

Exogene und endogene Einflussfaktoren auf die Bildung von Acrylamid-Expositionsbiomarkern

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

D 386



vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Katharina Goerke

geboren in Fulda

Betreuerin: Prof. Dr. Elke Richling

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12. Januar 2022

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 2015 bis Oktober 2018 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Richling durchgeführt.

Prüfungskommission

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Helmut Sitzmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

DANKE

An dieser Stelle möchte ich allen ein großes Dankeschön aussprechen, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit fachlich und persönlich unterstützt haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Überlassung und Betreuung des interessanten Themas.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Übernahme der Zweitkorrektur und Herrn Prof. Dr. Helmut Sitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eisenbrand für die hilfreichen Diskussionen und die fachliche Unterstützung.

Weiterhin bedanken möchte ich beim BfR und ISIC für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und der Humanstudien.

Liebe Tamara, Teresa, Simone und Meike – Vielen, vielen Dank für eure Freundschaft, die gute Zusammenarbeit und die schönen Momente! Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Ingrid, danke für deine Unterstützung bei allen administrativen Aufgaben und dein offenes Ohr.

Danke dir, Laura, für unsere langjährige Freundschaft – angefangen bei den OC-Unterlagen über die unzähligen SPEs und alles darüber hinaus.

Danke, Rabea, für deine tatkräftige Unterstützung im Labor und die schönen Mittagspausen! Vielen Dank an alle Forschungspraktikanten und Diplomanden für euer Mitwirken im Labor.

Eva, Melanie, Ruth, Lukas – danke euch für die lustigen Pausen im Kaffeezimmer.

Ich danke allen Probanden, Ärzten und Kollegen für das Gelingen der aufwändigen Humanstudien. Danke an das Team vom Finsterbrunnertal für das Beherbergen und Verköstigen der Probanden und aller Helfer und die gute Laune morgens um 7 Uhr.

Danke Horst mit Begleitung, dass ihr stoisch alles getrunken habt, was ich euch verfüttert habe und ihr trotzdem nur selten Urlaub von mir gebraucht habt.

Rudi und Simone: Danke für euer finales Review und den letzten Schliff meiner Arbeit.

Liebes Schwesterherz, einer muss den Job ja machen – Danke, du machst ihn (meistens) ziemlich gut!

Jonas, danke dass du immer an mich glaubst und für mich da bist! Wir sind ein tolles Team! Mit dir kann ich einfach alles schaffen.

Zum Schluss bedanke ich mich Mutti und Paps, Mutti II und Paps II für eure Unterstützung und Förderung. Danke, dass ihr auch heute noch, immer eine gute Antwort auf alles habt.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abstract.....	VII
Kurzzusammenfassung	VIII
1. Einleitung	1
2. Stand der Wissenschaft.....	2
2.1. Acrylamid	2
2.1.1. Bildung von Acrylamid	2
2.1.1.1. Exogene Bildungswege	2
2.1.1.2. Endogene Bildung	4
2.1.2. Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln.....	5
2.1.3. Toxikokinetik.....	9
2.1.3.1. Resorption und Verteilung	9
2.1.3.2. Metabolismus.....	10
2.1.3.3. Elimination	14
2.1.4. Toxikologie von Acrylamid	17
2.1.5. Externe Exposition von Acrylamid	20
2.2. Biomarker	22
2.2.1. Biomarker einer Acrylamid-Exposition	22
2.2.1.1. Mercaptursäuren als Kurzzeit-Expositionsbiomarker	23
2.2.1.2. Hämoglobin-Addukte als Langzeit-Expositionsbiomarker	27
2.2.2. Biomarker einer Tabakrauch-Exposition	31
2.2.2.1. Cotinin als Expositionsbiomarker von Nikotin.....	31
2.2.2.2. CYMA als Expositionsbiomarker von Acrylnitril	33
3. Problemstellung.....	35
4. Durchführung der Humanstudie I.....	37
4.1. Rechtliche Genehmigung und Finanzierung	37
4.2. Studienort	37
4.3. Studiendesign.....	37
4.4. Ernährungsplan und Kalorienaufnahme	39
4.5. Auswahl und Rekrutierung der Probanden	41
4.6. Medizinische Voruntersuchung.....	42
4.7. Probanden-Informationen und Randomisierung.....	42
4.8. Aktivitäten der Probanden während des Studienzeitraumes	43
5. Durchführung der Humanstudie II.....	44

5.1. Rechtliche Genehmigung und Finanzierung	44
5.2. Studiendesign	45
5.3. Ernährung der Probanden.....	45
5.4. Retrospektive Aktivitäten der Probanden während des Studienzeitraumes.....	45
5.5. Auswahl und Rekrutierung der Probanden	46
5.6. Medizinische Voruntersuchung.....	46
5.7. Probanden-Informationen	46
6. Ergebnisse und Diskussion	48
6.1. Entwicklung und Validierung von analytischen Quantifizierungsmethoden.....	48
6.1.1. Quantifizierung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren in Urin.....	48
6.1.2. Quantifizierung der Tabakrauch-Biomarker Cotinin und CYMA in Urin.....	51
6.1.3. Quantifizierung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids	54
6.1.4. Quantifizierung von Acrylamid aus Modell-Reaktionen	56
6.2. Humanstudie I	58
6.2.1. Körpergewichtsentwicklung der Probanden während der Studie	58
6.2.2. Acrylamid-Gehalte der Studienlebensmittel.....	59
6.2.3. Acrylamid-Aufnahme während des Studienzeitraumes	64
6.2.4. Renale Bezugsgrößen.....	65
6.2.5. Ausscheidung der Mercaptursäuren.....	66
6.2.6. Level der Hämoglobin-Addukte	79
6.3. Modell-Reaktionen zur endogenen Bildung von Acrylamid.....	82
6.4. Humanstudie II	85
6.4.1. Acrylamid-Gehalte der verzehrten Lebensmittel.....	85
6.4.2. Acrylamid-Aufnahme der Probanden	87
6.4.3. Renale Bezugsgrößen.....	91
6.4.4. Ausscheidung der Acrylamid-Mercaptursäuren	91
6.4.5. Ausscheidung der Tabakrauch-Biomarker Cotinin und CYMA.....	95
6.4.6. Vergleich der Acrylamid-Aufnahme mit der Biomarker-Ausscheidung.....	98
6.4.6.1. Gemischtköstler	98
6.4.6.2. Veganer.....	112
6.4.7. Vergleich der Biomarker-Ausscheidung von Gesamt- zu Spoturin.....	128
6.5. Stärken und Limitierungen der Duplikatstudien.....	131
7. Zusammenfassung und Fazit.....	134
8. Geräte, Chemikalien und Materialien	139
8.1. Geräte	139
8.2. Chemikalien.....	140
8.3. Verbrauchsmaterialien.....	142
9. Methoden.....	143
9.1. Bestimmung der (gesamt-) reduzierenden Zucker	143

9.2. Ermitteln von substanz- und gerätespezifischen MS-Parametern	143
9.3. Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln	145
9.4. Bestimmung des Uringewichts und -volumina	146
9.5. Bestimmung von Kreatinin im Urin	146
9.6. Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren	147
9.6.1. Etablierung und Validierung der UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren	147
9.6.2. Methode zur Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren in Urin ..	151
9.7. Bestimmung von Cotinin und CYMA	153
9.7.1. Entwicklung und Validierung einer UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Cotinin und CYMA	153
9.7.2. Methode zur Bestimmung von Cotinin und CYMA in Urin	157
9.8. Bestimmung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids	158
9.8.1. Optimierung der SPE-UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Hämoglobin- Addukten	158
9.8.2. Methode zur Bestimmung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids	162
9.9. Modell-Reaktionen zur Bildung von Acrylamid	164
9.9.1. Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Acrylamid in Modell- Ansätzen	164
9.9.2. Ansatz der Modell-Reaktionen	166
9.9.3. Methode zur Bestimmung von Acrylamid in Modell-Lösungen	166
9.10. Induktive und deskriptive Statistik	167
Literaturverzeichnis	169
Tabellenverzeichnis	179
Abbildungsverzeichnis	184
Anhang	189
Lebenslauf	293
Publikationen	294
Persönliche Erklärung	295

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
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
AAVal	<i>N</i> -(2-carbamoylethyl)-valin
AAValPFPTH	1-(2-carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin
AUC	engl. <i>area under curve</i> , Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve
BE	Blutentnahme
BMDL ₁₀	engl. <i>benchmark dose lower confidence limit 10</i>
BMI	engl. <i>body mass index</i>
bw	engl. <i>body weight</i> , Körpergewicht
CAD	engl. <i>collisionally activated dissociation gas</i>
CAS	engl. <i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	engl. <i>collision energy</i>
CEMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein
CRP	C-reaktives Protein
CUR	engl. <i>curtain gas</i>
CXP	engl. <i>collision cell exit potential</i>
CYMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)-L-cystein
CYP	Cytochrom P
DHPA	2,3-Dihydroxypropionamid
DHPS	2,3-Dihydroxypropansäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	engl. <i>declustering potential</i>
ECHA	engl. <i>European Chemicals Agency</i> , Europäische Chemikalienagentur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	engl. <i>European Food Safety Authority</i> , Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ESI	Elektrospray-Ionisation
EP	engl. <i>entrance potential</i>
EPI	engl. <i>Enhanced product ion</i>
FFQ	Fragebogen zum Lebensmittelkonsum, engl. <i>food frequency questionnaire</i>
GA	Glycidamid
GAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein
GAVal	<i>N</i> -(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin

GAVaIPFPTH	1-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin
GC	Gaschromatographie
GK	Gemischtköstler
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
HPMA	N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein
Hb	Hämoglobin
IARC	engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>
iso-GAMA	N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein
i. v.	intravenös
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
KG	Körpergewicht
LB	engl. <i>lower bound</i> , untere Grenze
LD	Letale Dosis
LOAEL	engl. <i>lowest observed adverse effect level</i>
LOD	engl. <i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LOQ	engl. <i>limit of quantification</i> , Bestimmungsgrenze
MB	engl. <i>middle bound</i> , mittlere Grenze
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NOAEL	engl. <i>no observed adverse effect level</i>
NTP	engl. <i>National Toxicology Program</i>
N^3 -GA-Ade	N^3 -(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin
N^7 -GA-Gua	N^7 -(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin
NOEL	engl. <i>no observed effect level</i>
P95	95. Perzentil
p. A.	lat. <i>pro analysi</i> , analysenrein
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFITC	Pentafluorphenylisothiocyanat
Q	Quadrupol
REACH	engl. <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>

ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SIM	engl. <i>selected ion monitoring</i>
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalytik
sMRM	engl. <i>scheduled multiple reaction monitoring</i>
SPE	engl. <i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
SVHC	engl. <i>substances of very high concern</i>
UB	engl. <i>upper bound</i> , obere Grenze
ucr	engl. <i>urinary creatinine</i> , renal ausgeschiedenes Kreatinin
(U)HPLC	engl. <i>(ultra) high performance liquid chromatography</i> , (Ultra-) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
V	Veganer
Val	Valin
z. A.	zur Analyse, analysenrein

ABSTRACT

Acrylamide is a α,β -unsaturated carbonyl compound formed during the Maillard reaction by heating of food from certain amino acids like asparagine and reducing sugars. As for this process-related food contaminant several toxicological effects like neurotoxicity and genotoxicity are described and the mean human dietary exposure has been estimated to range from 0.4–1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d within European citizens, acrylamide is of relevance for risk assessment of food. Acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide are both degraded to the mercapturic acids *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cysteine (AAMA) and *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cysteine (GAMA), respectively, which are used as urinary biomarker to assess the internal exposure to acrylamide. Previous findings in humans and rats suggest a potential endogenous formation of acrylamide equivalent to an exposure of 0.2–0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw which may add a remarkable amount to the biomarker excretion caused by different exogenous acrylamide sources like food, environmental tobacco smoke or workplace exposure. To further assess these different factors influencing the biomarker of exposure, two human (intervention) were performed.

Within a duplicate diet study under strictly controlled conditions, toxicokinetics of the short-term urinary AAMA and GAMA as well as long term hemoglobin adducts were investigated in six volunteers after acrylamide intake via coffee consumption (0.15–0.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d) and heat-treated foods (14.1–15.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d). Whereas coffee consumption only resulted in a slightly enhanced urinary mercapturic acid response, excretion kinetics were monitored after intake of heat-treated foods. Six further volunteers were on acrylamide minimized diet throughout the whole study period not exceeding an acrylamide intake of 0.05–0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d. In addition, these volunteers received a bolus of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -acrylamide once. At the end of the 13-day washout period, an urinary AAMA baseline level equivalent to a background exposure of 0.3–0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d was observed whereas excretion of $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -acrylamide as $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA was practically completed within 72–96 h which provides compelling support for the hypothesis of a sustained endogenous acrylamide formation *in vivo*. These findings were further substantiated by model reactions showing that acrylamide can be formed at physiological conditions.

A second study focused on the influence of nutritional and lifestyle preferences on human acrylamide exposure. Consumed foods and urinary biomarker excretion indicative for acrylamide respective tobacco smoke exposure were monitored in omnivores and vegans. Overall mean acrylamide intake was 0.32 ± 0.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d with marked inter-day and inter-volunteer variabilities. Vegans ingested more acrylamide (0.38 ± 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d) than omnivores (0.26 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/d). Excretion kinetics of urinary AAMA and GAMA were essentially concordant with the respective dietary intake or enhanced levels could be traced back to environmental tobacco smoke exposure.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Acrylamid ist eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, die beim Erhitzen von Lebensmitteln durch die Maillard-Reaktion aus Aminosäuren wie Asparagin und reduzierenden Zuckern gebildet wird. Da für diese prozessbedingte Lebensmittelkontaminante neuro- und gentoxische Effekte beschrieben sind und die mittlere alimentäre Exposition in Europa auf 0,4–1,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ geschätzt wurde, ist Acrylamid von Bedeutung für die Risikobewertung von Lebensmitteln.

Acrylamid und sein gentoxischer Metabolit Glycidamid werden zu den Mercaptursäuren N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein (AAMA) bzw. N-Acetyl-S-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein (GAMA) metabolisiert, die als renale Biomarker zur Abschätzung der internen Exposition Verwendung finden. Frühere Befunde deuteten bereits auf eine potentielle endogene Bildung hin, die einer Acrylamid-Exposition von 0,2–0,7 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ entsprach und somit nennenswert zur Biomarker-Ausscheidung beitragen kann, die exogen durch Acrylamid-Aufnahme durch Lebensmittel, Tabakrauch oder Exposition am Arbeitsplatz beeinflusst werden kann. Um diese verschiedenen Einflussfaktoren weiter zu untersuchen, wurden zwei Humanstudien durchgeführt. Im Rahmen einer Duplikat-Studie unter streng kontrollierten Bedingungen wurde die Toxikokinetik der Mercaptursäuren und Hämoglobin-Addukte nach Acrylamid-Aufnahme durch den Verzehr von Kaffee (0,15–0,17 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) bzw. hitzebehandelten Lebensmitteln (14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) in sechs Probanden untersucht. Während der Kaffeekonsum nur zu einer leicht erhöhten Mercaptursäure-Antwort führte, konnte die renale Ausscheidungskinetik nach Aufnahme von 14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ Acrylamid erfasst werden. Weitere sechs Probanden erhielten eine Acrylamid-minimierte Diät, die eine Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ nicht überschritt (*Washout*), und zusätzlich einen einmaligen Bolus von 1 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid. Am Ende des 13-tägigen *Washout* wurde ein AAMA-Level erfasst, das einer Hintergrundbelastung von 0,3–0,4 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ entsprach, während die Ausscheidung von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid als $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA innerhalb von 72–96 h praktisch abgeschlossen war, welches die Hypothese einer anhaltenden endogenen Acrylamid-Bildung *in vivo* unterstützt. Dies wurde durch Modell-Reaktionen untermauert, die eine Acrylamid-Bildung unter physiologischen Bedingungen zeigten. Eine zweite Duplikat-Studie mit Gemischtköstlern und Veganern befasste sich mit dem Einfluss der Ernährung und Lebensstils auf die Acrylamid-Exposition und Ausscheidung von AAMA, GAMA sowie Tabakrauch-Expositionsbiomarkern. Die mittlere Acrylamid-Aufnahme betrug $0,32 \pm 0,19$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$, es zeigten sich jedoch deutliche Variabilitäten zwischen den Tagen und den Probanden. So nahmen Veganer mehr Acrylamid auf ($0,38 \pm 0,23$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) als Gemischtköstler ($0,26 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$). Die Ausscheidungskinetik von AAMA und GAMA im Urin stimmte im Wesentlichen mit der jeweiligen alimentären Acrylamid-Aufnahme überein. Erhöhte Werte konnten auf eine umwelt-bezogene Belastung mit Tabakrauch zurückgeführt werden.

1. EINLEITUNG

Im Jahre 2002 wurde die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung Acrylamid, welche zuvor vor Allem als Industriechemikalie bekannt war, erstmals in erhitzten Lebensmitteln nachgewiesen [Tareke *et al.*, 2002]. Es zeigte sich, dass Acrylamid im Rahmen der Maillard-Reaktion aus Aminosäuren wie Asparagin und reduzierenden Zuckern gebildet werden kann [Mottram *et al.*, 2002], sodass insbesondere hochoverhitzte Kartoffelprodukte, Getreideprodukte, aber auch Kaffee zu den Lebensmittelgruppen mit hohen Gehalten der Kontaminante zählen [EFSA, 2015]. Zudem findet sich Acrylamid pyrolysebedingt im Hauptstrom von Zigaretten [Smith *et al.*, 2000], welches ebenso zu einer Exposition mit Acrylamid beiträgt.

Bedingt durch die beschriebenen toxikologischen Effekte wie Neurotoxizität und Reproduktionstoxizität und die Einstufung der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als „möglichweise krebserzeugend beim Menschen“ (Gruppe 2A), ist eine Risikobewertung notwendig, welche die toxischen Effekte in Relation zur humanen Exposition setzt [NTP, 2012; IARC, 1994; EFSA, 2015].

Die Abschätzung der Exposition kann durch direktes Monitoring bekannter Expositionsquellen wie Lebensmitteln erfolgen. Auf Basis von Acrylamid-Gehalten unterschiedlicher Lebensmittel und deren bekannten Verzehrmenen wurde von der *European Food Safety Authority* (EFSA) die durchschnittliche Acrylamid-Aufnahme europäischer Erwachsener auf 0,4–1,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht (KG) ermittelt [EFSA, 2015]. Um genauere Hinweise auf Variabilitäten der Acrylamid-Gehalte durch die Art der Zubereitung durch Privatpersonen zu erhalten, wurde von der EFSA die Durchführung von Duplikat-Studien empfohlen [EFSA, 2015].

Neben dem Lebensmittelmonitoring können auch Biomarker zur Erfassung der Exposition herangezogen werden. Für Acrylamid haben sich neben den Hämoglobin-Addukten zur Erfassung einer Langzeit-Exposition [Fennell *et al.*, 2005] auch die renal ausgeschiedenen Mercaptursäuren *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein (AAMA) und *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (GAMA) als Kurzzeit-Expositionsbiomarker etabliert [Wang *et al.*, 2017; Ruenz *et al.*, 2016]. Durch Verwendung der von der EFSA empfohlenen Duplikat-Dosimetrie konnte gezeigt werden, dass 58 % einer bekannten Acrylamid-Dosis als AAMA und 7–10 % als GAMA innerhalb von 72 h renal ausgeschieden wurden. Gleichzeitig ergaben sich jedoch auch Indizien wie überproportionale Biomarker-Level, welche für eine mögliche endogene Acrylamid-Bildung sprachen [Ruenz *et al.*, 2016].

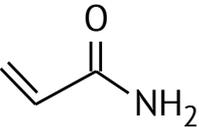
Um die humane Exposition von Acrylamid besser abschätzen zu können, sind detaillierte Erkenntnisse zu möglichen Einflussfaktoren auf die Acrylamid-Aufnahme und Kinetik der Expositionsbiomarker in Relation zu einer bekannten Acrylamid-Aufnahme notwendig.

2. STAND DER WISSENSCHAFT

2.1. Acrylamid

Acrylamid (2-Propenamid) ist ein bei Raumtemperatur farb- und geruchsloser, kristalliner bzw. pulverförmiger organischer Feststoff, welcher mit 2.040 g/l bei 25 °C sehr gut wasserlöslich ist und zur Gruppe der Carbonsäureamide gehört [IFA, 2018; Raters *et al.*, 2019]. Weitere Eigenschaften sowie die Strukturformel sind in Tabelle 2-1 gelistet.

Tabelle 2-1 Eigenschaften von Acrylamid [IFA, 2018].

Strukturformel	Allgemeine Daten und Eigenschaften	
	Summenformel	C ₃ H ₅ NO
	CAS-Nummer	79-06-1
	Molare Masse	71,08 g/mol
	Schmelzpunkt	84–86 °C
	Siedepunkt	125 °C bei 33,3 hPa

Acrylamid reagiert als Michael-Addition mit Elektrophilen wie Thiolen, Aminen oder Hydroxyl-Gruppen. Acrylamid neigt, bedingt durch seine α,β -ungesättigte Carbonylstruktur, zur Polymerisation. Polyacrylamide haben in der Industrie ein breites Anwendungsgebiet wie zum Beispiel als Flockungsmittel zur Trinkwasser-Aufbereitung, als Dichtungsmittel, als Bindemittel in der Papier- und Zellstoffindustrie sowie in der Farbstoffsynthese [FAO/WHO, 2011; Umweltbundesamt, 2008].

2.1.1. Bildung von Acrylamid

Neben der industriellen Synthese durch Hydrierung von Acrylnitril [Yamada und Kobayashi, 1996] kann Acrylamid auch hitzeinduziert vor allem in Lebensmitteln oder bei Verbrennungsprozessen gebildet werden [Tareke *et al.*, 2002]. Darüber hinaus gibt es in der Literatur auch Hinweise auf eine mögliche endogene Bildung [Tareke *et al.*, 2009; Tareke *et al.*, 2008; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016].

2.1.1.1. Exogene Bildungswege

In Lebensmitteln wird Acrylamid insbesondere beim Erhitzen bei Temperaturen >120 °C im Zuge der Maillard-Reaktion aus bestimmten Aminosäuren, v. a. Asparagin, und reaktiven Carbonyl-Verbindungen wie reduzierenden Zuckern gebildet [Mottram *et al.*, 2002]. Weitere Bildungsmechanismen stellen der thermische oder enzymatische Abbau von Aminosäuren sowie die Bildung aus Acrolein dar, welches zuvor aus Triacylglyceriden generiert wurde [Yasuhara *et al.*, 2003].

Hauptbildungsweg aus Asparagin und reaktiven Carbonylen. Im Rahmen der Maillard-Reaktion kann Acrylamid aus Asparagin und reaktiven Carbonylen, z. B. Glucose, ab Temperaturen von 120 °C gebildet werden [Mottram *et al.*, 2002; Zyzak *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2004]. Der postulierte Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

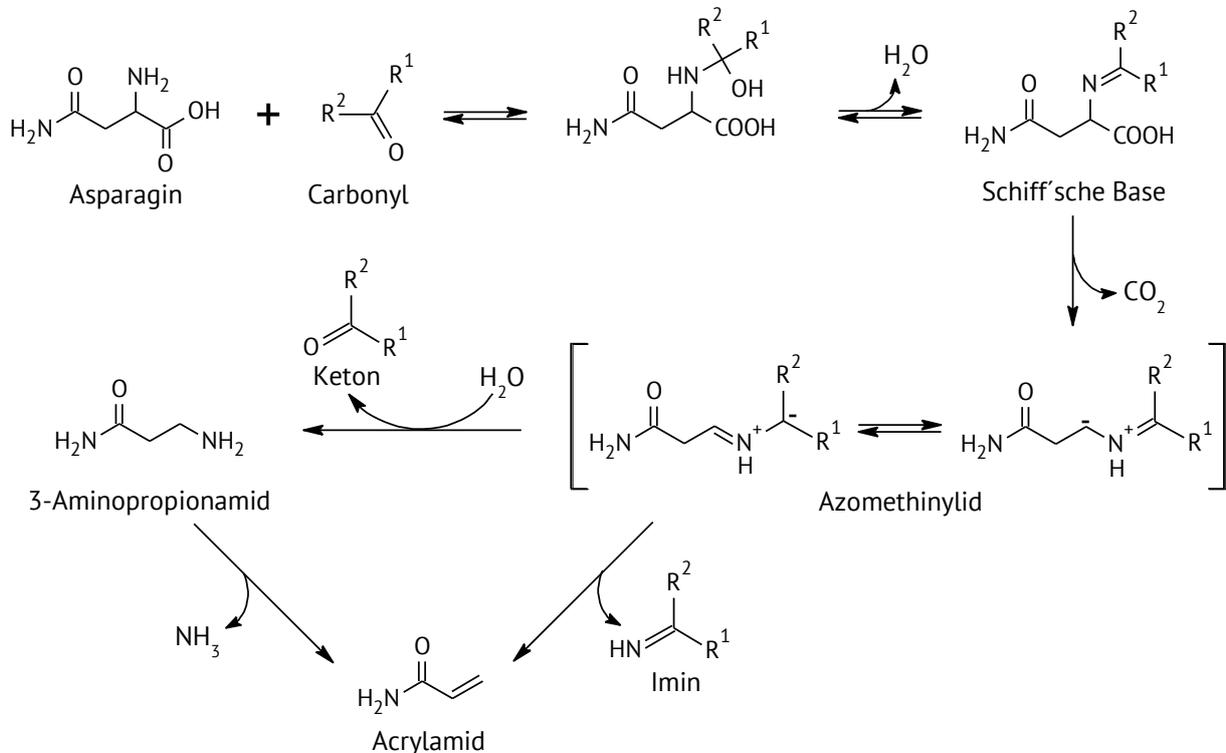


Abbildung 2-1 Hitzeinduzierte Bildung von Acrylamid aus Asparagin und reaktiven Carbonylen [modifiziert nach Zyzak *et al.*, 2003].

Unter hohen thermischen Bedingungen erfolgt eine nukleophile Addition von der freien α -Aminogruppe des Asparagins an eine Carbonyl-Gruppe. Die im Anschluss durch Dehydratisierung gebildete Schiff'sche Base wird durch weitere thermische Einwirkung decarboxyliert. Das so entstandene Azomethinylid kann zum einen durch Abspaltung eines Imins direkt Acrylamid bilden oder zum anderen durch Hydratisierung und Abspaltung eines Ketons zu 3-Aminopropionamid reagieren. Dieses kann durch Desaminierung ebenfalls Acrylamid bilden [Zyzak *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014]. Die Acrylamid-Bildung ist dabei von der Kettenlänge des zugegebenen Carbonyls abhängig. So zeigte Zyzak *et al.* [2003] in einem Kartoffelsnack-Modell mit Asparagin und Kartoffelstärke als inerte Matrix, dass ab einer Temperatur von 200 °C die Bildung von Acrylamid mit steigender Kettenlänge der Carbonylverbindung (D-Glucose < 2-Desoxyglucose < Ribose < Glyceraldehyd < Glyoxal) abnahm. Durch eine begünstigte zyklische Hemiacetal-Bildung der kürzeren Carbonyle sei entsprechend der nucleophile Angriff der Aminogruppe des Asparagins begünstigt.

