhitzten Lebensmittel gab es lediglich *Washout*-Phasen, in denen von den Probanden nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel (≤ 100 °C) verzehrt wurden. Das Fasten in den Studien von Watzek *et al.* garantierte, dass keine Acrolein-Aufnahme über Lebensmittel erfolgte. Außerdem ist es denkbar, dass durch Fasten auch eine endogene Acrolein-Bildung, welche von Anderson *et al.* (1997), Lee und Sayere (1998), Uchida *et al.* (1998) und Engels *et al.* (2016) postuliert wurde (siehe Kapitel 2.3.2.3), gehemmt wurde. Es ist möglich, dass der HPMA- und CEMA-Anstieg nach Verzehr der kommerziellen Kartoffelchips nur beobachtet wurde, da ihm eine Fastenperiode vorangestellt war.

Zirkadianer Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung

Die Urinsammlung erfolgte während der Humanstudie I an verschiedenen Studientagen in unterschiedlich langen Sammelzeiträumen (siehe Kapitel 4.2, Abbildung 26). Ab Tag 2 bis Tag 8 war die Urinsammlung in vier Sammelzeiträume unterteilt. Bei der Bestimmung von HPMA und CEMA in diesen Urinproben wurde beobachtet, dass die Ausscheidung der Mercaptursäuren zu Beginn des Tages von 8:00 bis 12:00 Uhr (0 - 4 h) geringer war als während der folgenden Sammelzeiträume von 12:00 bis 16:00 Uhr (4 - 8 h), von 16:00 bis 20:00 Uhr (8 - 12 h) und von 20:00 bis 8:00 Uhr des Folgetages (12 - 24 h). Diese Tagesschwankungen (zirkadianer Rhythmus) der HPMA- und CEMA-Ausscheidung lagen sowohl an den *Washout*-Tagen (Tag 3, Tag 5, Tag 6 und Tag 8), an denen keine hocherhitzten Lebensmittel verzehrt wurden, als auch an Tag 4 und Tag 7, an denen hocherhitzte Lebensmittel verzehrt wurden, vor. Sie wurden mit und ohne Bezug auf die Kreatinin-Ausscheidung beobachtet. Abbildung 37 zeigt die mittlere Kreatinin-bezogene HPMA-Ausscheidung der Probanden pro Sammelzeitraum.

An den *Washout*-Tagen (Tag 3, Tag 5, Tag 6 und Tag 8) lag die HPMA-Ausscheidung zu Beginn des Tages im Zeitraum von 8:00 bis 12:00 Uhr (0 - 4 h) im Mittel bei $0,77 \pm 0,20$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und stieg auf $1,14 \pm 0,27$ $\mu\text{g/g}$ Kreatinin im Zeitraum von 16:00 bis 20:00 Uhr (8 - 12 h) an ($p < 0,001$). Auch an Tag 4, an dem eine mittlere Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln erfolgte, konnte ein Anstieg der HPMA-Ausscheidung über den Tag beobachtet werden. Im Sammelzeitraum von 8:00 bis 12:00 Uhr (0 - 4 h) lag die HPMA-Ausscheidung bei $0,88 \pm 0,57$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin und stieg im Sammelzeitraum

von 16:00 bis 20:00 Uhr (8 - 12 h) auf $1,18 \pm 0,28 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin an ($p < 0,05$). An Tag 7, an dem eine hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln erfolgte, lag die HPMA-Ausscheidung zu Beginn des Tages im Zeitraum von 8:00 bis 12:00 Uhr (0 - 4 h) bei $0,70 \pm 0,21 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin und am Ende des Tages im Zeitraum von 20:00 bis 8:00 Uhr des Folgetages (12 - 24 h) bei $1,25 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ Kreatinin. Auch hier war der Anstieg der HPMA-Ausscheidung signifikant ($p < 0,001$). Die CEMA-Ausscheidung zeigte wie die HPMA-Ausscheidung ebenfalls einen zirkadianen Rhythmus an *Washout*-Tagen sowie an Tagen an denen hocherhitzte Lebensmittel verzehrt wurden. Auf eine graphische Darstellung der CEMA-Ausscheidung wurde verzichtet.

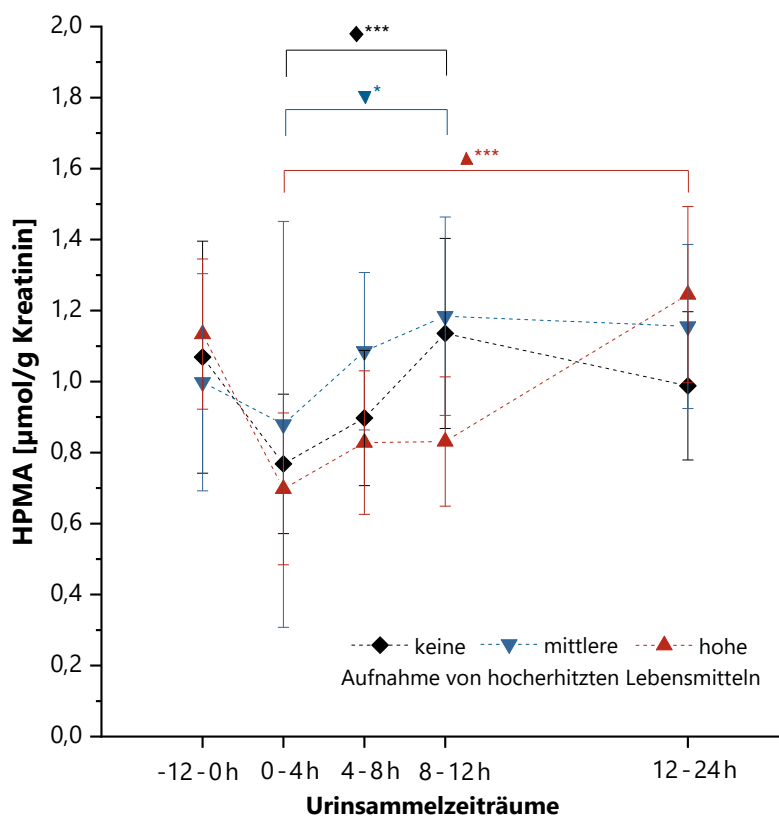


Abbildung 37: HPMA-Ausscheidung [$\mu\text{mol/g}$ Kreatinin] der Probanden nach keiner, mittlerer und hoher Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (Humanstudie I); \blacklozenge keine Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln: 0 g/d an Tag 3, Tag 5, Tag 6 und Tag 8; \blacktriangledown mittlerer Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln: 1110 g/d an Tag 4, \blacktriangle hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln: 1525 g/d an Tag 7. Quadrate bzw. Dreiecke stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichung ($\pm\text{SD}$) berechnet aus den Ausscheidungen der einzelnen Probanden ($n=14$) dar. -12 - 0 h: 12:00 Uhr am Vortrag bis 8:00 Uhr, 0 - 4 h: 8:00 bis 12:00 Uhr, 4 - 8 h: 12:00 bis 16:00 Uhr, 8 - 12 h: 16:00 bis 20:00 Uhr, 12 - 24 h: 20:00 bis 8:00 Uhr am Folgetag, Signifikanz-Berechnung: geringste HPMA-Ausscheidung zu höchster HPMA-Ausscheidung, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$

Die beobachtete Zunahme der HPMA- und CEMA-Ausscheidung über den Tagesverlauf war signifikant. Eine Überprüfung dieser Tagesschwankungen mit einer größeren Anzahl an Probanden und geringeren Urinsammelzeiträumen wäre sinnvoll, um das Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus zu bestätigen. Ein zirkadianer Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Zirkadiane Rhythmen wurden jedoch bereits für verschiedenen andere Verbindungen (v. a. Hormone, Lipide und Aminosäuren) beschrieben (Ang *et al.*, 2012; Dallmann *et al.*, 2012; Kasukawa *et al.*, 2012).

Der zirkadiane Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung wurde an allen Studientagen mit z. T. sehr unterschiedlichem Ernährungsplan beobachtet. Dies zeigt, dass er nicht von der Art der Nahrungs-

aufnahme abhängig ist. Ob er jedoch vom Rhythmus der Nahrungsaufnahme abhängig ist lässt sich anhand von Humanstudie I nicht beurteilen, da die Nahrungsaufnahme an allen Tagen zu gleichen Zeiten (8:00 Uhr, 12:00 Uhr, 14:00 Uhr und 18:00 Uhr) erfolgte. Nur an Tag 7 erfolgte eine zusätzliche Nahrungsaufnahme in der Zeit von 20:00 bis 21:00 Uhr. Um den Effekt des Essens-Rhythmus auf den zirkadianen Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung zu untersuchen müsste wie z. B. von Dallmann *et al.* (2012) eine Studie mit konstanter Nahrungsaufnahme durchgeführt werden. Ebenfalls gibt Humanstudie I keine Auskunft darüber, ob eine Abhängigkeit des zirkadianen Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung vom Schlaf-Wach-Rhythmus besteht. Solch eine Abhängigkeit könnte, ebenfalls analog zur Studie von Dallmann *et al.* (2012), durch eine konstante Wachperiode (40 h) der Probanden überprüft werden.

Unabhängig davon, ob der zirkadiane Rhythmus der HPMA- und CEMA-Ausscheidung abhängig oder unabhängig vom Essens- und/oder Schlaf-Wach-Rhythmus ist, stellt das Vorliegen eines zirkadianen Rhythmus eine neue Erkenntnis dar, die auch für zukünftige Untersuchungen berücksichtigt werden sollte. Beim Acrolein-Monitoring unter Verwendung von HPMA und CEMA als Expositionsbiomarker sollte wenn möglich, so wie in Humanstudie I bereits angewandt, der gesamte Tagesurin gesammelt werden um zirkadiane Schwankungen auszugleichen. Falls dies nicht möglich ist, sollte die Probenahme zu einem definierten Zeitpunkt, erfolgen.

Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung

Über den gesamten neuntägigen Studienzeitraum zeigten die Probanden eine relative konstante HPMA- und CEMA-Ausscheidung. Die mittlere tägliche HPMA-Ausscheidung der Probanden lag bei 1952 ± 354 nmol und die mittlere tägliche CEMA-Ausscheidung bei 648 ± 263 nmol. Diese war deutlich höher als die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA (siehe Kapitel 4.2.6.3). Am Ende der initialen *Washout*-Phase, war die Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren 21-fach höher als die Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren, welche an Tag 3 bei 93 ± 31 nmol AAMA und 29 ± 7 nmol GAMA lag. Eine 10-fach höhere HPMA- und CEMA-Ausscheidung ergab der Vergleich mit der AAMA- und GAMA-Ausscheidung an Tag 4 (AAMA: 225 ± 37 nmol, GAMA: 29 ± 7 nmol) und eine 6-fach höhere HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Vergleich mit der AAMA- und GAMA-Ausscheidung Tag 7 (AAMA: 404 ± 78 nmol, GAMA: 40 ± 9 nmol).

Mögliche Ursachen für dieses beobachtete konstante Basislevel der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA könnten, eine konstante Aufnahme bzw. Freisetzung von Acrolein aus exogenen Quellen oder eine konstante endogene Bildung von Acrolein bzw. von HPMA und CEMA sein.

Exogen entsteht Acrolein durch Verbrennungsprozesse und ist v. a. in Rauch, insbesondere Tabakrauch, Autoabgasen und Kochdämpfen enthalten. Um eine Acrolein-Exposition durch derartige exogene Quellen auszuschließen wurde als Studienort ein Gästehaus (Naturfreundehaus Finsterbrunnental) des Pfälzerwald-Verein in Mitten des Pfälzerwaldes ausgewählt. Am Studienort herrschte im Studienzeitraum Rauchverbot und es wurden keine offenen Feuerstellen genutzt. Die Küche des Gästehauses war gut belüftet und räumlich von den Aufenthalts-, Schlaf- und Essensräumen der Probanden abgetrennt. Eine Überprüfung des Acrolein-Gehaltes in der Raumluft am Studienort ergab in allen untersuchten Räumen

(Aufenthaltsraum, Schlafrum, Essensraum und Küche) Konzentrationen $< 1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (siehe Kapitel 4.2.5.1).

Eine mögliche exogene Acrolein-Quelle stellen auch erhitzte sowie unerhitzte Lebensmittel dar. Allerdings existieren zu Acrolein-Gehalten in Lebensmitteln bisher nur wenige Daten (siehe Kapitel 2.3.3) und auch im Rahmen der Humanstudie I konnten die Acrolein-Gehalte der verzehrfertigen Lebensmittel nicht bestimmt werden (siehe Kapitel 4.2.3.2). Die Ernährung der Probanden variierte an den verschiedenen Studientagen (nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel an den *Washout*-Tagen vs. hoch-erhitzte Lebensmittel an Tag 4 und Tag 7). Diese unterschiedliche Ernährung hatte keinen Einfluss auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung (siehe Abschnitt *Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln*, S. 112 ff.). Eine Möglichkeit, wie die Acrolein-Aufnahme über Lebensmittel einen Beitrag zur konstanten HPMA- und CEMA-Ausscheidung geleistet haben könnte ist, dass Acrolein an Nahrungsbestandteile gebunden aufgenommen wurde bzw. im Körper an körpereigene Verbindungen gebunden hat und aus diesen Verbindungen kontinuierlich freigesetzt wurde. Eine Acrolein-Freisetzung aus Acrolein-Peptid-Addukten und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren unter physiologischen Bedingungen wurde bereits beschrieben (Ramu *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Modelluntersuchungen zur Acrolein-Freisetzung aus Acrolein-Addukten bzw. Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren durchgeführt (siehe Kapitel 4.3).

Auch kann eine konstante endogene Acrolein-Bildung die Ursache für die konstante HPMA- und CEMA-Ausscheidung sein. Ein Basislevel der Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (AAMA und GAMA), welches vermutlich auf einer endogener Bildung basiert, wurde bereits im Rahmen dieser Studie (Humanstudie I, Kapitel 4.2.6.3) und im Rahmen der Nachfolgestudie (Goempel *et al.*, 2017) beobachtet. Nach *Washout*-Phasen (≥ 3 Tage), an denen eine Acrylamid-minimierten Ernährung verzehrt wurde, lag das Basislevel für AAMA im Mittel bei 90 - 140 nmol und für GAMA im Mittel bei circa 30 - 50 nmol. Dass dieses Basislevel nicht auf eine exogene Acrylamid-Aufnahme zurückzuführen ist, zeigte die Aufnahme von isotope-markierten Acrylamid ($1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$, $n = 6$), nach der kein Basislevel der AAMA oder GAMA-Ausscheidung beobachtet wurde. Innerhalb von 72 Stunden erfolgte eine nahezu vollständige Acrylamid-Ausscheidung als isotope-markiertes AAMA und GAMA (Goempel *et al.*, 2017). So wie es für AAMA und GAMA postuliert wurde, scheint es ebenfalls für HPMA und CEMA möglich, dass die beobachtete konstante Mercaptursäure-Ausscheidung auf eine endogene Bildung zurückzuführen ist. Eine endogene Acrolein-Bildung wurde aus Threonin mittels Myeloperoxidase (Anderson *et al.*, 1997), aus Spermin und Spermidin mittels Aminooxidase (Lee und Sayre, 1998), im Rahmen der Lipidperoxidation (Uchida *et al.*, 1998) sowie aus Glycerin mittels Glycerin-/Dialdehydatase (Engels *et al.*, 2016) postuliert. Diese oder andere bisher noch nicht beschriebenen endogene Acrolein-Bildungsmechanismen könnten zum beobachteten Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung beigetragen haben. Auch könnte eine direkte endogene Bildung von HPMA und CEMA erfolgt sein, die ebenfalls zum HPMA- bzw. CEMA-Basislevel beigetragen haben könnte.

Abschätzung der Acrolein-Exposition

Die Acrolein-Exposition kann basierend auf der Ausscheidung der Biomarker HPMA und CEMA abgeschätzt werden. Von der SKLM (2012) wurde zur Abschätzung der Acrolein-Exposition zwei verschiedenen Annahmen bezüglich der prozentualen Acrolein-Ausscheidung als HPMA gemacht. Die

erste Abschätzung entsprach der von Abraham *et al.* (2011) und es wurde von einer 50%igen Acrolein-Ausscheidung über 24 Stunden als HPMA ausgegangen. Bei der zweiten Abschätzung wurde angenommen, dass beim Menschen analog zur Ratte über 24 Stunden circa 20 % des aufgenommenen Acroleins als HPMA ausgeschieden werden (SKLM, 2012). Entsprechend dieser beiden Annahmen erfolgte eine Abschätzung der Acrolein-Exposition der Probanden der Humanstudie I (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Abgeschätzte mittlere Acrolein-Exposition der Probanden (n = 14) auf Basis der HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Probanden (Humanstudie I)

Mittlere Acrolein-Exposition					
unter Annahme einer Acrolein-Ausscheidung innerhalb von 24 Stunden von					
50 % als HPMA		20 % als HPMA		26 % als HPMA + CEMA	
[µg/d]	[µg/kg KG/d]	[µg/d]	[µg/kg KG/d]	[µg/d]	[µg/kg KG/d]
219	2,9	547	7,2	561	7,4

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein

Unter Annahme einer Acrolein-Ausscheidung von 50 % als HPMA innerhalb von 24 Stunden ergab sich eine mittlere Acrolein-Exposition der Probanden von 219 µg/d bzw. 2,9 µg/kg KG/d. Dies ist vergleichbar mit der von Abraham *et al.* (2011) unter derselben Annahme abgeleiteten Exposition von Nichtrauchern, welche auf 124 bzw. 143 µg/d (2,1 bzw. 2,4 µg/kg KG/d) abgeschätzt wurde.

Eine Abschätzung der Acrolein-Exposition der Probanden unter Annahme einer Acrolein-Ausscheidung von 20 % über 24 Stunden als HPMA resultiert wiederum in einer Acrolein-Exposition von 547 µg/d bzw. 7,2 µg/kg KG/d. Diese Expositionsabschätzung ist im Bereich der Exposition von Nichtrauchern bzw. ehemaligen Rauchern nach längerem Rauchverzicht, welcher von der SKLM unter derselben Annahme auf 300 - 1400 µg/d (5 - 24 µg/kg KG/d), abgeschätzt wurde (SKLM, 2012).

Dass eine Acrolein-Ausscheidung von 20 % als HPMA über 24 Stunden eine bessere Annahme ist als eine Acrolein-Ausscheidung von 50 % als HPMA über 24 Stunden, unterstützt eine Humanstudie mit einem männlichen Probanden. Nach oraler Acrolein-Aufnahme von 7,5 µg/kg KG (TDI) wurde im Zeitraum von 24 Stunden eine Acrolein-Ausscheidung von 26 % als HPMA und CEMA bestimmt (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Unter Annahme dieser prozentualen Acrolein-Ausscheidung als HPMA und CEMA ergibt sich für die Probanden der Humanstudie I eine mittlere Ausscheidung von 561 µg/d bzw. 7,4 µg/kg KG/d (siehe Tabelle 24).

Im Rahmen von Humanstudie I wurde auch die Acrylamid-Exposition durch Lebensmittel bestimmt (siehe Kapitel 4.2.4.1). Diese lag an den *Washout*-Tagen bei 0,02 - 0,04 µg/kg KG/d, an Tag 4 (*medium AA*) bei 0,6 - 0,9 µg/kg KG und an Tag 7 (*high AA*) bei 1,3 - 1,8 µg/kg KG. Die abgeschätzte mittlere Acrolein-Exposition (je nach Annahme: 2,9 - 7,4 µg/kg) lag um ein 73- bis 370-faches über der minimierten Acrylamid-Exposition an den *Washout*-Tagen, um ein 3- bis 12-faches über der Acrylamid-Exposition an Tag 4 (*medium AA*) und um ein 1,6- bis 6-faches über der Acrylamid-Exposition an Tag 7 (*high AA*). Der Vergleich der Acrolein-Exposition der Probanden mit der mittleren täglichen Acrylamid-Exposition von Erwachsene in Europa von 0,4 - 0,9 µg/kg KG (EFSA, 2015a), ergab eine 3- bis 19-fach höhere Acrolein-Exposition.

Neben der Abschätzung der Acrolein-Exposition anhand der Biomarker-Ausscheidung kann auch die Acrolein-Exposition über die Raumluft abgeschätzt werden. Am Studienort wurde eine Acrolein-Raumluftkonzentration von $< 1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bestimmt (siehe Kapitel 4.2.5.1). Diese resultieren bei einem Atemvolumen von $20 \text{ m}^3/\text{d}$ in einer Acrolein-Exposition von $< 20 \mu\text{g}/\text{d}$ bzw. $< 0,24 - 0,33 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$. Diese Abschätzung zeigt, dass die Acrolein-Exposition über die Raumluft nur einen sehr geringen Beitrag zur ermittelten gesamt Acrolein-Exposition geleistet haben kann.

Korrelation der HPMA- und CEMA-Ausscheidung mit der Nährstoff-Aufnahme

Eine Korrelation der HPMA- und CEMA-Ausscheidung mit der Protein-, Kohlenhydrat- und Fett-Aufnahme wurde nach Pearson und Spearman überprüft. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten finden sich in Tabelle 25. Die Korrelationskoeffizienten wurden bestimmt, um Hinweise auf mögliche Hauptausgangsverbindungen einer exogenen und endogenen Acrolein-Bildung zu erhalten.

Tabelle 25: Korrelation der Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren mit der Aufnahme von Proteinen, Kohlenhydraten und Fett (Humanstudie I)

Korrelation		nach Pearson		nach Spearman	
Ausscheidung	Aufnahme	r	p	r	p
HPMA	Protein	0,710	0,032 (*)	0,427	0,252
CEMA	Protein	0,588	0,096	0,393	0,295
HPMA	Kohlenhydrate	-0,595	0,091	-0,427	0,252
CEMA	Kohlenhydrate	-0,492	0,179	-0,393	0,295
HPMA	Fett	0,620	0,075	0,393	0,295
CEMA	Fett	0,500	0,170	0,359	0,343

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, p: Signifikanzwert, r: Korrelationskoeffizient, *: $p < 0,05$

Eine hitzeinduzierte Acrolein-Bildung in Lebensmitteln ist aus Triacylglyceriden (Fetten), Kohlenhydraten und Aminosäuren (Proteinen) beschrieben (Stevens und Maier, 2008). Die höchsten Acrolein-Gehalte in Lebensmitteln wurden bisher in erhitzten fettreichen Lebensmitteln (Fetten und Ölen) ermittelt (Ewert *et al.*, 2011; Granvogl, 2014). Ebenfalls wurde eine endogene Acrolein-Bildung im Rahmen der Lipidperoxidation (Uchida *et al.*, 1998) und aus Glycerin mittels Glycerin-/Dioldehydratase (Engels *et al.*, 2016) beschrieben. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Ausscheidung der Biomarker der Acrolein-Exposition (HPMA und CEMA) und der Fett-Aufnahme (siehe Tabelle 25).

Eine endogene Acrolein-Bildung wurde ebenfalls aus Spermin und Spermidin mittels Aminooxidase (Lee und Sayre, 1998) sowie aus Threonin mittels Myeloperoxidase (Anderson *et al.*, 1997) postuliert. Nach Pearson ergab sich für die HPMA-Ausscheidung und die Protein-Aufnahme eine Korrelation mit $r = 0,710$ ($p = 0,032$), welche jedoch nach Spearman nicht bestätigt werden konnte.

Neben der Korrelation der HPMA- und CEMA-Ausscheidung mit der Fett- und Protein-Aufnahme wurde auch eine Korrelation mit der Kohlenhydrat-Aufnahme überprüft. Eine solche konnte nicht nachgewiesen werden.

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten liefern somit keine eindeutigen Hinweise auf exogene oder endogene Hauptausgangsverbindungen der Acrolein-Bildung.

4.3 Untersuchungen zur Acrolein-Freisetzung

In Humanstudie I wurde eine konstante Ausscheidung der Mercaptursäuren HPMA und CEMA, welche Biomarker der Acrolein-Exposition darstellen, beobachtet. Sie betrug ein 6-faches (*high AA*) bis 21-faches (*washout*) der Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA, welche Biomarker für die Exposition gegenüber Acrylamid sind.

Eine mögliche Erklärung für diese konstante und vergleichsweise hohe Ausscheidung der Mercaptursäuren HPMA und CEMA könnte sein, dass mit der Nahrung aufgenommenes Acrolein an Nahrungsbestandteile gebunden war oder an Verbindungen im Körper gebunden hat und es aus diesen Verbindungen zu einer kontinuierlichen Acrolein-Freisetzung kam.

Bindungspartner für Acrolein können Proteine bzw. Peptide (Cai *et al.*, 2009) oder phenolische Verbindungen (Zamora *et al.*, 2016) sein. Im Körper erfolgt vor allem eine Bindung von Acrolein an das Tripeptid Glutathion (Horvath *et al.*, 1992; Stevens und Maier, 2008). Glutathion liegt jedoch nicht nur im Körper vor, ebenfalls ist es ein Bestandteil verschiedener Lebensmittel (Jones *et al.*, 1992). Ausgehend vom Acrolein-Glutathion-Addukt kann es im Körper zur Bildung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren kommen. Die Freisetzung von Acrolein aus dem Acrolein-Glutathion-Addukt sowie aus der Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein (OPMA), dem entsprechende Sulfoxid (OPMA-SO) und der Mercaptursäure HPMA wurde von Ramu *et al.* (1995) bereits untersucht. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterverfolgt.

Die Freisetzung von Acrolein wurde anhand von Modellexperimenten unter physiologischen Bedingungen untersucht. Als Modellverbindung wurden OPMA, HPMA und CEMA ausgewählt. Bei OPMA handelt es sich um ein Addukt aus Acrolein und der am *N*-Terminus geschützten Aminosäure Cystein. Im Metabolismus von Acrolein stellt OPMA ein postuliertes Zwischenprodukt dar, aus dem durch Reduktion die Mercaptursäure HPMA und durch Oxidation die Mercaptursäure CEMA gebildet werden kann (Stevens und Maier, 2008). Die Synthese von OPMA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nach der Methode von Ramu *et al.* (1995). Die Charakterisierung mittels Kernspinresonanz (NMR) - Spektroskopie bestätigte die erfolgreiche Darstellung. Details zur Synthese von OPMA finden sich in Kapitel 7.5. Die Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA waren kommerziell erhältlich.

Um physiologische Bedingungen nachzustellen wurde Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 37 °C) verwendet. In diesem wurde das Acrolein-Addukt bzw. die Mercaptursäuren (OPMA, HPMA oder CEMA) gelöst und indirekt die Acrolein-Freisetzung untersucht, indem die Abnahme von OPMA, HPMA oder CEMA mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS stündlich über einen Zeitraum von sechs Stunden bestimmt wurde. Die verwendete Messmethode findet sich in Kapitel 7.6. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 38 (OPMA), Abbildung 39 (HPMA) und Abbildung 40 (CEMA) dargestellt. Diese indirekte Messmethode wurde gewählt, da die Messmethoden für HPMA und CEMA bereits etabliert waren und das benötigte HPLC-ESI-MS/MS-Gerät zur Verfügung stand. Ein funktionsfähiges HS-GS-MS-Gerät zur direkten Acrolein-Bestimmung stand zum Zeitpunkt dieser Analysen nicht zur Verfügung und von einer Etablierung einer neuen Methode zur Acrolein-Bestimmung z. B. nach Derivatisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS wurde aus Zeit- und Kostengründen abgesehen.

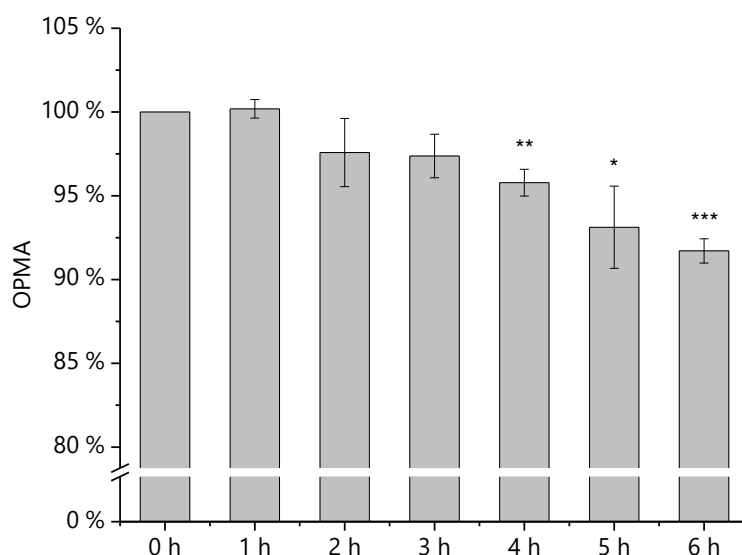


Abbildung 38: OPMA (10 nmol/ml) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 37 °C, 0 - 6 h), n = 3, OPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-oxo-propyl)-*L*-cystein, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005

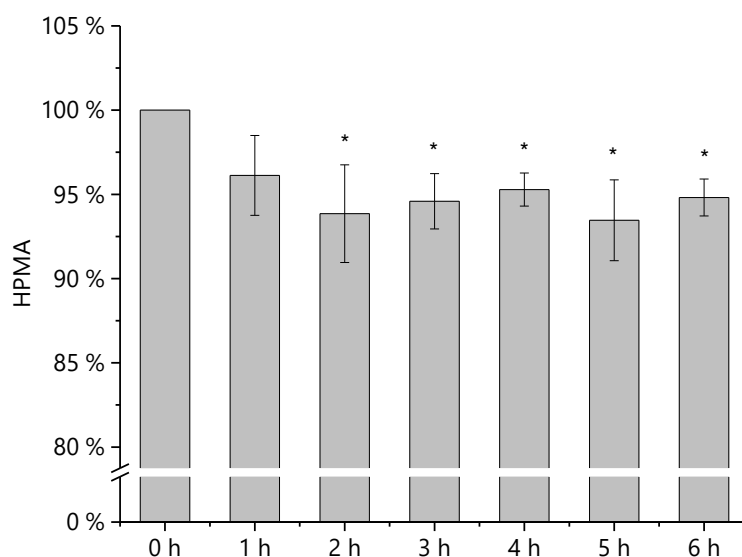


Abbildung 39: HPMA (0,2 nmol/ml) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 37 °C, 0 - 6 h), n = 3, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxy-propyl)-*L*-cystein, *p < 0,05

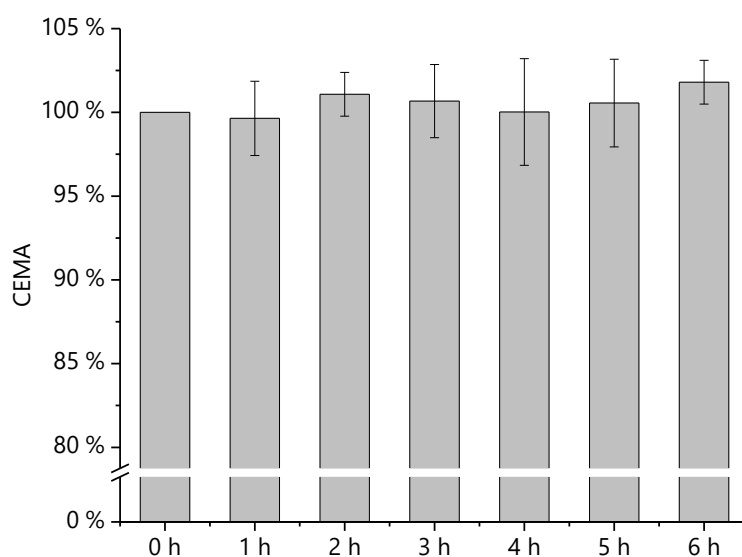


Abbildung 40: CEMA (0,2 nmol/ml) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 37 °C, 0 - 6 h), 0, CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein

Durch Bestimmung mittels HPLC-ESI-MS/MS zeigte sich für OPMA (siehe Abbildung 38) unter physiologischen Bedingungen eine Abnahme, die ab vier Stunden signifikant war. Die insgesamt beobachtete Abnahme lag am Ende des Untersuchungszeitraums von sechs Stunden bei 8,3 %. Ebenfalls wurde eine Abnahme für HPMA (siehe Abbildung 39) beobachtet. Diese war ab zwei Stunden signifikant und lag zu diesem Zeitpunkt bei 6,1 %. Mit fortschreitender Inkubationszeit wurde keine weitere HPMA-Abnahme beobachtet. Für CEMA (siehe Abbildung 40) wurde innerhalb des Zeitraums von sechs Stunden keine Abnahme beobachtet.

Auch wenn eine OPMA- bzw. HPMA-Abnahme nicht direkt mit einer Acrolein-Freisetzung gleichzusetzen ist, deutet dieses Modellexperiment darauf hin, dass die Bindung von Acrolein an SH-Gruppen von zum Beispiel Cystein unter physiologischen Bedingungen reversibel ist. Postuliert wurde eine Acrolein-Freisetzung unter physiologischen Bedingungen aus OPMA, OPMA-Sulfoxid, HPMA und einem Acrolein-Glutathion-Addukt ebenfalls von Ramu *et al.* (1995). Gemessen wurde dabei die Absorption bei 210 nm, die Absorption bei 257 nm nach Semicarbazid-Zugabe sowie die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 344 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm nach *m*-Aminophenol-Zugabe. Eine Zunahme der Absorption bzw. Fluoreszenz wurde als eine Zunahme der Acrolein-Freisetzung interpretiert (Ramu *et al.*, 1995). Ebenfalls wurde im Rahmen von Untersuchungen zur Bildung von Addukten aus Acrolein mit Modellpeptiden mit Cystein-, Histidin- und Lysin-Resten eine Acrolein-Freisetzung beobachtet. Eine langsame Freisetzung von Acrolein erfolgte unter physiologischen Bedingungen aus dem synthetisches Modellpeptid Ac-HKVCD (AAPPTec LLC, Louisville, USA), welches sowohl Cystein- als auch Lysin-Reste enthielt (Cai *et al.*, 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modelluntersuchungen sowie die Untersuchungen von Ramu *et al.* (1995) und Cai *et al.* (2009) gaben Hinweise darauf, dass die Acrolein-Bindung unter physiologischen Bedingungen reversibel sein kann. Es ist somit denkbar, dass an Nahrungsbestandteile oder Verbindungen im Körper gebundenes Acrolein kontinuierlich freigesetzt wird und zur beobachteten konstanten HPMA- und CEMA-Ausscheidung (siehe Kapitel 4.2.6.4 Abschnitt *Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung*, S. 117 f.) beigetragen haben könnte.

4.4 Humanstudie II

Humanstudie II umfasst einen zehntägigen Studienzeitraum und wurde mit zehn Gemischtköstlern (5 ♂, 5 ♀) und zehn Veganern (5 ♂, 5 ♀) durchgeführt.

Ein Hauptziel der Studie war es die Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA von Gemischtköstlern und Veganern zu bestimmen und zu vergleichen. Zusätzlich wurde die alimentäre Acrylamid-Aufnahme ermittelt und mit der Ausscheidung der Expositionsbiomarker AAMA und GAMA korreliert. Die entsprechenden Ergebnisse sind nicht Bestandteil dieser Arbeit. Die Publikation der Daten steht noch aus (Goempel *et al.*, unveröffentlichte Arbeit).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA in den Urinproben der Probanden der Humanstudie II bestimmt und die ermittelte Mercaptursäure-Ausscheidung der Gemischtköstler und Veganer verglichen. Unter Verwendung der Ernährungsprotokolle wurde außerdem untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung dieser Biomarker der Acrolein-Exposition und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln gibt.

Die Durchführung der Humanstudie II erfolgte aufgeteilt in zwei Studiengruppen vom 29. Juni 2015 (8:00 Uhr) bis zum 9. Juli 2015 (8:00 Uhr) und vom 10. August 2015 (8:00 Uhr) bis zum 20. August 2015 (8:00 Uhr) an der Technischen Universität Kaiserslautern.

Das Design der Humanstudie II ist in Abbildung 41 dargestellt.

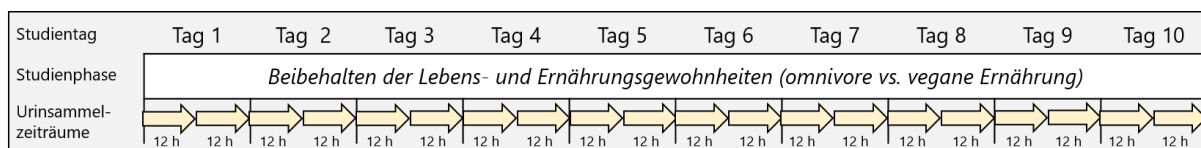


Abbildung 41: Studiendesign der Humanstudie II. Beibehalten der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, n = 10 Gemischtköstler vs. n = 10 Veganer, Urinsammelzeiträume: 8:00 - 20:00 Uhr und 20:00 - 8:00 Uhr des Folgetages (2 x 12 h)

Das Studiendesign sah vor, dass alle Probanden über den gesamten zehntägigen Studienzeitraum ihre Lebens- sowie Ernährungsgewohnheiten beibehielten. Alle verzehrfertigen Mahlzeiten der Probanden wurden als Duplikate gesammelt und in homogenisierter Form bei -20 °C eingefroren. Außerdem führten die Probanden Ernährungsprotokolle.

Der gesamte Urin der Probanden wurde gesammelt, gewogen, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Urinsammlung erfolgte in 12-h-Sammelzeiträumen von 8:00 bis 20:00 Uhr und von 20:00 bis 8:00 Uhr des Folgetages. Zusätzlich wurde täglich eine Spoturinprobe (nach dem Aufstehen, vor 8:00 Uhr) abgegeben.

Ein Jahr nach Durchführung der Studie wurde außerdem ein Fragebogen zum Lebensstil (Aktivitäten bzw. Aufenthaltsorten) während des Studienzeitraums erstellt und von den Probanden ausgefüllt, der darauf abzielte nicht-alimentäre exogene Acrylamid- und Acrolein-Expositionsquellen und -zeitpunkte zu identifizieren. Die Fragebögen wurden im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt, den Einfluss von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Quellen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung zu ermitteln.

Weitere Informationen zur Humanstudie II finden sich in Kapitel 8.2.

4.4.1 Berechnung der täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln

Die täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln der Probanden wurden bestimmt, um einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln zu erfassen (siehe Kapitel 4.4.3.3).

Die Berechnung erfolgte unter Verwendung der Ernährungsprotokolle (siehe Tabelle 75 bis Tabelle 94 im Anhang), die von den Probanden über den gesamten Studienzeitraum geführt wurden. Zur Berechnung wurden die Aufnahmemengen aller, vom entsprechenden Probanden, an diesem Tag verzehrten Lebensmittel, die während ihres Herstellungs- oder Zubereitungsprozesses > 100 °C erhitzt wurden, aufsummiert. Bestand die vom Probanden verzehrte Mahlzeit aus hocherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C) sowie nicht erhitzten oder geringfügig erhitzten Lebensmitteln (\leq 100 °C) wurde dies durch einen entsprechenden Erhitzungsfaktor berücksichtigt (siehe Tabelle 95 im Anhang). Bei einem belegten Brötchen wurde z. B. davon ausgegangen, dass es sich zu 75 % um ein hocherhitztes Lebensmittel (Brötchen) und zu 25 % um ein nicht erhitztes oder geringfügiges Lebensmittel (Belag) handelte, entsprechend wurde zur Berechnung der Aufnahmemenge an hocherhitzten Lebensmitteln das Gewicht es belegten Brötchens mit dem Faktor 0,75 multipliziert. Bei den berechneten täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln handelt es sich somit um eine Abschätzung.

Eine Übersicht über die mittleren täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln der Probanden gibt Tabelle 26. Eine Auflistung der mittleren täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln eines jeden Probanden findet sich im Anhang in Tabelle 96.

Tabelle 26: Tägliche Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln der Probanden (Humanstudie II)

	n	Aufnahme von hocherhitzte Lebensmittel [g/d]
Gesamt	20	675 ± 244
Gemischtköstler	10	711 ± 134
Veganer	10	639 ± 324
♂	10	773 ± 198
♀	10	577 ± 255

n: Anzahl der Probanden

Im Durchschnitt lag die tägliche Aufnahmemenge an hocherhitzten Lebensmitteln der Probanden bei 675 ± 244 g/d. Die Aufnahmemengen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Gemischtköstlern (711 ± 134 g/d) und Veganern (639 ± 324 g/d) und ebenfalls nicht signifikant zwischen männlichen (773 ± 198 g/d) und weiblichen (577 ± 255 g/d) Probanden.

4.4.2 Ermittlung von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen

Nicht-alimentäre exogene Acrolein-Expositionsquellen wurden durch einen Fragebogen (siehe Anhang S. 282) ermittelt, um zu untersuchen ob die HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Probanden im Zusam-

menhang stand mit der Nähe zu diesen nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen (siehe Kapitel 4.4.3.3, Abschnitt *Einfluss nicht-alimentärer exogener Acrolein-Expositionsquellen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung*, S. 139 ff.). Im Fragebogen wurde erfasst, ob sich die Probanden im Studienzeitraum in der Nähe von Rauchern, Feuer oder Grillrauch, in Restaurants, Bars oder Diskotheken aufgehalten bzw. eine öffentliche Veranstaltung (z. B. ein Stadtfest) besucht hatten. Da der Fragebogen jedoch erst ein Jahr nach der Studiendurchführung erstellt wurde, ist es wahrscheinlich, dass sich die Probanden nicht an alle Aktivitäten (nicht-alimentäre exogene Acrolein-Quellen) erinnerten, denen sie im Studienzeitraum nachgegangen waren.

Elf Probanden gaben an sich während des Studienzeitraums in der Nähe von Rauchern aufgehalten zu haben. Von den 13 Probanden, die sich nach ihren Angaben im Fragebogen während des Studienzeitraums in Bars, Diskotheken oder Restaurants aufgehalten hatten, gaben fünf Probanden an im Raucherbereich der jeweiligen Lokalität gewesen zu sein. Acht Probanden hatten entsprechend des Fragebogens öffentliche Veranstaltungen besucht und neun Probanden hatten in der Studienzeit gegrillt bzw. sich in der Nähe von offenem Feuer aufgehalten. Einige Probanden konnten den genauen Tag bzw. die genauen Tage angeben, an denen sie den exogenen Acrolein-Quellen ausgesetzt waren, andere gaben an sich nicht an die exakten Tage erinnern zu können. Ebenfalls gaben acht Probanden an sich vorwiegend in Innenräumen aufgehalten zu haben und acht Probanden gaben an sich vorwiegend im Freien aufgehalten zu haben. Die anderen vier Probanden konnten keine Auskunft über ihren vorwiegenden Aufenthaltsort geben. Eine Zusammenfassung der Auswertung der Fragebögen findet sich in Tabelle 97 im Anhang.

4.4.3 Analyse des Urins der Probanden

4.4.3.1 Urinvolumina

Die Urinvolumina wurden, wie in Humanstudie I, als Bezugsgröße für die im Urin bestimmten Mercaptursäuren ermittelt. Sie ergaben sich durch die Bestimmung der Uringewichte und Umrechnung auf die Urinvolumina unter Annahme einer Dichte des Urins von 1 kg/l.

Das mittlere Urinvolumen, welches pro Tag von den Probanden ausgeschieden wurde, lag bei $2,1 \pm 1,2$ l. Einen Überblick über die einzelnen Urinvolumina geben Tabelle 98 und Tabelle 99 im Anhang.

4.4.3.2 Kreatinin

Als weitere Bezugsgröße wurde Kreatinin in den Urinproben der Probanden bestimmt. Zur Bestimmung wurde ein Kreatinin-Assay-Kit verwendet (siehe Kapitel 7.4). Es wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

Die Kreatinin-Ausscheidung der Probanden lag durchschnittlich bei $1,49 \pm 0,77$ g/l. Die Ergebnisse der Kreatinin-Bestimmungen sind im Anhang in Tabelle 100 bis Tabelle 103 zu finden.

4.4.3.3 Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren

Die Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA wurden im Urin der Probanden bestimmt um die Ausscheidung von Gemischtköstlern und Veganern zu vergleichen sowie um einen Zusammen-

hang zwischen der Ausscheidung dieser Expositionsbiomarker und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln zu untersuchen. Ebenfalls wurde überprüft, ob der Lebensstil bzw. nicht-alimentäre exogene Acrolein-Quellen einen Einfluss auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung hatten. Anhand der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA erfolgte außerdem eine Abschätzung der Acrolein-Exposition.

Zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren wurden die Urinproben mittels SPE (siehe Kapitel 7.2.1) aufgearbeitet und die anschließende Quantifizierung der Gehalte erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS (siehe Kapitel 7.2.2). Die Bestimmung erfolgte als Zweifachbestimmung.

HPMA-Ausscheidung

Die HPMA-Ausscheidung der Probanden ist in Abbildung 42 dargestellt. Sie lag im Mittel bei 2408 ± 972 nmol/d ($1,45 \pm 0,58$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d). Gemischtköstler wiesen eine mittlere HPMA-Ausscheidung von 2083 ± 564 nmol/d ($1,13 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d) auf und Veganer eine mittlere Ausscheidung von 2733 ± 1202 nmol/d ($1,76 \pm 0,66$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d). Der Unterschied zwischen Gemischtköstlern und Veganern war nur für die Kreatinin-bezogene Ausscheidung signifikant ($p < 0,05$). Der Vergleich der HPMA-Ausscheidung von männlichen (2678 ± 841 nmol/d bzw. $1,28 \pm 0,42$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d) und weiblichen (2138 ± 1061 nmol/d bzw. $1,61 \pm 0,69$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d) Probanden ergab keinen signifikanten Unterschied.

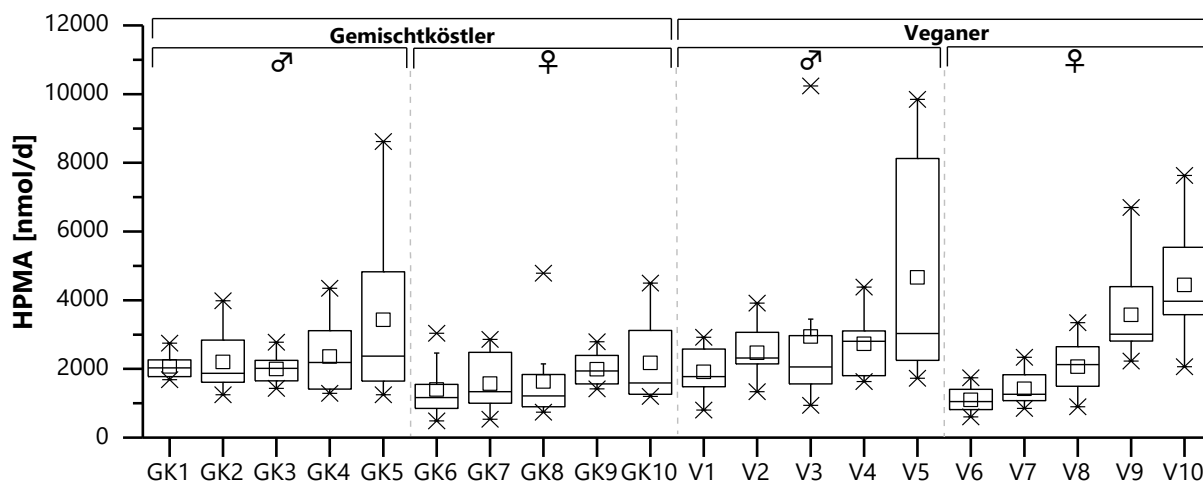


Abbildung 42: HPMA-Ausscheidung [nmol/d] aller 20 Probanden während des zehntägigen Studienzeitraums (Humanstudie II). Die dargestellten Werte sind aus den Gesamtausscheidungen an den einzelnen Studientagen ($n = 10$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. GK: Gemischtköstler, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, V: Veganer

Die HPMA-Ausscheidung der Probanden der Humanstudie II war etwas höher als die der Probanden der Humanstudie I (1952 ± 354 nmol/d bzw. $0,98 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d) und lag im Bereich der Ausscheidung von Nichtrauchern. Mittel- bzw. Medianwerte der HPMA-Ausscheidungen von Nichtrauchern reichen von $0,20$ bis $2,23$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin (Carmella *et al.*, 2007; Schettgen *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Eckert *et al.*, 2011; Higashi *et al.*, 2016).

Für die meisten Probanden der Humanstudie II lag die mittlere HPMA-Ausscheidung im Bereich von 1000 bis 2500 nmol/d und war mit einer geringen bis mittleren Schwankungsbreite verbunden. Einige

Probanden zeigten jedoch an einigen Tagen eine deutlich höhere HPMA-Ausscheidung (max. 10.238 nmol/d).

Zur genaueren Betrachtung der interindividuellen Unterschiede sind in Abbildung 43 die HPMA-Ausscheidungen von vier exemplarisch ausgewählten männlichen Probanden im Detail dargestellt. Als Probanden mit geringer Schwankungsbreite der täglichen HPMA-Ausscheidung wurde Proband GK1 (1689 - 2748 nmol/d) und Proband V1 (806 - 2896 nmol/d) ausgewählt und als Probanden mit einer hohen Variabilität der HPMA-Ausscheidung Proband GK5 (1251 - 8620 nmol/d) und Proband V5 (1729 - 9848 nmol/d). Auf diese Probanden wird im Abschnitt *Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln* (S. 131 ff.) nochmals näher eingegangen.

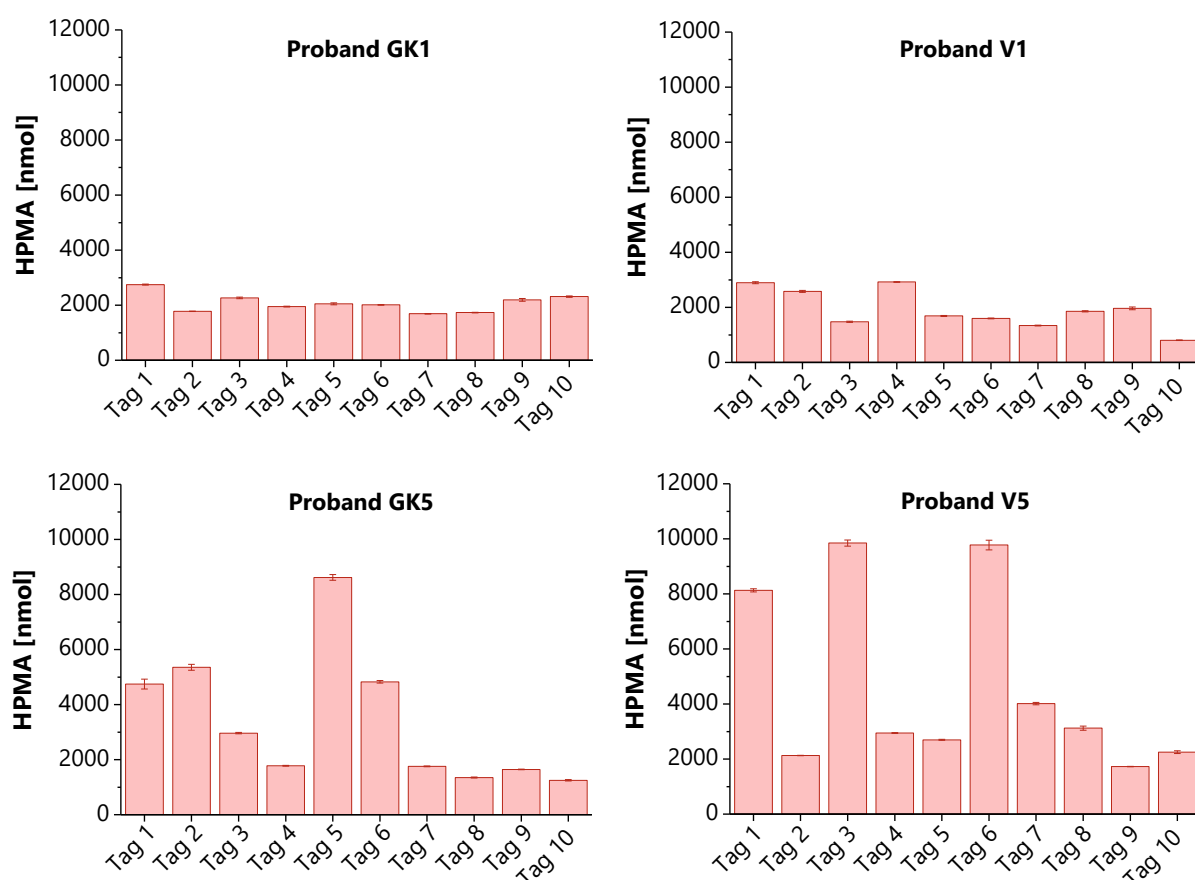


Abbildung 43: Tägliche HPMA-Ausscheidung [nmol] der männlichen Probanden GK1, V1, GK5 und V5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2 x 12 h) der HPMA-Bestimmungen im Urin (n = 2) dar. GK: Gemischtköstler, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, V: Veganer

CEMA-Ausscheidung

Analog zur HPMA-Ausscheidung gibt Abbildung 44 eine Übersicht über die CEMA-Ausscheidung der Probanden der Humanstudie II und Abbildung 45 zeigt detailliert die CEMA-Ausscheidung von vier exemplarisch ausgewählte Probanden (GK1, V1, GK5 und V5). Die Mittlere CEMA-Ausscheidung der Probanden lag bei 713 ± 397 nmol/d ($0,44 \pm 0,30$ μ mol/g Kreatinin/d). Der Unterschied zwischen der mittleren CEMA-Ausscheidung von Gemischtköstlern, welche bei 589 ± 259 nmol/d ($0,31 \pm 0,08$ μ mol/g Kreatinin/d) lag, und der von Veganern, welche bei 836 ± 482 nmol/d ($0,58 \pm 0,37$ μ mol/g Kreatinin/d)

lag, war nicht signifikant. Ebenso ergab auch der Vergleich der CEMA-Ausscheidung von männlichen (785 ± 464 nmol/d bzw. $0,38 \pm 0,29$ μ mol/g Kreatinin/d) und weiblichen (640 ± 326 nmol/d bzw. $0,51 \pm 0,31$ μ mol/g Kreatinin/d) Probanden keinen signifikanten Unterschied.

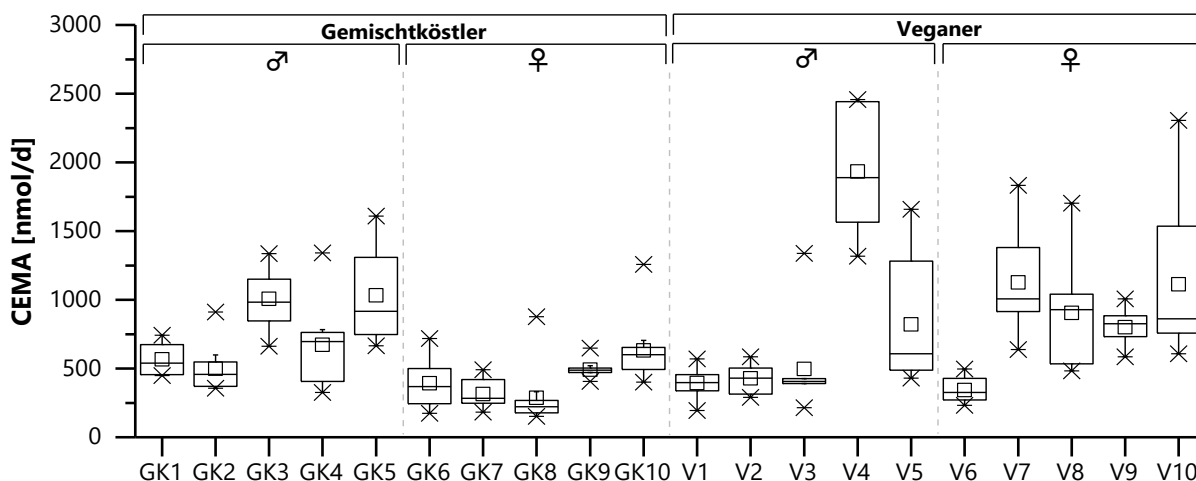


Abbildung 44: CEMA-Ausscheidung [nmol/d] aller 20 Probanden während des zehntägigen Studienzeitraums (Humanstudie II). Die dargestellten Werte sind aus den Gesamtausscheidungen an den einzelnen Studientagen ($n = 10$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, GK: Gemischtköstler, V: Veganer

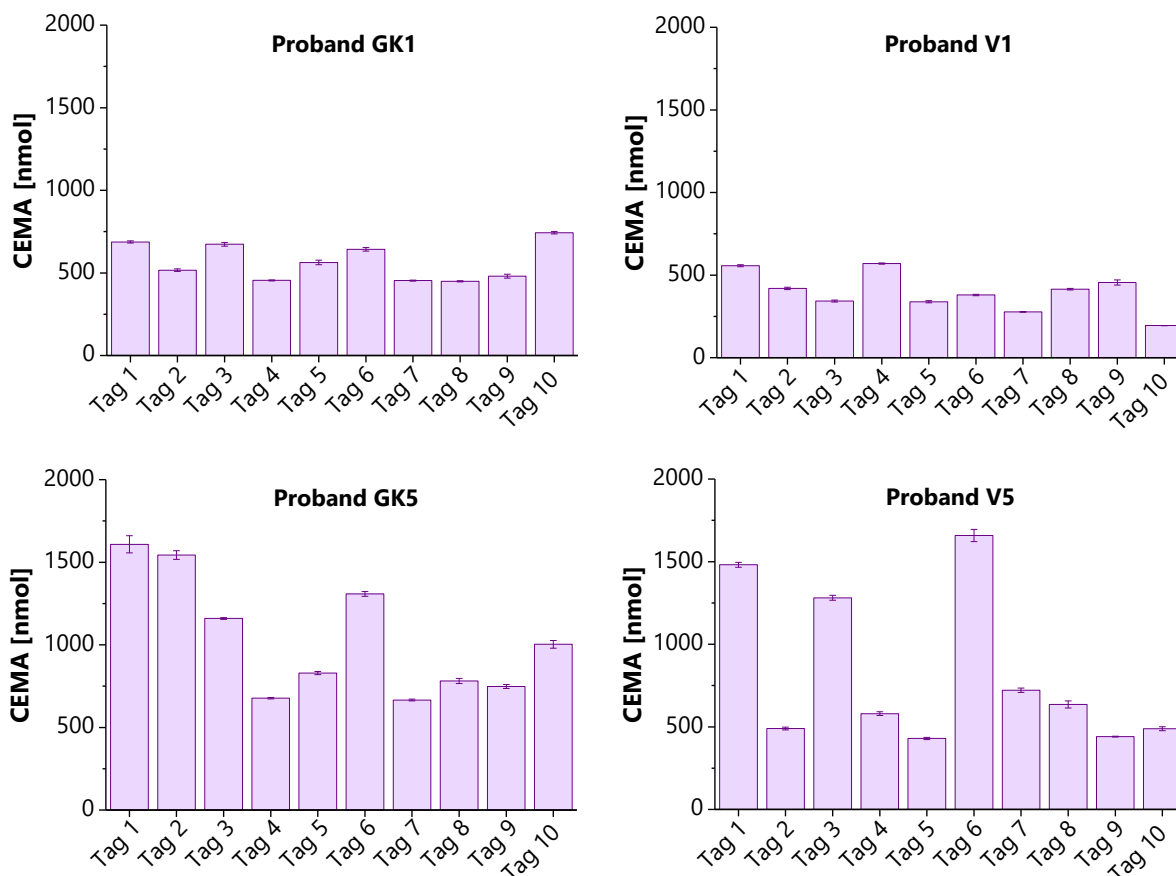


Abbildung 45: Tägliche CEMA-Ausscheidung [nmol] der männlichen Probanden GK1, V1, GK5 und V5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2×12 h) der CEMA-Bestimmungen im Urin ($n = 2$) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, GK: Gemischtköstler, V: Veganer

Die CEMA-Ausscheidung der Probanden aus Humanstudie II war geringfügig höher als die CEMA-Ausscheidung, die im Rahmen von Humanstudie I bestimmt wurde (648 ± 263 nmol/d bzw. $0,32 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin/d). Ebenfalls lag sie über der mittleren CEMA-Ausscheidung von Nichtrauchern ($0,18$ $\mu\text{mol/g}$ Kreatinin, $n = 59$), welche von Ding *et al.* (2009) ermittelt wurde.

Die CEMA-Ausscheidung unterschied sich ebenso wie die HPGA-Ausscheidung von Proband zu Proband (siehe Abbildung 44). Einige Probanden hatten eine relativ konstante mittlere tägliche CEMA-Ausscheidung im Bereich von 300 bis 500 nmol/d. Bei anderen Probanden wies die CEMA-Ausscheidung eine hohe Schwankungsbreite, mit einer täglichen Ausscheidung von bis zu 2457 nmol/d, auf. Proband GK1 ($449 - 743$ nmol/d) und Proband V1 ($194 - 570$ nmol/d) waren Probanden mit geringer Schwankungsbreite der CEMA-Ausscheidung. Proband GK5 ($666 - 1608$ nmol/d) und Proband V5 ($430 - 1658$ nmol/d) zeigten eine von Tag zu Tag variierende CEMA-Ausscheidung mit z. T. sehr hoher täglicher Ausscheidung. Auf die exemplarisch ausgewählten Probanden wird im Abschnitt *Zusammenhang zwischen der HPGA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln* (S. 131 ff.) nochmals näher eingegangen.

Verhältnis der CEMA-/HPMA-Ausscheidung

Aus den HPGA- und CEMA-Ausscheidungen der Probanden wurden die CEMA/HPMA-Verhältnisse berechnet (siehe Abbildung 46).

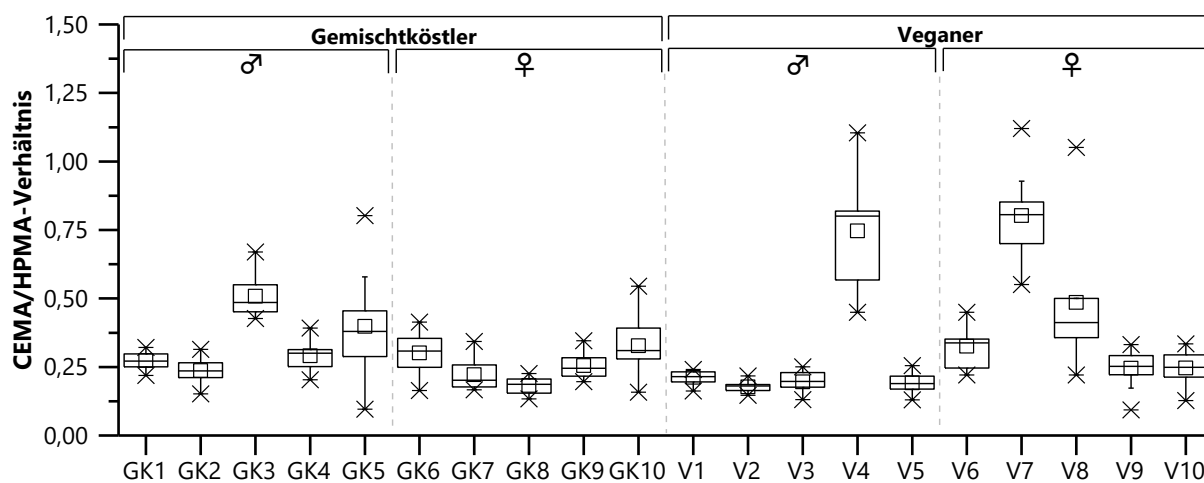


Abbildung 46: Verhältnisse der CEMA-/HPMA-Ausscheidung aller 20 Probanden während des zehntägigen Studienzeitraums (Humanstudie II). Die dargestellten Werte sind aus den CEMA/HPMA-Verhältnissen an den einzelnen Studientagen ($n = 10$) berechnet. Boxen stellen den Interquartilsabstand (IQR) dar mit Whiskern, die maximal die 1,5-fache Länge des IQR aufweisen. Kreuze sind Ausreißer entsprechend des $1,5 \times$ IQR Kriteriums. Quadrate stellen die Mittelwerte dar und horizontale Linien in den Boxen geben die Medianwerte an. CEMA: *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, GK: Gemischt-köstler, HPMA: *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, V: Veganer

Im Mittel lag das CEMA/HPMA-Verhältnis der Probanden bei $0,33 \pm 0,21$. Ein deutlich geringeres CEMA/HPMA-Verhältnis zeigte z. B. Proband V2 mit $0,18 \pm 0,02$ und Proband GK8 mit $0,18 \pm 0,03$ und eine deutlich höheres Verhältnis Proband V4 mit $0,75 \pm 0,19$ und Proband V7 mit $0,80 \pm 0,16$. Diese interindividuellen Schwankungen wurden auch bereits in Humanstudie I beobachtet und sind möglicherweise auf Unterschiede im Acrolein-Metabolismus (Enzym-Polymorphismen) der einzelnen Probanden zurückzuführen. Polymorphismen sind z. B. beschrieben für die Enzyme Cytochrom P450 (Neafsey *et al.*, 2009), GST (Ginsberg *et al.*, 2009), NAT (Walker *et al.*, 2009). Während Humanstudie II wurden außerdem

z. T. hohe intraindividuelle Unterschiede der CEMA/HPMA-Verhältnisse beobachtet. Auf diese wird bei der Einzelbetrachtung der Probanden GK1, GK5, V1 und V5 im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln

Die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme an hocherhitzten Lebensmitteln erfolgte analog zu Humanstudie I.

Die mittleren täglichen Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln wurden anhand der Ernährungsprotokolle der Probanden ermittelt (siehe Kapitel 4.4.1). Als hocherhitzt galten alle Lebensmittel die > 100 °C erhitzt wurden. Zu beachten ist dabei, dass sich die hocherhitzten Lebensmittel zum Teil stark unterscheiden. Hoherhitzte Lebensmittel waren zum Beispiel frittierte Kartoffelprodukte wie Pommes frites, Backwaren wie Brot und Brötchen oder auch hocherhitzten Fleischgerichte wie ein angebratenes oder gegrilltes Steak. Bei diesen Lebensmitteln unterscheiden sich *per se* die Erhitzungstemperatur und -dauer. So erfolgt das Frittieren von Pommes frites zum Beispiel bei hohen Temperaturen ($\approx 150 - 190$ °C), was zu einer hohen Oberflächentemperatur der Pommes frites von bis zu 160 °C sowie zu einer Kerntemperatur von bis zu 104 °C führen kann (Gökmen *et al.*, 2006). Ein Steak, wird zwar in hocherhitztem Öl (≈ 200 °C) angebraten, die Kerntemperatur im Fleisch ist jedoch deutlich geringer (Steak *rare*: 51 - 54 °C, Steak *well done*: 74 - 85 °C (Marquard *et al.*, 2010)). Neben diesem Unterschied der Erhitzungsstärke zwischen verschiedenen Lebensmitteln, kann sich die Erhitzungsstärke auch bei gleichen Lebensmitteln unterscheiden. So können Pommes frites z. B. für 8 Minuten bei 160 °C oder für 10 Minuten bei 180 °C frittiert werden. Unter Verwendung der Aufnahmemengen wurde dieser Unterschied in der Erhitzungsstärke nicht mitberücksichtigt.

Eine vergleichende Darstellung der aufgenommenen Mengen an hocherhitzten Lebensmitteln und der ausgeschiedenen Mengen an HPMA und CEMA der Probanden gibt Abbildung 47. Anders als in Humanstudie I folgten die Probanden der Humanstudie II keinem vorgegebenen Ernährungsplan, sondern behielten ihre Ernährungsgewohnheiten bei. Dies führte dazu, dass auch eine Einzelbetrachtung eines jeden Probanden erfolgen musste (siehe exemplarisch Abbildung 48 bis Abbildung 51).

Anhand der vergleichenden Darstellung der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln und der HPMA- und CEMA-Ausscheidung (siehe Abbildung 47) zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung dieser Biomarker der Acrolein-Exposition und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln. Die HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Probanden unterschied sich unabhängig von den Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln. Dass kein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Expositionsbiomarker HPMA und CEMA und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln existierte, zeigt zum Beispiel die vergleichende Betrachtung von Proband V1 und Proband V10. Proband V1 hat durchschnittlich 2308 ± 810 nmol/d an Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren ausgeschieden (HPMA: 1913 ± 694 nmol/d, CEMA: 395 ± 116 nmol/d) und hatte eine durchschnittliche Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln von 989 ± 446 g/d (Kaffee, Backwaren, Cerealien, Fleischersatzprodukte und andere Pfannen-/Ofengerichte). Proband V10 wies mit 5559 ± 1779 nmol/d eine mehr als doppelt so hohe Ausscheidung von Acrolein-assoziierte Mercaptursäuren auf (HPMA: 4446 ± 1556 nmol/d, CEMA: 1113 ± 581 nmol/d). Er hat mit 505 ± 223 g/d (Backwaren, Fleischersatzprodukte, Kartoffelprodukte, Pizza, andere Pfannen-/Ofengerichte) jedoch nur circa halb so viele

hoherhitzte Lebensmittel konsumiert. Der Vergleich der mittleren täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der mittleren täglichen Aufnahme von hoherhitzten Lebensmitteln der Probanden ($n = 20$) ergab keinen Zusammenhang.

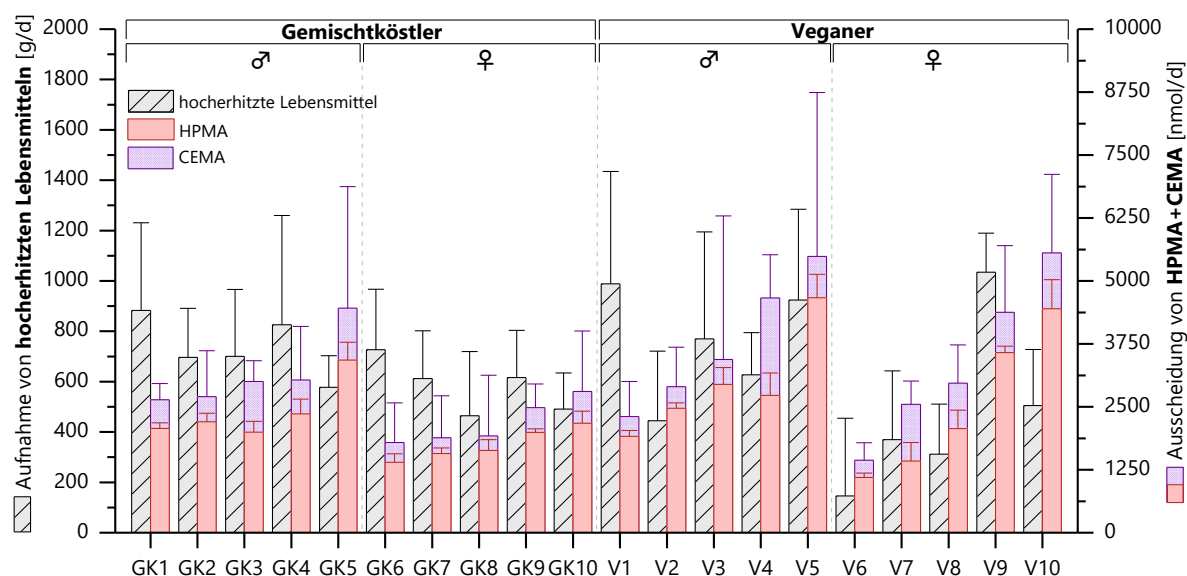


Abbildung 47: Vergleichende Darstellung der Aufnahme von hoherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C) [g/d] und der HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol/d] aller 20 Probanden während des zehntägigen Studienzeitraums (Humanstudie II). Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichungen (+SD) berechnet aus der Gesamtaufnahmen bzw. -ausscheidungen an den einzelnen Studientagen ($n = 10$) dar. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung der Standardabweichungen (-SD) verzichtet. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, GK: Gemischtköstler, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, V: Veganer

Zusätzlich zu den interindividuellen Unterschieden der HPMA- und CEMA-Ausscheidung wurden auch die intraindividuellen Unterschiede der HPMA- und CEMA-Ausscheidungen der einzelnen Probanden betrachtet. Exemplarisch wird im Folgenden auf vier männliche Probanden genauer eingegangen. Bei den ausgewählten Probanden handelt es sich um einen Gemischtköstler (GK1) und einen Veganer (V1), deren HPMA- und CEMA-Ausscheidung eine geringe Schwankungsbreite aufwies, sowie um einen Gemischtköstler (GK5) und einen Veganer (V5), deren HPMA- und CEMA-Ausscheidung an einigen Tagen sehr hoch war (siehe Abbildung 43 und Abbildung 45). Verglichen wurde die Aufnahme von hoherhitzten Lebensmitteln mit der HPMA- und CEMA-Ausscheidung am selben Studientag. Dieser Vergleich wurde aufgrund der in der Literatur angegebenen t_{max} -Werte für HPMA und CEMA, welche bei weniger als sechs Stunden lagen, angewandt. Der t_{max} -Werte für HPMA und CEMA lag nach oraler Gabe von 615 μg Acrolein (7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) an einen männlichen Probanden im Zeitraum von 0 - 2 h. Nach Verzehr von kommerziell erhältlichen Kartoffelchips (4,6 μg Acrolein) durch fünf männlichen Probanden, lag t_{max} für HPMA im Zeitraum von 2 - 4 h und für CEMA im Zeitraum von 4 - 6 h. Der Verzehr von selbst hergestellten Kartoffelchips mit unbekanntem Acrolein-Gehalt durch 13 männlichen Probanden resultierte in einem t_{max} für HPMA im Zeitraum von 2 - 4 h (Watzek, 2012; Watzek *et al.*, 2012b). Die Nahrungsaufnahme der Probanden erfolgte während der Humanstudie II überwiegend zwischen 8:00 und 20:00 Uhr und die Urinsammlung für den jeweiligen Studientag endete erst um 8:00 Uhr des Folgetages. Somit ist davon auszugehen, dass falls es zu einer Acrolein-Aufnahme über hoherhitzte Lebensmittel gekommen ist, die maximale Ausscheidung dieser Biomarker der Acrolein-Exposition am selben Studientag (8:00 - 8:00 Uhr des Folgetages) erfolgte. Berücksichtigt wurde jedoch auch, dass sich eine hohe

alimentäre Acrolein-Aufnahme, wenn erfolgt, auch noch auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung am Folgetag ausgewirkt haben könnte.

Gemischtköstler GK1

Proband GK1, welcher zur Gruppe der männlichen Probanden gehörte, die während des Studienzeitraums ihre omnivoren Ernährungsgewohnheiten beibehielten, zeigte eine konstante HPMA- und CEMA-Ausscheidung über die gesamten zehn Studientage (siehe Abbildung 48).

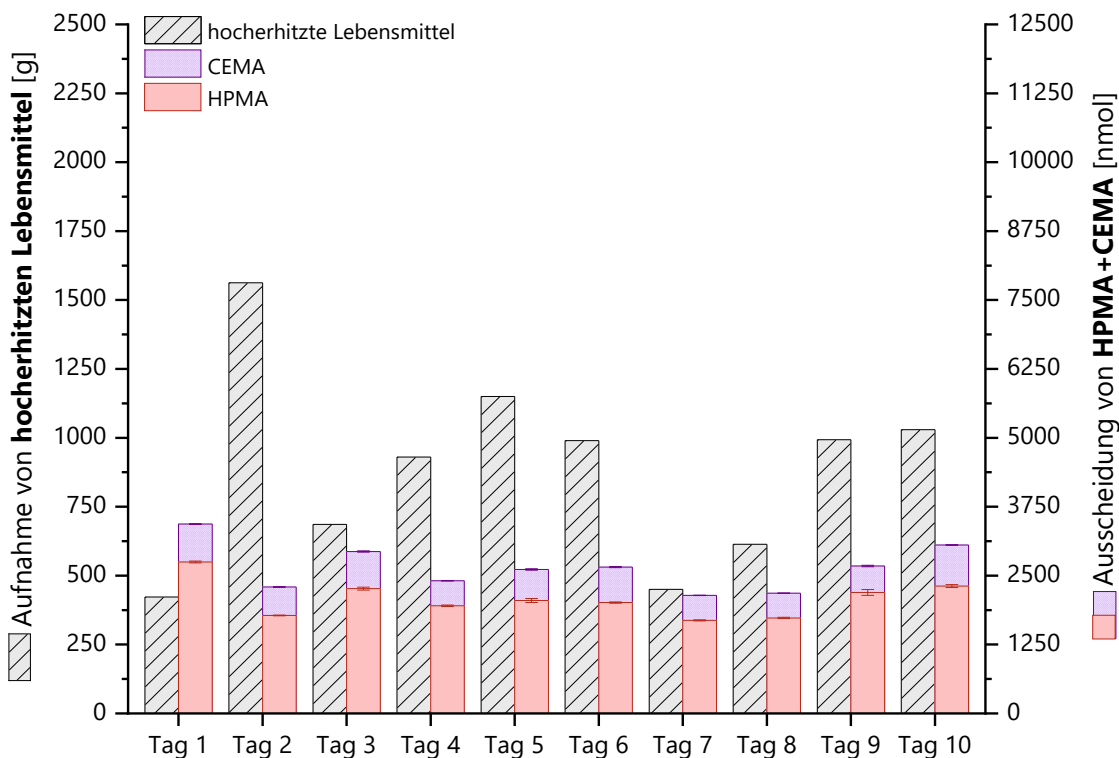


Abbildung 48: Vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C) [g] und der täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband GK1 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen (hocherhitzte Lebensmittel) stellen die Summen der Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln des jeweiligen Tages dar. Säulen (HPMA und CEMA) stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2 x 12 h) der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin (n = 2) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, GK: Gemischtköstler, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein

Die HPMA-Ausscheidung reichte von 1689 bis 2748 nmol/d und lag im Mittel bei 2073 ± 322 nmol/d. Die CEMA-Ausscheidung reichte von 449 bis 743 nmol/d mit einer mittleren Ausscheidung von 566 ± 112 nmol/d. Aus den täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidungen ergab sich ein mittleres CEMA/HPMA-Verhältnis von $0,27 \pm 0,03$, das nur eine geringe Schwankung zwischen den Studientagen aufwies.

Die Ernährung von Proband GK1 variierte an den verschiedenen Studientagen (siehe Ernährungsprotokoll im Anhang in Tabelle 75). Ebenfalls variierte seine Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (siehe Abbildung 48). Sie lag im Mittel bei 883 ± 348 g/d. Den Tag mit der höchsten Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (1563 g) stellte Tag 2 dar. An diesem Tag verzehrte Proband GK1 als hocherhitzte Lebensmittel verschiedene Backwaren, Pizza, ein Ofengericht und Kaffee. Die HPMA-Ausscheidung von Proband GK1 lag an diesem Tag bei 1777 ± 7 nmol/d und die CEMA-Ausscheidung bei 517 ± 7 nmol/d und war somit nicht erhöht verglichen zur mittleren Ausscheidung von HPMA

(2073 ± 322 nmol/d) und CEMA (566 ± 112 nmol/d) des Probanden. Die geringste Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (423 g) erfolgte an Tag 1. An diesem Tag verzehrte der Proband GK1 Nudeln mit Soße, Suppe, belegte Sandwichs, Pudding, Softdrinks, Bier und Kaffee; somit überwiegend nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel. Trotz der mehr als 3-fach geringeren Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln verglichen zu Tag 2 war die Ausscheidung von HPMA (2748 ± 16 nmol) und CEMA (687 ± 7 nmol) an Tag 1 höher als an Tag 2. Für den ersten Studientag ist eine hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln kurz vor Studienbeginn nicht auszuschließen und eine erhöhte Mercaptursäure-Ausscheidung ist möglicherweise auf eine Acrolein-Aufnahme vor Studienbeginn zurückzuführen. Eine geringe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln erfolgte jedoch z. B. auch an Tag 7 (450 g; Steak, Brötchen und Pizza) sowie am Folgetag 8 (614 g; Cordon bleu, Brot, Haselnuss-Schnitte und Kaffee). Auch an diesen Tagen war die geringe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln nicht mit einer verminderten HPMA- (Tag 7: 1689 ± 10 nmol, Tag 8: 1733 ± 11 nmol) oder CEMA-Ausscheidung (Tag 7: 454 ± 3 nmol, Tag 8: 449 ± 4 nmol) verbunden.

Die Betrachtung der ausgewählten Tage sowie des ganzen Studienzeitraums (siehe Abbildung 48) zeigte für Proband GK1 keinen Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln.

Veganer V1

Als zweiter Proband, der im Detail betrachtet werden sollte, wurde ein männlicher Veganer ausgewählt, dessen HPMA- und CEMA-Ausscheidung während des Studienzeitraums nur eine geringe Schwankungsbreite aufwies (siehe Abbildung 49).

Die HPMA-Ausscheidung von Proband V1 reichte von 806 bis 2896 nmol/d mit einer mittleren HPMA-Ausscheidung von 1913 ± 694 nmol/d. Die minimale tägliche CEMA-Ausscheidung von Proband V1 war 194 nmol/d und die maximale Ausscheidung 570 nmol/d. Im Mittel lag die tägliche CEMA-Ausscheidung von Proband V1 bei 395 ± 116 nmol/d. Das mittlere CEMA/HPMA-Verhältnis von Proband V1 lag bei $0,24 \pm 0,05$ und variierte nur geringfügig zwischen den verschiedenen Studientagen.

Die Ernährung (siehe Ernährungsprotokolle in Tabelle 85 im Anhang) sowie die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (siehe Abbildung 49) von Proband V1 unterschied sich von Tag zu Tag. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln lag bei 989 ± 446 nmol/d. An Tag 5 nahm Proband V1 die höchste Menge an hocherhitzten Lebensmitteln (1718 g) auf. Zu den an diesem Tag verzehrten hocherhitzten Lebensmitteln zählten verschiedene Backwaren, ein Ofengericht sowie Kaffee. Diese erhöhte Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln resultierte nicht in einer gesteigerten Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA (1689 ± 16 nmol) und CEMA (338 ± 7 nmol) verglichen zur mittleren täglichen Ausscheidung des Probanden (HPMA: 1913 ± 694 nmol/d, CEMA: 395 ± 116 nmol/d). Auch resultierte die hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln an Tag 5 nicht in einer erhöhten HPMA- oder CEMA-Ausscheidung an Tag 6. An Tag 6 nahm Proband V1 die geringste Menge an hocherhitzten Lebensmitteln (180 g) auf. An diesem Tag verzehrte der Proband Obst, Haferflocken mit Sojamilch, Gemüsereis, Maisnudeln mit Soße, belegtes Brot, Malzbier, Softdrink, Saft, Tee und Wasser. Bei diesen Lebensmitteln handelt es sich vorwiegend um nicht erhitzte oder geringfügig erhitzte Lebensmittel. Die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln

an Tag 6 war 10-fach geringer als die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln an Tag 5. Die HPMA- (1599 ± 17 nmol) und CEMA-Ausscheidung (380 ± 5 nmol) an Tag 6 war jedoch vergleichbar zu der an Tag 5.

Auch für Proband V1 ergab sich somit durch die vergleichende Betrachtung des Tag 5 und Tag 6 sowie durch die Betrachtung des gesamten Studienzeitraums (siehe Abbildung 49) kein Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln.

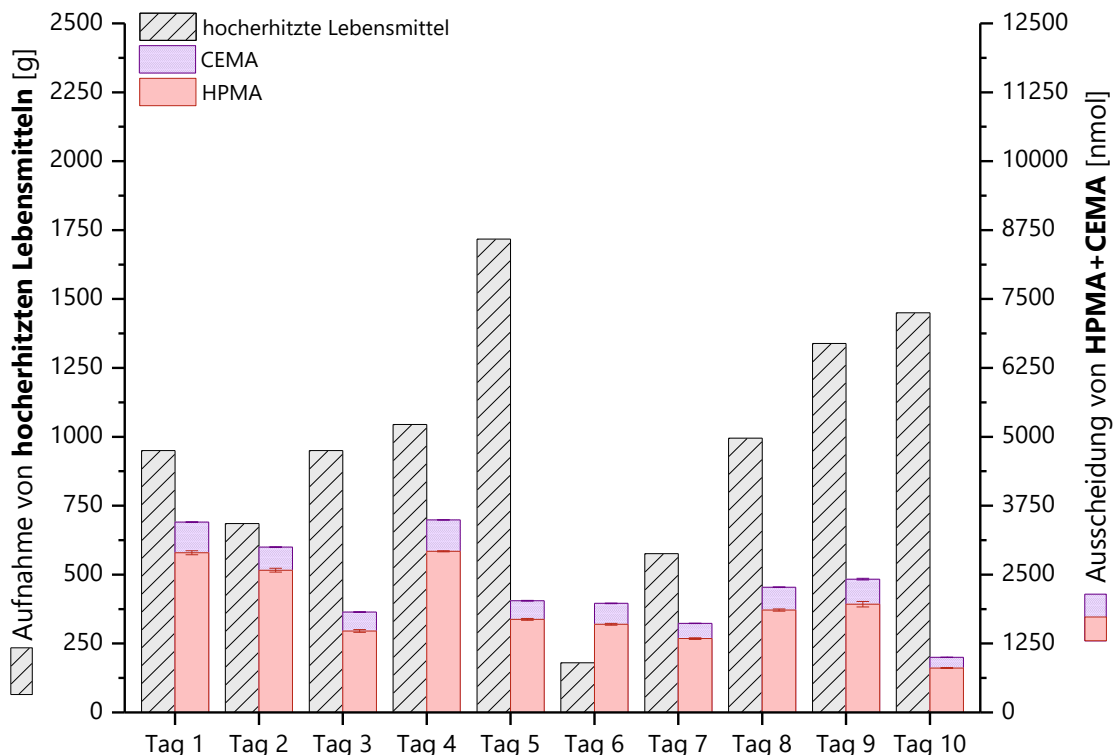


Abbildung 49: Vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmittel (> 100 °C) [g] und der täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband V1 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen (hocherhitzte Lebensmittel) stellen die Summen der Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln des jeweiligen Tages dar. Säulen (HPMA und CEMA) stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2 x 12 h) der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin (n = 2) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, V: Veganer

Gemischtköstler GK5

Proband GK5 gehörte zur Gruppe der männlichen Probanden, die während des Studienzeitraums ihre omnivoren Ernährungsgewohnheiten beibehielten. Seine HPMA- und CEMA-Ausscheidung unterschied sich an den verschiedenen Studientagen (siehe Abbildung 50). An Tag 4, Tag 7, Tag 8, Tag 9 und Tag 10 zeigte er eine tägliche HPMA-Ausscheidung von 1251 bis 1776 nmol. Diese war im Bereich der konstanten HPMA-Ausscheidung von Proband GK1 und Proband V1. Die CEMA-Ausscheidung von Proband GK5 lag an den entsprechenden Tagen bei 666 bis 1033 nmol. Im Vergleich zu diesen Tagen mit relativ konstanter Mercaptursäure-Ausscheidung gab es auch Tage (Tag 1, Tag 2, Tag 5 und Tag 6), an denen Proband GK5 eine deutlich höhere Ausscheidung zeigte, welche für HPMA bei max. 8620 nmol/d und für CEMA bei max. 1608 nmol/d lag. Das CEMA/HPMA-Verhältnis von Proband GK5 wies einen Mittelwert von $0,40 \pm 0,19$ auf und unterschied sich stark an den verschiedenen Studientagen. An Tag 5 war es mit 0,10 am geringsten und an Tag 10 mit 0,80 am höchsten.

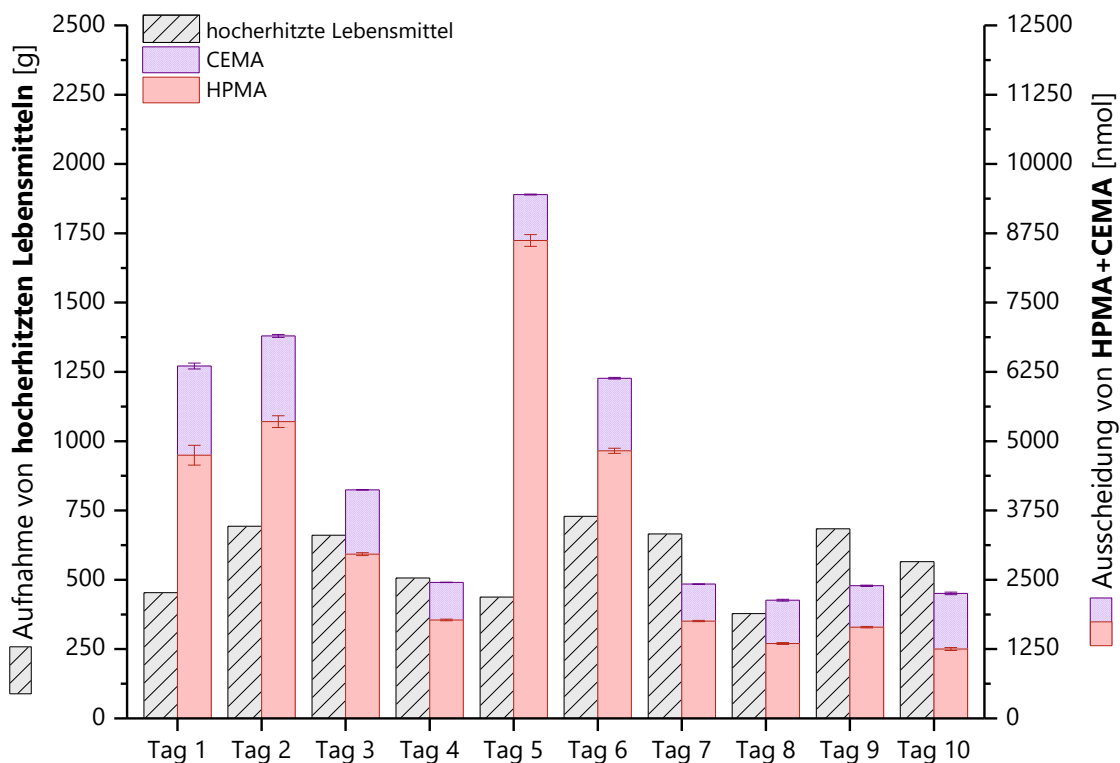


Abbildung 50: Vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C) [g] und der täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband GK5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen (hocherhitzte Lebensmittel) stellen die Summen der Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln des jeweiligen Tages dar. Säulen (HPMA und CEMA) stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2 x 12 h) der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin (n = 2) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, GK: Gemischtköstler, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein

Auch die Ernährung (siehe Ernährungsprotokoll, Tabelle 79 im Anhang) und die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (siehe Abbildung 50) von Proband GK5 unterschied sich von Tag zu Tag. Die Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln variierten jedoch weniger stark als die von Proband GK1 und Proband V1. Proband GK5 konsumierte täglich 378 g (Tag 8) bis 729 g (Tag 6) hocherhitzte Lebensmittel. Die durchschnittliche Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln lag für Proband GK5 bei 576 ± 124 g/d.

Tage, an denen der Proband GK5 vergleichbare Mengen an hocherhitzten Lebensmitteln konsumiert hatte, waren zum Beispiel Tag 1 (454 g), Tag 4 (506 g) und Tag 5 (438 g). An diesen Tagen verzehrte der Proband GK5 viele nicht erhitzte oder geringfügig erhitzte Lebensmittel wie Joghurt, Süßigkeiten, Nudeln, Suppe, Softdrinks, Bier und Wasser und zusätzlich als hocherhitzte Lebensmittel Backwaren und gegrilltes bzw. angebratenes Fleisch. Diese vergleichbare Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln war nicht assoziiert mit einer vergleichbaren HPMA- (Tag 1: 4747 nmol, Tag 4: 1776 nmol, Tag 5: 8620 nmol) und CEMA-Ausscheidung (Tag 1: 1608 nmol Tag 4: 677 nmol Tag 5: 829 nmol). Für Tag 5 zeigt sich außerdem, dass die hohe Ausscheidung von HPMA und CEMA nicht verbunden war mit einer erhöhten Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln am Vortag.

Ebenfalls war eine erhöhte Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln nicht mit einer erhöhten Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren verbunden. An Tag 8 verzehrte Proband GK5 viele nicht erhitzte oder geringfügig erhitzte Lebensmittel wie Joghurt, Nudeln, Kartoffelklöße, Softdrinks und Wasser. Die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (378 g) erfolgte an diesem Tag durch hoch-

erhitztes Fleisch (Putengulasch und Curry mit Fleisch). An Tag 9 verzehrte Proband GK5 ebenfalls einige nicht erhitzte oder geringfügig erhitzte Lebensmittel wie Joghurt, Salat, Softdrinks und Wasser, jedoch verglichen zu Tag 8 mehr hochehitzte Lebensmittel (684 g; Kroketten, Pizza und Truthahnsteak). Trotz dieser höheren Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln war die Ausscheidung von HPMA (Tag 8: 1351 nmol, Tag 9: 1645 nmol) und CEMA (Tag 8: 782 nmol, Tag 9: 748 nmol) an diesen Tagen vergleichbar.

Der Vergleich der Ausscheidung der Biomarker der Acrolein-Exposition (HPMA und CEMA) mit der Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln an verschiedenen Studientagen zeigte für Proband GK5 wie bereits für Proband GK1 und Proband V1 keinen Zusammenhang.

Veganer V5

Als letzter Proband, der im Detail betrachtet werden sollte, wurde ein männlicher Veganer ausgewählt. Dieser zeigte, wie der sich omnivor ernärende Proband GK5, an einigen Tagen eine deutlich erhöhte Mercaptursäure-Ausscheidung (siehe Abbildung 51).

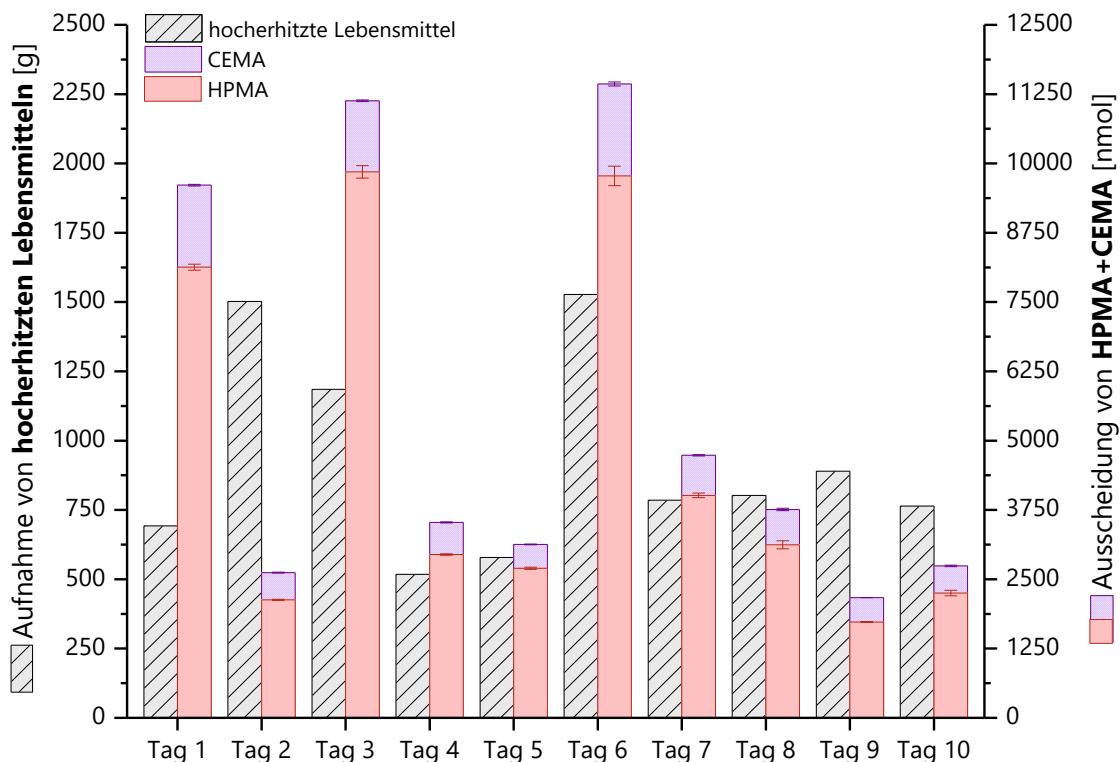


Abbildung 51: Vergleichende Darstellung der täglichen Aufnahme von hochehitzten Lebensmitteln (> 100 °C) [g] und der täglichen HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband V5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen (Humanstudie II). Säulen (hochehitzte Lebensmittel) stellen die Summen der Aufnahmemengen an hochehitzten Lebensmitteln des jeweiligen Tages dar. Säulen (HPMA und CEMA) stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den aufsummierten Einzelwerten (Urinsammlung: 2 x 12 h) der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin (n = 2) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, V: Veganer

Tage mit ähnlich geringer HPMA- und CEMA-Ausscheidung waren Tag 2, Tag 4, Tag 5, Tag 7, Tag 8, Tag 9 und Tag 10. Die HPMA-Ausscheidung reichte an diesen Tagen von 1729 bis 4014 nmol/d und die CEMA-Ausscheidung von 430 bis 722 nmol/d. Tage mit deutlich erhöhter Mercaptursäure-Ausscheidung waren Tag 1, Tag 3 und Tag 6. Die HPMA-Ausscheidung erreichte einen Maximalwert von 9848 nmol/d

und die CEMA-Ausscheidung von 1658 nmol/d. Das CEMA/HPMA-Verhältnis von Proband V5 zeigte nur geringe intraindividuelle Schwankungen und lag im Mittel bei $0,19 \pm 0,04$.

Die Ernährung (siehe Ernährungsprotokoll, Tabelle 89 im Anhang) und die Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (siehe Abbildung 51) von Proband V5 unterschied sich von Tag zu Tag. Im Mittel nahm Proband V5 täglich 941 ± 349 g hocherhitzte Lebensmittel auf.

An Tag 1 verzehrte der Proband V5 693 g hocherhitzte Lebensmittel, bestehend aus Backwaren und hocherhitzte Kartoffelprodukten. Diese Aufnahme war vergleichbar zur Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln an Tag 4 und Tag 8. An Tag 4 verzehrte der Proband V5 etwas weniger (518 g; Backwaren, hocherhitzte Fleischersatzprodukte) und an Tag 8 etwas mehr (802 g; Backwaren, hocherhitzte Kartoffelprodukte) hocherhitzte Lebensmittel als an Tag 1. Die vergleichbare Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln war nicht verbunden mit einer vergleichbaren Ausscheidung von Mercaptursäuren. An Tag 1 war die Mercaptursäure-Ausscheidung (HPMA: 8159 nmol, CEMA: 1481 nmol) von Proband V5 mehr als doppelt so hoch wie die an Tag 4 (HPMA: 2946 nmol, CEMA: 580 nmol) bzw. Tag 8 (HPMA: 3123 mol, CEMA: 636 nmol). Ob die hohe Mercaptursäure-Ausscheidung an Tag 1 im Zusammenhang stand mit einer hohen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln am Vortag, kann nicht geklärt werden, da die Dokumentation der Ernährung erst an Tag 1 der Studie begonnen hat.

Ebenfalls eine vergleichbare Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln erfolgte jedoch auch an Tag 2 und Tag 6. An Tag 6 erfolgte die höchste Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (1528 g) durch den Verzehr von Ofen-Paprikakartoffeln, einem Tofu-Gemüse-Gericht und einem Brötchen. An Tag 2 konsumierte Proband V5 als hocherhitzten Lebensmitteln Kroketten, ein Ofengericht und ein Brötchen, was in der zweithöchsten Aufnahmemenge an hocherhitzten Lebensmitteln (1503 g) resultierte. Die hohe Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln an Tag 6 ging einher mit einer hohen Ausscheidung von HPMA (9775 nmol) und CEMA (1658 nmol). An Tag 2 war die HPMA- (2129 nmol) und CEMA-Ausscheidung (490 nmol) jedoch trotz hoher Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln gering.

Die Einzelbetrachtung von Proband V5 ergab somit ebenfalls keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-Metaboliten HPMA und CEMA im Urin und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln.

Zusammenfassend zeigte sich weder durch den Vergleich der Probanden untereinander (siehe Abbildung 47) noch durch die Einzelbetrachtung von Proband GK1, Proband GK5, Proband V1 und Proband V5 (siehe Abbildung 48 bis Abbildung 51) und allen anderen Probanden (nicht dargestellt) ein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln. Eine vergleichbare Mercaptursäure-Ausscheidung war nicht assoziiert mit einer vergleichbaren Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln und eine hohe Mercaptursäure-Ausscheidung ging nicht einher mit einer hohen Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln.

Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung

Für einige Probanden aus Humanstudie II wurde eine konstante Ausscheidung der Expositionsbiomarker HPMA und CEMA beobachtet. Die mittlere HPMA-Ausscheidung dieser Probanden lag im Bereich von

1000 bis 2500 nmol/d (siehe Abbildung 42) und die mittlere CEMA-Ausscheidung im Bereich von 300 bis 500 nmol/d (siehe Abbildung 44). Eine vergleichbare konstante Ausscheidung von HPMA (1356 - 2298 nmol/d) und CEMA (456 - 854 nmol/d) wurde auch im Rahmen von Humanstudie I beobachtet. Eine Ursache für dieses in Humanstudie I sowie in Humanstudie II beobachtete Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung könnte eine konstante Acrolein-Freisetzung aus exogen aufgenommenem und an Nahrungsbestandteile oder Verbindungen im Körper gebundenem Acrolein sein. Ebenfalls könnte eine endogene Acrolein- bzw. HPMA- und CEMA-Bildung zum beobachteten Basislevel geführt haben (Diskussion siehe Humanstudie I, Kapitel 4.2.6.4, Abschnitt *Basislevel der HPMA- und CEMA-Ausscheidung*, S. 117 f.).

Einfluss nicht-alimentärer exogener Acrolein-Expositionsquellen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung

Im Rahmen von Humanstudie II, bei der die Probanden ihre Lebens- und Ernährungsgewohnheiten beibehielten, zeigten einige Probanden an einigen Tagen eine hohe HPMA-Ausscheidung von über 10.000 nmol/d sowie eine hohe CEMA-Ausscheidung von fast 2500 nmol/d. Diese beobachtete hohe Mercaptursäure-Ausscheidung war nicht assoziiert mit einer erhöhten Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln (siehe Abschnitt *Zusammenhang zwischen der HPMA- und CEMA-Ausscheidung und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln*, S. 131 ff.).

Im Rahmen von Humanstudie I, welche in einer kontrollierten Umgebung unter Ausschluss von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen durchgeführt wurde, zeigten die Probanden keine vergleichbar hohe Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren. Dies lässt vermuten, dass die während Humanstudie II beobachtete hohe Mercaptursäure-Ausscheidung auf den Lebensstil der Probanden bzw. auf eine mit dem Lebensstil verbundene Acrolein-Exposition durch nicht-alimentäre exogene Acrolein-Quellen zurückzuführen ist.

Um dieser Beobachtung genauer zu untersuchen, sollte überprüft werden ob die beobachteten hohen Mercaptursäure-Ausscheidungen (Humanstudie II) mit einer Acrolein-Exposition durch nicht-alimentäre exogene Acrolein-Expositionsquellen einhergingen. Hierzu wurde ein Fragebogen erstellt, der dazu diente, die nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen der Probanden zu identifizieren (Kapitel 4.4.2). Abbildung 52 und Abbildung 53 zeigen exemplarisch die HPMA- und CEMA-Ausscheidung von Proband GK1 und Proband V5 zusammen mit den Aktivitäten bzw. Aufenthaltsorten der Probanden, die möglicherweise mit einer exogenen Acrolein-Exposition verbunden waren.

Für Proband GK5 (siehe Abbildung 52) zeigte sich, dass die Tage, an denen die HPMA- und CEMA-Ausscheidung hoch war, ebenfalls Tage waren, an denen sich der Proband in der Nähe von exogenen Acrolein-Quellen aufgehalten hatte. Dies war für Tag 1, Tag 2, Tag 5 und Tag 6 der Fall. An Tag 1 lag die HPMA- bzw. CEMA-Ausscheidung von Proband GK5 bei 4747 bzw. 1608 nmol, an Tag 2 bei 5354 bzw. 1544 nmol und an Tag 5 bei 8620 bzw. 829 nmol. An diesen Tagen mit hoher Ausscheidung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren hat Proband GK5 angegeben, gegrillt zu haben. Eine exogene Acrolein-Exposition über Grillrauch ist somit wahrscheinlich. An Tag 5 besuchte Proband GK5 außerdem ein Stadtfest, hier ist es ebenfalls denkbar, dass die exogene Acrolein-Exposition durch Nähe zu Rauchern, Grills oder Imbissständen erhöht war. Das gleiche Stadtfest besuchte Proband GK5 auch an Tag 6. An

diesem Tag besuchte er zusätzlich ein Restaurant bzw. eine Bar oder Diskothek. Auch an diesem Tag zeigte er eine erhöhte Ausscheidung von HPMA (4826 nmol) und CEMA (1309 nmol). Die erhöhten Mercaptursäure-Ausscheidungen von Proband GK5 sind somit möglicherweise auf die ermittelten exogenen Expositionsquellen zurückzuführen.

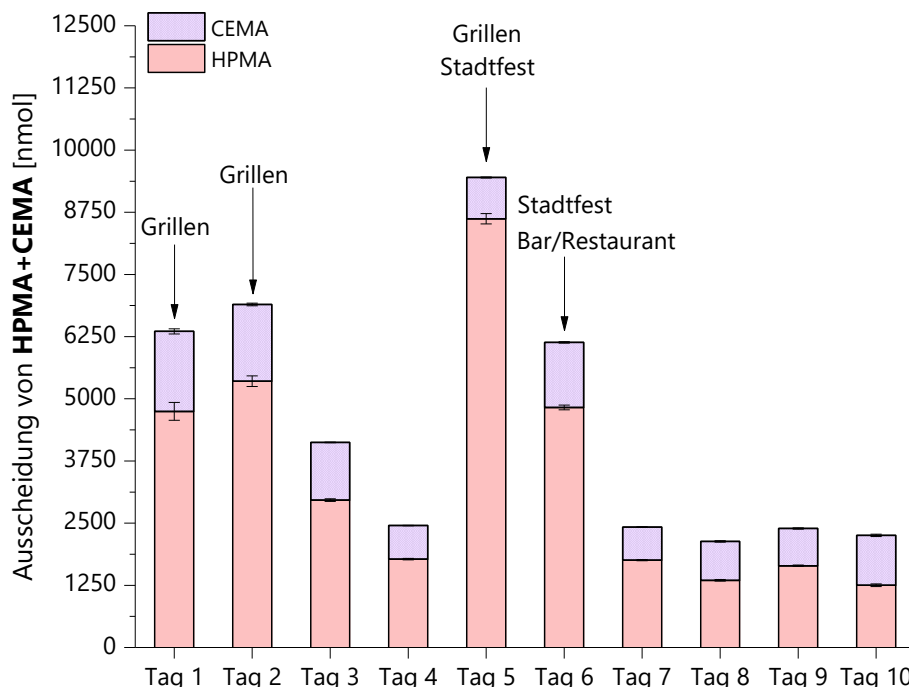


Abbildung 52: Tägliche HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband GK5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen im Zusammenhang mit Aktivitäten des Probanden, die möglicherweise mit einer exogenen Acrolein-Exposition verbunden waren. Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den Einzelwerten der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin ($n = 2$) dar. CEMA: *N*-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, GK: Gemischtköstler, HPMA: *N*-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Proband V5 (siehe Abbildung 53) zeigte an Tag 1, Tag 3 und Tag 6 eine erhöhte HPMA- und CEMA-Ausscheidung. Im Fragebogen zur Ermittlung der exogenen Acrolein-Expositionsquellen hatte er angegeben an Tag 6, an dem die HPMA-Ausscheidung bei 9775 nmol und die CEMA-Ausscheidung bei 1658 nmol lag, ein Restaurant besucht zu haben. Dies kann möglicherweise mit einer erhöhten Acrolein-Exposition verbunden gewesen sein. Ebenfalls gab er an, sich an Tag 5 in der Nähe eines Lagerfeuers aufgehalten zu haben. Es ist wahrscheinlich, dass dieses abends bis spät abends erfolgte, sodass sich die mögliche Acrolein-Exposition über den Feuerrauch eventuell auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung am Folgetag (Tag 6) ausgewirkt haben kann. Zusätzlich zum Aufenthalt in der Nähe des Lagerfeuers und zum Restaurantbesuch gab er auch an, an Tag 8 ein Konzert besucht zu haben. Die HPMA- und CEMA-Ausscheidung war an Tag 8 nicht erhöht und lässt somit nicht auf eine erhöhte Acrolein-Exposition bedingt durch den Konzertbesuch schließen. Für Tag 1 und Tag 3 an denen die Mercaptursäure-Ausscheidung ebenfalls erhöht war, ergab die Auswertung des Fragebogens keinen Hinweis auf Aktivitäten, die möglicherweise mit einer exogenen Acrolein-Exposition verbunden waren. Da der Fragebogen jedoch erst ein Jahr nach Durchführung der Studie erstellt und von den Probanden ausgefüllt wurde, ist es möglich, dass sich Proband V5 (und andere Probanden) nicht mehr an alle Aktivitäten erinnerte, denen er im Studienzeitraum nachgegangen war.

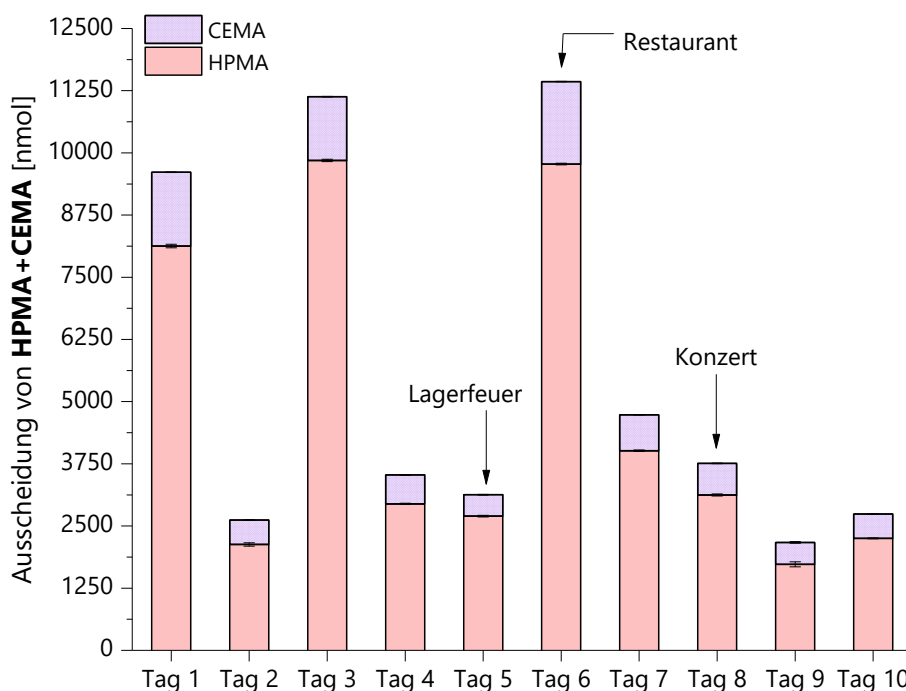


Abbildung 53: Tägliche HPMA- und CEMA-Ausscheidung [nmol] von Proband V5 über den Studienzeitraum von zehn Tagen im Zusammenhang mit Aktivitäten des Probanden, die möglicherweise mit einer exogenen Acrolein-Exposition verbunden waren. Säulen stellen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Spannweiten berechnet aus den Einzelwerten der HPMA- und CEMA-Bestimmung im Urin ($n = 2$) dar. CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, V: Veganer

Für Folgestudien wäre es daher sinnvoll Aktivitätsprotokolle direkt in das Studiendesign zu integrieren. Um noch genauere Information über exogene Acrolein-Expositionsquellen zu erhalten ist es ebenfalls denkbar, Biomarker bestimmter Acrolein-Expositionsquellen im Urin der Probanden mitzubestimmen. Als Biomarker für eine allgemeine Rauchexposition oder eine Zigarettenrauch-Exposition könnte z. B. die Acrylnitril-Mercaptursäure bzw. der Nikotin-Metabolit Cotinin im Urin bestimmt werden (Bramer und Kallungal, 2003; Minet *et al.*, 2011). Vorteil der Verwendung von Biomarkern wäre, dass anders als bei der Verwendung von Fragebögen oder Aktivitätsprotokollen, die tatsächliche Exposition erfasst würde.

Die Auswertung der Fragebögen zur Ermittlung der exogenen Acrolein-Expositionsquellen und der Vergleich mit der HPMA- und CEMA-Ausscheidung zeigte, dass es sich bei einigen Tagen mit hoher HPMA- und CEMA-Ausscheidung ebenfalls um Tage handelte, an denen sich der entsprechende Proband in der Nähe von exogenen Acrolein-Quellen aufgehalten hat. Dies und vor allem der Vergleich mit Humanstudie I bei der in einer kontrollierten Umgebung mit minimierter exogener Acrolein-Exposition keine erhöhte HPMA- und CEMA-Ausscheidung beobachtet wurde, lässt vermuten, dass eine hohe HPMA- und CEMA-Ausscheidungen wahrscheinlich auf eine nicht-alimentäre exogene Acrolein-Exposition zurückzuführen ist.

Abschätzung der Acrolein-Exposition

Die Acrolein-Exposition der Probanden wurde basierend auf der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA abgeschätzt. Die Abschätzung der Exposition erfolgte unter Verwendung verschiedener Annahmen bezüglich der prozentualen Acrolein-Ausscheidung als HPMA und CEMA analog zu Humanstudie I. Die entsprechend abgeschätzten mittleren Acrolein-Expositionshöhen der Probanden aus Humanstudie II sind in Tabelle 27 angegeben.

Zum einen wurde entsprechend der SKLM-Stellungnahme (2012) bzw. der Veröffentlichung von Abraham *et al.* (2011) eine 50%ige Ausscheidung von Acrolein als HPMA angenommen. Mit dieser Annahme ergab sich eine mittlere Acrolein-Exposition der Probanden von 267 µg/d bzw. 4,0 µg/kg KG/d. Die Acrolein-Exposition von Gemischtköstlern und Veganern unterschied sich nicht signifikant. Für die mittlere Acrolein-Exposition von männlichen und weiblichen Probanden ergab sich nach Bezug auf das Körpergewicht (3,8 vs. 4,2 µg/kg KG/d) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Die abgeleitete mittlere Acrolein-Exposition der Probanden aus Humanstudie II lag etwas über der mit derselben Annahme abgeleiteten mittleren Exposition der Probanden aus Humanstudie I (2,9 µg/kg KG/d) und dem Median der Exposition von Nichtrauchern (2,1 bzw. 2,4 µg/kg KG/d), welcher von Abraham *et al.* (2011) ebenfalls unter der derselben Annahme abgeleitet wurde.

Zum anderen erfolgte ebenfalls analog zur Stellungnahme der SKLM (2012) auch eine Abschätzung der Acrolein-Exposition unter Annahme einer 20%ige Ausscheidung von Acrolein als HPMA. Diese prozentuale Ausscheidung wurde von der SKLM analog zu Studienergebnissen aus Untersuchungen an Nagern gewählt. Die entsprechend ermittelte mittlere Acrolein-Exposition der Probanden der Humanstudie II lag bei 668 µg/d bzw. 10,1 µg/kg KG/d. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab sich nur für die körpergewichtsbezogene Acrolein-Exposition von männlichen und weiblichen Probanden (9,6 vs. 10,5 µg/kg KG/d). Die mittlere Acrolein-Exposition der Probanden aus Humanstudie II lag über der mit der selben Annahme ermittelten mittleren Acrolein-Exposition der Probanden aus Humanstudie I (7,2 µg/kg KG/d) und im Bereich der durch die SKLM abgeschätzten Exposition von Nichtrauchern (5 - 24 µg/kg KG/d) (SKLM, 2012).

Als letzte Annahme wurde von einer Acrylamid-Ausscheidung von 26 % als HPMA und CEMA ausgegangen. Diese Annahme basierte auf einer Humanstudie mit einem männlichen Probanden, in der eine orale Acrolein-Aufnahme von 7,5 µg/kg KG erfolgte (Watzek *et al.*, 2012b). Die entsprechend abgeschätzte mittlere Acrolein-Exposition der Probanden (siehe Tabelle 27) lag bei 666 µg/d bzw. 10,1 µg/kg KG/d. Diese abgeschätzte Acrolein-Exposition war vergleichbar mit der unter Annahme einer 20%igen Acrolein-Ausscheidung als HPMA abgeschätzten Exposition.

Der Vergleich der mittleren Acrolein-Exposition der Probanden (je nach Annahme: 4,0 - 10,1 µg/g KG) mit der mittleren täglichen Acrylamid-Aufnahme von Erwachsene in Europa (0,4 - 0,9 µg/kg KG, EFSA (2015a)) ergab eine 4- bis 25-fach höhere Acrolein- als Acrylamid-Exposition.

Tabelle 27: Abgeschätzte mittlere Acrolein-Exposition der Probanden (n = 20) auf Basis der HPMA- und CEMA-Ausscheidung der Probanden (Humanstudie II)

Mittlere Acrolein-Exposition							
unter Annahme einer Acrolein-Ausscheidung innerhalb von 24 Stunden von							
		50 % als HPMA		20 % als HPMA		26 % als HPMA + CEMA	
	n	[µg/d]	[µg/kg KG/d]	[µg/d]	[µg/kg KG/d]	[µg/d]	[µg/kg KG/d]
Gesamt	20	267	4,0	668	10,1	666	10,1
Gemischtköstler	10	231	3,4	578	8,6	571	8,4
Veganer	10	303	4,6	758	11,5	762	11,7
♂	10	297	3,8	742	9,6	739	9,7
♀	10	237	4,2	594	10,5	597	10,5

CEMA: N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, n: Anzahl der Probanden

5 Zusammenfassung

Als hitzeinduzierte Kontaminanten entstehen Acrylamid und Acrolein während der thermischen Herstellung und Zubereitung von Lebensmitteln (SKLM, 2012). Der Hauptbildungsweg von Acrylamid in Lebensmitteln ist die Bildung aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren im Rahmen der Maillard-Reaktion (Mottram *et al.*, 2002). Die höchsten Acrylamid-Gehalte finden sich dementsprechend in hochoverhitzten Kartoffelprodukten wie Chips oder Pommes frites und in Getreideprodukten wie Knäcke-
brot oder Lebkuchen (EFSA, 2015a). Acrolein wurde in hohen Konzentrationen vor allem in erhitzten Fetten und Ölen quantifiziert (Granvogl, 2014). Als zugrundeliegender Bildungsmechanismus wurde eine Acrolein-Bildung ausgehend von ungesättigten Fettsäure-Resten von Triacylglyceride nachgewiesen. In geringen Mengen kann Acrolein ebenfalls aus dem Glycerin-Grundgerüst von Triacylglyceriden gebildet werden (Ewert *et al.*, 2014).

Sowohl Acrylamid als auch Acrolein besitzen eine hohe toxikologische Relevanz. Acrylamid zeigte in Tierversuchen kanzerogene, neurotoxische und reproduktionstoxische Wirkungen und ist von der IARC als „möglicherweise krebserzeugend beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft (IARC, 1994). Acrolein ist eine akut toxische Verbindung, deren TDI bei 7,5 µg/kg KG/d liegt (WHO, 2002). Aufgrund der derzeitigen Datenlage ist Acrolein nicht als Humankarzinogen klassifizierbar (Gruppe 3) (IARC, 1995).

Eine umfassende Risikobewertung, welche eine genaue Expositionsabschätzung beinhaltet, ist für beide Verbindungen von höchster Priorität. Zum einen kann eine Abschätzung der Exposition durch ein Umwelt- bzw. Lebensmittelmonitoring, welches auf einer Bestimmung der Acrylamid-Gehalte basiert, erfolgen. Zum anderen kann die Exposition auch mittels Humanbiomonitoring, bei dem die Bestimmung von Biomarkern wie Mercaptursäuren in Urin erfolgt, abgeschätzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuntägige Duplikatstudie (Humanstudie I) mit 14 männlichen Probanden durchgeführt, um die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Biomarker der alimentären Acrylamid-Exposition zu etablieren. Die Humanstudie wurde in einer kontrollierten Umgebung unter Ausschluss von unerwünschten exogenen Acrylamid-Expositionsquellen durchgeführt. Sie beinhaltete mehrere Tage (*Washout*-Phasen), während denen von den Probanden ein Acrylamid-minimierter Ernährungsplan befolgt wurde, der nicht erhitzte und geringfügig erhitzte Lebensmittel (≤ 100 °C) enthielt, sowie zwei Tage (Tag 4, *medium AA* und Tag 7, *high AA*), an denen der Ernährungsplan hochoverhitzte Lebensmittel (> 100 °C) in unterschiedlichen Mengen beinhaltete.

Die Acrylamid-Bestimmung in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten ergab für die nicht erhitzten oder geringfügig erhitzten Lebensmittel Acrylamid-Gehalte $< 2,1$ µg/kg. Der Verzehr dieser Lebensmittel während der *Washout*-Phasen resultierte in einer maximalen täglichen Acrylamid-Aufnahme der Probanden von 1,8 - 2,6 µg/d (0,02 - 0,04 µg/kg KG/d). In den hochoverhitzten Lebensmitteln, welche an Tag 4 (*medium AA*) und Tag 7 (*high AA*) verzehrt wurden, wurden Acrylamid-Gehalte von bis zu 333 µg/kg (Kartoffelchips) quantifiziert. Die tägliche alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probanden lag an Tag 4 bei 54 µg (0,6 - 0,9 µg/kg KG) und an Tag 7 bei 108 µg (1,3 - 1,8 µg/kg KG). Die Acrylamid-Aufnahme an Tag 4 lag im Bereich der mittleren täglichen Acrylamid-Aufnahme von Erwachsenen in Europa (0,4 - 0,9 µg/kg KG/d) und die Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 spiegelte das 95. Perzentil der täglichen Exposition von Erwachsenen in Europa (0,6 - 2,0 µg/kg KG/d) wider (EFSA, 2015a).

Neben der Acrylamid-Bestimmung in den verzehrfertigen Duplikat-Mahlzeiten erfolgte die Bestimmung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Urin der Probanden. Nach mittlerer alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 54 μg (0,6 - 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) an Tag 4 wurden 30 % (24 h), 46 % (48 h) bzw. 58 % (72 h) des aufgenommenen Acrylamids als AAMA und 4 % (24 h), 7 % (48 h) bzw. 10 % (72 h) als GAMA ausgeschieden. Die hohe Acrylamid-Aufnahme von 108 μg (1,3 - 1,8 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) an Tag 7 resultierte in einer Ausscheidung von 27 % (24 h), 50 % (48 h) bzw. 58 % (72 h) des aufgenommenen Acrylamids als AAMA und 3 % (24 h), 6 % (48 h) bzw. 7 % (72 h) als GAMA. Die prozentuale Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA waren somit nach mittlerer und hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme vergleichbar. Ebenfalls waren sie vergleichbar zur prozentualen Ausscheidung, welche nach Acrylamid-Aufnahme durch Kartoffelchips-Verzehr (Fuhr *et al.*, 2006; Watzek, 2012) oder durch Gabe der isopenmarkierten Reinsubstanz (Fennell und Friedman, 2005; Boettcher *et al.*, 2006; Fennell *et al.*, 2006; Kopp und Dekant, 2009; EFSA, 2015a) bestimmt wurden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA geeignete Biomarker einer alimentären Acrylamid-Aufnahme (0,6 - 1,8 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) darstellen.

Zusätzlich zur prozentualen Acrylamid-Ausscheidung als AAMA und GAMA wurde die Ausscheidungskinetik der Mercaptursäuren nach mittlerer und hoher alimentären Acrylamid-Aufnahme ermittelt. Nach der mittleren Acrylamid-Aufnahme an Tag 4 (0,6 - 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) stieg die AAMA-Konzentration von $0,05 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (C_{washout}) auf ein C_{max} von $0,15 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (t_{max} : 8 - 12 h) und die GAMA-Konzentration von $0,01 \pm 0,005 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (C_{washout}) auf ein C_{max} von $0,02 \pm 0,003 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (t_{max} : 12 - 24 h). Die AUC lag bei $0,58 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin \times 4 h für AAMA und bei $0,01 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin \times 4 h für GAMA. Die hohe Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 (1,3 - 1,8 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) resultierte in einem C_{max} von $0,29 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (t_{max} : 24 - 28 h) für AAMA. Das C_{max} von GAMA lag bei $0,03 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin (t_{max} : 24 - 28 h). Für AAMA ergab sich eine AUC von $1,72 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin \times 4 h und für GAMA von $0,12 \mu\text{mol}/\text{g}$ Kreatinin \times 4 h. C_{max} , t_{max} und die AUC waren somit an Tag 7 erhöht verglichen zu Tag 4. Die doppelt so hohe Acrylamid-Aufnahme an Tag 7 verglichen zu Tag 4 resultierte in einem circa doppelt so hohem C_{max} . Dass C_{max} an Tag 7 später erreicht wurde als an Tag 4, war darauf zurückzuführen, dass die Hauptaufnahme von Acrylamid über Kartoffelchips erfolgte, welche am Ende des Tages zwischen 20:00 und 21:00 Uhr (12 - 13 h) verzehrt wurden.

Die Acrylamid-minimierte Ernährung während der *Washout*-Phasen führte zu einer Abnahme der Ausscheidung von AAMA und GAMA. Allerdings lag die Mercaptursäure-Ausscheidung nach der initialen dreitägigen *Washout*-Phase noch deutlich über der ermittelten Acrylamid-Aufnahme. An Tag 3 wurde nach Abzug der alimentären Acrylamid-Aufnahmemenge ein Basislevel der AAMA-Ausscheidung bestimmt, welches einer theoretischen Acrylamid-Aufnahme von 19,9 $\mu\text{g}/\text{d}$ (0,2 - 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) entspricht. Im Rahmen von Humanstudie I konnte nicht geklärt werden, ob das beobachtete Basislevel auf einer endogenen Acrylamid-Bildung basierte oder ob es auf eine exogene Acrylamid-Aufnahme vor Studienbeginn zurückzuführen war. Hinweise darauf, dass es sich um ein endogen bedingtes Basislevel handelt, finden sich in einer Rattenstudie in der nach Gabe eines Acrylamid-minimierten Futters (< LOD) über zwei Wochen ebenfalls ein Basislevel der AAMA- und GAMA-Ausscheidung beobachtet wurde, welches nicht auf die Acrylamid-Aufnahme aus dem Futter zurückzuführen war (Watzek *et al.*, 2012a). Um das Vorliegen des Basislevels zu bestätigen und um genauere Informationen zum zugrunde-

liegenden Mechanismus zu erhalten wurde basierend auf der im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Humanstudie I eine weitere Humanstudie geplant und durchgeführt. Diese Nachfolgestudie beinhaltete längere *Washout*-Perioden sowie die Gabe von isotoopenmarkiertem Acrylamid. Sie bestätigte das Vorliegen eines Basislevel der AAMA- und GAMA-Ausscheidung und unterstützt die Hypothese, dass dieses Basislevel vermutlich auf einer endogenen Bildung basiert (Goempel *et al.*, 2017).

In den Urinproben aus Humanstudie I wurden zusätzlich zu den Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA die Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA bestimmt. Die Ausscheidung von HPMA und CEMA war über den gesamten Studienzeitraum konstant und unabhängig von der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln an Tag 4 und Tag 7. Sie war um ein 6- (*high AA*) bis 19-faches (*washout*) höher als die AAMA- und GAMA-Ausscheidung. Eine mögliche Erklärung für diese konstante und vergleichsweise hohe HPMA- und CEMA-Ausscheidung könnte eine kontinuierliche Acrolein-Freisetzung aus exogen aufgenommenem und an Nahrungsbestandteile oder Verbindungen im Körper gebundenem Acrolein sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen dieser Arbeit Modelluntersuchungen mit dem Acrolein-Cystein-Addukt *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-L-cystein (OPMA) und den Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA durchgeführt. Diese Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Bindung von Acrolein an SH-Gruppen von zum Beispiel Cystein unter physiologischen Bedingungen reversibel sein kann. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine kontinuierliche Acrolein-Freisetzung zur konstanten HPMA- und CEMA-Ausscheidung beigetragen haben könnte. Ebenfalls ist es jedoch auch möglich, dass eine endogene Bildung von Acrolein und/oder HPMA und CEMA zur erfassten konstanten HPMA- und CEMA-Ausscheidung geführt hat. Eine endogene Acrolein-Bildung wurde bisher aus Threonin mittels Myeloperoxidase (Anderson *et al.*, 1997), aus Spermin und Spermidin mittels Aminooxidase (Lee und Sayre, 1998), im Rahmen der Lipidperoxidation (Uchida *et al.*, 1998) sowie aus Glycerin mittels Glycerin-/Dioldehydratase (Engels *et al.*, 2016) postuliert.

Zusätzlich zu den Urinproben aus Humanstudie I wurden auch Urinproben aus einer weiteren Duplikatstudie (Humanstudie II) auf ihre HPMA- und CEMA-Gehalte hin untersucht. Bei Humanstudie II handelte es sich um eine zehntägige Humanstudie mit 20 Probanden, von denen zehn Gemischtköstler (5 ♂, 5 ♀) und zehn Veganer (5 ♂, 5 ♀) waren. Alle Probanden behielten während der Studie ihre Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bei. Unter diesen Studienbedingungen zeigten sich für einige Probanden (Gemischtköstler sowie Veganer) eine konstante HPMA- und CEMA-Ausscheidung vergleichbar zu der der Probanden aus Humanstudie I. Andere Probanden (Gemischtköstler sowie Veganer) wiesen jedoch an einigen Tagen höhere HPMA- und CEMA-Ausscheidungen auf. Da die Humanstudie II anders als Humanstudie I nicht in einer kontrollierten Umgebung unter Ausschluss von unerwünschten exogenen Acrolein-Expositionsquellen durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass nicht-alimentäre exogene Expositionsquellen einen Einfluss auf die Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA hatten. Durch einen Fragebogen wurde ermittelt, ob und an welchen Tagen sich die Probanden während Humanstudie II in der Nähe von Acrolein-Quellen wie Feuer, Grillrauch, Zigarettenrauch oder Autoabgasen aufgehalten hatten. Die Auswertung der Fragebögen und der Vergleich mit der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren zeigte, dass es sich bei einigen Tagen mit hoher HPMA- und CEMA-Ausscheidung ebenfalls um Tage handelte, an denen sich die entsprechenden Probanden in der Nähe von exogenen Acrolein-Quellen aufgehalten hatten. Dies und vor allem der Vergleich mit Humanstudie I bei der in einer kontrollierten Umgebung mit minimierter exogener

Acrolein-Exposition keine erhöhte HPMA- und CEMA-Ausscheidung beobachtet wurde, lässt vermuten, dass hohe HPMA- und CEMA-Ausscheidungen wahrscheinlich auf nicht-alimentäre exogene Acrolein-Expositionen zurückzuführen waren. Die wichtigste exogene Acrolein-Quelle stellt Rauch, insbesondere Zigarettenrauch, dar. Um den Einfluss dieser Expositionsquelle auf die Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA zu untersuchen wäre eine zusätzliche Bestimmung von z. B. der Acrylnitril-Mercaptursäure oder des Nikotin-Metaboliten Cotinin als Biomarkern der allgemeinen Rauch- bzw. Zigarettenrauch-Exposition, sinnvoll. Eine derartige Analyse könnte im Urin der Probanden nachgeholt werden bzw. in das Design zukünftiger Studien integriert werden um den Ursprung der beobachteten HPMA- und CEMA-Ausscheidung weiter aufzuklären.

Die mittlere Acrolein-Exposition der Probanden der Humanstudie I und der Humanstudie II wurde basierend auf Ausscheidung der Biomarker HPMA und CEMA abgeschätzt. Sie lag für die Probanden der Humanstudie I je nach angenommener prozentualer Acrolein-Ausscheidung als HPMA und CEMA bei 2,9 - 7,4 µg/kg KG/d und für die Probanden der Humanstudie II bei 4,0 - 10,1 µg/kg KG/d. Zwischen Gemischtköstlern und Veganern (Humanstudie II) ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der errechneten Acrolein-Exposition. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab sich für die ermittelte körperlsgewichtsbezogene Acrolein-Exposition von männlichen und weiblichen Probanden. Die abgeschätzte Acrolein-Exposition der Probanden aus Humanstudie I und Humanstudie II lag im Bereich der durch die SKLM (2012) abgeschätzten Acrolein-Exposition von Nichtrauchern (5 - 24 µg/kg KG/d). Sie war höher als die Acrylamid-Exposition der Probanden der Humanstudie I (Tag 4: 0,6 - 0,9 µg/kg KG/d; Tag 7: 1,3 - 1,8 µg/kg KG/d) sowie höher als die von der EFSA (2015a) abgeschätzten mittleren Acrylamid-Exposition von Erwachsenen in Europa (0,4 - 0,9 µg/kg KG/d).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Rahmen dieser Arbeit als Biomarker der alimentären Acrylamid-Exposition etabliert werden konnten. Des Weiteren zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA und der Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln. Es wurde jedoch ein Einfluss von nicht-alimentären exogenen Acrolein-Expositionsquellen auf die HPMA- und CEMA-Ausscheidung nachgewiesen. Zusätzlich dazu lieferte diese Arbeit Hinweise auf das Vorliegen eines Basislevels der AAMA- und GAMA- sowie HPMA- und CEMA-Ausscheidung. Für die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA gab die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertete Humanstudie I den Anlass zu einer Folgestudie (Goempel *et al.*, 2017). Diese bestätigte das Vorliegen eines AAMA- und GAMA-Basislevel und fundierte, die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass dieses Basislevel vermutlich auf einer endogenen Bildung basiert.