Nebenbildungswege. Neben Asparagin als Reaktionspartner konnte auch eine geringe hitzeinduzierte Acrylamid-Bildung aus den Aminosäuren Methionin, Cystein und Glutamin mit Glucose nachgewiesen werden. Äquimolare Mischungen dieser Aminosäuren mit Glucose ergaben unter Pyrolyse (180 °C, 60 min) jedoch geringere Mengen Acrylamid als die entsprechende

äquimolare Mischung von Asparagin und Glucose [Stadler *et al.*, 2002]. Darüber hinaus ergab auch das Erhitzen bei 185 °C einer äquimolaren Mischung von Asparaginsäure mit Glucose in Phosphat-Puffer sehr geringe Mengen Acrylamid [Mottram *et al.*, 2002]. Ebenso ergaben Experimente, dass aus Asparagin in Abwesenheit weiterer Reaktionspartner Acrylamid durch thermische Degradation (180 °C, 30 min) mit einer Ausbeute von 0,99 µg/g Asparagin entstehen kann [Yasuhara *et al.*, 2003]. Die analoge Reaktion mit einer äquimolaren Menge Glucose ergab jedoch wesentlich höhere Acrylamid-Mengen (1200 µg/g Asparagin). In Anwesenheit von Ölsäureglycerinester entstanden 88,6 µg Acrylamid/g Asparagin. Als möglicher molekularer Mechanismus der Acrylamid-Bildung aus Triacylglyceriden wurde ein Abbau der Lipide zu Acrolein und anschließend eine Oxidation mit Aminierung von Acrolein oder aber ein radikalischer Mechanismus beschrieben [Yasuhara *et al.*, 2003]. Die Bildung aus Acrolein (siehe Abbildung 2-2) ist durch den hierzu benötigten Ammoniak limitiert, welcher schnell mit anderen Carbonylen oder Maillard-Reaktionsprodukten reagieren kann [Mottram *et al.*, 2002].

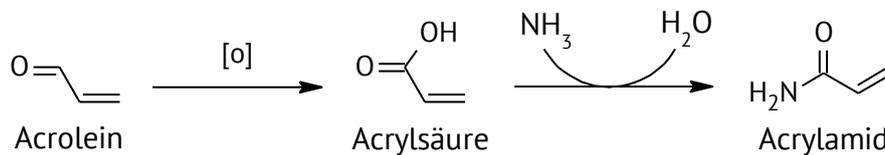


Abbildung 2-2 Postulierter Nebenbildungsweg von Acrylamid durch Oxidation und Aminierung von Acrolein [modifiziert nach Mottram *et al.*, 2002].

2.1.1.2. Endogene Bildung

In der Literatur finden sich bisher erst vereinzelte Hinweise auf eine mögliche endogene Acrylamid-Bildung. Diese beruhen zum einen auf *in-vitro*-Versuchen und zum anderen aus indirekten Hinweisen aus Tier- bzw. Humanstudien [Tareke *et al.*, 2008; Tareke *et al.*, 2009; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016].

Erste *in-vivo*-Hinweise ergaben sich bereits 2008 in einer Studie an männlichen C57BL/6N-Mäusen, welche mit Substanzen behandelt wurden, die in der Lage sind, freie Radikale und oxidativen Stress zu erzeugen [Tareke *et al.*, 2008]. Hierfür wurden Mäuse mit FeSO₄, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bzw. Methamphetamin behandelt und anschließend die N-terminalen Valin-Addukte des Hämoglobins (Hb) von Acrylamid (AAVal) bzw. Glycidamid (GAVal) im Blut quantifiziert. Es zeigte sich ein geringer, jedoch signifikanter Anstieg (p<0,05) der Hb-Addukte 24 h nach Gabe von FeSO₄ bzw. 72 h nach Gabe von MPTP und Methamphetamin. Als mögliche Ursachen wurden neben einem verzögerten Abbau durch Inhibition des Phase-II-Metabolismus eine endogene Bildung von Acrylamid diskutiert. Als potentieller Bildungsmechanismus nannten die Autoren die Reaktion von Acrolein als *Precursor* mit Amino-Gruppen während der Protein-Oxidation [Tareke *et al.*, 2008]. Eine endogene Acrolein-Bildung durch oxidativem Stress wurde bereits zuvor in Form von endogen gebildeten Acrolein-DNA-Addukten der Lipidperoxidation beobachtet [Pan und Chung, 2002]. Zudem führte das Versprühen

von gasförmigem Acrolein über auf 180 °C erhitztes Asparagin zu einer Acrylamid-Bildung [Yasuhara *et al.*, 2003].

Eine Folgestudie von Tareke *et al.* [2009] befasste sich *in vitro* mit möglichen oxidativen Bildungsmechanismen der vorherigen Ergebnisse der Tierstudie. Die Inkubation von Asparagin (6,8 mM) mit H₂O₂ (120 mM) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zeigte unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) eine zeitabhängige Bildung von Acrylamid innerhalb von 72 h. Die Verwendung von Wasser oder eines anderen Puffer-Systems (Tris-Aminomethan-Puffer, Ammoniumacetat-Puffer) sowie die Zugabe von Glucose (4,1 mM) hatten keinen Einfluss auf die Acrylamid-Bildungsrate. Diese war jedoch abhängig von der verwendeten H₂O₂-Konzentration. So bildeten sich quantifizierbare Acrylamid-Mengen innerhalb von 24 h bei einer H₂O₂-Konzentration von 25 mM sowie innerhalb von 120 h bei einem Reaktionsansatz mit 5 mM H₂O₂. Darüber hinaus inhibierte die Zugabe von 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als Chelat-Bildner die Acrylamid-Bildung vollkommen, sodass ein metall-katalysierter Reaktionsmechanismus durch das Vorliegen von Metall-Ionen im Reaktionsansatz wahrscheinlich sei [Tareke *et al.*, 2009].

Weitere *in-vivo*-Hinweise auf eine mögliche endogene Acrylamid-Bildungen ergaben sich in einer Dosis-Wirkungs-Studie an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (n=54). Dort erhielten die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe 14 Tage vor Studienbeginn sowie während der Studie eine Nahrung mit Acrylamid-Gehalten unterhalb der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) von 0,5 µg/kg Futter, welches einer maximalen täglichen Acrylamid-Aufnahme von 0,1 µg/kg Körpergewicht (KG) entsprach. Die Mercaptursäure-Ausscheidung (AAMA + GAMA) lag bei der Kontrollgruppe innerhalb von 16 h bei 0,84±0,12 nmol, welches sich auf eine Acrylamid-Aufnahme von 0,6–0,7 µg/kg KG umrechnen ließ. Die Autoren schlussfolgerten, dass dieses beobachtete Basislevel aus endogen gebildetem Acrylamid resultieren könnte [Watzek *et al.*, 2012a]. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine humane Interventionsstudie mit 14 männlichen Probanden. Ausgehend von einer 3-tägigen *Washout*-Phase, bei der die Probanden täglich maximal 41 ng/kg KG Acrylamid über die Nahrung aufnahmen, betrug die AAMA-Ausscheidung 93±31 nmol/d, welches einer hypothetischen Acrylamid-Exposition von 0,2–0,3 µg/kg KG entsprach [Ruenz *et al.*, 2016].

2.1.2. Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln

Acrylamid wurde erstmals 2002 in hocherhitzten (>120 °C) Lebensmitteln nachgewiesen [Tareke *et al.*, 2002]. Die gebildete Menge von Acrylamid ist dabei neben dem Vorhandensein der in Kapitel 2.1.1.1 beschriebenen Präkursoren von weiteren Parametern wie der Temperatur, der Dauer des Erhitzens [Brathen und Knutsen, 2005] und der Wasseraktivität der Lebensmittelmatrix [Vleeschouwer *et al.*, 2007] abhängig.

Analytisch lässt sich Acrylamid in Lebensmitteln nach chromatographischer Separation mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC) massenspektrometrisch detektieren. Die Quantifizierung kann hierbei im *Selected Ion Monitoring*

(SIM-) Modus oder *Multiple Reaction Monitoring* (MRM-) Modus unter Verwendung einer Stabilisotopenverdünnungsanalytik (SIVA) erfolgen [EFSA, 2015].

Zuletzt wurde im Jahr 2015 von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) eine umfangreiche Übersicht der Acrylamid-Gehalte unterschiedlicher Lebensmittelgruppen, basierend auf verschiedenen Analysen aus EU-Staaten, herausgegeben. Zur Erfassung der Acrylamid-Gehalte, welche der Abschätzung der Exposition der europäischen Bevölkerung dienen, wurden ab dem Jahr 2010 insgesamt 43.419 Analyseergebnisse kommerzieller Produkte aus 24 europäischen Ländern sowie sechs Verbänden der Lebensmittelbranche evaluiert. Die so ermittelten Acrylamid-Gehalte verschiedener Lebensmittelkategorien sind in Tabelle 2-2 gelistet. Die EFSA verwendete zur Abschätzung der Gehalte dabei drei unterschiedliche Ansätze. Im *lower-bound*-Ansatz (LB) wurden alle Messwerte, welche unterhalb des LOD und des LOQ liegen, gleich null gesetzt. Unter Verwendung der mittleren Grenze werden beim *middle-bound*-Ansatz (MB) für Werte <LOD die Hälfte des LOD herangezogen und entsprechend bei Werten, die zwischen LOD und LOQ liegen, der halbe LOQ. Zur Abschätzung der oberen Grenze werden im *upper-bound*-Ansatz (UB) alle Werte <LOD und <LOQ als die respektiven LOD- und LOQ-Werte betrachtet [EFSA, 2015].

Bedingt durch die Präkursoren Asparagin und reduzierende Zucker sowie die notwendigen thermischen Bedingungen zur Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln enthalten vor allem erhitzte Kartoffel- und Getreideprodukte, aber auch Röstkaffee, nennenswerte Mengen Acrylamid. Entsprechend wurden mit im MB-Mittel 389 µg/kg bei einem 95. Perzentil von 932 µg/kg sehr hohe Acrylamid-Gehalte in der Lebensmittelkategorie „Kartoffelchips und -snacks“ ermittelt, wobei Produkte aus frischen Kartoffeln mit 392 µg/kg höhere mittlere Acrylamid-Gehalte als solche aus Kartoffelteig mit 338 µg/kg aufwiesen. Gemüsechips hatten mit einem MB-Mittel von 1.846 µg/kg die höchsten analysierten Acrylamid-Gehalte, wobei jedoch nur eine geringe Anzahl (n=11) beprobt wurde. Andere frittierte Kartoffelprodukte wie Bratkartoffeln, Pommes frites und weitere Kartoffelprodukte, zu denen Rösti oder Kartoffelpuffer zählten, wiesen mit im Mittel 308 µg/kg und einem 95. Perzentil von 971 µg/kg ähnlich hohe Werte auf. Bei der näheren Betrachtung der Pommes frites und Bratkartoffeln wurden die höchsten Acrylamid-Gehalte in frisch oder vorgekocht verkauften Proben mit 367 µg/kg gefunden. Entsprechende frisch oder vorgekocht verkaufte und als verzehrfertig analysierte Produkte hatten mit im MB-Mittel 239 µg/kg deutlich niedrigere Acrylamid-Werte. Die EFSA schloss draus, dass es zu einer Fehlklassifizierung der Lebensmittel-Proben gekommen sein könnte. In der Unterkategorie der anderen frittierten Kartoffelprodukte (Rösti, Kartoffelpuffer etc.) wurden mit im MB-Mittel 606 µg/kg bei einem 95. Perzentil von 1.549 µg/kg höhere Acrylamid-Gehalte als bei Pommes frites und Bratkartoffeln analysiert [EFSA, 2015].

Tabelle 2-2 Acrylamid-Gehalte verschiedener Lebensmittelgruppen [modifiziert nach EFSA, 2015].

Lebensmittelkategorie	n	Ø MB [LB–UB] ¹ [µg/kg]	P95 ² [µg/kg]
Kartoffelchips und -snacks	34.501	389 [388–389]	932
aus frischen Kartoffeln	31.467	392	949
aus Kartoffelteilg	2.795	338	750
Andere frittierte Kartoffelprodukte ³	1.694	308 [303–313]	971
Pommes frites und Bratkartoffeln			
frisch oder vorgekocht, verzehrfertig verkauft	877	308 [302–314]	904
frisch oder vorgekocht verkauft	74	367 [362–372]	1.888
frisch oder vorgekocht verkauft, verzehrfertig	557	239 [236–242]	656
sonstige frittierte Kartoffelprodukte	96	606 [606–607]	1.549
Kaffee (trocken) ⁴	1.457	522 [521–523]	1.054
gerösteter Kaffee (trocken) ⁴	595	249 [248–251]	543
Instant-Kaffee (trocken) ⁴	862	710	1.122
Kaffeersatz (trocken) ⁴	88	1.499	4.500
auf Getreidebasis	20	510 [509–510]	-
auf Chicoréebasis	37	2.942	-
Weißbrot	543	42 [36–49]	156
Weitere Backwaren	2.065	265 [261–269]	1.048
Kräcker	162	231 [229–233]	590
Knäckebrot	528	171 [166–176]	486
Kekse und Waffeln	682	201 [197–206]	810
Lebkuchen	693	407 [403–412]	1.600
Frühstückszerealien	1.230	161 [157–164]	552
auf Basis von Mais, Hafer, Dinkel, Gerste, Reis	210	102 [96–109]	403
auf Basis von Weizen, Roggen	151	170 [169–172]	410
Andere Produkte basierend auf Kartoffeln, Getreide und Kakao	569	97 [92–101]	370
Kuchen und Feingebäck	198	66 [61–71]	219
„Herzhafte“ Snacks ⁵	135	171 [168–173]	690
andere Produkte auf Getreidebasis	143	68 [61–76]	293
Nudeln	9	13 [0–25]	-
Bier	11	14 [0–27]	-
Geröstete Nüsse und Kerne	40	93 [82–103]	-
Schwarze Oliven in Salzlake	3	454	-
Gemüsechips	11	1.846 [1.843–1.848]	-

¹ berechnet mittels MB-, LB- und UB-Ansatzes der EFSA, bei gleichen Werten nur Angabe eines Wertes

² berechnet mittels MB-, LB- und UB-Ansatzes der EFSA, bei gleichen Werten nur Angabe eines Wertes, bei <60 Proben keine Angabe des P95

³ ausgenommen Kartoffelchips und -snacks

⁴ trockene Kaffeeprodukte wie Kaffeepulver, -bohnen oder Instantkaffeegranulat

⁵ nicht auf Kartoffelbasis, meistens auf Maisbasis

Ø Mittelwert; LB untere Grenze; MB mittlere Grenze; n Anzahl der Proben; P95 95. Perzentil; UB obere Grenze

Neben Kartoffelprodukten wurden insbesondere in geröstetem Kaffee (trocken) hohe Acrylamid-Gehalte von im MB-Mittel 522 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bei einem 95. Perzentil von 1.054 $\mu\text{g}/\text{kg}$ analysiert. Diese Werte beziehen sich hierbei auf trockene Kaffeeprodukte wie Kaffeepulver, -bohnen oder Instantkaffeegranulat und nicht auf das verzehrfertige Getränk. Gerösteter Kaffee wies mit 249 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (95. Perzentil 543 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dabei niedrigere Gehalte auf als Instantkaffee mit 710 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (95. Perzentil 1.122 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Unter der Annahme eines Verdünnungsfaktors von 0,035–0,125 für Röstkaffee bzw. von 0,017 für Instantkaffee schlussfolgerte die EFSA [2015] jedoch, dass Kaffee-Getränke, welche aus Röstkaffee hergestellt wurden, höhere Acrylamid-Konzentrationen enthalten könnten als solche, die aus Instantkaffee-Granulat zubereitet werden.

Abgesehen von dem Datensatz der EFSA von 2015 finden sich in der Literatur neben weiteren Ansätzen zur Berechnung von Acrylamid-Gehalten in verzehrfertigen Kaffee-Getränken ausgehend von Kaffeepulver weitere Untersuchungen zu Acrylamid-Gehalten von Röstkaffees als auch zu gebrühtem Kaffee-Getränk. Andrzejewski *et al.* [2004] untersuchten 30 verschiedene Röstkaffees von neun unterschiedlichen Herstellern, deren Acrylamid-Gehalte zwischen 45–374 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lagen. Um aus diesen Proben Rückschlüsse auf die Acrylamid-Gehalte einer Tasse Kaffee (300 ml) ziehen zu können, bestimmten die Autoren einen Konversionsfaktor von 26 ± 3 anhand des Verhältnisses von vier gemessenen Acrylamid-Gehalten des Röstkaffees im Vergleich zu den entsprechenden aufgebrühten Kaffee-Getränken. Entsprechend wurde die quantifizierte Menge Acrylamid der Röstkaffees durch den Faktor dividiert und mit 295 g multipliziert, um die Menge Acrylamid in 300 ml Kaffee-Getränk zu erhalten. Durch dieses Vorgehen sollten Effekte wie eine unterschiedliche Wasserretention durch das Kaffeegranulat oder unvollständige Wasserentleerung des Kaffeefilters in die Kalkulation mit einberechnet werden. Somit ergaben sich Acrylamid-Gehalte von 0,50–4,21 $\mu\text{g}/300 \text{ ml}$ Kaffee-Getränk [Andrzejewski *et al.*, 2004], entsprechend 1,67–14,04 $\mu\text{g}/\text{l}$. Für zwölf Instant-Kaffeepulver-Proben ergaben sich Acrylamid-Gehalte von 169–539 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Darüber hinaus wurden von Andrzejewski *et al.* [2004] elf Kaffee-Getränke aus acht verschiedenen amerikanischen Geschäften untersucht, bei denen die quantifizierten Acrylamid-Gehalte zwischen 6–11 $\mu\text{g}/\text{l}$ lagen.

Eine polnische Studie fand in Röstkaffee-Proben ($n=28$) im Mittel $179 \pm 85 \mu\text{g}/\text{kg}$ Acrylamid bei einem Bereich von 61–397 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In den verzehrfertigen Kaffee-Getränken, welche aus 3,2 g des jeweiligen Röstkaffees mit 160 ml Wasser zubereitet wurden, wurden $0,45 \pm 0,21 \mu\text{g}/160 \text{ ml}$ ($\approx 2,81 \pm 1,31 \mu\text{g}/\text{l}$) Acrylamid quantifiziert. Im Vergleich zum Röstkaffee fanden sich darüber hinaus höhere Acrylamid-Gehalte in Instant-Kaffeepulver ($358 \pm 188 \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=11$) und in Kaffee-Ersatz ($818 \pm 310 \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$), welcher aus geröstetem Getreide oder Chicorée-Wurzel bestand [Mojska und Gielecińska, 2013]. Zudem zeigten die Autoren eine negative Korrelation zwischen den Acrylamid-Gehalten der Röstkaffees mit der Intensität der Röstfarbe, jedoch nicht bei Instant-Kaffeepulver. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kaffee-Sorten *Arabica* und *Robusta* konnte hingegen nicht festgestellt werden [Mojska und Gielecińska, 2013].

In einer Humaninterventionsstudie von Ruenz *et al.* [2016] wurde von den Probanden ein Kaffee-Getränk konsumiert, welches $19 \pm 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ Acrylamid enthielt. Hierbei handelte es sich um ein

Kaffee-Getränk, welches mittels Kaffeepad-Maschine mit jeweils 7,5 g auf 125 ml Wasser hergestellt wurde [Ruenz *et al.*, 2016].

Weitere Acrylamid-haltige Lebensmittelgruppen, welche jedoch im Mittel geringere Acrylamid-Gehalte als die oben beschriebenen Lebensmittel aufweisen, sind Brot- und Backwaren und Produkte auf Getreidebasis wie Frühstückszerealien oder Nudeln [EFSA, 2015].

Während Weißbrot in der Datenanalyse der EFSA [2015] mit im MB-Mittel 42 µg/kg und einem 95. Perzentil von 156 µg/kg nur wenig Acrylamid enthielt, wiesen andere Backwaren mit 265 µg/kg (95. Perzentil 1.048 µg/kg) wesentlich höhere Gehalte auf. Hierbei zeigten vor allem die saisonal erhältlichen Lebkuchen mit im MB-Mittel 407 µg/kg und einem 95. Perzentil von 1.600 µg/kg besonders hohe Acrylamid-Gehalte. Im Vergleich hierzu lagen die analysierten Acrylamid-Gehalte anderer Backwaren wie Kräcker (231 µg/kg), Knäckebrötchen (171 µg/kg) sowie Kekse und Waffeln (201 µg/kg) bei circa der Hälfte. Ähnliche Acrylamid-Gehalte hatten andere Snacks auf Kartoffel- oder Getreidebasis mit im MB-Mittel 171 µg/kg sowie Frühstückszerealien mit 161 µg/kg. Niedrige Acrylamid-Gehalte finden sich hingegen in Kuchen und Feingebäck (66 µg/kg), Nudeln (13 µg/kg) oder Bier (14 µg/kg).

Ausgehend von der Analyse der EFSA im Jahr 2015 wurde, um die Gehalte an Acrylamid in den Endprodukten weiter zu minimieren und folglich ebenso die Exposition der Verbraucher zu senken, am 20. November 2017 die Verordnung (EU) 2017/2158 zur *Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln* erlassen, welche am 11. April 2018 in Kraft getreten ist.

Zuvor existierte bereits nach der Trinkwasser-Verordnung¹ ein Grenzwert von 0,00010 mg/l für Acrylamid in Trinkwasser bezogen auf die Restmonomer-Konzentration im Trinkwasser, welche sich auf Grund der maximalen Freisetzung nach den Spezifikationen des entsprechenden Polymers und der angewandten Polymerdosis berechnet.

2.1.3. Toxikokinetik

Humanrelevante Expositionswege sind insbesondere die orale Aufnahme, durch beispielsweise Lebensmittel, und Inhalation, da Acrylamid während des Verbrennungsprozesses organischer Moleküle entstehen kann. Untersuchungen zur Toxikokinetik von Acrylamid wurden vor allem an Nagetieren durchgeführt, es liegen in der Literatur jedoch auch Daten aus Humanstudien vor.

2.1.3.1. Resorption und Verteilung

Acrylamid kann neben dem oralen Hauptexpositionsweg durch Lebensmittel ebenso dermal oder inhalativ durch z. B. Tabakrauch aufgenommen werden.

Nach oraler Aufnahme wird Acrylamid schnell und in großem Maße resorbiert. So wurde in einer Studie an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (n=4) die maximale Acrylamid-Konzentration (c_{\max})

¹ Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 22. September 2021 (BGBl. I S. 4343) geändert worden ist

im Plasma nach oraler Aufnahme von 2 mg/kg per Schlundsonde bereits nach $t_{\max}=30$ min bei einer oralen Bioverfügbarkeit von $80,5\pm 6,3$ % gemessen [Kim *et al.*, 2015].

In einer Studie von Miller *et al.* [1982] wurde die Verteilung im Organismus von Fischer-344-Ratten mittels oraler Gabe (1, 10 und 100 mg/kg) bzw. i. v. Gabe (10 mg/kg) von radioaktiv-markiertem [2,3- ^{14}C]-Acrylamid untersucht. Nach i. v. Gabe von 10 mg/kg wurden im Vollblut nach 1 h 12 % der Dosis gemessen, während im Plasma zeitgleich nur 3,4 % gefunden wurden. Darüber hinaus blieb die Konzentration im Vollblut über den Versuchszeitraum über 70 h konstant, die Plasma-Konzentration nahm jedoch konstant zweiphasig ab, sodass die Autoren eine Bindung an Erythrozyten schlussfolgerten. Weitere Anteile an radioaktiv-markiertem Acrylamid fanden sich im Muskelgewebe (48 %), der Haut (15 %) und Leber (7 %). Im Nervengewebe wurde weniger als 1 % der Gesamtradioaktivität nachgewiesen. Da sich 6 h nach Dosisgabe 15 % der Radioaktivität in der Gallenflüssigkeit zeigte, folgerten die Autoren einen enterohepatischen Kreislauf von Acrylamid [Miller *et al.*, 1982].

Eine rasche Resorption zeigte sich ebenfalls in männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach oraler Gabe von 50 mg/g [1- ^{14}C]-Acrylamid. Bereits 5 min nach Dosisgabe konnte Radioaktivität im Blut nachgewiesen werden, das Maximum im Plasma wurde nach 38 min erreicht. Die Elimination von Acrylamid aus dem gesamten Blut war hierbei 62-fach länger als lediglich im Plasma. Während 28 h nach Gabe die höchste Radioaktivität im Mageninhalt, gefolgt von Magen, Lunge, Knochenmark und Haut gefunden wurden, fand sich 144 h nach oraler Gabe die höchste Radioaktivität in den Lungen, gefolgt von Knochenmark und Ösophagus [Kadry *et al.*, 1999].

Um die Verteilung von Acrylamid und seinem Metaboliten Glycidamid (siehe Kapitel 2.1.3.2) unter kontinuierlicher Exposition (*steady-state*) zur Simulation der Acrylamid-Aufnahme über die tägliche Ernährung bestimmen zu können, wurde in einer Studie von Kim *et al.* [2015] männlichen Sprague-Dawley-Ratten über einen Zeitraum von 12 h Acrylamid als i. v. Injektion (2 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$) verabreicht. Eine konstante Acrylamid-Konzentration von 347 ± 45 ng/ml wurde 2 h nach Beginn der Infusion im Plasma erreicht. Die Glycidamid-Konzentration im Plasma war zeitgleich mit 113 ± 37 ng/ml niedriger. Die höchsten Acrylamid-Konzentrationen in den untersuchten Organen wurden im Herzen (196 ± 50 ng/g), gefolgt von Schilddrüse (172 ± 45 ng/g) und Magen (169 ± 127 ng/g) nachgewiesen. Im Vergleich hierzu verteile sich Glycidamid vor allem in der Schilddrüse (152 ± 57 ng/g), im Fettgewebe ($74,5\pm 11,8$ ng/g) und im Dickdarm ($63,4\pm 21,7$ ng/g), sodass daraus ähnliche Konzentrationen wie von Acrylamid resultierten [Kim *et al.*, 2015].