6 Materialien

6.1 Geräte

Tabelle 28: Geräteliste mit Herstellern / Lieferanten

Gerät	Hersteller / Lieferant
Gefrier- und Kühlschränke	
Liebherr Comfort, -21° C	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Liebherr Comfort, 1°C	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
HPLC-MS/MS I	
HPLC: Serie 1200	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<ul style="list-style-type: none"> • 1200 Degasser G1379B • 1200 Bin Pump SL G1315C • 1200 FC/ALS Therm G1330B • 1200 Hip-ALS SL G1367C • 1200 TCC SL G1316B 	
MS/MS: API 3200	AB Sciex, Framingham, USA
HPLC-MS/MS II	
HPLC: Serie 1290 Infinity	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<ul style="list-style-type: none"> • 1290 Bin Pump G4220A • 1290 Thermostat G1330B • 1290 Sampler G4226A • 1290 TCC G1316C 	
MS/MS: QTRAP 5500	AB Sciex, Framingham, USA
Labor-Gasbrenner nach Bunsen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Pipetten	
Manuelle Pipetten (Research®, 10 - 5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektronische Pipette (Research® pro, 5 - 100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette (Multipette® plus)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Platten-Reader	
Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten (Synergy 2)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Platten-Schüttler	
Kreis-Schüttler 3015	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
SPE-Kammer (Visiprep™)	Sigma-Aldrich Co. LLC (Supelco), St. Louis, USA
Vakuumpumpe	
Vaccumbrand CVC 3000	VWR International LLC, Radnor, USA
SP 402 SA-V	Schwarzer Precision GmbH + Co KG, Essen, Deutschland
Vakuumentrifuge	
Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer	
Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Tabelle 28 (Fortsetzung): Geräteliste mit Herstellern / Lieferanten

Gerät	Hersteller / Lieferant
Waagen	
CP224S (Feinwaage)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Exellence Plus (Ultrafeinwaage)	Mettler-Toledo LLC., Columbus, USA
1507 (Feinwaage)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	
WNB 45	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	
Zentrifuge für Reaktionsgefäße (5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für Zentrifugenröhrchen (5804R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

6.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 29: Verbrauchsmaterialien mit Herstellern / Lieferanten

Verbrauchsmaterial	Hersteller / Lieferant
Diaphragma (Laboratory Film Parafilm® "M")	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Dünnschichtchromatographieplatte	
Kieselgel 60 mit Fluoreszenz Indikator UV240	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einwegspritze (Omnifix® 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einwegkanüle (0,60 x 0,60 mm, 23G x 2 3/8")	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Filterpapier (3 hm. 65 g/m ² , 90 mm)	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
HPLC-Säulen	
Luna C8 (2), 150 x 4,6 mm; 3 µm	Phenomenex, Torrance, USA
Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 µm	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
HPLC-Vials (32 mm x 11,6 mm)	Buddeberg GmbH, Mannheim, Deutschland
HPLC-Vial-Schraubkappen (9 mm, PP, 6 mm Loch)	Buddeberg GmbH, Mannheim, Deutschland
HPLC-Vorsäulen	
Luna C8 (2); 4 mm x 3 mm	Phenomenex, Torrance, USA
Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 5 mm, 1,8 µm	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Inserts für HPLC-Vials	Wagner & Munz GmbH, München, Deutschland
Pipettenspitzen	
Ultratip; 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000µl	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Combitips advanced® 1 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Siedesteine	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
SPE-Kartuschen	
Isolute® ENV+; 100 mg, 10 ml	Biotage AB, Uppsala, Schweden
Isolute® ENV+; 500 mg, 6 ml	Biotage AB, Uppsala, Schweden

Tabelle 29 (Fortsetzung): Verbrauchsmaterialien mit Herstellern / Lieferanten

Verbrauchsmaterial	Hersteller / Lieferant
96-Well-Microplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

6.3 Chemikalien

Tabelle 30: Chemikalienliste mit Herstellern / Lieferanten

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade HPLC Optigrade®, LC-MS	VWR International LLC, Radnor, USA Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
Acrolein	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Acrylamid (99,5%)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Ameisensäure (p.a. ≥ 98%)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Argon	L'AIR LIQUIDE S.A., Paris, Frankreich
Bromthymolblau	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
D₃-Acrylamid (98,8 atom% D)	C/D/N Isotopes, Pointe-Claire, USA
D₆-DMSO	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Acetic acid glacial ULC/MS)	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Ethylacetat (Analytical reagent grade)	Fisher Scientific, New Hampshire, USA
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumjodid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Kreatinin-Assay-Kit (colorimetrisch, für Urinproben) Kreatinin-Standard-Lösung (20 mg/dl) Farbreagenz Natriumhydroxid-Lösung (1 M) Säure-Lösung Natriumborat-Lösung Tensid-Lösung	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Mercaptursäuren	
AMMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
D₃-AAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-ethyl-d ₃)-L-cystein	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
GAMA-Salz <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, Dicyclohexylammonium-Salz	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada

Tabelle 30 (Fortsetzung): Chemikalienliste mit Herstellern / Lieferanten

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Mercaptursäuren	
D₃-GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl-d ₃)-L-cystein	Synthese von Watzek <i>et al.</i> (2012b)
HPMA-Salz <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)-cystein, Dicyclohexylammonium-Salz	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
D₃-HPMA-Salz <i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)cystein, Dicyclohexylammonium-Salz	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
CEMA-Salz <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein, Bis(dicyclohexylamin)-Salz	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
D₃-CEMA-Salz <i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein, Bis(dicyclohexylamin)-Salz	Synthese von Watzek <i>et al.</i> (2012b)
Methanol	
HPLC-Gradient Grade	Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
Optigrade®, LC-MS	Prom Chem Ltd, Edenbridge, Großbritannien
<i>N</i>-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Natriumcarbonat-Decahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Lösung (0,1 M)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>p</i>-Anisaldehyd (98%)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Stärke	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zinksulfat-Heptahydrat	VWR International LLC, Radnor, USA
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA

7 Methoden

7.1 Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln

Dieses Kapitel beinhaltet bereits publizierte Inhalte aus Ruenz et al. (2016). Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung von Springer Nature (siehe S. 292).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln mittels SIVA. Zur Probenvorbereitung wurde eine Wasserextraktion und SPE angewandt (siehe Kapitel 7.1.1). Die Vermessung der Proben erfolgte mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS (siehe Kapitel 7.1.2). Alle Bestimmungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.1.1 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte nach Watzek *et al.* (2012a), wobei die Methode geringfügig modifiziert wurde. Je nach erwartetem Acrylamid-Gehalt und je nach Matrixbeschaffenheit wurden 1 - 30 g Probenmaterial eingewogen und D₃-Acrylamid als interner Standard hinzugegeben. Lebensmittelproben, bei denen ein geringer Acrylamid-Gehalt erwartet wurde, wurden 5 µl D₃-Acrylamid-Lösung (50 µg/ml) zugesetzt und bei den Proben, bei denen ein höher Acrylamid-Gehalt erwartet wurde, wurden 20 µl der D₃-Acrylamid-Lösungen (50 µg/ml) zugesetzt. Nach Zugabe des Standards wurden die Lebensmittelproben mit bidestilliertem Wasser auf circa 30 ml aufgefüllt und unter Rühren erfolgte eine Wasserextraktion bei Raumtemperatur. 10 ml des zentrifugierten Überstandes (3000 g, 30 min, bei Raumtemperatur) wurden zur SPE eingesetzt. Die SPE-Kartuschen (Isolute® ENV⁺, 500 mg, 6 ml, Biotage AB) wurden mit 4 ml Methanol konditioniert und mit 2 x 4 ml bidestilliertem Wasser äquilibriert. Nach der Probenaufgabe folgte ein Waschschriff mit 2 x 2 ml bidestilliertem Wasser. Die Elution der Analyten wurde mit 2 ml Methanol (60 %) in 15-ml-Zentrifugenröhrchen durchgeführt und die SPE-Kartuschen wurden abschließend bei gemäßigttem Vakuum (ca. 250 mbar), welches durch eine Vakuumpumpe erzeugt wurde, getrocknet. Je nach zu erwartendem Acrylamid-Gehalt wurde das Eluat an einer Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, Raumtemperatur) auf 500 - 1000 µl eingengt.

7.1.2 Probenvermessung

Zur Vermessung der aufgearbeiteten Proben fanden im Rahmen dieser Arbeit zwei HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methoden (Methode A und Methode B) Anwendung. Beide wurden im Rahmen dieser Arbeit basierend auf einer Methode von Watzek *et al.* (2012a) entwickelt und validiert. Details zur Methodenentwicklung und -validierung finden sich in Kapitel 7.1.2.1 und Kapitel 7.1.2.2. Die HPLC- sowie ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der finalen Methoden sind in Kapitel 7.1.2.3 angegeben und die Kalibriergeraden finden sich in Kapitel 7.1.2.4.

7.1.2.1 Methodenentwicklung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode von Watzek *et al.* (2012a) auf eine andere HPLC-Anlage übertragen und es erfolgte eine Methodenoptimierung zur Verkürzung der Analysenzeit (Methode A). Ebenfalls wurde die Methode zur Erhöhung der Sensitivität auf ein neueres, sensitiveres HPLC-ESI-MS/MS-System übertragen (Methode B).

Methode A

Als HPLC-ESI-MS/MS-System wurde bei der Methode von Watzek *et al.* (2012a) eine HPLC-Anlage der Firma Jasco GmbH (PU-2080, DG-208053, AS-2057) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer der Firma AB Sciex (API 3200) verwendet. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde die Methode auf eine HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Serie 1200) übertragen. Es wurde das gleiche Tandem-Massenspektrometer (AB Sciex, API 3200) wie bei der Methode von Watzek *et al.* (2012a) verwendet.

ESI_{pos}-MS/MS-Methode

Die ESI_{pos}-MS/MS-Methode von Watzek *et al.* (2012a), bei der sich um eine MRM-Methode handelte, wurde überprüft in dem ein substanz- sowie gerätespezifisches Tuning durchgeführt und ESI_{pos}-MS²-Scans von Acrylamid und D₃-Acrylamid erstellt wurden. Die hierzu verwendeten Acrylamid- bzw. D₃-Acrylamid-Lösungen hatten eine Konzentration von 400 ng/ml. Zur Vermessung der ESI_{pos}-MS²-Scans wurde die Spritzenpumpe auf eine Flussrate von 10 µl/min eingestellt.

Der ESI_{pos}-MS²-Scan von Acrylamid (siehe Abbildung 54) zeigt das Molekülion [M+H]⁺ von Acrylamid, welches ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (*m/z*) von 72,1 aufweist, sowie das einzige spezifische Fragmentation mit einem *m/z* von 55,1. Grund dafür, dass nur dieses eine spezifische Fragmentation entstanden, ist die geringen Molekülmasse von Acrylamid. Das entsprechende Fragmentation ist durch Abspaltung der Aminogruppe entstanden. Für D₃-Acrylamid (siehe Abbildung 55) wies das Molekülion [M+H]⁺ entsprechend ein *m/z* von 75,1 und das Fragmentation ein *m/z* von 58,1 auf.

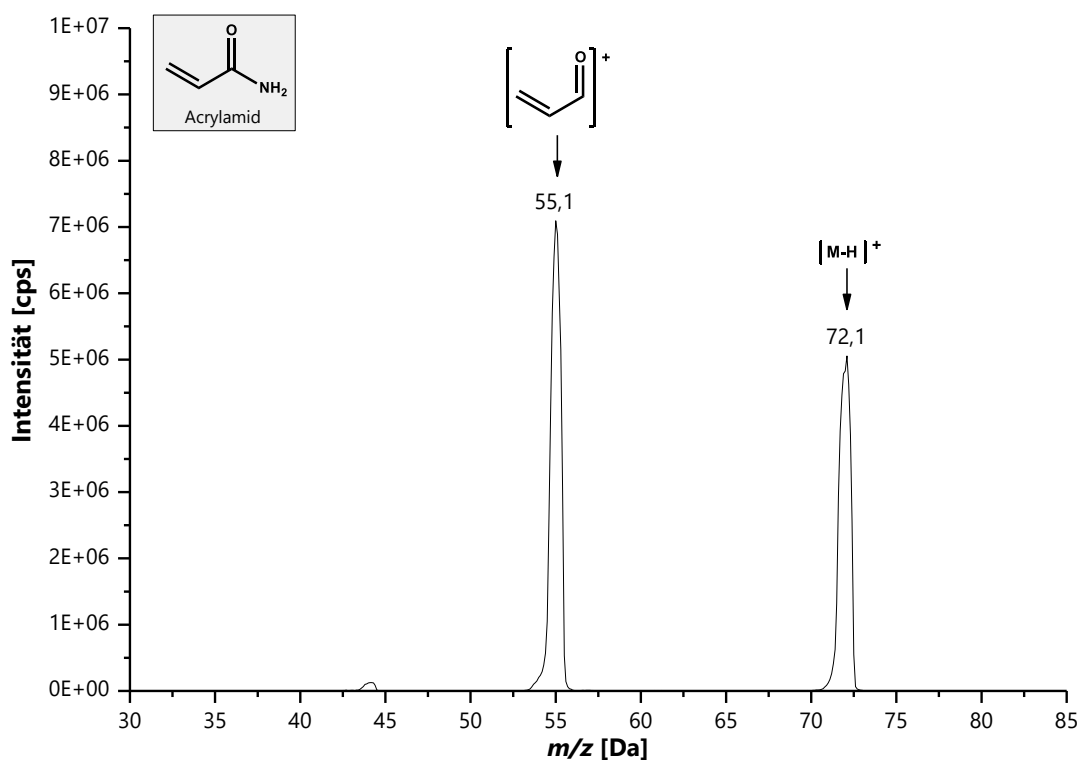


Abbildung 54: ESI_{pos}-MS²-Scan von Acrylamid (400 ng/ml), ESI-MS/MS-System: API 3200, AB Sciex, ESI_{pos}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (siehe Kapitel 7.1.2.3, Tabelle 32), Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

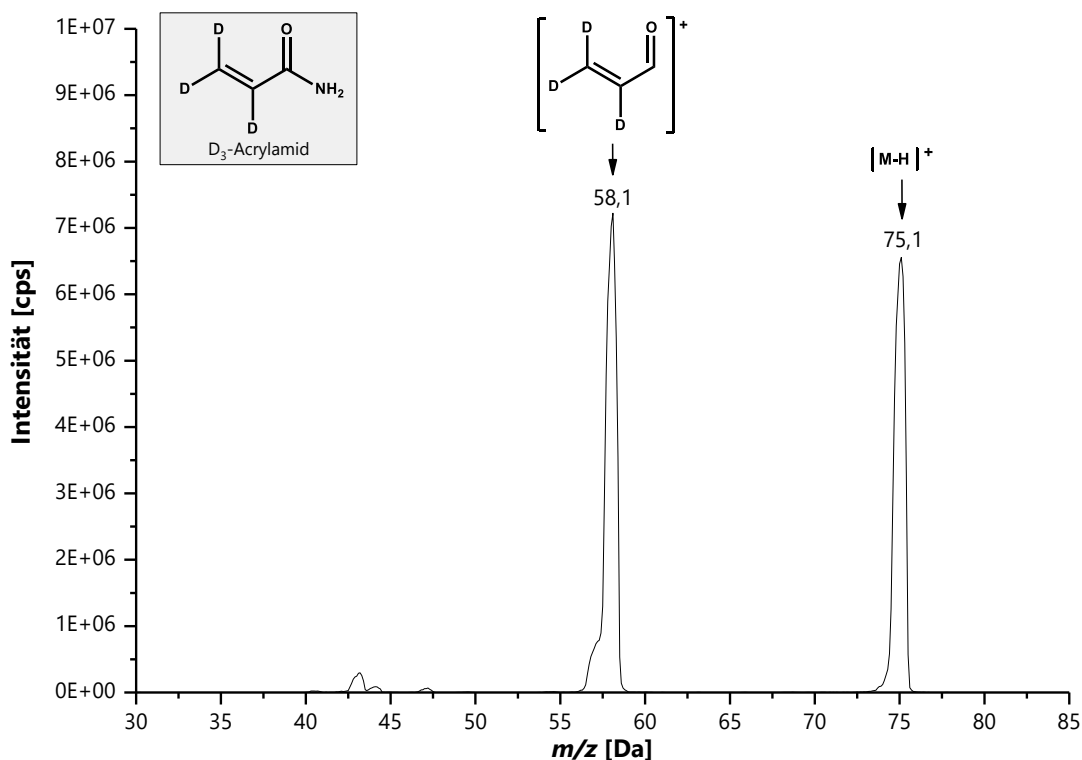


Abbildung 55: ESI_{pos}-MS²-Scan von D₃-Acrylamid (400 ng/ml), ESI-MS/MS-System: API 3200, AB Sciex, ESI_{pos}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (siehe Kapitel 7.1.2.3, Tabelle 32), Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

Die Methodenüberprüfung bestätigte die ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der Methode von Watzek *et al.* (2012a) inklusive der ausgewählten *m/z*-Übergänge von 72,1/55,1 zum Quantifizieren von Acrylamid und von 75,1/58,1 zum Quantifizieren von D₃-Acrylamid. Die ESI_{pos}-MS/MS-Parameter wurden folglich von der Methode von Watzek *et al.* (2012a), übernommen. Sie sind tabellarisch in Kapitel 7.1.2.3 aufgeführt.

HPLC-Methode

Die HPLC-Methode wurde mit dem Ziel optimiert, die Analysenzeit zu verkürzen. Dies gelang, indem die Erhöhung des organischen Anteils in einem kürzen Zeitintervall erfolgte sowie durch eine Verkürzung des Spül- und Äquilierungsschrittes am Ende der Methode. Die Methode konnte mit gleichbleibender Sensitivität von 45 Minuten auf 24 Minuten verkürzt werden. Als Trennsäule wurde wie bei der Methode von Watzek *et al.* (2012a) eine Phenomenex Luna C8(2) verwendet und die Flussrate von 0,5 ml/min wurde beibehalten. Fließmittel A war 0,05%ige Ameisensäure und als Fließmittel B diente Methanol. Zur Äquilierung wurden die Ausgangsbedingungen von 1 % des Fließmittel B für 1 Minute gehalten. Die anschließende Erhöhung des organischen Anteils auf 20 % erfolgte innerhalb von 11 Minuten, somit in einem kürzeren Zeitintervall verglichen zur Methode von Watzek *et al.* (2012a), bei der die Erhöhung des organischen Anteils innerhalb von 19 Minuten erfolgte. Anschließend folgte ein verkürzter 5-minütiger Spülschritt bei 90 % des Fließmittels B und ein ebenfalls verkürzter 5-minütiger Äquilierungsschritt bei den Ausgangsbedingungen von 1 % des Fließmittels B. Unter Verwendung dieser HPLC-Methode lag die Retentionszeit von Acrylamid bei 7,4 Minuten. Eine tabellarische Übersicht der optimierten HPLC-Parameter findet sich in Kapitel 7.1.2.3.

Methode B

Zur Steigerung der Sensitivität wurde Messmethode A auf ein neueres, sensitiveres HPLC-MS/MS-System übertragen. Bei diesem HPLC-ESI-MS/MS-System handelte es sich um eine HPLC-Anlage von Agilent Technologies (Serie 1290 Infinity) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer der Firma AB Sciex (QTRAP 5500).

ESI_{pos}-MS/MS-Methode

Analog zu Methode A wurde bei Methode B eine positive Ionisierung mittels ESI und eine Messung im MRM-Modus angewendet. Zur Ermittlung der ESI_{pos}-MS/MS-Parameter wurde ein geräte- und substanzspezifisches Tuning und entsprechende ESI_{pos}-MS²-Scans durchgeführt. Hierzu wurden Acrylamid- bzw. D₃-Acrylamid-Lösungen mit einer Konzentration von 5 ng/ml verwendet. Zur Vermessung der ESI_{pos}-MS²-Scans wurde die Spritzenpumpe auf eine Flussrate von 10 µl/min eingestellt. Die optimierten ESI_{pos}-MS/MS-Parameter sind in Kapitel 7.1.2.3 angegeben. Die ESI_{pos}-MS²-Scans der Methode B waren vergleichbar zu denen der MS²-Scans der Methode A (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55). Auf eine Abbildung wurde aus diesem Grund verzichtet.

HPLC-Methode

Die HPLC-Parameter wurden an das HPLC-System (Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies) angepasst. Die Flussrate von 0,5 ml/min sowie Methanol als Fließmittel B wurden beibehalten. Als Fließmittel A wurde am sensitiveren HPLC-ESI-MS/MS-System 0,05%ige Essigsäure gewählt. Grund für den Wechsel des wässrigen Fließmittels war die höhere Reinheit der verfügbaren Essigsäure verglichen zur verfügbaren Ameisensäure und die damit verbundene höhere Sensitivität der Methode. Auch bei Messmethode B erfolgte zu Beginn eine Äquilibrierung bei 1 % des Fließmittel B für 1 Minute. Verglichen zu Methode A wurde der organische Anteil anschließend in 11 Minuten auf nur 5 % anstatt auf 20 % erhöht. Der Spülschritt erfolgte ebenfalls über 5 Minuten mit 90 % des Fließmittels B, gefolgt von einem 5-minütigen Äquilibrierungsschritt bei 1 % des Fließmittels B. Unter Verwendung dieser Methode lag die Retentionszeit von Acrylamid lag bei 7,0 Minuten. Eine tabellarische Übersicht über die optimierten HPLC-Parameter findet sich in Kapitel 7.1.2.3.

7.1.2.2 Methodvalidierung

Methode A

Zur Validierung der Methode wurde die Messpräzision ermittelt indem die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt wurden. Hierzu wurde eine Acrylamid-Lösung mit einer Acrylamid- sowie D₃-Acrylamid-Konzentration von 400 ng/ml verwendet. Diese wurde zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität an einem Tag in fünf aufeinanderfolgenden Läufen und zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vermessen. Die Acrylamid-Lösungen wurden über diesen Zeitraum im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C gelagert. Die entsprechend ermittelte Lauf-zu-Lauf-Variabilität lag bei 0,4 % und die Tag-zu-Tag-Variabilität bei 1,6 %.

Der LOD und der LOQ der Methode wurde im Fließmittel sowie in verschiedenen Lebensmittelmatrices ermittelt. Die Bestimmung erfolgte rechnerisch über die Peakhöhen, wobei der LOD als die 3-fache

Peakhöhe des Signal-Rausch-Verhältnisses (*signal-to-noise ratio*, *S/Ns*) und der LOQ als die 10-fache Peakhöhe des *S/Ns* definiert wurde. In Wasser erfolgte ebenfalls eine experimentelle Überprüfung der berechneten LOD- und LOQ-Werte. Hierzu wurden Acrylamid-Lösungen bis zu der Konzentration verdünnt, die bei der Vermessung mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS in einem Peak mit 3-facher (LOD) bzw. 10-facher (LOQ) Peakhöhe verglichen zum *S/N* resultierten. Im Fließmittel lag der absolute LOD bei 2,7 pmol und der absolute LOQ bei 8,8 pmol. Im Lebensmittel lagen der LOD je nach Matrix bei 14 - 33 µg/kg und der LOQ bei 23 - 53 µg/kg. Die einzelnen lebensmittelspezifischen LODs und LOQs sind in Kapitel 4.2.3.1 aufgeführt. In Kapitel 7.1.2.4 findet sich die zur Quantifizierung von Acrylamid verwendete Kalibriergerade, welche zur Geradengleichung $y = 0,707x - 0,062$ führte und ein R^2 von 0,999 aufwies.

Ein Beispiel-Chromatogramm der HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln ist in Abbildung 56 zu sehen. Vermessen wurde eine mittels Wasserextraktion und SPE aufgearbeitete Knäckebrot-Probe (1,82 g), der zu Beginn der Probenaufarbeitung 1,00 µg D₃-Acrylamid als interner Standard zugesetzt wurde (siehe Kapitel 7.1.1). Der ermittelte Acrylamid-Gehalt der Probe lag bei 213 µg/kg Knäckebrot (absolut: 0,39 µg Acrylamid).

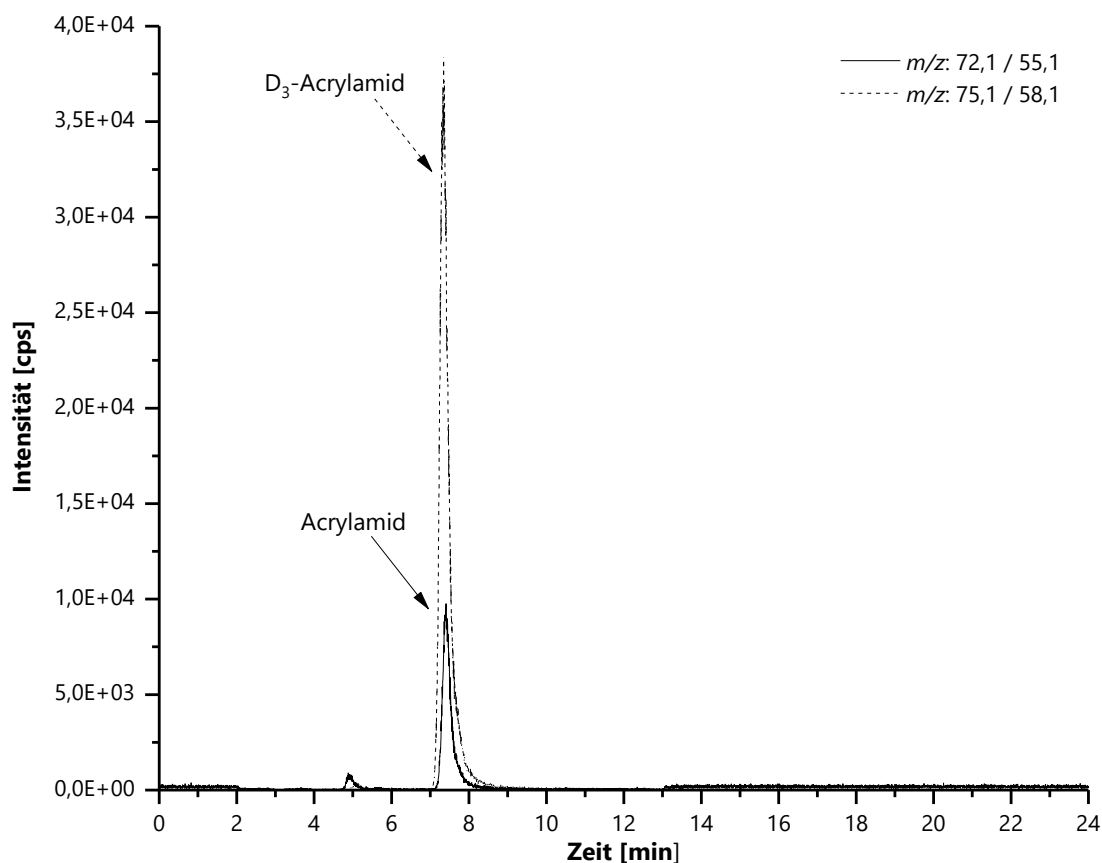


Abbildung 56: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Knäckebrot-Probe (1,82 g Probe, 0,39 µg Acrylamid) mit zugesetztem internem Standard (1,00 µg D₃-Acrylamid), Messmethode: Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (MRM-Methode), HPLC-System: Serie 1200, Agilent Technologies, ESI-MS/MS-System: API 3200, AB Sciex, Messparameter: siehe Kapitel 7.1.2.3, MRM: *multiple reaction monitoring*, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

Method B

Auch für Methode B wurde die Messpräzision bestimmt indem die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität ermittelt wurden. Zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde eine Acrylamid-

Lösung der Kalibriergeraden mit einer Acrylamid-Konzentration von 75 ng/ml und einer D₃-Acrylamid-Konzentration von 200 ng/ml in fünf aufeinander folgenden Läufen vermessen. Dieselbe Lösung wurde zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf verschiedenen Tagen vermessen. Über diesen Zeitraum wurde die Acrylamid-Lösung im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C gelagert. Es ergab sich eine Lauf-zu-Lauf-Variabilität von 0,3 % und eine Tag-zu-Tag-Variabilität von 1,3 %.

Außerdem wurde im Fließmittel und in verschiedenen Lebensmittelmatrices der LOD ($S/N \geq 3$) und der LOQ ($S/N \geq 10$) analog zu Methode A bestimmt. Im Fließmittel ergab sich ein absoluter LOD von 0,05 pmol und ein LOQ von 0,15 pmol. Der LOD in Lebensmitteln lag je nach Matrix bei 0,1 - 0,8 µg/kg und der LOQ bei 0,3 - 2,5 µg/kg. In Kapitel 4.2.3.1 sind die einzelnen lebensmittelspezifischen LODs und LOQs aufgeführt. Die zur Quantifizierung von Acrylamid verwendete Kalibriergerade ist in Kapitel 7.1.2.4 dargestellt und resultiert in einer Geradengleichung von $y = 0,953x$ sowie einem R^2 von 1,000.

Abbildung 57 zeigt ein Chromatogramm der Methode B zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln. Der mittels Wasserextraktion und SPE (siehe Kapitel 7.1.1) aufgearbeiteten Knäckebrot-Probe (0,93 g Probe) wurde zu Beginn der Probenaufarbeitung 0,50 µg D₃-Acrylamid als interner Standard zugesetzt und es wurde ein Acrylamid-Gehalt von 366 µg/kg Knäckebrot (absolut: 0,34 µg Acrylamid) bestimmt.

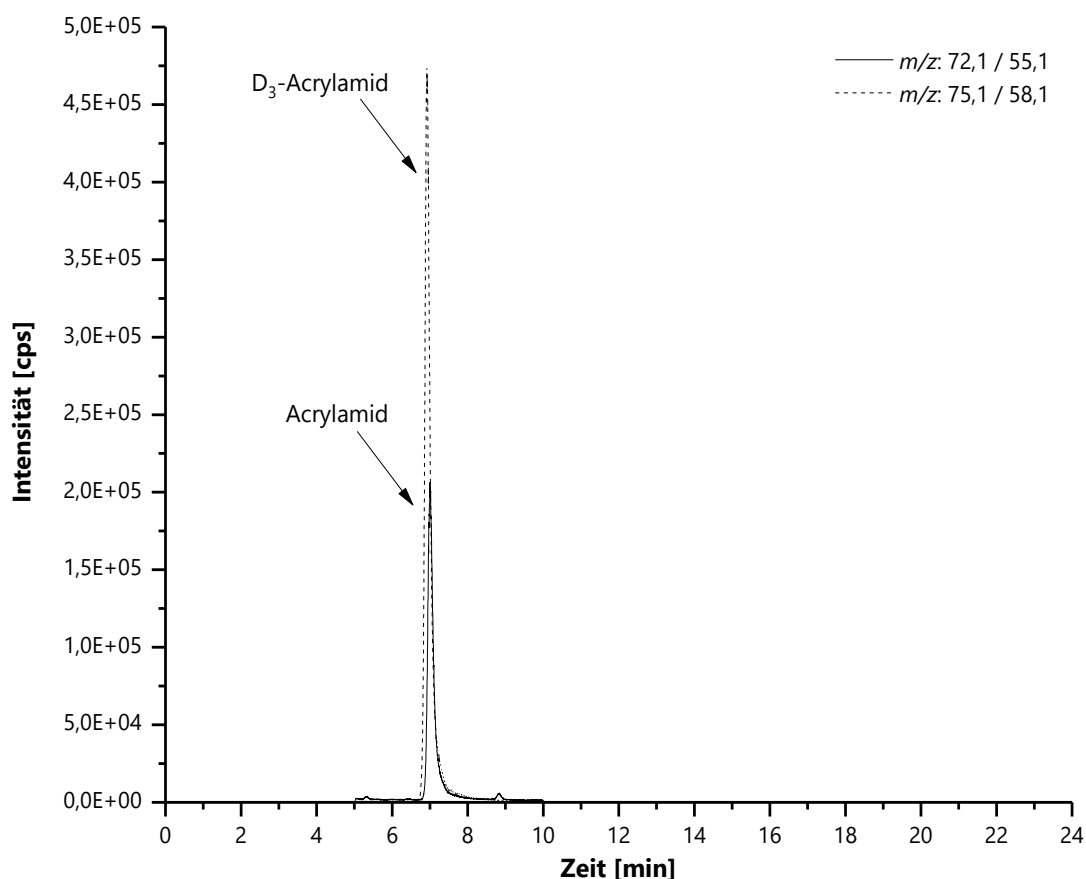


Abbildung 57: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Knäckebrot-Probe (0,93 g Probe, 0,34 µg Acrylamid) mit zugesetztem internem Standard (0,50 µg D₃-Acrylamid), Messmethode: Methode B zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (MRM-Methode), HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies, ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, Messparameter: siehe Kapitel 7.1.2.3, MRM: *multiple reaction monitoring*, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

7.1.2.3 HPLC- und ESI_{pos}-MS/MS-Parameter

Methode A

Methode A wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmittelproben mit erwartungsgemäß hohem Acrylamid-Gehalt verwendet.

Informationen zu Methodenentwicklung und -validierung sind in Kapitel 7.1.2.1 und Kapitel 7.1.2.2 gegeben. Die optimierten HPLC-Parameter finden sich in Tabelle 31 und die optimierten ESI_{pos}-MS/MS-Parameter in Tabelle 32.

Tabelle 31: HPLC-Parameter der Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (HPLC-System: Serie 1200, Agilent Technologies)

Säule	Phenomenex Luna C8(2), 150 mm x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, USA)						
Injektionsvolumen	50 µl						
Flussrate	0,5 ml/min						
Fließmittel A	0,05%ige Ameisensäure						
Fließmittel B	Methanol						
Gradient							
Zeit (min)	0	1	12	13	18	19	24
Fließmittel A (%)	99	99	80	10	10	99	99
Fließmittel B (%)	1	1	20	90	90	1	1

Tabelle 32: ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der Methode A zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (MS/MS-System: API 3200, AB Sciex)

	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CE	CEP	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
AA	72,1	55,1	100	31	5,5	15	14	4	10	5	5500	450	20	40
D₃-AA	75,1	58,1	100	31	5,5	15	14	4	10	5	5500	450	20	40

AA: Acrylamid, CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], CE: Kollisionsenergie [V], CEP: Zelleintrittspotential [V], CUR: Curtain-Gas [psi], CXP: Zellaustrittspotential [V], DP: Declustering-Potential [V], Dwell: Dwell-Zeit [msec], D₃-AA: Acrylamid, EP: Eingangspotential [V], GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], Q1: Quadrupol 1 [m/z], Q3: Quadrupol 3 [m/z], TEM: Temperatur [°C]

Methode B

Methode B wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Vermessung von Lebensmittelproben, in denen kein oder nur geringe Mengen an Acrylamid erwartet wurden, verwendet.

Informationen zu Entwicklung und -validierung der Methode finden sich in Kapitel 7.1.2.1 und Kapitel 7.1.2.2. Die optimierten HPLC-Parameter der Methode B sind in Tabelle 33 und die optimierten ESI_{pos}-MS/MS-Parameter in Tabelle 34 angegeben.

Tabelle 33: HPLC-Parameter der Methode B zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies)

Säule	Phenomenex Luna C8(2), 150 mm x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, USA)						
Injektionsvolumen	5 µl						
Flussrate	0,5 ml/min						
Fließmittel A	0,05%ige Essigsäure						
Fließmittel B	Methanol						
Gradient							
Zeit (min)	0	1	12	13	18	19	24
Fließmittel A (%)	99	99	80	10	10	99	99
Fließmittel B (%)	1	1	5	90	90	1	1

Tabelle 34: ESI_{pos}-MS/MS-Parameter der Methode B zur Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln (ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex)

	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
AA	72,1	55,1	100	36	10	16	15	40	medium	4500	550	70	40
D₃-AA	75,1	58,1	100	36	10	15	7	40	medium	4500	550	70	40

AA: Acrylamid, CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], CE: Kollisionsenergie [V], CUR: Curtain-Gas [psi], CXP: Zellaustrittspotential [V], DP: Declustering-Potential [V], Dwell: Dwell-Zeit [msec], D₃-AA: Acrylamid, EP: Eingangspotential [V], GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], TEM: Temperatur [°C]

7.1.2.4 Kalibriergeraden

Methode A

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid unter Verwendung von Methode A umfasste einen Acrylamid-Konzentrationsbereich von 50 - 900 ng/ml (L1 - L7). Zur Herstellung der Acrylamid-Lösungen wurde eine Stammlösung (SL) mit einer Acrylamid-Konzentration von 1 mg/ml in Methanol angesetzt. Aus dieser SL wurde durch zweifaches Verdünnen (1:10, 1:50) mit bidestilliertem Wasser die Zwischenverdünnung I (ZV I) mit einer Acrylamid-Konzentration von 2000 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:20) mit bidestilliertem Wasser die Zwischenverdünnung II (ZV II) mit einer Acrylamid-Konzentration von 100 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 35 angegebenen Pipettierschemas die Acrylamid-Lösungen (L1 - L7) hergestellt. Jeder dieser Acrylamid-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-Acrylamid-Lösung (2000 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-Acrylamid in allen Acrylamid-Lösungen (L1 - L7) bei 200 ng/ml lag.

Die Vermessung der Acrylamid-Lösungen L1 - L7 resultierte in einer Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,707x - 0,026$ mit einem R² von 0,999. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 36. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 58.

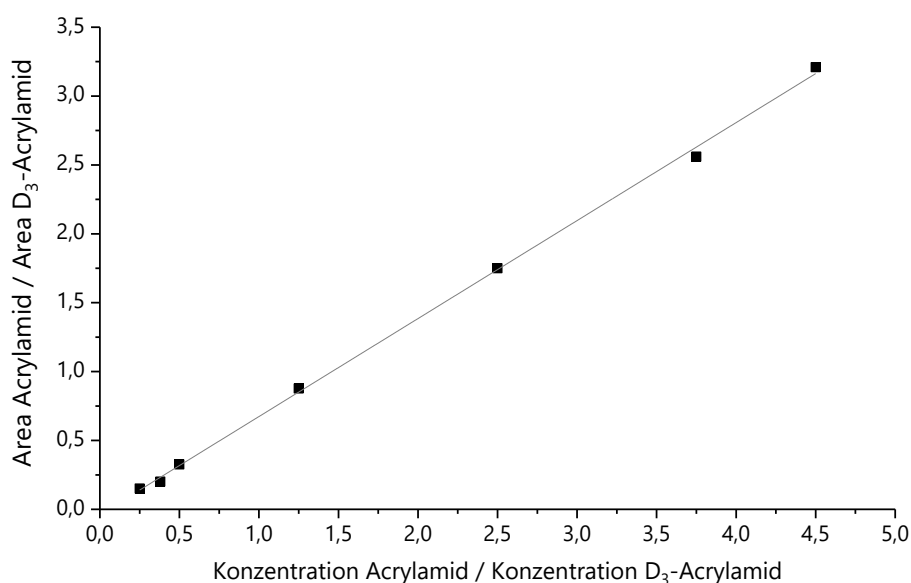
Tabelle 35: Pipettierschema zur Herstellung der Acrylamid-Lösungen L1 - L7 (Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln, Methode A)

Acrylamid-Lösung	ZV I Acrylamid (2000 ng/ml) [µl]	ZV II Acrylamid (100 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -Acrylamid (2000 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel bidestilliertes Wasser [µl]	Acrylamid- Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	500	100	400	50
L2	0	750	100	150	75
L3	50	0	100	850	100
L4	125	0	100	775	250
L5	250	0	100	650	500
L6	375	0	100	525	750
L7	450	0	100	450	900

L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 2000 ng/ml Acrylamid in bidestilliertem Wasser, ZV II: 100 ng/ml Acrylamid in bidestilliertem Wasser

Tabelle 36: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln (Methode A)

Acrylamid		D ₃ -Acrylamid		Acrylamid/D ₃ -Acrylamid	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
50	1,06E+04	200	7,03E+04	0,25	1,51E-01
75	1,39E+04	200	6,90E+04	0,38	2,01E-01
100	2,21E+04	200	6,78E+04	0,50	3,26E-01
250	5,83E+04	200	6,65E+04	1,25	8,77E-01
500	1,12E+05	200	6,40E+04	2,50	1,75E+00
750	1,68E+05	200	6,55E+04	3,75	2,56E+00
900	2,08E+05	200	6,50E+04	4,50	3,21E+00

**Abbildung 58:** Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln (Methode A), Geradengleichung: $y = 0,707x - 0,026$, $R^2 = 0,999$

Methode B

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid unter Verwendung von Methode B umfasste einen geringeren Acrylamid-Konzentrationsbereich (5 - 250 ng/ml (L1 - L6)) als die Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid unter Verwendung von Methode A. Zur Herstellung der Acrylamid-Lösungen wurde eine SL mit einer Acrylamid-Konzentration von 1 mg/ml in Methanol angesetzt. Aus dieser SL wurde durch zweifaches Verdünnen (1:10, 1:50) mit bidestilliertem Wasser die ZV I mit einer Acrylamid-Konzentration von 2000 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:20) mit bidestilliertem Wasser die ZV II mit einer Acrylamid-Konzentration von 100 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 37 angegebenen Pipettierschemas die Acrylamid-Lösungen (L1 - L6) hergestellt. Jeder dieser Acrylamid-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-Acrylamid-Lösung (2000 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-Acrylamid in allen Acrylamid-Lösungen (L1 - L6) bei 200 ng/ml lag.

Die Vermessung der Acrylamid-Lösungen L1 - L6 resultierte in einer Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,953x$ mit einem R² von 0,999. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 38. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 59.

Tabelle 37: Pipettierschema zur Herstellung der Acrylamid-Lösungen L1 - L6 (Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln, Methode B)

Acrylamid-Lösung	ZV I Acrylamid (2000 ng/ml) [µl]	ZV II Acrylamid (100 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -Acrylamid (2000 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel bidestilliertes Wasser [µl]	Acrylamid- Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	50	100	850	5
L2	0	100	100	800	10
L3	0	250	100	650	25
L4	0	750	100	150	75
L5	65	0	100	835	130
L6	125	0	100	775	250

L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 2000 ng/ml Acrylamid in bidestilliertem Wasser, ZV II: 100 ng/ml Acrylamid in bidestilliertem Wasser

Tabelle 38: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln (Methode B)

Acrylamid Konzentration [ng/ml]	Area	D₃-Acrylamid Konzentration [ng/ml]	Area	Acrylamid/D₃-Acrylamid Konzentration	Area
5	1,57E+05	200	6,51E+06	0,025	2,41E-02
10	3,18E+05	200	6,55E+06	0,05	4,86E-02
25	8,09E+05	200	6,58E+06	0,125	1,23E-01
75	2,41E+06	200	6,72E+06	0,375	3,59E-01
130	5,97E+06	200	9,90E+06	0,65	6,04E-01
250	8,02E+06	200	6,69E+06	1,25	1,20E+00

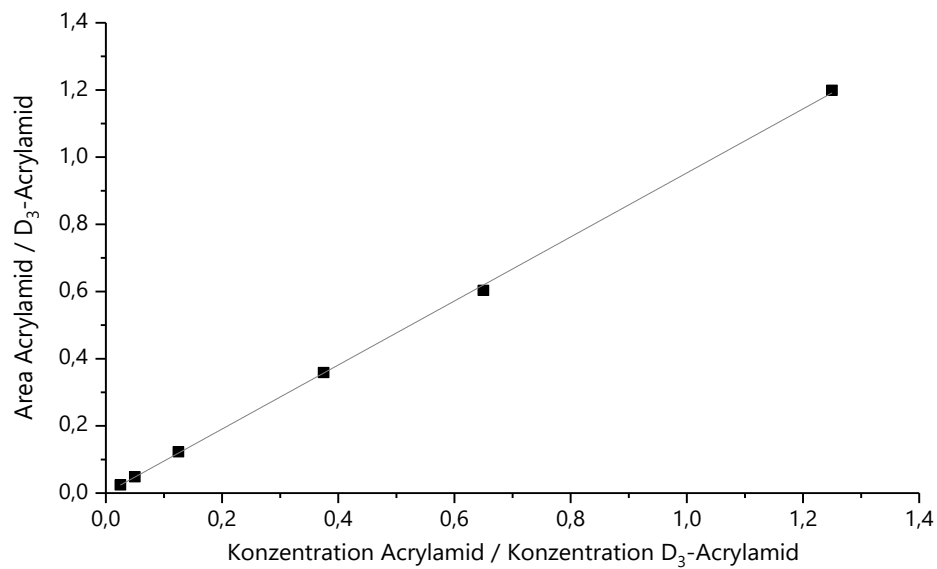


Abbildung 59: Kalibriergerade zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln (Methode B), Geradengleichung: $y = 0,953x$, $R^2 = 1,000$

7.2 Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin

Die verwendeten Methoden zur Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren (AAMA, GAMA, HPMA und CEMA) in Urin stellen eine Erweiterung der Methoden zur Bestimmung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) in Urin dar, welche bereits in der Zeitschrift *Archives of Toxicology* publiziert sind (Ruenz et al., 2016; Goempel et al., 2017). Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung von Springer Nature bzw. durch Creative Commons Attribution 4.0 International License (siehe S. 290).

Die Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin erfolgte mittels SIVA. Es erfolgte eine Probenaufarbeitung mittels SPE (siehe Kapitel 7.2.1) und eine Vermessung der Proben mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS (siehe Kapitel 7.2.2). Es wurden Dreifach- (Humanstudie I) bzw. Zweifachbestimmungen (Humanstudie II) durchgeführt.

7.2.1 Probenaufarbeitung

Zur Probenaufarbeitung fanden jeweils zwei geringfügig abweichende Methoden (Methode C und Methode D) Anwendung. Die Abweichung basierte vor allem darauf, dass unterschiedlichen Konzentrationen an internen Standards zugesetzt wurden sowie auf einer abweichenden Verdünnung der SPE-Eluate, welche zur Vermessung mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS verwendet wurde. Beide Methoden basieren auf einer Methode von Watzek et al. (2012b), welche geringfügig modifiziert wurde. Methode C wurde zur Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in den Urinproben aus Humanstudie I verwendet. Methode D fand Anwendung zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in den Urinproben aus Humanstudie II.

Methode C

Zu 2 ml Urin wurden 140 µl isopenmarkierter Standardmix (D₃-AAMA: 40 µl; 10 µg/ml, D₃-GAMA: 40 µl; 10 µg/ml, D₃-HPMA: 50 µl; 10 µg/ml, D₃-CEMA: 10 µl; 10 µg/ml) gegeben. Anschließend erfolgte die pH-Werteinstellung auf 2,5. Dazu wurden 6 ml Ammonium-Puffer (50 mM, pH 2,5) zur Urinprobe geben und HCl (4N) zugegeben bis ein pH-Wert von 2,5 ± 0,5 erreicht war. Für die SPE wurden die SPE-Kartuschen (Isolute® ENV⁺, 100 mg, 10 ml, Biotage AB) zuerst mit 2 x 2 ml Methanol konditioniert und anschließend mit 2 x 2 ml bidestilliertem Wasser sowie mit 2 x 2 ml Salzsäure (pH 2,5) äquilibriert. Die Aufgabe der vorbereiteten gevortexten Probe auf die SPE-Kartusche erfolgte in zwei Schritten (2 x ca. 4 ml). Anschließend wurde die Kartusche mit 2 ml Salzsäure (pH 2,5) und 1 ml eines Salzsäure-Methanol-Gemisches (90:10, pH 2,5) gewaschen. Nach Trocknen bei gemäßigttem Vakuum (ca. 250 mbar), welches durch eine Vakuumpumpe erzeugt wurde, erfolgte die Elution mit 1,85 ml eines Methanol-Ameisensäure-Gemisches (99:1, pH 2,5) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß. Das Eluat wurde an einer Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, Raumtemperatur) auf circa 100 µl eingengt und mit 0,1%iger Essigsäure auf 300 µl aufgefüllt.

Methode D

Zu 1 ml Urin wurden 37,5 µl eines isopenmarkierten Standardmixes (D₃-AAMA: 10 µl; 10 µg/ml, D₃-GAMA: 2,5 µl; 10 µg/ml, D₃-HPMA: 20 µl; 10 µg/ml, D₃-CEMA: 5 µl; 10 µg/ml) zugesetzt und

anschließend der pH-Wert auf 2,5 eingestellt. Dazu wurden 3 ml Ammonium-Puffer (50 mM, pH 2,5) zur Urinprobe geben und HCl (4N) zugegeben bis ein pH-Wert von $2,5 \pm 0,5$ erreicht war. Die Konditionierung der SPE-Kartuschen (Isolute® ENV+, 100 mg, 10 ml, Biotage AB) erfolgte mit 4 ml Methanol und die anschließende Äquilibrierung mit 4 ml bidestilliertem Wasser sowie mit 4 ml Salzsäure (pH 2,5). Nach der Aufgabe der vorbereiteten gevortexten Probe (ca. 4 ml) wurde die SPE-Kartusche mit 2 ml Salzsäure (pH 2,5) und 1 ml eines Salzsäure-Methanol-Gemisches (90:10, pH 2,5) gewaschen. Anschließend wurde die Kartusche bei gemäßigttem Vakuum (ca. 250 mbar), welches durch eine Vakuumpumpe erzeugt wurde, getrocknet und es erfolgte die Elution mit 1,85 ml eines Methanol-Ameisensäure-Gemisches (99:1, pH 2,5) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß. Das Eluat wurde an der Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, Raumtemperatur) auf circa 100 µl eingengt, mit 0,1%iger Essigsäure auf 2000 µl aufgefüllt und nochmals 1:4 verdünnt, indem zu 200 µl des mit 0,1%iger Essigsäure aufgefüllten Eluats weiter 600 µl 0,1%ige Essigsäure gegeben wurden.

7.2.2 Probenvermessung

Die Vermessung der aufgearbeiteten Proben erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von zwei HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methoden (Methode C und Methode D). Methode C wurden im Rahmen dieser Arbeit basierend auf einer Methode von Watzek *et al.* (2012b) entwickelt und validiert. Details zur Methodenentwicklung und -validierung finden sich in Kapitel 7.2.2.1 und Kapitel 7.2.2.2. Methode C wurde zur Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in den Urinproben aus Humanstudie I verwendet. Methode D wurde von Katharina Gömpel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Elke Richling in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern basierend auf Methode C entwickelt und validiert. Methode D fand Anwendung zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in den Urinproben aus Humanstudie II. Die verwendeten HPLC- und ESI_{neg}-MS/MS-Parameter beider Methoden sind in Kapitel 7.2.2.3 angegeben und die Kalibriergeraden finden sich in Kapitel 7.2.2.4.

7.2.2.1 Methodenentwicklung

Methode C

Die Methode von Watzek *et al.* (2012b) wurde im Rahmen dieser Arbeit auf ein sensitiveres HPLC-ESI-MS/MS-System übertragen. Bei der Methode von Watzek *et al.* (2012b) wurde eine HPLC-Anlage der Firma Jasco GmbH (PU-2080, DG-208053, AS-2057) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer der Firma AB Sciex (API 3200) verwendet. Diese Methode wurde auf ein HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Serie 1290 Infinity) gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer der Firma AB Sciex (QTRAP 5500) übertragen.

ESI_{neg}-MS/MS-Methode

Die Methode C basiert wie die Methode von Watzek *et al.* (2012b) auf einer negativen Ionisierung mittels ESI und eine anschließende Messung im MRM-Modus. Zur Methodenübertragung wurde ein geräte- sowie substanzspezifisches Tuning durchgeführt. Hierzu wurden Mercaptursäure- bzw. D₃-Mercaptursäure-Lösungen mit einer Konzentration von 10, 20 und 30 ng/ml verwendet. Das Tuning wurde mit der

geringsten Konzentration begonnen. Bei zu geringer Konzentration wurde die nächste höhere Konzentration verwendet. Die optimierten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter befinden sich in Kapitel 7.2.2.3.

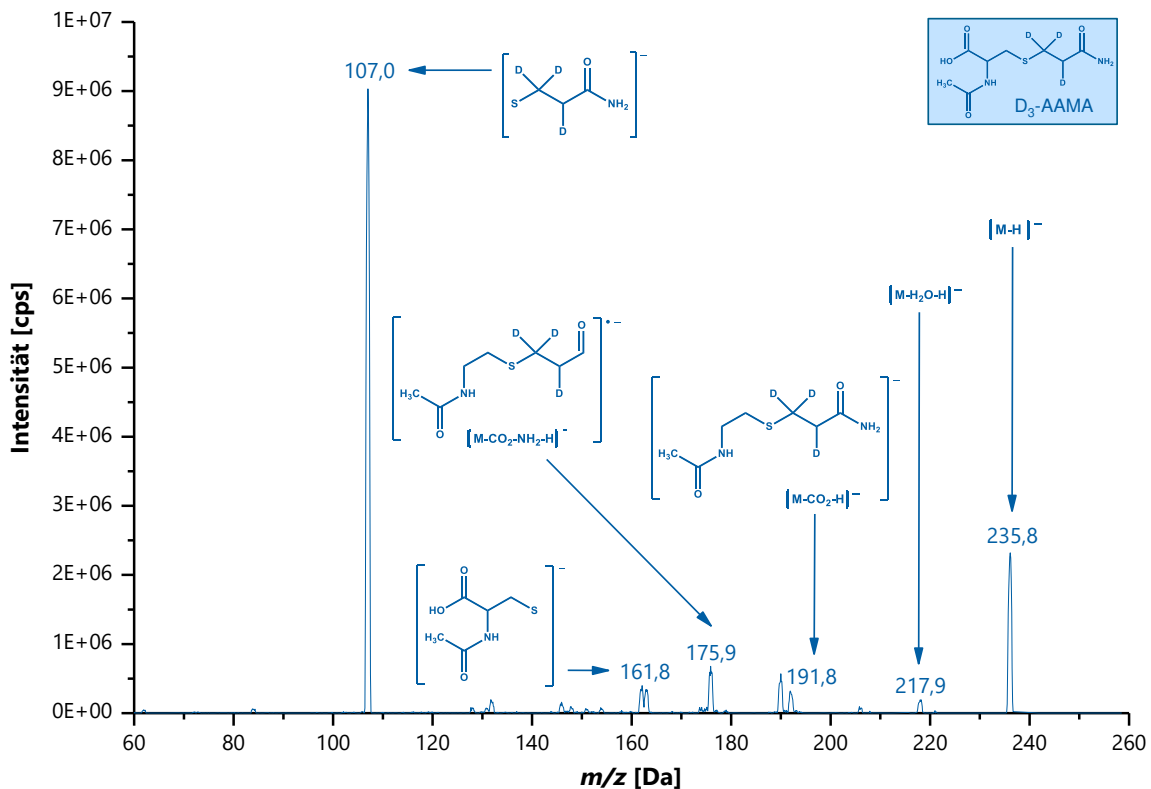
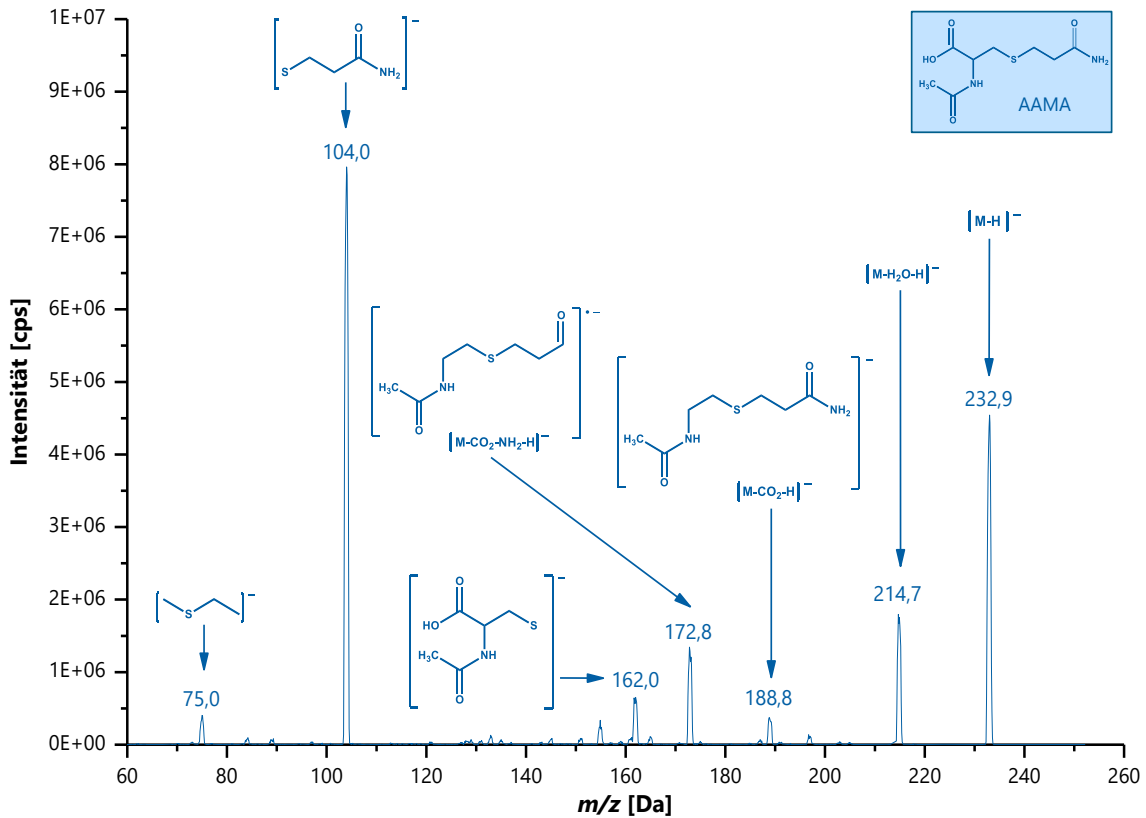
Zur Überprüfung der MRM-Ionenspuren wurde unter Verwendung der optimierten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter (siehe Tabelle 40 in Kapitel 7.2.2.3) und einer Scanrate von 200 Da/s ESI_{neg}-MS²-Scans aufgenommen. Es wurde eine Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 10 µl/min verwendet und die Mercaptursäure- bzw. D₃-Mercaptursäure-Lösungen wiesen eine Konzentration von 50 ng/ml auf. Die erhaltenen ESI_{neg}-MS²-Scans sind in Abbildung 60 bis Abbildung 67 gegeben.

Der ESI_{neg}-MS²-Scan von AAMA (Abbildung 60) zeigt das Molekülion [M-H]⁻ von AAMA mit einem m/z von 232,9 sowie mehrere Fragmentionen. Das Fragmention mit einem m/z von 104,0, welches durch Abspaltung von *N*-Acetylcystein entstanden ist, wies die höchste Intensität auf und der resultierende MRM-Übergang von m/z 232,9/104,0 wurde zur Quantifizierung gewählt. Für D₃-AAMA (Abbildung 61) war das m/z des Molekülion [M-H]⁻ mit 235,8 und das m/z des entsprechenden Fragmentions mit 107,0 aufgrund der Isotopenmarkierung um drei höher als das von AAMA. Der resultierende MRM-Übergang für D₃-AAMA war somit m/z 235,8/107,0.

Das Molekülion [M-H]⁻ von GAMA (Abbildung 62) wies ein m/z von 248,9 auf und das von D₃-GAMA (Abbildung 63) ein m/z von 252,0. Für GAMA hatte das Fragmention mit einem m/z von 120,0, welches durch Abspaltung von *N*-Acetylcystein entstanden ist, die höchste Intensität. Die entsprechende Ionenspur von m/z 248,9/120,0 wurde als MRM-Übergang zur Quantifizierung ausgewählt. Für D₃-GAMA wurde analog das isotopenmarkierte Fragmention mit einem m/z von 123,0 gewählt. Als MRM-Übergang ergab sich somit für D₃-GAMA m/z 252,0/123,0.

Abbildung 64 zeigt den ESI_{neg}-MS²-Scan von HPMA mit einem Molekülion [M-H]⁻, welches ein m/z von 219,9 aufwies. Analog dazu ergab sich aus dem ESI_{neg}-MS²-Scan von D₃-HPMA (Abbildung 65) für das Molekülion [M-H]⁻ ein m/z von 222,9. Als Fragmention mit der höchsten Intensität wurde sowohl bei HPMA als auch bei D₃-HPMA ein Fragmention mit einem m/z von 91,0 identifiziert. Zur Bildung des Fragmentions kam es durch Abspaltung von *N*-Acetylcystein von HPMA bzw. D₃-HPMA. Dass sowohl aus HPMA als auch aus D₃-HPMA das gleiche Fragmention (m/z 91,0) gebildet wurde, liegt daran, dass D₃-HPMA an der CH₃-Gruppe des *N*-Acetylcystein-Restes isotopenmarkiert war, die während des Fragmentierungsprozesses abgespalten wurde. Der MRM-Übergang für HPMA war somit m/z 219,9/91,0 und der MRM-Übergang für D₃-HPMA m/z 222,9/91,0.

Der ESI_{neg}-MS²-Scan von CEMA, welcher in Abbildung 66 dargestellt ist, zeigt, dass das Molekülion [M-H]⁻ von CEMA ein m/z von 233,8 aufwies. Das Fragmention mit einem m/z von 105,0, welches durch Abspaltung von *N*-Acetylcystein entstanden ist, wies die höchste Intensität auf und wurde als Quantifizier-Fragmention ausgewählt. Es ergab sich ein MRM-Übergang für CEMA von m/z 233,8/105,0. Verglichen zum ESI_{neg}-MS²-Scan von CEMA ergab sich aus dem ESI_{neg}-MS²-Scan von D₃-CEMA (Abbildung 67) für das [M-H]⁻ ein um drei erhöhtes m/z von 236,8. Das Fragmention mit der höchsten Intensität entsprach dem von CEMA, da die Isotopenmarkierung bei der Fragmention-Bildung abgespalten wurde. Der MRM-Übergang von D₃-CEMA war somit m/z 236,8/105,0.



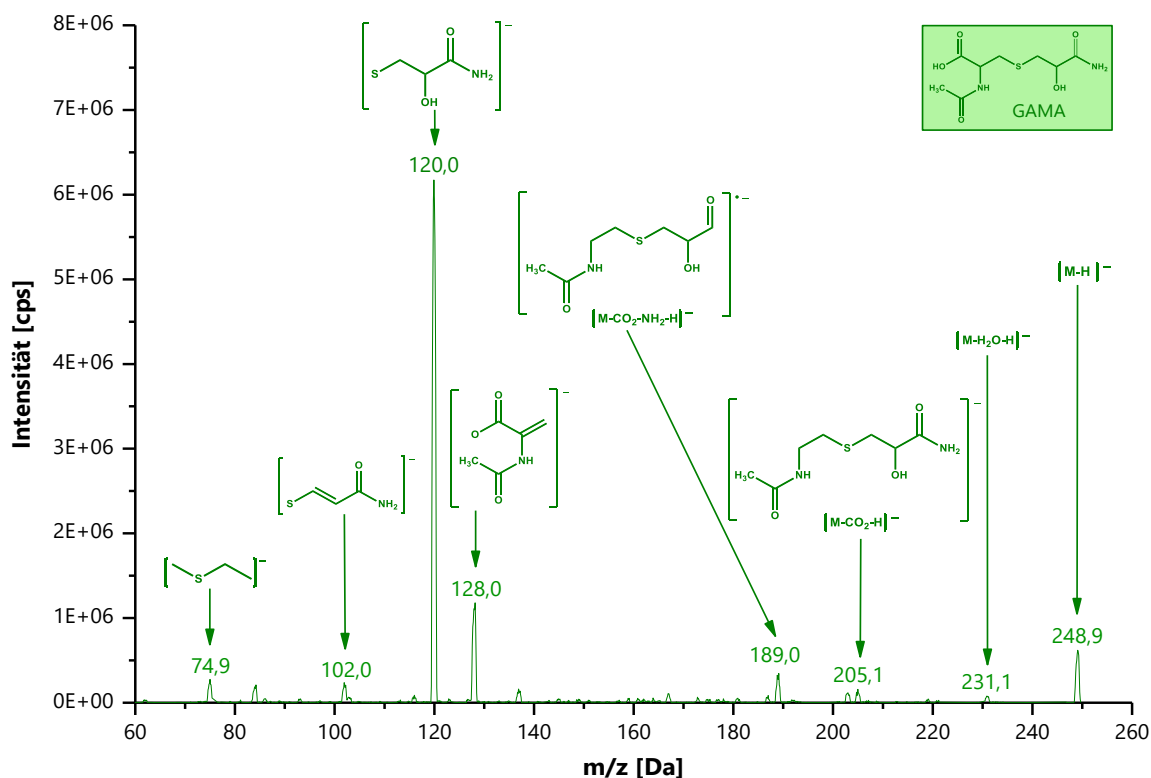


Abbildung 62: ESI_{neg}-MS²-Scan von GAMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

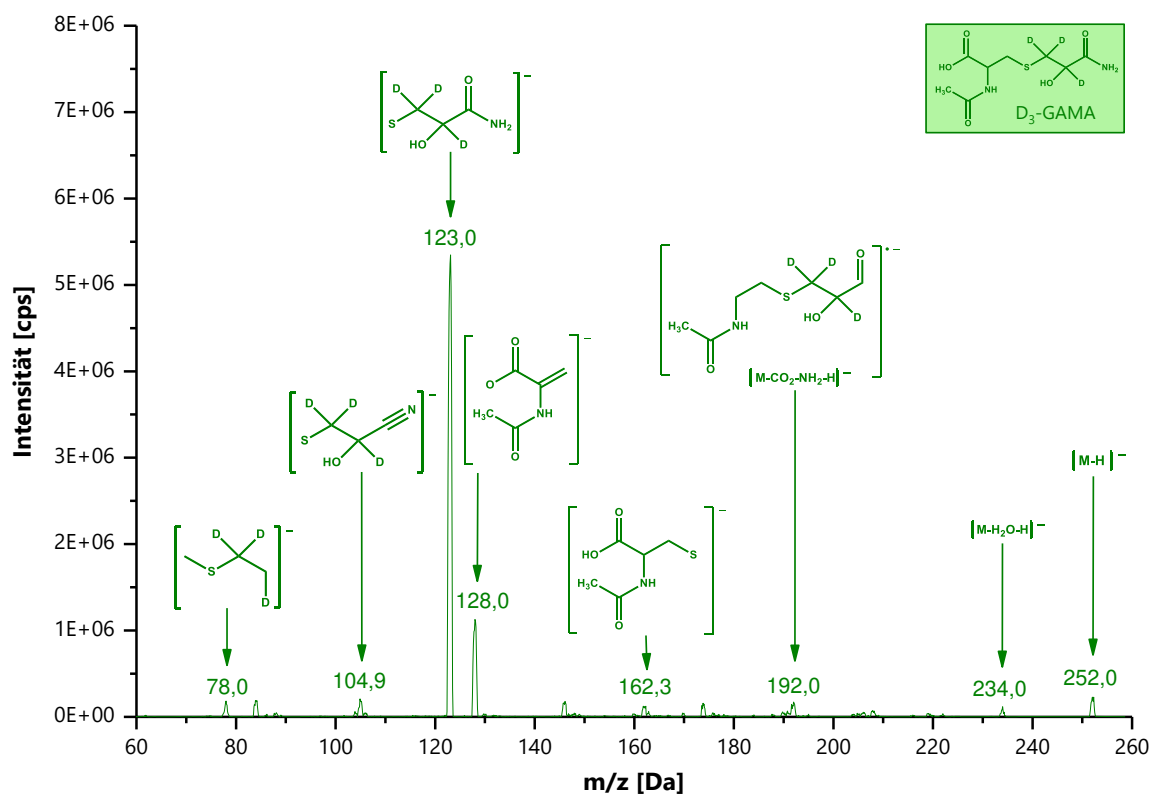


Abbildung 63: ESI_{neg}-MS²-Scan von D₃-GAMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), D₃-GAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

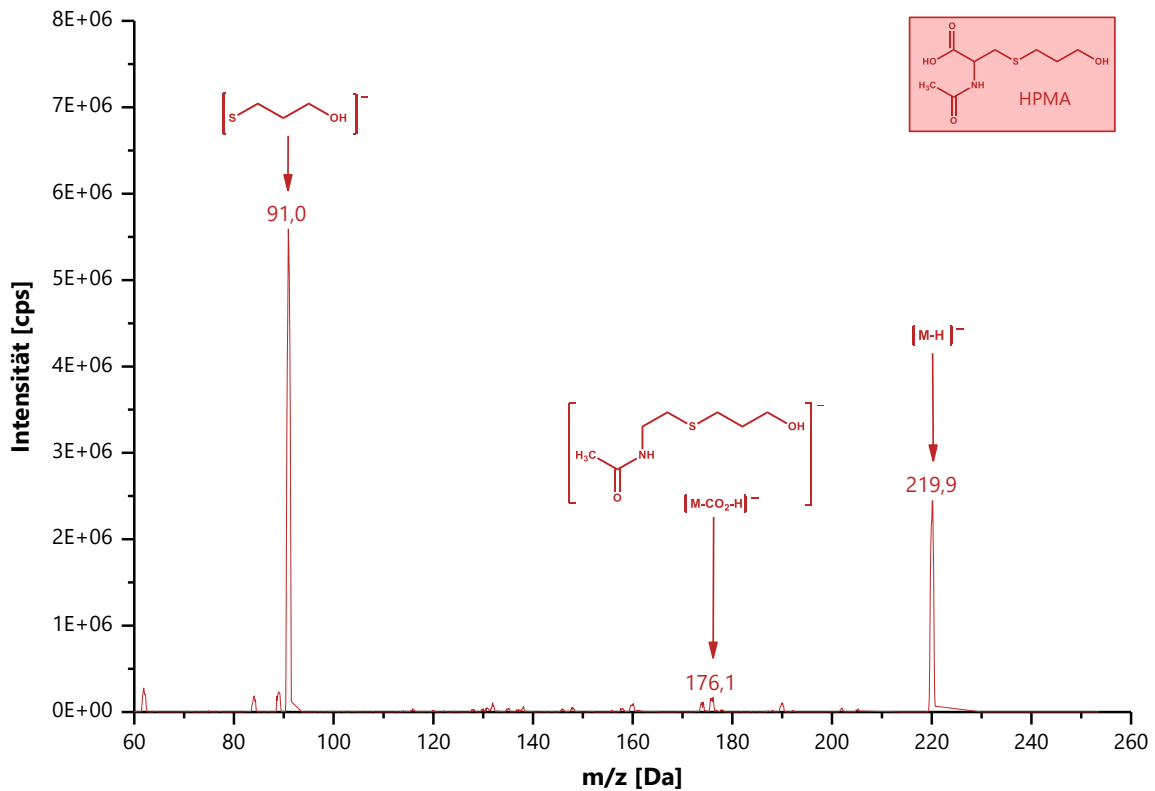


Abbildung 64: ESI_{neg}-MS²-Scan von HPMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

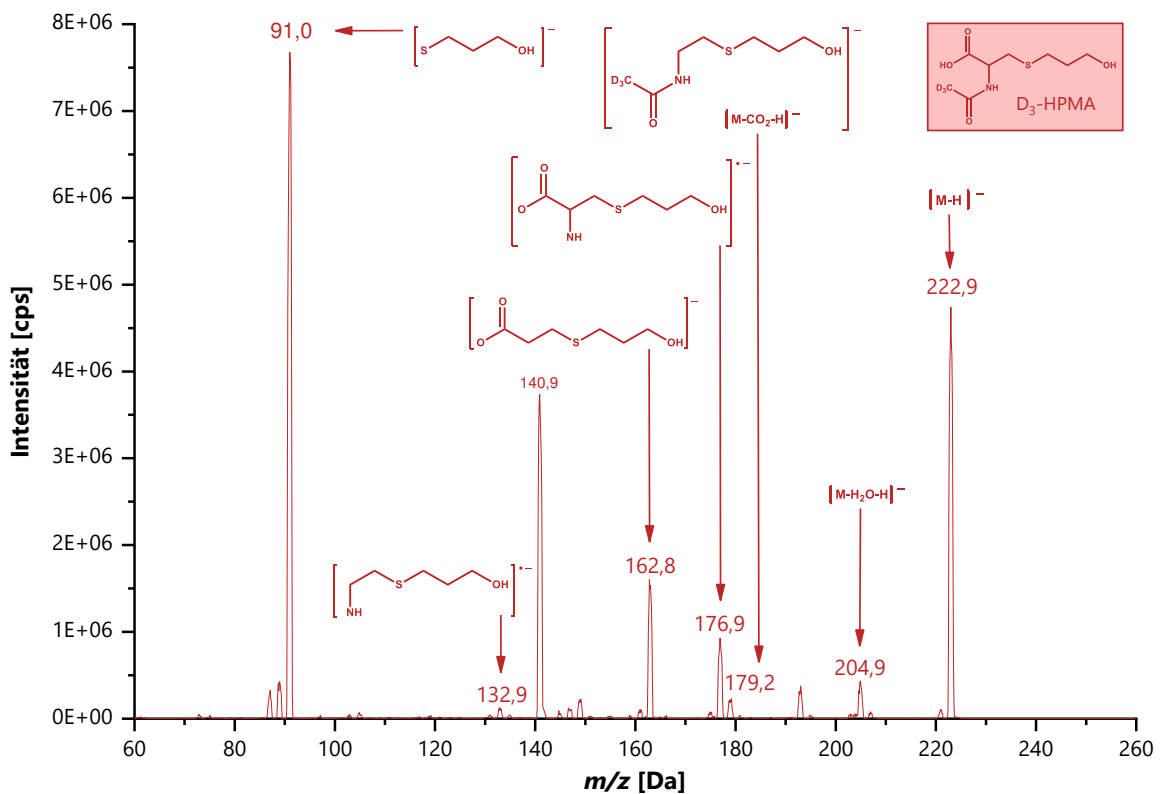


Abbildung 65: ESI_{neg}-MS²-Scan von D₃-HPMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), D₃-HPMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

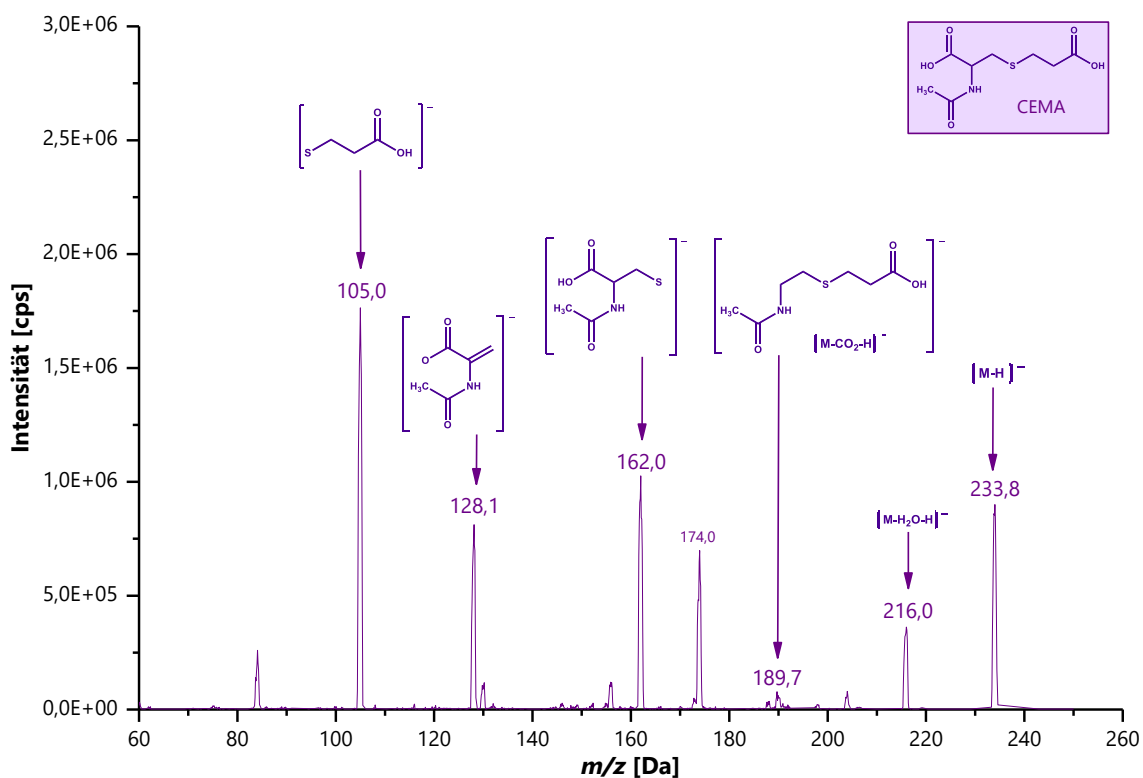


Abbildung 66: ESI_{neg}-MS²-Scan von CEMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

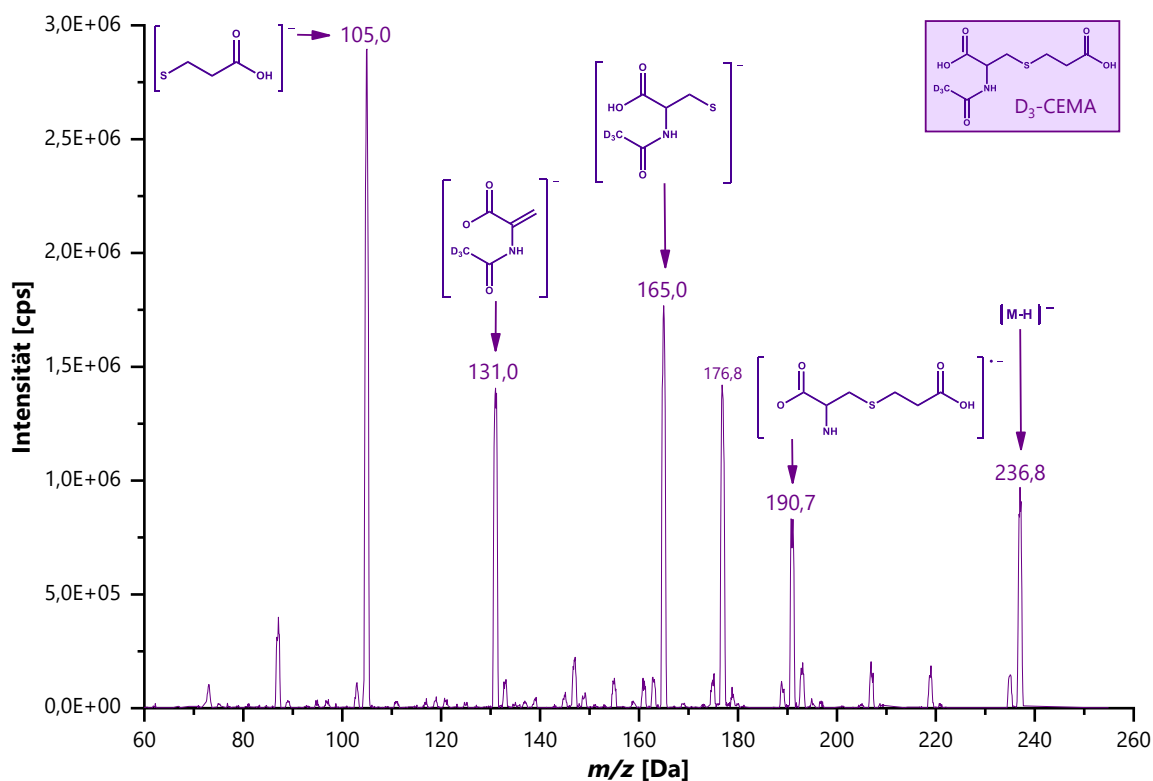


Abbildung 67: ESI_{neg}-MS²-Scan von D₃-CEMA (50 ng/ml), ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, ESI_{neg}-MS/MS-Parameter: gemäß Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3, Tabelle 40), Scanrate: 200 Da/s, Flussrate: 10 µl/min (Spritzenpumpe), D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

HPLC-Methode

Nachdem die ESI_{neg}-MS/MS-Methode erfolgreich übertragen wurde, erfolgte auch eine Anpassung des HPLC-Gradienten an die entsprechende HPLC-Anlage (Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies). Die optimierten HPLC-Parameter sind tabellarisch in Kapitel 7.2.2.3 aufgeführt. Als Säule diente eine Phenomenex Luna C8(2), die Flussrate der Methode lag bei 0,6 ml/min und als Fließmittel A wurde 0,1%ige Essigsäure sowie als Fließmittel B Acetonitril verwendet. In den ersten 9 Minuten der Methode wurde Fließmittel B isokratisch bei 4 % gehalten und anschließend innerhalb von 11 Minuten auf 10 % erhöht. Es folgten ein 10-minütiger Spülschritt bei 90 % des Fließmittels B und ein 5-minütiger Äquilibrationsschritt bei 4 % des Fließmittels B. Die optimierten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter sind tabellarisch in Kapitel 7.2.2.3 zusammengefasst.

7.2.2.2 Methodenvalidierung

Methode C

Zur Methodenvalidierung wurde die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität der Analyten bestimmt. Hierzu wurde eine Mercaptursäure-Lösung verwendet, die die Mercaptursäuren AAMA, GAMA, HPMA oder CEMA und die entsprechenden D₃-markierten Mercaptursäuren D₃-AAMA, D₃-GAMA, D₃-HPMA oder D₃-CEMA in einer Konzentration von jeweils 50 ng/ml enthielt. Diese Lösung wurde zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität an einem Tag in fünf aufeinanderfolgenden Läufen und zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vermessen. Über diesen Zeitraum wurde die Mercaptursäure-Lösung im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C gelagert. Es ergab sich eine Lauf-zu-Lauf-Variabilität für AAMA, GAMA und CEMA von 0,5 % und für HPMA von 0,6 %. Die Tag-zu-Tag-Variabilität betrug 0,5 % für GAMA, CEMA und HPMA sowie 1,2 % für AAMA.

Die LODs und LOQs der Methode wurden im Fließmittel bestimmt. Eine Bestimmung in einer Urinmatrix war nicht möglich, da keine Urinproben frei von den zu untersuchenden Analyten zur Verfügung standen. Die Bestimmung erfolgte rechnerisch über die Peakhöhen, wobei der LOD als die 3-fache Peakhöhe des S/Ns und der LOQ als die 10-fache Peakhöhe des S/Ns definiert wurde. Ebenfalls erfolgte eine experimentelle Überprüfung der berechneten LOD- und LOQ-Werte. Hierzu wurden Mercaptursäure-Lösungen bis zu der Konzentration verdünnt, die bei der Vermessung mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS in einem Peak mit 3-facher (LOD) bzw. 10-facher (LOQ) Peakhöhe verglichen zum S/N resultierten. Die absoluten LODs und LOQs der Methode lagen bei 0,9 / 3,0 fmol für AAMA, bei 0,9 / 3,1 fmol für GAMA, bei 1,0 / 3,0 fmol für HPMA und bei 3,3 / 11,0 fmol für CEMA. Entsprechend ergaben sich volumenbezogene LODs und LOQs von 0,04 / 0,14 ng/ml für AAMA, 0,05 / 0,15 ng/ml für GAMA, 0,05 / 0,15 ng/ml für HPMA und 0,15 / 0,51 ng/ml für CEMA.

Die zur Quantifizierung der Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren verwendeten Kalibriergeraden sind in Kapitel 7.2.2.4 dargestellt. Die Geradengleichungen waren $y = 0,955x$ (AAMA), $y = 1,117x$ (GAMA), $y = 1,031x$ (HPMA) und $y = 0,766x$ (CEMA). Das R² betrug jeweils 1,000.

Ein Chromatogramm einer mit Methode C vermessenen aufgearbeiteten Urinprobe findet sich in Abbildung 68. Der Urinprobe wurden als interne Standards isotopenmarkierte Mercaptursäuren (400 ng D₃-AAMA, 400 ng D₃-GAMA, 500 ng D₃-HPMA, 100 ng D₃-CEMA) zugesetzt. Das Chromatogramm zeigt,

dass alle Analyten basisliniengengetrennt waren. Zuerst eluieren die beiden Acrylamid-assozierten Mercaptursäuren (GAMA: 5,8 min, AAMA: 8,3 min), anschließend die Acrolein-assozierten Mercaptursäuren (HPMA: 15,6 min, CEMA: 16,7 min).

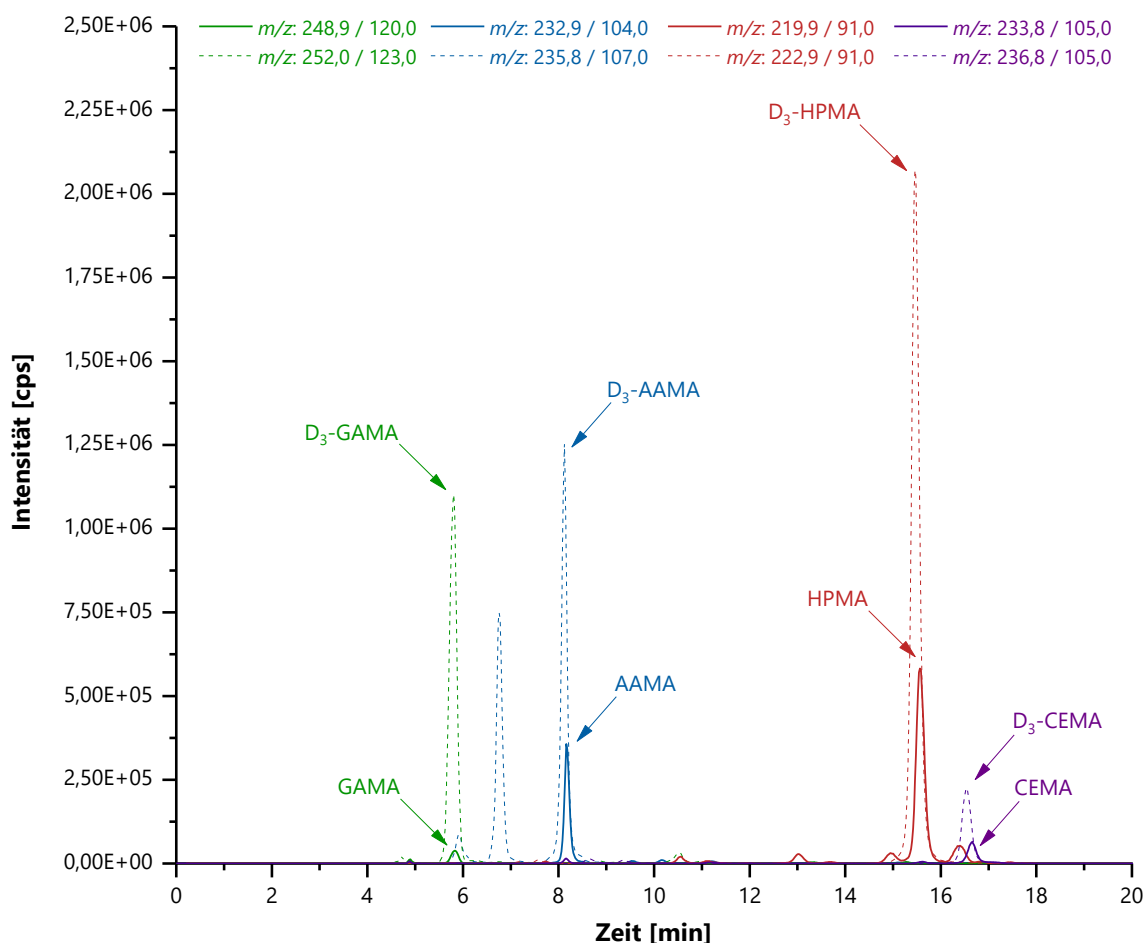


Abbildung 68: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Messung) einer aufgearbeiteten Urinprobe unter Zugabe der Standards (400 ng D₃-AAMA, 400 ng D₃-GAMA, 500 ng D₃-HPMA, 100 ng D₃-CEMA), Messmethode: Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (MRM-Methode), HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies, MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex, Messparameter: siehe Kapitel 7.2.2.3, AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein, D₃-AAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein, D₃-GAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, D₃-HPMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, MRM: *multiple reaction monitoring*, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

7.2.2.3 HPLC- und ESI_{neg}-MS/MS-Parameter

Methode C

Methode C wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Acrylamid- und Acrolein-assozierten Mercaptursäuren in Urinproben der Humanstudie I verwendet.

Informationen zu Methodenentwicklung und -validierung sind in Kapitel 7.2.2.1 und Kapitel 7.2.2.2 gegeben. Die optimierten HPLC-Parameter finden sich in Tabelle 39 und die optimierten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter in Tabelle 40.

Tabelle 39: HPLC-Parameter der Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies)

Säule	Phenomenex Luna C8(2), 150 mm x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, USA)						
Injektionsvolumen	5 µl						
Flussrate	0,6 ml/min						
Fließmittel A	0,1%ige Essigsäure						
Fließmittel B	Acetonitril						
Gradient							
Zeit (min)	0	9	20	21	31	32	37
Fließmittel A (%)	96	96	90	10	10	96	96
Fließmittel B (%)	4	4	10	90	90	4	4

Tabelle 40: ESI_{neg}-MS/MS-Parameter der Methode C zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (ESI-MS/MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex)

	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
AAMA	232,9	104,0	150	-30	-10	-20	-5	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-AAMA	235,8	107,0	150	-45	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70
GAMA	248,9	120,0	150	-45	-10	-22	-11	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-GAMA	252,0	123,0	150	-45	-10	-22	-11	50	medium	-4500	550	50	70
HPMA	219,9	91,0	150	-40	-10	-18	-9	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-HPMA	222,9	91,0	150	-45	-10	-18	-11	50	medium	-4500	550	50	70
CEMA	233,8	105,0	150	-45	-10	-20	-5	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-CEMA	236,8	105,0	150	-45	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70

AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], CE: Kollisionsenergie [V], CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, CUR: Curtain-Gas [psi], CXP: Zellaustrittspotential [V], DP: Declustering-Potential [V], Dwell: Dwell-Zeit [msec], D₃-AAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, D₃-GAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, D₃-HPMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, EP: Eingangspotential [V], GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, GS1: Zerstäuberberg [psi], GS2: Heizgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], TEM: Temperatur [°C]

Methoden D

Methoden D wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urinproben der Humanstudie II verwendet. Die Methode wurde von Katharina Gömpel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Elke Richling in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern entwickelt. Die optimierten HPLC-Parameter finden sich in Tabelle 41 und die optimierten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter in Tabelle 42.

Tabelle 41: HPLC-Parameter der Methode D zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies)

Säule	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)						
Injektionsvolumen	2 µl						
Flussrate	0,6 ml/min						
Fließmittel A	0,1%ige Essigsäure						
Fließmittel B	Acetonitril						
Gradient							
Zeit (min)	0	2	5	5,1	8,1	8,2	12
Fließmittel A (%)	99	99	90	10	10	99	99
Fließmittel B (%)	1	1	10	90	90	1	1

Tabelle 42: ESI_{neg}-MS/MS-Parameter der Methode D zur Mercaptursäure-Bestimmung in Urin (MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex)

	Q1	Q3	Time	DP	EP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
AAMA	233,0	104,0	3,9	-30	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-AAMA	236,0	103,9	3,9	-55	-10	-20	-5	50	medium	-4500	550	50	70
GAMA	249,0	120,0	2,2	-35	-10	-22	-11	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-GAMA	252,0	119,7	2,2	-30	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70
HPMA	220,0	91,0	5,4	-5	-10	-18	-9	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-HPMA	222,9	91,0	5,4	-50	-10	-18	-7	50	medium	-4500	550	50	70
CEMA	234,0	104,9	5,6	-40	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70
D₃-CEMA	236,9	105,0	5,6	-25	-10	-20	-9	50	medium	-4500	550	50	70

AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], CE: Kollisionsenergie [V], CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, CUR: Curtain-Gas [psi], CXP: Zellaustrittspotential [V], DP: Declustering-Potential [V], D₃-AAMA: *N*-Acetyl-D₃-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, D₃-GAMA: *N*-Acetyl-D₃-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, D₃-HPMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, EP: Eingangspotential [V], GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], TEM: Temperatur [°C], Time: erwartete Retentionszeit [min]

7.2.2.4 Kalibriergeraden

Methode C - AAMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von AAMA unter Verwendung von Methode C umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 250 ng/ml (L1 - L10). Zur Herstellung der AAMA-Lösungen wurde eine SL mit einer AAMA-Konzentration von 50 mg/ml in Methanol angesetzt. Aus der SL wurde durch dreifaches Verdünnen (3 x 1:50) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer AAMA-Konzentration von 400 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:8) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer AAMA-Konzentration von 50 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 43 angegebenen Pipettierschemas die AAMA-Lösungen (L1 - L10) hergestellt. Jeder dieser AAMA-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-AAMA-Lösung (2500 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-AAMA in allen AAMA-Lösungen (L1 - L10) bei 250 ng/ml lag.

Die Vermessung der AAMA-Lösungen L1 - L10 resultierte in einer AAMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,915x$ mit einem R^2 von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 44. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 69.

Tabelle 43: Pipettierschema zur Herstellung der AAMA-Lösungen L1 - L10 (Kalibriergerade zur Bestimmung von AAMA in Urin, Methode C)

AAMA-Lösung	ZV I AAMA (400 ng/ml) [µl]	ZV II AAMA (50 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -AAMA (2500 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	AAMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	2	100	898	0,1
L2	0	20	100	880	1
L3	0	100	100	800	5
L4	0	200	100	700	10
L5	0	500	100	400	25
L6	125	0	100	775	50
L7	250	0	100	650	100
L8	376	0	100	525	150
L9	500	0	100	400	200
L10	625	0	100	275	250

AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, D₃-AAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 400 ng/ml AAMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 50 ng/ml AAMA in Essigsäure (0,1 %)

Tabelle 44: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von AAMA in Urin (Methode C)

AAMA		D₃-AAMA		AAMA/D₃-AAMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
0,1	7,07E+03	150	1,13E+07	0,001	6,26E-04
1	7,01E+04	150	1,12E+07	0,01	6,26E-03
5	3,52E+05	150	1,12E+07	0,03	3,13E-02
10	6,90E+05	150	1,11E+07	0,07	6,23E-02
25	1,70E+06	150	1,11E+07	0,17	1,53E-01
50	3,46E+06	150	1,11E+07	0,33	3,10E-01
100	6,96E+06	150	1,14E+07	0,67	6,12E-01
150	1,03E+07	150	1,13E+07	1,00	9,06E-01
200	1,38E+07	150	1,13E+07	1,33	1,22E+00
250	1,74E+07	150	1,14E+07	1,67	1,53E+00

AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, D₃-AAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein

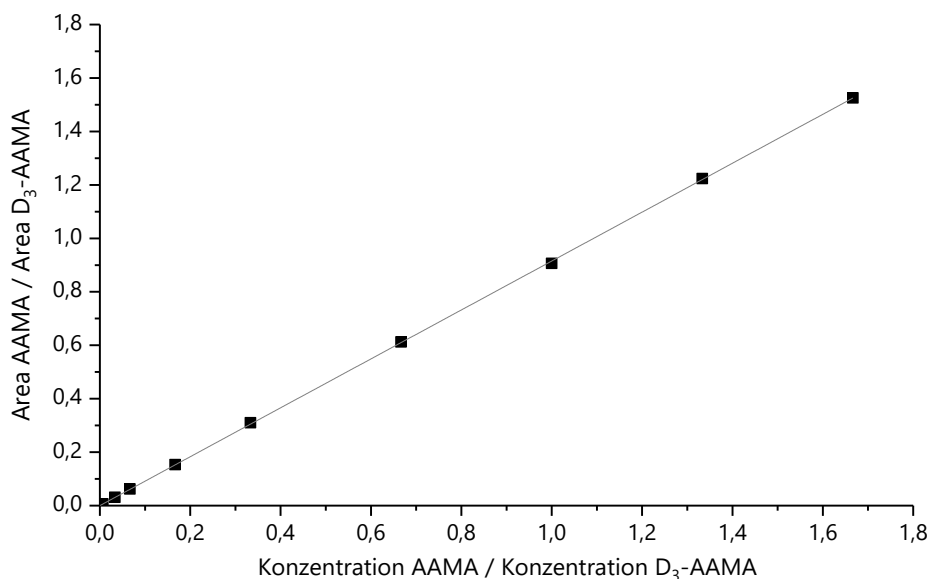


Abbildung 69: Kalibriergerade zur Bestimmung von AAMA in Urin (Methode C), Geradengleichung: $y = 0,915x$, $R^2 = 1,000$, AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, D₃-AAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein

Methode C - GAMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von GAMA unter Verwendung von Methode C umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 50 ng/ml (L1 - L10). Zur Herstellung der GAMA-Lösungen wurde eine SL mit einer GAMA-Konzentration von 2 mg/ml in einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (99,9:0,1) angesetzt. Aus der SL wurde durch dreifaches Verdünnen (1:100, 1:50, 1:4) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer GAMA-Konzentration von 100 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:10) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer GAMA-Konzentration von 10 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 45 angegebenen Pipettierschemas die GAMA-Lösungen (L1 - L10) hergestellt. Jeder dieser GAMA-Lösung wurden 100 µl einer D₃-GAMA-Lösung (1000 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-GAMA in allen GAMA-Lösungen (L1 - L10) bei 100 ng/ml lag.

Die Vermessung der GAMA-Lösungen L1 - L10 resultierte in einer GAMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,915x$ mit einem R^2 von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 46. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 70.

Tabelle 45: Pipettierschema zur Herstellung der GAMA-Lösungen L1 - L10 (Kalibriergerade zur Bestimmung von GAMA in Urin, Methode C)

GAMA-Lösung	ZV I GAMA (100 ng/ml) [µl]	ZV II GAMA (10 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -GAMA (1000 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	GAMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	10	100	890	0,1
L2	0	100	100	800	1
L3	0	250	100	650	2,5
L4	0	500	100	400	5
L5	100	0	100	800	10

D₃-GAMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 100 ng/ml GAMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 10 ng/ml GAMA in Essigsäure (0,1 %)

Tabelle 45 (Fortsetzung): Pipettierschema zur Herstellung der GAMA-Lösungen L1 - L10 (Kalibriergerade zur Bestimmung von GAMA in Urin, Methode C)

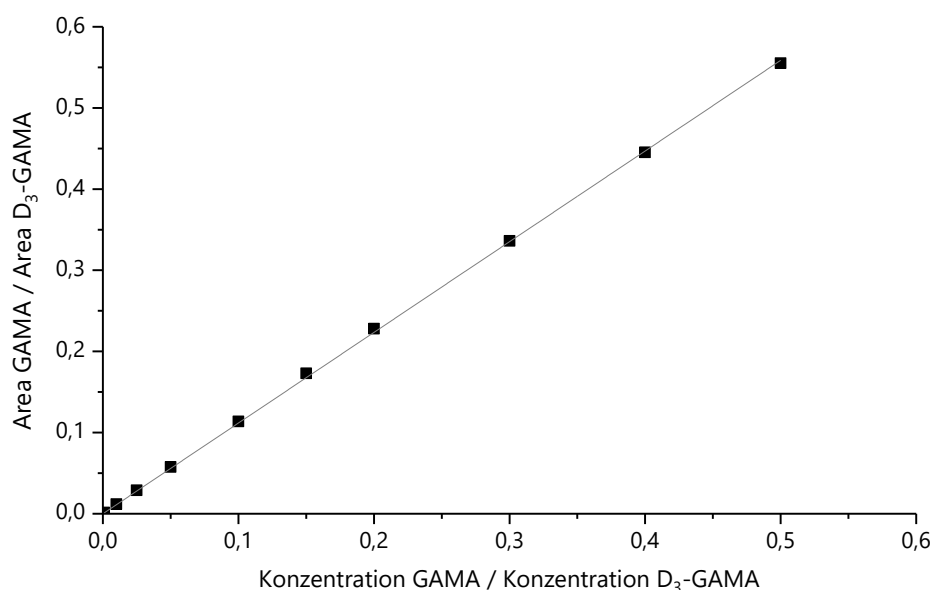
GAMA-Lösung	ZV I GAMA (100 ng/ml) [µl]	ZV II GAMA (10 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -GAMA (1000 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	GAMA-Endkonzentration [ng/ml]
L6	150	0	100	750	15
L7	200	0	100	700	20
L8	300	0	100	600	30
L9	400	0	100	500	40
L10	500	0	100	400	50

D₃-GAMA: D₃-N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 100 ng/ml GAMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 10 ng/ml GAMA in Essigsäure (0,1 %)

Tabelle 46: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von GAMA in Urin (Methode C)

GAMA		D₃-GAMA		GAMA/D₃-GAMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
0,1	8,12E+03	100	5,63E+06	0,001	1,44E-03
1	6,69E+04	100	5,67E+06	0,01	1,18E-02
2,5	1,63E+05	100	5,65E+06	0,03	2,89E-02
5	3,27E+05	100	5,67E+06	0,05	5,77E-02
10	6,36E+05	100	5,59E+06	0,10	1,14E-01
15	9,63E+05	100	5,56E+06	0,15	1,73E-01
20	1,27E+06	100	5,59E+06	0,20	2,28E-01
30	1,89E+06	100	5,61E+06	0,30	3,36E-01
40	2,53E+06	100	5,68E+06	0,40	4,45E-01
50	3,13E+06	100	5,63E+06	0,50	5,55E-01

D₃-GAMA: D₃-N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein

**Abbildung 70:** Kalibriergerade zur Bestimmung von GAMA in Urin (Methode C), Geradengleichung: $y = 1,117x$, $R^2 = 1,000$, D₃-GAMA: D₃-N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein, GAMA: N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein,

Methode C - HPMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA unter Verwendung von Methode C umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 1200 ng/ml (L1 - L11). Zur Herstellung der HPMA-Lösungen wurde eine SL mit einer HPMA-Konzentration von 4 mg/ml in einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (99,9:0,1) angesetzt. Aus der SL wurde durch zweifaches Verdünnen (1:100, 1:20) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer HPMA-Konzentration von 2000 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:40) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer HPMA-Konzentration von 50 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 47 angegebenen Pipettierschemas die HPMA-Lösungen (L1 - L11) hergestellt. Jeder dieser HPMA-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-HPMA-Lösung (1500 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-HPMA in allen HPMA-Lösungen (L1 - L11) bei 150 ng/ml lag.

Die Vermessung der HPMA-Lösungen L1 - L11 resultierte in einer HPMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 1,031x$ mit einem R² von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 48. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 71.

Tabelle 47: Pipettierschema zur Herstellung der HPMA-Lösung L1 - L11 (Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA in Urin, Methode C)

HPMA-Lösung	ZV I HPMA (2000 ng/ml) [µl]	ZV II HPMA (50 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -HPMA (2500 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	HPMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	2	100	898	0,1
L2	0	20	100	880	1
L3	0	100	100	800	5
L4	0	200	100	700	10
L5	25	0	100	875	50
L6	50	0	100	850	100
L7	125	0	100	775	250
L8	250	0	100	650	500
L9	375	0	100	525	750
L10	500	0	100	400	1000
L11	600	0	100	300	1200

D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 2000 ng/ml HPMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 50 ng/ml HPMA in Essigsäure (0,1 %)

Tabelle 48: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von HPMA in Urin (Methode C)

HPMA		D₃-HPMA		HPMA/D₃-HPMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
0,1	6,07E+03	150	8,65E+06	0,001	7,02E-04
1	6,20E+04	150	8,65E+06	0,01	7,17E-03
5	3,06E+05	150	8,60E+06	0,03	3,56E-02
10	6,12E+05	150	8,65E+06	0,07	7,08E-02

D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Tabelle 48 (Fortsetzung): Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von HPMA in Urin (Methode C)

HPMA		D ₃ -HPMA		HPMA/D ₃ -HPMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
50	3,04E+06	150	8,68E+06	0,33	3,50E-01
100	6,09E+06	150	8,77E+06	0,67	6,94E-01
250	1,54E+07	150	8,79E+06	1,67	1,76E+00
500	3,07E+07	150	8,90E+06	3,33	3,44E+00
750	4,63E+07	150	8,96E+06	5,00	5,17E+00
1000	6,17E+07	150	8,92E+06	6,67	6,91E+00
1000	5,58E+07	150	8,08E+06	6,67	6,91E+00
1200	6,50E+07	150	7,95E+06	8,00	8,18E+00

D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

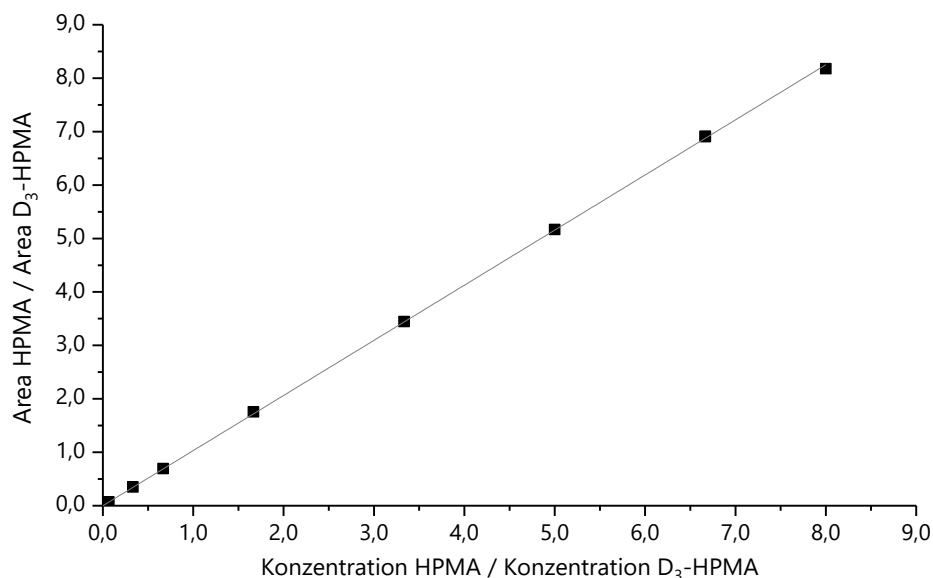


Abbildung 71: Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA in Urin (Methode C), Geradengleichung: $y = 1,031x$, $R^2 = 1,000$, D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Methode C - CEMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA unter Verwendung von Methode C umfasste einen Konzentrationsbereich von 1 - 500 ng/ml (L1 - L11). Zur Herstellung der CEMA-Lösungen wurde eine SL mit einer CEMA-Konzentration von 3 mg/ml in einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (99,9:0,1) angesetzt. Aus der SL wurde durch zweifaches Verdünnen (1:37,5; 1:100) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer CEMA-Konzentration von 800 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:8) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer CEMA-Konzentration von 100 ng/ml hergestellt. Unter Verwendung der ZV I und ZV II wurden entsprechend des in Tabelle 49 angegebenen Pipettierschemas die CEMA-Lösungen (L1 - L11) hergestellt. Jeder dieser CEMA-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-CEMA-Lösung (1000 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-CEMA in allen CEMA-Lösungen (L1 - L11) bei 100 ng/ml lag.

Die Vermessung der CEMA-Lösungen L1 - L11 resultierte in einer CEMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,766x$ mit einem R^2 von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 50. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 72.

Tabelle 49: Pipettierschema zur Herstellung der CEMA-Lösungen L1 - L11 (Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA in Urin, Methode C)

CEMA-Lösung	ZV I CEMA (800 ng/ml) [µl]	ZV II CEMA (100 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -CEMA (2500 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	CEMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	10	100	890	1
L2	0	50	100	850	5
L3	0	100	100	800	10
L4	0	250	100	650	25
L5	0	500	100	400	50
L6	125	0	100	77	100
L7	187,5	0	100	712,5	150
L8	250	0	100	650	200
L9	375	0	100	525	300
L10	500	0	100	400	400
L11	625	0	100	275	500

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 800 ng/ml CEMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 100 ng/ml CEMA in Essigsäure (0,1 %),

Tabelle 50: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von CEMA in Urin (Methode C)

Konzentration [ng/ml]	CEMA		D₃-CEMA		CEMA/D₃-CEMA	
	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]
1	2,74E+04	100	3,50E+06	0,01	7,83E-03	
5	1,33E+05	100	3,41E+06	0,05	3,90E-02	
10	2,54E+05	100	3,42E+06	0,10	7,42E-02	
25	6,70E+05	100	3,48E+06	0,25	1,93E-01	
50	1,33E+06	100	3,45E+06	0,50	3,85E-01	
100	2,90E+06	100	3,70E+06	1,00	7,83E-01	
150	3,97E+06	100	3,39E+06	1,50	1,17E+00	
200	5,21E+06	100	3,37E+06	2,00	1,54E+00	
300	7,80E+06	100	3,39E+06	3,00	2,30E+00	
400	1,04E+07	100	3,44E+06	4,00	3,03E+00	
500	1,31E+07	100	3,40E+06	5,00	3,84E+00	

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein

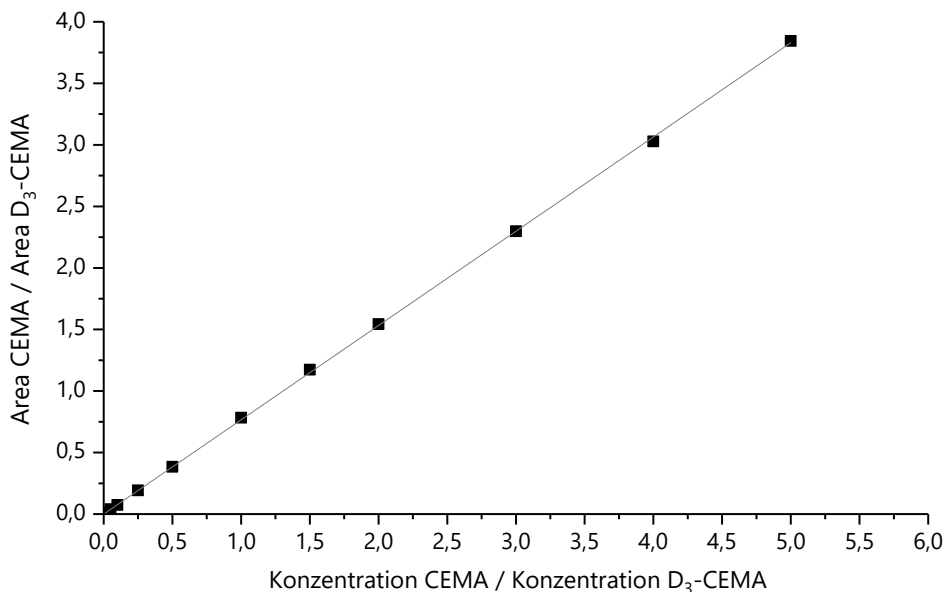


Abbildung 72: Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA in Urin (Methode C), Geradengleichung: $y = 0,766x$, $R^2 = 1,000$, CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein

Methode D - HPMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA unter Verwendung von Methode D umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,1 - 75 ng/ml (L1 - L11). Zur Herstellung der HPMA-Lösungen wurde eine SL mit einer HPMA-Konzentration von 1 mg/ml in Essigsäure (0,1 %) angesetzt. Aus der SL wurde durch zweifaches Verdünnen (1:25, 1:16) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer HPMA-Konzentration von 2500 ng/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch Verdünnen (1:16) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer HPMA-Konzentration von 25 ng/ml hergestellt. ZV II wurde nochmals 1:100 mit Essigsäure (0,1 %) verdünnt zur ZV III mit einer Konzentration von 1 ng/ml. Unter Verwendung der ZVs wurden entsprechend des in Tabelle 51 angegebenen Pipettierschemas die HPMA-Lösungen (L1 - L11) hergestellt. Jeder dieser HPMA-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-HPMA-Lösung (150 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-HPMA in allen HPMA-Lösungen (L1 - L11) bei 15 ng/ml lag.

Die Vermessung der HPMA-Lösungen L1 - L11 resultierte in einer HPMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,679x$ mit einem R^2 von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 52. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 73.

Tabelle 51: Pipettierschema zur Herstellung der HPMA-Lösungen L1 - L11 (Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA in Urin, Methode C)

HPMA-Lösung	ZV I HPMA (2500 ng/ml) [µl]	ZV II HPMA (25 ng/ml) [µl]	ZV III HPMA (1 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -HPMA (150 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	HPMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	0	100	100	800	0,1
L2	0	40	0	100	860	1
L3	0	80	0	100	820	2
L4	0	200	0	100	700	5
L5	0	400	0	100	500	10
L6	8	0	0	100	892	20
L7	10	0	0	100	890	25
L8	14	0	0	100	886	35
L9	20	0	0	100	880	50
L10	24	0	0	100	875	60
L11	30	0	0	100	870	75

D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 2500 ng/ml HPMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 50 ng/ml HPMA in Essigsäure (0,1 %), ZV III: 1 ng/ml HPMA in Essigsäure (0,1 %)

Tabelle 52: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von HPMA in Urin (Methode D)

HPMA		D₃-HPMA		HPMA/D₃-HPMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
0,1	1,90E+03	15	4,27E+05	0,01	4,45E-03
1	3,12E+04	15	6,53E+05	0,07	4,78E-02
2	5,39E+04	15	5,95E+05	0,14	9,06E-02
5	1,51E+05	15	6,26E+05	0,34	2,41E-01
10	2,83E+05	15	6,12E+05	0,68	4,62E-01
20	7,79E+05	15	8,24E+05	1,35	9,45E-01
25	1,06E+06	15	9,03E+05	1,69	1,17E+00
35	1,56E+06	15	9,62E+05	2,37	1,62E+00
50	2,63E+06	15	1,14E+06	3,38	2,31E+00
60	3,19E+06	15	1,14E+06	4,05	2,80E+00
75	4,25E+06	15	1,26E+06	5,07	3,37E+00

D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

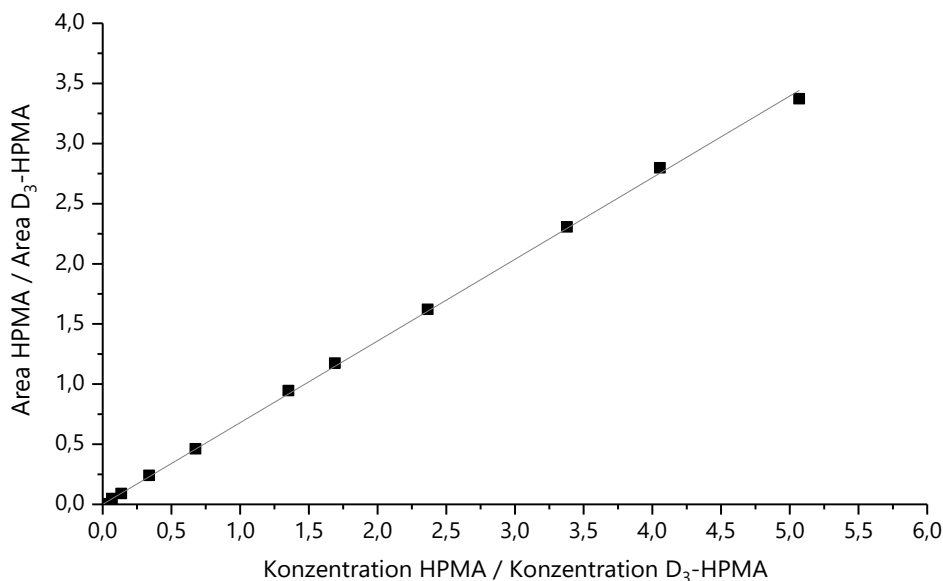


Abbildung 73: Kalibriergerade zur Bestimmung von HPMA in Urin (Methode D), Geradengleichung: $y = 0,679x$, $R^2 = 1,000$, D₃-HPMA: D₃-N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein, HPMA: N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein

Methode D - CEMA

Die Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA unter Verwendung von Methode D umfasste einen Konzentrationsbereich von 1 - 50 ng/ml (L1 - L5). Zur Herstellung der Verdünnungen wurden eine SL mit einer CEMA-Konzentration von 3 mg/ml in einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (99,9:0,1) angesetzt. Aus der SL wurde durch einfaches Verdünnen (1:150) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV I mit einer CEMA-Konzentration von 20 µg/ml hergestellt. Aus der ZV I wurde wiederum durch einfaches Verdünnen (1:100) mit Essigsäure (0,1 %) die ZV II mit einer CEMA-Konzentration von 50 ng/ml hergestellt. ZV II wurde nochmals 1:5 mit Essigsäure (0,1 %) verdünnt zur ZV III mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Unter Verwendung der ZV I, ZV II und ZV III wurden entsprechend des in Tabelle 53 angegebenen Pipettierschemas die CEMA-Lösungen (L1 - L5) hergestellt. Jeder dieser CEMA-Lösungen wurden 100 µl einer D₃-CEMA-Lösung (50 ng/ml) zugesetzt, sodass die Endkonzentration des internen Standards D₃-CEMA in allen CEMA-Lösungen (L1 - L5) bei 5 ng/ml lag.

Tabelle 53: Pipettierschema zur Herstellung der CEMA-Lösungen L1 - L5 (Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA in Urin, Methode D)

CEMA-Lösung	ZV I CEMA (20 µg/ml) [µl]	ZV II CEMA (50 ng/ml) [µl]	ZV III CEMA (10 ng/ml) [µl]	interner Standard D ₃ -CEMA (50 ng/ml) [µl]	Lösungsmittel Essigsäure (0,1 %) [µl]	CEMA-Endkonzentration [ng/ml]
L1	0	0	100	100	800	1
L2	0	0	500	100	400	5
L3	0	200	0	100	700	10
L4	0	500	0	100	400	25
L5	10	0	0	100	890	50

CEMA: N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, D₃-CEMA: D₃-N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein, L: Lösung, ZV: Zwischenverdünnung, ZV I: 20 µg/ml CEMA in Essigsäure (0,1 %), ZV II: 50 ng/ml CEMA in Essigsäure (0,1 %), ZV III: 10 ng/ml CEMA in Essigsäure (0,1 %)

Die Vermessung der CEMA-Lösungen L1 - L5 resultierte in einer CEMA-Kalibriergeraden mit der Geradengleichung $y = 0,886x$ mit einem R^2 von 1,000. Die Messwerte zur Kalibriergeraden finden sich in Tabelle 54. Eine Darstellung der Kalibriergeraden findet sich in Abbildung 74.

Tabelle 54: Messwerte zur Kalibriergeraden zur Bestimmung von CEMA in Urin (Methode D)

CEMA		D ₃ -CEMA		CEMA/D ₃ -HPMA	
Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration [ng/ml]	Area	Konzentration	Area
1	2,98E+03	5	1,93E+04	0,2	1,54E-01
5	7,31E+04	5	8,35E+04	1,0	8,75E-01
10	9,37E+04	5	5,19E+04	2,0	1,81E+00
25	4,87E+05	5	1,08E+05	5,1	4,51E+00
50	1,56E+06	5	1,74E+05	10,1	8,97E+00

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein

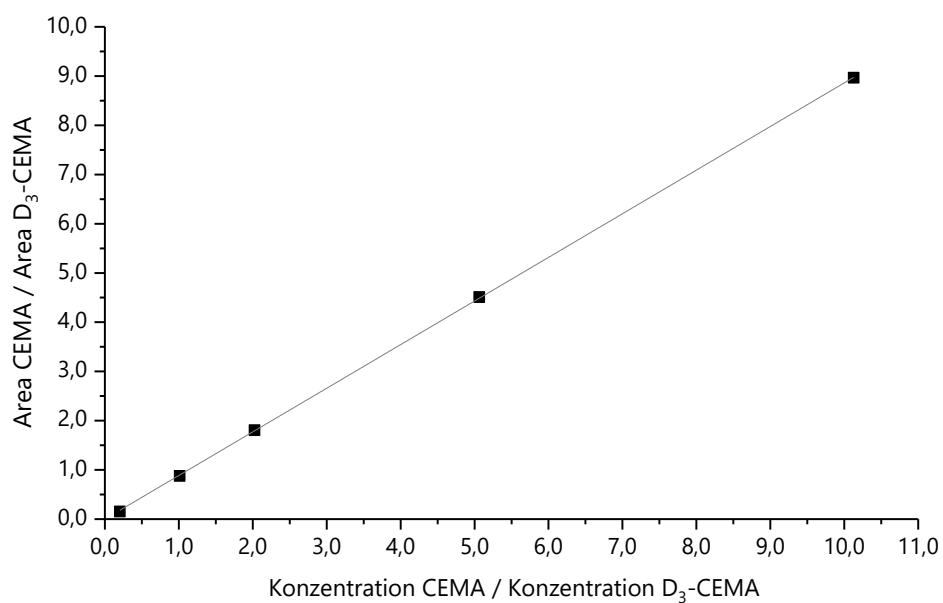


Abbildung 74: Kalibriergerade zur Bestimmung von CEMA in Urin (Methode D), Geradengleichung: $y = 0,886x$, $R^2 = 1,000$, CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, D₃-CEMA: D₃-*N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein

7.3 Abschätzung von Nährstoff- und Energie-Gehalten in Lebensmitteln mittels Prodi 5.8 Expert

Zur Abschätzung der Nährstoff- und Energie-Gehalte in Lebensmitteln wurde die Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland) verwendet. Die Software beinhaltet Informationen zu den Protein-, Kohlenhydrat-, Fett- und Energiegehalten einzelner Lebensmittel und Mahlzeiten und ermöglicht es basierend auf einem Ernährungsplan oder -protokoll die täglichen Aufnahmemengen an Proteinen, Kohlenhydraten und Fett sowie die tägliche Energieaufnahme zu ermitteln. Hierzu greift Prodi 5.8. Expert auf Daten des Bundeslebensmittelschlüssels und auf Produktdaten aus der Lebensmittel-industrie zurück.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Prodi 5.8 Expert zur Abschätzung der Nährstoff- und Energie-Gehalte der Lebensmittel verwendet, die von den Probanden der Humanstudie I verzehrt wurden. Ebenfalls wurde die Software zur Abschätzung der täglichen Nährstoff- und Energie-Aufnahmemengen der Probanden der Humanstudie I genutzt.

7.4 Bestimmung von Kreatinin in Urin

Zur Bestimmung von Kreatinin in Urinproben wurde ein Kreatinin-Assay-Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) verwendet. Es wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Jede Einzelbestimmung erfolgte unabhängig auf einer anderen Wellplatte. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach geringfügig modifizierten Herstellerangaben.

7.4.1 Versuchsvorbereitung

Der Urin wurde je nach erwartetem Kreatinin-Gehalt 1:2 bis 1:60 verdünnt. Eine Kreatinin-Standard-Reihe (0 - 13 mg/dl) wurde entsprechend des Pipettierschemas in Tabelle 55 hergestellt. Pro Platte wurden zwei unabhängig voneinander pipettierte Standard-Reihen benötigt. Die alkalische Pikrat-Lösung wurde hergestellt indem 2 ml Natriumborat-Lösung, 6 ml Tensid-Lösung, 10 ml Farbreagenz und 3,6 ml Natriumhydroxid-Lösung zusammenpipettiert wurden.

Tabelle 55: Pipettierschema zur Herstellung einer Kreatinin-Standard-Reihe

Reaktionsgefäß	Kreatinin-Standard-Lösung [µl]	Bidestilliertes Wasser [µl]	Kreatinin-Standard-Lösung [mg/dl]
A	0	500	0
B	50	450	2
C	100	400	4
D	150	350	6
E	200	300	8
F	250	250	10
G	300	200	12
H	375	125	13

7.4.2 Versuchsdurchführung

15 µl einer Kreatinin-Standard-Lösung oder verdünnten Urinprobe wurden in je ein Well einer 96-Well-Microplatte pipettiert. Nach Zugabe von 150 µl alkalischer Pikrat-Lösung wurde die Platte mit einer Abdeckfolie verschlossen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Abdeckfolie entfernt und mittels Platten-Readers die Absorption bei 500 nm bestimmt. Nach der Messung erfolgte zur Zerstörung des Farbkomplexes die Zugabe von 5 µl Säure-Lösung. Die Wellplatte wurde erneut mit Abdeckfolie verschlossen und nochmals 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler inkubiert. Nach Entfernen der Abdeckfolie erfolgte eine zweite Vermessung der Absorption bei 500 nm.

7.5 Synthese von *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein

Syntheschema

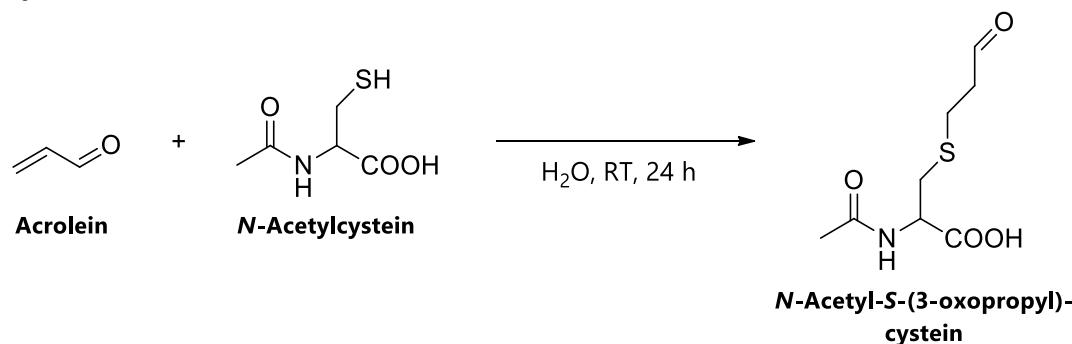


Abbildung 75: Syntheschema zur Darstellung von *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein

Synthesevorschrift modifiziert nach Ramu *et al.* (1995)

N-Acetylcystein (1,63 g, 10 mmol) wurde in einen Dreihalskolben mit destilliertem Wasser (5 ml) unter Rühren in Suspension gebracht. Nach Anlegen einer Argonschutzatmosphäre erfolgte die tropfenweise Zugabe von Acrolein (1,68 g, 2 ml, 30 mmol) mittels Spritze durch ein Diaphragma. Nach Rühren für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Bildung des Eduktes mittels Dünnschichtchromatographie überprüft und anschließend das Wasser unter Vakuum entfernt. Zurück blieb eine sehr viskose weiße Flüssigkeit.

Die Syntheseüberprüfung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie sowie NMR-Spektroskopie. Das synthetisierte *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein wies keine Verunreinigungen auf.

Charakterisierung

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wird eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator verwendet und als Laufmittel Ethylacetat-Methanol-Essigsäure (49,5:49,5:1). Das Sprühreagenz ist *p*-Anisaldehyd-Schwefelsäure.

R_f -Werte: Edukte: 0,96 (Acrolein), 0,72 (*N*-Acetylcystein)

Produkt: 0,66 (*N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein)

NMR-Spektroskopie

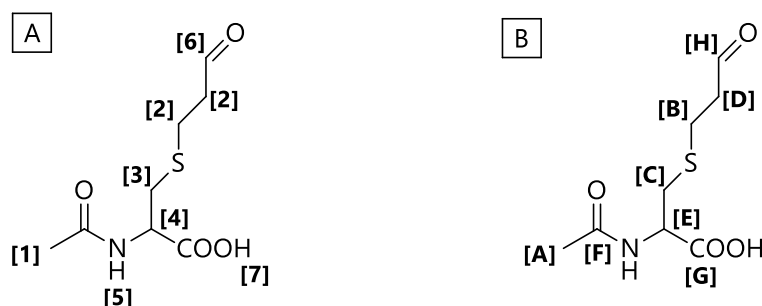
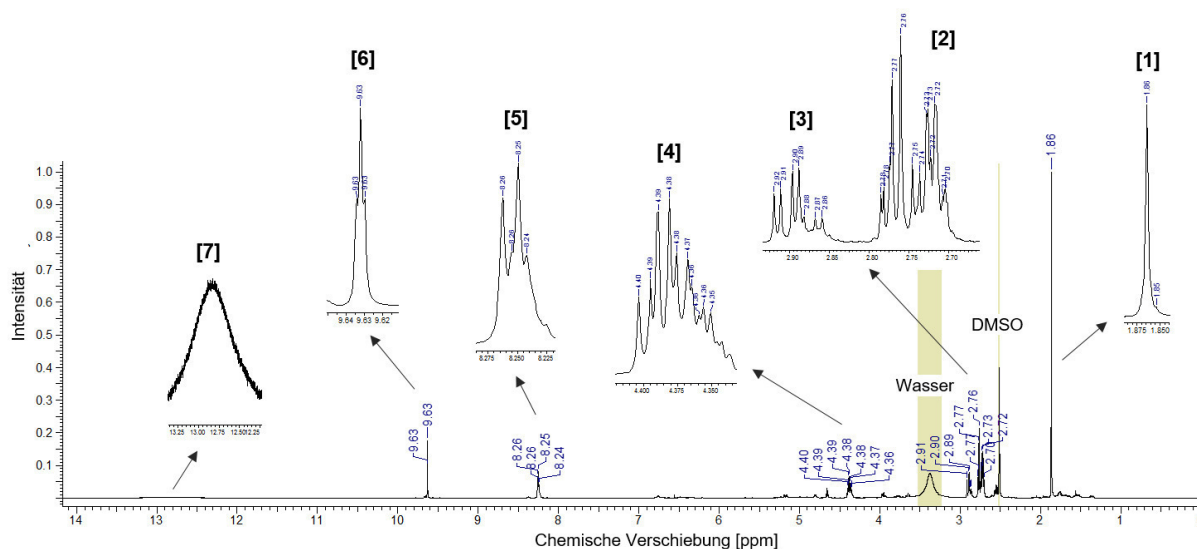


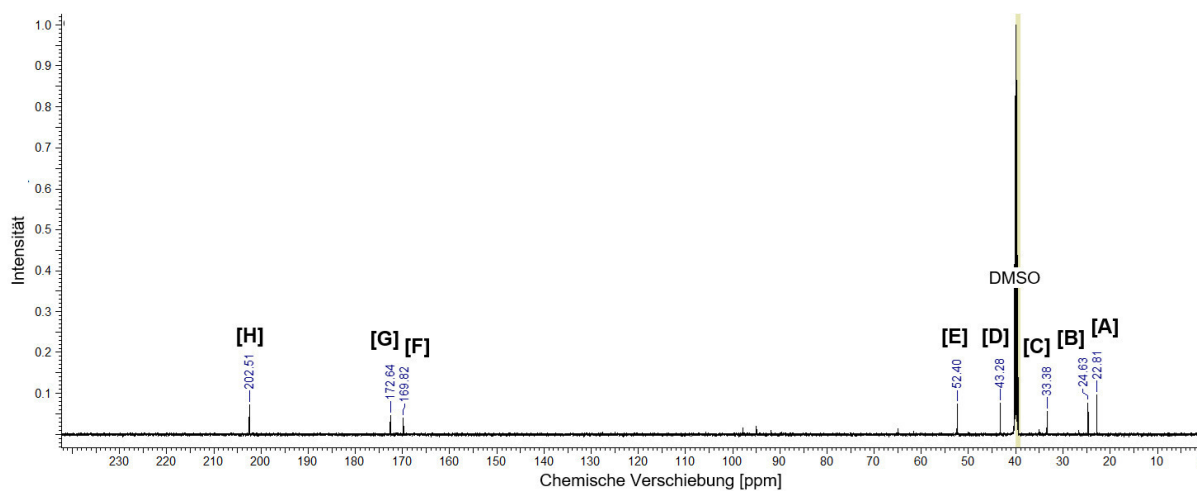
Abbildung 76: Strukturformel von *N*-Acetyl-S-(3-oxopropyl)-cystein, A: H-Atome [1-7] aufsteigend nach ihrer chemischen Verschiebung, B: C-Atome [A-H] aufsteigend nach ihrer chemischen Verschiebung

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_6 -DMSO)Chemische Verschiebung δ [ppm]:

1,86 (s, 3H, CH₃, [1]), 2,70 - 2,78 (m, 4H, 2 x CH₂, [2]), 2,86 - 2,92 (m, 2H, CH₂, [3]), 4,35 - 4,40 (m, 1H, CH, [4]), 4,35 - 4,40 (m, 1H, NH, [5]), 9,63 (t, 1H, CHO, [6]), 12,85 (s, 1H, COOH, [7])

Abbildung 77: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, D_6 -DMSO) von *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-cystein (OPMA) $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, D_6 -DMSO):Chemische Verschiebung δ [ppm]:

22,81 (CH₃, [A]), 24,63 (CH₂, [B]), 33,38 (CH₂, [C]), 40,36 (CH₂, [D]), 52,40 (CH, [E]), 169,82 (CO, [F]), 172,64 (COOH, [G]), 202,51 (CHO, [H])

Abbildung 78: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, D_6 -DMSO) von *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-cystein (OPMA)

7.6 Bestimmung von Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Kaliumphosphatpuffer

Die Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA, CEMA und OPMA in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 37 °C) erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS. Alle Bestimmungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.6.1 Probenvorbereitung

Herstellung des Kaliumphosphatpuffers

Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (1 M)

Zur Herstellung einer 1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung wurden 17,42 g Dikaliumhydrogenphosphat in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (1 M)

Eine 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung wurde hergestellt indem 13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst wurden.

Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)

Zur Herstellung des Kaliumphosphatpuffers (pH 7,4) wurden 8,02 ml der Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung und 1,98 ml der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert (7,4) wurde mittels pH-Meter überprüft.

Herstellung der Mercaptursäure-Lösungen

Die Mercaptursäure-Lösungen wurden in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) hergestellt. Zur Herstellung der OPMA-Lösung wurde eine SL mit einer Acrylamid-Konzentration von 100 µmol/ml angesetzt. Durch zweifaches Verdünnen (2 x 1:100) wurde eine OPMA-Lösung mit der Konzentration von 10 nmol/ml erhalten. Die HPMA- und CEMA-Lösung mit einer Konzentration von 0,2 nmol/ml wurde jeweils aus einer SL der Konzentration 1 µmol/ml durch zweifaches Verdünnen (1:50, 1:100) hergestellt. Den OPMA-, HPMA- und CEMA-Lösungen wurde als Standard AAMA (0,2 nmol/ml) zugesetzt.

7.6.2 Probenvermessung

Die verwendete HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode basiert auf Methode D zur Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren in Urin (siehe Kapitel 7.2.2.3).

Als HPLC-MS/MS-Gerät wurde entsprechend eine HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Serie 1290 Infinity) gekoppelt mit einem Tandemmassenspektrometer der Firma AB Sciex (QTRAP 5500) verwendet. Die HPLC-Methode wurde so angepasst, dass jeder Lauf fünfzehn Minuten betrug. Tabelle 56 enthält die optimierten HPLC-Parameter der Methode. Die geräte- sowie substanzspezifischen ESI_{neg}-MS/MS-Parameter für HPMA, CEMA und AAMA wurden von Methode D übernommen. Für OPMA wurde ein substanzspezifisches Tuning mit einer OPMA-Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/ml durchgeführt. Die verwendeten ESI_{neg}-MS/MS-Parameter finden sich in Tabelle 57.

Tabelle 56: HPLC-Parameter zur OPMA-, HPMA- und CEMA-Bestimmung (HPLC-System: Serie 1290 Infinity, Agilent Technologies)

Säule	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)					
Autosamplertemperatur	37 °C					
Injektionsvolumen	2 µl					
Flussrate	0,6 ml/min					
Fließmittel A	0,1%ige Essigsäure					
Fließmittel B	Acetonitril					
Gradient						
Zeit (min)	0	3	4	9,2	9,3	14,3
Fließmittel A (%)	99	99	10	10	99	99
Fließmittel B (%)	1	1	90	90	1	1

CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, OPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-*L*-cystein

Tabelle 57: ESI_{neg}-MS/MS-Parameter zur OPMA-, HPMA- und CEMA-Bestimmung (MS-System: QTRAP 5500, AB Sciex)

	Q1	Q3	Dwell	DP	EP	CE	CXP	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
OPMA	218,0	161,9	120	-40	-10	-10	-11	50	medium	-4500	550	50	70
HPMA	220,0	91,0	120	-5	-10	-18	-9	50	medium	-4500	550	50	70
CEMA	234,0	104,9	120	-40	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70
AAMA	233,0	104,0	120	-30	-10	-20	-11	50	medium	-4500	550	50	70

AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein, CAD: kollisionsaktiviertes Dissoziationsgas [psi], CE: Kollisionsenergie [V], CEMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein, CUR: Curtain-Gas [psi], CXP: Zellaustrittspotential [V], DP: Declustering-Potential [V], Dwell: Dwell-Zeit [msec], EP: Eingangspotential [V], GS1: Zerstäubergas [psi], GS2: Heizgas [psi], IS: Ionenspray-Spannung [V], HPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein, OPMA: *N*-Acetyl-*S*-(3-oxopropyl)-*L*-cystein, Q1: Quadrupol 1 [*m/z*], Q3: Quadrupol 3 [*m/z*], TEM: Temperatur [°C]

7.7 Berechnungen und Statistik

Die Berechnungen der AUC und einige statistischen Test wurden von einer Statistikerin (Frau Dorethea Schipp) durchgeführt. Weitere statistische Test wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft® Excel® 2013 der Firma Microsoft Corporation, Redmond, USA durchgeführt.