2.1.3.2. Metabolismus

Der Metabolismus von Acrylamid wurde in der Vergangenheit anhand zahlreicher Studien bereits hinreichend untersucht und kann zum einen in einen oxidativen und reduktiven Teil sowie in Giftungs- und Entgiftungsreaktionen unterteilt werden. Ein Überblick über wichtige Zwischenprodukte und Endprodukte ist in Abbildung 2-3 dargestellt.

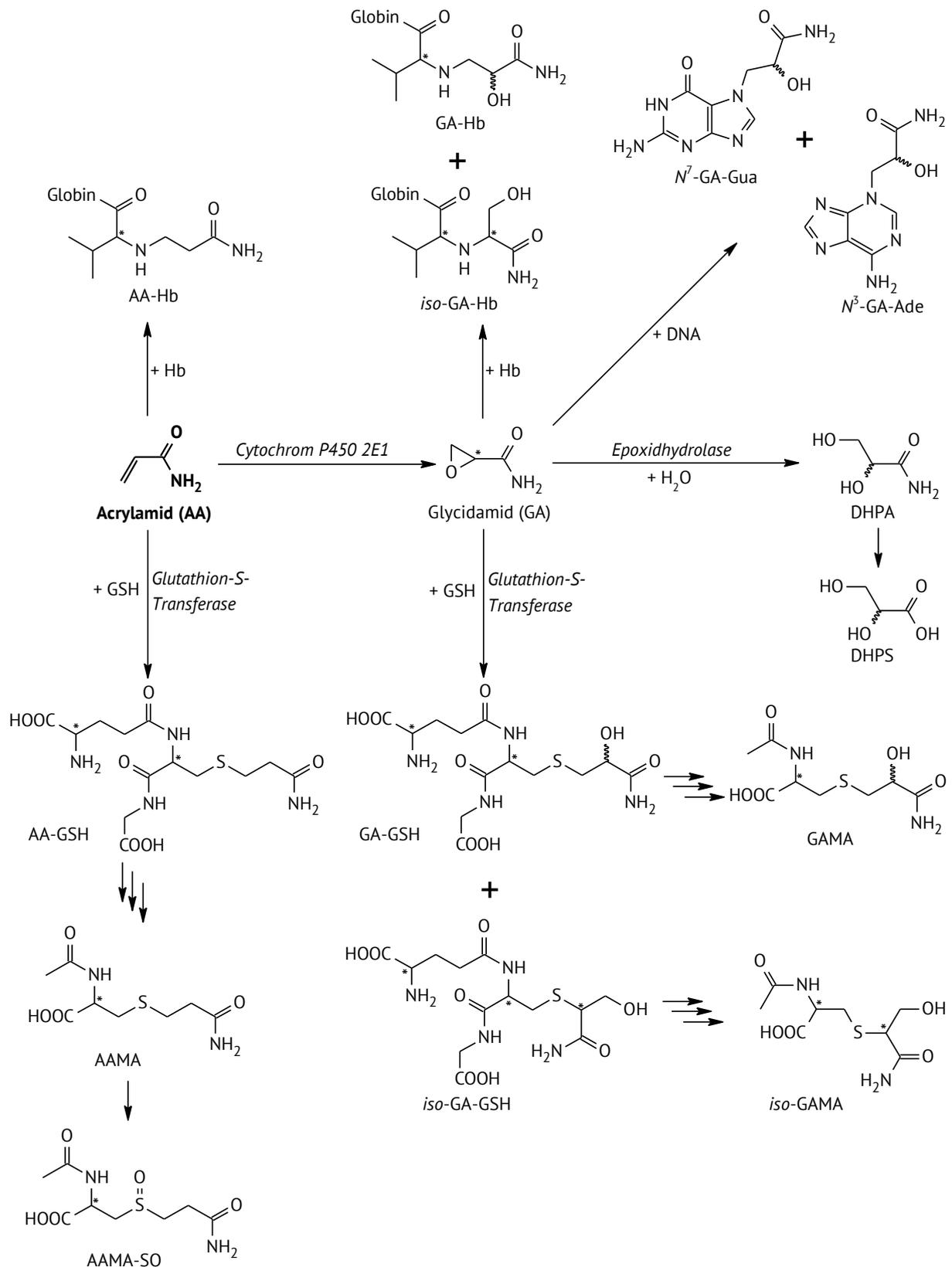


Abbildung 2-3 Metabolismus von Acrylamid. AA Acrylamid; AAMA N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein; AAMA-SO N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein-S-oxid; Ade Adenin; DHPA 2,3-Dihydroxypropanamid; DHPS 2,3-Dihydroxypropansäure; DNA Desoxyribonucleinsäure; GA Glycidamid; GAMA N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; GSH Glutathion; Gua Guanin; Hb Hämoglobin; iso-GAMA N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein.

Metabolische Aktivierung von Acrylamid zu Glycidamid. Acrylamid kann vorwiegend durch Cytochrom P450 (CYP 450) 2E1 zu dem Epoxid 2,3-Epoxypropionamid (Glycidamid) metabolisch aktiviert werden [Sumner *et al.*, 1999; Ghanayem *et al.*, 2005; Doroshenko *et al.*, 2009; Kraus *et al.*, 2013]. Im Vergleich zwischen Menschen und Nagern zeigte sich, dass der oxidative Metabolismus zu Glycidamid in Nagerspezies ausgeprägter ist und in der Reihenfolge Mensch < Ratte < Maus zunimmt [Fennell und Friedman, 2005].

Abbau von Glycidamid zu DHPA und DHPS. Glycidamid kann partiell unter Beteiligung einer Epoxidhydrolase zu 2,3-Dihydroxypropionamid (DHPA, Glyceramid) hydrolysieren. Die Gabe von 13,2 µg/kg KG D₃-Acrylamid an einen 46-jährigen männlichen Probanden resultierte in einer Ausscheidung von 5,4 % der verabreichten Dosis als D₃-DHPA, das Maximum lag hierbei im Zeitraum von 8–22 h nach Aufnahme [Hartmann *et al.*, 2011]. DHPA kann darüber hinaus zu 2,3-Dihydroxypropionsäure (DHPS) metabolisiert werden. Dieser Metabolit wurde in Fischer-344-Ratten (n=4) nach oraler Gabe mittels Schlundsonde von 50 mg/kg KG ¹³C₃-Acrylamid nachgewiesen [Sumner *et al.*, 2003].

GSH-Konjugation von Acrylamid und Glycidamid und Abbau zu Mercaptursäuren. Sowohl Acrylamid als auch Glycidamid können in einer Michael-Addition mit der freien Thiol-Gruppe von Glutathion (GSH) reagieren und Addukte bilden. In Abbildung 2-4 sind die einzelnen Schritte der Bildung der Mercaptursäuren dargestellt. Die Konjugation von Acrylamid und GSH ist hierbei um den Faktor 1,5–3 schneller als die Epoxidierung des Acrylamids zu Glycidamid [Watzek *et al.*, 2013]. Während Acrylamid lediglich ein GSH-Addukt bildet, führt bei Glycidamid das Öffnen des Epoxidrings zu zwei möglichen GSH-Addukten. Eine Reaktion am C3-Kohlenstoff-nach Öffnen des Epoxidrings führt hierbei zu sogenannten Glycidamid-GSH-Addukten, eine Reaktion am C2-Kohlenstoff zum entsprechenden *iso*-Glycidamid-GSH-Addukt.

Alle beschriebenen Addukte werden im Phase-II-Metabolismus zu den jeweiligen Mercaptursäuren abgebaut und renal ausgeschieden. Der Abbau des Acrylamid-GSH-Adduktes führt zur Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein (AAMA). Durch anschließende Sulfatierung kann hieraus das korrespondierende Sulfoxid, AAMA-SO, gebildet werden. Die Glycidamid-GSH-Addukte sowie das *iso*-Glycidamid-GSH-Addukt werden ebenso zu den Mercaptursäuren *N*-Acetyl-S-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein (GAMA) bzw. *N*-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (*iso*-GAMA) abgebaut. Im Gegensatz zu AAMA wurden bei den Mercaptursäuren des Glycidamids bisher keine korrespondierenden Sulfoxide nachgewiesen [Fennell und Friedman, 2005; Fennell *et al.*, 2005].

Mittels Glutathion-S-Transferase (GST) erfolgt die Konjugation von Acrylamid bzw. Glycidamid zu Acrylamid-GSH, Glycidamid-GSH bzw. *iso*-Glycidamid-GSH. Durch Abspaltung von Glutaminsäure mittels γ -Glutamyl-Transpeptidase und Glycin mittels Dipeptidase sowie einer *N*-Acetyl-Transferase (NAT) vermittelten *N*-Acetylierung entstehen aus den jeweiligen GSH-Addukten die korrespondierenden Mercaptursäuren [Fennell und Friedman, 2005].

Die Relevanz der Mercaptursäuren als Biomarker der kurzzeitigen Exposition wird näher in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

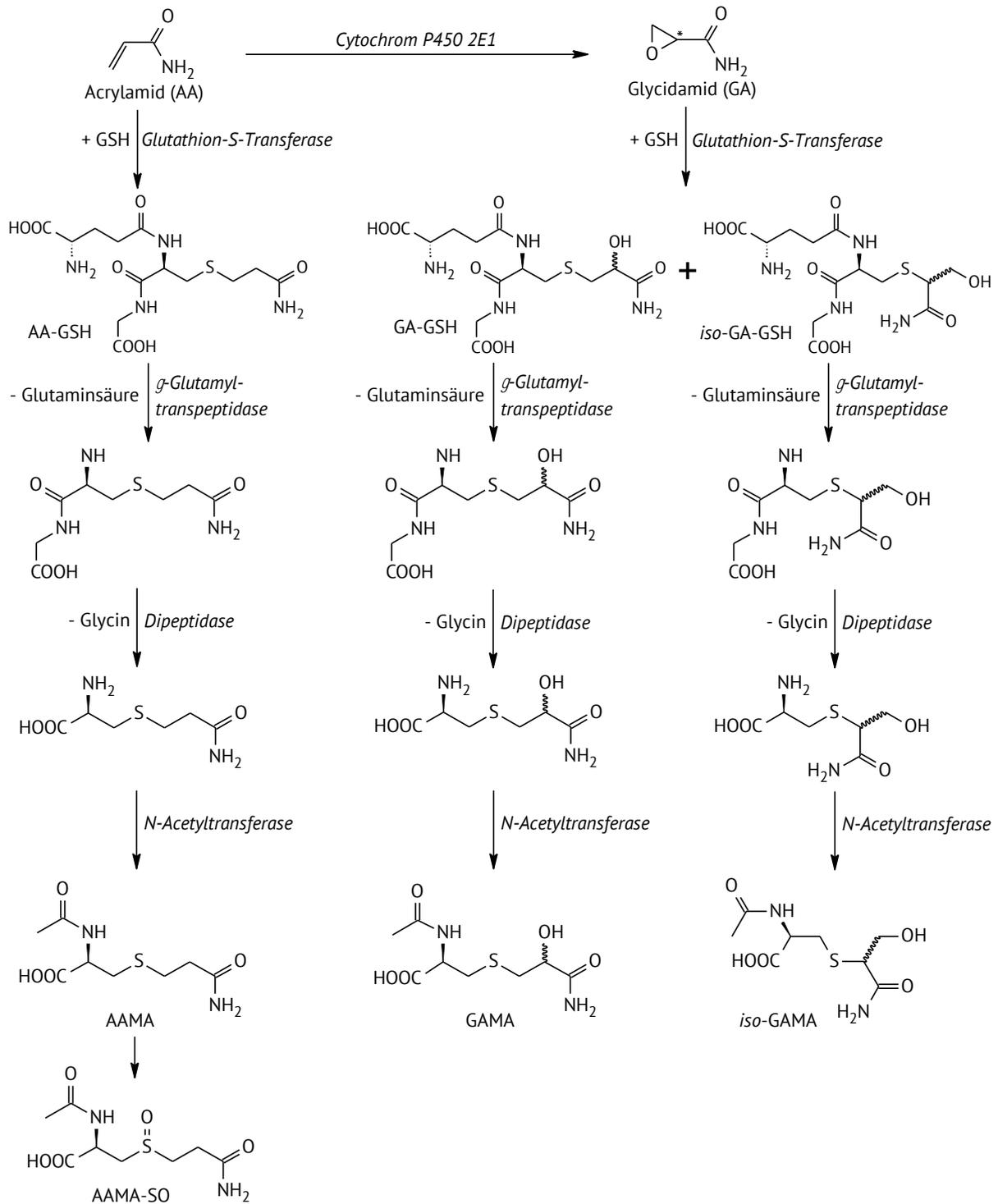


Abbildung 2-4 Bildung der Mercaptursäuren AAMA, GAMA, *iso*-GAMA sowie von AAMA-SO ausgehend von Acrylamid bzw. Glycidamid. AA Acrylamid; AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; AAMA-SO *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein-*S*-oxid; GA Glycidamid; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; GSH Glutathion; *iso*-GAMA *N*-Acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein.

Bildung von Acrylamid- und Glycidamid-Hb-Addukten. Neben GSH-Addukten können durch die Reaktion von Acrylamid bzw. Glycidamid mit der *N*-terminalen Aminogruppe des Valins (Val) aus dem Hämoglobin (Hb) auch Acrylamid-Hb-Addukte und (*iso*)-Glycidamid-Hb-Addukte entstehen [Bergmark *et al.*, 1993; Fennell *et al.*, 2005]. Diese irreversible Bindung und die daraus resultierende verminderte systemische Bioverfügbarkeit stellt neben den GSH-Addukten eine Detoxifizierung von Acrylamid und Glycidamid dar [Barber *et al.*, 2001].

Auf die Verwendung als Langzeit-Expositionsbiomarker wird näher in Kapitel 2.2.1.2 eingegangen.

Bildung von Glycidamid-DNA-Addukten. Glycidamid ist darüber hinaus in der Lage, Addukte mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu bilden. Hierbei wird vorwiegend *N*⁷-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (*N*⁷-GA-Gua) gebildet, *N*³-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (*N*³-GA-Ade) konnte jedoch ebenso nachgewiesen werden [Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Watzek *et al.*, 2012a; Eisenbrand, 2020].

2.1.3.3. Elimination

Durch die Gabe von radioaktiv markiertem Acrylamid konnte in mehreren Tierstudien gezeigt werden, dass Acrylamid vorwiegend über den Urin sowie zu geringen Anteilen über die Fäzes ausgeschieden wird [Miller *et al.*, 1982; Kadry *et al.*, 1999].

In Fischer-344-Ratten wurden innerhalb von 24 h nach oraler Gabe von 1, 10 bzw. 100 mg/kg [2,3-¹⁴C]-Acrylamid 53–67 % der jeweiligen Dosis und innerhalb von sieben Tagen 65–82 % eliminiert. Hierbei fanden sich >90 % der gefundenen Radioaktivität im Urin der Versuchstiere. Die Elimination nach intravenöser (i. v.) Gabe von 10 mg/kg zeigte gleichsinnige Eliminationsverläufe. So wurden innerhalb von 24 h bzw. 7 d nach i. v. Gabe 62 % bzw. 71 % der Dosis über den Urin ausgeschieden. Dabei lagen im Urin <2 % der Dosis als nicht metabolisiertes Acrylamid vor. Die Elimination über die Fäzes war mit 4,8 % bzw. 6 % im Vergleich zur Ausscheidung über den Urin vergleichsweise gering [Miller *et al.*, 1982]. Eine Studie an Sprague-Dawley-Ratten wies ebenfalls die Niere als Hauptausscheidungsorgan von Acrylamid aus. Innerhalb von 12 h nach oraler Gabe von 50 mg/kg [1-¹⁴C]-Acrylamid in Wasser wurden bereits 41 % der Dosis im Urin ausgeschieden. Jeweils weitere 10 % der Dosis wurden in den Zeiträumen 12–24 h, 24–48 h sowie 72–144 h renal eliminiert. Die maximale Ausscheidung über die Fäzes lag mit <2 % im Zeitraum von 24–48 h. Insgesamt wurden im Urin 61,01±2,74 % und in den Fäzes 3,94±0,74 % der Radioaktivität gefunden [Kadry *et al.*, 1999].

Eine Elimination über die Atemwege in Form von ¹⁴CO₂ konnte hingegen in einem Zeitraum von 6 h nach Gabe von [2,3-¹⁴C]-Acrylamid nicht beobachtet werden [Miller *et al.*, 1982]. Während zuvor in einer Studie von Hashimoto und Aldridge [1970] an männlichen Albino-Ratten circa 6 % der injizierten Dosis an [1-¹⁴C]-Acrylamid (100 mg/kg) als ¹⁴CO₂ nachgewiesen wurden, konnten auch Kadry *et al.* [1999] diesen Befund nicht belegen, obwohl die gleiche radioaktive Markierung verwendet wurde.

Die Elimination von Acrylamid in Form von Mercaptursäuren sowie deren Kinetik wurde sowohl in Ratten und Mäusen als auch im Menschen untersucht. Einen Überblick über die prozentuale renale Ausscheidung verschiedener Mercaptursäuren innerhalb von 24 h nach Einmalgabe von Acrylamid gibt Tabelle 2-3.

Tabelle 2-3 Prozentuale renale Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren innerhalb von 24 h nach Einmalgabe von Acrylamid in Wasser von Nagern und Menschen (modifiziert nach Kopp und Dekant [2009], EFSA [2015]).

Spezies	Dosis	AAMA [%]	AAMA-SO [%]	GAMA [%]	Σ [%]	Referenz
Maus	50 mg/kg	21,0±1,1	n. a.	8,6±1,1	50,4	Sumner <i>et al.</i> [1992]
Maus	0,1 mg/kg	5–9	n. a.	16–18	33–48	Doerge <i>et al.</i> [2007]
Ratte	50 mg/kg	34,0±1,8	n. a.	2,8±0,5	50,7	Sumner <i>et al.</i> [1992]
Ratte	0,1 mg/kg	31	n. a.	27–29	64–66	Doerge <i>et al.</i> [2007]
Ratte	0,1 mg/kg	34,9±7,4	n. a.	26,7±4,64	61,7±10,5	Kopp und Dekant [2009]
Ratte	20 µg/kg	29,7±5,13	n. a.	25,4±6,2	55,1±11,8	Kopp und Dekant [2009]
Mensch	3,0 mg/kg	22,0±5,3	4,2±1,1	n. a.	34,0±5,7	Fennell <i>et al.</i> [2005]
Mensch	0,5 µg/kg	41,4±3,47	7,19±1,40	3,83±0,78	52,4±3,59	Kopp und Dekant [2009]
Mensch	20 µg/kg	37,4±2,92	6,33±1,77	3,23±0,69	46,9±3,7	Kopp und Dekant [2009]
Mensch	13 µg/kg	45,1	n. a.	2,8	47,7	[Boettcher <i>et al.</i> , 2006a]
Mensch	0,5 mg/kg	31,2±6,55	8,26±2,39	0,82±0,16	45,6±8,5	Fennell <i>et al.</i> [2006]
Mensch	1,0 mg/kg	34,4±5,21	8,68±1,21	0,82±0,11	49,9±6,3	Fennell <i>et al.</i> [2006]
Mensch	3,0 mg/kg	27,8±7,99	7,25±2,40	0,70±0,22	39,9±9,90	Fennell <i>et al.</i> [2006]

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; AAMA-SO *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein-*S*-oxid; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; Σ Summe der Metaboliten

In einer vergleichenden Studie mit männlichen Fischer-344-Ratten und B6C3F₁-Mäusen wurde die Elimination von Acrylamid in Form seiner Metaboliten untersucht. Hierfür wurden nach Gabe von 50 mg/kg KG [1,2,3-¹³C]-Acrylamid der 24-h-Sammelurin der Tiere mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanzspektroskopie) auf Acrylamid-assoziierte Metaboliten analysiert. Es zeigte sich, dass AAMA als Metabolit des reduktiven Metabolismus mit 67 % der quantifizierten Metaboliten von Ratten mehr ausgeschieden wurde als von Mäusen mit 41 %. In Relation zur Dosis von 50 mg/kg KG wurden somit 34±1,8 % (Ratte) bzw. 21±1,1 % (Maus) als AAMA ausgeschieden. In Mäusen war hingegen der Anteil des oxidativen Metabolismus mit 8,6±1,1 % Glycidamid und mit 17±0,6 % GAMA im Vergleich zur Ratte mit 2,8±0,5 % Glycidamid und 12±0,6 % GAMA erhöht [Sumner *et al.*, 1992; EFSA, 2015].

Fennell *et al.* [2006] verglichen den Metabolismus von Acrylamid nach oraler Gabe von 3 mg/kg [1,2,3-¹³C]-Acrylamid an männlichen Fischer-344-Ratten (n=4) mit dem von Menschen (n=24,

männlich, Nichtraucher), die oral als Einmalgabe 0,5, 1 bzw. 3 mg/kg KG [^{13}C]-Acrylamid aufnahmen, indem der Urin der höchsten Dosisgruppe mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie auf deren Acrylamid-assoziierte Metaboliten untersucht wurde. Im 24 h-Sammelurin der Ratten wurden $29\pm 4,5$ % der Dosis als AAMA, $13\pm 2,1$ % als GAMA und $8,0\pm 2,1$ % als *iso*-GAMA quantifiziert, welches einer Ausscheidung von $50\pm 8,6$ % der Gesamtdosis in Form der oben genannten Metaboliten entsprach. Im Vergleich hierzu schieden die männlichen Probanden nur $22\pm 5,3$ % der Gesamtdosis als AAMA und $4,2\pm 1,1$ % als AAMA-SO aus, während GAMA in den Urinproben nicht quantifiziert werden konnte (<LOD) [Fennell *et al.*, 2005].

Die Unterschiede des humanen Acrylamid-Metabolismus zu dem in Fischer-344-Ratten wurde darüber hinaus von Kopp und Dekant [2009] anhand einer oralen Einmalgabe von $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid untersucht. Dafür wurden im Urin, welcher in Intervallen über einen Zeitraum von 94 h (Mensch) bzw. 96 h (Ratte) gesammelt wurde, mittels HPLC-MS/MS nach Elektrospray-Ionisation (ESI) die Metaboliten $^{13}\text{C}_3$ -AAMA, $^{13}\text{C}_3$ -GAMA und $^{13}\text{C}_3$ -AAMA-SO quantifiziert. Nach Gabe von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG wurden innerhalb von 96 h $33,6\pm 5,0$ % bzw. $38,8\pm 7,3$ % der Dosis als $^{13}\text{C}_3$ -AAMA und $32,7\pm 7,0$ % bzw. $31,7\pm 4,3$ % der Dosis als $^{13}\text{C}_3$ -GAMA von Fischer-344-Ratten ($n=5$ je Dosisgruppe) ausgeschieden. AAMA-SO wurde nicht im Urin der Ratten detektiert. Im Humanurin ($n=6$) wurden nach Gabe von 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG $51,7\pm 3,8$ % bzw. $49,2\pm 2,8$ % der Dosis als $^{13}\text{C}_3$ -AAMA, $13,2\pm 3,2$ % bzw. $14,5\pm 3,1$ % der Dosis als $^{13}\text{C}_3$ -AAMA-SO und $6,3\pm 0,9$ % bzw. $6,4\pm 1,2$ % der Dosis als $^{13}\text{C}_3$ -GAMA detektiert. Vom Menschen wurden somit circa 70 % der jeweiligen Dosis an $^{13}\text{C}_3$ -AA in Form seiner Mercaptursäuren eliminiert. $^{13}\text{C}_3$ -AAMA war sowohl in Ratten als auch im Menschen die im kürzesten Zeitraum ausgeschiedene Mercaptursäure. So wurden bereits $t_{\text{max}}=10,9\pm 2,7$ h (Ratte, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) und $t_{\text{max}}=10,2\pm 0,1$ h (Mensch, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG) nach Aufnahme die maximalen Konzentrationen im Urin an $^{13}\text{C}_3$ -AAMA detektiert. Die Ausscheidung von $^{13}\text{C}_3$ -GAMA erreichte das Maximum mit 17,2 \pm 1,7 h bzw. 22,7 \pm 0,69 h erst wesentlich später. Die nur im Menschen gebildete Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3$ -AAMA-SO wies mit 23,0 \pm 2,1 h ein ähnliches t_{max} auf. Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) lagen im Menschen bei 14,2 \pm 1,1 h ($^{13}\text{C}_3$ -AAMA), 21,5 \pm 4,6 h ($^{13}\text{C}_3$ -AAMA-SO) und 26,3 \pm 2,4 h ($^{13}\text{C}_3$ -GAMA). Im Probandenkollektiv zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern (jeweils $n=3$) in den von Kopp und Dekant [2009] erfassten Parametern. Die prozentualen Ausscheidungen der Mercaptursäuren innerhalb von 22 h nach Gabe sind in Tabelle 2-3 dargestellt.

Eine weitere Studie erfasste ebenfalls die renale Ausscheidungskinetik von D_3 -AAMA und D_3 -GAMA innerhalb von 46 h nach Einmalgabe von 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG D_3 -Acrylamid in Wasser in einem männlichen Probanden. Insgesamt wurden 52 % der Dosis als D_3 -AAMA im Studienzeitraum wiedergefunden, 47 % der Dosis hierbei bereits innerhalb der ersten 25 h. Der Proband zeigte zwischen 8–18 h eine konstante Ausscheidung an AAMA bei einem t_{max} von 11,5 h. Nach einer beinahe linearen Abnahme im Zeitraum von 18–26 h nach Gabe, verlief die Ausscheidung des D_3 -Acrylamids im Zeitraum von 26–46 h wesentlich langsamer. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass GAMA im Vergleich zu AAMA zeitverzögert ausgeschieden wird. So lag das t_{max} von D_3 -GAMA mit 22,1 h mehr als 10 h hinter dem von D_3 -AAMA. Ebenso wurden nur 4,6 % der D_3 -Acrylamid-

Dosis als D₃-GAMA innerhalb von 46 h ausgeschieden, circa 3 % davon innerhalb des ersten Tages. Beide Mercaptursäuren waren im letzten Urinsammelzeitraum noch detektierbar [Boettcher *et al.*, 2006a]. Eine nachfolgende Studie erfasste zusätzlich die Ausscheidung von D₃-*iso*-GAMA, welche mit 0,8 % der Dosis innerhalb von 46 h nur einen geringen Anteil der aufgenommenen Dosis von 13 µg/kg KG D₃-Acrylamid darstellte [Hartmann *et al.*, 2009].

Weitere Informationen zu den Mercaptursäuren als Biomarker sind näher in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

2.1.4. Toxikologie von Acrylamid

Acrylamid weist als α,β -ungesättigte Verbindung eine hohe elektrophile Reaktivität auf und ist somit in der Lage, in einer Michael-Addition mit weichen Nucleophilen zu reagieren, zu denen zum Beispiel Thiol-Gruppen enzymatischer Cystein-Resten oder die anderer funktionaler Proteine wie Nervenzellen oder Spermatozyten zählen. Das durch metabolische Aktivierung gebildete Epoxid Glycidamid weist zudem eine Reaktivität mit harten Nucleophilen wie DNA-Basen auf. Aufgrund dieser reaktiven Eigenschaften ergeben sich für Acrylamid verschiedene toxische Effekte, bei denen insbesondere die Neurotoxizität, Genotoxizität, Mutagenität, Kanzerogenität sowie Reproduktionstoxizität eine Rolle spielen [EFSA, 2015].

Akute Toxizität. Die akute Toxizität von Acrylamid nach oraler Gabe wurde an verschiedenen Spezies untersucht. Für Mäuse ergab sich mit 107 mg/kg KG der niedrigste ermittelte letale Dosis (LD₅₀)-Wert [Hashimoto *et al.*, 1981]. Der orale LD₅₀-Wert lag bei Ratten zwischen 150–250 mg/kg KG [McCollister *et al.*, 1964; Fullerton und Barnes, 1966; Tilson und Cabe, 1979] und bei Kaninchen bzw. Meerschweinchen bei 150–180 mg/kg KG [McCollister *et al.*, 1964].

Neurotoxizität. Die Neurotoxizität von Acrylamid beruht auf einer distalen Axonopathie und äußert sich in klinischen Symptomen wie peripherer Neuropathie [Hagmar *et al.*, 2001; NTP, 2012; EFSA, 2015].

So zeigte sich unter anderem in einer 13-wöchigen *Dose-Range-Finder*-Studie des *National Toxicology Program* (NTP) des *U.S. Department of Health and Human Services* in männlichen und weiblichen F344/N-Ratten (n=8 pro Geschlecht/Dosisgruppe) in der jeweils höchsten Dosis-Gruppe von 3,52 mM (250 ppm) bzw. 185 mg/kg Futter eine Paralyse der hinteren Gliedmaßen. In der zweithöchsten Trinkwasser-Dosisgruppe von 1,41 mM (100 ppm) zeigte sich das Symptom ebenfalls in vier von acht Versuchstieren. In den höchsten Dosisgruppen beider Geschlechter, bei weiblichen Tieren zusätzlich bis zu einer Dosis von 74 mg/kg Futter, wurden darüber hinaus Radikuloneuropathien, die den Ischiasnerv und/oder das lumbale Rückenmark betrafen, beobachtet [NTP, 2012]. Der *no observed adverse effect level* (NOAEL) betrug 0,35 mM bei Exposition über das Trinkwasser (2,1 mg/kg KG/d), der *lowest observed adverse effect level* (LOAEL) betrug 7,4 mg/kg Futter (0,5 mg/kg KG/d) [EFSA, 2015]. Eine Studie an B6C3F₁-Mäusen mit vergleichbarem Studiendesign des NTP wies ähnliche, jedoch weniger ausgeprägte adverse Effekte auf das Nervensystem [NTP, 2012] mit einem NOAEL von 0,70 mM (13,3 mg/kg KG/d) für

eine Exposition über das Trinkwasser und einem NOAEL von 74 mg/kg Futter, entsprechend 12,0 mg/kg KG/d nach [EFSA, 2015].

In Acrylamid-exponierten Menschen (n=210) traten laut einer epidemiologischen Studie von Hagmar *et al.* [2001] ebenfalls toxische Effekte auf das periphere Nervensystem wie Taubheit in den Extremitäten und Beinkrämpfe sowie weitere Symptome wie erhöhte Transpiration der Extremitäten, Hautablösungen an den Händen, Reizungen, Husten, Atemnot, Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindelgefühl auf. Die das periphere Nervensystem betreffenden Symptome korrelierten mit den Level an Acrylamid-Hb-Addukten im Blut [Hagmar *et al.*, 2001].

Gentoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität. Die mutagene Wirkung von Acrylamid beruht im Wesentlichen auf der metabolischen Aktivierung zu dessen Epoxid Glycidamid. Verschiedene *in-vitro*-Tests zeigten für Acrylamid eine schwach mutagene, aber stark klastogene Wirkung und für Glycidamid eine starke klastogene und mutagene Eigenschaften [Baum *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007] wie beispielsweise durch Bildung von DNA-Addukte [Manière *et al.*, 2005]. *In vivo* wurden gentoxische Wirkungen in somatischen Zellen sowie Keimzellen beobachtet, welche auf die metabolische Aktivierung zu Glycidamid zurückzuführen waren, sowie direkt auf Acrylamid beruhende gentoxische Effekte bei hohen Dosen, die im Zusammenhang mit der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) als Folge oxidativen Stresses standen [Yener und Dikmenli, 2009; Yener, 2013; NTP, 2012; Nixon *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2010].

Eine *in-vitro*-Studie an humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen ergab schwach gentoxische Effekte von Acrylamid nach vierstündiger Behandlung bei Konzentrationen >10 mM ohne metabolische Aktivierung im Mikrokern-Test und Thymidin-Kinase-Test. Im Vergleich hierzu konnte für Glycidamid eine signifikante und konzentrationsabhängige Gentoxizität mittels Mikrokern-, Thymidin-Kinase-Test und Comet-Assay bereits ab Konzentrationen von 0,5 mM nachgewiesen werden. Die Zyto- und Gentoxizität von Acrylamid wurden nicht durch metabolische Aktivierung durch Ratten-S9-Mix verstärkt, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass Ratten-S9-Mix nicht geeignet sei, um Acrylamid metabolisch zu aktivieren [Koyama *et al.*, 2006]. Eine Studie von Jiang *et al.* [2007] an HepG2-Zellen untersuchte ebenfalls die Gentoxizität von Acrylamid mittels Comet-Assay (0–20 mM) und Mikronukleus-Test (0–2,5 mM). Darüber hinaus wurde die intrazelluläre Bildung von ROS mittels 2,7-Dichlorfluorescein- (DCF-) Assay, das Level an oxidativen DNA-Schäden mittels immunochemischer Detektion von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) sowie der Einfluss einer GSH-Depletion durch Buthioninsulfoximin analysiert. Es zeigte sich im Comet-Assay eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Schädigung und im Mikrokern-Test eine Zunahme der Mikrokerne. Ebenso konnte eine Bildung von ROS, ein Anstieg von 8-OHdG als Indikator für oxidative DNA-Schäden und eine Verstärkung zytotoxischer Effekte durch GSH-Depletion beobachtet werden, sodass die Autoren schlussfolgerten, die gentoxische Wirkung von Acrylamid könne möglicherweise auf einer Induktion von oxidativen DNA-Schäden beruhen, welche durch ROS oder GSH-Depletion entstehen könnten [Jiang *et al.*, 2007].

Yener und Dikmenli [2009] führten *in vivo* einen Mikrokern-Test aus dem Knochenmark von männlichen Sprague-Dawley-Ratten durch. Nach einmaliger oraler Gabe von 0, 125, 150 bzw. 175 mg/kg KG an jeweils fünf Tieren wurde 48 h nach Dosisgabe ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) in allen Dosisgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe induziert. In der höchsten Dosisgruppe von 175 mg/kg KG entsprach dies einem Anstieg um den Faktor 3,75 im Vergleich zur Kontrolle. Zytotoxische Effekte konnten ebenfalls durch ein statistisch signifikant verringertes Verhältnis ($p < 0,05$) von polychromatischen zu normochromatischen Erythrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden [Yener und Dikmenli, 2009]. Weitere positive Testresultate im *in-vivo*-Mikrokerntest an Ratten oder Mäusen wurden des Weiteren von Zeiger *et al.* [2009], Yener [2013] und Witt *et al.* [2008] publiziert.

Die DNA-schädigende Wirkung von Acrylamid in verschiedenen Geweben wurde *in vivo* von Manière *et al.* [2005] mittels Comet-Assay und dem Monitoring der DNA-Addukte N⁷-GA-Gua sowie N³-GA-Gua untersucht. Hierfür wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten ($n=4-5$) per Schlundsonde 0, 18, 36 oder 54 mg/kg KG Acrylamid verabreicht. In der zweithöchsten Dosisgruppe von 36 mg/kg KG wurden DNA-Schäden in Leukozyten und Gehirn sowie in der höchsten Dosisgruppe in den Hoden 24 h nach Exposition mittels Comet-Assay detektiert. In den weiteren untersuchten Geweben (Nebenniere, Knochenmark, Leber) konnten keine Acrylamid-induzierten DNA-Schäden nach 24 h beobachtet werden. Es fanden sich jedoch in der höchsten Dosisgruppe nach Reduzierung des Zeitfensters auf 2 h bzw. 5 h nach Acrylamid-Gabe DNA-Schäden in den Hoden und Nebennieren (2 h) bzw. Leukozyten, Knochenmark, Leber und Nebennieren (5 h). Die Analyse der Glycidamid-DNA-Addukte ergab, dass N⁷-GA-Gua in 50–100fach höheren Konzentrationen in Gehirn, Leber und Hoden nachgewiesen werden konnte als N³-GA-Gua. Darüber hinaus wies N³-GA-Gua mit 20–30 h eine geringere Halbwertszeit auf als N⁷-GA-Gua mit 50–80 h [Manière *et al.*, 2005].

In einer Zwei-Jahres-Studie des NTP [2012] an F344/N-Ratten zeigten sich in männlichen Tieren in der höchsten Dosisgruppe von 2,7 mg/kg KG/d Acrylamid über das Trinkwasser signifikant erhöhte Inzidenzen für Mesotheliome der Nebenhoden und Hodenhaut, Adenomen in Langerhans-Inselzellen und sowohl Adenomen als auch Karzinomen in der Schilddrüse. Zudem wiesen weibliche Tiere Karzinome der Klitorisdrüse, Fibroadenome der Brustdrüsen, Karzinome und Papillome an Mundschleimhaut und Zunge, (Fibro)sarkome der Haut und ebenso Adenome und Karzinome des Follikularepithels der Schilddrüse auf [NTP, 2012]. Anhand dieser Studie wurde von der EFSA [2015] ein BMDL₁₀ (engl. *benchmark dose lower confidence limit 10*) von 1,13 mg/kg KG/d für Nebenhoden- und Hodenhaut Mesotheliome bei männlichen F344/n-Ratten und ein BMDL₁₀ von 0,30 mg/kg KG/d für Mammakarzinome bei weiblichen Tieren abgeleitet.

Acrylamid wurde von der IARC als möglicherweise krebserregend beim Menschen (Gruppe 2A) eingestuft [IARC, 1994]. Ebenso wurde Acrylamid unter anderem auf europäischer Ebene von der

European Chemicals Agency (ECHA) gemäß der Verordnung (EG) 1907/2006² Artikel 57 als *substance of very high concern* (SVHC) gelistet.

2.1.5. Externe Exposition von Acrylamid

Seit dem Bekanntwerden von Acrylamid als hitzeinduzierte Kontaminante in einer Vielzahl von Lebensmitteln (siehe Kapitel 2.1.2) im Jahre 2002 wurden verschiedene Abschätzungen zur Acrylamid-Exposition durch die Ernährung, aber auch anderen Expositionsquellen, veröffentlicht und stetig aktualisiert.

Alimentäre Acrylamid-Exposition. Eine erste Abschätzung des *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) ergab im Jahr 2002 eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 0,3–0,8 µg/kg KG für eine westliche Ernährungsform [FAO/WHO, 2002]. Erneute Abschätzungen ergaben in 2006 eine durchschnittliche Acrylamid-Aufnahme von 1 µg/kg KG/d und in 2011 eine Aufnahme von 0,2–1 µg/kg KG/d bei einem 95.–97.5. Perzentil von 0,6–1,8 µg/kg KG/d [FAO/WHO, 2006, 2011]. DIE JECFA schlussfolgerte, dass es keine Veränderungen der alimentären Acrylamid-Exposition zwischen den 2006 und 2011 publizierten Datensätzen gab, sodass zur Sicherheitsbeurteilung eine durchschnittliche tägliche Exposition von 1 µg/kg KG bzw. 4 µg/kg KG für hohe Aufnahmen herangezogen werden sollten [FAO/WHO, 2011].

Auf europäischer Ebene wurde 2015 von der EFSA eine Abschätzung der Acrylamid-Exposition der Allgemeinbevölkerung publiziert, deren Ergebnisse in Tabelle 2-4 gelistet sind.

Tabelle 2-4 Acrylamid-Exposition in µg/kg KG/d verschiedener Altersgruppen der europäischen Allgemeinbevölkerung gemäß [EFSA, 2015].

Altersgruppe	Mittlere Aufnahme		95. Perzentil	
	Median [Minimum–Maximum]		Median [Minimum–Maximum]	
	LB	UB	LB	UB
Säuglinge	0,8 [0,5–1,3]	1,0 [0,7–1,6]	1,8 [1,4–2,3]	2,1 [1,6–2,5]
Kleinkinder	1,3 [0,9–1,9]	1,4 [0,9–1,9]	2,3 [1,4–3,4]	2,4 [1,5–3,4]
Andere Kinder	1,2 [0,9–1,6]	1,2 [0,9–1,6]	2,2 [1,4–3,2]	2,3 [1,4–3,2]
Heranwachsende	0,7 [0,4–0,9]	0,7 [0,4–0,9]	1,4 [0,9–2,0]	1,4 [0,9–2,0]
Erwachsene	0,5 [0,4–0,6]	0,5 [0,4–0,6]	1,0 [0,8–1,3]	1,0 [0,8–1,3]
Ältere Menschen	0,4 [0,4–0,5]	0,5 [0,4–0,5]	0,8 [0,7–1,0]	0,9 [0,7–1,0]
Hochbetagte Menschen	0,4 [0,4–0,5]	0,5 [0,4–0,5]	0,9 [0,6–1,0]	0,9 [0,6–1,0]

LB untere Grenze; UB obere Grenze

² Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.

Die durchschnittliche tägliche alimentäre Exposition in den Gruppen von Erwachsenen bis hochbetagten Menschen betrug im Mittel 0,4–0,9 µg/kg KG. Das 95. Perzentil lag in diesen Altersgruppen zwischen 0,6–2,0 µg/kg KG/d. Als höher exponierte Gruppe in Relation zum Körpergewicht erwiesen sich die jüngeren Altersgruppen von Säuglingen bis Kinder mit einer mittleren täglichen Acrylamid-Aufnahme von 0,5–1,9 µg/kg KG und einem 95. Perzentil von 1,4–3,4 µg/kg KG [EFSA, 2015].

Zu den identifizierten Lebensmitteln, welche am meisten zur chronischen Acrylamid-Exposition beitrugen, zählten für Säuglinge ‚Babynahrung‘, welche gefolgt wurde von ‚anderen Produkten auf Kartoffelbasis‘. Für die Altersgruppen der Kleinkinder, andere Kinder bis zu Heranwachsenden stellten ‚frittierte Kartoffelprodukte‘ (ohne Kartoffelchips) circa die Hälfte der Gesamtexposition dar. Weiterhin trugen ‚Weißbrot‘, ‚Frühstückszerealien‘, ‚Kekse und Gebäck‘ sowie ‚andere Getreide-basierte Produkte‘ zur Exposition mit Acrylamid bei. Zusammen mit diesen Lebensmittelgruppen trug ‚Kaffee‘ hauptsächlich zur täglichen Acrylamid-Aufnahme bei Erwachsenen, älteren Menschen und hochbetagten Menschen bei [EFSA, 2015].

Neben Abschätzungen zur chronischen Acrylamid-Exposition wurden auch Abschätzungen anhand von Analysen von Duplikaten verzehrter Mahlzeiten vorgenommen. So untersuchten Kawahara *et al.* [2019] 24-h-Duplikat-Mahlzeiten (n=110) von erwachsenen Japanern auf deren Acrylamid-Gehalte, um anhand der entsprechenden Ernährungsprotokolle Rückschlüsse auf die Acrylamid-Exposition des Studientages ziehen zu können. Die Autoren kalkulierten so eine mittlere Acrylamid-Exposition von 215 ng/kg KG/d (8–1.582 ng/kg /KG/d), welche signifikant mit dem Konsum von Kaffee und hochoverhitztem Gemüse korrelierte [Kawahara *et al.*, 2019].

Acrylamid-Exposition durch Tabakrauch. Neben einer Exposition von Acrylamid durch Lebensmittel, ist auch eine Aufnahme durch Tabakrauch möglich. Mögliche Bildungswege wurden von Diekmann *et al.* [2008] diskutiert und umfassten die Reaktion von im Tabakrauch vorhandenem Ammoniak mit Acrylsäure und Essigsäure, eine Bildung aus Asparagin und reduzierenden Zuckern durch die Maillard-Reaktion analog des postulierten Bildungsweges in Lebensmitteln sowie die Bildung durch Oxidation von Acrolein zu Acrylsäure, welche mit Ammoniak Acrylamid bildet.

In Zigaretten tabak wurden Acrylamid-Gehalte von 50,3–119,6 ng/g quantifiziert, während Tabak für andere Tabakprodukte zwischen 69,9–366,7 ng/g Acrylamid enthielt. Aus den im Zigaretten tabak erhaltenen Acrylamid-Gehalten ergab sich ein Level von 497,1–8019 ng/Zigarette im Hauptstrom des Zigarettenrauchs, welcher jeweils anhand von drei verschiedenen normierten Rauch-Konditionen erzeugt wurde. Die Autoren schlussfolgerten, dass für eine Korrelation mit Acrylamid-Expositionsbiomarkern ein Wert von 1 µg/Zigarette herangezogen werden sollte, welcher sich aus dem Tabakrauch der 2R4F und 3R4F Kentucky Referenz-Zigarette bei Anwendung der 35/2/60-Rauchmethode ergab [Moldoveanu und Gerardi, 2011]. Zuvor wurden bereits mit 1,1–2,34 µg/Zigarette vergleichbare Daten publiziert [Smith *et al.*, 2000].

2.2. Biomarker

Als Biomarker der Exposition können gemäß des *United States National Academy of Sciences and National Research Council* Xenobiotika, Metaboliten dieser mit endogenen Verbindungen oder direkt expositionsbezogene Prozesse im Körper verstanden werden, welche der Identifizierung exponierter Gruppen oder einzelner Individuen dienen [Aitio, 1999].

Zum einen können anhand von Metabolomics-Techniken Metabolitenprofile einer Substanz erstellt werden, durch diese die Gesamtheit möglicher Interaktionen einer Substanz im Organismus abgebildet werden können. Zum anderen können, wie in dieser Arbeit, bestimmte Metaboliten selektiv als Biomarker ausgewählt werden, um quantitative Aussagen über eine interne Exposition zu ermöglichen. Hierfür müssen diese Biomarker jedoch unter anderem in Bezug auf deren Toxikokinetik, Metabolismus, Verhalten und Stabilität charakterisiert werden [Rietjens *et al.*, 2018].

2.2.1. Biomarker einer Acrylamid-Exposition

Im Gegensatz zu Expositionsabschätzungen anhand von konsumierten Lebensmittel-Mengen und deren Acrylamid-Gehalten (siehe Kapitel 2.1.5), umfasst eine Abschätzung mittels Humanbiomonitoring in Form von Expositionsbiomarkern die gesamte Acrylamid-Exposition ungeachtet der Expositionsquellen. Somit werden neben der Aufnahme durch die Ernährung auch direkte oder indirekte Expositionen mit Tabakrauch oder auch eine mögliche endogene Exposition miterfasst.

Während die renal ausgeschiedenen Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Kurzzeit-Expositionsbiomarker angesehen werden, kann in Blutproben anhand Hb-Addukt-Level von Acrylamid (AAVal) bzw. Glycidamid (GAVal) eine Langzeit-Exposition abgeschätzt werden [EFSA, 2015; Abraham *et al.*, 2017; Eisenbrand, 2020].

Die beiden oxidativen Metaboliten DHPA und DHPS stellen keine geeigneten Expositionsbiomarker für Acrylamid dar, da neben Acrylamid auch andere Vorläuferverbindungen zu diesen renal ausgeschiedenen Metaboliten führen können. Dies zeigten Studien, die eine höhere Ausscheidung der Metaboliten im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung sowie keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern feststellen konnten [Hartmann *et al.*, 2011; Latzin *et al.*, 2012].

Um von der Ausscheidung eines Metaboliten auf die Exposition dessen Ausgangsverbindung schließen zu können, müssen Eigenschaften wie die Toxikokinetik der Substanz bekannt sein. Die folgenden beiden Kapitel befassen sich mit publizierten Erkenntnissen über die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren, insbesondere AAMA und GAMA, und die Hb-Addukte des Acrylamids (AAVal) und Glycidamids (GAVal), welche in den in dieser Arbeit beschriebenen Humanstudien Anwendung als Expositionsbiomarker fanden.

2.2.1.1. Mercaptursäuren als Kurzzeit-Expositionsbiomarker

Seit dem Bekanntwerden von Acrylamid als hitzeinduzierte Prozesskontaminante in Lebensmitteln wurden zahlreiche Studien durchgeführt, welche die humane Acrylamid-Exposition durch Biomonitoring der Mercaptursäuren AAMA und GAMA erfassten. Neben der Nahrung als Expositionsquelle lag ein Augenmerk der Studien hierbei auch auf dem Konsum von Tabakerzeugnissen, welcher in ebenso relevanten Teilen zur Acrylamid-Belastung beiträgt. Einen Überblick über Studien, welche AAMA bzw. GAMA in Nichtrauchern und Rauchern erfassten, geben Tabelle 2-5 bzw. Tabelle 2-6.

Tabelle 2-5 Humanstudien zur Erfassung der AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern und Rauchern.

Kollektiv	n	AAMA: Median ^o ±SD (Min–Max)		Referenz
		[nmol/l]	[µmol/g ucr]	
Nichtraucher	16	124 (13–354)	-	Boettcher <i>et al.</i> [2005]
Nichtraucher	13	111 (60–435)	0,16 (0,06–0,42)	Kellert <i>et al.</i> [2006]
Nichtraucher	47	137 (9–1310)	-	Bjellaas <i>et al.</i> [2007b]
Nichtraucher	6	102 (34–341)	0,17 (0,06–0,38)	Kopp <i>et al.</i> [2008]
Nichtraucher	91	124 (<LOD–977)	0,13 (<LOD–0,59)	Hartmann <i>et al.</i> [2008]
Gelegentliche Raucher	12	239 (68–2689)	0,18 (0,14–1,73)	Kellert <i>et al.</i> [2006]
Raucher	13	1208 (260–3014)	0,70 (0,34–1,52)	
Raucher	13	542 (73–1443)	-	Boettcher <i>et al.</i> [2005]
Raucher	6	785 (102–2373)	-	Bjellaas <i>et al.</i> [2007b]

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; LOD Nachweisgrenze; Mengenkonzentrationen von AAMA wurden unter Berücksichtigung einer molaren Massen von 234,27 g/mol in Molkonzentrationen konvertiert

Tabelle 2-6 Humanstudien zur Erfassung der GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern und Rauchern.

Kollektiv	n	GAMA: Median±SD (Min–Max)		Referenz
		[nmol/l]	[µmol/g ucr]	
Nichtraucher	16	20 (<LOD–56)	-	Boettcher <i>et al.</i> [2005]
Nichtraucher	13	12 (4–44)	0,02 (0,01–0,03)	Kellert <i>et al.</i> [2006]
Nichtraucher	47	12 (<LOQ–68)	-	Bjellaas <i>et al.</i> [2007b]
Nichtraucher	6	16 (4–96)	0,03 (0,01–0,05)	Kopp <i>et al.</i> [2008]
Nichtraucher	91	28 (<LOD–340)	0,04 (<LOD–0,15)	Hartmann <i>et al.</i> [2008]
Gelegentliche Raucher	12	36 (12–56)	0,03 (0,01–0,06)	Kellert <i>et al.</i> [2006]
Raucher	13	80 (20–216)	0,05 (0,03–0,09)	
Raucher	13	76 (12–180)	-	Boettcher <i>et al.</i> [2005]
Raucher	6	435 (<LOQ–180)	-	Bjellaas <i>et al.</i> [2007b]

GAMA *N*-Acetyl-*S*-(carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein; LOD Nachweisgrenze; LOQ Bestimmungsgrenze; Mengenkonzentrationen von GAMA wurden unter Berücksichtigung einer molaren Massen von 250,27 g/mol in Molkonzentrationen konvertiert

Es zeigte sich, dass Raucher mit ungefähr dem Faktor 2–4 eine wesentliche höhere Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA aufwiesen als Nichtraucher.

So wiesen Nichtraucher eine Median-AAMA-Ausscheidung von 102–137 nmol/l auf, wobei Werte erfasst wurden, die unter dem LOD lagen bis zu einem Maximum von 1310 nmol/l. Bezogen auf renal ausgeschiedenes Kreatinin (ucr) ergaben sich Mediane von 0,13–0,17 µmol/g ucr und einem

Maximum von 0,59 $\mu\text{mol/g}$ ucr. Raucher wiesen hingegen eine AAMA-Ausscheidung zwischen 73–3014 nmol/l bei Median-Werten zwischen 542–1208 nmol/l auf [Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Bjellaas *et al.*, 2007b; Hartmann *et al.*, 2008]. Gelegentliche Raucher mit einem Zigarettenkonsum von <5 Zigaretten/d wiesen mit 239 nmol/l einen Median zwischen denen von Rauchern und Nichtrauchern auf, das Maximum von 2689 nmol/l lässt jedoch darauf schließen, dass nicht nur Tabakrauch als Expositionsquelle eine Rolle spielt [Kellert *et al.*, 2006].

In Einklang mit der AAMA-Ausscheidung, lag auch der Median der GAMA-Ausscheidung bei Rauchern mit 76–435 nmol/l über dem von Nichtrauchern mit 12–28 nmol/l [Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Bjellaas *et al.*, 2007b; Hartmann *et al.*, 2008].

Um den Einfluss der Ernährung auf die Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA zu untersuchen, wurden Studien durchgeführt, die eine Fastenperiode enthielten [Bjellaas *et al.*, 2005; Boettcher *et al.*, 2006b; Fuhr *et al.*, 2006], das Biomonitoring unter Verzicht verschiedener Lebensmittelgruppen durchführten [Zhang *et al.*, 2015; Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017] oder bei denen Probanden ausgewählte Lebensmittel(gruppen) zu sich nahmen [Kellert *et al.*, 2006; Watzek *et al.*, 2012b; Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017]. Manche Studien kombinierten mehrere dieser Ansätze innerhalb einer Studie.