7.7.1 Berechnung der AUC

Die AUC nach mittlerer (*medium AA*, Tag 4) und hoher (*high AA*, Tag 7) Acrylamid-Aufnahme der Probanden der Humanstudie I wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{AUC} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} ((t_{i+1} - t_i) * (c_i + c_{i+1}))$$

c_i : AAMA- bzw. GAMA-Konzentrationen zum Zeitpunkt t_i

t_i : Messzeitpunkte [t_0 (-12 - 0 h) bis t_{12} (60 - 72 h, *medium AA*) bzw. t_{10} (48 - 72 h, *high AA*)]

7.7.2 Anderson-Darling-Test

Der Anderson-Darling-Test fand Anwendung zur Prüfung auf Normalverteilung.

7.7.3 Gepaarter und ungepaarter t -Test

Wenn eine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde ein gepaarter t -Test für verbundene Stichproben verwendet und ein ungepaarter t -Test (Zweistichproben- t -Test) für unverbundenen Stichproben.

7.7.4 Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) wurde zur statistischen Analyse von verbundenen Stichproben verwendet, die keine Normalverteilung aufwiesen.

7.7.5 Mann-Whitney- U -Test

Zur Datenanalyse von unverbundenen Stichproben, die Normalverteilung auswiesen, fand der Mann-Whitney- U -Test Anwendung.

8 Informationen zu den Humanstudien

8.1 Humanstudie I

8.1.1 Rechtliche Genehmigung

Die Genehmigung der Humanstudie (837.499.12 (8600-F)) wurde von der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz in Mainz erteilt. Die Antragstellung erfolgte am 26. Oktober 2012, nach Überprüfung durch die Ethikkommission wurde die finale Version am 14. Januar 2013 eingereicht und am 29. Januar 2013 genehmigt.

8.1.2 Rekrutierung der Probanden

Für die Studie wurden 15 männliche Probanden zwischen 20 und 44 Jahren rekrutiert, die kaukasischer Abstammung waren und einen BMI von 19 - 25 kg/m² aufwiesen sollten. Die Probanden mussten Nichtraucher sein sowie täglichen Kaffeeconsum gewöhnt sein. Ausschlusskriterien waren Leistungssport, Blutspende, metabolische Störungen, die Einnahme von Medikamenten oder Nahrungsergänzungsmitteln sowie die Teilnahme an anderen Studien.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte im Januar 2013 an der Technischen Universität Kaiserslautern. Während einer Vorbesprechung am 1. Februar 2013 erhielten alle Interessenten detaillierte Informationen über die Studiendurchführung, den vorgegebenen Ernährungsplan und den Studienort. Nach einer Bedenkzeit von mindestens 24 Stunden gaben die Probanden ihre informierte Zustimmung.

8.1.3 Medizinische Voruntersuchung

Eine medizinische Voruntersuchung der Probanden wurde am 21. Februar 2013 an der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt. Jeder Proband füllte einen gesundheitsbezogenen Fragebogen aus und es wurde das Alter, das Körpergewicht, die Körpergröße und der BMI ermittelt (siehe Anhang, Tabelle 59). Außerdem wurde die Körperzusammensetzung der Probanden mittels bioelektrischer Impedanzanalyse (Maltron-BF906, Jewell Medical, Gauting, Deutschland) bestimmt. Diese Bestimmung umfasste die Analyse der Fettmasse (FM), fettfreie Masse (FFM) und gesamtes Körperwasser (TBW). Ebenfalls wurde der Blutdruck der Probanden bestimmt und eine Blutentnahme durchgeführt um die Blutparameter Leukozyten-, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Hämoglobin-Konzentration, Hämatokrit-Wert, mittlere Zellvolumen (MCV), mittlerer Hämoglobin-Gehalt (MCH) und die mittlere Hämoglobin-Konzentration (MCHC) zu ermitteln. Zusätzlich wurden die Nierenparameter Kreatinin und Cystatin C, die Leberparameter γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sowie als Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) bestimmt. Die Analyse der Blutparameter erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin der Westpfalz Klinikum GmbH, Kaiserslautern.

Das ermittelte Alter der Probanden war $23,4 \pm 2,7$ Jahre und der mittlere BMI lag bei $23 \pm 1,6$ kg/m². Die medizinische Voruntersuchung gab keine Hinweise auf eine Erkrankung der Probanden.

8.1.4 Lebensmittel-Screening (Acrylamid-Gehalte)

Vor Beginn der Studie wurden einige hochoverhitze Lebensmittel, bei denen unter anderem aufgrund von Informationen von Überwachungsämtern ein hoher Acrylamid-Gehalt erwartet wurde ausgewählt und durch die Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland) auf ihren Acrylamid-Gehalt hin analysiert. Die Acrylamid-Bestimmung erfolgte mittels einer internen LC-MS/MS-Methode, deren LOQ bei 30 µg/kg lag.

Ziel der Acrylamid-Analyse war es die Lebensmittel auszuwählen, welche an Tag 4 (*medium AA*) und/oder Tag 7 (*high AA*) der Studie von den Probanden verzehrt werden sollten. Analysiert wurden Lebensmittel aus lokalen Supermärkten (Spritzgebäck, Cornflakes, Haferfleks, Kartoffelchips und Knäckebrot), vom *Institute for Scientific Information on Coffee* (ISIC) zu Verfügung gestellte Kaffeepadproben (Kaffeepulver A, B und C) sowie Lebensmittel die am Studienort zubereitet wurden (Bratwurst, paniertes Schnitzel, Pommes frites und Rösti).

Die Analysenergebnisse finden sich in Tabelle 58. Als Lebensmittel für die Studie ausgewählt wurden Spritzgebäck, Haferflakes, Kartoffelchips, Knäckebrot, Kaffeepulver B, Bratwurst sowie Pommes frites. Die tatsächlich während der Studie verzehrten Lebensmittel wiesen jedoch z. T. eine andere Charge auf als die analysierten Lebensmittel. Dies war der Fall, bei den Lebensmitteln, die in lokalen Supermärkten gekauft wurden. Bei den Lebensmitteln, die am Studienort zubereitet wurden, handelte es sich bei den während des Lebensmittel-Screening analysierten und den während der Studie verzehrten Lebensmitteln um die zum jeweiligen Zeitpunkt am Studienort angebotenen Lebensmittel. Zur Überprüfung der Acrylamid-Gehalte der tatsächlich von den Probanden verzehrten Lebensmittel wurden während der Studie Duplikate aller verzehrfertigen Lebensmittel homogenisiert, aliquotiert, bei -20 °C eingefroren und im Anschluss an die Studie analysiert (siehe Kapitel 4.2.3.1).

Tabelle 58: Lebensmittel-Screening (Acrylamid-Gehalte), Bestimmung durch die Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland)

Lebensmittel	n	Acrylamid [µg/kg]	ausgewählte Lebensmittel für Tag 4 und/oder Tag 7
Bratwurst	1	< LOQ	Tag 7
Spritzgebäck	1	84	Tag 4, Tag 7
Cornflakes	1	35	-
Haferfleks	1	140	Tag 4, Tag 7
Kaffeepulver A*	3	347 ± 21	-
Kaffeepulver B*	3	330 ± 17	Tag 4, Tag 7
Kaffeepulver C*	3	447 ± 6	-
Kartoffelchips	1	530	Tag 7
Knäckebrot	1	150	Tag 4, Tag 7
Paniertes Schnitzel	1	< LOQ	-
Pommes frites	1	270	Tag 7
Rösti	1	290	-

*Padkaffee: 7,5 g Kaffeepulver ± 1 Kaffeepad ± 125 ml Kaffeegetränk, LOQ: Bestimmungsgrenze (30 µg/kg), n: Anzahl der Analysen

8.1.5 Zusatzinformationen

Die Studie wurde am 4. März 2013 mit 15 männlichen Probanden begonnen. Am zweiten Studientag, dem 5. März 2013, beendete ein Proband die Studie jedoch frühzeitig. Die Studie wurde am 13. März 2013 mit 14 Probanden beendet.

8.2 Humanstudie II

8.2.1 Rechtliche Genehmigung

Der Ethikantrag zur Durchführung der Humanstudie wurde am 10. Januar 2015 bei der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz in Mainz gestellt. Nach Überprüfung durch die Ethikkommission wurde die finale Version am 2. April 2015 eingereicht und am 21. April 2015 mit der Nummer 837.029.15 (9797) genehmigt. Zur Bestimmung der Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA im Urin wurde am 9. Mai 2016 ein Zusatzantrag (Amendment) gestellt, welcher am 17. Mai 2016 genehmigt wurde.

8.2.2 Rekrutierung der Probanden

Für die Studie wurden 20 Probanden rekrutiert, von denen zehn Gemischtköstler (5 ♂, 5 ♀) und zehn Veganer (5 ♂, 5 ♀) waren. Die Probanden mussten kaukasischer Abstammung sein, ein Alter zwischen 20 und 50 Jahren und einen BMI von 19 - 25 kg/m² aufweisen. Des Weiteren mussten sie Nichtraucher sein und täglichen Kaffeekonsum gewöhnt sein. Ausschlusskriterien waren die Einnahmen von Medikamenten, metabolische Störungen, Leistungssport, Blutspende, die Teilnahme an anderen Studien sowie bei Frauen eine Schwangerschaft.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte im Mai 2015 an der Technischen Universität Kaiserslautern. Am 10. Juni 2015 fand eine Vorbesprechung statt bei der alle Teilnehmer detaillierte Informationen über die Studiendurchführung erhielten. Nach einer Bedenkzeit von mindestens 24 Stunden gaben die Probanden ihre informierte Zustimmung.

8.2.3 Medizinische Voruntersuchung

Einer medizinischen Voruntersuchung fand am 17. Juni 2015 an der Technischen Universität Kaiserslautern statt. Jeder Proband füllte einen gesundheitsbezogenen Fragebogen aus und es wurde das Alter, das Körpergewicht, die Körpergröße und der BMI ermittelt (siehe Anhang, Tabelle 74). Mittels bioelektrischer Impedanzanalyse (Maltron-BF906, Juwell Medical, Gauting, Deutschland) erfolgte die Bestimmung der Körperzusammensetzung (FM, FFM, TBW) der Probanden. Außerdem wurde der Blutdruck der Probanden bestimmt und eine Blutentnahme zur Analyse der Blutparameter Leukozyten-, Erythrozyten-, Thrombozyten- und Hämoglobin-Konzentration, Hämatokrit-Wert, MCV, MCH und MCHC durchgeführt. Ergänzend wurden als Parameter der Nierenfunktion Kreatinin, als Parameter der Leberfunktion γ -GT und als Entzündungsmarker CRP im Blut bestimmt. Die Analyse der Blutparameter erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin der Westpfalz Klinikum GmbH, Kaiserslautern.

Das ermittelte Alter der Probanden war $26,3 \pm 5,3$ Jahre und der mittlere BMI lag bei $22,2 \pm 2,2$ kg/m². Die medizinische Voruntersuchung gab keine Hinweise auf eine Erkrankung der Probanden.

9 Literaturverzeichnis

- 98/83/EG, Rat der Europäischen Union. Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch.
- 2007/331/EG, Europäische Kommission. Empfehlung der Kommission vom 3. Mai 2007 zur Überwachung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln.
- 2013/647/EU, Europäische Kommission. Empfehlung der Kommission vom 8. November 2013 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln.
- Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Appel, K. E. und Lampen, A. (2011). Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(9), 1277-1290.
- Adler, I.-D., Gonda, H., de Angelis, H., Jentsch, I., Otten, I. und Speicher, M. (2004). Heritable translocations induced by dermal exposure of male mice to acrylamide. *Cytogenetic and Genome Research*. 104(1-4), 271-276.
- Adler, I.-D., Reitmeir, P., Schmöller, R. und Schriever-Schwemmer, G. (1994). Dose response for heritable translocations induced by acrylamide in spermatids of mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 309(2), 285-291.
- Alarcon, R. (1970). Acrolein: IV. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 137(2), 365-372.
- Altaeva, A., Sycheva, L. und Belyaeva, N. (2011). Mutagenic Activity of Acrylamide in the Rat Thyroid Cells under Conditions of a Subacute Experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 152(2), 275-277.
- Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F. und Heinecke, J. W. (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. *Journal of Clinical Investigation*. 99(3), 424-432.
- Ang, J. E., Revell, V., Mann, A., Mäntele, S., Otway, D. T., Johnston, J. D., Thumser, A. E., Skene, D. J. und Raynaud, F. (2012). Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. *Chronobiology international*. 29(7), 868-881.
- Annola, K., Karttunen, V., Keski-Rahkonen, P., Myllynen, P., Segerbäck, D., Heinonen, S. und Vähäkangas, K. (2008). Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta. *Toxicology Letters*. 182(1), 50-56.
- Ao, L., Liu, S.-X., Yang, M.-S., Fong, C.-C., An, H. und Cao, J. (2008). Acrylamide-induced molecular mutation spectra at HPRT locus in human promyelocytic leukaemia HL-60 and NB4 cell lines. *Mutagenesis*. 23(4), 309-315.
- Auerbach, S. S., Mahler, J., Travlos, G. S. und Irwin, R. D. (2008). A comparative 90-day toxicity study of allyl acetate, allyl alcohol and acrolein. *Toxicology*. 253(1), 79-88.
- Ballance, P. (1961). Production of volatile compounds related to the flavour of foods from the Strecker degradation of DL-methionine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 12(7), 532-536.
- Bandarra, S., Fernandes, A. S., Magro, I., Guerreiro, P. S., Pingarilho, M., Churchwell, M. I., Gil, O. M., Batinić-Haberle, I., Gonçalves, S. und Rueff, J. (2013). Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis*. 28(6), 721-729.
- Barros, A., Comendador, M. und Sierra, L. (1994a). Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. II. Influence of mus201 and mus308 mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 306(1), 1-8.
- Barros, A., Sierra, L. und Comendador, M. (1994b). Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. III. Effects of metabolism modification. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 321(3), 119-126.

- Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Merz, K., Rudolphi, M., Zankl, H. und Eisenbrand, G. (2005). Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 61-69.
- Baum, M., Loeppky, R. N., Thielen, S. und Eisenbrand, G. (2008). Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-nitroso-oxazolidin-2-one. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15), 5989-5993.
- Becalski, A., Lau, B. P.-Y., Lewis, D., Seaman, S. W., Hayward, S., Sahagian, M., Ramesh, M. und Leclerc, Y. (2004). Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(12), 3801-3806.
- Bell, R. (1995). Windsor Air Quality Study data, Letter to R. Newhook. Health Canada, Atmospheric Studies Section, Energy, Science and Technology Branch, Ontario Ministry of Environment and Energy. Toronto, Ontario, November 1995.
- Bell, R. (1996). Hamilton Home Study data. Letter to J. Sealy, Health Canada, Atmospheric Studies Section, Energy, Science and Technology Branch, Ontario Ministry of Environment and Energy. Toronto, Ontario, May 1996.
- Bell, R. (1997). Hamilton Home Study data. Personal communication to R. Beauchamp, Health Canada, Atmospheric Studies Section, Energy, Science and Technology Branch, Ontario Ministry of Environment and Energy. Toronto, Ontario, September 1997.
- Bell, R., Chapman, R., Kruschel, B. und Spancer, M. (1994). A comparison of smoking and non-smoking areas: private homes and bingo halls. Proceedings of the U.S. Environmental Protection Agency / Air and Waste Management Association International Symposium, Durham, North Carolina.
- Berger, F. I., Feld, J., Bertow, D., Eisenbrand, G., Fricker, G., Gerhardt, N., Merz, K.-H., Richling, E. und Baum, M. (2011). Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: A study in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(3), 387-399.
- Bergmark, E. (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*. 10(1), 78-84.
- Berhane, K., Widersten, M., Engström, Å., Kozarich, J. W. und Mannervik, B. (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(4), 1480-1484.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2005). Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Stoffe soll in der EU harmonisiert werden - Stellungnahme Nr. 029/2005 des BfR vom 18. Mai 2005. Verfügbar auf www.bfr.de.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2010). Leitfaden für gesundheitliche Bewertungen. Verfügbar auf www.bfr.de.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2011). Acrylamid in Lebensmitteln - Stellungnahme Nr. 043/2011 des BfR vom 29. Juni 2011. Verfügbar auf www.bfr.de.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2017). Lebensmittelsicherheit. www.bfr.bund.de/de/lebensmittelsicherheit-3982.html.
- Bjellaas, T., Janak, K., Lundanes, E., Kronberg, L. und Becher, G. (2005). Determination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide. *Xenobiotica*. 35(10-11), 1003-1018.
- Bjellaas, T., Olesen, P. T., Frandsen, H., Haugen, M., Stølen, L. H., Paulsen, J. E., Alexander, J., Lundanes, E. und Becher, G. (2007a). Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicological Sciences*. 98(1), 110-117.
- Bjellaas, T., Stølen, L. H., Haugen, M., Paulsen, J. E., Alexander, J., Lundanes, E. und Becher, G. (2007b). Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*. 45(6), 1020-1026.
- BMEL, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2017). Sichere Lebensmittel. www.bmel.de/DE/Ernaehrung/SichereLebensmittel/sichereLebensmittel_node.html.

- Boettcher, M. I., Bolt, H. M., Drexler, H. und Angerer, J. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives of Toxicology*. 80(2), 55-61.
- Boettcher, M. I., Schettgen, T., Kütting, B., Pischetsrieder, M. und Angerer, J. (2005). Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 167-176.
- Bramer, S. L. und Kallungal, B. A. (2003). Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers*. 8(3-4), 187-203.
- Brantsæter, A. L., Haugen, M., de Mul, A., Bjellaas, T., Becher, G., Van Klaveren, J., Alexander, J. und Meltzer, H. M. (2008). Exploration of different methods to assess dietary acrylamide exposure in pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Food and Chemical Toxicology*. 46(8), 2808-2814.
- Brisson, B., Ayotte, P., Normandin, L., Gaudreau, É., Bienvenu, J.-F., Fennell, T. R., Blanchet, C., Phaneuf, D., Lapointe, C. und Bonvalot, Y. (2014). Relation between dietary acrylamide exposure and biomarkers of internal dose in Canadian teenagers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 24(2), 215-221.
- Burek, J., Albee, R., Beyer, J., Bell, T., Carreon, R., Morden, D., Wade, C., Hermann, E. und Gorzinski, S. (1980). Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*. 4(5-6), 157-182.
- Butterworth, B. E., Eldridge, S. R., Sprankle, C. S., Working, P. K., Bentley, K. S. und Hurtt, M. E. (1992). Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 20(3), 148-155.
- BVL, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2010). Ergebnisse der 8. Signalwert-Berechnung mit statistischen Kennzahlen. Verfügbar auf www.bvl.bund.de.
- BVL, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2015). Acrylamidgehalte in Lebensmitteln im Untersuchungszeitraum Januar 2013 - Februar 2015 (xls, 50 KB, nicht barrierefrei). Verfügbar auf www.bvl.bund.de.
- Cai, J., Bhatnagar, A. und Pierce Jr, W. M. (2009). Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chemical Research in Toxicology*. 22(4), 708-716.
- Carmella, S. G., Chen, M., Zhang, Y., Zhang, S., Hatsukami, D. K. und Hecht, S. S. (2007). Quantitation of acrolein-derived (3-hydroxypropyl) mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chemical Research in Toxicology*. 20(7), 986-990.
- Casella, I. G. und Contursi, M. (2004). Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(19), 5816-5821.
- Chiang, W.-C., Chen, C.-Y., Lee, T.-C., Lee, H.-L. und Lin, Y.-W. (2015). Fast and simple screening for the simultaneous analysis of seven metabolites derived from five volatile organic compounds in human urine using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 132, 469-478.
- Cohen, S. M., Garland, E. M., John, M. S., Okamura, T. und Smith, R. A. (1992). Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research*. 52(13), 3577-3581.
- Collin, S., Osman, M., Delcambre, S., El-Zayat, A. I. und Dufour, J. P. (1993). Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(10), 1659-1663.
- Committee on Carcinogenicity, Committee on Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (2012). Risk Characterisation Methods. COC/G 06. Version 1.0.
- Curren, R. D., Yang, L. L., Conklin, P. M., Grafstrom, R. C. und Harris, C. C. (1988). Mutagenesis of xeroderma pigmentosum fibroblasts by acrolein. *Mutation Research Letters*. 209(1-2), 17-22.
- Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C. und Brown, S. A. (2012). The human circadian metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(7), 2625-2629.

- DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft (2001). *Biological Monitoring: Heutige und Künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH. ISBN: 3527621210.
- DGE, Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2016). *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Bonn, Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE). 2. aktualisierte Ausgabe. ISBN: 978-3-86528-148-7.
- DGF, Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (2012). *Optimal Frittieren - Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft*. Verfügbar auf www.dgfett.de.
- Ding, Y. S., Blount, B. C., Valentin-Blasini, L., Applewhite, H. S., Xia, Y., Watson, C. H. und Ashley, D. L. (2009). Simultaneous determination of six mercapturic acid metabolites of volatile organic compounds in human urine. *Chemical Research in Toxicology*. 22(6), 1018-1025.
- Dobrzynska, M. M. (2007). Assessment of DNA damage in multiple organs from mice exposed to X-rays or acrylamide or a combination of both using the comet assay. *In Vivo*. 21(4), 657-662.
- Doerge, D. R., da Costa, G. G., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C. und Beland, F. A. (2005a). DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 131-141.
- Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Boettcher, M. I., McDaniel, L. P. und Angerer, J. (2007). Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F 1 mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicology Letters*. 169(1), 34-42.
- Doerge, D. R., Young, J. F., Chen, J. J., DiNovi, M. J. und Henry, S. H. (2008). Using dietary exposure and physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in human risk extrapolations for acrylamide toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15), 6031-6038.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddle, N. C. und Churchwell, M. I. (2005b). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F 1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 202(3), 258-267.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddle, N. C. und Churchwell, M. I. (2005c). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 208(3), 199-209.
- Dorman, D. C., Struve, M. F., Wong, B. A., Marshall, M. W., Gross, E. A. und Willson, G. A. (2008). Respiratory tract responses in male rats following subchronic acrolein inhalation. *Inhalation Toxicology*. 20(3), 205-216.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D. und Kirchheiner, J. (2009). In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 18(2), 433-443.
- Duale, N., Bjellaas, T., Alexander, J., Becher, G., Haugen, M., Paulsen, J. E., Frandsen, H., Olesen, P. T. und Brunborg, G. (2009). Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicological Sciences*. 108(1), 90-99.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Sroka, P. und Satora, P. (2016). A review of the interactions between acrylamide, microorganisms and food components. *Food & Function*. 7(3), 1282-1295.
- Eckert, E., Schmid, K., Schaller, B., Hiddemann-Koca, K., Drexler, H. und Göen, T. (2011). Mercapturic acids as metabolites of alkylating substances in urine samples of German inhabitants. *International journal of hygiene and environmental health*. 214(3), 196-204.
- EFSA, Scientific Committee of the European Food Safety Authority (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal*. 282, 1-31.
- EFSA, European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010a). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*. 8(3):1462 [77 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010b). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*. 8(3):1461 [107 pp.].

- EFSA, European Food Safety Authority (2011). Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007–2009 and exposure assessment. *EFSA Journal*. 9(4):2133 [48 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for energy. *EFSA Journal*. 11(1):3005 [112 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (2015a). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*. 13(6): 4104 [321 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2015b). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal*. 10(2):2557 [66 pp.].
- EFSA, European Food Safety Authority (2016). Chemicals in food 2016 - Overview of selected data collection. ISBN: 978-92-9199-888-3.
- Engels, C., Schwab, C., Zhang, J., Stevens, M. J., Bieri, C., Ebert, M.-O., McNeill, K., Sturla, S. J. und Lacroix, C. (2016). Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific reports*. 6.
- Environment Canada (1996). National Air Pollution Surveillance (NAPS) database. Air Toxics Section, Pollution Measurement Division, Conservation and Protection. Ottawa, Ontario.
- Environment Canada, Health Canada (2000). Priority substances list assessment report for Acrolein. ISBN: 0-662-28654-5.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. und Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11(1), 81-128.
- Europäische Kommission (2011). Empfehlung der Kommission vom 10.1.2011 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln.
- Ewert, A., Granvogl, M. und Schieberle, P. (2011). Development of two stable isotope dilution assays for the quantitation of acrolein in heat-processed fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(8), 3582-3589.
- Ewert, A., Granvogl, M. und Schieberle, P. (2014). Isotope-Labeling Studies on the Formation Pathway of Acrolein during Heat Processing of Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(33), 8524-8529.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization (2002). Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization (2006). Safety evaluation of certain contaminants in food. Prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *FAO Food and Nutrition Paper / WHO Food Additives Series*. 82 / 55.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *FAO JECFA Monographs / WHO Food Additives Series*. 8 / 63.
- Fekry, M. I., Engels, C., Zhang, J., Schwab, C., Lacroix, C., Sturla, S. J. und Chassard, C. (2016). The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP). *Environmental microbiology reports*. 8(2), 201-209.
- Fennell, T. R. und Friedman, M. A., (2005). Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Chemistry and Safety of Acrylamide in food*, Springer 109-116.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Burgess, J. und Friedman, M. A. (2006). Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*. 93(2), 256-267.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W. E. und Friedman, M. A. (2005). Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*. 85(1), 447-459.

- Ferguson, S. A., Garey, J., Smith, M. E., Twaddle, N. C., Doerge, D. R. und Paule, M. G. (2010). Prewaning behaviors, developmental landmarks, and acrylamide and glycidamide levels after pre- and postnatal acrylamide treatment in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 32(3), 373-382.
- Feron, V., Til, H., De Vrijer, F., Woutersen, R., Cassee, F. und Van Bladeren, P. (1991). Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 259(3-4), 363-385.
- Ferrari, P., Freisling, H., Duell, E. J., Kaaks, R., Lujan-Barroso, L., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Nailler, L., Polidoro, S. und Mattiello, A. (2013). Challenges in estimating the validity of dietary acrylamide measurements. *European Journal of Nutrition*. 52(5), 1503-1512.
- Fohgelberg, P., Rosén, J., Hellenäs, K.-E. und Abramsson-Zetterberg, L. (2005). The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life—an improved method for analysis of acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*. 43(6), 951-959.
- FoodDrinkEurope (2014). Acrylamide. Toolbox 2013. Verfügbar auf www.fooddrinkeurope.eu/publication/fooddrinkeurope-updates-industry-wide-acrylamide-toolbox/.
- Friedman, M. A., Dulak, L. H. und Stedham, M. A. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Toxicological Sciences*. 27(1), 95-105.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P. und Jakob, V. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 15(2), 266-271.
- Fullerton, P. M. und Barnes, J. (1966). Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *British Journal of Industrial Medicine*. 23(3), 210-221.
- Galdo, V. C., Massart, C., Jin, L., Vanvooren, V., Caillet-Fauquet, P., Andry, G., Lothaire, P., Dequanter, D., Friedman, M. und Van Sande, J. (2006). Acrylamide, an in vivo thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 257, 6-14.
- Galloway, S., Armstrong, M., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A., Nakamura, F., Ahmed, M. und Duk, S. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 10(S10), 1-35.
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Von Tungeln, L. S., Beland, F. A., Marques, M. M. und Doerge, D. R. (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research in Toxicology*. 16(10), 1328-1337.
- Garey, J. und Paule, M. G. (2007). Effects of chronic low-dose acrylamide exposure on progressive ratio performance in adolescent rats. *Neurotoxicology*. 28(5), 998-1002.
- Garey, J. und Paule, M. G. (2010). Effects of chronic oral acrylamide exposure on incremental repeated acquisition (learning) task performance in Fischer 344 rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 32(2), 220-225.
- Gertz, C. und Klostermann, S. (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104(11), 762-771.
- Ghanayem, B., Witt, K., Kissling, G., Tice, R. und Recio, L. (2005a). Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 578(1), 284-297.
- Ghanayem, B. I., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Snyder, R., Fennell, T. R. und Doerge, D. R. (2005b). Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences*. 88(2), 311-318.
- Ghanayem, B. I., Witt, K., El-Hadri, L., Hoffler, U., Kissling, G., Shelby, M. und Bishop, J. (2005c). Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biology of Reproduction*. 72(1), 157-163.
- Ginsberg, G., Smolenski, S., Hattis, D., Guyton, K. Z., Johns, D. O. und Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in glutathione transferases (GST): population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 12(5-6), 389-439.

- Göbel, A. und Kliemant, A. (2007). The German minimization concept for acrylamide. *Food additives and contaminants*. 24(sup1), 82-90.
- Goempel, K., Tedsen, L., Ruenz, M., Bakuradze, T., Schipp, D., Galan, J., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2017). Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background. *Archives of Toxicology*. DOI: 10.1007/s00204-017-1990-1.
- Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Köksel, H. und Acar, J. (2007). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*. 104(3), 1136-1142.
- Gökmen, V., Palazoğlu, T. K. und Şenyuva, H. Z. (2006). Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*. 77(4), 972-976.
- Granvogl, M. (2014). Development of three stable isotope dilution assays for the quantitation of (E)-2-butenal (crotonaldehyde) in heat-processed edible fats and oils as well as in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(6), 1272-1282.
- Greenhoff, K. und Wheeler, R. (1981). Analysis of beer carbonyls at the part per billion level by combined liquid chromatography and high pressure liquid chromatography. *Journal of the Institute of Brewing*. 87(1), 35-41.
- Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A.-L., Malmberg, B., Aprea, P. und Granath, F. (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 219-226.
- Hagmar, L., Wirfält, E., Paulsson, B. und Törnqvist, M. (2005). Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 157-165.
- Hansen, S. H., Olsen, A. K., Sørderlund, E. J. und Brunborg, G. (2010). In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 696(1), 55-61.
- Hartmann, E. C., Boettcher, M. I., Schettgen, T., Fromme, H., Drexler, H. und Angerer, J. r. (2008). Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15), 6061-6068.
- Hartmann, E. C., Latzin, J. M., Schindler, B. K., Koch, H. M. und Angerer, J. (2011). Excretion of 2, 3-dihydroxypropionamide (OH-PA), the hydrolysis product of glycidamide, in human urine after single oral dose of deuterium-labeled acrylamide. *Archives of Toxicology*. 85(6), 601-606.
- Hashimoto, K. und Aldridge, W. (1970). Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochemical Pharmacology*. 19(9), 2591-2604.
- Hashmi, M., Vamvakas, S. und Anders, M. (1992). Bioactivation mechanism of S-(3-oxopropyl)-N-acetyl-L-cysteine, the mercapturic acid of acrolein. *Chemical Research in Toxicology*. 5(3), 360-365.
- HBC, Human Biomonitoring Commission (2005). Normierung von Stoffgehalten im Urin-Kreatinin. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz*. 48, 616-618.
- Hecht, S. S., Koh, W.-P., Wang, R., Chen, M., Carmella, S. G., Murphy, S. E. und Yuan, J.-M. (2015). Elevated levels of mercapturic acids of acrolein and crotonaldehyde in the urine of Chinese women in Singapore who regularly cook at home. *PLoS ONE*. 10(3).
- Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R. und Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(10), 4168-4176.
- Heudorf, U., Hartmann, E. und Angerer, J. (2009). Acrylamide in children—exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 212(2), 135-141.
- Higashi, K., Igarashi, K. und Toida, T. (2016). Recent Progress in Analytical Methods for Determination of Urinary 3-Hydroxypropylmercapturic Acid, a Major Metabolite of Acrolein. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 39(6), 915-919.

- Hoenicke, K. und Gatermann, R. (2005). Studies on the stability of acrylamide in food during storage. *Journal of AOAC International*. 88(1), 268-273.
- Horvath, J. J., Witmer, C. M. und Witz, G. (1992). Nephrotoxicity of the 1: 1 acrolein-glutathione adduct in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 117(2), 200-207.
- Huang, C.-C. J., Li, C.-M., Wu, C.-F., Jao, S.-P. und Wu, K.-Y. (2007). Analysis of urinary N-acetyl-S-(propionamide)-cysteine as a biomarker for the assessment of acrylamide exposure in smokers. *Environmental Research*. 104(3), 346-351.
- Huang, C.-C. J., Wu, C.-F., Shih, W.-C., Luo, Y.-S., Chen, M.-F., Li, C.-M., Liou, S.-H., Chung, W.-S., Chiang, S.-Y. und Wu, K.-Y. (2015). Potential Association of Urinary N 7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl) Guanine with Dietary Acrylamide Intake of Smokers and Nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*. 28(1), 43-50.
- Huang, Y.-F., Chen, M.-L., Liou, S.-H., Chen, M.-F., Uang, S.-N. und Wu, K.-Y. (2011). Association of CYP2E1, GST and mEH genetic polymorphisms with urinary acrylamide metabolites in workers exposed to acrylamide. *Toxicology Letters*. 203(2), 118-126.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1994). Some Industrial Chemicals. Acrylamide. Summary of data reported and Evaluation. *IARC Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risks to Humans*. 60.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1995). Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 63.
- IFA, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (2017). GESTIS-Stoffdatenbank, Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank/.
- Jackson, L. (2014). Personal communication to European Food Safety Authority
- Jain, R. B. (2015a). Distributions of selected urinary metabolites of volatile organic compounds by age, gender, race/ethnicity, and smoking status in a representative sample of US adults. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40(2), 471-479.
- Jain, R. B. (2015b). Levels of selected urinary metabolites of volatile organic compounds among children aged 6-11 years. *Environmental Research*. 142, 461-470.
- Ji, K., Kang, S., Lee, G., Lee, S., Jo, A., Kwak, K., Kim, D., Kho, D., Lee, S. und Kim, S. (2013). Urinary levels of N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-cysteine (AAMA), an acrylamide metabolite, in Korean children and their association with food consumption. *Science of the Total Environment*. 456, 17-23.
- Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L. und Zhong, L. (2007). Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*. 21(8), 1486-1492.
- Johansson, F., Lundell, T., Rydberg, P., Erixon, K. und Jenssen, D. (2005). Mutagenicity and DNA repair of glycidamide-induced adducts in mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 81-89.
- Johnson, K. A., Gorzinski, S. J., Bodner, K. M., Campbell, R. A., Wolf, C. H., Friedman, M. A. und Mast, R. W. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 85(2), 154-168.
- Jones, D. P., Coates, R. J., Flagg, E. W., Eley, J. W., Block, G., Greenberg, R. S., Gunter, E. W. und Jackson, B. (1992). Glutathione in foods listed in the National Cancer Institute's health habits and history food frequency questionnaire. *Nutrition and Cancer*. 17(1), 57-75
- Kadry, A. M., Friedman, M. A. und Abdel-Rahman, M. S. (1999). Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. 7(2), 127-133.
- Kasukawa, T., Sugimoto, M., Hida, A., Minami, Y., Mori, M., Honma, S., Honma, K.-i., Mishima, K., Soga, T. und Ueda, H. R. (2012). Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(37), 15036-15041.
- Katic, J., Cemeli, E., Baumgartner, A., Laubenthal, J., Bassano, I., Stølevik, S. B., Granum, B., Namork, E., Nygaard, U. C. und Løvik, M. (2010). Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental

- compounds with the in vitro micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10), 2612-2623.
- Kellert, M., Scholz, K., Wagner, S., Dekant, W. und Völkel, W. (2006). Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1131(1), 58-66.
- Kim, S.-i., Pfeifer, G. P. und Besaratinia, A. (2007). Lack of mutagenicity of acrolein-induced DNA adducts in mouse and human cells. *Cancer Research*. 67(24), 11640-11647.
- Kopp, E. K. und Dekant, W. (2009). Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 235(2), 135-142.
- Kopp, E. K., Sieber, M., Kellert, M. und Dekant, W. (2008). Rapid and sensitive HILIC-ESI-MS/MS quantitation of polar metabolites of acrylamide in human urine using column switching with an online trap column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(21), 9828-9834.
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S. und Kinae, N. (2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 603(2), 151-158.
- Koyama, N., Yasui, M., Kimura, A., Takami, S., Suzuki, T., Masumura, K., Nohmi, T., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Imai, T. und Honma, M. (2011a). Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis*. 26(4), 545-549.
- Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N. und Honma, M. (2011b). Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 52(1), 11-19.
- Kraus, D., Rokitta, D., Fuhr, U. und Tomalik-Scharte, D. (2013). The role of human cytochrome P450 enzymes in metabolism of acrylamide in vitro. *Toxicology mechanisms and methods*. 23(5), 346-351.
- Kuballa, T., Lachenmeier, D. und Gary, M. (2012). Deutscher Lebensmittelchemikertag in Halle: Analytik, Acrolein in Spirituosen und Fetten/Ölen. *Lebensmittelchemie*. 66, 17-19.
- Kütting, B., Uter, W. und Drexler, H. (2008). The association between self-reported acrylamide intake and hemoglobin adducts as biomarkers of exposure. *Cancer Causes & Control*. 19(3), 273-281.
- Lane, R. und Smathers, J. (1990). Monitoring aldehyde production during frying by reversed-phase liquid chromatography. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 74(6), 957-960.
- Latzin, J. M., Schindler, B. K., Weiss, T., Angerer, J. und Koch, H. M. (2012). Determination of 2, 3-dihydroxypropionamide, an oxidative metabolite of acrylamide, in human urine by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402(7), 2431-2438.
- Lee, J. H., Lee, K. J., Ahn, R. und Kang, H. S. (2014). Urinary concentrations of acrylamide (AA) and N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-cysteine (AAMA) and associations with demographic factors in the South Korean population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 217(7), 751-757.
- Lee, Y. und Sayre, L. M. (1998). Reaffirmation that metabolism of polyamines by bovine plasma amine oxidase occurs strictly at the primary amino termini. *Journal of Biological Chemistry*. 273(31), 19490-19494.
- Li, C. M., Hu, C. W. und Wu, K. Y. (2005). Quantification of urinary N-acetyl-S-(propionamide) cysteine using an on-line clean-up system coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 40(4), 511-515.
- Li, G., Wang, L., Fei, T., Liu, H., Wu, D. und Zheng, S. (2015). Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Combined with HPLC-MS/MS for the Determination of Seven Mercapturic Acids in Human Urine. *Chromatographia*. 78(9-10), 641-648.
- Li, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J. und Zhong, L. (2008). The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. *Free Radical Research*. 42(4), 354-361.
- Limberg, C., (2006). The SOHIO Process as an Inspiration for Molecular Organometallic Chemistry. *Organometallic Oxidation Catalysis*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 79-95. ISBN: 9783540372097.

- Linhart, I., Frantík, E., Vosmanská, M., Šmejkal, J. und Mitera, J. (1996). Biotransformation of acrolein in rat: excretion of mercapturic acids after inhalation and intraperitoneal injection. *Toxicology and applied pharmacology*. 136(1), 155-160.
- LoPachin, R. M. und Gavin, T. (2008). Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56(15), 5994-6003.
- LoPachin, R. M. und Gavin, T. (2012). Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environmental health perspectives*. 120(12), 1650.
- Maillard, L. C. (1912). Action des acidesamines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *Compte-rendu de l'Académie des sciences (Paris)*. 154, 66-68.
- MAK-Kommission, DFG Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (2012a). 2-Propenal (Acrolein) [MAK Value Documentation in German language, 1997]. *The MAK Collection for Occupational Health and Safety* 1-31.
- MAK-Kommission, DFG Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (2012b). Acrylamid [MAK Value Documentation in German language, 2007]. *The MAK Collection for Occupational Health and Safety* 1-52.
- Manière, I., Godard, T., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Guffroy, M., Laurentie, M. und Poul, J.-M. (2005). DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580(1), 119-129.
- Manjanatha, M. G., Aidoo, A., Shelton, S. D., Bishop, M. E., McDaniel, L. P., Lyn-Cook, L. E. und Doerge, D. R. (2006). Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 47(1), 6-17.
- Manson, J., Brabec, M. J., Buelke-Sam, J., Carlson, G. P., Chapin, R. E., Favor, J. B., Fischer, L. J., Hattis, D., Lees, P. S. und Perreault-Darney, S. (2005). NTP-CERHR Expert Panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 74(1), 17-113.
- Marquard, S., Eichhorn, S. und Otto, S., (2010). *Steak pur!*. Königswinter, HEEL Verlag GmbH ISBN: 978-3-86852-182-5.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E. und Arrigo, T. (2015). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*. 16(1), 378-400.
- Martins, C., Oliveira, N. G., Pingarilho, M., da Costa, G. G., Martins, V., Marques, M. M., Beland, F. A., Churchwell, M. I., Doerge, D. R. und Rueff, J. (2007). Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts. *Toxicological Sciences*. 95(2), 383-390.
- Matthäus, (2002). Präsentationen: Acrylamidgehalte von im Backofen zubereiteten Pommes Frites und von Reibekuchen. BAGKF, Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel und Fettforschung. Verfügbar auf www.bfr.bund.de
- Matthäus, B., Haase, N. U. und Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 106(11), 793-801.
- McCollister, D., Oyen, F. und Rowe, V. (1964). Toxicology of acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 6(2), 172-181.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M. I., Guo, L., Moore, M. M., Doerge, D. R. und Chen, T. (2008). Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2), 628-636.
- Miller, B. E. und Danielson, N. D. (1988). Derivatization of vinyl aldehydes with anthrone prior to high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Analytical Chemistry*. 60(7), 622-626.
- Miller, M., Carter, D. und Sipes, I. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 63(1), 36-44.

- Minet, E., Cheung, F., Errington, G., Sterz, K. und Scherer, G. (2011). Urinary excretion of the acrylonitrile metabolite 2-cyanoethylmercapturic acid is correlated with a variety of biomarkers of tobacco smoke exposure and consumption. *Biomarkers*. 16(1), 89-96.
- Moldoveanu, S. C. und Gerardi, A. R. (2011). Acrylamide Analysis in Tobacco, Alternative Tobacco Products, and Cigarette Smoke. *Journal of Chromatographic Science*. 49(3), 234-242.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. und Dodson, A. T. (2002). Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*. 419(6906), 448-449.
- Naruszewicz, M., Zapolska-Downar, D., Kośmider, A., Nowicka, G., Kozłowska-Wojciechowska, M., Vikström, A. S. und Törnqvist, M. (2009). Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 89(3), 773-777.
- Nath, R. G. und Chung, F.-L. (1994). Detection of exocyclic 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(16), 7491-7495.
- Nath, R. G., Ocando, J. E. und Chung, F.-L. (1996). Detection of 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. *Cancer Research*. 56(3), 452-456.
- Nath, R. G., Ocando, J. E., Guttenplan, J. B. und Chung, F.-L. (1998). 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Research*. 58(4), 581-584.
- Neafsey, P., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z. und Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 12(5-6), 362-388.
- Nixon, B., Stanger, S., Nixon, B. und Roman, S. (2012). Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice. *Toxicological Sciences*. 129(1), 135-145.
- Nixon, B. J., Katen, A. L., Stanger, S. J., Schjenken, J. E., Nixon, B. und Roman, S. D. (2014). Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *PLoS ONE*. 9(5).
- NTP, National Toxicology Program (2006). NTP Technical Report on the comparative toxicity studies of allyl acetate (CAS No. 591-87-7), allyl alcohol (CAS No. 107-18-6) and acrolein (CAS No. 107-02-8) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicology Report Series. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Report Number: 48.
- NTP, National Toxicology Program (2011). Report on Carcinogens, Twelfth Edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Report Number: 1551-8280.
- NTP, National Toxicology Program (2012). NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Report Number: TR 575.
- Ohara-Takada, A., Matsuura-Endo, C., Chuda, Y., Hiroshi, O., Hiroshi, Y., Yoshida, M., Kobayashi, A., Tsuda, S., Takigawa, S. und Takahiro, N. (2005). Change in content of sugars and free amino acids in potato tubers under short-term storage at low temperature and the effect on acrylamide level after frying. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69(7), 1232-1238.
- Oruna-Concha, M. J., Duckham, S. C. und Ames, J. M. (2001). Comparison of volatile compounds isolated from the skin and flesh of four potato cultivars after baking. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49(5), 2414-2421.
- Osório, V. M. und de Lourdes Cardeal, Z. (2011). Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218(21), 3332-3336.
- Ou, S., Shi, J., Huang, C., Zhang, G., Teng, J., Jiang, Y. und Yang, B. (2010). Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *Journal of Hazardous Materials*. 182(1), 863-868.

- Outzen, M., Egeberg, R., Dragsted, L., Christensen, J., Olesen, P. T., Frandsen, H., Overvad, K., Tjønneland, A. und Olsen, A. (2011). Dietary determinants for Hb-acrylamide and Hb-glycidamide adducts in Danish non-smoking women. *British Journal of Nutrition*. 105(09), 1381-1387.
- Pabst, K., Mathar, W., Palavinskas, R., Meisel, H., Blüthgen, A. und Klaffke, H. (2005). Acrylamide-occurrence in mixed concentrate feed for dairy cows and carry-over into milk. *Food Additives and Contaminants*. 22(3), 210-213.
- Panosyan, A., Mamikonyan, G., Torosyan, M., Gabrielyan, E., Mkhitarian, S., Tirakyan, M. und Ovanesyan, A. (2001). Determination of the composition of volatiles in cognac (brandy) by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*. 56(10), 945-952.
- Parent, R. A., Caravello, H. C., Balmer, M. F., Shellenberger, T. E. und Long, J. E. (1992a). One-year toxicity of orally administered acrolein to the beagle dog. *Journal of Applied Toxicology*. 12(5), 311-316.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. und Harbell, J. W. (1991a). Gene mutation assay of acrolein in the CHO/HGPRT test system. *Journal of Applied Toxicology*. 11(2), 91-95.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. und Long, J. E. (1991b). Oncogenicity study of acrolein in mice. *International Journal of Toxicology*. 10(6), 647-659.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. und Long, J. E. (1992b). Two-year toxicity and carcinogenicity study of acrolein in rats. *Journal of Applied Toxicology*. 12(2), 131-139.
- Parent, R. A., Caravello, H. E. und Sharp, D. E. (1996). Metabolism and distribution of [2, 3-¹⁴C] acrolein in Sprague-Dawley rats. *Journal of Applied Toxicology*. 16(5), 449-457.
- Parent, R. A., Paust, D. E., Schrimpf, M. K., Talaat, R. E., Doane, R. A., Caravello, H. E., Lee, S. J. und Sharp, D. E. (1998). Metabolism and distribution of [2, 3-¹⁴C] acrolein in Sprague-Dawley rats II. Identification of urinary and fecal metabolites. *Toxicological Sciences*. 43(2), 110-120.
- Patel, J., Wood, J. C. und Leibman, K. C. (1980). The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metabolism and Disposition*. 8(5), 305-308.
- Pedersen, M., Von Stedingk, H., Botsivali, M., Agramunt, S., Alexander, J., Brunborg, G., Chatzi, L., Fleming, S., Fthenou, E. und Granum, B. (2012). Birth weight, head circumference, and prenatal exposure to acrylamide from maternal diet: the European prospective mother-child study (NewGeneris). *Environmental health perspectives*. 120(12), 1739-1745.
- Pedreschi, F., Kaack, K. und Granby, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT-Food Science and Technology*. 37(6), 679-685.
- Pedreschi, F., Kaack, K. und Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*. 109(2), 386-392.
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Galeone, C. und La Vecchia, C. (2015). Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 136(12), 2912-2922.
- Penn, A., Nath, R., Pan, J., Chen, L., Widmer, K., Henk, W. und Chung, F.-L. (2001). 1, N (2)-propanodeoxyguanosine adduct formation in aortic DNA following inhalation of acrolein. *Environmental Health Perspectives*. 109(3), 219-224.
- Pingarilho, M., Oliveira, N. G., Martins, C., Gomes, B. C., Fernandes, A. S., Martins, V., Labilloy, A., de Lima, J. P., Rueff, J. und Gaspar, J. F. (2013). Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: Role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 752(1), 1-7.
- Ramu, K., Fraiser, L. H., Mamiya, B., Ahmed, T. und Kehrer, J. P. (1995). Acrolein mercapturates: synthesis, characterization, and assessment of their role in the bladder toxicity of cyclophosphamide. *Chemical Research in Toxicology*. 8(4), 515-524.
- Recio, L., Hobbs, C., Caspary, W. und Witt, K. L. (2010). Dose-response Assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus and Comet assay protocol. *The Journal of Toxicological Sciences*. 35(2), 149-162.
- Rodriguez-Saona, L. E. und Wrolstad, R. E. (1997). Influence of potato composition on chip color quality. *American Journal of Potato Research*. 74(2), 87-106.

- Rothfuss, A., O'Donovan, M., De Boeck, M., Brault, D., Czich, A., Custer, L., Hamada, S., Plappert-Helbig, U., Hayashi, M. und Howe, J. (2010). Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 702(1), 40-69.
- Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2016). Monitoring urinary mercapturic acids as biomarkers of human dietary exposure to acrylamide in combination with acrylamide uptake assessment based on duplicate diets. *Archives of Toxicology*. 90(4), 873-881.
- Russell, L. B., Hunsicker, P. R., Cacheiro, N. L. und Generoso, W. M. (1991). Induction of specific-locus mutations in male germ cells of the mouse by acrylamide monomer. *Mutation Research Letters*. 262(2), 101-107.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. und Törnqvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(24), 7012-7018.
- Sanchez, A. M., Minko, I. G., Kurtz, A. J., Kanuri, M., Moriya, M. und Lloyd, R. S. (2003). Comparative evaluation of the bioreactivity and mutagenic spectra of acrolein-derived α -HOPdG and γ -HOPdG regioisomeric deoxyguanosine adducts. *Chemical Research in Toxicology*. 16(8), 1019-1028.
- Schabacker, J., Schwend, T. und Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(12), 4021-4025.
- Schettgen, T., Musiol, A. und 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 Communications in Mass Spectrometry*. 22(17), 2629-2638.
- Schuh, C. (1992). Entwicklung eines Meßverfahrens zur Bestimmung kurzketziger aliphatischer Aldehyde in Küchendämpfen und Expositionsmessungen in Küchen. Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Kaiserslautern.
- SCOEL, Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (2011). Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Acrylamide. SCOEL/SUM/139.
- Seaman, V. Y., Bennett, D. H. und Cahill, T. M. (2007). Origin, occurrence, and source emission rate of acrolein in residential indoor air. *Environmental Science & Technology*. 41(20), 6940-6946.
- Sega, G. A., Generoso, E. E., Brimer, P. A. und Malling, H. (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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 16(3), 137-142.
- Sierra, L., Barros, A., Garcia, M., Ferreiro, J. und Comendador, M. (1991). Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. I. Somatic and germinal mutagenesis under proficient repair conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 260(3), 247-256.
- SKLM, Senatskommission der Deutsche Forschungsgemeinschaft zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (2012). Thermisch induzierte/prozessbedingte Kontaminanten: Das Beispiel Acrolein und der Vergleich zu Acrylamid. Verfügbar auf www.dfg.de.
- Skog, K. und Alexander, J., (2006). *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*, Woodhead Publishing. ISBN: 1845692012.
- Smith, R., Cohen, S. M. und Lawson, T. (1990). Acrolein mutagenicity in the V79 assay. *Carcinogenesis*. 11(3), 497-498.
- Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F. und Segal, A. (1985). Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Research*. 45(8), 3465-3470.
- Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A. und Landersdorfer, C. (2003). 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), 267-274.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M.-C. und Riediker, S. (2002). Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 419(6906), 449-450.

- Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. und Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(17), 5550-5558.
- Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(1), 7-25.
- Sumner, S. C., Fennell, T. R., Moore, T. A., Chanas, B., Gonzalez, F. und Ghanayem, B. I. (1999). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research in Toxicology*. 12(11), 1110-1116.
- Sumner, S. C., MacNeela, J. P. und Fennell, T. R. (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1, 2, 3-¹³C] acrylamide in rats and mice using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology*. 5(1), 81-89.
- Sumner, S. C., Williams, C. C., Snyder, R. W., Krol, W. L., Asgharian, B. und Fennell, T. R. (2003). Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicological Sciences*. 75(2), 260-270.
- Tareke, E., Heinze, T. M., Gamboa da Costa, G. und Ali, S. (2009). Acrylamide formed at physiological temperature as a result of asparagine oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(20), 9730-9733.
- Tareke, E., Lyn-Cook, B., Robinson, B. und Ali, S. F. (2008). Acrylamide: a dietary carcinogen formed in vivo? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15), 6020-6023.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. und Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17), 4998-5006.
- Tareke, E., Twaddle, N. C., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Young, J. F. und Doerge, D. R. (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. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 217(1), 63-75.
- Thielen, S., Baum, M., Hoffmann, M., Loeppky, R. N. und Eisenbrand, G. (2006). Genotoxicity of glycidamide in comparison to (±)-anti-benzo [a] pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide and α-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50(4-5), 430-436.
- Tilson, H. A. und Cabe, P. A. (1979). The effects of acrylamide given acutely or in repeated doses on fore-and hindlimb function of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 47(2), 253-260.
- Tyl, R. W., Friedman, M. A., Losco, P. E., Fisher, L. C., Johnson, K. A., Strother, D. E. und Wolf, C. H. (2000). Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reproductive Toxicology*. 14(5), 385-401.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T., Noguchi, N. und Niki, E. (1998). Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 273(26), 16058-16066.
- Umamo, K. und Shibamoto, T. (1987). Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35(6), 909-912.
- Umweltbundesamt, Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes (1996). Human-Biomonitoring: Definition, Möglichkeiten und Voraussetzungen. *Bundesgesundheitsblatt*. 39(6), 213-214.
- Urso, M. L. und Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189(1), 41-54.
- US-EPA, U.S. Environmental Protection Agency (1993). Ambient Concentration Summaries for Clean Air Act Title III Hazardous Air Pollutants. Final Report for US Environmental Protection Agency Contract No 68-D80082.
- US-EPA, U.S. Environmental Protection Agency (2003). Toxicological Review of Acrolein (CAS No. 107-02-8) - In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, DC, May 2003.

- US-EPA, U.S. Environmental Protection Agency (2010). Toxicological Review of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) - In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, DC, March 2010.
- Vanhaecke, L., Knize, M., Noppe, H., De Brabander, H., Verstraete, W. und Van de Wiele, T. (2008). Intestinal bacteria metabolize the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. *Food and Chemical Toxicology*. 46(1), 140-148.
- Vasilyev, N., Williams, T., Brennan, M.-L., Unzek, S., Zhou, X., Heinecke, J. W., Spitz, D. R., Topol, E. J., Hazen, S. L. und Penn, M. S. (2005). Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. 112(18), 2812-2820.
- Verordnung (EG) Nr. 1223/2009, Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel.
- Verordnung (EU) Nr. 10/2011, Verordnung (EU) Nr. 10/2011 der Kommission vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen.
- Verordnung (EU) Nr. 366/2011, Verordnung (EU) Nr. 366/2011 der Kommission vom 14. April 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) hinsichtlich Anhang XVII (Acrylamid).
- Verordnung (EU) Nr. 2017/2158 Verordnung (EU) Nr. 2017/2158 der Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln.
- Vikström, A. C., Abramsson-Zetterberg, L., Naruszewicz, M., Athanassiadis, I., Granath, F. und Törnqvist, M. (2011). In vivo doses of acrylamide and glycidamide in humans after intake of acrylamide-rich food. *Toxicological Sciences*. 119(1), 41-49.
- Vikström, A. C., Eriksson, S., Paulsson, B., Karlsson, P., Athanassiadis, I. und Törnqvist, M. (2008). Internal doses of acrylamide and glycidamide in mice fed diets with low acrylamide contents. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(2), 974-980.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M. und Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*. 47(sup1), 3-27.
- von Stedingk, H., Vikström, A. C., Rydberg, P., Pedersen, M., Nielsen, J. K., Segerbäck, D., Knudsen, L. E. und Törnqvist, M. (2011). Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide, and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chemical Research in Toxicology*. 24(11), 1957-1965.
- von Tungeln, L. S., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., Shaddock, J. G., McGarrity, L. J., Heflich, R. H., Gamboa da Costa, G., Marques, M. M. und Beland, F. A. (2009). DNA adduct formation and induction of micronuclei and mutations in B6C3F1/Tk mice treated neonatally with acrylamide or glycidamide. *International Journal of Cancer*. 124(9), 2006-2015.
- von Tungeln, L. S., Yi, P., Bucci, T. J., Samokyszyn, V. M., Chou, M. W., Kadlubar, F. F. und Fu, P. P. (2002). Tumorigenicity of chloral hydrate, trichloroacetic acid, trichloroethanol, malondialdehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, crotonaldehyde, and acrolein in the B6C3F 1 neonatal mouse. *Cancer Letters*. 185(1), 13-19.
- Walker, K., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z. und Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in N-acetyltransferase (NAT): population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 12(5-6), 440-472.
- Wang, Q., Chen, X., Ren, Y., Chen, Q., Meng, Z., Cheng, J., Zheng, Y., Zeng, W., Zhao, Q. und Zhang, Y. (2016). Toxicokinetics and internal exposure of acrylamide: new insight into comprehensively profiling mercapturic acid metabolites as short-term biomarkers in rats and Chinese adolescents. *Archives of Toxicology*, 1-12.
- Wang, R.-S., McDaniel, L. P., Manjanatha, M. G., Shelton, S. D., Doerge, D. R. und Mei, N. (2010). Mutagenicity of acrylamide and glycidamide in the testes of big blue mice. *Toxicological Sciences*. 117(1), 72-80.

- Watzek, N. (2012). Acrylamid und Acrolein: Toxikokinetik hitzeinduzierter Kontaminanten in Lebensmitteln. Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Kaiserslautern.
- Watzek, N., Bohm, N., Feld, J., Scherbl, D., Berger, F., Merz, K. H., Lampen, A., Reemtsma, T., Tannenbaum, S. R., Skipper, P. L., Baum, M., Richling, E. und Eisenbrand, G. (2012a). N7-glycidamide-guanine DNA adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a dose-response study encompassing human diet-related exposure levels. *Chemical Research in Toxicology*. 25(2), 381-390.
- Watzek, N., Scherbl, D., Feld, J., Berger, F., Doroshyenko, O., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Baum, M., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2012b). Profiling of mercapturic acids of acrolein and acrylamide in human urine after consumption of potato crisps. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56(12), 1825-1837.
- WHO, World Health Organization (2002). Acrolein; Concise International Chemical Assessment Document 43. Geneva. Verfügbar auf www.who.int.
- Willenborg, G. (2015). Telefonat mit Herr G. Willenborg (Wernsing Feinkost GmbH, Essen, Deutschland), 10.11.2015.
- Wirfält, E., Paulsson, B., Törnqvist, M., Axmon, A. und Hagmar, L. (2008). Associations between estimated acrylamide intakes, and hemoglobin AA adducts in a sample from the Malmö Diet and Cancer cohort. *European Journal of Clinical Nutrition*. 62(3), 314-323.
- Witt, K. L., Livanos, E., Kissling, G. E., Torous, D. K., Caspary, W., Tice, R. R. und Recio, L. (2008). Comparison of flow cytometry-and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 649(1), 101-113.
- Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G. und Shi, J. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*. 69, 1-12.
- Yamada, H. und Kobayashi, M. (1996). Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 60(9), 1391-1400.
- Yan, W., Byrd, G. D., Brown, B. G. und Borgerding, M. F. (2010). Development and validation of a direct LC-MS-MS method to determine the acrolein metabolite 3-HPMA in urine. *Journal of Chromatographic Science*. 48(3), 194-199.
- Yang, I.-Y., Chan, G., Miller, H., Huang, Y., Torres, M. C., Johnson, F. und Moriya, M. (2002). Mutagenesis by acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells. *Biochemistry*. 41(46), 13826-13832.
- Yang, Y., Yang, Y., Trent, M. B., He, N., Lick, S. D., Zimniak, P., Awasthi, Y. C. und Boor, P. J. (2004). Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 173(2), 211-221.
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. und Shibamoto, T. (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(14), 3999-4003.
- Yaylayan, V. A., Harty-Majors, S. und Ismail, A. A. (1999). Monitoring carbonyl-amine reaction and enolization of 1-hydroxy-2-propanone (Acetol) by FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(6), 2335-2340.
- Yaylayan, V. A. und Keyhani, A. (2000). Origin of carbohydrate degradation products in L-alanine/D-[13C] glucose model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6), 2415-2419.
- Yaylayan, V. A., Locas, C. P., Wnorowski, A. und O'Brien, J. (2005). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Chemistry and safety of acrylamide in food. 561, 191-203.
- Yener, Y. (2013). Effects of long term low dose acrylamide exposure on rat bone marrow polychromatic erythrocytes. *Biotechnic & Histochemistry*. 88(6), 356-360.
- Yener, Y. und Dikmenli, M. (2009). Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food and Chemical Toxicology*. 47(8), 2120-2123.
- Yuan, J.-M., Murphy, S. E., Stepanov, I., Wang, R., Carmella, S. G., Nelson, H. H., Hatsukami, D. K. und Hecht, S. S. (2016). 2-Phenethyl isothiocyanate, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and

- detoxification of volatile organic carcinogens and toxicants in tobacco smoke. *Cancer Prevention Research*. 9(7), 598-606.
- Zamora, R., Aguilar, I., Granvogl, M. und Hidalgo, F. J. (2016). Toxicologically relevant aldehydes produced during the frying process are trapped by food phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*. 64(27), 5583-5589.
- Zeiger, E., Recio, L., Fennell, T. R., Haseman, J. K., Snyder, R. W. und Friedman, M. (2009). Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicological Sciences*. 107(1), 247-257.
- Zhang, S., Balbo, S., Wang, M. und Hecht, S. S. (2011). Analysis of acrolein-derived 1, N 2-propano-deoxyguanosine adducts in human leukocyte DNA from smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*. 24(1), 119-124.
- Zhang, S., Villalta, P. W., Wang, M. und Hecht, S. S. (2007). Detection and quantitation of acrolein-derived 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 20(4), 565-571.
- Zhang, X., Xiong, W., Shi, L., Hou, H. und Hu, Q. (2014). Simultaneous determination of five mercapturic acid derived from volatile organic compounds in human urine by LC-MS/MS and its application to relationship study. *Journal of Chromatography B*. 967, 102-109.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A. und Rizzi, G. P. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(16), 4782-4788

Anhang

Humanstudie I

Probandeninformationen

Tabelle 59: Probandencodierung und Probandeninformation. Informationen zu Alter, Körpergewicht, Körpergröße und BMI der Probanden (Humanstudie I).

Probandencodierung	Alter [Jahre]	Körpergewicht [kg]	Körpergröße [cm]	BMI [kg/m ²]
P1	22	81,4	186	23,5
P2	26	72,9	182	22,0
P3	21	79,8	180	24,6
P4	23	60,8	178	19,2
P5	24	80,1	191	22,0
P6	22	79,9	185	23,5
P7	23	75,6	184	22,5
P8	23	69,4	177	22,2
P9	23	70,8	177	22,7
P10	21	74,7	180	23,1
P11	20	78,1	178	24,6
P12*	25	71,3	181	21,8
P13	22	85,0	186	24,7
P14	31	83,0	184	24,5
P15	25	80,4	178	25,3
MW	23,4	76,2	181,7	23,1
SD	2,7	6,3	4,1	1,6
MW (ohne P12*)	23,3	76,6	181,9	23,2
SD (ohne P12*)	2,7	6,4	4,3	1,6

BMI: Body-Mass-Index, MW: Mittelwert, P: Proband, SD: Standardabweichung, *P12 hat die Studie vorzeitig an Tag 2 beendet.

Humanstudie I*Ernährungsplan***Tabelle 60:** Ernährungsplan (Humanstudie I)

Studienphase	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	Lebensmittel	Zubereitungsart
Washout	1 / 5	08:00	420	Obstsalat (Apfel, Birne, Banane)	
	1 / 5	08:00	250	Joghurt (Natur)	
	1 / 5	08:00	200	Orangensaft	
	1 / 5	12:00	300	Kartoffeln	Kochen
	1 / 5	12:00	200	Kaisergemüse	Dampfgaren
	1 / 5	12:00	50	Kräuterbutter	
	1 / 5	12:00	200	Apfelsaft	
	1 / 5	14:00	215	Obst I (Banane + Orange)	
	1 / 5	14:00	125	Joghurt (Vanille)	
	1 / 5	18:00	250	Nudeln	Kochen
	1 / 5	18:00	165	Putenbrust	Kochen
	1 / 5	18:00	150	Sahnesoße	Kochen
	1 / 5	18:00	200	Apfelsaft	
Washout	2 / 6 / 8	08:00	420	Obstsalat (Apfel, Birne, Banane)	
	2 / 6 / 8	08:00	250	Joghurt (Natur)	
	2 / 6 / 8	08:00	200	Apfelsaft	
	2 / 6 / 8	12:00	250	Reis	Kochen
	2 / 6 / 8	12:00	325	Hühnerfrikasse	Kochen
	2 / 6 / 8	14:00	195	Obst II (Apfel + Banane)	
	2 / 6 / 8	14:00	125	Joghurt (Vanille)	
	2 / 6 / 8	18:00	250	Nudeln	Kochen
	2 / 6 / 8	18:00	150	Hackfleisch	Kochen
	2 / 6 / 8	18:00	150	Tomatensoße	Kochen
	2 / 6 / 8	18:00	200	Orangensaft	
Washout	3 / 9	08:00	420	Obstsalat (Apfel, Birne, Banane)	
	3 / 9	08:00	250	Joghurt (Natur)	
	3 / 9	08:00	200	Orangensaft	
	3 / 9	12:00	300	Kartoffeln	Kochen
	3 / 9	12:00	150	Kräuterquark	
	3 / 9	12:00	150	Joghurt	
	3 / 9	12:00	50	Schnittlauch	
	3 / 9	14:00	215	Obst I (Banane + Orange)	
	3 / 9	14:00	125	Joghurt (Vanille)	
	3 / 9	18:00	350	Kartoffelklöße (Gnocchi)	Kochen
	3 / 9	18:00	250	Kaisergemüse	Dampfgaren
	3 / 9	18:00	150	Tomatensoße	Kochen
	3 / 9	18:00	200	Apfelsaft	

Tabelle 60 (Fortsetzung): Ernährungsplan (Humanstudie II)

Studienphase	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	Lebensmittel	Zubereitungsart
Hoherhitzte Lebensmittel I (medium AA)	4	08:00	100	Haferfleks	
	4	08:00	20	Honig	Aufbrühen
	4	08:00	150	Milch	Aufbrühen
	4	12:00	350	Gemüse Eintopf	Kochen
	4	12:00	150	Rindersteak	Braten
	4	12:00	100	Knäckebrötchen	
	4	14:00	100	Spritzgebäck	
	4	14:00	125	Joghurt (Vanille)	
	4	14:00	250	Kaffee*	Aufbrühen
	4	18:00	250	Kartoffeln	Kochen
	4	18:00	25	Kräuterbutter	
	4	18:00	150	Hühnerbrust	Braten
	4	18:00	50	Käse (Emmentaler)	
	4	18:00	100	Kaisergemüse	Dampfgaren
	Hoherhitzte Lebensmittel II (high AA)	7	08:00	100	Haferfleks
7		08:00	20	Honig	
7		08:00	150	Milch	
7		08:00	100	Knäckebrötchen	
7		08:00	15	Erdbeermarmelade	
7		08:00	125	Kaffee*	Aufbrühen
7		10:30	125	Kaffee*	Aufbrühen
7		12:00	150	Rindersteak	Braten
7		12:00	30	Ketchup	
7		12:00	150	Pommes frites	Frittieren
7		14:00	100	Spritzgebäck	
7		14:00	250	Kaffee*	Aufbrühen
7		18:00	100	Bratwurst	Braten
7		18:00	200	Bratkartoffeln	Braten
7		20:00	125	Kartoffelchips	

* Padkaffee: 125 ml Kaffeegetränk \cong 7,5 g Kaffeepulver \cong 1 Kaffeepad

Humanstudie I*Körpergewichtsentwicklung***Tabelle 61:** Körpergewicht der Probanden (Humanstudie I)

	Körpergewicht [kg]													
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P13	P14	P15
Tag 1	82,6	72,5	80,0	61,8	79,4	80,5	75,6	69,9	71,9	74,7	78,5	85,1	83,6	80,7
Tag 2	82,5	72,4	79,9	60,6	78,9	80,0	75,2	69,9	71,9	74,8	77,8	85,1	83,4	80,1
Tag 3	82,7	72,2	79,8	61,2	78,7	80,3	75,3	69,8	71,9	74,9	77,9	85,1	83,0	79,8
Tag 4	82,7	72,5	79,8	61,6	79,5	80,8	75,6	69,8	72,9	74,9	77,9	85,5	83,1	79,8
Tag 5	81,9	71,6	79,3	61,5	79,1	80,1	75,0	69,8	72,1	74,6	77,5	85,2	83,1	79,7
Tag 6	82,0	71,6	79,2	62,0	79,3	79,8	75,3	69,9	71,9	74,2	77,7	85,3	83,0	79,6
Tag 7	81,9	71,6	78,9	62,1	78,9	80,0	75,1	69,9	72,1	74,2	77,4	85,2	82,8	79,2
Tag 8	81,3	71,5	79,5	61,9	79,1	80,3	75,2	69,8	71,8	74,3	77,9	85,5	83,2	79,3
Tag 9	81,9	71,6	79,1	62,5	78,8	80,2	75,4	69,9	71,8	74,6	77,3	85,5	82,9	79,4
MW	82,2	71,9	79,5	61,7	79,1	80,2	75,3	69,9	72,0	74,6	77,8	85,3	83,1	79,7
SD	0,5	0,4	0,4	0,6	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,5

MW: Mittelwert, P: Proband, SD: Standardabweichung; Die tägliche Bestimmung des Körpergewichts erfolgte vor dem Frühstück (vor 8:00 Uhr).