Eine Studie an drei Probanden untersuchte die Ausscheidung von AAMA und GAMA während einer 48-stündigen Fastenperiode. Die Summe aus AAMA und GAMA lag im Bereich von 25–171 $\mu\text{g/g}$ ucr im Zeitraum von 5–0 h vor Fastenbeginn. Sowohl die Ausscheidung von AAMA als auch von GAMA nahm während der Fastenperiode ab, wobei die Ausscheidung von AAMA einen stärkeren Abfall zeigte. Dies resultierte in einer Ausscheidung von 12–23 μg (AAMA+GAMA)/g ucr am Ende der Fastenperiode von 48–50 h [Boettcher *et al.*, 2006b]. In einer weiteren Studie führte 24-stündiges Fasten zu einer Abnahme von circa 50 % der Ausscheidung von AAMA und GAMA [Bjellaas *et al.*, 2005]. Zhang *et al.* [2015] zeigten in zehn Probanden (5 männlich, 5 weiblich), dass nach 24-stündigem Verzicht auf frittierte Lebensmittel und Backwaren die Ausscheidung der Mercaptursäuren in beiden Geschlechtern vergleichbare Werte annahm. So lag der Median der AAMA-Ausscheidung bei 57,8 ng/ml (247 nmol/l) bei einem Bereich von 30,4–80,1 ng/ml (130–342 nmol/l) bei den männlichen Probanden und bei einem Median von 58,8 ng/ml (251 nmol/l) und einem Bereich von 20,1–79,9 ng/ml (86–341 nmol/l) bei weiblichen Probanden. Auch die Ausscheidung an GAMA der männlichen Probanden war mit einem Median von 7,5 ng/ml (30 nmol/l) und einem Bereich von 4,0–12,9 ng/ml (16–52 nmol/l) vergleichbar mit der der weiblichen Probanden mit einem Median von 5,7 ng/ml (23 nmol/l) bei einem Bereich von 3,5–9,6 ng/ml (14–38 nmol/l) [Zhang *et al.*, 2015].

Eine humane Interventionsstudie von Fuhr *et al.* [2006] zeigte, dass die Konjugation mit Glutathion schneller verläuft als die metabolische Aktivierung zu Glycidamid anhand der Erfassung der Kinetik der Mercaptursäuren nach Fasten und anschließendem Konsum einer definierten Mahlzeit. Die Studie umfasste sechs Probanden (3 männlich, 3 weiblich), welche 150 g frisch hergestellte Kartoffelchips ($6,23 \pm 0,99$ $\mu\text{g/g}$) konsumierten. Dies führte zu einer Acrylamid-Aufnahme von 938 μg (13,3 μmol) bzw. 12,4 $\mu\text{g/kg}$ KG. Die Probanden fasteten über 11 h vor

Studienbeginn und sollten während der Studie auch Lebensmittel verzichten, welche nach Erkenntnissen Acrylamid enthielten. Innerhalb von 72 h schieden die Probanden $50,0 \pm 9,4$ % ($6,60 \mu\text{mol}$) als AAMA und $5,9 \pm 1,2$ % ($0,77 \mu\text{mol}$) als GAMA aus. Während die mittlere Zeit bis zur maximalen Ausscheidung von AAMA 6,9 h bei 378 nmol/h und die Eliminations-Halbwertszeit 17,4 h betragen, wies GAMA mit 14,9 h bei 20 nmol/h bzw. 25,1 h höhere Werte auf [Fuhr *et al.*, 2006].

Eine vergleichbare Studie wurde von Watzek *et al.* [2012b] mit fünf männlichen Probanden durchgeführt, welche 175 g kommerziell erhältliche Kartoffelchips mit einem Acrylamid-Gehalt von $249 \pm 12 \mu\text{g/kg}$ nach einer Fastenperiode von 11 h konsumierten. Dies entsprach einer Acrylamid-Aufnahme von $44 \mu\text{g}$ bzw. $0,6 \mu\text{g/kg KG}$. Nach 11 h Fasten lag die Ausscheidung der Mercaptursäuren bei $0,05 \pm 0,02 \mu\text{mol/g ucr}$ (AAMA) und $0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol/g ucr}$ (GAMA). Nach dem Verzehr der Kartoffelchips erreichte die AAMA-Ausscheidung das Maximum von $0,16 \pm 0,03 \mu\text{mol/g ucr}$ nach 6 h. Die Halbwertszeit betrug 12 h. Im Gegensatz zu anderen Publikationen lag der Zeitpunkt der maximalen GAMA-Ausscheidung von $0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol/g ucr}$ wie bei AAMA ebenfalls bei 6 h [Watzek *et al.*, 2012b].

In einer humanen Interventionsstudie an 101 Probanden (41 männlich, 60 weiblich) wurde von Wang *et al.* [2017] ebenfalls der Einfluss des Verzehrs Acrylamid-haltiger Lebensmittel auf die Ausscheidung der Metaboliten AAMA, AAMA-SO, GAMA, und *iso*-GAMA untersucht. Die kinetischen Parameter der Mercaptursäuren der Studie von Wang *et al.* [2017] sind in Tabelle 2-7 dargestellt.

Tabelle 2-7 Kinetische Parameter der Mercaptursäure-Ausscheidung nach Konsum von Kartoffelchips, entsprechend einer Acrylamid-Aufnahme von $12,6 \mu\text{g/kg KG}$, einer humanen Interventionsstudie von Wang *et al.* [2017].

Parameter	AAMA	AAMA-SO	GAMA	<i>iso</i> -GAMA
$t_{1/2\alpha}$ [h]	14,6	38,4	23,0	38,6
$t_{1/2\beta}$ [h]	2,8	5,1	6,8	4,1
c_{max} [nmol/g ucr]	1533,4	324,4	138,0	44,8
t_{max} [h]	11,5	18,5	19,4	16,0
AUC [nmol/g ucr h]	43.711,8	24.401,8	7.545,7	3.247,9

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein; AAMA-SO *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein-*S*-oxid; AUC Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (engl. *area under curve*); c_{max} maximale Konzentration nach Acrylamid-Aufnahme; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; *iso*-GAMA *N*-Acetyl-*S*-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; $t_{1/2\alpha}$ Eliminationshalbwertszeit; $t_{1/2\beta}$ Verteilungshalbwertszeit; t_{max} Zeitpunkt der maximalen Konzentration

Nach 24 h Einhalten restriktiver Ernährungsvorgaben, welche Lebensmittel verboten, die bekannt für hohe Acrylamid-Gehalte waren, lag die renale Konzentration von AAMA bei $41,3 \pm 22,3 \text{ ng/ml}$ ($239,4 \pm 137,2 \text{ nmol/g ucr}$), von AAMA-SO bei $22,2 \pm 8,3 \text{ ng/ml}$ ($120,1 \pm 48,3 \text{ nmol/g ucr}$), von GAMA bei $9,7 \pm 6, \text{ ng/ml}$ ($53,0 \pm 36,6 \text{ nmol/g ucr}$) und von *iso*-GAMA bei $5,1 \pm 3,0 \text{ ng/ml}$ ($27,5 \pm 17,0 \text{ nmol/g ucr}$). Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Mercaptursäure-Ausscheidung von männlichen zu weiblichen Probanden, wenn die Mercaptursäure-Ausscheidung

auf das ebenfalls renal ausgeschiedene ucr bezogen wurde. Eine Sub-Gruppe (n=20) erhielt in China kommerziell erhältliche Kartoffelchips ($6,30 \pm 0,97 \mu\text{g/g}$), welches in einer Acrylamid-Aufnahme von $12,6 \mu\text{g/kg KG}$ resultierte [Wang *et al.*, 2017].

Die der in dieser Arbeit beschriebenen Humanstudie I vorausgehende humane Interventionsstudie von Ruenz *et al.* [2016] untersuchte die Kinetik der Mercaptursäuren AAMA und GAMA in Abhängigkeit einer kontrollierten Ernährung an 14 Probanden über einen Zeitraum von neun Tagen. An zwei Interventionstagen erhielten die Probanden Mahlzeiten mit niedrigen Acrylamid-Gehalten (Tag 4) bzw. hohen Acrylamid-Gehalten (Tag 7), welche zu Acrylamid-Aufnahmen von $0,06\text{--}0,08 \mu\text{g/kg KG}$ bzw. $1,3\text{--}1,8 \mu\text{g/kg KG}$ führten. An den restlichen Studientagen erhielten die Probanden eine Acrylamid-minimierte Ernährung (*Washout*), die in einer Acrylamid-Aufnahme von $<41 \text{ ng/kg KG}$ resultierte. Die Abschätzung der Acrylamid-Aufnahme erfolgte hierbei anhand von Duplikat-Mahlzeiten, welche auf ihre Gehalte an Acrylamid untersucht wurden. Nach niedriger bzw. hoher Acrylamid-Aufnahme wurden innerhalb von 24 h 27–30 % als AAMA bzw. 3–4 % als GAMA ausgeschieden sowie innerhalb von 72 h 58 % als AAMA und 7–10 % als GAMA. Die von Ruenz *et al.* [2016] ermittelten kinetischen Parameter nach den beiden Interventionstagen sind in Tabelle 2-8 dargestellt.

Die hier beschriebenen Studien zeigen, dass nach alimentärer Acrylamid-Aufnahme als Mercaptursäure vorwiegend und am schnellsten AAMA ausgeschieden wird. GAMA oder weitere Mercaptursäuren wie AAMA-SO und *iso*-GAMA werden in geringen Mengen und über einen größeren Zeitraum ausgeschieden. Ebenso zeigte sich in allen neueren Studien, dass auch nach Fasten oder minimierter alimentärer Acrylamid-Aufnahme über mehrere Tage (24–72 h) die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren noch im Urin nachweisbar waren.

Tabelle 2-8 Kinetische Parameter der Mercaptursäure-Ausscheidung nach niedriger (Tag 4) und hoher (Tag 7) Acrylamid-Aufnahme der humanen Interventionsstudie von Ruenz *et al.* [2016].

Parameter	Tag 4: 54,0 μg (0,6–0,9 $\mu\text{g/kg KG}$)		Tag 7: 108,4 μg (1,3–1,8 $\mu\text{g/kg KG}$)	
	AAMA	GAMA	AAMA	GAMA
c_{Washout} [$\mu\text{mol/g ucr}$]	0,05	0,01	0,06	0,01
c_{max} [$\mu\text{mol/g ucr}$]	0,15	0,02	0,29	0,03
t_{max} [h]	8–12	12–24	24–28	24–28
AUC [4 h x $\mu\text{mol/g ucr}$]	0,58	0,01	1,72	0,12

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; AUC Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (engl. *area under curve*); c_{Washout} Konzentration nach der jeweiligen *Washout*-Phase; c_{max} maximale Konzentration nach Acrylamid-Aufnahme; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(carbamoyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cystein; t_{max} Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung

Anhand der renalen Level der Mercaptursäuren kann darüber hinaus auf die Höhe der Exposition mit Acrylamid geschlossen werden. Eine Studie von Heudorf *et al.* [2009] schätzte die Acrylamid-Exposition von 110 Kindern (63 Jungen, 47 Mädchen) im Alter von 5–6 Jahren anhand der Ausscheidung von AAMA und GAMA ab, welche in einer vormittags gewonnenen Spoturin-Probe bestimmt wurden. Die mittlere AAMA-Ausscheidung der Kinder lag bei $57,8\text{--}119,5 \mu\text{g/l}$

($767 \pm 98,7 \mu\text{g/g ucr}$), der Median bei $36,0 \mu\text{g/l}$ und das 95. Perzentil bei $152,7 \mu\text{g/l}$ ($1587 \mu\text{g/g ucr}$). Als weiterer Metabolit wurde GAMA mit im Mittel $18,3 \pm 15,3 \mu\text{g/l}$ ($25,8 \pm 13,9 \mu\text{g/g ucr}$), einem Median von $13,4 \mu\text{g/l}$ und einem 95. Perzentil von $55,9 \mu\text{g/l}$ ($57,8 \mu\text{g/g ucr}$) bestimmt. Die aus der Summe von AAMA und GAMA resultierende Acrylamid-Aufnahme wurde anhand von zwei Modellen kalkuliert. Anhand einer volumen-basierten Ansatzes ergab sich eine Exposition von $0,54 \mu\text{g/kg KG}$ mit einem 95. Perzentil von $1,91 \mu\text{g/kg KG}$, während die Exposition durch einen ucr-basierten Ansatz mit $0,88 \mu\text{g/kg KG}$ und einem 95. Perzentil von $2,27 \mu\text{g/kg KG}$ höher eingeschätzt wurde. Darüber hinaus konnten die Autoren eine positive Korrelation zwischen der Aufnahme von hocherhitzten Kartoffelprodukten und der Ausscheidung beider Mercaptursäuren feststellen. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit Passivrauchen (≥ 1 Familienmitglied Raucher bzw. Tabak rauchende Personen im gleichen Haushalt) [Heudorf *et al.*, 2009].

2.2.1.2. Hämoglobin-Addukte als Langzeit-Expositionsbiomarker

Sowohl Acrylamid als auch dessen Metabolit Glycidamid können kovalent an Nukleophile wie Amino- und Thiolgruppen des Hämoglobins binden. Die durch Reaktion am *N*-terminalen Valin entstehenden Hb-Addukte von Acrylamid, *N*-(2-carbamoyl-ethyl)-valin (AAVal), und Glycidamid, *N*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin (GAVal), können dabei mittels modifiziertem Edman-Abbau (*N*-Alkyl-Edman-Verfahren) mit anschließender Derivatisierung in Blutproben mittels GC-MS/MS oder HPLC-MS/MS quantifiziert werden [Törnqvist *et al.*, 1986; Bergmark *et al.*, 1993; Bergmark, 1997; Hagmar *et al.*, 2001; Paulsson *et al.*, 2003; Bjellaas *et al.*, 2007a; Hartmann *et al.*, 2008; Stedingk *et al.*, 2010; Vikström *et al.*, 2012; Carlsson *et al.*, 2014].

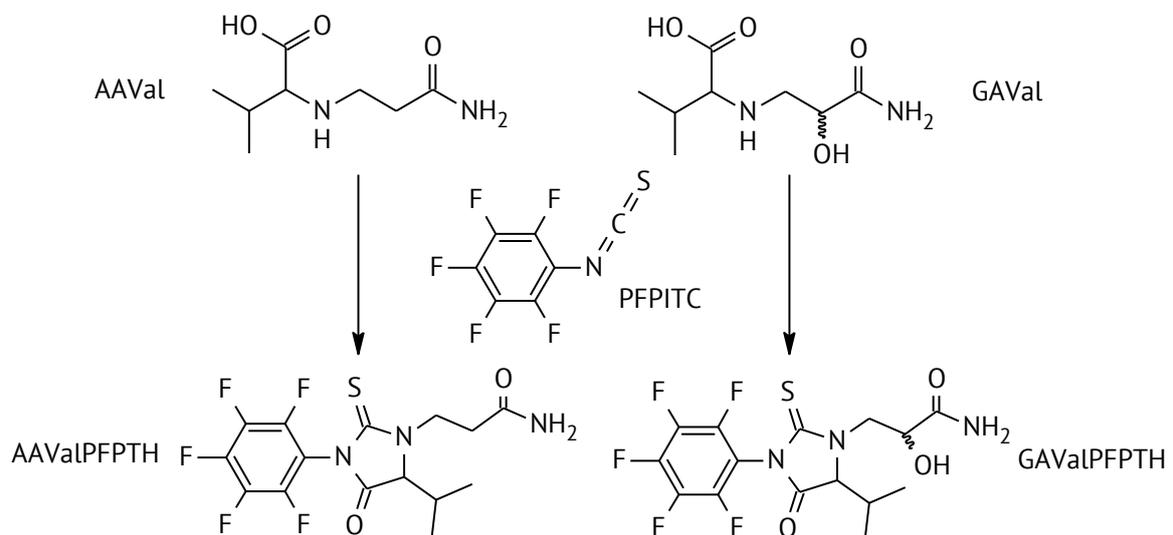


Abbildung 2-5 Acrylamid- (AAVal) bzw. Glycidamid-Addukte (GAVal) an das *N*-terminale Valin des Hämoglobins mit anschließender Derivatisierung mit Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPITC) und Freisetzung der Thiohydantoin-Derivate AAVaIPFPPTH und GAValPFPPTH [modifiziert nach Paulsson *et al.*, 2003].

Wie in Abbildung 2-5 dargestellt, beinhaltet diese Methode eine Kupplung von Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPITC) oder eines vergleichbaren Derivatisierungsreagenz wie

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an das *N*-terminale Valin des zuvor isolierten Hämoglobins. Durch Zyklisierung spaltet sich der substituierte Valin-Rest ab, welches durch den Gem-Dialkyl-Effekt im Vergleich zu unsubstituierten *N*-terminalen Valin-Resten begünstigt wird. Die so entstehenden Thiohydantoine 1-(2-Carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin (AAValPFPTH, ausgehend von Acrylamid) und 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin (GAValPFPTH, ausgehend von Glycidamid) können nach Aufreinigung quantitativ bestimmt werden [Rydberg *et al.*, 2002; Paulsson *et al.*, 2003].

Im Gegensatz zu Mercaptursäuren in Urin können AAVal und GAVal bedingt durch die Lebenszeit von humanen Erythrozyten für circa 120 Tage nachgewiesen werden, sodass diese als Langzeit-Expositionsbiomarker einer Acrylamid-Exposition angesehen werden können [Fennell *et al.*, 1992; Schettgen *et al.*, 2004; Rietjens *et al.*, 2018; Eisenbrand, 2020]. Eine Übersicht über bereits publizierte Daten zu Hb-Addukt-Leveln aus verschiedenen Humanbiomonitoring-Studien geben Tabelle 2-9 für AAVal bzw. Tabelle 2-10 für GAVal.

Tabelle 2-9 Publierte Humanstudien zu AAVal-Leveln im Blut verschiedener Personengruppen.

Kollektiv	n	AAVal [pmol/g Hämoglobin]		Referenz
		Median°/Mittelwert*±SD	Min.–Max.	
Nichtraucher	25	21°	n. a.–50	[Schettgen <i>et al.</i> , 2003]
Raucher	47	85°	n. a.–294	
Nichtraucher	13	18° / 19* ±7	7–31	[Schettgen <i>et al.</i> , 2004]
Raucher	16	83° / 80* ±48	25–199	
Nichtraucher	60	26,8° / 27,6* ±7,3	17,6–51,0	[Urban <i>et al.</i> , 2006]
Raucher ¹	60	79,1° / 81,8* ±43,9	18,5–210,4	
Nichtraucher	44	36,8° / 38,4* ±11,9	17,9–65,5	[Bjellaas <i>et al.</i> , 2007a]
Raucher ³	6	165,8° / 154* ±46,3	98,9–211	
Nichtraucher ⁴	91	30°	15–71	[Hartmann <i>et al.</i> , 2008]
Nichtraucher	53	42,0* ±14,2	n. a.	[Kotova <i>et al.</i> , 2015]
- Vegetarier	24	43,9* ±17,0		
- Nicht-Vegetarier	29	39,7* ±9,9		
Nichtraucher	255	42,5°/ 48,4*	24,2–88,3 ⁵	[Vesper <i>et al.</i> , 2008]
-davon Deutsche	30	39,6°/ 40,2*	14,7–92,4	
Raucher	255	121° / 137*	44,0–285 ⁵	
-davon Deutsche	30	137° / 157*	32,1–371	

¹ Zigaretten pro Tag: 17,7* ±12,8 (1–56)

³ Zigaretten pro Tag: 14° (7–21)

⁴ Alter: 6–80 Jahre

⁵ Werte entsprechen 5. Perzentil bzw. 95. Perzentil

AAVal *N*-(2-carbamoylethyl)-valin; n Anzahl der Proben; Min. Minimum; Max. Maximum; SD Standardabweichung

Tabelle 2-10 Publierte Humanstudien zu GAVal-Leveln im Blut verschiedener Personengruppen.

Kollektiv	n	GAVal [pmol/g Hb]		Referenz
		Median°/Mittelwert*±SD	Min.–Max.	
Nichtraucher	13	18° / 17* ±4	9–23	[Schettgen <i>et al.</i> , 2004]
Raucher	16	44° / 53* ±30	22–119	
Nichtraucher	44	18,2° / 19,6* ±7,9	6,7–45,6	[Bjellaas <i>et al.</i> , 2007a]
Raucher ¹	6	83,2° / 76,5* ±26,3	29,1–99,0	
Nichtraucher ²	91	34	14–66	[Hartmann <i>et al.</i> , 2008]
Nichtraucher	53	48,8* ±17,0	n. a.	[Kotova <i>et al.</i> , 2015]
- Vegetarier	24	46,6* ±16,8	n. a.	
- Nicht-Vegetarier	29	51,4* ±17,2	n. a.	
Nichtraucher	255	39,9° / 43,3*	18,3–83,3 ³	[Vesper <i>et al.</i> , 2008]
-davon Deutsche	30	34,1° / 37,3*	11,2–96,6	
Raucher	255	92,8° / 101*	33,8–198 ³	
-davon Deutsche	30	96,1° / 102*	25,4–247	

¹ Zigaretten pro Tag: Median 14 (7–21)

² Alter: 6–80 Jahre

³ Werte entsprechen 5. Perzentil bzw. 95. Perzentil

GAVal N-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin; n Anzahl der Proben; Min. Minimum; Max. Maximum; SD Standardabweichung

In Blutproben von 91 Nichtrauchern (46 weiblich, 45 männlich, Alter: 6–80 Jahre) wurde ein Median von 30 pmol/g Hb für AAVal und ein Median von 34 pmol/g Hb für GAVal bestimmt. Während keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet werden konnten, variierten die Hb-Addukt-Level in abhängig vom Alter der Probanden. So wiesen 6–10 Jahre alte Kinder (n=12) mit 38 pmol/g Hb (Median) und 11–18-Jährige (n=11) mit 34 pmol/g Hb (Median) signifikant ($p < 0,05$) höhere AAVal-Level auf als Erwachsene mit 29 pmol/g Hb (Median der Altersgruppen von 21–80 Jahre) [Hartmann *et al.*, 2008].

Ein besonderes Augenmerk bei bisher publizierten Daten lag auf dem Vergleich der Langzeitexpositionsbiomarkern AAVal und GAVal zwischen Nichtrauchern und Rauchern, da neben der Zufuhr durch Lebensmittel auch die Aufnahme durch Zigarettenkonsum eine große Bedeutung für die chronische Acrylamid-Exposition darstellt.

Schettgen *et al.* untersuchten bereits 2003 in 72 Probanden, von denen 25 Nichtraucher und 47 Raucher waren, die AAVal-Level im Blut. Der Median für Nichtraucher lag bei 21 pmol/g Hb bei einem Maximum von 50 pmol/g Hb. Für Raucher wurden mit 85 pmol/g Hb (Median) bei einem Maximum von 294 pmol/g Hb entsprechend höhere Werte analysiert. Anhand dieser Werte und der Annahme einer Acrylamid-Elimination im Menschen von 0,15/h kalkulierten die Autoren eine Acrylamid-Aufnahme von 0,85 µg/kg KG für Nichtraucher entsprechend 60 µg/d bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75 kg. In Rauchern ergaben sich ungefähr viermal so hohe Level [Schettgen *et al.*, 2003].

In einer kurz darauffolgenden Publikation der gleichen Arbeitsgruppe wurden darüber hinaus neben AAVal- auch GAVal-Level in Blutproben von Rauchern (n=16) und Nichtrauchern (n=13)

bestimmt. Es wurden AAVal-Level im Blut für Nichtraucher mit 19 ± 4 pmol/g Hb und für Raucher mit 80 ± 48 pmol/g Hb detektiert. Lediglich die gemessenen Maxima variierten mit 31 pmol/g Hb bzw. 199 pmol/g Hb im Vergleich zur zuvor beschriebenen Studie. Die GAVal-Level im Blut lagen bei 17 ± 4 pmol/g Hb (9–23 pmol/g Hb) und 53 ± 30 pmol/g Hb (22–119 pmol/g Hb) für Nichtraucher bzw. Raucher. Entsprechend ergaben sich ein AAVal:GAVal-Verhältnis von 1:0,96 für Nichtraucher und 1:0,73 für Raucher, welches darauf hindeutete, dass bei einer Acrylamid-Aufnahme das als Teil des oxidativen Metabolismus gebildete Glycidamid-Hb-Addukt nicht in gleichem Maße ansteigt wie das entsprechende Acrylamid-Hb-Addukt des reduktiven Metabolismus [Schettgen *et al.*, 2004].

Die Differenzierung zwischen Rauchern und Nichtrauchern erfolgte in beiden Studien anhand der simultanen Bestimmung eines Acrylnitril-Hb-Adduktes, welches als spezifisch für Tabakrauchen gilt [Schettgen *et al.*, 2003; Schettgen *et al.*, 2004].

Vergleichbare AAVal-Level bestimmte auch Urban *et al.* [2006] in Blutproben von jeweils 60 Nichtrauchern bzw. Rauchern (17,7 \pm 12,8 Zigaretten pro Tag) mittels GC-MS. Raucher hatten mit $81,8 \pm 43,9$ pmol/g Hb circa 3-fach höhere AAVal-Level als Nichtraucher mit $27,6 \pm 7,3$ pmol/g Hb. Eine Korrelation zwischen den AAVal-Leveln und der mittels siebentägigem, standardisierten Ernährungstagebuch abgeschätzten Acrylamid-Aufnahme konnte hingegen nicht gezeigt werden. Weitere Studien konnten ebenfalls keine oder nur eine geringe Korrelation der Hb-Addukte mit Abschätzungen der Acrylamid-Aufnahme anhand von Ernährungsfragebögen nachweisen.

So wurden von Bjellaas *et al.* [2007a] in je einer Blutprobe von 50 Probanden, von denen sechs Raucher mit einem Konsum von 7–21 Zigaretten pro Tag waren, beide Hb-Addukte bestimmt und zusätzlich standardisierte Fragebögen zum Lebensmittelkonsum (FFQ, engl. *food frequency questionnaires*) über das letzte Jahr vor der Studie ausgewertet. Während keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden beobachtet werden konnten, wiesen Raucher (n=6) mit $154 \pm 46,3$ pmol/g Hb (98,9–211 pmol/g Hb) für AAVal bzw. $76,5 \pm 26,3$ pmol/g Hb (29,1–99,0 pmol/g Hb) für GAVal signifikant ($p < 0,001$) höhere Konzentrationen auf als die nichtrauchenden Probanden (n=44) mit $38,4 \pm 11,9$ pmol/g Hb (17,9–65,5 pmol/g Hb) für AAVal und $19,6 \pm 7,9$ pmol/g Hb (6,7–45,6 pmol/g Hb) für GAVal. Zwar konnten die Autoren keine Korrelation dieser Hb-Addukt-Level mit der durchschnittlichen Acrylamid-Aufnahme von $13,7$ μ g/d für Nichtraucher, die anhand von FFQ kalkuliert wurde, aufstellen, sie identifizierten jedoch durch ein lineares Regressions-Modell Kartoffelchips/-snacks und Knäckebrot als unabhängige Anzeichen eines erhöhten Gesamtlevels an Hb-Addukten. Darüber hinaus korrelierten die AAVal-Level der Nichtraucher nicht mit den zuvor publizierten Mercaptursäure-Ausscheidungen des gleichen Probandenkollektivs [Bjellaas *et al.*, 2007a; Bjellaas *et al.*, 2007b].

Neben vergleichenden Studien zu Hb-Addukten in Rauchern und Nichtrauchern wurden ebenso der Einfluss unterschiedlicher Ernährungsgewohnheiten auf die Langzeit-Expositionsbiomarker untersucht. Im Mittel lagen im Blut 29 nicht-vegetarischer Probanden $39,7 \pm 9,9$ pmol/g Hb AAVAl bzw. $51,4 \pm 17,2$ pmol/g Hb GAVAl vor. Die sich vegetarisch ernährenden Probanden (n=24) wiesen

mit $43,9 \pm 17,0$ pmol/g Hb (AAVal) und $46,6 \pm 16,8$ pmol/g Hb (GAVal) vergleichbare Level auf, sodass kein signifikanter Unterschied zwischen der Langzeit-Exposition an Acrylamid anhand der Hb-Addukte abgeleitet werden konnte [Kotova *et al.*, 2015].

In einem umfangreichen Humanbiomonitoring, welche 510 Probanden verschiedener europäischer Nationalitäten der EPIC-Studie umfasste, wurden ebenfalls AAVal- und GAVal-Level im Blut bestimmt. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Studien waren sowohl die mittleren Konzentrationen von AAVal mit 48,4 pmol/g Hb als auch von GAVal mit 43,3 pmol/g Hb für Nichtraucher ($n=255$) im oberen Bereich. Bei Rauchern wurden mittlere AAVal-Level von 137 pmol/g Hb und mittlere GAVal-Level von 101 pmol/g Hb erfasst [Vesper *et al.*, 2008].

2.2.2. Biomarker einer Tabakrauch-Exposition

Um eine mögliche Exposition mit Tabakrauch oder Rauch aus anderen Verbrennungsprozessen anhand von Biomarkern abschätzen zu können, ist es notwendig, Metaboliten zu identifizieren, welche aus Vorläuferverbindungen hervorgehen, die spezifisch bei diesen Prozessen entstehen. Im Rahmen der Humanstudie II wurden als solche Expositionsbiomarker die renal ausgeschiedene Mercaptursäure des Acrylnitrils, welches bei Verbrennungsprozessen wie dem Tabakrauchen gebildet wird, sowie Cotinin als Metabolit des im Tabak vorkommenden Nikotins verwendet.

2.2.2.1. Cotinin als Expositionsbiomarker von Nikotin

Bei Cotinin handelt es sich um den vorwiegend gebildeten Metaboliten des Nikotins. Die Bildung erfolgt hierbei CYP450 2A6 vermittelt über ein Nikotin-1'(5')-Iminium-Ion, welches in einem zweiten Schritt mittels Aldehydoxidase zu Cotinin metabolisiert wird (siehe Abbildung 2-6) [Benowitz *et al.*, 1983].

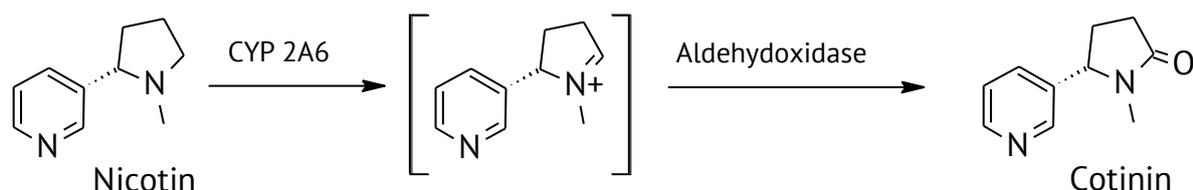


Abbildung 2-6 Metabolische Bildung von Cotinin aus Nicotin über das Nikotin-1'(5')-Iminium-Ion [modifiziert nach Benowitz und Jacob, 1987].

Obwohl Nikotin im Mittel zu 72 % (55–92 %) zu Cotinin metabolisiert wird [Benowitz und Jacob, 1994], finden sich nur circa 10–15 % des durch Tabakrauch aufgenommenen Nikotins als Cotinin im Urin wieder, da dieses weiter metabolisiert wird [Benowitz *et al.*, 1994].

Dennoch wird Cotinin häufig als Biomarker für eine direkte oder indirekte Tabakrauchexposition verwendet und lässt sich unter anderem im Plasma, Urin und Speichel nachweisen [Hukkanen *et al.*, 2005; Benowitz, 1996]. Dies liegt unter anderem an der längeren Eliminationshalbwertzeit, welche bei Cotinin mit 770–1.130 min (entsprechend ~13–19 h) wesentlich länger ist als bei Nikotin mit 100–150 min [Hukkanen *et al.*, 2005; Benowitz und Jacob, 1994].

Zur Verwendung von Cotinin als Expositionsbiomarker für Nikotin sind zahlreiche Studien in der Literatur publiziert. Diese erfassen unterschiedliche Level an Cotinin, um zwischen aktiven

Tabakkonsum, passiver Tabakrauchexposition und keiner Exposition unterscheiden zu können [Wald *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1990; Schettgen *et al.*, 2009].

Wald *et al.* [1984] untersuchten den Urin von Nichtrauchern (n=221) und Rauchern (n=232) auf dessen Cotinin-Gehalte mittels Radioimmunoassay und unterschieden dabei bei Nichtrauchern die Dauer der Exposition zu Tabakrauch und bei Rauchern die Art des Tabakkonsums. Es zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der Cotinin-Level mit zunehmender Dauer der Tabakrauchexposition bei Nichtrauchern. Während Nichtraucher mit einer Tabakrauch-Exposition zwischen 0–1,5 h/Woche lediglich im Mittel $2,8 \pm 3,0$ ng/ml Cotinin ausschieden, schieden bereits Nichtraucher, welche 4,5–8,6 h/Woche Tabakrauch-exponiert waren, $5,3 \pm 4,3$ ng/ml Cotinin aus. In den beiden höchsten exponierten Nichtraucher-Gruppen setzte sich dieser Trend mit $14,7 \pm 19,5$ ng/ml (8,6–29 h/Woche) und $29,6 \pm 73,7$ ng/ml (20–80 h/Woche) fort. Der Median der Zigaretten-Raucher (n=131) lag im Vergleich hierzu bei 1.645 ng/ml, das 10. Perzentil bei 537 ng/ml sowie das 90. Perzentil bei 3.326 ng/ml [Wald *et al.*, 1984].

In einer weiteren Studie wurden nichtrauchende Probanden nach ihrem Zusammenleben mit Nichtrauchern oder Rauchern unterteilt. Das geometrische Mittel der Cotinin-Konzentration im Urin von 158 Probanden, welche alleine oder in einem Haushalt mit einem weiteren Nichtraucher lebten, lag in dieser Studie bei 4,4 ng/ml, das 95 % Konfidenzintervall lag bei 3,6–5,4 ng/ml. Im Vergleich hierzu lag die gemessene Cotinin-Konzentration von Probanden, welche mit Rauchern zusammenlebten (n=26), bei 11,4 ng/ml (6,9–18,9 ng/ml). Das arithmetische Mittel von Rauchern (n=49) lag mit 1.691 ng/ml deutlich über den Leveln der Nichtraucher [Thompson *et al.*, 1990].

Zur Unterscheidung von Rauchern und Nichtrauchern mit unterschiedlicher Exposition zu Tabakrauch haben sich ähnliche Cotinin-level etabliert. So können gemäß der Arbeitsgruppe „*Analyses of hazardous substances in biological materials*“ der Deutschen Forschungsgesellschaft Probanden mit Cotinin-Leveln zwischen 10–20 µg/l als Grenzwert zwischen Nichtrauchern und Passivrauchern sowie ein Bereich von 60–120 µg/l zur Unterscheidung von passiven zu aktiven Rauchern herangezogen werden [Angerer und Schaller, 2001; Schettgen *et al.*, 2009].

Schettgen *et al.* [2009] unterteilten 210 Probanden ihrer Studie in Nichtraucher anhand von Cotinin-Leveln < 5 µg/l, in Nichtraucher mit niedriger Exposition zu Tabakrauch mit Cotinin-Leveln < 10 µg/l bzw. hoher Exposition zu Tabakrauch mit Cotinin-Leveln zwischen 10–60 µg/l sowie aktiven Rauchern, deren Cotinin-Level in einem Bereich von 77–4.300 µg/l lagen [Schettgen *et al.*, 2009].

Eine weitere Expositionsquelle für Nikotin neben Tabakrauch stellen auch wenige Lebensmittel dar, bei denen es sich jedoch im Vergleich zu Tabakrauch um eine wesentlich geringere Expositionsquelle handelte. Benowitz [1996] schlussfolgerte, dass um typische Cotinin-Level in der Höhe einer Exposition durch Passivrauch zu erreichen, mindestens 0,8 kg Aubergine, 4,6kg Blumenkohl, 5,5 kg Kartoffeln oder 7,3 kg Tomaten täglich verzehrt werden müssten [Benowitz, 1996]. Auch Bramer und Kallungal [2003] schlussfolgerten, dass der Einfluss einer alimentäre Nikotin-Exposition auf die Cotinin-Level zur Unterscheidung des Rauchverhaltens zu vernachlässigen sei.

2.2.2.2. CYMA als Expositionsbiomarker von Acrylnitril

Acrylnitril (Prop-2-enitril) als einfachstes ungesättigtes Nitril findet industrielle Anwendung in der chemischen Großsynthese sowie Polymerchemie. Zur Exposition mit Acrylnitril kann es demnach durch Exposition am Arbeitsplatz sowie bei Großbränden und durch Tabakrauch kommen [Minet *et al.*, 2011]. So enthält der Hauptstrom einer Zigarette circa 10 µg Acrylnitril [Hecht, 2003] in einem Bereich von 3–15 µg/Zigarette [Hoffmann *et al.*, 2001].

N-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein (CYMA) gehört zu einer Reihe von Mercaptursäuren, welche aus der Ausgangsverbindung Acrylnitril hervorgehen. Der Metabolismus von Acrylnitril zu CYMA erfolgt analog der Mercaptursäure-Bildung aus Acrylamid und ist in Abbildung 2-7 dargestellt [Fennell *et al.*, 1991; Sumner *et al.*, 1997].

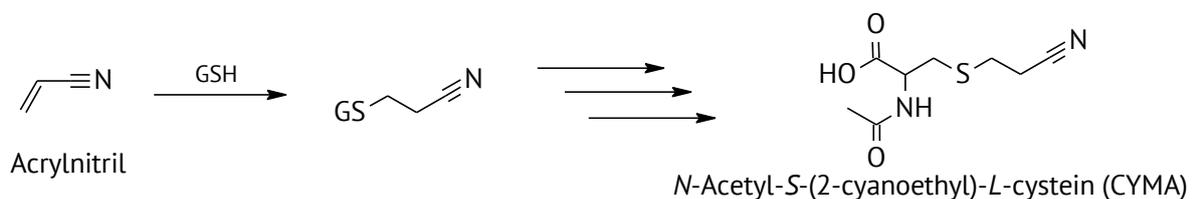


Abbildung 2-7 Metabolische Bildung von *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein (CYMA) ausgehend von Acrylnitril durch Konjugation mit Glutathion (GSH) und anschließendem Abbau [modifiziert nach Wu *et al.*, 2012].

Eine Studie mit sechs männlichen Probanden zeigte, dass nach Exposition von 5 bzw. 10 mg/m³ für bis zu 8 h 51 % der Dosis respiratorisch retardiert wurden, von denen sich 21,8 % im Urin als CYMA wiederfanden. Das gemessene Maximum lag in dieser Studie bei meist 6–8 h nach Expositionsbeginn, zeigte jedoch individuelle Verschiebungen. Die Elimination von Acrylnitril in Form von CYMA erfolgte dabei in einer Kinetik erster Ordnung mit einer Eliminationshalbwertszeit von circa 8 h [Jakubowski *et al.*, 1987].

Schettgen *et al.* [2009] untersuchten an 210 Probanden die Korrelation von CYMA mit Cotinin als Tabakrauch-Expositionsbiomarker anhand der Biomarker-Level in Spoturin-Proben. Die Probanden wurden anhand ihrer Cotinin-Level in vier unterschiedlich mit Tabakrauch exponierte Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 2.2.2.1). Nichtraucher ohne Exposition zu Tabakrauch (n=73) schieden im Median 2,0 µg/l CYMA in einem Bereich von <1–21,3 µg/l aus. Nichtraucher mit niedriger Tabakrauch-Exposition (n=38) schieden 3,2 µg/l (<1–19,9 µg/l) und solche mit hoher Tabakrauch-Exposition (n=18) schieden im Median 6,6 µg/l (<1–71,1 µg/l) aus. Im Vergleich hierzu lag der Median von aktiven Rauchern (n=81) mit 240 µg/l bei einem Bereich von 2,0–1.382 µg/l in einem signifikant höheren Bereich, welcher um circa den Faktor 100 die Ausscheidung der nichtrauchenden Probanden überstieg. Die Korrelation zwischen CYMA und Cotinin betrug dabei nach Pearson $r=0,734$ ($p>0,001$) [Schettgen *et al.*, 2009].

In einer Biomarker-Studie von Wu *et al.* [2012] wurden auch Spoturin-Proben von 36 Probanden auf deren Gehalte an CYMA analysiert. Von den Probanden waren 31 Nichtraucher sowie zwei Raucher. CYMA konnte in circa 70 % der Proben detektiert werden, deren geometrisches Mittel

bei 2,59 µg/g ucr lag und einen Bereich bis 111,70 µg/g ucr abdeckte. Auch diese Studie kam zu dem Schluss, dass die CYMA-Level gut mit Cotinin-Leveln korrelierten ($r_p=0,801$, $p<0,001$).

Luo *et al.* [2020] bestimmten in einer Studie mit 1.259 Rauchern (renales Cotinin ≥ 25 ng/ml) und 1.191 Nichtrauchern einen Grenzwert von 27 pmol/ml CYMA zur Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Die Autoren schlussfolgerten, dass aufgrund der Tatsache, dass Acrylnitril beim Verbrennen von Tabakprodukten entsteht, CYMA in Kombination mit Cotinin ebenso zur Unterscheidung von Zigaretten zu anderen Tabakprodukten wie E-Zigaretten geeignet sei, welche den Tabak nicht verbrennen.

Zu diesem Schluss kam ebenso eine Studie von Goniewicz *et al.* [2017], welche im Urin von 20 Probanden nach dem Wechsel von Zigaretten-Konsum zu E-Zigaretten-Konsum stark reduzierte CYMA-Gehalte fanden, die entsprechenden Cotinin-Werte jedoch nahezu unverändert blieben. So nahmen die CYMA-Level ausgehend von der Basislinie von 212 ± 178 µg/g ucr nach einer Woche E-Zigarettenkonsum anstelle von Zigarettenkonsum auf 51 ± 58 µg/g ucr und nach zwei Wochen auf 45 ± 66 µg/g ucr ab. Im Vergleich hierzu blieben die Cotinin-Level von der Basislinie mit 4.765 ± 3.163 µg/g ucr bis zur zweiten Woche mit 4.686 ± 4.409 µg/g ucr auf einem ähnlichen Niveau [Goniewicz *et al.*, 2017].

3. PROBLEMSTELLUNG

Während der thermischen Behandlung von Lebensmitteln wie dem Braten, Backen und Frittieren entsteht durch die nicht-enzymatische Bräunung, welche auch als Maillard-Reaktion bezeichnet wird, ein breites Spektrum an Substanzen, deren Aroma- und Geschmackseigenschaften vom Menschen als angenehm empfunden werden. Durch das Erhitzen von Lebensmitteln, insbesondere ab Temperaturen von 120 °C können jedoch auch unerwünschte Kontaminanten gebildet werden, zu welchen die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung Acrylamid zählt. Die hitzeinduzierte Bildung in Lebensmitteln erfolgt vorwiegend aus Asparagin und reduzierenden Zuckern, sodass insbesondere hocherhitzte Kartoffelprodukte wie Pommes frites oder Kartoffelchips, Getreideprodukte wie Knäckebrot und Frühstückszerealien, aber auch Kaffee hohe Mengen an Acrylamid enthalten können [Tareke *et al.*, 2002; Mottram *et al.*, 2002; Zyzak *et al.*, 2003]. Die sich hieraus ergebende tägliche Exposition wurde von der EFSA für Erwachsene auf 0,4–1,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ geschätzt [EFSA, 2015]. Neben einer alimentären Exposition kann eine Aufnahme von Acrylamid auch durch Exposition mit Tabakrauch erfolgen. So finden sich im Hauptstrom einer Zigarette circa 1,1–2,3 μg Acrylamid [Smith *et al.*, 2000]. Durch die darüber hinaus zahlreich beschriebenen toxikologischen Wirkungen wie Neurotoxizität, Reproduktionstoxizität und Kanzerogenität, ergibt sich eine Relevanz für die Risikobewertung [EFSA, 2015].

Eine erfolgreiche Risikobewertung setzt eine genaue Abschätzung der Exposition voraus. Hierzu kann neben einer direkten Bestimmung in verschiedenen Expositionsquellen wie Lebensmitteln auch ein Humanbiomonitoring durchgeführt werden, um anhand von Biomarkern eine innere Exposition bestimmen zu können. Zur Abschätzung einer Kurzzeit-Exposition haben sich für Acrylamid die renal ausgeschiedenen Mercaptursäuren AAMA und GAMA und als Langzeit-Biomarker die Hämoglobin-Addukte AAVal und GAVal etabliert [Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Fennell *et al.*, 2005].

In vorangegangenen Studien zeigte sich im Verhältnis zu einer definierten Acrylamid-Aufnahme über die Ernährung eine überproportionale Ausscheidung der Mercaptursäuren, welche als Indiz für eine mögliche endogene Bildung betrachtet wurde [Ruenz *et al.*, 2016; Watzek *et al.*, 2012a].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von niedriger und hoher Acrylamid-Aufnahme durch die Ernährung auf die renale Ausscheidung der Mercaptursäuren und die Level der Hämoglobin-Addukte im Blut zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war es, die Hypothese einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung im Menschen zu untermauern.

Hierzu wurde eine 13-tägige humane Interventionsstudie mit zwölf männlichen Probanden unter streng kontrollierten Bedingungen durchgeführt, deren Studiendesign auf den Arbeiten von Ruenz *et al.* [2016] aufbaute. Gruppe A erhielt eine Acrylamid-minimierte Diät (*Washout*) sowie an

einem Interventionstag Kaffee und an einem weiteren Interventionstag Mahlzeiten, aus denen eine hohe Acrylamid-Aufnahme resultiere (*high AA*). Gruppe B erhielt während des gesamten Studienzeitraums eine „*Washout*“-Diät und zusätzlich an einem Tag eine orale Einmalgabe von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid in Wasser.

Die alimentär aufgenommenen Mengen Acrylamid wurden entsprechend den Empfehlungen der EFSA [2015] mittels Duplikat-Dosimetrie bestimmt. Zudem erfolgte zur Erfassung der Exkretionskinetik die Bestimmung der Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Gesamturin sowie der Level der Hämoglobin-Addukte AAV_{al} und GAV_{al} zu drei Zeitpunkten im Blut der Probanden.

Darüber hinaus wurden hinsichtlich einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung einfache Modell-Reaktionen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von Ernährungsgewohnheiten und Lebensstils auf die Acrylamid-Exposition und Mercaptursäure-Ausscheidung zu erfassen.

Um diesen Aspekt näher zu betrachten wurde eine weitere Humanstudie an zehn Gemischtköstlern und 10 Veganern durchgeführt, welche im 10-tägigen Studienzeitraum ihre Ernährungspräferenzen und Lebensgewohnheiten beibehielten. Die Erfassung der alimentären Acrylamid-Aufnahme erfolgte anhand der Analyse der im Studienzeitraum konsumierten Lebensmittel, von denen die Probanden Duplikate anfertigten. Der Urin der Probanden wurde hinsichtlich der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der renalen Biomarker Cotinin und CYMA, durch welche eine unbeabsichtigte Acrylamid-Exposition in Form von Tabakrauch oder offene Feuer indirekt erfasst werden konnte.

Die quantitative Bestimmung der renalen Biomarker und der Hämoglobin-Addukte im Blut sowie der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln und Modell-Reaktionen sollte nach Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion (SPE) und chromatographischer Trennung mittels (Ultra-) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ((U)HPLC) und Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erfolgen. Die hierzu benötigten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und validiert oder im Arbeitskreis existierende Methoden weiter optimiert und ebenfalls validiert.

4. DURCHFÜHRUNG DER HUMANSTUDIE I

Bei Humanstudie I handelte es sich um eine 13-tägige Interventionsstudie mit zwölf männlichen Probanden, welche 2015 unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurde. Ziel der Studie war es, durch Gabe von stabilisotopen-markiertem Acrylamid im Vergleich zu einer definierten alimentären Acrylamid-Aufnahme zwischen exogenem und potentiell endogenen Acrylamid unterscheiden zu können. Hierfür wurden zum einen die Mercaptursäuren AAMA, GAMA sowie die stabilisotopen-markierte Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AAMA}$ und zum anderen die Hämoglobin-Addukte AAVal und GAVal erfasst. Die Bestimmung der alimentären Acrylamid-Aufnahme erfolgte anhand von Duplikat-Mahlzeiten.

4.1. Rechtliche Genehmigung und Finanzierung

Die Studie mit dem Titel „Humane Interventionsstudie zur endogenen Bildung von Acrylamid (AA) durch Erfassung von Mercaptursäuren im Urin nach AA-Aufnahme (*Human intervention study: urinary biomarker monitoring to elucidate background acrylamide exposure in comparison to dietary exposure using stable isotope labelling*)“ wurde am 21. Januar 2015 von der Ethik-Kommission des Landes Rheinland-Pfalz, Mainz, unter der Nummer 837.454.14 (9693) genehmigt.

Die Finanzierung der Studie erfolgte durch das *Institute for Scientific Information on Coffee* (Worcestershire, UK) im Rahmen eines Drittmittelprojektes.

4.2. Studienort

Als Studienort wurde das Naturfreundehaus Finsterbrunnertal in 67705 Schopp (Deutschland) gewählt, welches abgelegen inmitten des Pfälzer Waldes liegt und in dessen unmittelbarer Nähe es keinen Straßenverkehr, keine offenen Feuerstellen oder Tabakrauch gab. Somit konnten kontrollierte und gleiche Studienbedingungen für alle Probanden gewährleistet werden.

4.3. Studiendesign

Die 13-tägige Interventionsstudie wurde mit zwölf gesunden, männlichen Probanden vom 09.03.2015 (08:00 Uhr) bis zum 22.03.2015 (08:00 Uhr) unter streng kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Beginn jedes Studientages war 08:00 Uhr. Das Studiendesign ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

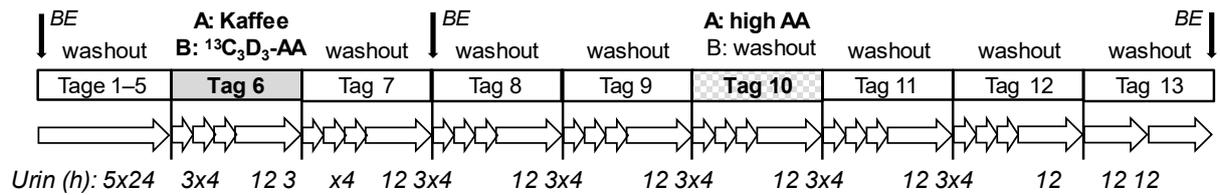


Abbildung 4-1 Studiendesign der 13-tägigen humanen Interventionsstudie I. Jeder Studientag begann um 08:00 Uhr. *Washout*: Acrylamid-minimierte Diät; Kaffee: 4x125 ml Kaffee über den Tag verteilt; $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AA}$: Gabe von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG des stabilisotopen-markierten $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-Acrylamids}$; *high AA*: Aufnahme stark erhitzter Lebensmittel.; BE: Blutentnahme.

Nach einer initialen *Washout*-Phase von fünf Tagen, während derer die Probanden eine Acrylamid-minimierte Diät (siehe Kapitel 4.4) zu sich nahmen, wurden die Probanden in zwei Gruppen aufgeteilt.

Gruppe A. An Tag 6 konsumierten die Probanden von Gruppe A zusätzlich zu Acrylamid-reduzierten *Washout*-Mahlzeiten insgesamt vier Tassen à 125 ml eines frisch gebrühten Kaffee-Getränkes. Der Verzehr je einer Tasse Studienkaffees erfolgte um 08:00 Uhr und 10:30 Uhr sowie von zwei Tassen Studienkaffee um 14:30 Uhr. Im Anschluss an Tag 6 folgten drei weitere Tage *Washout*. An Tag 10 erhielten die Probanden der Gruppe A Mahlzeiten aus (stark) erhitzten Lebensmitteln, von denen auszugehen war, dass sie hohe Mengen Acrylamid enthielten. Bis zum Studienende erfolgten erneut drei Tage *Washout*.

Gruppe B. An Tag 6 nahmen die Probanden der Gruppe B zusätzlich zu einer *Washout*-Mahlzeit vier Tassen heißes Wasser zu sich. Die Zeitpunkte entsprachen hierbei denen des Kaffeekonsums von Gruppe A. Zusätzlich erfolgte an Tag 6 um 08:00 Uhr eine Einmalgabe von stabilisotopen-markiertem $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-Acrylamid}$ in Mineralwasser mit einer Dosis von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG. Bei den restlichen Studientagen handelte es sich erneut um *Washout*.

Während des 13-tägigen Studienzeitraumes wurde der gesamte Urin der Probanden in unterschiedlichen Intervallen gesammelt. An den ersten fünf Studientagen erfolgte die Sammlung jeweils in 24-h-Intervallen von jeweils 08:00 Uhr bis 08:00 Uhr des Folgetages. Von Tag 6 bis einschließlich Tag 12 erfolgte die Sammlung tagsüber in 4-h-Intervallen (08:00–12:00 Uhr, 12:00–16:00 Uhr und 16:00 Uhr–20:00 Uhr) sowie in einem 12-stündigen Übernachtsintervall (20:00–08:00 Uhr des Folgetages). Am letzten Studientag 13 erfolgte die Sammlung des Urins in zwei 12-h-Intervallen.

An drei Tagen erfolgte zusätzlich eine Blutentnahme (BE) von jeweils drei Monovetten à 9 ml, bei der die Probanden nüchtern waren. Die 1. BE erfolgte unmittelbar vor dem Frühstück des ersten Studientages, die 2. BE zu Beginn des achten Studientages und die 3. BE am Ende des letzten Studientages.

4.4. Ernährungsplan und Kalorienaufnahme

Während des gesamten Studienzeitraumes von 13 Tagen mussten die Probanden den vorgegebenen Ernährungsplan ihrer jeweiligen Gruppe einhalten. Während der *Washout*-Phasen (Tage 1–5, 7–9, 11–13) wurden jeweils drei verschiedene Tagesmenüs (siehe Tabelle 4-1) zusammengestellt, die die Probanden alternierend serviert bekamen.