Humanstudie I*Aktivitäten***Tabelle 62:** Aktivitäten der Probanden (Humanstudie I)

	Aktivitäten														
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P13	P14	P15	
Computernutzung (Spiele, Internet)		x		x	x	x	x	x			x	x		x	
Film ansehen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	
Klausurvorbereitung/ Klausur schreiben			x	x			x				x	x			
Lernen	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Lesen						x		x	x	x		x			
Musik machen (Gitarre)										x					
Spazieren / Wandern	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Spielen (Karten, Brettspiele)	x		x							x	x			x	
Telefonieren			x									x			
Zeichnen										x					

P: Proband; Die Aktivitäten Koffer ein- bzw. auspacken, Aufräumen, Duschen und Schlafen wurden von einigen Probanden in ihren Aktivitätsprotokollen angegeben. Da davon auszugehen ist, dass sie von allen Probanden durchgeführt wurden, sind sie nicht separat in der Tabelle aufgeführt.

Humanstudie I

Prodi 5.8. Expert (Nährstoff- und Energie-Gehalte der Lebensmittel)

Tabelle 63: Protein-, Kohlenhydrat-, Fett- und Energie-Gehalte der Duplikat-Mahlzeiten ermittelt unter Verwendung der Ernährungssoftware Prodi 5.8. Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland) (Humanstudie I)

Lebensmittelkategorie Lebensmittel	Protein [g/100g]	Kohlenhydrate [g/100g]	Fett [g/100g]	Energie [kJ/100g]
Frittierte bzw. gebratene Kartoffelprodukte 🔥				
Bratkartoffeln	2,9	14,5	1,0	348
Kartoffelchips	4,0	56,8	32,0	2286
Pommes frites	2,1	17,3	7,3	600
Backwaren 🔥				
Knäckebrötchen	9,7	65,0	2,0	1333
Spritzgebäck	6,0	62,0	12,0	1606
Frühstückscerealien 🔥				
Haferfleks	9,7	72,0	5,0	1641
Kaffeepulver und -getränk 🔥				
Kaffeegetränk*	0,2	0,0	0,0	9
Kaffeepulver	14,0	1,5	13,4	811
Fleischprodukte 🔥				
Bratwurst	13,7	2,0	22,0	348
Hühnerbrust	24,1	0,0	1,3	440
Rindersteak	22,5	0,0	4,7	544
Milch und Milchprodukte				
Joghurt (Vanille)	3,6	16,8	2,4	439
Käse (Emmentaler)	29,0	0,0	30,0	1602
Milch	3,3	4,7	3,3	267
Obst und Fruchtsäfte				
Apfelsaft	0,5	11,5	0,0	209
Orangensaft	0,7	10,0	0,0	295
Obst I (Banane + Orange)	1,1	13,5	1,1	267
Obst II (Apfel + Banane)	0,7	16,9	0,0	313
Obstsalat und Joghurt (Natur)	1,9	15,9	1,0	343
Gemüse und Gemüse Eintopf				
Gemüse Eintopf	5,3	2,6	2,9	235
Kaisergemüse	2,3	4,0	0,0	105
Kartoffel-, Nudel und Reisgerichte				
Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße	2,7	16,8	1,3	377
Kartoffeln	1,9	14,8	0,0	295
Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter	2,0	9,8	5,6	415
Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch	4,6	10,9	3,2	426
Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße	9,5	12,9	4,5	557
Nudeln, Putenbrust und Sahnesoße	11,2	17,7	4,4	638
Reis mit Hühnerfrikassee	5,7	12,9	5,9	535

🔥 hochoverhitzte Lebensmittel (> 100 °C), * Packkaffee: 125 ml Kaffeegetränk $\hat{=}$ 7,5 g Kaffeepulver $\hat{=}$ 1 Kaffeeepad

Humanstudie I - Tägliche Aufnahmemengen (Tag 1 und Tag 5)**Tabelle 64:** Acrylamid-, Protein-, Asparagin-, Fett-, Kohlenhydrat- und Kalorien-Aufnahme an Tag 1 und Tag 5 (washout)

Mahlzeit	Lebensmittel (Menge)	Acrylamid- Aufnahme [µg]	Eurofins¹ Aufnahme [g]	Protein- Aufnahme [g]	Asparagin- Aufnahme [g]	Kohlenhydrat- Aufnahme [g]	Fett- Aufnahme [g]	Kalorien- Aufnahme [kcal]
	Eigene Analyse	Eurofins¹	Prodi²	Prodi²	Kuhlmann³	Prodi²	Prodi²	Prodi²
Frühstück (8 h)	Obstsalat und Joghurt (Natur) (670 g)	0,3	7,8	12,8	110,7	110,4	8,0	564,4
	Orangensaft (200 ml)	0,04	1,4	1,4	84,0	19,8	0,2	90,0
Mittagessen (12 h)	Kartoffeln, Kaisergemüse und Kräuterbutter (550 g)	0,7	12,1	10,9	891,0	53,7	31,4	550,0
	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,2	1,0	100,0	23,2	0,2	102,0
Snack (14 h)	Obst I (Banane + Orange) (215 g)	0,1	2,4	2,3	88,2	28,9	0,4	137,1
	Joghurt (Vanille) (125 g)	0,1	4,6	4,5		21,3	3,3	131,3
Abendessen (18 h)	Nudeln, Putenbrust und Sahnesoße (565 g)	0,8	76,8	63,3	29,4	99,8	23,7	863,3
	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,2	1,0	100,0	23,2	0,2	102,0
Summe		2,2	105,5	97,2	1403,2	380,2	67,3	2540,0

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland), ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³Kuhlmann: Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Humanstudie I - Tägliche Aufnahmemengen (Tag 2, Tag 6 und Tag 8)

Tabelle 65: Acrylamid-, Protein-, Asparagin-, Fett-, Kohlenhydrat- und Kalorien-Aufnahme an Tag 2, Tag 6 und Tag 8 (washout)

Mahlzeit	Lebensmittel (Menge)	Acrylamid-	Protein-	Asparagin-	Kohlenhydrat-	Fett-	Kalorien-
		Aufnahme [µg]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [kcal]
Eigene Analyse		Eurofins ¹	Prodi ²	Kuhlmann ³	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²
Frühstück (8 h)	Obstsalat mit Joghurt (Natur) (670 g)	0,3	7,8	12,8	110,4	8,0	564,4
	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,2	1,0	23,2	0,2	102,0
Mittagessen (12 h)	Reis mit Hühnerfrikassee (575 g)	1,3	65,6	32,5	73,6	34,4	735,0
	Obst II (Apfel + Banane) (195 g)	0,05	1,4	1,4	33,4	0,2	146,5
Snack (14 h)	Joghurt (Vanille) (125 g)	0,1	4,6	4,5	21,3	3,3	131,3
	Nudeln, Hackfleisch und Tomatensoße (550 g)	0,8	49,0	52,1	70,9	24,9	732,0
Abendessen (18 h)	Orangensaft (200 ml)	0,04	1,4	1,4	19,8	0,2	90,0
	Summe	2,6	129,9	105,8	451,5	71,1	2501,2

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland), ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³Kuhlmann: Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Humanstudie I - Tägliche Aufnahmemengen (Tag 3 und Tag 9)**Tabelle 66:** Acrylamid-, Protein-, Asparagin, Fett-, Kohlenhydrat- und Kalorien-Aufnahme an Tag 3 und Tag 9 (washout)

Mahlzeit	Lebensmittel (Menge)	Acrylamid-	Protein-	Asparagin-	Kohlenhydrat-	Fett-	Kalorien-
		Aufnahme [µg]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [g]	Aufnahme [kcal]
		Eigene Analyse	Eurofins ¹	Kuhlmann ³	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²
Frühstück (8 h)	Obstsalat mit Joghurt (Natur) (670 g)	0,3	7,8	12,8	110,4	8,0	564,4
	Orangensaft (200 ml)	0,04	1,4	1,4	19,8	0,2	90,0
Mittagessen (12 h)	Kartoffeln, Kräuterquark, Joghurt und Schnittlauch (600 g)	0,7	28,0	30,0	70,54	21,3	660,5
	Obst I (Banane + Orange) (215 g)	0,05	2,4	2,3	28,9	0,4	137,1
Snack (14 h)	Joghurt (Vanille) (125 g)	0,1	4,6	4,5	21,3	3,3	131,3
	Kartoffelklöße (Gnocchi), Kaisergemüse und Tomatensoße (750 g)	0,6	17	19,9	125,2	9,4	676,0
Abendessen (18 h)	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,2	1,0	23,2	0,2	102,0
	Summe	1,8	61	71,9	399,4	42,7	2361,3

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland), ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³Kuhlmann: Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Humanstudie I - Tägliche Aufnahmemengen (Tag 4)

Tabelle 67: Acrylamid-, Protein-, Asparagin-, Fett-, Kohlenhydrat- und Kalorien-Aufnahme an Tag 4 (medium AA)

Mahlzeit	Lebensmittel (Menge)	Acrylamid-Aufnahme [µg]	Eurofins ¹	Protein-Aufnahme [g]	Asparagin-Aufnahme [g]	Kohlenhydrat-Aufnahme [g]	Fett-Aufnahme [g]	Kalorien-Aufnahme [kcal]
		Eigene Analyse	Prodi ²	Kuhlmann ³	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²
Erstes Frühstück (8 h)	Haferfleks (100 g)	9,7	12,4	9,7	24,0	72,4	5,4	392,0
	Honig (20 g)			0,1		16,2	0,0	60,2
	Milch (150 ml)	0,1	5,1	5,0		7,2	5,3	96,0
Zweites Frühstück (10:30 h)	Apfelsaft (200 ml)	0,1	0,2	1,0	100,0	23,2	0,2	102,0
	Kaffeegetränk (125 ml)	2,4	0,4	0,3		0,4	0,0	2,5
	Kaffeegetränk (125 ml)	2,4	0,4	0,3		0,4	0,0	2,5
Mittagessen (12 h)	Gemüseintopf (350 g)	0,3	2,1	18,6	73,5	8,9	9,6	196,0
	Rindersteak (150 g)	0,7	54,2	33,8	12,9		6,8	195,0
	Knäckebrot (100 g)	22,2	12,4	10,1	63,0	66,1	1,4	322,0
Snack (14 h)	Spritzgebäck (100 g)	10,8	5,8	8,2	6,7	74,7	11,0	434,0
	Joghurt (Vanille) (125 g)	0,1	4,6	4,5		21,3	3,3	131,3
	Kaffeegetränk (250 ml)	4,8	0,8	0,5		0,8	0,0	5,0
Abendessen (18 h)	Kartoffeln (250 g)	0,2	4,8	4,7	600,0	37,5	0,0	175,0
	Kräuterbutter (25 g)			0,3		0,9	15,5	145,0
	Hühnerbrust (150 g)	0,3	45,5	36,2	13,8	0,0	1,5	157,5
	Kaisergemüse (100 g)	0,1	2,0	2,3	25,0	3,5	0,2	25,0
	Käse (Emmentaler) (50 g)	0,03	13,6	14,5	48,5	0,0	15,0	193,0
Summe		54,1	164,3	149,8	967,4	333,4	75,0	2634,0

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland), ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³Kuhlmann: Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Humanstudie I - Tägliche Aufnahmemengen (Tag 7)**Tabelle 68:** Acrylamid-, Protein-, Asparagin-, Fett-, Kohlenhydrat- und Kalorien-Aufnahme an Tag 7 (high AA)

Mahlzeit	Lebensmittel (Menge)	Acrylamid- Aufnahme [µg]	Eurofins ¹	Protein- Aufnahme [g]	Asparagin- Aufnahme [g]	Kohlenhydrat- Aufnahme [g]	Fett- Aufnahme [g]	Kalorien- Aufnahme [kcal]
		Eigene Analyse	Prodi ²	Kuhlmann ³	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²	Prodi ²
Erstes Frühstück (8 h)	Haferfleks (100 g)	9,7	12,4	9,7	24,0	72,4	5,4	392,0
	Honig (20 g)			0,1		16,2	0,0	60,2
	Milch (150 ml)	0,1	5,1	5,0		7,2	5,3	96,0
	Knäckebröt (100 g)	22,2	12,4	9,7	63,0	65,0	1,7	314,0
	Erdbeermarmelade (15 g)			0,1		9,4	0,0	38,7
Zweites Frühstück (10:30 h)	Kaffeetränk (125 ml)	2,4	0,4	0,3		0,4	0,0	2,5
	Kaffeetränk (125 ml)	2,4	0,4	0,3		0,4	0,0	2,5
	Pommes frites (150 g)	8,9	5,0	3,2	480,0	25,6	10,8	214,5
	Rindersteak (150 g)	0,7	54,5	33,8	12,9		6,8	195,0
	Ketchup (30 g)			0,3		7,2	0,0	30,6
Snack (14 h)	Spritzgebäck (100 g)	10,8	5,8	6,0	6,7	61,9	12,2	381,0
	Kaffeetränk (250 ml)	4,8	0,8	0,5		0,8	0,0	5,0
Abendessen (18 h)	Bratkartoffeln (200 g)	4,7	4,6	5,8	580,0	29,0	2,2	166,0
	Bratwurst (100 g)	0,3	16,1	13,7		1,7	21,6	256,0
Snack (20 h)	Kartoffelchips (125 g)	41,6	5,6	5,0	437,5	70,9	40,0	682,5
Summe		108,4	122,9	93,2	1604,1	368,0	105,9	2836,5

¹Eurofins: Eurofins Analytik GmbH (Hamburg, Deutschland), ²Prodi: Ernährungssoftware Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland), ³Kuhlmann: Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)

Humanstudie I*Urinvolumina***Tabelle 69:** Urinvolumina der Probanden P1 - P7 (Humanstudie I)

	Urinvolumina [ml]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (08:00 - 08:00)	1759	2129	1865	1804	1749	1939	1698
Tag 1 (08:00 - 08:00 ZB)	0	718	602	232	1630	630	757
Tag 2 (08:00 - 08:00)	1949	2027	2258	1869	1641	1827	2083
Tag 2 (08:00 - 08:00 ZB)	596	0	294	353	1121	1353	669
Tag 3 (08:00 - 12:00)	827	618	510	138	362	1225	663
Tag 3 (12:00 - 16:00)	1199	129	1181	360	778	561	393
Tag 3 (16:00 - 20:00)	604	201	805	971	1091	791	531
Tag 3 (20:00 - 08:00)	883	1146	454	1491	585	695	520
Tag 4 (08:00 - 12:00)	841	402	583	1004	541	1470	777
Tag 4 (12:00 - 16:00)	479	244	811	180	893	411	344
Tag 4 (16:00 - 20:00)	872	433	258	667	875	691	395
Tag 4 (20:00 - 08:00)	832	799	514	1379	676	843	895
Tag 5 (08:00 - 12:00)	480	888	440	338	675	1536	695
Tag 5 (12:00 - 16:00)	756	380	138	174	1008	588	299
Tag 5 (16:00 - 20:00)	216	337	177	729	205	322	232
Tag 5 (20:00 - 08:00)	1019	283	1157	468	795	729	624
Tag 6 (08:00 - 12:00)	736	640	583	314	569	1300	544
Tag 6 (12:00 - 16:00)	336	332	225	554	932	321	606
Tag 6 (16:00 - 20:00)	233	135	319	1089	325	711	589
Tag 6 (20:00 - 08:00)	1091	828	1081	909	1417	783	932
Tag 7 (08:00 - 12:00)	579	200	220	777	523	941	711
Tag 7 (12:00 - 16:00)	394	251	207	374	593	675	557
Tag 7 (16:00 - 20:00)	709	335	608	850	884	479	191
Tag 7 (20:00 - 08:00)	631	501	911	1088	1190	560	458
Tag 8 (08:00 - 12:00)	440	746	628	454	505	1176	446
Tag 8 (12:00 - 16:00)	226	435	151	60	389	450	377
Tag 8 (16:00 - 20:00)	414	336	462	1794	884	737	460
Tag 8 (20:00 - 08:00)	866	622	1347	889	1257	855	1115
Tag 9 (08:00 - 08:00)	697	973	774	1100	1352	1509	1064
Tag 9 (08:00 - 08:00 ZB)	1444	1028	1359	1831	3221	1148	1403

P: Proband, ZB: Zusatzbehälter

Tabelle 70: Urinvolumina der Probanden P8 - P15 (Humanstudie I)

	Urinvolumina [ml]						
	P8	P9	P10	P11	P13	P14	P15
Tag 1 (08:00 - 08:00)	1699	2153	1949	1773	1804	2137	941
Tag 1 (08:00 - 08:00 ZB)	644	543	0	0	0	0	0
Tag 2 (08:00 - 08:00)	1903	1889	2147	1465	2034	1701	1462
Tag 2 (08:00 - 08:00 ZB)	863	594	0	0	777	1495	0
Tag 3 (08:00 - 12:00)	1343	1037	950	169	428	581	362
Tag 3 (12:00 - 16:00)	253	564	906	258	378	596	309
Tag 3 (16:00 - 20:00)	864	912	125	546	717	468	231
Tag 3 (20:00 - 08:00)	389	595	766	729	818	546	602
Tag 4 (08:00 - 12:00)	643	754	819	119	486	425	196
Tag 4 (12:00 - 16:00)	183	212	313	461	269	302	179
Tag 4 (16:00 - 20:00)	890	660	454	623	673	584	141
Tag 4 (20:00 - 08:00)	693	750	759	939	963	750	1246
Tag 5 (08:00 - 12:00)	1002	1126	1067	303	936	690	34
Tag 5 (12:00 - 16:00)	621	905	392	710	555	681	661
Tag 5 (16:00 - 20:00)	480	579	422	95	313	166	292
Tag 5 (20:00 - 08:00)	800	700	563	405	502	1091	930
Tag 6 (08:00 - 12:00)	997	1362	567	184	1138	688	365
Tag 6 (12:00 - 16:00)	338	472	427	78	732	513	246
Tag 6 (16:00 - 20:00)	658	539	669	643	696	991	243
Tag 6 (20:00 - 08:00)	623	476	893	1097	697	1282	1022
Tag 7 (08:00 - 12:00)	495	449	159	511	174	310	37
Tag 7 (12:00 - 16:00)	545	343	185	236	781	585	194
Tag 7 (16:00 - 20:00)	427	690	758	264	494	311	173
Tag 7 (20:00 - 08:00)	329	427	1340	611	488	1279	378
Tag 8 (08:00 - 12:00)	614	1141	643	303	824	896	160
Tag 8 (12:00 - 16:00)	240	806	370	309	452	205	250
Tag 8 (16:00 - 20:00)	1119	985	342	1535	1194	219	251
Tag 8 (20:00 - 08:00)	572	683	991	417	560	1367	1015
Tag 9 (08:00 - 08:00)	1651	1465	789	458	996	1170	158
Tag 9 (08:00 - 08:00 ZB)	492	1198	880	947	1384	2364	1386

P: Proband, ZB: Zusatzbehälter

Humanstudie I*Kreatinin***Tabelle 71:** Kreatinin im Urin der Probanden P1 - P5 (Humanstudie I)

	Kreatinin [g/l]				
	P1	P2	P3	P4	P5
Tag 1 (08:00 - 08:00)	1,32 ± 0,02	0,26 ± 0,08	0,81 ± 0,09	0,37 ± 0,01	0,44 ± 0,00
Tag 1 (08:00 - 08:00 ZB)		1,80 ± 0,04	1,15 ± 0,01	2,36 ± 0,01	0,96 ± 0,01
Tag 2 (08:00 - 08:00)	0,84 ± 0,04	1,20 ± 0,02	0,79 ± 0,01	0,63 ± 0,00	0,60 ± 0,00
Tag 2 (08:00 - 08:00 ZB)	1,20 ± 0,01		0,90 ± 0,04	1,58 ± 0,03	1,25 ± 0,03
Tag 3 (08:00 - 12:00)	0,31 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,01	1,93 ± 0,08	1,09 ± 0,03
Tag 3 (12:00 - 16:00)	0,36 ± 0,05	1,24 ± 0,05	0,43 ± 0,03	0,55 ± 0,05	0,39 ± 0,00
Tag 3 (16:00 - 20:00)	0,43 ± 0,00	1,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Tag 3 (20:00 - 08:00)	1,18 ± 0,02	0,79 ± 0,01	1,68 ± 0,01	0,54 ± 0,02	2,17 ± 0,01
Tag 4 (08:00 - 12:00)	0,54 ± 0,03	0,43 ± 0,03	1,00 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,43 ± 0,06
Tag 4 (12:00 - 16:00)	0,91 ± 0,01	1,62 ± 0,06	0,61 ± 0,00	0,53 ± 0,02	0,67 ± 0,01
Tag 4 (16:00 - 20:00)	0,48 ± 0,02	0,95 ± 0,04	1,27 ± 0,04	0,40 ± 0,00	0,49 ± 0,00
Tag 4 (20:00 - 08:00)	1,35 ± 0,07	1,08 ± 0,01	2,21 ± 0,01	0,59 ± 0,02	1,68 ± 0,01
Tag 5 (08:00 - 12:00)	0,82 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,99 ± 0,03	0,92 ± 0,01	0,51 ± 0,02
Tag 5 (12:00 - 16:00)	0,31 ± 0,01	0,70 ± 0,02	1,75 ± 0,04	0,79 ± 0,04	0,43 ± 0,01
Tag 5 (16:00 - 20:00)	2,67 ± 0,01	1,05 ± 0,03	2,18 ± 0,05	0,45 ± 0,03	1,63 ± 0,03
Tag 5 (20:00 - 08:00)	0,88 ± 0,04	2,64 ± 0,07	1,25 ± 0,02	1,69 ± 0,00	1,50 ± 0,01
Tag 6 (08:00 - 12:00)	0,69 ± 0,04	0,60 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,54 ± 0,00
Tag 6 (12:00 - 16:00)	1,53 ± 0,00	0,57 ± 0,01	1,38 ± 0,06	0,50 ± 0,02	0,56 ± 0,03
Tag 6 (16:00 - 20:00)	1,06 ± 0,04	1,67 ± 0,13	1,27 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,99 ± 0,00
Tag 6 (20:00 - 08:00)	0,90 ± 0,03	1,33 ± 0,06	1,22 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,73 ± 0,02
Tag 7 (08:00 - 12:00)	1,09 ± 0,04	0,48 ± 0,01	1,94 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,66 ± 0,02
Tag 7 (12:00 - 16:00)	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,03	1,08 ± 0,05	0,68 ± 0,01	0,66 ± 0,04
Tag 7 (16:00 - 20:00)	0,52 ± 0,02	1,98 ± 0,06	0,93 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,52 ± 0,04
Tag 7 (20:00 - 08:00)	2,30 ± 0,07	1,67 ± 0,18	1,32 ± 0,05	0,79 ± 0,00	0,90 ± 0,05
Tag 8 (08:00 - 12:00)	0,56 ± 0,00	0,54 ± 0,02	0,67 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,67 ± 0,00
Tag 8 (12:00 - 16:00)	0,94 ± 0,05	0,86 ± 0,02	2,09 ± 0,08	2,95 ± 0,08	1,11 ± 0,02
Tag 8 (16:00 - 20:00)	1,52 ± 0,07	0,75 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,41 ± 0,02
Tag 8 (20:00 - 08:00)	1,34 ± 0,07	1,50 ± 0,05	0,87 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,80 ± 0,01
Tag 9 (08:00 - 08:00)	0,86 ± 0,00	0,51 ± 0,02	0,78 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Tag 9 (08:00 - 08:00 ZB)	1,13 ± 0,01	1,12 ± 0,01	1,17 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,47 ± 0,04

P: Proband, ZB: Zusatzbehälter

Tabelle 72: Kreatinin im Urin der Probanden P6 - P10 (Humanstudie I)

	Kreatinin [g/l]				
	P6	P7	P8	P9	P10
Tag 1 (08:00 - 08:00)	0,32 ± 0,00	0,69 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,73 ± 0,01
Tag 1 (08:00 - 08:00 ZB)	1,91 ± 0,04	1,48 ± 0,00	1,65 ± 0,00	1,85 ± 0,01	
Tag 2 (08:00 - 08:00)	0,47 ± 0,03	0,74 ± 0,02	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,00	1,02 ± 0,04
Tag 2 (08:00 - 08:00 ZB)	0,90 ± 0,03	1,26 ± 0,01	1,24 ± 0,01	1,83 ± 0,02	
Tag 3 (08:00 - 12:00)	0,29 ± 0,00	0,51 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,52 ± 0,01
Tag 3 (12:00 - 16:00)	0,59 ± 0,02	1,07 ± 0,05	1,06 ± 0,05	0,52 ± 0,00	0,40 ± 0,02
Tag 3 (16:00 - 20:00)	0,37 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,33 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Tag 3 (20:00 - 08:00)	1,80 ± 0,10	2,16 ± 0,01	1,94 ± 0,01	1,46 ± 0,02	1,23 ± 0,02
Tag 4 (08:00 - 12:00)	0,25 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,32 ± 0,01
Tag 4 (12:00 - 16:00)	1,00 ± 0,02	1,19 ± 0,06	0,58 ± 0,03	1,08 ± 0,05	1,25 ± 0,04
Tag 4 (16:00 - 20:00)	0,51 ± 0,00	0,69 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,45 ± 0,04
Tag 4 (20:00 - 08:00)	1,17 ± 0,01	1,42 ± 0,05	1,30 ± 0,12	1,35 ± 0,03	1,65 ± 0,07
Tag 5 (08:00 - 12:00)	0,33 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,45 ± 0,01
Tag 5 (12:00 - 16:00)	0,67 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,54 ± 0,01	0,34 ± 0,00	0,41 ± 0,01
Tag 5 (16:00 - 20:00)	0,43 ± 0,00	1,45 ± 0,05	0,46 ± 0,01	0,37 ± 0,03	1,20 ± 0,03
Tag 5 (20:00 - 08:00)	1,65 ± 0,07	2,26 ± 0,03	1,38 ± 0,05	1,51 ± 0,02	2,12 ± 0,01
Tag 6 (08:00 - 12:00)	0,19 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,47 ± 0,00
Tag 6 (12:00 - 16:00)	1,24 ± 0,07	0,62 ± 0,03	0,65 ± 0,01	0,72 ± 0,03	1,07 ± 0,03
Tag 6 (16:00 - 20:00)	0,56 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,60 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Tag 6 (20:00 - 08:00)	1,20 ± 0,00	1,20 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,41 ± 0,14	1,22 ± 0,03
Tag 7 (08:00 - 12:00)	0,51 ± 0,00	0,60 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,59 ± 0,02	1,33 ± 0,03
Tag 7 (12:00 - 16:00)	0,55 ± 0,05	0,73 ± 0,06	0,69 ± 0,00	0,76 ± 0,03	1,53 ± 0,02
Tag 7 (16:00 - 20:00)	0,93 ± 0,02	2,36 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,65 ± 0,01
Tag 7 (20:00 - 08:00)	1,87 ± 0,12	2,21 ± 0,08	2,36 ± 0,04	1,86 ± 0,00	0,74 ± 0,02
Tag 8 (08:00 - 12:00)	0,27 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,41 ± 0,03	0,49 ± 0,00
Tag 8 (12:00 - 16:00)	0,85 ± 0,01	0,69 ± 0,01	1,54 ± 0,00	0,47 ± 0,01	1,19 ± 0,01
Tag 8 (16:00 - 20:00)	0,07 ± 0,01	1,41 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,00	0,89 ± 0,03
Tag 8 (20:00 - 08:00)	1,13 ± 0,00	0,94 ± 0,03	1,58 ± 0,03	1,13 ± 0,03	0,95 ± 0,07
Tag 9 (08:00 - 08:00)	0,45 ± 0,03	0,54 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,55 ± 0,02
Tag 9 (08:00 - 08:00 ZB)	1,14 ± 0,06	0,99 ± 0,07	1,3 ± 0,03	0,96 ± 0,00	1,81 ± 0,01

P: Proband, ZB: Zusatzbehälter

Tabelle 73: Kreatinin im Urin der Probanden P11 - P15 (Humanstudie I)

	Kreatinin [g/l]			
	P11	P13	P14	P15
Tag 1 (08:00 - 08:00)	1,01 ± 0,00	1,00 ± 0,01	0,75 ± 0,02	2,27 ± 0,02
Tag 1 (08:00 - 08:00 ZB)				
Tag 2 (08:00 - 08:00)	1,09 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,02	1,81 ± 0,05
Tag 2 (08:00 - 08:00 ZB)		0,93 ± 0,00	1,00 ± 0,00	
Tag 3 (08:00 - 12:00)	2,27 ± 0,03	0,70 ± 0,00	0,72 ± 0,01	1,05 ± 0,01
Tag 3 (12:00 - 16:00)	0,80 ± 0,01	0,56 ± 0,00	0,75 ± 0,02	0,63 ± 0,01
Tag 3 (16:00 - 20:00)	0,64 ± 0,04	0,46 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,93 ± 0,01
Tag 3 (20:00 - 08:00)	1,44 ± 0,01	0,94 ± 0,02	2,14 ± 0,02	1,91 ± 0,00
Tag 4 (08:00 - 12:00)	1,99 ± 0,04	0,96 ± 0,05	1,09 ± 0,00	1,49 ± 0,01
Tag 4 (12:00 - 16:00)	0,98 ± 0,09	1,29 ± 0,01	0,83 ± 0,03	1,53 ± 0,06
Tag 4 (16:00 - 20:00)	0,66 ± 0,03	0,42 ± 0,00	1,03 ± 0,01	2,08 ± 0,01
Tag 4 (20:00 - 08:00)	0,68 ± 0,00	0,92 ± 0,04	1,49 ± 0,01	0,96 ± 0,00
Tag 5 (08:00 - 12:00)	0,79 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,75 ± 0,02	1,79 ± 0,03
Tag 5 (12:00 - 16:00)	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,67 ± 0,01	0,59 ± 0,01
Tag 5 (16:00 - 20:00)	2,18 ± 0,01	0,92 ± 0,05	0,97 ± 0,00	0,51 ± 0,01
Tag 5 (20:00 - 08:00)	2,51 ± 0,00	1,64 ± 0,00	1,14 ± 0,02	1,50 ± 0,02
Tag 6 (08:00 - 12:00)	2,05 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,65 ± 0,00	0,86 ± 0,02
Tag 6 (12:00 - 16:00)	2,25 ± 0,00	0,41 ± 0,03	0,66 ± 0,01	1,85 ± 0,00
Tag 6 (16:00 - 20:00)	0,54 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,48 ± 0,03	0,71 ± 0,02
Tag 6 (20:00 - 08:00)	1,04 ± 0,02	1,17 ± 0,01	0,90 ± 0,01	1,20 ± 0,00
Tag 7 (08:00 - 12:00)	0,79 ± 0,01	1,63 ± 0,04	1,49 ± 0,02	1,80 ± 0,01
Tag 7 (12:00 - 16:00)	1,38 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,01	2,33 ± 0,10
Tag 7 (16:00 - 20:00)	1,54 ± 0,03	0,86 ± 0,02	1,17 ± 0,06	2,49 ± 0,01
Tag 7 (20:00 - 08:00)	1,71 ± 0,05	1,71 ± 0,03	1,11 ± 0,03	3,02 ± 0,01
Tag 8 (08:00 - 12:00)	1,05 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,46 ± 0,01	1,97 ± 0,26
Tag 8 (12:00 - 16:00)	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,00	1,65 ± 0,04	1,90 ± 0,04
Tag 8 (16:00 - 20:00)	0,27 ± 0,00	0,32 ± 0,00	1,52 ± 0,04	1,19 ± 0,03
Tag 8 (20:00 - 08:00)	2,46 ± 0,04	1,42 ± 0,03	0,94 ± 0,03	0,95 ± 0,06
Tag 9 (08:00 - 08:00)	0,77 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,65 ± 0,01
Tag 9 (08:00 - 08:00 ZB)	1,62 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,69 ± 0,02

P: Proband, ZB: Zusatzbehälter

Humanstudie II*Probandeninformationen***Tabelle 74:** Probandencodierung und Probandeninformation. Informationen zu Ernährungsgewohnheiten (GK / V), Geschlecht (♂ / ♀), Alter, Körpergröße, Körpergewicht und BMI der Probanden (Humanstudie II).

Probandencodierung		V / GK	♂ / ♀	Alter	Gewicht	Größe	BMI	
in dieser Arbeit	während der Studie			[Jahre]	[kg]	[cm]	[kg/m ²]	
GK1	P2	GK	♂	24	80,3	189,0	22,5	
GK2	P3	GK	♂	24	74,9	182,0	22,6	
GK3	P5	GK	♂	23	83,4	182,0	25,2	
GK4	P20	GK	♂	27	80,6	179,0	25,2	
GK5	P1	GK	♂	24	80,3	179,0	25,1	
GK6	P19	GK	♀	29	56,2	156,0	23,1	
GK7	P9	GK	♀	40	56,5	172,0	19,1	
GK8	P8	GK	♀	23	54,0	160,0	21,1	
GK9	P15	GK	♀	25	63,3	169,5	22,0	
GK10	P7	GK	♀	26	49,5	163,0	18,6	
V1	P6	V	♂	22	76,8	179,0	24,0	
V2	P12	V	♂	26	79,1	185,0	23,1	
V3	P13	V	♂	26	79,5	184,0	23,5	
V4	P11	V	♂	24	59,2	174,5	19,4	
V5	P4	V	♂	20	83,7	184,0	24,7	
V6	P16	V	♀	23	65,2	168,0	23,1	
V7	P18	V	♀	22	60,5	165,0	22,2	
V8	P14	V	♀	30	49,0	162,5	18,6	
V9	P17	V	♀	40	57,2	169,5	19,9	
V10	P10	V	♀	28	59,8	171,1	20,4	
				MW	26,3	67,5	173,7	22,2
				SD	5,3	12,2	9,4	2,2

BMI: Body-Mass-Index, GK: Gemischtköstler, MW: Mittelwert, P: Proband, SD: Standardabweichung, V: Veganer

Humanstudie II*Ernährungsprotokolle***Tabelle 75:** Ernährungsprotokolle Proband GK1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK1	1	12:00	808	Schinken-Sahne-Nudeln, Grana Padano, Suppe (Mensa)
GK1	1	12:00	400	Sprite Zero
GK1	1	13:00	100	Milchkaffee
GK1	1	15:00	400	Iso-Sport-Getränk
GK1	1	15:00	180	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBQ-Sauce)
GK1	1	15:00	100	Karamell-Pudding
GK1	1	19:00	1500	Volvic Kirsch-Geschmack
GK1	1	20:30	250	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBQ-Sauce)
GK1	1	23:00	200	Bier
GK1	2	12:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)
GK1	2	12:00	745	Schafskäse überbacken mit Paprika, Oliven, Peperoni und Zwiebeln, dazu ein Baguettebrötchen, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK1	2	13:00	500	Leitungswasser
GK1	2	15:00	200	Milchkaffee
GK1	2	15:00	1000	Leitungswasser
GK1	2	15:00	230	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBQ-Sauce)
GK1	2	19:00	200	Nuss-Nougat-Croissant
GK1	2	20:30	500	Iso-Sport-Getränk
GK1	2	21:00	300	Pizza Speciale
GK1	2	23:00	1500	Leitungswasser
GK1	2	23:00	400	Kilkenny Bier
GK1	3	10:00	150	Kaffee (schwarz, 1 Pad)
GK1	3	12:00	689	Seelachsfilet mit Spinat-Vitalkruste, Apfel-Birnen-Béchamelsoße, Rosinen-Safran-Reis, Suppe (Mensa)
GK1	3	12:00	500	Leitungswasser
GK1	3	13:00	120	Sandwich-Eis
GK1	3	15:00	190	Banane
GK1	3	15:00	500	Leitungswasser
GK1	3	15:30	150	Apfel
GK1	3	15:30	180	Banane
GK1	3	15:30	500	Leitungswasser
GK1	3	19:00	200	Cheeseburger
GK1	3	19:00	500	Leitungswasser
GK1	3	19:00	180	Banane
GK1	3	21:30	140	Sandwich II (Leberwurst, Käse, BBQ-Sauce)
GK1	4	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)
GK1	4	13:00	370	Pizza Vegetale
GK1	4	13:00	500	Leitungswasser
GK1	4	14:00	120	Sandwich-Eis
GK1	4	14:00	500	Leitungswasser
GK1	4	17:00	200	Johannisbeersaft

Tabelle 75 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK1	4	17:00	500	Leitungswasser
GK1	4	17:30	250	Eis (cookie Dough)
GK1	4	18:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	4	18:00	500	Leitungswasser
GK1	4	18:00	160	Banane
GK1	4	20:00	200	Bollburger
GK1	4	20:00	330	Radler
GK1	4	20:00	500	Leitungswasser
GK1	4	23:00	1000	Bier
GK1	4	23:00	500	Leitungswasser
GK1	5	11:00	160	Banane
GK1	5	11:00	1000	Leitungswasser
GK1	5	11:00	100	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	5	13:00	1000	Leitungswasser
GK1	5	13:00	250	Eis (cookie Dough)
GK1	5	14:30	175	Pizza Vegetale
GK1	5	14:30	175	Pizza Speciale
GK1	5	15:00	200	Johannisbeersaft
GK1	5	15:00	500	Leitungswasser
GK1	5	16:00	500	Iso-Sport-Getränk
GK1	5	17:00	200	Chickenwings mit süß-saurer Soße und Brot
GK1	5	17:00	400	Pizza Thunfisch
GK1	5	17:30	2000	Leitungswasser
GK1	5	17:30	150	Espresso
GK1	5	02:00	330	Radler
GK1	6	11:00	500	Leitungswasser
GK1	6	11:00	150	Banane
GK1	6	11:30	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	6	13:30	1000	Leitungswasser
GK1	6	13:30	400	Pizza Speciale
GK1	6	14:00	150	Kaffee (1 Pad, schwarz)
GK1	6	14:00	30	Vollmilchschokolade (ganze Nuss)
GK1	6	16:00	1000	Leitungswasser
GK1	6	16:00	100	Eis (cookie Dough)
GK1	6	19:00	500	Iso-Sport-Getränk
GK1	6	19:00	280	Sandwich (Leberwurst, Käse, BBQ-Sauce)
GK1	6	20:00	50	Vollmilchschokolade (ganze Nuss)
GK1	6	20:00	200	Johannisbeersaft
GK1	6	23:00	1200	Radler
GK1	6	23:00	200	Cheeseburger
GK1	6	00:00	500	Leitungswasser
GK1	7	11:00	500	Leitungswasser
GK1	7	14:00	200	Hähnchensteak
GK1	7	14:00	150	Kartoffelpüree
GK1	7	14:00	50	Feldsalat mit Balsamico

Tabelle 75 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK1	7	14:00	150	Aufbackbrötchen
GK1	7	15:00	110	Gelatelli-Eis
GK1	7	15:00	500	Leitungswasser
GK1	7	16:30	115	Snickers (Intense Choc)
GK1	7	16:30	500	Leitungswasser
GK1	7	20:00	100	Pizza mit Salami und Gemüse
GK1	7	20:00	150	RAPP-Multisaft
GK1	7	22:00	1000	Leitungswasser
GK1	8	10:00	500	Leitungswasser
GK1	8	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)
GK1	8	11:30	151	Cordon bleu mit Schinken und Käse gefüllt, Salat (Mensa)
GK1	8	11:30	500	Leitungswasser
GK1	8	15:00	160	Nektarine
GK1	8	15:00	500	Leitungswasser
GK1	8	16:00	160	Banane
GK1	8	16:00	160	Nektarine
GK1	8	19:30	200	Vollkornbrot (süß-saure Sauce, Schwarzwälder-Schinken, Gouda-Käse)
GK1	8	19:30	500	Iso-Fit-Getränk
GK1	8	20:00	150	Eis (cookie Dough)
GK1	8	23:00	1000	Radler
GK1	8	00:00	500	Leitungswasser
GK1	8	00:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	9	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)
GK1	9	10:00	50	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	9	11:15	665	Truthahnsteak mit Kräuter-Rahmsoße, Kroketten, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK1	9	11:15	500	Leitungswasser
GK1	9	14:00	60	Sandwich-Eis
GK1	9	16:00	500	Leitungswasser
GK1	9	16:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	9	16:00	160	Banane
GK1	9	19:00	1000	Radler
GK1	9	19:00	500	Leitungswasser
GK1	9	23:00	240	Sandwich (Mischbrot, Schwarzwälder-Schinken, Knoblauch-Dressing, Gouda-Käse)
GK1	9	23:00	500	Leitungswasser
GK1	9	23:00	100	Haselnuss-Mignon-Schnitte
GK1	10	10:00	150	Milchkaffee
GK1	10	10:00	200	Nuss-Nougat Croissant
GK1	10	12:15	394	Rindergeschnetzeltes in Pfeffersoße mit Spätzle, Suppe (Mensa)
GK1	10	12:15	500	Leitungswasser
GK1	10	14:30	150	Milchkaffee
GK1	10	16:00	500	Leitungswasser
GK1	10	18:00	500	Leitungswasser
GK1	10	22:30	360	Crepes mit Marmelade

Tabelle 75 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK1	10	22:30	300	Leitungswasser
GK1	10	23:30	150	Apfel
GK1	10	23:30	500	Leitungswasser

Tabelle 76: Ernährungsprotokolle Proband GK2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK2	1	10:00	200	Glas Wasser aus der Leitung
GK2	1	11:40	924	Schinken-Sahne-Nudeln, Grana Padano, Suppe, Salat (Mensa)
GK2	1	12:30	1000	Mineralwasser (Plastikflasche)
GK2	1	16:10	250	Kaffee (2 Pads), schwarz
GK2	1	18:00	250	Leitungswasser
GK2	1	18:00	180	Belegtes Brötchen mit Butter, Schinken und Käse
GK2	1	20:15	400	Glas Wasser
GK2	1	20:15	122	Belegtes Brötchen wie 18:00
GK2	1	20:30	120	Belegtes Brötchen wie 18:00
GK2	1	22:00	200	Bier
GK2	2	08:20	250	Kaffee (2 Pads), schwarz
GK2	2	09:40	250	Leitungswasser
GK2	2	11:30	745	Schafskäse überbacken mit Paprika, Oliven, Peperoni und Zwiebeln, dazu ein Baguettebrötchen, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK2	2	12:30	250	Leitungswasser
GK2	2	13:12	125	Avocado (2/3)
GK2	2	14:00 - 20:00	1000	Leitungswasser
GK2	2	14:00 - 20:00	50	Haselnusschnitte
GK2	2	22:00	600	Döner
GK2	2	22:30	500	Bier (Pils)
GK2	3	11:00	90	Nuss-Nougat-Croissant
GK2	3	11:30	799	Seelachsfilet mit Spinat-Vitalkruste, Apfel-Birnen-Béchamelsoße, Rosinen-Safran-Reis, Salat, Suppe (Mensa)
GK2	3	13:00	90	Sandwich-Eis
GK2	3	11:30 - 14:00	1000	Leitungswasser
GK2	3	13:45	110	Apfel
GK2	3	14:10	150	Banane
GK2	3	15:09	157	Apfel
GK2	3	16:35	120	Brötchen mit Leberkäse, Käse und Butter
GK2	3	19:50	160	Apfel
GK2	3	20:00	1000	Leitungswasser
GK2	3	21:30	100	Toastbrot (Leberkäse, BBQ-Sauce, Käse)
GK2	3	22:30	150	Pfefferminztee mit Honig
GK2	3	23:30	150	Grüner Tee mit Honig
GK2	4	05:35	200	Haferflocken mit Banane + Honig
GK2	4	09:05	100	Kaffee
GK2	4	12:00	400	ACE-Saft
GK2	4	12:00	1000	Leitungswasser
GK2	4	13:00	600	Pasta mit gebackenen Tomaten, Olivenöl, Knoblauch

Tabelle 76 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK2	4	14:00	150	Apfel
GK2	4	16:30	500	Leitungswasser
GK2	4	17:30	250	Johannisbeersaft
GK2	4	18:10	200	belegtes Brötchen
GK2	4	21:00	60	1 Banane
GK2	4	21:00	200	Johannisbeersaft
GK2	4	23:00	200	Pfefferminztee
GK2	5	00:00	90	Banane
GK2	5	09:00	250	Kaffee (2 Pads)
GK2	5	09:15	90	Belegtes Brötchen
GK2	5	12:00	250	Glas Leitungswasser
GK2	5	12:00	60	Banane
GK2	5	14:00	175	1/2 Pizza vegetarisch
GK2	5	14:00	175	1/2 Pizza Speciale
GK2	5	15:41	150	Kaffee (1 Pad)
GK2	5	16:30	157	Apfel
GK2	5	17:00	200	Johannisbeersaft
GK2	5	20:00	250	Grüner Tee + Honig
GK2	5	21:00	100	Brot, Leberkäse, Käse, Butter
GK2	6	09:00	250	Grüner Tee + Honig
GK2	6	09:00	130	Brot, Leberkäse, Butter, Käse
GK2	6	09:30	250	Kaffee (2 Pads)
GK2	6	11:00	150	Apfel
GK2	6	11:00	250	Leitungswasser
GK2	6	14:00	420	Spaghetti Bolognese
GK2	6	14:30	150	Kaffee
GK2	6	14:30	200	Leitungswasser
GK2	6	14:35	70	Käsekuchen
GK2	6	16:30	250	Leitungswasser
GK2	6	18:30	150	Toastbrot belegt
GK2	6	18:30	200	Grüner Tee
GK2	6	20:00	100	Nuss-Nougat-Croissant
GK2	6	20:00	150	Johannisbeersaft
GK2	6	22:00	1000	Leitungswasser
GK2	6	22:00	150	Johannisbeersaft
GK2	7	08:10	250	Leitungswasser
GK2	7	08:45	250	Kaffee (2 Pads)
GK2	7	13:00	500	Leitungswasser
GK2	7	14:00	500	Reis mit Fisch, Oliven, Knoblauch, Kartoffeln
GK2	7	14:30	100	Kaffee
GK2	7	17:00	250	Johannisbeersaft gemischt mit Leitungswasser
GK2	7	20:00	150	Pizza Vegetarisch+ Salami
GK2	7	22:00	500	Leitungswasser
GK2	7	22:30	150	ACE-Saft
GK2	8	06:30	250	Grüner Tee+ Honig

Tabelle 76 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK2	8	09:30	250	Kaffee (2 Pads)
GK2	8	11:30	253	Cordon bleu mit Schinken und Käse gefüllt, Pommes frites frites, Salat (Mensa)
GK2	8	13:00	100	Kaffee (1 Pad)
GK2	8	13:00	93	Nuss-Nougat-Croissant
GK2	8	13:30	160	Nektarine
GK2	8	13:40	100	Banane
GK2	8	14:00	500	Leitungswasser
GK2	8	17:15	200	Brot belegt mit Käse, Wurst, Butter
GK2	8	18:00	144	Nektarine
GK2	8	19:00	95	Toastbrot belegt mit Käse, Wurst, Butter
GK2	8	19:30	90	Banane
GK2	8	20:30	125	Eis (Cookie-Dough)
GK2	9	09:30	250	Kaffee (2 Pads)
GK2	9	09:45	250	Grüner Tee + Honig
GK2	9	12:00	450	Pasta mit gehackten Tomaten, Olivenöl, Knoblauch
GK2	9	13:25	125	Kaffee (1 Pads)
GK2	9	14:00	150	Nektarine
GK2	9	15:00	250	Leitungswasser
GK2	9	15:00	90	Banane
GK2	9	19:45	200	Brot belegt mit BBQ-Sauce, Käse und Wurst
GK2	9	21:00	500	Wasser
GK2	10	09:00	250	Grüner Tee + Honig
GK2	10	09:15	100	Brot mit Käse und Butter
GK2	10	12:30	654	Rindergeschmortes in Pfeffersauce mit Spätzle, Salat, Suppe (Mensa)
GK2	10	13:00	250	Leitungswasser
GK2	10	13:20	178	Apfel
GK2	10	14:30	160	Apfel
GK2	10	14:30	90	Banane
GK2	10	15:00	250	Kaffee (2 Pads) Neue Marke
GK2	10	16:30 - 19:00	1500	Leitungswasser
GK2	10	20:30	200	Baguette belegt mit Schinken, Käse und Butter
GK2	10	22:00	700	Leitungswasser

Tabelle 77: Ernährungsprotokolle Proband GK3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK3	1	06:50	-	Streuselkuchen
GK3	1	12:30	924	Schinken-Sahne-Nudeln, Grana Padano, Suppe, Salat (Mensa)
GK3	1	13:00	200	Kaffee
GK3	1	16:00	200	Kaffee
GK3	1	18:30	66	3 Hanuta
GK3	1	22:30	300	Nudeln
GK3	1	22:30	300	Schweinefleisch
GK3	1	ganzer Tag	1500	Leitungswasser

Tabelle 77 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK3	2	05:00	500	Orangensaft
GK3	2	06:30	150	Müsli mit Milch
GK3	2	12:00	544	Paniertes Schweineschnitzel "Jäger Art" mit Pommes frites frites, Salat (Mensa)
GK3	2	12:30	200	Kaffee
GK3	2	14:00	400	Cola
GK3	2	20:30	300	Nudeln
GK3	2	20:30	300	Schweinefleisch
GK3	2	ganzer Tag	1000	Leitungswasser
GK3	3	06:30	150	Müsli mit Milch
GK3	3	08:00	500	Cola
GK3	3	10:00	200	Kaffee
GK3	3	11:00	200	Kaffee
GK3	3	13:00	799	Seelachsfilet mit Spinat-Vitalkruste, Apfel-Birnen-Béchamelsoße, Rosinen-Safran-Reis, Salat, Suppe (Mensa)
GK3	3	13:30	400	Kaffee
GK3	3	14:00	22	Hanuta
GK3	3	18:00	22	Hanuta
GK3	3	18:00	200	Milchreis
GK3	3	18:00	50	Studentenfutter
GK3	3	22:45	150	Nudeln mit Pesto
GK3	4	06:30	150	Müsli mit Milch
GK3	4	10:00	400	Kaffee
GK3	4	13:00	846	"Burrito": Tortilla mit feuriger Rindfleisch-Gemüsefüllung, geriebenem Käse, Sour Cream, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK3	4	15:00	500	Cola
GK3	4	15:30	22	Hanuta
GK3	4	16:00	1500	Leitungswasser
GK3	4	16:30	500	Bollburger
GK3	4	19:30	660	Radler
GK3	4	21:30	150	Nudeln mit Pesto
GK3	4	22:00 - 01:00	2000	Bier (Bitburger)
GK3	5	06:30	150	Müsli mit Milch
GK3	5	08:00	248	2 Brötchen, 1 Laugenbrötchen
GK3	5	09:00	500	Cola
GK3	5	10:00	400	Kaffee
GK3	5	12:30	1031	Pfälzer Grumbeersuppe mit Grumbeerpannekuchen und hausgemachtem Appelmus, Suppe (Mensa)
GK3	5	15:00	500	Cola
GK3	5	15:30	70	Studentenfutter
GK3	5	21:30	22	Hanuta
GK3	5	23:00	150	Nudeln mit Pesto
GK3	5	ganzer Tag	3000	Leitungswasser
GK3	6	06:30	150	Müsli mit Milch
GK3	6	08:00	700	Leitungswasser
GK3	6	13:00	200	Pizza

Tabelle 77 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK3	6	15:00	22	Hanuta
GK3	6	17:00	1500	Leitungswasser
GK3	6	22:00	200	gegrilltes Fleisch + Karottensalat + Kräuterbaguette
GK3	6	22:00	500	Bier
GK3	6	22:00	330	Sprite
GK3	7	08:00	150	Müsli mit Milch
GK3	7	15:00	674	300 g Nudeln mit 200 g Bratwurst und 3 Eiern
GK3	7	18:30	200	Schokomüsli mit Milch
GK3	7	22:00	500	Bier
GK3	7	ganzer Tag	3000	Leitungswasser
GK3	8	06:30	200	Schokomüsli mit Milch
GK3	8	06:45	200	Kaffee
GK3	8	12:00	900	Putengulasch in Paprikarahmsauce mit Eiernudeln, Kaisergemüse, Kaltschale (Mensa)
GK3	8	15:30	500	Cola
GK3	8	17:00	500	Cola
GK3	8	17:00	70	Studentenfutter
GK3	8	17:00	170	Frikadellen-Brötchen (Mensa)
GK3	8	22:00	150	Nudeln mit Pesto
GK3	8	ganzer Tag	2500	Leitungswasser
GK3	9	06:30	200	Schokomüsli mit Milch
GK3	9	11:30	724	Truthahnsteak mit Kräuter-Rahmsauce, Kroketten, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK3	9	14:00	500	Cola
GK3	9	15:30	500	Cola
GK3	9	15:30	70	Studentenfutter
GK3	9	20:30	220	Fleischkäsebrötchen mit Ketchup
GK3	9	21:00 - 22:00	990	Bier
GK3	9	ganzer Tag	1500	Leitungswasser
GK3	10	06:30	200	Schokomüsli mit Milch
GK3	10	08:30	248	2 Laugenbrötchen mit Frischkäse
GK3	10	12:30	654	Rindergeschnetzeltes in Pfeffersauce mit Spätzle, Salat, Suppe (Mensa)
GK3	10	15:30	400	Kaffee
GK3	10	15:30	22	Hanuta
GK3	10	19:00	200	Schokomüsli mit Milch
GK3	10	ganzer Tag	2000	Leitungswasser

Tabelle 78: Ernährungsprotokolle Proband GK4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK4	1	14:00	589	Pizza Margarita
GK4	1	14:00	233	Leitungswasser
GK4	1	17:30	230	Leitungswasser
GK4	1	19:00	236	Weltmeisterbrot (Salami u. Emmentaler)
GK4	1	19:00	460	Leitungswasser

Tabelle 78 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK4	1	21:00	539	Nougat Kissen, Milch 3,5 %
GK4	2	10:00	233	Leitungswasser
GK4	2	11:00 - 17:00	750	Active O2 Apfel Kiwi
GK4	2	17:00	750	Hot-Dog (Ikea)
GK4	2	19:45		Leitungswasser
GK4	2	17:00	200	Smoothie Blueberry and Raspberry
GK4	2	21:30	900	Hühner-Nudel-Eintopf
GK4	2	21:30	75	Muffin Schoko
GK4	2	23:00	250	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)
GK4	3	08:30	40	Muffin Schoko
GK4	3	08:30	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	3	11:30	350	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei
GK4	3	11:30	500	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)
GK4	3	12:00 - 15:0	750	Active O2 Apfel Kiwi
GK4	3	18:00	450	Leitungswasser
GK4	3	20:30	120	Chips Chakalaka
GK4	3	21:00	500	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)
GK4	3	21:00	130	Salat
GK4	3	21:00	450	Spaghetti mit Olivenöl, Zwiebel, Tomaten, Garnelen
GK4	3	21:00	40	Brot
GK4	3	21:15	350	Pfirsichsaft
GK4	4	11:00	150	Brötchen mit Schinken und Griebenschmalz
GK4	4	12:00 - 14:00	750	Active O2 Apfel Kiwi
GK4	4	15:00	800	Hack-Lauchsuppe
GK4	4	15:00	50	Brötchen
GK4	4	16:00 - 18:0	350	Active O2 Apfel Kiwi
GK4	4	18:00	500	Cola-Weizen
GK4	4	19:30	550	Active O2 Apfel Kiwi
GK4	4	19:45	350	Hack-Lauchsuppe
GK4	4	19:50	250	Banane mit Quark Genuss Himbeer Rhabarber
GK4	5	09:30	150	Brötchen mit Schinken und Griebenschmalz
GK4	5	12:30	320	Banane
GK4	5	13:00	100	Hack-Lauchsuppe
GK4	5	17:00	500	Eistee Wildkirsch
GK4	5	18:00	800	Lasagne Bolognese
GK4	5	18:00 - 21:00	500	Eistee Wildkirsch
GK4	5	21:00	100	Erdnüsse
GK4	6	11:30	420	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	6	11:30	66	Zimtschnecke
GK4	6	11:45	300	Hot Dog
GK4	6	15:00	280	Fleischbällchen
GK4	6	15:00	400	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	6	18:00 - 22:00	1200	Coca Cola
GK4	6	23:30	500	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	6	02:00	500	Cola-Weizen

Tabelle 78 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK4	7	11:30	80	Croissant
GK4	7	14:50	230	Suppe
GK4	7	14:50	560	Bratreis mit Gemüse und Ente
GK4	7	14:50	400	Eistee
GK4	7	19:00	400	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	7	21:00	330	Coca Cola
GK4	7	01:00	700	Cola Weizen
GK4	8	11:30	300	Kartoffelsalat
GK4	8	14:00	375	Obstgarten Pfirsich Maracuja
GK4	8	19:00	450	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei
GK4	8	20:00	250	Obstgarten Pfirsich Maracuja
GK4	8	14:00 - 21:00	1000	Eistee
GK4	9	11:15	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	9	11:15	66	Zimtschnecke
GK4	9	12:30	300	Hot Dog
GK4	9	14:00	250	Energy Drink (Summer mojito)
GK4	9	15:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	9	16:30	200	Hühner-Nudel-Eintopf
GK4	9	16:30	200	Rinderkraftbrühe
GK4	9	16:30	52	Brötchen
GK4	9	16:45	60	Brownie
GK4	9	20:00	300	Speck-Käse-Spätzle
GK4	9	19:00 - 20:30	1000	Cola Weizen
GK4	9	20:30	250	Obstgarten Pfirsich Maracuja
GK4	10	13:00	800	Lasagne Bolognese
GK4	10	18:00	500	Cola
GK4	10	20:00	500	Cola
GK4	10	21:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	10	23:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK4	10	00:00	500	Cola Weizen
GK4	10	01:00	500	Cola Weizen
GK4	10	01:00	300	Reis mit Currysauce

Tabelle 79: Ernährungsprotokolle Proband GK5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK5	1	09:00 - 13:00	500	Sprudelwasser
GK5	1	09:53	150	Yoo Fruit
GK5	1	12:30	808	Schinken-Sahne-Nudeln, Grana Padano, Suppe (Mensa)
GK5	1	14:00 - 19:00	500	Sprudelwasser
GK5	1	14:35	300	Pepsi light lemon
GK5	1	16:02	150	Jogurt mild
GK5	1	20:00 - 21:00	900	Sprudelwasser
GK5	1	20:30	158	Würstchen mit Senf und Ketchup
GK5	1	20:30	281	Brötchen Schinken
GK5	1	20:30	113	Brötchen Teewurst

Tabelle 79 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK5	1	21:00 - 23:59	700	Sprudelwasser
GK5	2	09:00 - 14:00	1000	Sprudelwasser
GK5	2	10:00	150	Yoo Fruit
GK5	2	12:30	492	Paniertes Schweineschnitzel "Jäger Art" mit Pommes frites frites, Kaltschale (Mensa)
GK5	2	13:30	300	Pepsi light lemon
GK5	2	16:30	300	Pepsi light lemon
GK5	2	20:30	150	Yoo Fruit
GK5	2	21:00	178	Würstchen mit Ketchup und Senf
GK5	2	21:00	168	Brötchen Schinken
GK5	2	21:00	500	Sprudelwasser
GK5	3	09:40	150	Yoo Fruit
GK5	3	10:00 - 17:00	700	Sprudelwasser
GK5	3	12:30	533	Cevapcici mit Ajvar-Dip, Pommes frites frites, Kaltschale (Mensa)
GK5	3	14:10	300	Pepsi light lemon
GK5	3	17:00	230	Bier
GK5	3	17:45	272	Pizza
GK5	3	20:00	280	Bier
GK5	3	20:00 - 22:15	500	Sprudelwasser
GK5	4	09:30	150	Yoo Fruit
GK5	4	10:00 - 17:00	1000	Sprudelwasser
GK5	4	12:40	742	"Burrito": Tortilla mit feuriger Rindfleisch-Gemüsefüllung, geriebenem Käse, Sour Cream, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK5	4	14:30	300	Pepsi light lemon
GK5	4	16:15	230	Bier
GK5	4	17:00	800	Radler
GK5	4	20:45	324	Brötchen Teewurst
GK5	4	20:45	88	Dipp
GK5	4	00:00 - 03:00	1100	Sprudelwasser
GK5	5	11:30	150	Yoo Fruit
GK5	5	11:30 - 18:00	1000	Sprudelwasser
GK5	5	16:45	71	Rocher-Eis
GK5	5	17:30	45	Pan tostado con tomate
GK5	5	17:30	330	Bier
GK5	5	20:00 - 21:00	1000	Bier
GK5	5	21:30	80	Baguette
GK5	5	21:30	125	Dipp
GK5	5	21:30	195	Würstchen mit Ketchup und Senf
GK5	5	21:30	157	Brötchen Käse
GK5	5	21:30	45	Mars
GK5	5	21:30	330	Bier
GK5	5	22:00	600	Sprudelwasser
GK5	6	05:00 - 08:00	1000	Sprudelwasser
GK5	6	11:00	300	Yoo Fruit
GK5	6	14:40	170	Brötchen Schinken
GK5	6	14:40	113	Brötchen Käse

Tabelle 79 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK5	6	16:00	330	Bier
GK5	6	16:00	200	Sekt
GK5	6	16:00	1000	Sprudelwasser
GK5	6	19:30	120	Baguette
GK5	6	19:30	44	Dipp
GK5	6	19:30	104	Salat
GK5	6	19:30	330	Bitburger
GK5	6	19:30	115	Pommes frites
GK5	6	19:30	308	Schweinefilet mit Gorgonzolasoße
GK5	6	20:30	500	Radler
GK5	6	20:30	94	Tiramisu
GK5	6	20:30	500	Leitungswasser
GK5	6	23:00	400	Weizen
GK5	6	23:00	108	Tiramisu
GK5	7	10:00	123	Brötchen mit Gorgonzola und Bergkäse
GK5	7	22:00	110	Brötchen mit Bergkäse
GK5	7	10:00	500	Leitungswasser
GK5	7	10:00	108	Tiramisu
GK5	7	12:30	500	Leitungswasser
GK5	7	13:30	56	Pan tostado con tomate
GK5	7	15:00	500	Leitungswasser
GK5	7	17:00	108	Brötchen mit Bergkäse
GK5	7	17:00	253	Tiramisu
GK5	7	17:00	500	Cola light
GK5	7	17:00	150	Leitungswasser
GK5	7	22:00	90	Schweinefilet mit Gorgonzolasoße
GK5	7	22:00	261	Brötchen mit Bergkäse
GK5	7	22:30	500	Leitungswasser
GK5	8	09:00	150	Yoo Fruit
GK5	8	09:00	250	Sprudelwasser
GK5	8	12:30	699	Putengulasch in Paprikarahmsoße mit Eiernudeln, Kaltschale (Mensa)
GK5	8	16:52	300	Pepsi light lemon
GK5	8	17:00 - 19:00	250	Sprudelwasser
GK5	8	19:30	235	Gnocchi
GK5	8	19:30	205	Fleisch Curry
GK5	8	22:00	700	Sprudelwasser
GK5	9	09:30	150	Yoo Fruit
GK5	9	10:00 - 14:00	300	Leitungswasser
GK5	9	12:30	472	Truthahnsteak mit Kräuter-Rahmsoße, Kroketten, Salat (Mensa)
GK5	9	15:50	300	Pepsi light lemon
GK5	9	18:00 - 19:00	300	Leitungswasser
GK5	9	19:00	291	(Vier-)Käsepizza
GK5	9	19:00	400	Multisaft
GK5	9	22:00	300	Sprudelwasser

Tabelle 79 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK5	10	08:44	150	Yoo Fruit
GK5	10	11:11	300	Multisaft
GK5	10	12:30	654	Rindergeschnetzeltes in Pfeffersoße mit Spätzle, Salat, Suppe (Mensa)
GK5	10	14:00 - 16:00	300	Leitungswasser
GK5	10	17:00	300	Pepsi light lemon
GK5	10	19:00	340	Die Knusperfrische Peperoni-Salami
GK5	10	22:55	500	Leitungswasser

Tabelle 80: Ernährungsprotokolle Proband GK6 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK6	1	07:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	1	12:40	258	Naturjoghurt mit Apfel und Müsli
GK6	1	13:15	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	1	15:45	400	Rinderkraftbrühe
GK6	1	18:15	346	Nudeln mit Geschnetzeltem (Schwein) und Champignons
GK6	1	19:30	250	Leitungswasser
GK6	1	21:30	250	Leitungswasser
GK6	1	21:30	300	Kakao
GK6	2	07:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	2	07:30	30	Brownie
GK6	2	09:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	2	12:00	250	Naturjoghurt mit Apfel und Müsli
GK6	2	17:00	450	Hot-Dog
GK6	2	17:00	200	Smoothie
GK6	2	19:45	300	Leitungswasser
GK6	2	21:30	400	Hühner-Nudel-Eintopf
GK6	2	21:30	76	Muffin Schoko
GK6	3	08:30	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	3	08:30	50	Muffin Schoko
GK6	3	11:30	210	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei
GK6	3	11:30	200	Frühstücks-Nektar
GK6	3	15:00	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	3	16:45	230	Müsli mit Milch
GK6	3	21:00	200	Frühstücks-Nektar
GK6	3	18:00	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	3	21:30	130	Salat
GK6	3	21:30	270	Spaghetti
GK6	3	21:30	50	Naan-Brot
GK6	3	23:18	200	Pfirsichsaft
GK6	3	23:18	100	Leitungswasser
GK6	4	08:55	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	4	09:50	116	Brötchen
GK6	4	15:00	360	Hack-Lauchsuppe
GK6	4	15:00	53	Brötchen

Tabelle 80 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK6 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK6	4	18:00	400	Cola-Weizen
GK6	4	19:30	200	Active O2
GK6	4	19:30	320	Hack-Lauchsuppe
GK6	4	19:50	50	Nutella-Brötchen
GK6	4	15:00	350	Fanta
GK6	5	07:20	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	5	12:15	240	Müsli mit Milch
GK6	5	17:30	300	Rinderkraftbrühe
GK6	5	17:30	100	2 Brötchen
GK6	5	20:15	200	Leitungswasser
GK6	5	21:15	200	Leitungswasser
GK6	5	22:00	100	Salat
GK6	5	22:00	291	Kürbis-Kartoffel-Karotte-Auflauf
GK6	5	22:30	250	Kakao
GK6	6	11:30	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	6	11:45	300	Hot-Dog
GK6	6	12:00	66	Zimtschnecke
GK6	6	15:00	220	Fleischbällchen
GK6	6	15:15	230	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	6	22:00	400	Radler
GK6	6	23:30	200	Red Bull (Blueberry) mit Wodka
GK6	6	01:00	200	Red Bull (Blueberry) mit Wodka
GK6	6	02:00	250	Fanta
GK6	6	02:30	158	Hamburger
GK6	6	03:30	230	Pommes frites mit Ketchup + Mayo
GK6	7	09:45	330	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	7	11:15	80	Croissant
GK6	7	14:15	240	Suppe Huhn
GK6	7	14:15	200	Bratreis mit Gemüse und Ente
GK6	7	18:30	200	Bratreis mit Gemüse und Ente
GK6	7	19:00 - 23:00	1000	Eistee Wildkirsch
GK6	8	07:30	255	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	8	10:15	75	Müsli mit Milch
GK6	8	13:00	250	Bratreis mit Gemüse und Ente
GK6	8	15:45	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	8	15:45	182	Dampfnudel mit Vanillesoße
GK6	8	22:15	378	Hühner-Nudel-Eintopf
GK6	9	07:30	255	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	9	09:50	30	Brownie
GK6	9	12:10	500	Salat + Joghurtdressing
GK6	9	15:00	230	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	9	16:30	700	Rinderkraftbrühe
GK6	9	16:30	200	Hühner-Nudel-Top
GK6	9	16:30	52	Brötchen
GK6	9	20:00	240	Speck-Käse-Spätzle

Tabelle 80 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK6 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK6	9	20:00	200	Coca Cola
GK6	9	23:00	400	Leitungswasser
GK6	10	07:40	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	10	10:30	120	Vanille-Quark
GK6	10	10:45	138	Speck-Käse-Spätzle
GK6	10	12:15	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	10	14:10	30	Brownie
GK6	10	16:20	400	Hühner-Nudel-Top
GK6	10	16:20	52	Brötchen
GK6	10	17:35	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker
GK6	10	20:30	180	Sekt
GK6	10	22:20	174	Brötchen überbacken
GK6	10	22:30	30	Brownie

Tabelle 81: Ernährungsprotokolle Proband GK7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK7	1	09:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	1	09:00	130	1 Apfel
GK7	1	09:00	250	Leitungswasser
GK7	1	09:30	200	Kaffee
GK7	1	09:30	20	Schokolade
GK7	1	13:00	70	Bretzel mit Käse
GK7	1	13:00	250	Leitungswasser
GK7	1	14:45	350	Penne mit Napoli-Soße mit einem Würstchen
GK7	1	16:00	170	1 Pfirsich, 3 Aprikosen
GK7	1	16:00	250	Leitungswasser
GK7	1	20:00	300	Hähnchenbrust / Schweinefleisch, gebackene Kartoffeln
GK7	1	20:00	200	Sekt
GK7	2	10:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	2	10:00	130	1 Apfel
GK7	2	10:00	250	Wasser
GK7	2	10:30	200	Kaffee
GK7	2	10:30	20	Halbbitterschoko
GK7	2	10:30	250	Wasser
GK7	2	13:00	544	Schafskäse überbacken mit Paprika, Oliven, Peperoni und Zwiebeln, dazu ein Baguettebrötchen, Salat (Mensa)
GK7	2	16:30	100	1 Brezel
GK7	2	16:30	250	Wasser
GK7	2	20:00	300	Reis mit Gemüse und Fleisch, Hähnchenbrust in Sahnesoße
GK7	2	20:00	250	Wasser
GK7	2	20:00	200	Secco
GK7	3	09:30	250	Wasser
GK7	3	09:30	130	1 Apfel
GK7	3	09:30	250	Haferbrei mit Wasser und Milch

Tabelle 81 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK7	3	09:50	200	Kaffee
GK7	3	09:50	20	Schokolade
GK7	3	13:00	300	Schlemmer-Geschnetzeltes, Hähnchen mit Zwiebeln + Sahne
GK7	3	13:00	250	Wasser
GK7	3	15:00	200	Grapefruitsaft
GK7	3	15:00	100	2 Aprikosen, 1 Pfirsich
GK7	3	20:00	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse
GK7	3	20:00	250	Wasser
GK7	4	08:00	250	Wasser
GK7	4	08:00	130	1 Apfel
GK7	4	08:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	4	08:10	200	Kaffee
GK7	4	08:10	20	Schokolade
GK7	4	08:10	100	Wasser
GK7	4	13:00	516	Hähnchen-Cordon-bleu mit Truthahnschinken und Käse gefüllt, Kroketten, Salat (Mensa)
GK7	4	13:30	200	Kaffee
GK7	4	13:30	250	Wasser
GK7	4	15:00	60	2 Aprikosen
GK7	4	15:00	200	Grapefruitsaft
GK7	4	19:30	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse
GK7	4	19:30	150	Multivitaminsaft
GK7	5	07:45	250	Wasser
GK7	5	07:45	130	1 Apfel
GK7	5	07:45	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	5	08:00	200	Kaffee mit Milch
GK7	5	08:00	20	Schokolade
GK7	5	08:00	250	Wasser
GK7	5	14:00	250	Bratkartoffeln mit Brot (1 Scheibe)
GK7	5	16:30	60	Käsekuchen
GK7	5	16:30	200	Kaffee mit Milch
GK7	5	18:00	170	Pizza mit Hähnchen und Gemüse
GK7	5	18:00	200	Multivitamin-Saft
GK7	6	09:30	250	Wasser
GK7	6	09:30	130	1 Apfel
GK7	6	09:30	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	6	09:40	200	Kaffee mit Milch
GK7	6	09:40	20	Schokolade
GK7	6	09:40	50	Käsekuchen
GK7	6	14:00	380	Spaghetti Bolognese
GK7	6	14:00	200	Multivitaminsaft
GK7	6	15:00	100	1 Brezel
GK7	6	15:00	250	Wasser
GK7	6	17:30	30	Eis am Stiel
GK7	6	17:30	250	Wasser

Tabelle 81 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK7	6	19:30	100	1 Scheibe Brot mit Käse
GK7	6	19:30	200	Sekt
GK7	6	19:30	200	Wasser
GK7	7	09:40	250	Wasser
GK7	7	09:40	130	1 Apfel
GK7	7	09:40	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	7	09:55	200	Kaffee mit Milch
GK7	7	09:55	20	Schokolade
GK7	7	12:30	200	Wasser
GK7	7	12:30	200	Multivitaminsaft
GK7	7	14:30	300	Fisch mit Gemüse + Kartoffeln (gebacken)
GK7	7	14:30	250	Multivitamin-Schorle
GK7	7	16:00	200	Wasser
GK7	7	19:30	100	Pizza mit Gemüse und Salami
GK7	7	19:30	250	Wasser
GK7	8	09:00	250	Wasser
GK7	8	09:00	130	1 Apfel
GK7	8	09:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	8	09:30	200	Kaffee mit Milch
GK7	8	09:30	20	Schokolade
GK7	8	13:50	370	Pasta Napoli, 1 Würstchen
GK7	8	15:00	60	Käsekuchen
GK7	8	15:00	200	Kaffee mit Milch
GK7	8	15:30	180	2 Pfirsiche
GK7	8	19:00	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse
GK7	8	ganzer Tag	2000	Leitungswasser
GK7	9	09:20	250	Wasser
GK7	9	09:20	130	1 Apfel
GK7	9	09:20	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	9	09:35	200	Kaffee mit Milch
GK7	9	09:35	20	Schokolade
GK7	9	14:00	300	Borsch (Suppe mit Gemüse und Suppenfleisch vom Rind), dazu Schwarzbrot
GK7	9	15:00	40	1 Pfirsich
GK7	9	16:00	30	Eis am Stiel
GK7	9	19:00	100	Brot mit Käse
GK7	9	ganzer Tag	2000	Leitungswasser
GK7	10	10:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch
GK7	10	10:00	80	1 Apfel
GK7	10	10:00	250	Leitungswasser
GK7	10	10:15	200	Kaffee mit Milch
GK7	10	10:15	20	Schokolade
GK7	10	13:00	100	Brezel
GK7	10	14:30	300	Suppe mit Gemüse
GK7	10	16:00	50	1 Pfirsich

Tabelle 81 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK7	10	19:30	250	Pfannkuchen mit Erdbeermarmelade und etwas saurer Sahne

Tabelle 82: Ernährungsprotokolle Proband GK8 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK8	1	12:30	90	2 Brote mit Leberwurst
GK8	1	12:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	1	12:30	300	Kaffee
GK8	1	19:00	300	Leitungswasser
GK8	1	19:30	450	Müsli
GK8	2	10:00	450	Müsli
GK8	2	10:00	300	Kaffee
GK8	2	15:30	250	Zimt-Fächer
GK8	2	20:30	150	Zimt-Fächer
GK8	2	20:30	400	Nektarinen
GK8	3	09:30	90	2 Brote mit Leberwurst
GK8	3	09:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	3	09:30	300	Kaffee
GK8	3	09:30	300	Leitungswasser
GK8	3	09:30	120	Mini-Windbeutel mit Sahnefüllung
GK8	3	17:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	3	17:30	300	Orangensaft
GK8	3	19:00	350	Lasagne
GK8	3	19:00	600	Orangensaft
GK8	4	08:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	4	08:30	300	Orangensaft
GK8	4	10:30	90	2 Brote mit Leberwurst
GK8	4	10:30	300	Orangensaft
GK8	4	19:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	4	19:30	300	Orangensaft
GK8	4	19:30	350	Nektarinen
GK8	5	08:30	450	Müsli
GK8	5	08:30	300	Orangensaft
GK8	5	19:00	400	Fanta
GK8	5	23:00	450	Müsli
GK8	5	23:00	300	Orangensaft
GK8	6	08:30	55	Brot mit Käse
GK8	6	08:30	45	Brot mit Leberwurst
GK8	6	08:30	150	Nektarinen
GK8	6	08:30	300	Orangensaft
GK8	6	15:00	150	Kirschtasche
GK8	6	15:00	200	2x Käsebrötchen
GK8	6	15:00	150	Ananas
GK8	6	21:00	150	Ananas
GK8	6	21:00	150	Nektarinen

Tabelle 82 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK8 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK8	6	21:00	300	Orangensaft
GK8	7	11:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	7	11:30	450	Müsli
GK8	7	11:30	600	Leitungswasser
GK8	7	11:30	300	Orangensaft
GK8	7	21:30	400	Spaghetti mit Gemüse
GK8	7	21:30	300	Orangensaft
GK8	7	21:30	300	Kaffee
GK8	7	22:30	300	Ananas
GK8	8	08:30	600	Leitungswasser
GK8	8	08:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	8	16:00	150	Heringsfilet mit Tomatensoße
GK8	8	16:00	1200	Leitungswasser
GK8	8	18:00	250	Mini-Windbeutel mit Sahnefüllung
GK8	8	18:00	300	Kaffee
GK8	9	08:30	600	Leitungswasser
GK8	9	11:00	110	2 Brote mit Käse
GK8	9	11:00	300	Fanta
GK8	9	15:30	250	Eiscreme
GK8	9	17:00	400	Paella
GK8	9	21:00	500	Eiscreme
GK8	10	08:30	110	2 Brote mit Käse
GK8	10	08:30	45	Brot mit Leberwurst
GK8	10	08:30	300	Kaffee
GK8	10	14:00	450	Müsli
GK8	10	14:00	45	Brot mit Leberwurst
GK8	10	19:00	250	Mini Windbeutel
GK8	10	19:00	300	Ananas

Tabelle 83: Ernährungsprotokolle Proband GK9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK9	1	07:00	150	Hefezopf
GK9	1	07:00	250	Kakao
GK9	1	07:00	150	Wasser
GK9	1	07:50	150	Wasser
GK9	1	09:30 - 11:30	750	Wasser
GK9	1	12:30	600	Coca Cola light
GK9	1	12:30	303	veg. Pizza
GK9	1	14:30 - 17:15	800	Wasser
GK9	1	18:00	205	Frikadellen + Ketchup
GK9	1	18:00	287	Brokkoli
GK9	1	18:00 - 19:45	800	Wasser
GK9	1	18:30	63	Gewürzkuchen
GK9	1	20:00 - 22:15	750	Wasser
GK9	1	03:00	50	Wasser

Tabelle 83 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK9	2	07:40	200	Schokobrötchen
GK9	2	07:40	250	Kakao
GK9	2	07:40	250	Wasser
GK9	2	08:32 - 10:40	800	Wasser
GK9	2	12:05	315	Lasagne mit Spinat und Schafskäse
GK9	2	11:00 - 14:40	1000	Wasser
GK9	2	14:45 - 18:10	700	Wasser
GK9	2	17:10	144	Neapolitaner Waffeln
GK9	2	17:10	250	Coca Cola light
GK9	2	20:05	165	Tomate + Mozzarella
GK9	2	20:05	247	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße
GK9	2	19:50-20:50	800	Wasser
GK9	2	21:00 - 22:50	150	Wasser
GK9	2	01:15	150	Wasser
GK9	3	07:15	130	Schoko-Cornflakes
GK9	3	07:15	250	Milch
GK9	3	07:15	250	Wasser
GK9	3	08:40-09:00	300	Wasser
GK9	3	12:15	432	Puten-Döner (selbst gemacht)
GK9	3	09:30-12:30	800	Wasser
GK9	3	12:30-15:45	800	Wasser
GK9	3	16:40	71	Nuss Eishörnchen
GK9	3	16:50	250	Coca Cola light
GK9	3	16:50	122	Frischeiwaffeln
GK9	3	18:50 - 21:50	800	Wasser
GK9	3	19:45	144	Tomate-Mozzarella
GK9	3	19:45	175	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße
GK9	3	19:45	250	Coca Cola light
GK9	3	21:50	71	Nuss Eishörnchen
GK9	3	21:55 - 23:00	400	Wasser
GK9	4	07:35	144	Schoko-Cornflakes
GK9	4	07:35	300	Milch
GK9	4	07:35	300	Wasser
GK9	4	08:30 - 12:20	500	Wasser
GK9	4	10:35-15:00	1300	Wasser
GK9	4	13:15	712	Spaghetti mit Tomatensoße, Salat (Mensa)
GK9	4	13:15		1,5 Salat
GK9	4	13:45	71	Schokoeis
GK9	4	15:30 - 18:50	750	Wasser
GK9	4	17:15	300	Coca Cola light
GK9	4	17:15	85	Frischeiwaffeln
GK9	4	18:35	182	Pizza mit Schinken
GK9	4	19:00 - 21:50	800	Wasser
GK9	4	19:45	71	Nuss-Eishörnchen
GK9	4	19:00 - 23:00	100	Wasser

Tabelle 83 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK9	5	07:35	129	Schoko-Cornflakes
GK9	5	07:35	250	Milch
GK9	5	07:35	250	Wasser
GK9	5	08:30 - 12:20	600	Wasser
GK9	5	10:35-15:00	800	Wasser
GK9	5	13:15	65	Neapolitaner Waffeln
GK9	5	13:15	159	Pizza mit Schinken
GK9	5	13:45	84	Spaghetti mit Tomatensoße (Mensa)
GK9	5	15:30 - 18:50	800	Wasser
GK9	5	17:15	200	Sprudelwasser
GK9	5	17:15	109	Schoko-Brownies
GK9	5	18:35	200	Sprudelwasser
GK9	5	19:00 - 21:50	637	Nizza Salat
GK9	5	19:45	200	Sprudelwasser
GK9	5	19:00 - 23:00	300	Wasser
GK9	5	19:00 - 23:00	55	Neapolitaner Waffeln
GK9	6	08:00	111	Schoko-Cornflakes
GK9	6	08:00	250	Milch
GK9	6	08:00	300	Wasser
GK9	6	08:50-12:00	800	Wasser
GK9	6	12:40	149	Burger King Pommes frites
GK9	6	12:40	290	Big King
GK9	6	12:40	500	Coca Cola light
GK9	6	13:45	500	Coca Cola light
GK9	6	14:30	800	Wasser
GK9	6	16:18	65	Neapolitaner Waffeln
GK9	6	19:30 - 21:30	800	Wasser
GK9	6	20:30	287	Schafskäse mit Tomaten
GK9	6	20:30	286	Salat mit Tomaten, Paprika, Käse, Ei, Sauren Gurken, Gurken
GK9	7	08:00	130	Schoko-Cornflakes
GK9	7	08:00	250	Milch
GK9	7	08:00	300	Wasser
GK9	7	08:50-12:50	800	Wasser
GK9	7	13:00 - 18:00	800	Wasser
GK9	7	12:55	309	Mensa Vegetarische Lasagne
GK9	7	14:25	316	Schokocroissant
GK9	7	14:25	500	Cola Mix Zero
GK9	7	20:15	600	Cola 4
GK9	7	20:15	234	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße
GK9	7	20:15	338	Bohnen-Mais-Salat
GK9	7	21:50	100	Wasser
GK9	8	07:00	133	Schoko-Cornflakes
GK9	8	07:00	200	Milch
GK9	8	07:00	200	Wasser
GK9	8	09:10 - 14:00	1200	Wasser

Tabelle 83 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK9	8	11:55	409	Schnitzel "Wiener Art" mit Pommes frites frites, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK9	8	11:55	98	Ketchup
GK9	8	11:55	130	Neapolitaner Waffeln
GK9	8	14:00 - 18:00	750	Wasser
GK9	8	18:40	300	Cola Mix Zero
GK9	8	19:02	347	Schafskäse mit Tomaten
GK9	8	19:52	71	Nuss-Eishörnchen
GK9	8	20:00	300	Wasser
GK9	9	07:20	118	Schoko-Cornflakes
GK9	9	07:20	200	Milch
GK9	9	07:20	300	Wasser
GK9	9	08:50 - 12:00	800	Wasser
GK9	9	12:00 - 15:00	800	Wasser
GK9	9	12:10	142	Spaghetti mit Soja und Garnelen
GK9	9	12:25	65	Neapolitaner Waffeln
GK9	9	15:15	700	Wasser
GK9	9	16:36	600	Coca Cola light
GK9	9	16:36	276	Schokobrotchen
GK9	9	21:42	200	Wasser
GK9	9	22:25	71	Nuss-Eishörnchen
GK9	10	07:20	136	Schoko-Cornflakes
GK9	10	07:20	250	Milch
GK9	10	07:20	300	Wasser
GK9	10	08:05-13:00	800	Wasser
GK9	10	13:00 - 16:45	800	Wasser
GK9	10	13:20	144	Tomaten
GK9	10	13:20	350	Vollkornnudeln mit Thunfisch in Öl
GK9	10	16:40	216	Oreo Kekse Schoko
GK9	10	16:40	600	Coca Cola light
GK9	10	19:45	500	Wasser
GK9	10	19:55	287	Tomate + Mozzarella
GK9	10	21:25	300	Coca Cola light
GK9	10	22:00	216	Oreo Kekse Schoko
GK9	10	22:00	300	Coca Cola light

Tabelle 84: Ernährungsprotokolle Proband GK10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK10	1	12:30	863	Schweinerückensteak "Provincial", Pommes frites Frites, grüne Bohnen, Suppe (Mensa)
GK10	1	14:00	250	Mineralwasser classic
GK10	1	17:00	250	Leitungswasser
GK10	1	19:00	1000	Leitungswasser
GK10	1	20:30	147	Würstchen (Geflügelbratwurst, extrawürzig) mit Senf und Ketchup

Tabelle 84 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK10	1	20:30	35	Aufbackbrötchen
GK10	1	22:30	200	Sprudelwasser
GK10	2	11:00	16	Vegane Schokolade
GK10	2	12:30	946	Schafskäse überbacken mit Paprika, Oliven, Peperoni und Zwiebeln, dazu ein Baguettebrötchen, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK10	2	15:30	100	Sekt
GK10	2	17:30	500	Leitungswasser
GK10	2	20:45	250	Sprudelwasser
GK10	2	21:15	159	Würstchen mit Ketchup und Senf
GK10	2	21:15	44	Aufbackbrötchen
GK10	2	21:30	250	Sprudelwasser
GK10	2	22:40	250	Sprudelwasser
GK10	3	12:15	1086	Seelachsfilet mit Spinat-Vitalkruste, Apfel-Birnen-Béchamel-soße, Rosinen-Safran-Reis, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK10	3	14:35	300	Roter Saft
GK10	3	16:30	500	Leitungswasser
GK10	3	17:45	318	Pizza Salami + Pizza Käse
GK10	3	18:30	500	Mineralwasser classic
GK10	3	22:00	500	Leitungswasser
GK10	3	22:00	150	Yoo Fruit Mango-Maracuja
GK10	4	08:00	250	Leitungswasser
GK10	4	12:15	500	Mineralwasser classic
GK10	4	12:30	236	Würstchen mit Senf
GK10	4	12:30	300	Radler
GK10	4	13:30	76	Eis
GK10	4	17:00	800	Radler
GK10	4	17:30	250	Mineralwasser classic
GK10	4	20:45	94	Aufbackbrötchen
GK10	4	20:45	116	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)
GK10	4	20:45	132	Paprika + Tomate
GK10	4	22:45	250	Sprudelwasser
GK10	4	23:00	250	Sprudelwasser
GK10	5	11:00	125	Leitungswasser
GK10	5	12:15	751	Pfälzer Grumbeersuppe mit Grumbeerpannekuchen und hausgemachtem Appelmus, Suppe (Mensa)
GK10	5	13:00	125	Leitungswasser
GK10	5	15:00	250	Sprudelwasser
GK10	5	16:45	71	Mangoeis
GK10	5	17:45	200	Sprudelwasser
GK10	5	17:45	500	Radler
GK10	5	17:45	60	Pan tostado con tomate
GK10	5	20:00	900	Radler
GK10	5	21:30	61	Baguette (Peperonibaguette)
GK10	5	21:30	45	Aufbackbrötchen
GK10	5	21:30	107	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)

Tabelle 84 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK10	5	21:30	195	Würstchen mit Ketchup und Senf
GK10	5	21:30	500	Radler
GK10	5	22:00	250	Sprudelwasser
GK10	6	11:00	250	Leitungswasser
GK10	6	11:30	250	Leitungswasser
GK10	6	14:40	93	Aufbackbrötchen
GK10	6	14:40	72	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)
GK10	6	14:40	250	Leitungswasser
GK10	6	15:20	120	Buttergemüse
GK10	6	16:00	110	Sekt
GK10	6	16:00	250	Leitungswasser
GK10	6	17:45	71	Rocher-Eis
GK10	6	18:00	400	Radler
GK10	6	19:30	46	Baguette (Peperonibaguette)
GK10	6	19:30	27	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)
GK10	6	19:30	101	Salat
GK10	6	19:30	162	Pommes frites (selbst gemacht im Backofen)
GK10	6	19:30	62	Schweinefilet mit Pilzsoße
GK10	6	19:30	75	Schweinefilet mit Gorogonzolasoße
GK10	6	19:30	500	Radler
GK10	6	21:00	250	Leitungswasser
GK10	6	21:30	71	Tiramisu
GK10	6	22:00	250	Leitungswasser
GK10	6	23:00	300	Maracuja-Schorle
GK10	7	10:00	101	Brötchen mit Gorgonzola und Bergkäse
GK10	7	10:00	250	Leitungswasser
GK10	7	11:45	172	Buttergemüse
GK10	7	11:45	250	Zitronenwasser
GK10	7	13:00	107	Pan tostado con tomate
GK10	7	13:00	250	Zitronenwasser
GK10	7	14:30	250	Zitronenwasser
GK10	7	16:15	78	Pommes frites (selbst gemacht im Backofen)
GK10	7	17:00	250	Zitronenwasser
GK10	7	18:15	94	Aufbackbrötchen
GK10	7	18:15	75,4	Schweinefilet mit Pilzsoße
GK10	7	18:15	45,8	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)
GK10	7	22:00	45	Himbeereis
GK10	7	22:00	500	Orangensaft mit Eiswürfeln
GK10	8	11:00	250	Leitungswasser
GK10	8	12:30	389	Sellerieschnitzel mit Schnittlauch-Dip, Pommes frites frites, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK10	8	15:00	250	Leitungswasser
GK10	8	17:30	150	Yoo Fruit Mango-Maracuja
GK10	8	18:00	500	Mineralwasser classic
GK10	8	18:00	500	Leitungswasser

Tabelle 84 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband GK10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
GK10	8	21:30	45	Aufbackbrötchen
GK10	8	21:30	80	Schweinefilet mit Pilzsoße
GK10	8	22:45	150	Leitungswasser
GK10	9	11:45	714	Käsesalat "Schweizer Art", Pommes frites frites, Salat, Kaltschale (Mensa)
GK10	9	13:15	250	Leitungswasser
GK10	9	13:15	125	Kirschkuchen
GK10	9	16:45	250	Zitronenwasser
GK10	9	19:00	201	Flammkuchen (Käse & Lauch)
GK10	9	20:30	125	Orangensaft mit Eiswürfeln
GK10	9	21:30	300	Orangensaft mit Eiswürfeln
GK10	10	12:30	654	Rindergeschmortes in Pfeffersoße mit Spätzle, Salat, Suppe (Mensa)
GK10	10	16:00	250	Roter Saft
GK10	10	16:30	250	Roter Saft
GK10	10	18:10	72	Pan tostado con tomate
GK10	10	20:00	500	Mineralwasser classic
GK10	10	20:45	990	Radler

Tabelle 85: Ernährungsprotokolle Proband V1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V1	1	10:00	230	Müsli mit Kokosmilch
V1	1	10:00	450	Frühstückssaft
V1	1	11:30	300	Sprudel
V1	1	13:30	450	Tofu mit Reis und Zwiebeln
V1	1	13:30	300	Cola
V1	1	15:00	300	Leitungswasser
V1	1	16:00	650	Kaffee
V1	1	19:00	930	Mexikanischer Eintopf
V1	1	19:00	75	Olivenbrot
V1	1	19:00	400	Leitungswasser
V1	1	21:00	900	Früchtetee
V1	1	22:30	40	Banane
V1	1	00:00	500	Sprudel
V1	2	08:00	280	Müsli mit Kokosmilch
V1	2	08:00	250	Orangensaft
V1	2	08:00	300	Kaffee
V1	2	10:00	200	Sprudel
V1	2	12:30	900	Ananassaft
V1	2	14:00	200	Olivenbrot
V1	2	14:00	60	Auberginenaufstrich
V1	2	19:00	300	Leitungswasser
V1	2	19:00	100	Tofuwieners
V1	2	20:00	140	Seitanwurst mit Weck
V1	2	20:00	500	Bier

Tabelle 85 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V1	2	21:00	330	Bier
V1	2	21:00	135	Tomatenbrötchen
V1	2	22:00	330	Bier
V1	2	00:00	500	Bier
V1	2	02:00	400	Sprudel
V1	3	08:00	300	Sprudel
V1	3	09:00	460	Müsli mit Kokosmilch
V1	3	09:00	250	Orangensaft
V1	3	11:30	200	Kaffee
V1	3	13:00	750	Kaffee
V1	3	14:00	200	Mexikanischer Reis
V1	3	14:00	300	Leitungswasser
V1	3	15:30	100	Kokosmilch
V1	3	15:30	200	Erdbeeren mit Sojasahne
V1	3	17:00	500	Leitungswasser
V1	3	19:00	470	Vegane Spätzle mit dkl. Soße
V1	3	20:00	300	Leitungswasser
V1	3	21:00	130	Erdbeeren mit Sojasahne
V1	3	23:30	560	Malzbier
V1	3	01:00	350	Sprudel
V1	4	08:00	220	Dinkelbrot mit veganem Aufschnitt
V1	4	08:00	190	Dinkelbrot mit Kräuteraufstrich
V1	4	08:00	250	Orangensaft
V1	4	09:00	150	Dinkelbrot mit Nougatcreme
V1	4	09:00	100	Grüner Tee
V1	4	09:00	350	Sprudel
V1	4	11:00	800	Grüner Tee
V1	4	13:00	150	Kaffee
V1	4	14:00	500	Tofu mit Reis und Zwiebeln
V1	4	14:00	400	Cola
V1	4	16:00	700	Leitungswasser
V1	4	19:00	100	Salat mit Balsamicodressing
V1	4	19:00	225	Grillwiener aus Tofu
V1	4	19:00	200	Tomaten
V1	4	23:00	700	Sprudel
V1	4	01:00	400	Cola
V1	4	03:00	500	Sprudel
V1	5	09:00	150	Orangensaft
V1	5	09:00	360	Haferflocken mit Sojamilch
V1	5	09:00	400	Kaffee
V1	5	10:00	200	Sprudel
V1	5	12:00	750	Kaffee
V1	5	13:00	180	Erdbeeren mit Sojasahne
V1	5	13:00	200	Bananen
V1	5	15:00	600	Leitungswasser

Tabelle 85 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V1	5	16:00	170	Dinkelbrot mit Kräuteraufstrich
V1	5	16:00	225	Dinkelbrot mit veg. Aufschnitt
V1	5	18:00	95	Dinkelbrot mit veg. "Käse"
V1	5	18:00	700	Sprudel
V1	5	20:30	200	Hirsepfanne
V1	5	22:30	330	Malzbier
V1	5	23:30	700	Sprudel
V1	6	08:00	200	Leitungswasser
V1	6	09:00	195	Sojamilch mit Haferflocken
V1	6	09:00	250	Orangensaft
V1	6	09:00	125	Dinkelbrot mit veganem Käse
V1	6	09:00	115	Dinkelbrot mit Nougatcreme
V1	6	11:00	700	Sprudel
V1	6	12:30	560	Schwarzer Tee
V1	6	14:00	200	Gemüsereis
V1	6	16:00	300	Erdbeeren mit Sojasahne
V1	6	17:00	1900	Eistee
V1	6	20:00	500	Nudeln aus Mais und Seitansoße
V1	6	23:00	330	Malzbier
V1	6	01:00	500	Sprudel
V1	7	08:00	200	Sprudel
V1	7	09:30	250	Orangensaft
V1	7	09:30	315	Haferflocken mit Sojamilch
V1	7	09:30	300	Kaffee
V1	7	13:00	70	Olivenbrot
V1	7	13:00	220	Fettucine mit Pesto
V1	7	13:00	300	Leitungswasser
V1	7	14:30	660	Schwarzer Tee
V1	7	17:00	250	Leitungswasser
V1	7	17:00	300	Erdbeeren mit Sojasahne
V1	7	20:00	120	Olivenbrot
V1	7	20:00	50	Auberginenaufstrich
V1	7	20:00	115	Olivenbrot mit Tomatenaufstrich
V1	7	20:00	300	Leitungswasser
V1	7	22:00	990	Malzbier
V1	7	01:00	400	Leitungswasser
V1	8	09:00	250	Orangensaft
V1	8	09:00	290	Haferflocken mit Sojamilch
V1	8	09:00	300	Kaffee
V1	8	11:00	500	Leitungswasser
V1	8	13:30	160	Dinkelbrot mit veganem "Käse"
V1	8	13:30	250	Orangensaft
V1	8	13:30	80	Dinkelbrot mit Humuspaste
V1	8	13:30	180	Dinkelbrot mit Ingwer-Curry-Aufstrich
V1	8	13:30	160	Dinkelbrot mit Karamellaufstrich

Tabelle 85 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V1 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V1	8	15:30	1000	Grüner Tee
V1	8	17:30	500	Leitungswasser
V1	8	20:00	520	Gnocchi mit Sojaschnitzel
V1	8	22:00	660	Malzbier
V1	8	00:00	350	Sprudel
V1	9	08:00	400	Haferflocken mit Sojamilch
V1	9	08:00	250	Frühstückssaft
V1	9	09:00	300	Kaffee
V1	9	11:00	450	Kaffee
V1	9	12:00	150	Kaffee
V1	9	13:30	350	Sprudel
V1	9	13:30	145	Olivenbrot mit Tomatenaufstrich
V1	9	13:30	140	Olivenbrot mit veganer Salami
V1	9	13:30	100	Olivenbrot mit Humuspaste
V1	9	15:00	1000	Ananassaft
V1	9	17:00	400	Sprudel
V1	9	19:00	200	Sojapudding
V1	9	20:00	560	Bier
V1	9	22:00	150	Seitanwürste aus Pfanne
V1	9	22:00	400	Glutenfreie Spirelli mit dunkler Soße
V1	9	22:00	650	Leitungswasser
V1	9	00:00	450	Sprudel
V1	10	07:30	360	Haferflocken mit Sojamilch
V1	10	07:30	250	Frühstückssaft
V1	10	07:30	300	Kaffee
V1	10	09:00	600	Kaffee
V1	10	10:30	250	Sojapudding
V1	10	11:30	300	Kaffee
V1	10	12:00	300	Bananen
V1	10	13:00	1000	Eistee
V1	10	16:00	200	Sprudel
V1	10	18:00	1000	Eistee
V1	10	19:30	500	Tofu mit Reis und Erdnusscreme
V1	10	20:00	100	Leitungswasser
V1	10	21:00	200	Leitungswasser
V1	10	22:00	1000	Bier
V1	10	00:00	1000	Bier
V1	10	01:00	730	Bier
V1	10	02:00	500	Bier
V1	10	03:00	800	Coca Cola
V1	10	05:00	500	Leitungswasser

Tabelle 86: Ernährungsprotokolle Proband V2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V2	1	11:15	163	Tomaten
V2	1	11:15	81	Brot mit Shiitake
V2	1	11:15	96	Brot mit Pflaumenmus
V2	1	11:15	215	Leitungswasser
V2	1	11:00 - 13:00	500	Leitungswasser
V2	1	18:00	520	Auflauf
V2	1	17:00 - 18:30	1100	Leitungswasser
V2	1	20:00	227	Auflauf
V2	1	20:00 - 22:00	800	Leitungswasser
V2	2	07:50	125	Tomaten
V2	2	07:50	67	Brot mit Pflaumenmus
V2	2	07:50	55	Brot mit Shiitake
V2	2	07:50	600	Leitungswasser
V2	2	13:15	83	Brezel (getoastet)
V2	2	13:15	257	Leitungswasser
V2	2	11:00 - 14:00	210	Leitungswasser
V2	2	15:00	660	Leitungswasser
V2	2	15:00	34	Brezel (getoastet)
V2	2	15:15	380	Auflauf
V2	2	15:15	330	Leitungswasser
V2	2	15:20	140	Banane
V2	2	17:20	500	Leitungswasser
V2	2	20:15	240	Leitungswasser
V2	2	21:30	660	Leitungswasser
V2	2	21:30	100	Tomaten
V2	2	21:30	42	Brot mit Shiitake
V2	2	22:00	280	Leitungswasser
V2	3	08:15	136	Gurke
V2	3	08:15	115	Rustinobrötchen mit Ratatoulli
V2	3	08:20	62	Rustinobrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	3	08:20	330	Leitungswasser
V2	3	08:40	160	Leitungswasser
V2	3	11:45	574	Pommes frites, Ketchup, Kaltschale (Mensa)
V2	3	13:00	330	Leitungswasser
V2	3	13:30 - 16:00	740	Leitungswasser
V2	3	13:30 - 16:00	500	Club-Mate
V2	3	16:00 - 19:00	1100	Leitungswasser
V2	3	17:20	306	Salat
V2	3	17:20	76	Kürbiskernbrötchen (getoastet)
V2	3	22:00	330	Leitungswasser
V2	3	23:30	330	Leitungswasser
V2	3	00:30	330	Leitungswasser
V2	4	08:15	93	Gurke
V2	4	08:15	74	Rustinibrötchen mit Ratatoulli
V2	4	08:15	42	Rustinibrötchen mit Erdbeermarmelade

Tabelle 86 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V2	4	08:15	330	Leitungswasser
V2	4	12:00	779	Spaghetti mit Tomatensoße, Kaltschale (Mensa)
V2	4	12:00	476	Leitungswasser
V2	4	15:00	46	Bio-Mango-Sorbet
V2	4	14:00	189	Club-Mate
V2	4	14:00 - 18:00	350	Leitungswasser
V2	4	15:20	330	Leitungswasser
V2	4	20:00	660	Leitungswasser
V2	4	20:00	80	Brezel
V2	4	20:20	47	Gurke
V2	4	20:20	84	Rustinabrötchen mit Ratatouille
V2	4	20:20	64	Rustinabrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	4	20:30	330	Leitungswasser
V2	4	22:00	340	Orangensaft + Likör 43
V2	4	22:00	400	Radler
V2	4	00:00	850	Hefe-Weißbier
V2	4	01:00	330	Leitungswasser
V2	5	10:00	69	Gurke
V2	5	10:00	78	Rustinabrötchen mit Ratatouille
V2	5	10:00	70	Rustinabrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	5	12:00	135	Gurke
V2	5	12:00	80	Brezel
V2	5	12:00	311	Club-Mate
V2	5	15:00	330	Leitungswasser
V2	5	18:30	100	Banane
V2	5	18:30	330	Leitungswasser
V2	5	20:00	740	Leitungswasser
V2	5	23:30	300	Leitungswasser
V2	6	08:10	330	Leitungswasser
V2	6	08:10	54	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	6	08:10	84	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille
V2	6	08:10	115	Tomate
V2	6	08:30	200	Leitungswasser
V2	6	13:00	500	Leitungswasser
V2	6	13:00	80	Brezel
V2	6	13:00	400	Salat
V2	6	14:20	330	Leitungswasser
V2	6	19:00	420	Mate-Tee
V2	6	20:00	514	Sushi
V2	6	20:00	330	Leitungswasser
V2	6	21:00	280	Schwarzer Tee
V2	6	22:30	330	Leitungswasser
V2	6	00:30	155	Leitungswasser
V2	7	08:40	62	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	7	08:40	83	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille

Tabelle 86 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V2	7	08:40	330	Leitungswasser
V2	7	12:00	300	Club-Mate
V2	7	16:00	200	Leitungswasser
V2	7	17:15	550	Salat
V2	7	17:15	82	Brezel
V2	7	17:15	68	Kürbiskernbrötchen (getoastet)
V2	7	17:00 - 21:00	200	Club-Mate
V2	7	17:00 - 21:00	540	Leitungswasser
V2	7	22:30	660	Leitungswasser
V2	8	07:00	110	Tomate
V2	8	07:00	330	Leitungswasser
V2	8	07:00	60	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	8	07:00	77	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille
V2	8	10:00	250	Club-Mate
V2	8	12:00	250	Club-Mate
V2	8	12:00	108	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	8	10:00 - 13:00	300	Leitungswasser
V2	8	16:00	330	Leitungswasser
V2	8	18:00	330	Leitungswasser
V2	8	20:45	222	Salat
V2	8	20:45	584	Nudeln mit Soße
V2	8	20:45	550	Radler
V2	8	22:45	330	Leitungswasser
V2	8	00:30	300	Leitungswasser
V2	9	08:00	82	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	9	08:00	68	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille
V2	9	08:00	125	Tomate
V2	9	08:00	330	Leitungswasser
V2	9	10:00	330	Leitungswasser
V2	9	13:00	111	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade
V2	9	13:00	200	Leitungswasser
V2	9	13:00	85	Brezel (getoastet)
V2	9	13:00 - 15:00	270	Leitungswasser
V2	9	15:30-19:00	270	Leitungswasser
V2	9	16:50	400	Nudeln mit Soße
V2	9	19:30	500	Club-Mate
V2	9	21:45	480	Nudeln mit Soße
V2	9	21:45	42	Brezel
V2	9	21:45	500	Club-Mate
V2	9	23:40	180	Pommes frites
V2	9	20:00 - 00:00	740	Leitungswasser
V2	10	09:00	131	Tomate
V2	10	09:00	170	Brot mit Auberginencreme
V2	10	09:30	462	Pfefferminztee
V2	10	09:00 - 12:00	740	Leitungswasser

Tabelle 86 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V2 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V2	10	13:30	150	Kuchen
V2	10	13:45	360	Leitungswasser
V2	10	14:30	150	Salat
V2	10	14:30	360	Rosmarinkartoffeln
V2	10	15:00	330	Leitungswasser
V2	10	16:00 - 19:00	550	Leitungswasser
V2	10	18:45	175	Burger King Pommes frites
V2	10	23:00	330	Leitungswasser
V2	10	23:00	330	Leitungswasser
V2	10	23:30	80	Brezel (getoastet)

Tabelle 87: Ernährungsprotokolle Proband V3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V3	1	09:30	500	Leitungswasser
V3	1	09:30	300	3 Gourmetstangen
V3	1	11:00	100	Café Crema
V3	1	13:00	100	Kaffee Asta
V3	1	14:00	100	Gourmetstange
V3	1	14:30	200	Kaffee Asta
V3	1	15:30	453	Bananen
V3	1	16:00	200	Leitungswasser
V3	1	16:00	60	Chips: Chipsfrisch gesalzen
V3	1	17:30	650	Aktivschorle Pfirsich-Melone
V3	1	20:30	650	Grapefruit-Limonade
V3	1	21:30	215	Bananen
V3	1	21:30	100	Schokolade dunkle Nougat
V3	2	09:00	600	Leitungswasser
V3	2	09:00	110	Knoblauchbrötchen
V3	2	09:30	200	2 Gourmetstangen
V3	2	12:00	200	Caffé Crema
V3	2	13:30	50	Chips: Chipsfrisch gesalzen
V3	2	13:30	200	2 Gourmetstangen
V3	2	15:00	400	Hefeweizen
V3	2	17:00	310	Bananen
V3	2	18:30	600	Leitungswasser
V3	2	20:00	500	Ratskrone Pilsener
V3	2	20:00	140	Seitanwürstchen mit Weck
V3	2	21:00	330	Karlsberg Pils
V3	2	21:00	135	Tomatenbrötchen
V3	2	00:00	500	Karlsberg Pils
V3	2	02:30	330	Karlsberg Pils
V3	3	09:30	230	Karlsberg Pils
V3	3	09:30	160	2 Laugenweck
V3	3	11:00	800	Leitungswasser
V3	3	11:00	100	Kaffee

Tabelle 87 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V3	3	12:30	160	Tomatenbrötchen
V3	3	12:30	200	Caffé Crema
V3	3	16:00	400	Leitungswasser
V3	3	16:00	80	Laugenweck
V3	3	17:00	600	Leitungswasser
V3	3	18:30	200	2 Gourmetstangen
V3	3	20:00	600	Mineralwasser
V3	3	22:00	500	Mineralwasser
V3	4	08:30	300	Mineralwasser
V3	4	10:00	400	Leitungswasser
V3	4	10:00	490	Bananen
V3	4	12:00	300	Leitungswasser
V3	4	14:00	120	2 Nespresso
V3	4	14:00	100	1 Gourmetstange
V3	4	15:00	100	Leitungswasser
V3	4	17:00	120	2 Nespresso
V3	4	17:00	100	1 Gourmetstange
V3	4	19:00	100	1 Gourmetstange
V3	4	19:00	700	Leitungswasser
V3	4	20:00	200	Kaffee Asta
V3	4	21:30	200	Leitungswasser
V3	4	22:30	160	Tomatenbrötchen
V3	4	22:30	500	Leitungswasser
V3	5	09:00	300	Leitungswasser
V3	5	12:00	800	Leitungswasser
V3	5	12:00	150	Exotic Fruchtmix
V3	5	12:00	100	Cashewkerne
V3	5	15:00	200	Leitungswasser
V3	5	17:00	200	Leitungswasser
V3	5	18:00	300	Leitungswasser
V3	5	18:00	50	Exotic Fruchtmix
V3	5	19:00	400	Leitungswasser
V3	5	19:00	200	Kaffee Asta
V3	5	22:00	400	Leitungswasser
V3	5	22:00	950	Spaghetti mit Tabasco Chipotle
V3	5	23:00	400	Leitungswasser
V3	6	09:00	300	Leitungswasser
V3	6	11:00	400	Leitungswasser
V3	6	14:00	300	Leitungswasser
V3	6	15:00	300	Schwarzer Tee
V3	6	15:00	470	Tortilla
V3	6	17:00	200	Leitungswasser
V3	6	17:00	200	Schwarzer Tee
V3	6	18:30	400	Leitungswasser
V3	6	20:00	400	Leitungswasser

Tabelle 87 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V3 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V3	6	20:00	200	Fruchtmus Apfel-Erdbeere
V3	6	22:00	790	Baked Beans
V3	6	22:00	200	Schwarzer Tee
V3	6	23:00	200	Fruchtmus Apfel-Erdbeere
V3	6	23:00	500	Leitungswasser
V3	7	10:30	500	Leitungswasser
V3	7	10:30	420	Baked Beans
V3	7	11:30	400	Schwarzer Tee
V3	7	13:00	570	Apfelmus Granny Smith
V3	7	13:00	200	Schwarzer Tee
V3	7	16:00	250	Kuchen I
V3	7	16:00	200	Schwarzer Tee
V3	7	18:30	600	Leitungswasser
V3	7	21:00	880	Nudeln mit Pilzsoße
V3	7	21:00	200	Schwarzer Tee
V3	7	22:00	400	Leitungswasser
V3	8	09:00	400	Leitungswasser
V3	8	09:00	100	Sonnenblumenkerne karamellisiert
V3	8	09:00	100	Fruchtmus Apfel-Erdbeere
V3	8	11:00	300	Leitungswasser
V3	8	12:30	600	Bananen
V3	8	12:30	250	Coca Cola
V3	8	14:30	250	Coca Cola
V3	8	17:30	150	Rittersport Marzipan
V3	8	17:30	200	Caffé Crema
V3	8	19:30	200	Schwarzer Tee
V3	8	21:00	500	Lasagne
V3	8	21:00	200	Schwarzer Tee
V3	8	22:30	700	Leitungswasser
V3	9	08:00	200	Leitungswasser
V3	9	08:00	500	Lasagne
V3	9	10:30	500	Leitungswasser
V3	9	12:30	200	Caffé Crema
V3	9	13:30	500	Leitungswasser
V3	9	14:30	450	Wurzelbaguette
V3	9	15:00	200	Leitungswasser
V3	9	16:00	200	Caffé Crema
V3	9	18:30	100	Rittersport Marzipan
V3	9	18:30	300	Leitungswasser
V3	9	21:00	200	Schwarzer Tee
V3	9	22:00	500	Leitungswasser
V3	9	23:00	200	Leitungswasser
V3	9	00:00	200	Leitungswasser
V3	9	23:00	250	Lasagne

V3 hat die Studie vorzeitig am Ende von Tag 9 beendet.

Tabelle 88: Ernährungsprotokolle Proband V4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V4	1	08:50	275	Müsli mit Soja-Milch
V4	1	09:15	112	Banane
V4	1	10:00	700	Leitungswasser
V4	1	12:45	180	Tofu-Würstchen mit Zwiebeln
V4	1	12:45	240	Salat
V4	1	12:45	45	Gewürz-Ketchup
V4	1	13:00 - 15:00	950	Leitungswasser
V4	1	16:00	81	Banane
V4	1	20:30	350	Pilz-Bratlinge
V4	1	20:30	41	Gewürz-Ketchup
V4	1	21:00	1000	Leitungswasser
V4	1	23:00	300	Leitungswasser
V4	2	10:00	282	Laugenbrötchen mit Aufstrich und Schnittlauch
V4	2	10:00	300	Pfefferminztee
V4	2	12:00	700	Leitungswasser
V4	2	17:00	700	Leitungswasser
V4	2	17:15	189	Pilz-Bratlinge
V4	2	17:15	42	Gewürz-Ketchup
V4	2	17:15	220	Ginger Ale
V4	2	17:30	58	Cuorcini
V4	2	17:30	72	Tappsy
V4	2	20:00	660	Bier
V4	2	21:00	160	Pilz-Bratlinge
V4	2	21:00	56	Tappsy
V4	2	22:00	230	Bier
V4	2	23:00	700	Leitungswasser
V4	3	09:15	105	Kürbiskernbrötchen
V4	3	09:15	72	Brotaufstrich Curry
V4	3	09:15	430	Multivitaminsaft
V4	3	13:00	300	Leitungswasser
V4	3	13:15	180	Tofu-Bratling
V4	3	13:15	152	Rucola-Salat
V4	3	13:15	105	Radieschen
V4	3	13:15	73	Gewürz-Ketchup
V4	3	13:15	320	Ginger Ale
V4	3	13:15	700	Leitungswasser
V4	3	14:00	390	Bananen-Soja-Milch
V4	3	16:00	700	Leitungswasser
V4	3	19:00	134	Weltmeisterbrötchen
V4	3	19:00	49	Johannisbeer-Marmelade
V4	3	19:00	32	Schnittlauch
V4	3	19:00	40	Brotaufstrich Curry
V4	3	19:30	250	Leitungswasser
V4	3	19:30	72	Kessel-Chips Salz&Pfeffer
V4	3	21:00 - 23:00	1260	Leitungswasser

Tabelle 88 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V4	4	09:00	52	Radieschen
V4	4	09:00	89	Weltmeisterbrötchen
V4	4	09:00	3330	Multivitaminsaft
V4	4	09:00	29	Johannisbeer-Marmelade
V4	4	09:00	33	Brotaufstrich-Curry
V4	4	13:00	471	Pommes frites-frites
V4	4	13:00	52	Rucola-Salat
V4	4	13:00	75	Gewürz-Ketchup
V4	4	13:00	320	Ginger-Ale
V4	4	13:15	700	Leitungswasser
V4	4	13:30	63	Tappsy
V4	4	17:00	1000	Leitungswasser
V4	4	17:30	45	Kessel-Chips Salz&Pfeffer
V4	4	19:00	80	Weltmeisterbrötchen
V4	4	19:00	95	Bio Veggie Aufschnitt
V4	4	19:00	42	Brotaufstrich-Curry
V4	4	19:30	45	Tappsy
V4	4	20:00	700	Leitungswasser
V4	4	23:10	250	Leitungswasser
V4	5	10:00	145	Laugenbrezel
V4	5	10:00	39	Brotaufstrich Curry
V4	5	10:00	45	Brotaufstrich Pastacuitta
V4	5	10:00	385	Multivitaminsaft
V4	5	12:15	550	Gemüsepfanne
V4	5	12:30	700	Leitungswasser
V4	5	12:45	63	Tappsy
V4	5	15:00	700	Leitungswasser
V4	5	18:30	100	Kürbiskernbrötchen
V4	5	18:30	85	Brotaufstrich Curry
V4	5	18:30	40	Brotaufstrich Pastacuitta
V4	5	18:30	62	Radieschen
V4	5	20:45	200	Leitungswasser
V4	5	22:30	1000	Weißbier naturtrüb
V4	5	23:00	200	Leitungswasser
V4	6	11:00	105	Laugenbrezel
V4	6	11:00	56	Brotaufstrich Aubergine
V4	6	11:00	75	Erdnusscreme
V4	6	11:00	71	Kürbiskernbrötchen
V4	6	11:00	400	Multivitaminsaft
V4	6	12:00	400	Bananen-Soja-Milch
V4	6	14:00	350	Leitungswasser
V4	6	15:15	342	Gemüsepfanne
V4	6	15:15	31	Gewürz-Ketchup
V4	6	15:30	300	Leitungswasser
V4	6	20:00	480	Süßkartoffel

Tabelle 88 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V4	6	20:00	350	Reissalat
V4	6	21:15	400	Bier (Bitburger)
V4	6	21:15	400	Bier (Erdinger)
V4	6	22:30	700	Leitungswasser
V4	7	08:45	200	Pfefferminztee
V4	7	08:45	100	Laugenbrezel
V4	7	08:45	37	Erdnusscreme
V4	7	10:40	70	Küriskernbrötchen
V4	7	10:40	30	Brotaufstrich Curry
V4	7	10:40	36	Brotaufstrich Aubergine
V4	7	10:40	300	Multivitaminsaft
V4	7	12:45	55	Süßkartoffel
V4	7	12:45	120	Reissalat
V4	7	12:45	90	Tofu-Bratling
V4	7	12:45	220	Leitungswasser
V4	7	14:00	450	Leitungswasser
V4	7	15:30	68	Salzstangen
V4	7	15:30	50	Multivitaminsaft
V4	7	15:30	300	Bananen-Soja-Milch
V4	7	16:00	400	Leitungswasser
V4	7	19:00	151	Küriskernbrötchen
V4	7	19:00	88	Erdnusscreme
V4	7	19:00	37	Brotaufstrich Pastacuitta
V4	7	19:00	40	Brotaufstrich Aubergine
V4	7	19:00	500	Leitungswasser
V4	7	21:30	250	Leitungswasser
V4	8	09:15	103	Laugenbrezel
V4	8	09:15	44	Brotaufstrich Curry
V4	8	09:15	60	Erdnusscreme
V4	8	09:15	37	Brotaufstrich Pastacuitta
V4	8	09:15	425	Multivitaminsaft
V4	8	09:15	90	Weltmeisterbrötchen
V4	8	10:30	36	Tappsy
V4	8	14:00	200	Farfalle-Nudeln
V4	8	14:00	380	Tofu mit Sauce
V4	8	14:00	400	Leitungswasser
V4	8	14:00	200	Rote Schorle
V4	8	16:00	350	Leitungswasser
V4	8	20:00	170	Zucchini gebraten
V4	8	20:00	212	Couscous
V4	8	20:00	165	Fladenbrot
V4	8	21:00	330	Bier
V4	8	22:15	350	Leitungswasser
V4	9	09:30	164	Weltmeisterbrötchen
V4	9	09:30	78	Brotaufstrich Curry

Tabelle 88 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V4 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V4	9	09:30	39	Brotaufstrich Aubergine
V4	9	09:30	45	Erdnusscreme
V4	9	09:30	350	Multivitaminsaft
V4	9	12:45	72	Tappsy
V4	9	12:45	200	Leitungswasser
V4	9	13:00	402	Bohnenpfanne
V4	9	13:15	63	Courcini
V4	9	13:30	400	Leitungswasser
V4	9	17:30	380	Müsli + Sojamilch
V4	9	17:30	200	Soja-Milch
V4	9	19:00	79	Fladenbrot
V4	9	19:00	54	Brotaufstrich Aubergine
V4	9	19:00	49	Brotaufstrich Pastacuitta
V4	9	19:00	100	Tofu-Basilikum
V4	9	19:00	400	Rote Schorle
V4	9	22:30	350	Leitungswasser
V4	9	23:00	200	Leitungswasser
V4	10	08:50	99	Laugenbrezel
V4	10	08:50	82	Kürbiskernbrötchen
V4	10	08:50	52	Erdnusscreme
V4	10	08:50	47	Brotaufstrich Curry
V4	10	08:50	40	Brotaufstrich Aubergine
V4	10	08:50	200	Multivitaminsaft
V4	10	11:00	300	Mineralwasser
V4	10	13:10	277	Zucchini
V4	10	13:10	171	Couscous
V4	10	13:10	50	Tofu-Basilikum
V4	10	13:10	35	Gewürzketchup
V4	10	13:10	200	Leitungswasser
V4	10	13:30	30	Courcini
V4	10	15:00	72	Tappsy
V4	10	19:00	80	Weltmeisterbrötchen
V4	10	19:00	101	Laugenbrezel
V4	10	19:00	40	Brotaufstrich Aubergine
V4	10	19:00	47	Erdnusscreme
V4	10	19:00	39	Johannisbeer-Marmelade
V4	10	20:00	55	Salzstangen
V4	10	23:30	200	Leitungswasser

Tabelle 89: Ernährungsprotokolle Proband V5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V5	1	08:00	750	Leitungswasser
V5	1	08:00	150	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und veganem Aufschnitt
V5	1	13:00	100	Leitungswasser

Tabelle 89 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V5	1	16:00	160	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate
V5	1	17:00	400	Kroketten
V5	1	17:00	120	Ketchup
V5	1	17:00	1000	Leitungswasser
V5	1	19:00	250	Curry mit Broccoli und Blumenkohl
V5	1	21:00	1000	Leitungswasser
V5	1	21:00	80	1/2 Brötchen mit Tomate und Margarine
V5	2	09:00	350	Ciabattabrötchen mit Aufstrich "Aubergine", veg. Mortadella und Tomate
V5	2	09:00	1000	Leitungswasser
V5	2	11:00	500	Mate-Zitrone Eistee
V5	2	13:00	240	Kroketten
V5	2	13:00	60	Ketchup
V5	2	14:00	1000	Leitungswasser
V5	2	19:00	1000	Couscouspfanne mit Zucchini, Paprika und Aubergine
V5	2	19:00	1000	Leitungswasser
V5	2	20:00	1000	Leitungswasser
V5	3	08:00	1000	Leitungswasser
V5	3	09:00	190	Kürbiskernbrötchen mit Tomaten und Margarine
V5	3	09:00	110	Ciabattabrötchen mit Aufstrich/ Mortadella
V5	3	10:00	120	Mate Zitronen Eistee
V5	3	11:00	450	Minz-Limonade
V5	3	11:00	430	Couscouspfanne
V5	3	14:00	1000	Leitungswasser
V5	3	17:00	500	Leitungswasser
V5	3	18:00	1000	Leitungswasser
V5	3	18:00	450	Wassermelone
V5	3	20:00	310	Tofuburger
V5	3	20:00	200	Salat mit Radieschen, Karotten, Gurken und Tomate+ Kerne
V5	3	20:00	220	Kartoffelwedges
V5	3	20:00	250	Coca-Cola
V5	3	20:00	15	Senf Mittelscharf
V5	3	23:00	500	Leitungswasser
V5	4	09:00	180	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate
V5	4	10:00	450	Coca-Cola
V5	4	12:00	650	Wassermelone
V5	4	13:00	1000	Leitungswasser
V5	4	13:00	190	Wassermelone
V5	4	13:00	616	Penne mit Tofu & Broccoli
V5	4	17:00	1000	Leitungswasser
V5	4	17:00	275	Penne mit Tofu & Broccoli
V5	4	20:00	160	Tofuburger
V5	4	20:00		Leitungswasser
V5	4	21:00	540	Wassermelone
V5	4	23:00	500	Leitungswasser

Tabelle 89 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V5	5	07:00	500	Leitungswasser
V5	5	09:00	250	Kürbiskernbrötchen mit Guacamole
V5	5	09:00	1000	Leitungswasser
V5	5	11:00	314	Pommes frites (Mensa)
V5	5	11:00	150	Ketchup (Mensa)
V5	5	12:00	1000	Coca Cola
V5	5	14:00	650	Wassermelone
V5	5	15:00	1000	Leitungswasser
V5	5	18:00	400	Mate-Eistee "menta Limon"
V5	5	21:00	485	Curry mit Bohnen, Paprika, Blumenkohl und Zucchini
V5	5	21:00	77	Brot
V5	6	07:00	1000	Leitungswasser
V5	6	07:00	290	Kürbiskernbrötchen-Sandwich
V5	6	14:00	770	Paprikakartoffeln
V5	6	14:00	1000	Leitungswasser
V5	6	18:00	330	Paprikakartoffeln
V5	6	20:00	485	Wassermelone
V5	6	21:00	420	Tofu mit Gemüse und Sacha-Soße
V5	6	21:00	275	Reisbeilage
V5	6	00:00	100	Leitungswasser
V5	7	08:00	205	Wassermelone
V5	7	08:00	900	Leitungswasser
V5	7	12:00	400	Malzbier
V5	7	13:00	650	Paprikakartoffeln
V5	7	15:00	1000	Leitungswasser
V5	7	17:00	180	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate
V5	7	20:00	375	Linseneintopf
V5	7	20:00	1000	Leitungswasser
V5	7	00:45	680	Curry mit Bohnen, Paprika, Blumenkohl und Zucchini
V5	7	00:45	250	Leitungswasser
V5	8	09:00	170	Kürbiskernbrötchen mit Aufstrich, Mortadella(veg) und Tomate
V5	8	09:00	1000	Leitungswasser
V5	8	15:00	675	Paprikakartoffel
V5	8	15:00	1000	Leitungswasser
V5	8	20:00	1000	Leitungswasser
V5	8	22:00	520	Zucchininudeln mit Broccoli
V5	9	09:00	185	Kürbiskernbrötchen mit Tomate und Margarine
V5	9	09:00	1000	Leitungswasser
V5	9	15:00	395	Börek mit Spinat-, Kichererbsen und Sojaback-Füllung
V5	9	15:00	250	Coca Cola
V5	9	20:00	235	Käsekuchen (vegan)
V5	9	20:00	1000	Leitungswasser
V5	9	22:00	190	Erdbeeren
V5	9	22:00	300	Spinat mit Kichererbsen, Tomaten und Sojahack
V5	10	09:00	250	Coca Cola

Tabelle 89 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V5 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V5	10	09:00	1000	Leitungswasser
V5	10	10:00	145	Käsekuchen
V5	10	10:00	210	Brötchen mit Ratatouille
V5	10	14:00	330	Zucchiniudeln mit Broccoli und Karotten
V5	10	14:00	165	Spinat mit Kichererbsen (siehe Tag 9)
V5	10	14:00	250	Coca Cola
V5	10	15:00	1000	Leitungswasser
V5	10	18:00	365	Waffeln mit Kirschen
V5	10	22:00	380	Spinat mit Kichererbsen (siehe Tag 9)
V5	10	22:00	190	Kürbiskernbrötchen mit Tomate und Margarine
V5	10	22:00	200	Coca Cola

Tabelle 90: Ernährungsprotokolle Proband V6 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V6	1	09:00 - 11:00	1000	Mineralwasser
V6	1	11:45	156	Brot mit Marmelade & Butter
V6	1	11:45	416	Obstsalat (Apfel, Nektarine, Aprikose, Pflaumen)
V6	1	11:45 - 13:06	1500	Grüner Tee Vanille
V6	1	13:10 - 17:10	1000	Mineralwasser
V6	1	15:00	707	Zwetchgen (ohne Kern)
V6	1	18:00 - 21:00	1500	Indischer Chai Classic
V6	1	18:40	532	Salat mit Tomaten
V6	1	18:40	494	Chinesische Gemüsepfanne
V6	1	18:40	153	Brot
V6	1	22:35 - 0:00	200	Mineralwasser
V6	2	00:00 - 10:55	1000	Mineralwasser
V6	2	11:00	185	Brot mit Marmelade & Butter
V6	2	11:00	472	Obstteller
V6	2	11:00 - 14:00	1500	Grüner Tee Vanille
V6	2	14:05 - 18:00	2000	Mineralwasser
V6	2	15:50	1026	Wassermelone
V6	2	18:15	559	Karotten, Zucchini, Soja-Schnitzel in Pfanne
V6	2	18:15		inkl. Soße: Gemüsebrühe mit Mehl
V6	2	18:15	433	Salat: Zucchini, Karotten, Tomate, Paprika, Pilze
V6	2	18:45 - 21:30	1500	Indischer Chai Classic
V6	3	08:30 - 11:50	1500	Mineralwasser
V6	3	12:00	663	Smoothie Bowl mit Nektarinen & Birnen, Topping: Banane & gefrorene Himbeeren
V6	3	12:00 - 15:00	1500	Grüner Tee Vanille
V6	3	15:15	1880	Wassermelone
V6	3	16:30 - 19:20	1500	Mineralwasser
V6	3	19:00	773	Couscous mit Gemüse (Tomaten, Pilze, Auberginen)
V6	3	20:15	700	Mineralwasser
V6	4	09:00 - 12:00	500	Mineralwasser
V6	4	12:25	1250	Smoothie Bowl

Tabelle 90 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V6 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V6	4	13:00 - 17:00	1500	Grüner Tee Vanille
V6	4	17:20 - 18:30	2000	Mineralwasser
V6	4	18:30	1312	Gemüsebrühe mit Zucchini & Karotten und Basmati Reis
V6	4	19:45 - 00:00	1000	Mineralwasser
V6	5	00:00 - 08:30	500	Mineralwasser
V6	5	11:20	733	Smoothie Bowl (2) (Banane, Aprikose mit gefrorenen Himbeeren)
V6	5	09:00 - 11:00	200	Mineralwasser
V6	5	12:00 - 18:00	1500	Grüner Tee Vanille
V6	5	19:05	856	Rice Rolls gefüllt mit Süßkartoffeln, Salat, Basilikum, Paprika & Pilze
V6	5	20:00 - 00:00	1000	Mineralwasser
V6	6	08:30 - 15:00	1000	Mineralwasser
V6	6	12:20	513	Kiwis
V6	6	12:20	913	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)
V6	6	15:30 - 18:20	1500	Indischer Chai Classic
V6	6	18:25	715	Salat
V6	6	18:25	253	Mais mit Soja-Butter
V6	6	19:00	559	Bananen Smoothie mit Rosinen
V6	6	19:00	1000	Mineralwasser
V6	7	09:30 - 11:00	500	Mineralwasser
V6	7	11:15	524	Obstsalat (Apfel, Pflaume, Banane, Nektarine)
V6	7	11:15 - 14:30	1500	Grüner Tee Vanille
V6	7	15:15 - 22:00	2500	Mineralwasser
V6	7	16:00	778	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)
V6	7	19:15	946	Süßkartoffel, Kohlrabi & Tomate
V6	8	08:00 - 09:45	200	Mineralwasser
V6	8	09:50	400	Bananen Smoothie mit Himbeeren & Kokosraspeln (gefroren)
V6	8	10:00 - 14:20	1500	Grüner Tee Vanille
V6	8	10:00	1014	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)
V6	8	14:30 - 17:30	700	Mineralwasser
V6	8	18:00 - 20:20	1500	Indischer Chai Classic
V6	8	18:20	1140	Spaghetti mit Brokkoli
V6	8	21:00 - 00:00	200	Mineralwasser
V6	9	09:00 - 13:00	1000	Mineralwasser
V6	9	13:30	1677	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)
V6	9	14:00 - 19:00	1500	Grüner Tee Vanille
V6	9	19:00	620	Salat mit Gurke & Paprika
V6	9	19:00	1000	Amaranth & Quinoa mit Paprika & Lauch
V6	9	20:00 - 00:00	500	Mineralwasser
V6	10	09:00	300	Mineralwasser
V6	10	13:15	462	warme Himbeeren mit Rosinen & Cashewkerne
V6	10	13:15	934	Obststeller (Nektarine, Apfel, Pfirsich (platt))
V6	10	13:30 - 19:20	1500	Grüner Tee Vanille
V6	10	18:40	560	Salat mit Tomaten
V6	10	18:40	876	Madras Curry mit Basmati Reis & Paprika
V6	10	18:20 - 22:00	1200	Mineralwasser

Tabelle 91: Ernährungsprotokolle Proband V7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V7	1	11:00 - 12:20	1060	Leitungswasser
V7	1	11:55	310	Reis mit Cha. (Kichererbsencurry)
V7	1	12:45	1060	Leitungswasser
V7	1	17:00	206	Kartoffelchips mit Ketchup
V7	1	17:00	413	Rohkost (Tomate, Gurke, Karotte, Kohlrabi)
V7	1	17:00 - 18:00	330	Leitungswasser
V7	1	20:00	150	Eis: Waldfrucht, Honigmelonen-Minze
V7	2	07:45 - 08:30	1060	Leitungswasser
V7	2	08:00	570	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli
V7	2	13:00 - 15:00	700	Leitungswasser
V7	2	14:10	550	Spaghetti mit Tomatensoße
V7	2	18:00	50	Chips Red Paprika
V7	2	18:00 - 19:00	560	Fritz Cola
V7	2	20:45	7	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	2	20:35 - 21:20	360	Leitungswasser
V7	3	09:30 - 10:25	650	Leitungswasser
V7	3	10:00	427	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli
V7	3	10:00	200	Orangensaft
V7	3	14:00	370	Spaghetti mit Tomatensoße
V7	3	14:15 - 16:30	650	Leitungswasser
V7	3	14:20	7	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	3	19:30	300	Pflaumen
V7	3	19:40	180	Karotten
V7	3	19:40 - 20:15	530	Leitungswasser
V7	3	21:00 - 08:00	100	Leitungswasser
V7	4	09:15	520	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli
V7	4	09:15	200	Orangensaft
V7	4	10:00 - 15:30	550	Leitungswasser
V7	4	15:55	450	Reis mit Erdnusssoße & Tofu
V7	4	15:55 - 17:00	530	Leitungswasser
V7	4	16:45	7	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	4	17:15 - 21:00	530	Leitungswasser
V7	4	21:30	50	Chips Red Paprika
V7	4	21:30	300	Ginger Ale
V7	4	21:50	52	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	4	22:10	560	Malzbier
V7	5	09:30 - 10:30	650	Leitungswasser
V7	5	11:00	1045	Wassermelone
V7	5	13:00	530	Reis mit Erdnusssoße & Tofu
V7	5	13:30	80	Wallnussbrötchen
V7	5	13:30 - 16:40	650	Leitungswasser
V7	5	17:00	330	Malzbier
V7	5	18:00	130	Veggie Mini Grillsteaks