Tabelle 4-1 Ernährungsplan für das *Washout*-Mahlzeiten Nr. 1–3.

<i>Washout</i> -Mahlzeiten Nr. 1, verzehrt an den Tagen 1, 4, 7, 10 (nur Gruppe B), 13	
Frühstück (08:00 Uhr)	Naturjoghurt 3,5 % (200 g) Obstsalat aus Apfel, Birne, Banane (300 g) Honig (20 g) Orangensaft (200 ml)
Mittagessen (12:00 Uhr)	gekochte Kartoffeln (300 g) Kaisergemüse (200 g) Kräuterbutter (50 g) Apfelsaft (200 ml)
Snack (14:00 Uhr)	je 1 Banane und Orange (215 g) Griechischer Joghurt (150 g) Orangensaft (200 ml)
Abendessen (18:00 Uhr)	gekochte Spaghetti (250 g) Carbonara-Soße mit Sahne und gekochtem Schinken (150 g) gekochte Putenbrust ohne Haut (165 g) Apfelsaft (200 ml)
<i>Washout</i> -Mahlzeiten Nr. 2, verzehrt an den Tagen 2, 5, 8, 11	
Frühstück (08:00 Uhr)	Naturjoghurt 3,5 % (200 g) Obstsalat aus Apfel, Birne, Banane (300 g) Honig (20 g) Orangensaft (200 ml)
Mittagessen (12:00 Uhr)	gekochter Reis (250 g) Hühnerfrikassee (300 g) Apfelsaft (200 ml)
Snack (14:00 Uhr)	je 1 Banane und Apfel (215 g) Griechischer Joghurt (150 g) Orangensaft (200 ml)
Abendessen (18:00 Uhr)	gekochte Nudeln (250 g) Tomatensoße (150 g) gekochte Hackfleischbällchen (150 g) Naturjoghurt 3,5 % (150 g) Apfelsaft (200 ml)

Fortsetzung Tabelle 4-1 Ernährungsplan für das *Washout-Mahlzeiten* Nr. 1–3.

<i>Washout-Mahlzeiten</i> Nr. 3, verzehrt an den Tagen 3, 9, 12	
Frühstück (08:00 Uhr)	Naturjoghurt 3,5 % (200 g) Obstsalat aus Apfel, Birne, Banane (300 g) Honig (20 g) Apfelsaft (200 ml)
Mittagessen (12:00 Uhr)	gekochte Kartoffeln (300 g) Kräuterquark 40 % (150 g) Naturjoghurt 3,5 % (150 g) Kräuter (10 g) Apfelsaft (200 ml)
Snack (14:00 Uhr)	je 1 Orange und Apfel (120 g) Griechischer Joghurt (150 g) Apfelsaft (200 ml)
Abendessen (18:00 Uhr)	gekochte Gnocchi (350 g) Tomatensoße (150 g) Kaisergemüse (250 g) Apfelsaft (200 ml)

An Tag 6 erhielt Gruppe A zusätzlich zum *Washout-Mahlzeit* Nr. 3 vier Tassen schwarzen Kaffee (je 125 ml), welcher mit einer Kaffeepad-Maschine der Marke Senseo® (Philips GmbH, Hamburg, DE) frisch zubereitet wurde. Die Probanden bekamen jeweils eine Tasse zum Frühstück um 08:00 Uhr und um 10:30 Uhr sowie zwei Tassen zum Snack um 14:00 Uhr. Die Probanden von Gruppe B erhielten an Tag 6 ebenfalls *Washout-Mahlzeit* Nr. 3, konsumierten jedoch statt Kaffee die gleiche Menge an Wasser. Zudem erfolgte um 08:00 Uhr eine Einmalgabe von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid in Wasser, die einer Dosis von 1 µg/kg KG entsprach. Als Grundlage des Körpergewichts dienten die Daten der medizinischen Voruntersuchung (vgl. Tabelle 4-4).

An Tag 10 erhielten die Probanden der Gruppe A Mahlzeiten, bei denen hohe Acrylamid-Gehalte zu erwarten waren, welches im Folgenden als *high AA* bezeichnet wird. Der entsprechende Ernährungsplan ist in Tabelle 4-2 ersichtlich. Im Gegensatz zu dieser *high-AA*-Ernährung bekamen die Probanden von Gruppe B *Washout-Mahlzeit* Nr. 3.

Während des gesamten Studienzeitraumes war das Trinken von Mineralwasser *ad libitum* erlaubt. Alle Studienmahlzeiten wurden von dem Küchenpersonal des Naturfreundehauses Finsterbrunnertal in deren Küche zubereitet, zu der die Probanden keinen Zutritt erhielten. Dadurch wurde eine ungewollte Acrylamid-Exposition verhindert. Duplikate der verzehrfähigen Mahlzeiten wurden homogenisiert und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Während alle *Washout-Mahlzeiten* als komplette Mahlzeit homogenisiert wurden, wurden alle Lebensmittel der Interventionstage der Gruppe A separat homogenisiert und analysiert.

Tabelle 4-2 Ernährungsplan der Probanden der Gruppe A an Tag 10 (*high AA*).

<i>High AA, verzehrt an Tag 10 (nur Gruppe A)</i>	
Frühstück (08:00 Uhr)	Milch 3,5 % (150 ml) Kellogg's® Smacks® (100 g) Honig (20 g) Knäckebrot (54 g) Erdbeermarmelade (15 g) schwarzer Kaffee (250 ml)
Snack (10:30 Uhr)	schwarzer Kaffee (250 ml)
Mittagessen (12:00 Uhr)	selbstgemachte, frittierte Pommes frites (150 g) Hähnchenschnitzel (150 g) Ketchup (30 g)
Snack (14:00 Uhr)	schwarzer Kaffee (500 ml) Schwedische Hafertaler (50 g)
Abendessen (18:00 Uhr)	selbstgemachte, frittierte Pommes frites (250 g) Sour Cream (60 g)
Snack (20:00 Uhr)	Kartoffelchips Paprika (125 g)

Die tägliche Kalorienaufnahme während der Humanstudie I wurde mit Hilfe der Software Prodi 5.8 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland) ermittelt. Wie in Tabelle 4-3 dargestellt, betrug die durchschnittliche Energie-Aufnahme während der *Washout*-Phasen 2.408 ± 83 kcal/d. Somit wurde eine annähernd isokalorische Energie-Aufnahme erreicht. Während der Konsum von vier Tassen Kaffee an Tag 6 durch die Probanden der Gruppe A die Energie-Aufnahme nicht nennenswert erhöhte (2.367 kcal/d), nahmen die Probanden der Gruppe A an Tag 10 (*high AA*) mit 2897 kcal bedingt durch hochkalorische Lebensmittel mehr Energie auf als an den anderen Studientagen.

Tabelle 4-3 Kalorienaufnahme der Probanden während der 13-tägigen Humanstudie I.

	Energie [kcal/d]
<i>Washout</i> -Mahlzeit Nr. 1	2.481
<i>Washout</i> -Mahlzeit Nr. 2	2.430
<i>Washout</i> -Mahlzeit Nr. 3	2.355
Mittelwert der <i>Washout</i> -Tage	2.408 ± 83
Tag 6 (<i>Washout</i> Nr. 3 + Kaffee)	2.367
Tag 10 (<i>high AA</i>)	2.897

4.5. Auswahl und Rekrutierung der Probanden

Es wurden zwölf gesunde Probanden gemäß den folgenden Einschlusskriterien rekrutiert: Gesunde Männer, Alter 20–44 Jahre, europid (kaukasische Abstammung), Nichtraucher, regelmäßige Kaffeetrinker, BMI 19–25 kg/m², keine Einnahme von Medikamenten (auch keine

rezeptfreien Medikamente). Es wurden zudem nur Probanden eingeschlossen, die eine 13-tägige Studienphase im Finsterbrunnertal und *Washout*-Phasen ohne Kaffee tolerierten. Ausschlusskriterien waren des Weiteren die Einnahme von Medikamenten (auch rezeptfreie Medikamente) und Nahrungsergänzungsmitteln, ein BMI $>25 \text{ kg/m}^2$, Tabakkonsum, Ausübung von Leistungssport, vorhandene Stoffwechselstörungen und die Teilnahme an Blutspenden.

Die Probanden-Rekrutierung erfolgte im Januar 2015 universitätsintern durch Aushänge und das Intranet. Alle Interessierten erhielten am 5. Februar 2015 eine umfassende Information über die Studie und deren Verlauf. Nach ausreichender Bedenkzeit von mindestens 24 h wurde eine rechtswirksame Einwilligung der Probanden eingeholt.

4.6. Medizinische Voruntersuchung

Am 10. Februar 2015 wurde zur Überprüfung des gesundheitlichen Zustandes der Probanden eine medizinische Voruntersuchung durchgeführt. Neben einer kurzen Anamnese wurden Körpergröße, -gewicht und Blutdruck bestimmt sowie eine Blutprobe für labormedizinische Basislabor-Untersuchungen entnommen. Das Blutbild enthielt die Marker Kreatinin und Cystatin C für die Nierenfunktion sowie γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) für die Leberfunktion und C-reaktives Protein (CRP) als Marker für inflammatorische Vorgänge. Die Analyse der Blutproben wurde durch das Institut für Laboratoriumsmedizin der Westpfalz-Klinikum GmbH Kaiserslautern durchgeführt. Durch die medizinische Voruntersuchung ergaben sich keine Hinweise auf mögliche Erkrankungen der Probanden.

4.7. Probanden-Informationen und Randomisierung

Aus den während der medizinischen Voruntersuchung erhobenen Daten von Alter, Gewicht und Größe konnte der BMI bestimmt werden, welcher herangezogen wurde, um die zwölf Probanden in zwei Gruppen zu je sechs Probanden einzuteilen (siehe Tabelle 4-4). Im Mittel waren die Probanden zur Zeit der Voruntersuchung 25 ± 2 Jahre alt und hatten einen BMI von $23,8 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$. Nach der Randomisierung ergaben sich ein mittlerer BMI von $23,9 \pm 0,9 \text{ kg/m}^2$ für die Probanden der Gruppe A sowie ein mittlerer BMI von $23,8 \pm 1,4 \text{ kg/m}^2$ für die Probanden der Gruppe B. Im Folgenden werden die Probanden der Gruppe A als ‚Gruppe A‘ bezeichnet, die Probanden der Gruppe B entsprechend als ‚Gruppe B‘.

Tabelle 4-4 Randomisierung und Informationen über Alter, Körpergewicht, Körpergröße sowie *body mass index* (BMI) der Probanden der Humanstudie I zum Zeitpunkt der Voruntersuchung.

Proband	Gruppe	Körpergewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m ²]	Alter [Jahre]
P1	A	79,3	1,79	24,7	24
P2	B	80,9	1,825	24,3	24
P3	B	80,2	1,82	24,2	23
P4	A	81,5	1,89	22,8	24
P5	B	78,9	1,79	24,6	27
P6	B	79,1	1,855	23,0	24
P7	A	76,8	1,82	23,2	23
P8	B	64,8	1,74	21,4	22
P9	A	74,6	1,73	24,9	23
P10	A	80,8	1,83	24,1	27
P11	A	73,5	1,77	23,5	31
P12	B	86,4	1,845	25,4	24

4.8. Aktivitäten der Probanden während des Studienzeitraumes

Während des gesamten 13-tägigen Studienzeitraumes war es den Probanden nicht erlaubt, intensiven Sport zu treiben. Darüber hinaus wurden alle Tätigkeiten von den Probanden selber in Aktivitätsprotokollen selber protokolliert. Zu den protokollierten Tätigkeiten gehörten unter anderem Lernen, Fernsehen, Lesen, Computer/Spiele Spielen, Spaziergehen und Schlafen. Es wurden keine intensiven sportlichen Tätigkeiten dokumentiert oder vom Studienpersonal beobachtet.

5. DURCHFÜHRUNG DER HUMANSTUDIE II

Die zehntägige Humanstudie II wurde 2015 mit 20 Probanden unter normalen Lebensbedingungen durchgeführt. Das Ziel dieser Studie war es, bei Männern und Frauen mit unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten (Gemischtköstler und Veganer) unter normalen Lebensbedingungen die über Lebensmittel aufgenommene Acrylamid-Menge mit der renal ausgeschiedenen Menge der Mercaptursäuren AAMA und GAMA zu vergleichen. Mit dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil die Korrelation der Acrylamid-Aufnahme mit der Mercaptursäure-Ausscheidung beeinflussen und ob diese auch unter weniger strikt kontrollierten Bedingungen als in Humanstudie I möglich ist. Zusätzlich zu den Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren erfolgte die Bestimmung der renalen Biomarker Cotinin und CYMA, durch die Rückschlüsse auf eine mögliche Tabakrauch-Exposition gezogen werden sollten. Die Bestimmung der alimentären Acrylamid-Aufnahme erfolgte ebenso wie bei Humanstudie I anhand von Duplikat-Mahlzeiten, welche jedoch von den Studienteilnehmern bereitgestellt wurden.

5.1. Rechtliche Genehmigung und Finanzierung

Die Studie mit dem Titel „Studien zur Korrelation der Acrylamidaufnahme durch Lebensmittel mit der Ausscheidung von Metaboliten im Urin“ wurde am 21. April 2015 von der Ethik-Kommission des Landes Rheinland-Pfalz, ansässig in Mainz, unter der Nummer 837.029.15 (9797) genehmigt. Im Nachfolgenden wurden zwei weitere Amendments zur weiteren Verwendung der erhaltenen Proben eingereicht und genehmigt. Das erste Amendment, genehmigt am 17. Mai 2016, umfasste die Erlaubnis zur Quantifizierung von *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-*L*-cystein (HPMA) und *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-*L*-cystein (CEMA), beides Mercaptursäuren des Acroleins, in den vorhandenen Urinproben sowie das Erstellen eines Fragebogens zu den Aktivitäten der Probanden während des Studienzeitraumes. Die im Rahmen dieses Amendments erfassten Daten sind Teil der Dissertation von Frau Dr. Meike Rünz und werden in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet. Das zweite Amendment umfasste die Erlaubnis zur Bestimmung von CYMA und Cotinin in den Urinproben und wurde am 12. September 2017 genehmigt. Die Einwilligung zu dieser weiteren Nutzung der Urinproben gaben 16 von 20 Probanden. Die verbleibenden vier Probanden konnten rückwirkend nicht mehr erfolgreich kontaktiert werden.

Die Finanzierung der Studie erfolgte im Rahmen eines gemeinsamen Projektes mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung.

5.2. Studiendesign

Die zehntägige Humanstudie wurde aus logistischen Gründen in zwei Gruppen von Montag, den 29. Juni 2015, bis Mittwoch, den 8. Juli 2015, (Gruppe 1) bzw. von Montag, den 10. August, bis Mittwoch, den 19. August 2015, (Gruppe 2) durchgeführt. Eine Probandin (P10) führte die Studie vom Dienstag, den 30. Juni 2015, bis Donnerstag, den 09. Juli 2015, durch.

Der Beginn jedes Studientages war 08:00 Uhr. Während der Studie behielten die Probanden ihre bisherigen Ernährungsgewohnheiten sowie gewohnten Tagesabläufe bei. Alle im Studienzeitraum konsumierten Lebensmittel und Getränke wurden von den Probanden in einem Ernährungsprotokoll (Menge, Uhrzeit) dokumentiert (siehe Kapitel 5.3). Repräsentative Aliquote der verzehrten Lebensmittel wurden gesammelt, am Studienort homogenisiert und bis zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Im gesamten Studienzeitraum sammelten die Probanden in Intervallen von je 12 h den Gesamturin. Hieraus ergeben sich pro Studientag zwei Sammelzeiträume von 08:00–20:00 Uhr (1) und 20:00–08:00 Uhr (2). Zudem erfolgte die Abgabe einer Spoturin-Probe (3) am Ende des jeweiligen Studientages (vor 08:00 Uhr morgens nach dem Aufstehen, circa 50 ml), welche formal in den Zeitraum 20:00–08:00 Uhr (2) eingegliedert wurde. Die Urinproben wurden jeden Tag von den Probanden zum Studienort gebracht, wo sie aliquotiert (2x35 ml) und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert wurden.

5.3. Ernährung der Probanden

Alle von den Probanden im Studienzeitraum verzehrten Lebensmittel und Getränke wurden von den Probanden gewogen und zusammen mit der Uhrzeit in einem Ernährungsprotokoll notiert. Des Weiteren wurden repräsentative Aliquots der verzehrten Lebensmittel (>50 g) gesammelt, von denen im Anschluss die Acrylamid-Gehalte bestimmt wurden. Duplikate der in der Mensa der Technischen Universität Kaiserslautern (Hauptausgaben I und II; im Folgenden als „Mensa“ bezeichnet) von den Probanden konsumierten Mittagessen wurden von dem Studierendenwerk Kaiserslautern zur Verfügung gestellt und ebenfalls homogenisiert und bei -20 °C gelagert. Vor Studienbeginn erhielten alle Probanden eine Einweisung in das Anfertigen von repräsentativen Aliquots in Bezug auf Portionsgrößen und Verteilung der einzelnen Bestandteile. Alle Ernährungsprotokolle finden sich in Anhang A.7 (S. 200ff).

5.4. Retrospektive Aktivitäten der Probanden während des Studienzeitraumes

Im Rahmen des ersten Amendments wurde ein Fragenbogen (siehe Anhang A.8, S. 272) zu den Aktivitäten bzw. Aufenthaltsorten der Probanden während des Studienzeitraumes erstellt, welcher von den Probanden circa ein Jahr nach Studienende ausgefüllt wurde. Dieser diente dazu,

neben der alimentären Acrylamid-Exposition auch weitere exogene Acrylamid-Quellen identifizieren zu können. Es wurde gefragt, ob sich die Probanden während der Studie in der Nähe von offenen Feuern, in Bars, Discotheken, Restaurants bzw. in Raucherbereichen dieser Lokalitäten oder auf öffentlichen Veranstaltungen wie zum Beispiel einem Stadtfest aufgehalten haben. Ebenso wurden die Probanden gefragt, ob sie sich zeitweise in der Nähe von Rauchern aufgehalten und ob sie sich mehr in Innenräumen oder im Freien aufgehalten haben. Eine Übersicht der gegebenen Antworten findet sich in Anhang A.9 (S. 273).

5.5. Auswahl und Rekrutierung der Probanden

Es wurden insgesamt 20 gesunde Probanden rekrutiert, von denen jeweils zehn Gemischtköstler (fünf männlich, fünf weiblich) bzw. Veganer (fünf männlich, fünf weiblich) waren. Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 20–50 Jahren, kaukasische Abstammung, Nichtraucher, ein BMI zwischen 19–25 kg/m² und keine Einnahme von Medikamenten. Ausschlusskriterien waren des Weiteren die Einnahme von Medikamenten und Nahrungsergänzungsmitteln, ein BMI >25 kg/m², Tabakkonsum, das Ausüben von Leistungssport, vorhandene Stoffwechselstörungen und die Teilnahme an Blutspenden.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte lokal im Mai 2015 durch Aushänge und das Intranet der Technischen Universität Kaiserslautern. Am 10. Juni 2015 erhielten alle Interessierten eine ausführliche Information über die Studie. Nach ausreichender Bedenkzeit von mindestens 24 h wurde eine rechtswirksame Einwilligung der Probanden eingeholt.

5.6. Medizinische Voruntersuchung

Am 17. Juni 2015 wurde eine medizinische Voruntersuchung durchgeführt, um den gesundheitlichen Zustand der teilnehmenden Probanden zu gewährleisten. Neben einer kurzen Anamnese wurden Körpergröße und -gewicht der Probanden bestimmt. Weibliche Probanden erhielten einen Schwangerschaftstest. Ebenso wurde der Blutdruck gemessen und eine Blutprobe für labormedizinische Basislabor-Untersuchungen entnommen. Das Blutbild enthielt die Marker Kreatinin, Cystatin C, γ -GT, GOT, GPT und CRP. Die Analyse der Blutproben wurde wie bereits bei Humanstudie I durch das Institut für Laboratoriumsmedizin der Westpfalz-Klinikum GmbH Kaiserslautern durchgeführt. Es ergaben sich keine Hinweise auf mögliche Erkrankungen der Probanden.

5.7. Probanden-Informationen

Die an der Humanstudie II teilnehmenden Probanden konnten anhand ihrer Ernährungsgewohnheiten und ihres Geschlechts unterteilt werden, sodass nachfolgend die in Tabelle 5-1 ersichtliche Codierung der Probanden verwendet wird. Diese erfolgt nach der

Ernährungsform (GK für Gemischtköstler, V für Veganer), dem Geschlecht (m für männlich, w für weiblich) sowie einer fortlaufenden Nummer von 1–5. Zur Zeit der Voruntersuchung waren die Probanden im Mittel 26 ± 5 Jahre alt und hatten einen BMI von $22,2 \pm 2,2$ kg/m². Die vegan lebenden Probanden waren geringfügig jünger (26 ± 6 Jahre) als die Gemischtköstler (27 ± 5 Jahre) und wiesen mit $21,9 \pm 2,1$ kg/m² auch einen geringeren BMI auf als die Gemischtköstler mit $22,4 \pm 2,4$ kg/m². Nach jeweils zehn Tagen beendeten 19 von 20 Probanden die Studie erfolgreich. Der Proband V-m-5 musste die Studie aufgrund einer medizinisch notwendigen Operation nach Tag 9 vorzeitig beenden.

Tabelle 5-1 Informationen über Geschlecht, Körpergewicht, -größe, BMI und Alter der Probanden der Humanstudie II zum Zeitpunkt der Voruntersuchung sowie die in dieser Arbeit verwendete Codierung, die Ernährungsform während der Studie und die Gruppe der Studiendurchführung.

Proband	Codierung	Ernährung	Geschlecht	KG [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m ²]	Alter [Jahre]	Gruppe
P1	GK-m-1	GK	männlich	80,3	1,79	25,1	24	1
P2	GK-m-2	GK	männlich	80,3	1,89	22,5	24	1
P3	GK-m-3	GK	männlich	74,9	1,82	22,6	24	1
P4	V-m-1	V	männlich	83,7	1,84	24,7	20	1
P5	GK-m-4	GK	männlich	83,4	1,82	25,2	23	1
P6	V-m-2	V	männlich	76,8	1,79	24,0	22	1
P7	GK-w-1	GK	weiblich	49,5	1,63	18,6	26	1
P8	GK-w-2	GK	weiblich	54,0	1,60	21,1	23	1
P9	GK-w-3	GK	weiblich	56,5	1,72	19,1	40	1
P10	V-w-1	V	weiblich	59,8	1,71	20,4	28	1
P11	V-m-3	V	männlich	59,2	1,75	19,4	24	2
P12	V-m-4	V	männlich	79,1	1,85	23,1	26	2
P13	V-m-5	V	männlich	79,5	1,84	23,5	26	1
P14	V-w-2	V	weiblich	49,0	1,63	18,6	30	2
P15	GK-w-4	GK	weiblich	63,3	1,70	22,0	25	2
P16	V-w-3	V	weiblich	65,2	1,68	23,1	23	2
P17	V-w-4	V	weiblich	57,2	1,70	19,9	40	2
P18	V-w-5	V	weiblich	60,5	1,65	22,2	22	2
P19	GK-w-5	GK	weiblich	56,2	1,56	23,1	29	2
P20	GK-m-5	GK	männlich	80,6	1,79	25,2	27	2

BMI *body mass index*; GK Gemischtköstler; KG Körpergewicht; V Veganer

6. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1. Entwicklung und Validierung von analytischen Quantifizierungsmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Acrylamid in Lebensmitteln und in Modell-Reaktionen auch Expositionsbiomarker in Humanurin und Blutproben bestimmt. Hierzu zählten die Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA, die Hämoglobin-Addukte AAVal und GAVal sowie die beiden Tabakrauch-Biomarker Cotinin und CYMA, für die jeweils eine geeignete Analysenmethode entwickelt und validiert werden musste. Obwohl nicht inhaltlicher Teil dieser Arbeit wurden die Acrolein-Expositionsbiomarker CEMA und HPMA zusätzlich in die Quantifizierungsmethode der Mercaptursäuren AAMA und GAMA integriert. Für die Bestimmung einer Acrylamid-Bildung in Modell-Reaktionsansätzen musste die vorhandene Methode der Lebensmittelanalytik zur Verbesserung der Sensitivität optimiert werden.

6.1.1. Quantifizierung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren in Urin

Um die renale Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA der Probanden beider Humanstudien bestimmen zu können, wurde hierfür eine geeignete Methode zur Aufarbeitung und Quantifizierung der beiden Analyten in Urin entwickelt und validiert.

In der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richling, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, existierte bereits eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) zur Bestimmung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA sowie gleichzeitig zur Bestimmung von den Acrolein-assoziierten Mercaptursäuren HPMA und CEMA. Dabei erfolgte die Detektion der Mercaptursäuren in angesäuerten Urinproben nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung mittels SPE durch HPLC-ESI-MS/MS-Analytik. [Watzek *et al.*, 2012b; Ruenz *et al.*, 2016]. Die Methodenentwicklung und die zur Analytik der Mercaptursäuren final verwendete SIVA-Methode ist näher in Kapitel 9.6 beschrieben.

Auf Basis der von Ruenz *et al.* [2016] veröffentlichten HPLC-ESI-MS/MS-Methode wurde eine sensitivere Quantifizierungsmethode entwickelt, mit der neben der Bestimmung der bereits genannten Mercaptursäuren ebenso aus $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid hervorgehendes $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA erfasst werden konnte. Darüber hinaus wurden Qualifier-Spuren für alle Analyten in die *multiple reaction monitoring* (MRM) Methode implementiert sowie die zuvor verwendeten internen Standards durch an einer anderen Position stabilisotopen-markierte interne Standards ersetzt, welche nicht wie zuvor durch Synthese hergestellt wurden, sondern kommerziell erhältlich waren. Entsprechend wurden für alle Analyten und internen Standards erneut die substanzspezifischen MS-Parameter,

wie in Kapitel 9.2 beschrieben, optimiert. Die Optimierung der MS-Parameter für $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA erfolgte manuell über HPLC-Läufe und Messungen einer Studienprobe, da für diesen Analyten keine Reinsubstanz vorhanden war. Es konnten hingegen keine geeigneten Quantifizier- oder Qualifizier-Spuren für die in geringerem Umfang gebildete Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -GAMA identifiziert werden, sodass in den Urinproben der Gruppe B der Humanstudie I lediglich $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA neben den natürlich vorkommenden Mercaptursäuren AAMA und GAMA quantifiziert wurden.