Tabelle 91 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V7	5	18:00	30	Lupinenrostbratwürstchen
V7	5	18:00	130	Körnerbaguette
V7	5	18:00	10	Curry-Ketchup
V7	5	18:30 - 20:40	650	Leitungswasser
V7	5	21:30	400	Ginger-Ale
V7	6	08:30 - 11:00	650	Leitungswasser
V7	6	11:30	200	Orangensaft
V7	6	11:30	500	Wassermelone
V7	6	11:40	135	Laugenstange mit Körner
V7	6	16:30	580	Nudeln mit Tofu, Tomate, Zwiebel, Knoblauch, Ingwer
V7	6	16:30 - 19:00	500	Leitungswasser
V7	6	17:50	40	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	6	20:25 - 21:15	700	Sprudel mit Pfefferminzsirup
V7	6	20:30	245	Empanadas mit Pilzen & Tomaten
V7	6	21:45 - 23:10	660	Malzbier
V7	6	21:45	75	Chips Red Paprika
V7	7	10:15 - 12:00	500	Leitungswasser
V7	7	11:00	200	Orangensaft
V7	7	11:00	90	Laugenstange mit Körnern
V7	7	11:50	360	Pancakes mit Agavendicksaft
V7	7	15:45 - 18:20	500	Leitungswasser
V7	7	17:25	40	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	7	20:25	450	Gemüselasagne mit Mandelcreme
V7	7	20:30 - 23:00	500	Leitungswasser
V7	7	21:40	10	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)
V7	8	09:40 - 10:30	500	Leitungswasser
V7	8	09:55	600	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli
V7	8	09:55	200	Orangensaft
V7	8	14:30 - 15:30	650	Leitungswasser
V7	8	15:00	365	Maultaschen vegan in Gemüsebrühe
V7	8	19:00 - 20:45	500	Leitungswasser
V7	8	20:00	400	Bananeneis (nur Bananen)
V7	8	21:00	400	Ginger Ale
V7	8	23:20 - 00:30	500	Leitungswasser
V7	9	09:15 - 21:00	500	Leitungswasser
V7	9	09:15	200	Orangensaft
V7	9	09:15	530	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli
V7	9	15:10	1200	Wassermelone
V7	9	21:30	400	selbst gemachte Limonade
V7	9	21:30	720	Jasmin-Reis mit Kaiserschoten & Teryaki-Tofu & Sesam
V7	10	09:30	200	Orangensaft
V7	10	09:30	530	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli

Tabelle 91 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V7 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V7	10	14:00	1625	Wassermelone
V7	10	18:30 - 19:45	500	Leitungswasser
V7	10	19:05	870	Avocado-Tomaten-Nudeln
V7	10	20:20	330	Fritz Cola
V7	10	22:45	200	Ginger-Ale

Tabelle 92: Ernährungsprotokolle Proband V8 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V8	1	08:30	300	Wasser
V8	1	08:45	240	Kaffee mit Sojasahne
V8	1	11:00	450	Türkischer Salat mit Brot
V8	1	11:30 - 16:00	800	Wasser
V8	1	16:00	680	Smoothie (Banane, Kiwi, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)
V8	1	16:30 - 20:00	400	Wasser
V8	1	20:30	340	Linsennudeln mit Curry
V8	1	20:30	300	Wasser
V8	1	21:00 - 23:00	340	Wasser
V8	2	07:30 - 11:00	400	Wasser
V8	2	11:00	310	Grüner Smoothie (Mangold, Petersilie, Banane, Apfel, Pflaume, Leinsamen, Mandeln)
V8	2	12:00	450	Türkischer Salat mit Brot
V8	2	13:30 - 19:00	950	Wasser
V8	2	14:15	40	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	2	19:00	300	Vegane Mettbrötchen mit Tomaten
V8	2	19:00	40	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	2	19:00 - 23:59	500	Wasser
V8	3	08:30	200	Wasser
V8	3	08:30	650	Grüner Smoothie
V8	3	11:00	350	Pita
V8	3	14:30	200	Chinesischer Tee
V8	3	11:00 - 19:30	750	Wasser
V8	3	19:30	350	Pita
V8	3	19:30	25	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	3	19:30 - 00:00	530	Wasser
V8	3	21:00	400	Bier
V8	4	09:30 - 20:00	1100	Wasser
V8	4	10:00	25	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	4	11:15	520	Rohkostsalat mit Brot
V8	4	14:30	690	Obst-Smoothie (Banane, Birne, Pflaume, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)
V8	4	18:15	140	Pita
V8	4	20:00	330	Alkoholfreies Bier
V8	4	22:00 - 02:00	400	Wasser
V8	4	23:00	100	Pita
V8	4	01:00	330	Leitungswasser

Tabelle 92 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V8 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V8	5	08:00 - 20:00	600	Wasser
V8	5	09:15	650	Smoothie (Banane, Apfel, Pflaume, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)
V8	5	16:00	500	Veganes Mettbrot mit Tomaten
V8	5	16:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	5	22:00	230	Pita
V8	5	22:00 - 00:00	500	Wasser
V8	6	09:00 - 12:00	500	Wasser
V8	6	10:30	400	Türkischer Salat mit Brot
V8	6		100	Schwarztee
V8	6	16:30	270	Nudelsalat
V8	6	16:30	50	Baguette
V8	6	16:30	320	Gemüsespieße (Aubergine, Zucchini, Pilze)
V8	6	12:00 - 22:00	750	Wasser
V8	6	20:00 - 00:00	300	Wasser
V8	6	22:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	7	09:00 - 13:00	600	Wasser
V8	7	11:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	7	13:30	300	Grüner Smoothie (Petersiliengrün, Spinat, Mango, Banane, Apfel, Leinsamen)
V8	7	16:15	560	Alkoholfreies Bier
V8	7	17:30	80	Veganes Grillsteak
V8	7	17:30	340	Nudelsalat
V8	7	17:30	120	Baguette mit Kräutersauce
V8	7	17:30 - 22:00	750	Wasser
V8	8	08:00 - 18:00	600	Wasser
V8	8	09:15	350	Grüner Smoothie
V8	8	10:30	20	Dunkle Schokolade
V8	8	12:00	300	Nudelsalat
V8	8	12:00	60	Knäckebrötchen
V8	8	12:00	180	Baguette mit Kräutersauce
V8	8	15:30	400	Salbeitee
V8	8	18:00 - 19:00	750	Wasser
V8	8	19:30	540	Obst-Smoothie
V8	8	19:30 - 23:00	300	Wasser
V8	8	22:00	250	Linsennudeln
V8	9	09:00 - 17:00	900	Wasser
V8	9	09:15	440	Möhren-Smoothie (Apfel, Möhren, Ingwer, Mandeln)
V8	9	10:40	30	Dunkle Schokolade
V8	9	12:00	450	Rohkostsalat
V8	9	12:00	90	Knäckebrötchen
V8	9	15:00	100	Kaffee Americano
V8	9	18:00 - 00:00	300	Wasser
V8	9	22:45	210	Nudeln mit Knoblauch
V8	9	23:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)
V8	10	10:00 - 16:00	900	Wasser

Tabelle 92 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V8 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V8	10	10:15	310	Nudeln mit Knoblauch
V8	10	16:45	470	Cigköften
V8	10	18:30	100	Kesselchips
V8	10	18:00 - 00:00	1350	Wasser

Tabelle 93: Ernährungsprotokolle Proband V9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V9	1	09:15	150	Gewürzkaffee
V9	1	09:30 - 11:00	500	Mineralwasser
V9	1	09:40	80	Baguette Brötchen
V9	1	09:40	200	Schwarzer Tee
V9	1	10:00	200	Entkoffeinierter Kaffee
V9	1	11:15	250	Mineralwasser
V9	1	12:00	70	Brötchen
V9	1	13:50	100	Brezel
V9	1	14:45	100	Brezel
V9	1	13:50 - 15:30	400	Leitungswasser
V9	1	16:00	180	Brötchen mit Olivenaufstrich
V9	1	16:00 - 16:45	400	Leitungswasser
V9	1	17:45	120	Brötchen mit Olivenaufstrich
V9	1	17:30 - 18:00	400	Leitungswasser
V9	1	19:20	300	Mineralwasser
V9	1	21:00	150	Mandarinen
V9	1	20:20 - 22:00	350	Mineralwasser
V9	2	07:10	600	Leitungswasser
V9	2	07:45	250	Gewürzkaffee
V9	2	08:00	90	Mandarine
V9	2	09:15 - 11:30	400	Leitungswasser
V9	2	09:20	200	Brezel
V9	2	09:45 - 10:15	500	entkoffeinierter Kaffee
V9	2	13:00 - 15:00	400	Leitungswasser
V9	2	13:20	900	Linseneintopf mit Gemüse
V9	2	16:45	120	Brötchen mit Olivenaufstrich
V9	2	16:45	100	Zucchini
V9	2	17:15 - 18:30	400	Leitungswasser
V9	2	20:08	900	Bier
V9	2	21:10 - 22:15	450	Mineralwasser
V9	3	07:15 - 08:15	650	Leitungswasser
V9	3	09:00	250	Gewürzkaffee
V9	3	09:15	280	Mandarinen
V9	3	09:30	300	Entkoffeinierter Kaffee
V9	3	12:45	250	Brombeeren
V9	3	12:50	115	Brezel
V9	3	12:30 - 15:00	400	Leitungswasser
V9	3	13:15	120	Brötchen mit Kichererbsen

Tabelle 93 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V9	3	15:00 - 17:00	400	Leitungswasser
V9	3	15:40	940	Linseneintopf mit Gemüse
V9	3	18:40	200	Mineralwasser
V9	3	19:20	1000	Bier
V9	3	20:45 - 22:00	500	Mineralwasser
V9	3	21:30	240	Brombeeren
V9	4	07:00	600	Leitungswasser
V9	4	07:40	250	Gewürzkaffee
V9	4	07:55	250	Brombeeren
V9	4	09:15 - 12:15	400	Leitungswasser
V9	4	09:20	100	Brezel
V9	4	09:30	100	Brötchen mit Kichererbsen
V9	4	09:30	80	Zucchini
V9	4	10:00	500	Entkoffeinierter Kaffee
V9	4	12:15	100	Brötchen mit Kichererbsen
V9	4	12:15	80	Zucchini
V9	4	13:15 - 15:30	400	Leitungswasser
V9	4	15:15	40	Brötchen mit Senf-Rucola
V9	4	15:15	70	China Kohl
V9	4	15:30 - 17:30	400	Leitungswasser
V9	4	17:20	90	Brötchen mit Senf-Rucola
V9	4	17:20	70	China Kohl
V9	4	17:40	100	Brezel
V9	4	20:00	200	Mineralwasser
V9	4	20:00	500	Apfelschorle
V9	4	20:00	100	Doppelkeks
V9	4	21:00	300	Mineralwasser
V9	5	06:30 - 07:00	600	Leitungswasser
V9	5	07:35	250	Gewürzkaffee
V9	5	07:50	250	Brombeeren
V9	5	09:15 - 12:15	400	Leitungswasser
V9	5	09:15	200	Brezel
V9	5	10:00	500	Entkoffeinierter Kaffee
V9	5	13:15	75	China Kohl
V9	5	13:15	90	Brötchen mit Senf Rucola
V9	5	13:15 - 15:00	400	Leitungswasser
V9	5	13:15	75	China Kohl
V9	5	13:15	90	Brötchen mit Senf Rucola
V9	5	16:15	400	Pfefferminztee
V9	5	17:20	130	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich
V9	5	17:20	110	Auberginen
V9	5	17:20 - 18:00	400	Leitungswasser
V9	5	18:00	100	Brezel
V9	5	20:00	250	Leitungswasser
V9	5	21:00	1000	Bier

Tabelle 93 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V9	5	21:00 - 22:00	550	Mineralwasser
V9	5	22:30 - 07:00	300	Leitungswasser
V9	6	08:20	600	Leitungswasser
V9	6	08:45	250	Gewürzkafee
V9	6	09:10	50	Doppelkeks
V9	6	09:10	170	Mandarinen
V9	6	09:40	300	Entkoffeinierter Kaffee
V9	6	10:45 - 14:00	500	Leitungswasser
V9	6	14:00 - 17:30	700	Mineralwasser
V9	6	10:55	100	Brezel
V9	6	14:15	90	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich
V9	6	14:15	90	Auberginen
V9	6	15:30	60	Banane
V9	6	16:45	90	Mandarinen
V9	6	17:30	90	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich
V9	6	17:30	90	Auberginen
V9	6	18:00 - 20:00	300	Mineralwasser
V9	6	19:00	175	Mandarinen
V9	6	19:45	200	Grüner Tee
V9	6	21:30	500	Bier
V9	6	21:45	450	Smore's
V9	6	23:00	400	Mineralwasser
V9	6	23:00 - 7:00	300	Leitungswasser
V9	7	11:45	600	Leitungswasser
V9	7	11:55	250	Gewürzkafee
V9	7	12:20	300	Entkoffeinierter Kaffee
V9	7	12:45	500	Traubenmost
V9	7	13:25	250	Chili Chai
V9	7	13:40	400	Bier
V9	7	13:50	300	Nudelsalat mit Broccoli
V9	7	14:10	500	Bier
V9	7	14:45	150	Brownie
V9	7	14:50	200	Mandelkuchen Beere
V9	7	14:55	500	Bier
V9	7	15:45	500	Bier
V9	7	16:35	250	Chili Chai
V9	7	17:30	500	Weinschorle
V9	7	19:30	500	Mineralwasser
V9	7	22:00	100	Brownie
V9	7	22:30	300	Leitungswasser
V9	7	23:00 - 07:00	300	Leitungswasser
V9	8	08:45	600	Leitungswasser
V9	8	09:15	30	Brownie
V9	8	10:00	250	Gewürzkafee
V9	8	10:10	170	Doppelkeks

Tabelle 93 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V9 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V9	8	10:30	300	Schwarzer Tee
V9	8	13:40	300	Linsensuppe
V9	8	14:30	500	Entkoffeinierter Kaffee
V9	8	15:45	100	Brezel
V9	8	17:00	250	Plantain Bananen
V9	8	17:00	400	Leitungswasser
V9	8	19:00 - 21:30	500	Mineralwasser
V9	8	20:00	200	Zuckerschoten
V9	9	07:00	600	Leitungswasser
V9	9	07:45	250	Gewürzkaffee
V9	9	09:15	200	Brezel
V9	9	09:45 - 14:30	500	Leitungswasser
V9	9	10:45	400	Schwarzer Tee
V9	9	11:50	500	Entkoffeinierter Kaffee
V9	9	14:30	750	Tofu-Tortellini
V9	9	15:00 - 17:00	400	Leitungswasser
V9	9	17:10	350	Bohneneintopf
V9	9	17:15 - 18:30	400	Leitungswasser
V9	9	18:00	300	Ingwer Zitrone Tee
V9	9	19:45	900	Bier
V9	9	20:30	500	Mineralwasser
V9	9	21:40	40	Smore
V9	9	22:30 - 07:00	250	Leitungswasser
V9	10	09:15	600	Leitungswasser
V9	10	09:40	250	Gewürzkaffee
V9	10	10:00	250	Tofu Tortellini
V9	10	10:45	300	Schwarzer Tee
V9	10	11:00	125	Brombeeren
V9	10	12:00 - 15:30	500	Leitungswasser
V9	10	12:30	200	Brezel
V9	10	16:00	500	Entkoffeinierter Kaffee
V9	10	17:00	100	Brezel
V9	10	17:00	410	Linsensuppe
V9	10	17:10	300	Leitungswasser
V9	10	19:30	900	Bier
V9	10	21:15	250	Mineralwasser
V9	10	22:15 - 07:00	300	Leitungswasser

Tabelle 94: Ernährungsprotokolle Proband V10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V10	1	08:00 - 11:00	750	Leitungswasser
V10	1	11:00	200	Reis mit Gemüse
V10	1	11:20	253	Kroketten
V10	1	12:00 - 15:00	750	Leitungswasser
V10	1	15:40	415	Pommes frites + Curry

Tabelle 94 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V10	1	15:40 - 20:40	650	Leitungswasser
V10	1	17:50 - 19:20	900	Bier
V10	1	21:15	222	Soja-Joghurt (Pfirsich)
V10	1	21:30	245	Blätterteig mit Spinat und Tofu
V10	1	23:00 - 01:00	1200	Bier
V10	1	01:30 - 04:30	750	Leitungswasser
V10	2	09:10	203	Blätterteig mit Spinat und Tofu
V10	2	09:00 - 11:15	750	Leitungswasser
V10	2	13:45	400	Erdbeer-Soja-Milchreis (Pulver)
V10	2	14:30	97	Blätterteig mit Spinat und Tofu
V10	2	15:00 - 16:00	503	Couscous-Salat
V10	2	15:20 - 18:00	750	Leitungswasser
V10	2	20:30	400	Bananen in Soja-Reismilch
V10	2	21:00	338	Salat
V10	2	21:00	250	Leitungswasser
V10	3	07:00 - 08:00	500	Leitungswasser
V10	3	07:55	401	Reis-Nudeln mit Tofu, Tomaten und Ingwer
V10	3	09:00 - 12:00	750	Leitungswasser
V10	3	10:15	308	Salat
V10	3	14:00 - 17:00	750	Leitungswasser
V10	3	14:00 - 17:00	543	Reis-Nudeln mit Tofu, Tomaten und Ingwer
V10	3	14:30	234	Apfel
V10	3	20:40	235	schwarzer + roter Reis mit Gemüse + Tofu
V10	3	20:40	300	Multivitaminsaft
V10	4	08:00 - 12:00	750	Leitungswasser
V10	4	08:00	80	Banane
V10	4	08:20	251	schwarzer + roter Reis mit Gemüse + Tofu
V10	4	11:00	181	Apfel
V10	4	12:00 - 15:00	750	Leitungswasser
V10	4	13:50	240	schwarzer + roter Reis mit Gemüse + Tofu
V10	4	15:00 - 17:45	750	Leitungswasser
V10	4	19:30	300	Multivitaminsaft
V10	4	20:00	299	Tofu mit Algen
V10	4	20:00	220	Salat
V10	4	20:15 - 22:00	750	Leitungswasser
V10	4	21:00	400	Traubenschorle
V10	4	22:30 - 03:30	2500	Bier
V10	4	04:00 - 08:00	500	Leitungswasser
V10	5	09:40	400	Leitungswasser
V10	5	09:50	371	Salat
V10	5	10:20	975	Leitungswasser
V10	5	11:40	442	roter + schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu
V10	5	12:15	275	Multivitaminsaft
V10	5	13:00	253	Apfel
V10	5	14:00 - 19:00	818	roter + schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu

Tabelle 94 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V10	5	16:00-20:15	750	Leitungswasser
V10	5	20:15	750	Leitungswasser
V10	5	22:00 - 01:30	2000	Bier
V10	5	02:00 - 07:00	1250	Leitungswasser
V10	5	02:00	241	roter + schwarzer Reis mit Gemüse+ Tofu
V10	6	08:00 - 12:00	750	Leitungswasser
V10	6	10:10	278	roter+ schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu
V10	6	12:20	578	Salat
V10	6	12:00 - 19:00	750	Leitungswasser
V10	6	20:00	500	Erdbeer-Soja-Reis-Milch(Pulver)
V10	6	17:00	263	Pizza
V10	6	21:00	200	Pizza
V10	6	21:00 - 06:00	750	Leitungswasser
V10	7	07:30	750	roter+ schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu
V10	7	08:00 - 11:00	750	Leitungswasser
V10	7	11:45 - 13:15	750	Leitungswasser
V10	7	14:20	590	Reisnudeln mit Tomaten-Kokosmilch
V10	7	13:20 - 17:10	750	Leitungswasser
V10	7	15:00	271	Beerenmix mit Kokosmilch
V10	7	17:15 - 22:40	750	Leitungswasser
V10	7	19:30	146	Apfel
V10	7	20:45	326	Salat mit Tempeh
V10	8	08:10	750	Leitungswasser
V10	8	08:10 - 13:00	316	Salat mit Tempeh
V10	8	12:00	468	Salat mit Tempeh
V10	8	13:00 - 15:30	750	Leitungswasser
V10	8	15:00	174	Tortilla Chips mit Dips
V10	8	15:30 - 21:00	750	Leitungswasser
V10	8	16:20	320	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu
V10	8	19:50	251	Apfel
V10	8	21:00	500	Erdbeer-Soja-Reismilch
V10	9	08:00 - 11:10	750	Leitungswasser
V10	9	08:45	235	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu
V10	9	11:10 - 13:40	750	Leitungswasser
V10	9	11:45	199	Apfel
V10	9	13:25	521	Reisnudeln mit Tomaten-Kokos-Sauce
V10	9	13:45	255	Beeren mit Kokosmilch
V10	9	13:40 - 18:00	750	Leitungswasser
V10	9	17:00	200	Kakao
V10	9	18:10	110	Brötchen mit Erdmandel
V10	9	18:00 - 7:10	750	Leitungswasser
V10	9	20:00	500	Schwarzer Tee
V10	9	21:50	445	Suppe mit Klößchen
V10	10	07:50	511	Suppe mit Klößen
V10	10	08:00	750	Leitungswasser

Tabelle 94 (Fortsetzung): Ernährungsprotokolle Proband V10 (Humanstudie II)

Proband	Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrtes Lebensmittel
V10	10	08:05	340	Schwarzer Tee
V10	10	11:00	522	Tofupfanne
V10	10	19:30	587	Suppe mit Klößchen
V10	10	20:00 - 23:00	350	Leitungswasser
V10	10	21:00	400	Erdbeer-Soja-Reis-Milch
V10	10	22:30	161	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu

Humanstudie II

Hoherhitzte Lebensmittel, eingeteilt nach Erhitzungsfaktor

Tabelle 95: Hoherhitzte Lebensmittel bzw. Mahlzeiten, eingeteilt in vier Gruppen nach ihrem Erhitzungsfaktor*

Erhitzungsfaktor 1 \approx 100 % des Lebensmittels / der Mahlzeit > 100 °C erhitzt
<ul style="list-style-type: none"> • Backwaren z. B. Brot, Brötchen, Kuchen, süße und herzhaft gebäckte Stücke • hoherhitzte Kartoffelprodukte z. B. Pommes frites, Kroketten, Kartoffelwedges, Bratkartoffeln, Kartoffelpuffer und Kartoffelchips • hoherhitztes Fleisch z. B. Steaks, Grillbratwurst, Cevapcici, Schnitzel, Cordon bleu und Chickenwings • hoherhitzter Fisch z. B. Seelachs (aus dem Backofen) • hoherhitzte vegetarische Produkte z. B. vegetarisches Grillsteak, Sellerie-Schnitzel, Tofu-Grillwürstchen, Pilz-Bratling und Lupinenrostbratwurst • Backofengerichte z. B. Pizza, Lasagne, Schafskäse (aus dem Backofen) und Auflauf • Pfannengerichte z. B. Couscouspfanne, Hirsepfanne, Gemüsepfanne, Paella, Pfannkuchen und Crêpes • sonstige Mahlzeiten bestehend aus verschiedenen hoherhitzten Lebensmitteln z. B. Schnitzel mit Pommes frites, Burger (inkl. Burgerbrötchen) und Bratwurst oder Fleischkäse im Brötchen • Kaffeegetränke z. B. schwarzer Kaffee, Kaffee mit Milch und Espresso • hoherhitzte Cerealienprodukte z. B. Cornflakes und Crunchy-Müsli
Erhitzungsfaktor 0,75 \approx 75 % des Lebensmittels / der Mahlzeit > 100 °C erhitzt
<ul style="list-style-type: none"> • Backwaren (> 100 °C, Anteil: \approx 75 %) mit Belag (\leq 100 °C) z. B. Brot, Brötchen oder Baguette belegt mit Käse, Wurst, Marmelade, Nutella oder anderem Brotaufstrich • Kekse (> 100 °C, Anteil: \approx 75 %) mit Cremefüllung (\leq 100 °C) z. B. Oreo-Kekse und Doppelkekse • Mahlzeiten bestehend aus hoherhitzten Lebensmitteln (> 100 °C, Anteil: \approx 75 %) mit Soße (\leq 100 °C) z. B. Schweinefilet mit Gorgonzolasoße, vegetarische Mühlen-Nuggets mit süßer Chilisoße, Baguette mit Kräutersauce und Tortilla Chips mit Dips
Erhitzungsfaktor 0,5 \approx 50 % des Lebensmittels / der Mahlzeit > 100 °C erhitzt
<ul style="list-style-type: none"> • Mahlzeiten bestehend aus hoherhitzten (> 100 °C, Anteil: \approx 50 %) und nicht oder nur geringfügig erhitzten (\leq 100 °C) Lebensmitteln z. B. Rindergeschneitztes in Pfeffersoße mit Spätzle, Hot-Dog und Gnocchi mit Sojaschnitzel • Süßigkeiten bzw. Süßspeisen aus hoherhitzten (> 100 °C, Anteil: \approx 50 %) und nicht oder nur geringfügig erhitzten (\leq 100 °C) Bestandteilen z. B. Mini-Windbeutel, Waffeln mit Kirschen, Haselnuss-Mignon-Schnitte, Hanuta und Smores
Erhitzungsfaktor 0,25 \approx 25 % des Lebensmittels / der Mahlzeit > 100 °C erhitzt
<ul style="list-style-type: none"> • Mahlzeiten bestehend aus hoherhitzten (> 100 °C, Anteil: \approx 25 %) und nicht oder nur geringfügig erhitzten (\leq 100 °C) Lebensmitteln z. B. Spaghetti Bolognese, Hack-Lauchsuppe und Dampfnudel mit Vanillesoße • Süßspeise aus hoherhitzten (> 100 °C, Anteil: \approx 25 %) und nicht oder nur geringfügig erhitzten (\leq 100 °C) Bestandteilen z. B. Eis in Eiswaffeln, Sandwicheis und Tiramisu • hoherhitzte Cerealienprodukte (> 100 °C, Anteil: \approx 25 %) in Kombination mit nicht oder nur geringfügig erhitzten (\leq 100 °C) Lebensmitteln z. B. Crunchy-Müsli, Cornflakes oder Nugat-Kissen mit Obst, Körnern, Wasser oder Milch

* Der Erhitzungsfaktor gibt den Anteil an hoherhitzten Lebensmittelbestandteilen in einem Lebensmittel bzw. an hoherhitzten Lebensmitteln in einer Mahlzeit an. Es handelt es sich um einen Schätzwert.

Humanstudie II*Tägliche Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln***Tabelle 96:** Mittlere tägliche Aufnahmemengen an hocherhitzten Lebensmitteln aller Probanden (Humanstudie II)

Proband	Aufnahme von hocherhitzten Lebensmitteln [g/d]
GK1	883 ± 348
GK2	708 ± 192
GK3	724 ± 239
GK4	900 ± 460
GK5	579 ± 124
GK6	803 ± 244
GK7	732 ± 172
GK8	705 ± 313
GK9	603 ± 189
GK10	472 ± 122
V1	1133 ± 471
V2	449 ± 277
V3	769 ± 425
V4	641 ± 164
V5	941 ± 349
V6	146 ± 309
V7	449 ± 240
V8	319 ± 195
V9	1035 ± 154
V10	509 ± 219

GK: Gemischtköstler, V: Veganer

Humanstudie II*Fragebogen zu nicht-alimentären exogenen Acrolein-Quellen*

1.) Haben Sie im Studienzeitraum gegrillt oder sich in der Nähe von offenem Feuer aufgehalten?

- Ja Nein Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Wenn ja wann? _____

2.) Haben Sie sich im Studienzeitraum in Bars, Diskotheken, Restaurants oder ähnlichem aufgehalten?

- Ja Nein Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Wenn ja wann? _____

3.) Haben Sie sich im Studienzeitraum in Raucherbereichen von Bars, Diskotheken, Restaurants oder ähnlichem aufgehalten?

- Ja Nein Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Wenn ja wann? _____

4.) Haben Sie im Studienzeitraum öffentliche Veranstaltungen (z. B. ein Stadtfest) besucht?

- Ja Nein Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Wenn ja wann? _____

5.) Haben Sie im Studienzeitraum zeitweise in der Nähe von Rauchern aufgehalten?

- Ja Nein Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Wenn ja wann? _____

6.) Haben Sie sich im Studienzeitraum eher in Innenräumen aufgehalten oder waren Sie viel im Freien unterwegs?

- Aufenthalt in Innenräumen Viel im Freien unterwegs

- Kann ich mich nicht mehr dran erinnern.

Tabelle 97: Auswertung der Fragebögen zu nicht-alimentären exogenen Acrolein-Quellen (Humanstudie II)

	GK1	GK2	GK3	GK4	GK5	GK6	GK7	GK8	GK9	GK10	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	
Vorwiegender Aufenthalt																					
in Innenräumen			x			x		x						x	x	x		x		x	
im Freien	x	x		x			x			x		x	x							x	
Aufenthalt in der Nähe von/in / auf																					
Rauchern			(T?+)	T2 T6 T10			(T?+)	(T?+)			T10	T2	T2	T1 T5 T8	T8		(T?+)	T?+	T?	T?	
Bars / Diskotheken / Restaurants	T3			T2 T6 T10	T6	T6				T6	T2 T4 T10	T9	T2		T6 T8	T4 T6 T6	T6	T6	T?+	T?	
Raucherbereichen von Bars / Diskotheken / Restaurants											T10				T8		T4		T?+	T?	
öffentlichen Veranstaltungen (z. B. Stadtfest)		T5		T?	T5 T6	T2	T6			T5 T6									T?+	T?	
Grillstellen / offenem Feuer			T6	T4 T6	T1 T2 T5					T1 T2 T4 T5	T2 T4 T9			T6	T5	T5			T?+		

P: Proband, T: Tag, T?: Tag unbekannt, + mehrmals wöchentlich

Humanstudie II*Urinvolumina***Tabelle 98:** Urinvolumina der Probanden GK1 - GK10 (Humanstudie II)

	Urinvolumina [ml]									
	GK1	GK2	GK3	GK4	GK5	GK6	GK7	GK8	GK9	GK10
Tag 1 (08:00 - 20:00)	740	1093	447	466	715	541	706	705	1586	413
Tag 1 (20:00 - 08:00)	320	390	403	686	1143	462	522	99	1639	266
Tag 1 (Spoturin)	65	49	60	96	60	83	66	60	61	61
Tag 2 (08:00 - 20:00)	591	1655	336	352	729	1076	906	128	2587	190
Tag 2 (20:00 - 08:00)	727	260	236	623	990	145	198	56	1229	322
Tag 2 (Spoturin)	54	67	83	61	53	86	66	54	62	68
Tag 3 (08:00 - 20:00)	1272	994	718	607	383	466	868	169	2164	537
Tag 3 (20:00 - 08:00)	353	1095	277	568	703	159	169	230	1535	506
Tag 3 (Spoturin)	71	93	86	57	52	87	85	62	64	58
Tag 4 (08:00 - 20:00)	575	2510	434	533	871	492	954	325	1781	1323
Tag 4 (20:00 - 08:00)	920	1002	586	796	383	126	243	124	1699	528
Tag 4 (Spoturin)	75	69	87	61	48	83	73	68	72	67
Tag 5 (08:00 - 20:00)	2840	2000	435	687	724	601	470	265	1883	329
Tag 5 (20:00 - 08:00)	1271	341	172	640	757	217	288	91	1619	954
Tag 5 (Spoturin)	82	86	91	82	56	94	44	53	69	53
Tag 6 (08:00 - 20:00)	1626	1396	413	333	152	681	495	142	2002	525
Tag 6 (20:00 - 08:00)	653	1099	162	1072	1114	613	403	56	1363	948
Tag 6 (Spoturin)	58	78	85	80	50	91	55	62	76	56
Tag 7 (08:00 - 20:00)	651	1733	485	956	785	723	345	198	1988	1403
Tag 7 (20:00 - 08:00)	810	498	627	1218	920	339	206	236	1288	351
Tag 7 (Spoturin)	75	94	65	75	53	75	58	56	74	58
Tag 8 (08:00 - 20:00)	1496	1064	768	736	452	51	523	598	2013	402
Tag 8 (20:00 - 08:00)	689	246	309	680	1243	218	866	499	1483	285
Tag 8 (Spoturin)	63	93	67	78	56	82	72	62	68	52
Tag 9 (08:00 - 20:00)	908	627	192	817	427	705	1000	256	2167	194
Tag 9 (20:00 - 08:00)	261	567	670	482	1060	181	654	472	1212	391
Tag 9 (Spoturin)	75	71	70	95	54	88	72	80	63	62
Tag 10 (08:00 - 20:00)	295	986	1286	554	724	1141	903	396	2300	381
Tag 10 (20:00 - 08:00)	396	767	954	923	438	423	713	367	1368	1050
Tag 10 (Spoturin)	74	93	89	86	53	71	72	61	69	49

Tabelle 99: Urinvolumina der Probanden V1 - V10 (Humanstudie II)

	Urinvolumina [ml]									
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
Tag 1 (08:00 - 20:00)	985	1109	1561	985	1546	4556	1990	1486	1746	2349
Tag 1 (20:00 - 08:00)	1673	1231	389	223	1281	2250	437	947	1138	2509
Tag 1 (Spoturin)	57	82	50	76	50	92	35	51	77	63
Tag 2 (08:00 - 20:00)	1727	1983	467	654	1500	4518	1570	1134	1549	835
Tag 2 (20:00 - 08:00)	805	790	1469	1017	1494	2973	583	1001	1972	857
Tag 2 (Spoturin)	60	69	51	88	58	78	96	74	77	91
Tag 3 (08:00 - 20:00)	2204	1236	1129	698	1312	2920	1130	711	2255	1629
Tag 3 (20:00 - 08:00)	345	425	167	212	1992	2313	545	778	2017	330
Tag 3 (Spoturin)	60	92	55	78	69	107	127	64	84	69
Tag 4 (08:00 - 20:00)	394	1404	124	382	779	2621	1354	1438	1420	1167
Tag 4 (20:00 - 08:00)	495	1790	295	265	2131	3100	548	1001	1047	3360
Tag 4 (Spoturin)	68	72	53	79	60	83	84	78	74	103
Tag 5 (08:00 - 20:00)	1606	1491	128	586	1273	1691	2053	818	1216	499
Tag 5 (20:00 - 08:00)	271	632	301	1127	744	1850	750	532	2143	2305
Tag 5 (Spoturin)	69	75	60	78	53	86	129	56	93	68
Tag 6 (08:00 - 20:00)	863	1718	242	696	2135	2637	1524	217	2629	894
Tag 6 (20:00 - 08:00)	872	495	339	636	2037	1837	1287	889	1314	554
Tag 6 (Spoturin)	63	77	50	98	67	99	97	64	93	74
Tag 7 (08:00 - 20:00)	1002	2319	236	2126	898	2904	1443	1717	4027	2266
Tag 7 (20:00 - 08:00)	523	641	344	1045	914	2911	561	410	2097	1498
Tag 7 (Spoturin)	68	71	54	68	62	65	63	84	58	56
Tag 8 (08:00 - 20:00)	703	1784	517	1369	897	2466	1723	1452	1064	1528
Tag 8 (20:00 - 08:00)	351	826	211	982	994	3311	1386	1215	1576	946
Tag 8 (Spoturin)	57	73	49	85	59	76	88	75	85	58
Tag 9 (08:00 - 20:00)	1507	2273	407	885	1025	2245	2309	2215	1021	2126
Tag 9 (20:00 - 08:00)	1100	1184	325	1018	961	2379	293	206	2020	975
Tag 9 (Spoturin)	71	73	73	79	70	79	71	60	83	76
Tag 10 (08:00 - 20:00)	2740	2403	*	572	800	1921	1908	857	2073	1857
Tag 10 (20:00 - 08:00)	4559	1062	*	419	907	2311	1280	1270	1836	1039
Tag 10 (Spoturin)	90	74	*	68	53	62	70	53	63	101

*Proband V3 hat die Studie vorzeitig am Ende von Tag 9 beendet.

Humanstudie II*Kreatinin***Tabelle 100:** Kreatinin im Urin der Probanden GK1 - GK5 (Humanstudie II)

	Kreatinin [g/l]				
	GK1	GK2	GK3	GK4	GK5
Tag 1 (08:00 - 20:00)	2,08 ± 0,10	1,63 ± 0,01	1,39 ± 0,02	2,14 ± 0,08	1,73 ± 0,05
Tag 1 (20:00 - 08:00)	3,29 ± 0,11	2,78 ± 0,07	4,02 ± 0,05	1,99 ± 0,06	1,03 ± 0,00
Tag 1 (Spoturin)	3,39 ± 0,03	2,41 ± 0,09	3,93 ± 0,00	2,51 ± 0,03	1,64 ± 0,03
Tag 2 (08:00 - 20:00)	0,99 ± 0,01	0,52 ± 0,02	2,86 ± 0,01	2,34 ± 0,01	1,52 ± 0,08
Tag 2 (20:00 - 08:00)	1,92 ± 0,06	3,14 ± 0,03	4,08 ± 0,07	1,70 ± 0,02	1,19 ± 0,03
Tag 2 (Spoturin)	2,22 ± 0,01	3,06 ± 0,01	4,64 ± 0,02	1,99 ± 0,07	2,44 ± 0,04
Tag 3 (08:00 - 20:00)	0,83 ± 0,01	1,09 ± 0,04	1,21 ± 0,02	1,58 ± 0,02	1,70 ± 0,10
Tag 3 (20:00 - 08:00)	3,02 ± 0,04	0,92 ± 0,01	4,08 ± 0,05	2,33 ± 0,05	2,42 ± 0,00
Tag 3 (Spoturin)	3,05 ± 0,16	0,83 ± 0,00	4,33 ± 0,05	2,40 ± 0,00	1,91 ± 0,09
Tag 4 (08:00 - 20:00)	1,78 ± 0,03	0,37 ± 0,01	2,57 ± 0,01	2,29 ± 0,01	1,10 ± 0,02
Tag 4 (20:00 - 08:00)	1,40 ± 0,01	1,02 ± 0,06	2,26 ± 0,01	1,82 ± 0,03	2,19 ± 0,02
Tag 4 (Spoturin)	2,93 ± 0,02	0,63 ± 0,01	2,51 ± 0,00	1,39 ± 0,01	2,51 ± 0,05
Tag 5 (08:00 - 20:00)	0,39 ± 0,02	0,05 ± 0,00	3,63 ± 0,08	1,94 ± 0,02	1,58 ± 0,07
Tag 5 (20:00 - 08:00)	0,93 ± 0,05	2,48 ± 0,04	3,97 ± 0,06	1,94 ± 0,04	1,12 ± 0,08
Tag 5 (Spoturin)	1,54 ± 0,07	2,39 ± 0,04	4,16 ± 0,02	2,23 ± 0,00	3,98 ± 0,05
Tag 6 (08:00 - 20:00)	0,64 ± 0,04	0,77 ± 0,01	2,81 ± 0,02	2,34 ± 0,08	2,66 ± 0,13
Tag 6 (20:00 - 08:00)	1,74 ± 0,08	0,86 ± 0,01	3,61 ± 0,01	1,39 ± 0,10	2,21 ± 0,09
Tag 6 (Spoturin)	2,71 ± 0,00	1,35 ± 0,00	3,91 ± 0,06	0,28 ± 0,01	1,40 ± 0,06
Tag 7 (08:00 - 20:00)	1,75 ± 0,09	0,62 ± 0,03	2,69 ± 0,02	0,81 ± 0,00	1,26 ± 0,08
Tag 7 (20:00 - 08:00)	1,26 ± 0,06	1,83 ± 0,05	1,99 ± 0,05	1,17 ± 0,02	1,50 ± 0,07
Tag 7 (Spoturin)	2,04 ± 0,02	2,01 ± 0,02	1,74 ± 0,01	1,18 ± 0,01	1,51 ± 0,05
Tag 8 (08:00 - 20:00)	0,81 ± 0,03	0,89 ± 0,04	1,67 ± 0,00	1,57 ± 0,04	2,05 ± 0,09
Tag 8 (20:00 - 08:00)	1,52 ± 0,01	3,12 ± 0,06	3,11 ± 0,03	1,90 ± 0,01	1,09 ± 0,03
Tag 8 (Spoturin)	1,67 ± 0,05	3,49 ± 0,07	3,38 ± 0,11	1,69 ± 0,09	1,80 ± 0,04
Tag 9 (08:00 - 20:00)	1,01 ± 0,05	1,50 ± 0,01	2,71 ± 0,03	1,69 ± 0,02	1,65 ± 0,05
Tag 9 (20:00 - 08:00)	2,99 ± 0,13	1,98 ± 0,01	2,14 ± 0,03	1,29 ± 0,04	1,57 ± 0,02
Tag 9 (Spoturin)	2,9 ± 0,08	1,94 ± 0,04	4,27 ± 0,06	1,27 ± 0,00	1,55 ± 0,03
Tag 10 (08:00 - 20:00)	2,96 ± 0,09	0,71 ± 0,00	0,98 ± 0,03	1,61 ± 0,04	1,77 ± 0,03
Tag 10 (20:00 - 08:00)	3,58 ± 0,16	1,62 ± 0,00	1,22 ± 0,03	2,06 ± 0,08	2,41 ± 0,04
Tag 10 (Spoturin)	4,00 ± 0,13	2,45 ± 0,04	2,48 ± 0,06	1,44 ± 0,00	2,42 ± 0,01

Tabelle 101: Kreatinin im Urin der Probanden GK6 - GK10 (Humanstudie II)

	Kreatinin [g/l]				
	GK6	GK7	GK8	GK9	GK10
Tag 1 (08:00 - 20:00)	1,38 ± 0,01	0,80 ± 0,04	1,57 ± 0,01	0,57 ± 0,03	1,45 ± 0,01
Tag 1 (20:00 - 08:00)	1,44 ± 0,04	1,06 ± 0,04	2,38 ± 0,12	0,55 ± 0,03	3,10 ± 0,07
Tag 1 (Spoturin)	1,20 ± 0,01	1,72 ± 0,06	3,37 ± 0,02	1,10 ± 0,04	2,81 ± 0,14
Tag 2 (08:00 - 20:00)	0,56 ± 0,01	0,74 ± 0,03	3,69 ± 0,11	0,31 ± 0,00	3,03 ± 0,11
Tag 2 (20:00 - 08:00)	2,81 ± 0,23	1,85 ± 0,10	3,27 ± 0,03	0,54 ± 0,00	2,09 ± 0,05
Tag 2 (Spoturin)	2,94 ± 0,03	2,10 ± 0,03	4,84 ± 0,06	0,74 ± 0,04	3,19 ± 0,16
Tag 3 (08:00 - 20:00)	1,35 ± 0,07	0,91 ± 0,04	3,05 ± 0,06	0,42 ± 0,04	1,29 ± 0,03
Tag 3 (20:00 - 08:00)	2,05 ± 0,02	1,23 ± 0,04	2,31 ± 0,01	0,44 ± 0,02	1,30 ± 0,04
Tag 3 (Spoturin)	2,55 ± 0,01	1,65 ± 0,04	2,35 ± 0,01	0,55 ± 0,03	1,04 ± 0,02
Tag 4 (08:00 - 20:00)	1,76 ± 0,06	0,85 ± 0,05	1,88 ± 0,07	0,57 ± 0,05	0,60 ± 0,01
Tag 4 (20:00 - 08:00)	3,19 ± 0,03	1,94 ± 0,06	2,75 ± 0,01	0,52 ± 0,02	1,29 ± 0,05
Tag 4 (Spoturin)	2,54 ± 0,03	2,96 ± 0,07	2,72 ± 0,04	0,94 ± 0,03	2,56 ± 0,03
Tag 5 (08:00 - 20:00)	1,18 ± 0,05	1,76 ± 0,03	2,08 ± 0,03	0,38 ± 0,03	1,93 ± 0,10
Tag 5 (20:00 - 08:00)	2,02 ± 0,02	2,30 ± 0,02	4,79 ± 0,19	0,63 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Tag 5 (Spoturin)	2,20 ± 0,03	3,17 ± 0,10	4,16 ± 0,02	1,24 ± 0,07	2,11 ± 0,06
Tag 6 (08:00 - 20:00)	1,07 ± 0,01	0,73 ± 0,03	3,82 ± 0,03	0,5 ± 0,03	1,31 ± 0,05
Tag 6 (20:00 - 08:00)	0,86 ± 0,02	1,36 ± 0,05	4,19 ± 0,11	0,63 ± 0,04	0,95 ± 0,01
Tag 6 (Spoturin)	1,72 ± 0,02	0,91 ± 0,02	4,24 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,68 ± 0,00
Tag 7 (08:00 - 20:00)	0,98 ± 0,05	1,72 ± 0,02	2,54 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,53 ± 0,01
Tag 7 (20:00 - 08:00)	0,87 ± 0,02	2,24 ± 0,01	2,12 ± 0,01	0,63 ± 0,02	1,56 ± 0,05
Tag 7 (Spoturin)	2,44 ± 0,01	2,59 ± 0,03	3,94 ± 0,02	0,79 ± 0,06	1,75 ± 0,01
Tag 8 (08:00 - 20:00)	0,91 ± 0,05	0,81 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,46 ± 0,04	1,60 ± 0,02
Tag 8 (20:00 - 08:00)	2,28 ± 0,08	0,56 ± 0,00	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,04	2,97 ± 0,10
Tag 8 (Spoturin)	3,03 ± 0,04	1,25 ± 0,01	2,22 ± 0,02	0,77 ± 0,03	2,45 ± 0,09
Tag 9 (08:00 - 20:00)	1,36 ± 0,06	0,61 ± 0,02	2,38 ± 0,10	0,35 ± 0,03	3,12 ± 0,03
Tag 9 (20:00 - 08:00)	2,06 ± 0,14	1,05 ± 0,00	0,84 ± 0,01	0,66 ± 0,02	2,03 ± 0,00
Tag 9 (Spoturin)	2,31 ± 0,05	1,42 ± 0,04	1,93 ± 0,01	1,27 ± 0,02	2,07 ± 0,03
Tag 10 (08:00 - 20:00)	0,72 ± 0,02	0,64 ± 0,01	1,38 ± 0,04	*	2,18 ± 0,00
Tag 10 (20:00 - 08:00)	0,84 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,53 ± 0,02
Tag 10 (Spoturin)	2,40 ± 0,09	1,15 ± 0,03	3,91 ± 0,03	1,15 ± 0,02	2,75 ± 0,11

*Der Urin von Proband GK9 wurde an Tag 10 (08:00 - 20:00) nicht aliquotiert.

Tabelle 102: Kreatinin im Urin der Probanden V1 - V5 (Humanstudie II)

	Kreatinin [g/l]				
	V1	V2	V3*	V4	V5
Tag 1 (08:00 - 20:00)	0,82 ± 0,02	1,12 ± 0,03	0,54 ± 0,01	1,28 ± 0,00	0,64 ± 0,01
Tag 1 (20:00 - 08:00)	0,82 ± 0,02	0,69 ± 0,01	2,63 ± 0,03	2,46 ± 0,11	0,81 ± 0,03
Tag 1 (Spoturin)	1,75 ± 0,01	0,87 ± 0,03	3,70 ± 0,06	2,75 ± 0,01	1,01 ± 0,08
Tag 2 (08:00 - 20:00)	0,51 ± 0,01	0,44 ± 0,01	2,11 ± 0,01	1,32 ± 0,03	0,75 ± 0,01
Tag 2 (20:00 - 08:00)	1,21 ± 0,02	1,01 ± 0,07	0,70 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,39 ± 0,00
Tag 2 (Spoturin)	1,20 ± 0,04	1,42 ± 0,06	1,83 ± 0,03	1,1 ± 0,00	3,16 ± 0,15
Tag 3 (08:00 - 20:00)	0,42 ± 0,01	0,79 ± 0,04	0,99 ± 0,01	1,26 ± 0,02	0,86 ± 0,03
Tag 3 (20:00 - 08:00)	1,94 ± 0,05	0,99 ± 0,06	4,56 ± 0,13	2,57 ± 0,02	0,61 ± 0,00
Tag 3 (Spoturin)	3,84 ± 0,02	2,02 ± 0,12	4,87 ± 0,07	3,52 ± 0,08	1,24 ± 0,00
Tag 4 (08:00 - 20:00)	2,21 ± 0,02	0,61 ± 0,04	4,64 ± 0,03	2,05 ± 0,00	1,46 ± 0,02
Tag 4 (20:00 - 08:00)	1,80 ± 0,03	0,35 ± 0,01	4,86 ± 0,1	2,01 ± 0,09	0,42 ± 0,03
Tag 4 (Spoturin)	1,97 ± 0,01	1,49 ± 0,07	5,45 ± 0,03	2,98 ± 0,14	0,86 ± 0,01
Tag 5 (08:00 - 20:00)	0,54 ± 0,00	0,56 ± 0,04	5,44 ± 0,07	1,39 ± 0,05	0,82 ± 0,01
Tag 5 (20:00 - 08:00)	2,39 ± 0,01	1,05 ± 0,02	4,29 ± 0,08	0,55 ± 0,00	1,16 ± 0,03
Tag 5 (Spoturin)	3,47 ± 0,04	3,42 ± 0,10	3,67 ± 0,08	1,98 ± 0,18	1,66 ± 0,01
Tag 6 (08:00 - 20:00)	1,07 ± 0,00	0,41 ± 0,00	2,74 ± 0,02	1,22 ± 0,02	0,51 ± 0,04
Tag 6 (20:00 - 08:00)	0,90 ± 0,01	0,88 ± 0,02	3,76 ± 0,00	1,03 ± 0,01	0,57 ± 0,01
Tag 6 (Spoturin)	2,59 ± 0,00	1,01 ± 0,04	3,44 ± 0,10	1,65 ± 0,11	0,73 ± 0,02
Tag 7 (08:00 - 20:00)	0,59 ± 0,01	0,33 ± 0,00	3,70 ± 0,09	0,38 ± 0,01	0,84 ± 0,02
Tag 7 (20:00 - 08:00)	1,49 ± 0,03	0,82 ± 0,03	2,85 ± 0,09	0,66 ± 0,01	1,20 ± 0,00
Tag 7 (Spoturin)	1,63 ± 0,03	3,48 ± 0,12	3,50 ± 0,07	0,95 ± 0,03	0,80 ± 0,02
Tag 8 (08:00 - 20:00)	1,42 ± 0,00	0,49 ± 0,01	1,99 ± 0,03	0,61 ± 0,00	0,94 ± 0,03
Tag 8 (20:00 - 08:00)	2,35 ± 0,04	0,95 ± 0,01	3,67 ± 0,10	0,67 ± 0,01	1,04 ± 0,04
Tag 8 (Spoturin)	2,24 ± 0,02	1,11 ± 0,02	3,72 ± 0,04	1,17 ± 0,04	1,14 ± 0,03
Tag 9 (08:00 - 20:00)	0,50 ± 0,01	0,42 ± 0,01	2,16 ± 0,14	0,86 ± 0,01	1,22 ± 0,01
Tag 9 (20:00 - 08:00)	0,72 ± 0,00	0,68 ± 0,02	3,09 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Tag 9 (Spoturin)	2,75 ± 0,02	1,16 ± 0,08	3,47 ± 0,07	1,37 ± 0,05	1,35 ± 0,04
Tag 10 (08:00 - 20:00)	0,25 ± 0,00	0,32 ± 0,00	*	1,10 ± 0,01	1,60 ± 0,07
Tag 10 (20:00 - 08:00)	0,18 ± 0,01	0,64 ± 0,00	*	1,84 ± 0,10	1,00 ± 0,00
Tag 10 (Spoturin)	0,33 ± 0,01	2,69 ± 0,05	*	2,55 ± 0,05	2,69 ± 0,10

*Proband V3 hat die Studie vorzeitig am Ende von Tag 9 beendet.

Tabelle 103: Kreatinin im Urin der Probanden V6 - V10 (Humanstudie II)

	Kreatinin [g/l]				
	V6	V7	V8	V9	V10
Tag 1 (08:00 - 20:00)	0,15 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,42 ± 0,00	0,51 ± 0,02	0,34 ± 0,02
Tag 1 (20:00 - 08:00)	0,22 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,88 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Tag 1 (Spoturin)	0,70 ± 0,01	2,82 ± 0,11	1,25 ± 0,06	0,90 ± 0,04	0,90 ± 0,04
Tag 2 (08:00 - 20:00)	0,15 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,61 ± 0,04	0,84 ± 0,01
Tag 2 (20:00 - 08:00)	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,59 ± 0,03
Tag 2 (Spoturin)	0,28 ± 0,00	1,72 ± 0,02	0,97 ± 0,05	1,25 ± 0,05	0,49 ± 0,02
Tag 3 (08:00 - 20:00)	0,16 ± 0,01	0,36 ± 0,00	0,78 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,46 ± 0,00
Tag 3 (20:00 - 08:00)	0,17 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,52 ± 0,05	0,46 ± 0,04	0,63 ± 0,03
Tag 3 (Spoturin)	0,23 ± 0,01	0,88 ± 0,00	1,34 ± 0,01	1,13 ± 0,03	0,88 ± 0,03
Tag 4 (08:00 - 20:00)	0,25 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,38 ± 0,04	0,56 ± 0,02	0,46 ± 0,00
Tag 4 (20:00 - 08:00)	0,15 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,94 ± 0,05	0,21 ± 0,00
Tag 4 (Spoturin)	0,29 ± 0,00	1,22 ± 0,01	1,73 ± 0,02	1,19 ± 0,09	0,19 ± 0,00
Tag 5 (08:00 - 20:00)	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,00	0,42 ± 0,01	0,71 ± 0,04	0,91 ± 0,02
Tag 5 (20:00 - 08:00)	0,28 ± 0,01	0,52 ± 0,01	1,12 ± 0,06	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,00
Tag 5 (Spoturin)	0,78 ± 0,00	0,37 ± 0,00	1,61 ± 0,03	1,39 ± 0,12	0,32 ± 0,02
Tag 6 (08:00 - 20:00)	0,24 ± 0,02	0,36 ± 0,01	1,98 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,75 ± 0,02
Tag 6 (20:00 - 08:00)	0,23 ± 0,02	0,38 ± 0,00	0,51 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,88 ± 0,03
Tag 6 (Spoturin)	0,22 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,00	1,81 ± 0,01	2,00 ± 0,01
Tag 7 (08:00 - 20:00)	0,19 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,20 ± 0,01	2,19 ± 0,09
Tag 7 (20:00 - 08:00)	0,19 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,84 ± 0,00	0,28 ± 0,03	0,40 ± 0,00
Tag 7 (Spoturin)	0,27 ± 0,01	0,62 ± 0,01	2,39 ± 0,01	2,23 ± 0,13	0,57 ± 0,00
Tag 8 (08:00 - 20:00)	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,36 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Tag 8 (20:00 - 08:00)	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,69 ± 0,02
Tag 8 (Spoturin)	0,19 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,74 ± 0,02
Tag 9 (08:00 - 20:00)	0,23 ± 0,02	0,33 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,33 ± 0,00
Tag 9 (20:00 - 08:00)	0,21 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,76 ± 0,10	0,22 ± 0,00	0,5 ± 0,01
Tag 9 (Spoturin)	0,31 ± 0,02	1,43 ± 0,04	2,26 ± 0,01	0,97 ± 0,00	0,99 ± 0,07
Tag 10 (08:00 - 20:00)	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,74 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,34 ± 0,00
Tag 10 (20:00 - 08:00)	0,20 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Tag 10 (Spoturin)	0,31 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,73 ± 0,00	0,78 ± 0,00

Genehmigungen

Abbildung 2 wiedergegeben (modifiziert) mit Genehmigung aus „DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft (2001). Biological Monitoring: Heutige und Künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH. ISBN: 3527621210“. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Abbildung 6 abgedruckt (modifiziert) mit Genehmigung aus „Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A. und Rizzi, G. P. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(16), 4782-4787“. Copyright (2003) American Chemical Society.

Abbildung 8 abgedruckt (modifiziert) aus „Yaylayan, V. A., Locas, C. P., Wnorowski, A. und O'Brien, J. (2005). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. Advances in Experimental Medicine and Biology. Chemistry and safety of acrylamide in food. 561, 191-203“ mit Genehmigung von Springer.

Abbildung 9 abgedruckt (modifiziert) mit Genehmigung aus „Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. und Shibamoto, T. (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(14), 3999-4003“. Copyright (2003) American Chemical Society.

Abbildung 10 abgedruckt (modifiziert) aus „Gertz, C. und Klostermann, S. (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. European Journal of Lipid Science and Technology. 104(11), 762-771“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons.

Abbildung 11 abgedruckt (modifiziert) aus „EFSA European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (2015a). Scientific opinion on acrylamide in food. EFSA Journal. 13(6):4104 [321 pp.]“ (Copyright: European Food Safety Authority, 2015) mit Genehmigung von John Wiley and Sons und Dr. Lauren Jackson.

Abbildung 12 abgedruckt (modifiziert) aus „Matthäus, (2002). Präsentationen: Acrylamidgehalte von im Backofen zubereiteten Pommes Frites und von Reibekuchen. BAGKF, Bundesanstalt für Getreide-Kartoffel und Fettforschung. Verfügbar auf www.bfr.bund.de“ mit Genehmigung von Herrn Bertrand Matthäus.

Abbildung 13 abgedruckt (modifiziert) mit Genehmigung aus „EFSA European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (2015a). Scientific opinion on acrylamide in food. EFSA Journal. 13(6):4104 [321 pp.]“. (Copyright: European Food Safety Authority, 2015).

Abbildung 14 wiedergegeben (modifiziert) aus „Duda-Chodak, A., Tarko, T., Sroka, P. und Satora, P. (2016). A review of the interactions between acrylamide, microorganisms and food components. Food & Function. 7(3), 1282-1295“ mit Genehmigung von The Royal Society of Chemistry.

Abbildung 16 abgedruckt (modifiziert) aus „Limberg, C., (2006). The SOHIO Process as an Inspiration for Molecular Organometallic Chemistry. Organometallic Oxidation Catalysis. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 79-95. ISBN: 9783540372097“ mit Genehmigung von Springer.

Abbildung 17 abgedruckt (modifiziert) mit Genehmigung aus „Umano, K. und Shibamoto, T. (1987). Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35(6), 909-912“. Copyright (1987) American Chemical Society.

Abbildung 18 Teil A abgedruckt (modifiziert) aus „Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. Molecular Nutrition & Food Research. 52(1), 7-25“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons und basierend auf „Esterbauer, H., Schaur, R. J. und Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine. 11(1), 81-128“ mit Genehmigung von Elsevier.

Abbildung 18 Teil B abgedruckt (modifiziert) aus „Ewert, A., Granvogl, M. und Schieberle, P. (2014). Isotope-Labeling Studies on the Formation Pathway of Acrolein during Heat Processing of Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62(33), 8524-8529. Copyright (2014) American Chemical Society“ mit Genehmigung von American Chemical Society und basierend auf „Esterbauer, H., Schaur, R. J. und Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine. 11(1), 81-128“ mit Genehmigung von Elsevier.

Abbildung 19 abgedruckt (modifiziert) aus „Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. Molecular Nutrition & Food Research. 52(1), 7-25“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons.

Abbildung 20 abgedruckt (modifiziert) aus „Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. Molecular Nutrition & Food Research. 52(1), 7-25“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons.

Abbildung 21 neu veröffentlicht (modifiziert) aus „Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F. und Heinecke, J. W. (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. Journal of Clinical Investigation. 99(3), 424-432“ mit Genehmigung von American Society for Clinical Investigation; Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

Abbildung 22 abgedruckt (modifiziert) aus „Lee, Y. und Sayre, L. M. (1998). Reaffirmation that metabolism of polyamines by bovine plasma amine oxidase occurs strictly at the primary amino termini. Journal of Biological Chemistry. 273(31), 19490-19494“ mit Genehmigung von American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Abbildung 23 abgedruckt (modifiziert) aus „Engels, C., Schwab, C., Zhang, J., Stevens, M. J., Bieri, C., Ebert, M.-O., McNeill, K., Sturla, S. J. und Lacroix, C. (2016). Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific reports*. 6“ genehmigt durch Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Abbildung 24 abgedruckt (modifiziert) aus „Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(1), 7-25“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons.

Abbildung 25 abgedruckt (modifiziert) aus „Stevens, J. F. und Maier, C. S. (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(1), 7-25“ mit Genehmigung von John Wiley and Sons und aus „Horvath, J. J., Witmer, C. M. und Witz, G. (1992). Nephrotoxicity of the 1:1 acrolein-glutathione adduct in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 117(2), 200-207“ mit Genehmigung von Elsevier.

Kapitel 4.1, 7.1 und 7.2 enthalten Inhalte aus „Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2016). Monitoring urinary mercapturic acids as biomarkers of human dietary exposure to acrylamide in combination with acrylamide uptake assessment based on duplicate diets. *Archives of Toxicology*. 90(4), 873-881“. Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung von Springer Nature: *Archives of Toxicology*, Monitoring urinary mercapturic acids as biomarkers of human dietary exposure to acrylamide in combination with acrylamide uptake assessment based on duplicate diets, Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G. und Richling, E., Copyright 2016.

Kapitel 7.2 enthält Inhalte aus „Goempel, K., Tedsen, L., Ruenz, M., Bakuradze, T., Schipp, D., Galan, J., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2017). Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background. *Archives of Toxicology*. DOI: 10.1007/s00204-017-1990-1.“ genehmigt durch Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Lebenslauf

Meike Rünz

Akademische Ausbildung

- April 2013 - Februar 2017 **Promotion**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
- April 2008 - März 2013 **Studium der Lebensmittelchemie (Diplom / 1. Staatsexamen)**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
- Oktober 2012 - März 2013 **Wissenschaftliche Abschlussarbeit**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
„Modellstudien zur Bindung von Anthocyanabbauprodukten an humanes Serumalbumin“
- Januar 2012 - April 2012 **Forschungsarbeit**
Universität von Barcelona, Spanien
Fachbereich Pharmazie und Lebenswissenschaften
Fachrichtung Ernährung und Bromatologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Cristina Andrés-Lacueva
„Distribution of resveratrol and its metabolites in adipose tissue of rats fed with doses of resveratrol and conjugated linoleic acid“

Schulische Ausbildung

- August 2001 - März 2008 **Allgemeine Hochschulreife**
Werner-Heisenberg-Gymnasium, Neuwied

Weiterbildungen

- seit Juni 2014 **Weiterbildung „Fachtoxikologe/in GT“**
Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)

Mitgliedschaft

- seit Juli 2013 Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh)

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

Goempel, K., Tedsen, L., Ruenz, M., Bakuradze, T., Schipp, D., Galan, J., Eisenbrand, G. und Richling, E. (2017). Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background. *Archives of Toxicology*. DOI: 10.1007/s00204-017-1990-1

Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Richling, E. (2016) Monitoring urinary mercapturic acids as biomarkers of human dietary exposure to acrylamide in combination with acrylamide uptake assessment based on duplicate diets. *Archives of Toxicology*. 90(4), 873-881.

Vorträge

Richling, E., Friedland, C., Gömpel, K., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Ruenz, M. Duplikatstudien zur Erfassung der alimentären Acrylamid-Aufnahme und Mercaptursäure-Ausscheidung. 45. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*. (Freising, 2016)

Richling, E., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Ruenz, M. Studies to establish biomarkers of alimentary acrylamide exposure. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT)* (Berlin, 2016)

Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Richling, E. Alimentäre Acrylamid-Aufnahme und Mercaptursäure-Ausscheidung: Vorstellung einer neuntägigen Duplikatstudie. *Regionalverbandstagung Südwest der Gesellschaft Deutscher Chemiker* (Freiburg, 2016)

Eisenbrand, G., Ruenz, M., Bakuradze, T., Richling, E. Exploring biomarkers for the risk assessment of food constituents. *Symposium der Ständige Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM)* (Bonn, 2015)

Poster

Gömpel, K., Ruenz, M., Friedland C., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Lampen, A., Abraham K., Richling, E. Alimentäre Acrylamidaufnahme und renale Mercaptursäure-Ausscheidung - ein Vergleich zwischen Veganern und Gemischtköstlern. 45. *Deutscher Lebensmittelchemikertag* (Freising, 2016)

Friedland, C., Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Richling, E. Duplikatstudie zur Evaluierung der Acrylamidaufnahme und -ausscheidung von Gemischtköstlern und Veganern. *Regionalverbandstagung Südwest der Gesellschaft Deutscher Chemiker* (Freiburg, 2016)

Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Richling, E. Validierung von Acrylamid-Expositionsbiomarkern. 44. *Deutscher Lebensmittelchemikertag* (Karlsruhe, 2015)

Ruenz, M., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Richling, E. Acrylamide - a duplicate diet study. 51. *Congress of The European Societies of Toxicology* (Porto, 2015)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle *Frau Prof. Dr. Elke Richling* für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Bedanken möchte ich mich insbesondere für die fortwährende Unterstützung und die hilfreichen Anregungen, die Gelegenheit an verschiedenen Tagungen und Weiterbildungen teilzunehmen sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls möchte ich mich bei *Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk* für die Übernahme der Zweitkorrektur und bei *Herrn Prof. Dr. Helmut Sitzmann* für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Mein Dank gilt außerdem *Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand* für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. Michael Granvogl danke ich für die Möglichkeit die GC-MS-Messungen an der Technischen Universität München durchführen zu dürfen sowie für die damit verbundene Unterstützung. Für die Anleitung im Labor bedanke ich mich insbesondere bei Jörg Stein.

Dem *Institute for Scientific Information on Coffee (ISIC)* und dem *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)* danke ich für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung der Humanstudien.

Weiterhin danke ich allen Diplomanden, Forschungspraktikanten und Hiwis, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich außerdem bei allen meinen ehemaligen Kollegen und Kolleginnen. *Dr. Denise Scherbel, Dr. Teresa Röhrig, Katharina Gömpel* und *Simone Stegmüller* danke ich für die Einarbeitung bzw. erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich HPLC-MS/MS-Analytik. Für die Unterstützung im Labor möchte ich mich bei *Sylvia Schmidt, Rabea Müller* und *Aribert Vetter* bedanken. Ebenfalls danke ich dem Team der Chemikalien-Ausgabe *Ludvik Napast, Jürgen Rahm* und *Frank Schröer*. Für die gute Zusammenarbeit danke ich außerdem *Dr. Tamara Bakuradze, Christine Fuchs, Kirsten Berger, Jonathan Kremer, Dr. Dolores Müller, Stephanie Pickard* und *Dr. Kerstin Berg. Ingrid Hemm* danke ich für die administrative sowie persönliche Unterstützung.

Für die Durchsicht dieser Arbeit, die hilfreichen Anregungen und die persönliche Unterstützung bedanke ich mich bei *Katharina Gömpel, Simone Stegmüller, Dr. Teresa Röhrig* und *Rosita Eiden* sowie besonders bei *Veronika Rink, Kathrin Jung* und *Mark Heck*.

Meiner *Mama* danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist und mich auf meinem Lebensweg unterstützt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Meike Rünz, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bestandteile dieser Arbeit wurden vor der Erstellung dieser Dissertation bereits auf Tagungen und in Printmedien veröffentlicht (siehe Publikationsliste).

Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 07. Oktober 1999 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den

(Meike Rünz)