Darüber hinaus wurde der MRM-Messmodus um einen *scheduled*-MRM™-Algorithmus erweitert, um insbesondere die Sensitivität der Detektion von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA zu erhöhen. Im *scheduled*-MRM-Modus wurden die Analyten lediglich in einem bestimmten Zeitfenster um ihre Retentionszeit detektiert, sodass *dwell-time* und Zykluszeit der massenspektrometrischen Detektion maximiert werden konnten. Die chromatographische Trennung der Analyten erfolgte durch *reversed phase* (RP-) Chromatographie auf einer Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μm) UHPLC-Säule mit entsprechender Vorsäule von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit Gradientenelution, wodurch die Zeit einer Messung von 37 min [Ruenz *et al.*, 2016] auf 12 min reduziert werden konnte. Ein entsprechendes UHPLC-MS/MS-Chromatogramm, gemessen im negativen *scheduled*-MRM-Modus, ist in Abbildung 6-1 dargestellt.

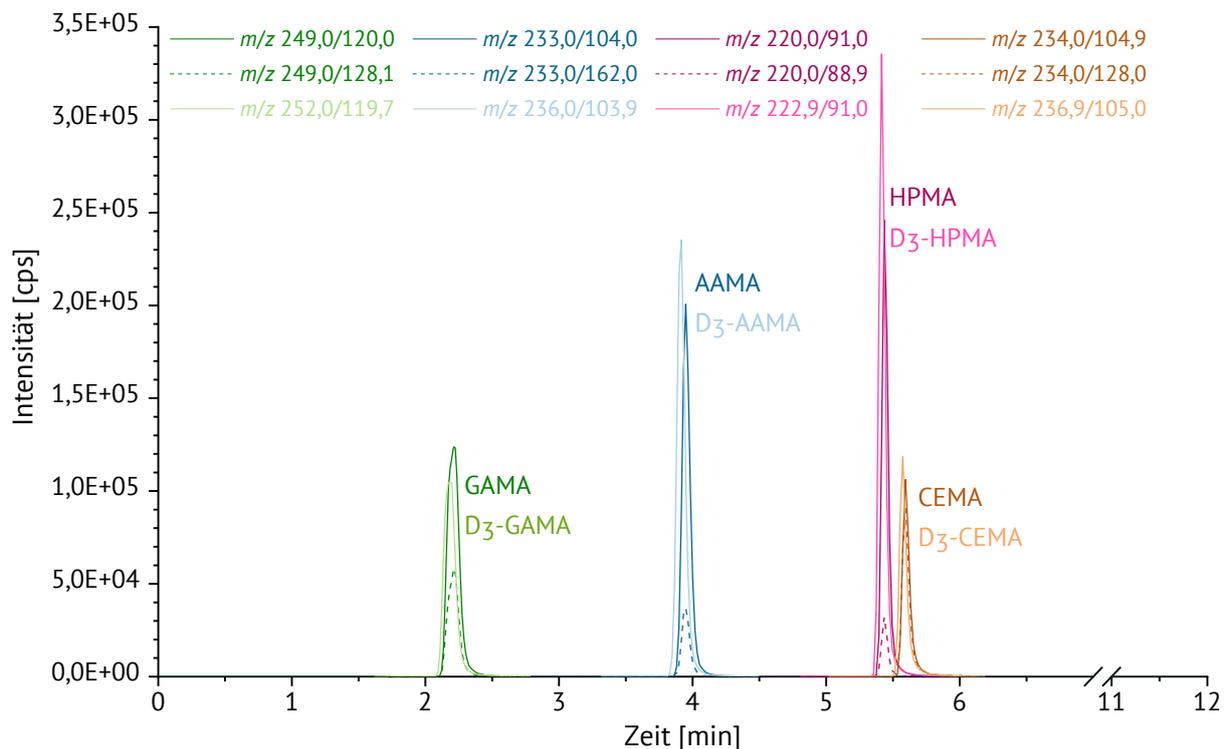


Abbildung 6-1 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen *scheduled*-MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 25 ng/ml AAMA, D₃-AAMA, GAMA, D₃-GAMA, HPMA, D₃-HPMA, CEMA, D₃-CEMA. AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein; CEMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein; HPMA *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein.

Während die Analyten GAMA ($t_R=2,2$ min) und AAMA ($t_R=3,9$ min) sehr gut voneinander chromatographisch getrennt werden konnten, zeigten die Peaks der Acrolein-Mercaptursäuren HPMA ($t_R=5,4$ min) und CEMA ($t_R=5,6$ min) eine geringfügige Überschneidung der Peakflächen. Bei

allen Analyten überschritten sich jedoch nicht die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der *Precursor*-Ionen oder deren Fragmente, sodass eine Unterscheidung trotz chromatographischer Überlagerung möglich war. Wie in Abbildung 6-2 anhand einer vermessenen Urinprobe zu sehen ist, zeigten sich ebenso keine Störpeaks zu den jeweiligen Retentionszeiten der Analyten.

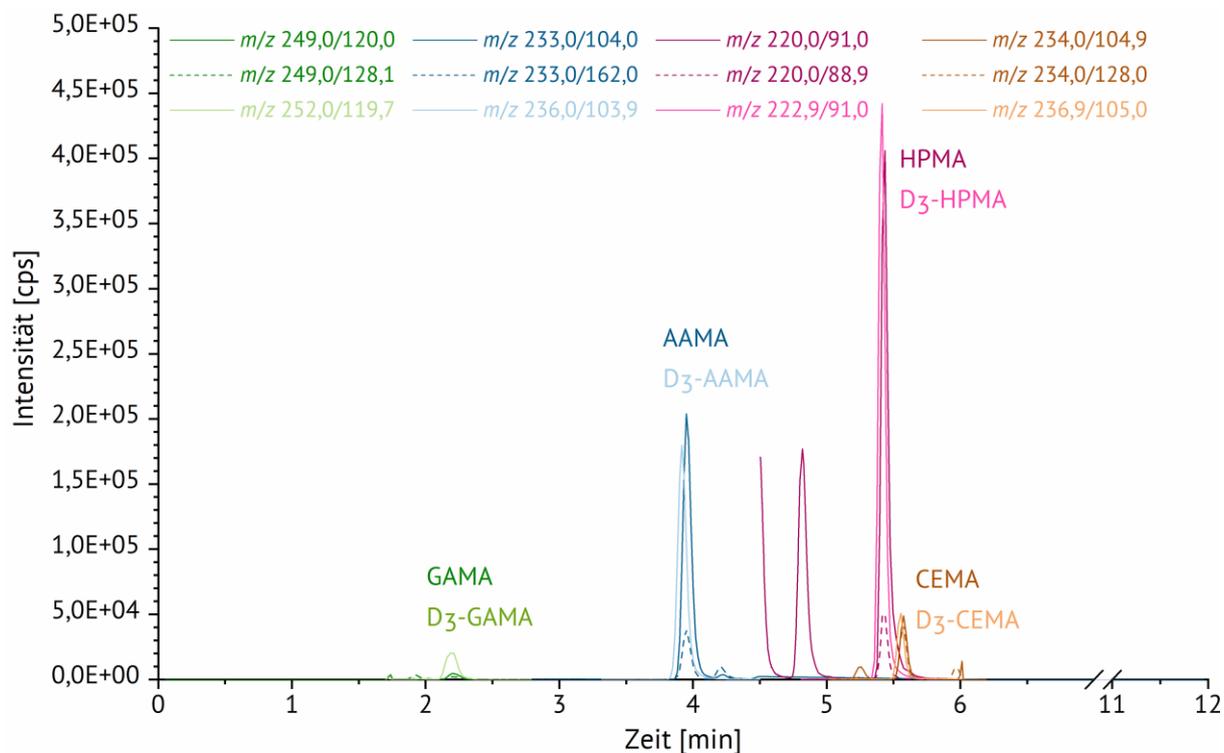


Abbildung 6-2 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen scheduled-MRM-Modus einer aufgearbeiteten Urinprobe (V-w-4 Tag 8(1) n=2, Humanstudie II) mit 100 ng D₃-AAMA, 25 ng D₃-GAMA, 200 ng D₃-HPMA und 50 ng D₃-CEMA als internem Standard. AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CEMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; HPMA *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein.

Durch die etablierte SIVA-Methode ergaben sich LOD- bzw. LOQ-Werte von 0,4–0,9 fmol für AAMA, 0,4–0,8 fmol für GAMA, 0,2–0,4 fmol für HPMA und 0,6–1,3 fmol für CEMA, welche empirisch ermittelt wurden und sich in dieser Arbeit aus einem Signal-zu-Rauschen- (S/N -) Verhältnis von mindestens 3 (LOD) bzw. 10 (LOQ) ergaben. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte UHPLC-MS/MS-Methode wies mit den in Tabelle 6-1 gelisteten Lauf-zu-Lauf-Variabilitäten und Tag-zu-Tag-Variabilitäten eine gute Messpräzision auf.

Tabelle 6-1 Messpräzision der Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren-Analytik.

Analyt	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Variabilität
AAMA	0,93	0,88
GAMA	0,68	0,67
HPMA	1,16	1,35
CEMA	0,98	0,95

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CEMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; HPMA *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein.

Neben der verkürzten Dauer eines UHPLC-Laufes konnte ebenfalls die bisherige Aufarbeitungszeit mittels Festphasenextraktion (SPE) reduziert werden, indem die eingesetzten Urinproben- und Lösungsmittelvolumina der zuvor verwendeten Methode der besseren Sensitivität der UHPLC-ESI-MS/MS-Methode angepasst wurden. Ebenso wurde empirisch die Durchlaufgeschwindigkeit der SPE erhöht, sodass sich die Aufarbeitungszeit einer Urinprobe um circa die Hälfte verkürzen ließ. Die Wiederfindungen der Analyten, welche jeweils mit vier verschiedenen Konzentrationen in Urin bestimmt wurden, betragen 91 ± 2 % (AAMA), 103 ± 2 % (GAMA), 95 ± 1 % (HPMA) und 102 ± 1 % (CEMA). Entsprechend konnte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte UHPLC-ESI-MS/MS-Methode mit Probenaufarbeitung mittels SPE dazu verwendet werden, um in den Urinproben der Humanstudien die Gehalte der Mercaptursäuren AAMA, GAMA und $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA ausreichend sensitiv und präzise zu bestimmen.

Die Bestimmung von HPMA und CEMA diente der Auswertung der Humanstudie II, welche bereits von Ruenz *et al.* [2019] publiziert wurden und nicht Teil dieser Arbeit waren.

6.1.2. Quantifizierung der Tabakrauch-Biomarker Cotinin und CYMA in Urin

Um die Metaboliten Cotinin und CYMA der im Tabakrauch vorkommenden Substanzen Nikotin bzw. Acrylnitril in den aufgearbeiteten Urinproben der Humanstudie II bestimmen zu können, musste hierfür eine geeignete Quantifizierungsmethode entwickelt werden. Teile dieser Methodenentwicklung wurden von Frau Muriel Kathinka Lieberum (B.Sc.) im Rahmen eines Forschungspraktikums im Master-Studiengang Lebensmittelchemie durchgeführt.

In der Literatur existieren überwiegend getrennte analytische Quantifizierungsmethoden für die beiden Analyten. Dies lässt sich zum einen damit begründen, dass Cotinin in der klinischen Analytik häufig Verwendung als Tabakrauch-Expositionsbiomarker findet und zum anderen, weil die Analyten bei massenspektrometrischer Detektion mit unterschiedlicher Polarisierung ionisiert werden müssen. Während sich CYMA lediglich negativ ionisieren lässt, weist positiv ionisiertes Cotinin die bessere Sensitivität auf. Entsprechend finden sich in der Literatur analytische Methoden, bei denen CYMA zusammen mit anderen Mercaptursäuren von beispielsweise weiteren flüchtigen organischen Verbindungen bestimmt wurde [Schettgen *et al.*, 2012; Alwis *et al.*, 2012]. Cotinin wurde hingegen meistens zusammen mit Nikotin, dessen weiteren Metaboliten oder anderen Tabakrauch-spezifischen Substanzen und Metaboliten wie zum Beispiel tabakspezifischen Nitrosaminen bestimmt. Dabei dienten als Probenmatrix neben Urin auch Speichel, Haar oder Blut [Kuo *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2010].

Da im Rahmen der Humanstudie II jedoch lediglich Cotinin und CYMA nachträglich in den bereits aufgearbeiteten Urinproben der Probanden, d. h. in den SPE-Eluaten, bestimmt werden sollten, wurde eine gemeinsame Quantifizierungsmethode für beide Analyten entwickelt. Die detaillierte Methodenentwicklung ist in Kapitel 9.7.1 beschrieben.

Durch Verwendung einer *shuttled*-MRM-Methode, bei der ein Ionisationswechsel zwischen zwei Messperioden eingestellt werden kann, konnte eine Quantifizierung beider Analyten in einem UHPLC-ESI-MS/MS-Lauf realisiert werden. Die chromatographische Separation von Cotinin

($t_R=2,2$ min) und CYMA ($t_R=3,8$ min) erfolgte mittels Gradientenelution (siehe Tabelle 9-7) auf einer Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μ m) UHPLC-Säule mit geeigneter Vorsäule von Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Ein entsprechendes Chromatogramm ist in Abbildung 6-3 dargestellt. Der sogenannte Perioden-Wechsel von positiver zu negativer Ionisierung wurde bei der Methodvalidierung nach 3 min gesetzt. Um auch breitere Cotinin-Peaks komplett erfassen zu können, wurde der Perioden-Wechsel bei den Messungen der aufgearbeiteten Urinproben auf 3,1 min geringfügig verschoben. Eine erneute Validierung der Methode war hierdurch nicht notwendig.

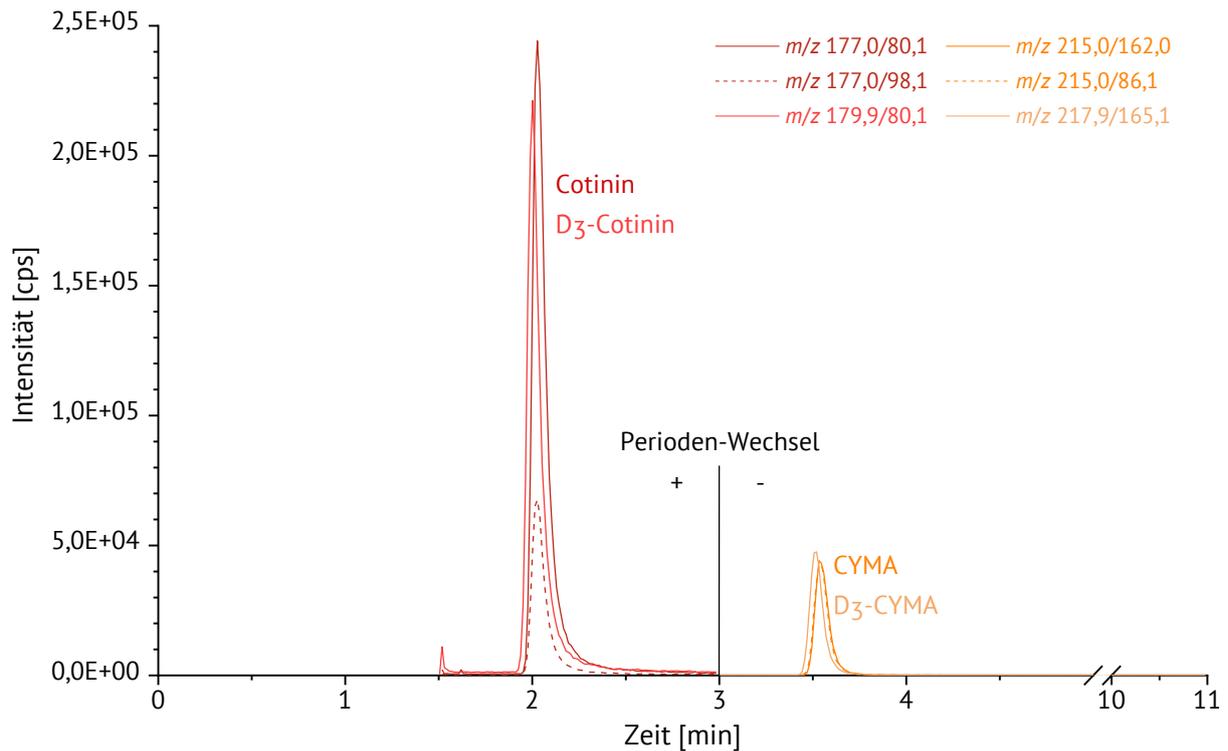


Abbildung 6-3 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im *shuttled*-MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 10 ng/ml Cotinin, D₃-Cotinin, CYMA, D₃-CYMA. Die Ionisierung erfolgt in der ersten Periode (0,00–2,99 min) im positiven Modus, in der zweiten Periode (3,00–11,00 min) negativ. Die MRM-Spur von D₃-CYMA wurde in der finalen Methode zur Messung der Studienproben der Humanstudie II entfernt.

Bedingt durch eine Verunreinigung im verwendeten D₃-CYMA-Standard, welche zu einem im Bereich zwischen LOD–LOQ auftretenden Peak des CYMA-Quantifiers m/z 215/162 führte, konnte der Analyt CYMA nicht durch SIVA mit D₃-CYMA als internem Standard quantifiziert werden. Stattdessen erfolgte die Quantifizierung von CYMA mittels externer Kalibration, während Cotinin mit D₃-Cotinin als internem Standard bestimmt wurde. Die Kalibriergerade von CYMA wurde entsprechend vor den jeweiligen Proben eines Probanden erneut vermessen, um Unterschiede in der Ionisierung zwischen Messungen der Kalibriergeraden und Probenlösungen möglichst gering zu halten. Ein repräsentatives UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm einer vermessenen aufgearbeiteten Urinprobe ist in Abbildung 6-4 dargestellt.

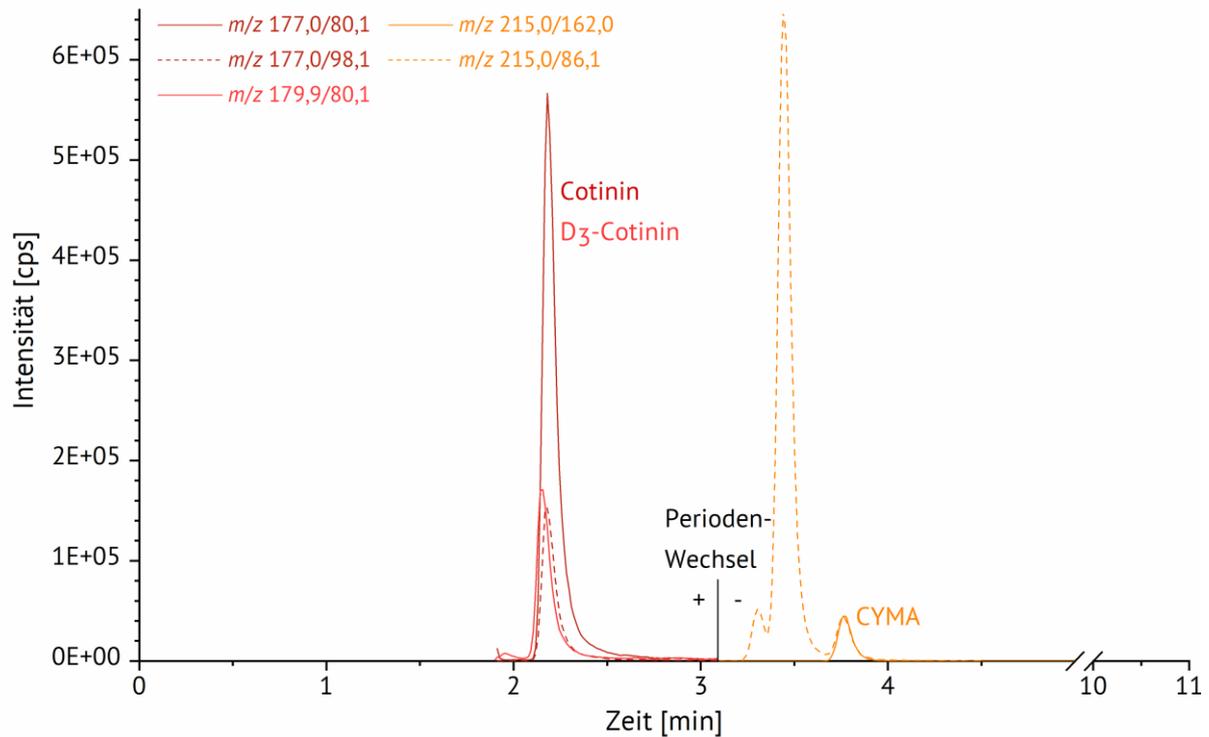


Abbildung 6-4 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im *shuttled*-MRM-Modus einer aufgearbeiteten Urinprobe (V-w-4 Tag 8(1) n=2, Humanstudie II) mit 3 ng D₃-Cotinin als internem Standard. Die Ionisierung erfolgt in der ersten Periode (0,00–3,1 min) im positiven Modus, in der zweiten Periode (3,1–11,00 min) negativ. Die MRM-Spur von D₃-CYMA wurde bei der Messung der Studienproben der Humanstudie II entfernt. CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein.

Zur Probenvorbereitung wurden die bereits aufgearbeiteten Urinproben herangezogen, deren aufkonzentrierte SPE-Eluate erneut 1:4 mit einer D₃-Cotinin-Lösung (4 ng/ml) verdünnt und vermessen wurden. Da bei dieser Probenaufarbeitung kein Ausgleich der Analyt-Verluste während der SPE durch Mitführen eines isotonenmarkierten internen Standards, welcher sich in seinen physikochemischen Eigenschaften nicht von dem unmarkierten Analyten unterscheidet, vorhanden war, wurde die Wiederfindung der Analyten CYMA und Cotinin ohne Einbezug eines internen Standards bestimmt. Die Wiederfindungen betragen, je nach Konzentration, 77–87 % für CYMA und 82–99 % für Cotinin. Des Weiteren ergaben sich LOD- und LOQ-Werte von 15 ng/l und 50 ng/l für CYMA sowie von 20 ng/l und 75 ng/l für Cotinin, welche empirisch durch Vermessen entsprechender Lösungen bestimmt wurden (siehe Kapitel 9.7.1). Eine von Wu *et al.* [2012] publizierte UHPLC-MS/MS-Methode, die ebenfalls die Quantifizierung von Cotinin und CYMA sowie zwei weiterer Mercaptursäuren des Acrylnitrils umfasste, wies mit LOD- und LOQ-Werten von 0,05 µg/l bzw. 0,1 µg/l (CYMA) sowie 0,025 µg/l bzw. 0,05 µg/l (Cotinin) geringere Sensitivitäten im Vergleich zur hier dargestellten Methode auf, wobei die Autoren ebenfalls von einem S/N-Verhältnis von 10 für den LOQ ausgingen, für den LOD jedoch pauschal 0,5*LOQ annahmen. Ein möglicher Grund für die höhere Sensitivität der eigenen Methode kann in der Verwendung von Essigsäure als Fließmitteladditiv liegen. Während der Methodenentwicklung resultierte aus der Verwendung von 0,1%ige wässriger Essigsäure als Fließmittel A eine deutlich bessere Ionisierung beider Analyten im Vergleich zu 0,1%ige Ameisensäure, welche von Wu *et al.*

[2012] verwendet wurde. Zur Quantifizierung wurden in beiden Methoden die gleichen Quantifizier-Übergänge verwendet, eine zusätzliche Qualifier-Spur findet sich jedoch in der SIVA-Methode von Wu *et al.* [2012] nicht. Für die Bestimmung einer möglichen Tabakrauch-Exposition war die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode somit ausreichend sensitiv.

6.1.3. Quantifizierung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids

Während der Humanstudie I wurden von den Probanden an drei Tagen Blutproben entnommen, welche auf ihre Gehalte an Hämoglobin-Addukten des Acrylamids (AAVal) bzw. Glycidamids (GAVal) untersucht werden sollten.

Als Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SIVA-Analytik dienten die Diplomarbeit von Frau Rosita Meyer und die Dissertation von Dr. Franz Ingo Berger, welche ebenfalls im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt worden sind. In der Arbeit von Dr. Franz Ingo Berger erfolgte die Quantifizierung der durch einen modifizierten Edman-Abbau gewonnenen PFPTH-Derivate mittels GC-MS [Berger, 2010; Berger *et al.*, 2011]. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für eine Übertragung der GC-MS-Methodik auf eine HPLC-MS/MS-Anlage (HPLC: Jasco 2008, Jasco; MS: API 3200, Applied Biosystems) gelegt [Berger, 2010]. Die Diplomarbeit von Frau Rosita Meyer beschäftigte sich hingegen u. a. mit der Übertragung der HPLC-MS/MS-Methode auf die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten (U)HPLC-MS/MS-Anlage (UHPLC: Agilent 1290; MS: QTrap 5500, AB Sciex).

Während in der älteren Literatur noch die Quantifizierung der PFPTH-Derivate mittels GC-MS überwiegt [Bergmark *et al.*, 1993], finden sich in aktuelleren Publikationen vorwiegend MS/MS-Methoden zur Bestimmung der Hämoglobin-Addukte, deren chromatographische Trennung ebenso mittels HPLC [Fennell *et al.*, 2005] oder aber weiterhin mittels GC erfolgte [Hartmann *et al.*, 2008; Vikström *et al.*, 2012; Kotova *et al.*, 2015]. Neben PFPTH-Derivaten wurden auch Fluoresceinisothiocyanat-Derivate des terminalen Valin-Restes zur Quantifizierung herangezogen [Carlsson *et al.*, 2014].

Die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität von AAValPFPTH/D₇-AAValPFPTH betragen 0,84 % bzw. 0,43 %, die von GAValPFPTH/D₇-GAValPFPTH 0,79 % bzw. 0,08 %. Der LOD und LOQ der entwickelten Methode betragen 5 pg/ml und 20 pg/ml für AAValPFPTH, für GAValPFPTH betragen diese 10 pg/ml und 30 pg/ml.

Um eine möglichst effiziente chromatographische Trennung des Analyten AAValPFPTH von dem Isomerenmisch GAValPFPTH, welches chromatographisch nicht getrennt, sondern als Gemisch quantifiziert werden sollte, wurden verschiedene UHPLC-Säulen getestet. Eine Kinetex PFP der Firma Phenomenex (Torrance, USA) mit den Abmaßen 100x2,1 mm bei einer Größe der mesoporösen Partikel von 2,6 µm wies dabei das beste Verhältnis von Trennung der Analyten AAValPFPTH und GAValPFPTH auf, wobei das Isomerenmisch weiterhin als ein Peak integrierbar war. Die ausführliche Methodenentwicklung ist in Kapitel 9.8.1 beschrieben, ein

exemplarisches UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm eines Standardgemisches ist in Abbildung 6-5, das einer aufgearbeiteten Blutprobe in Abbildung 6-6 zu sehen.

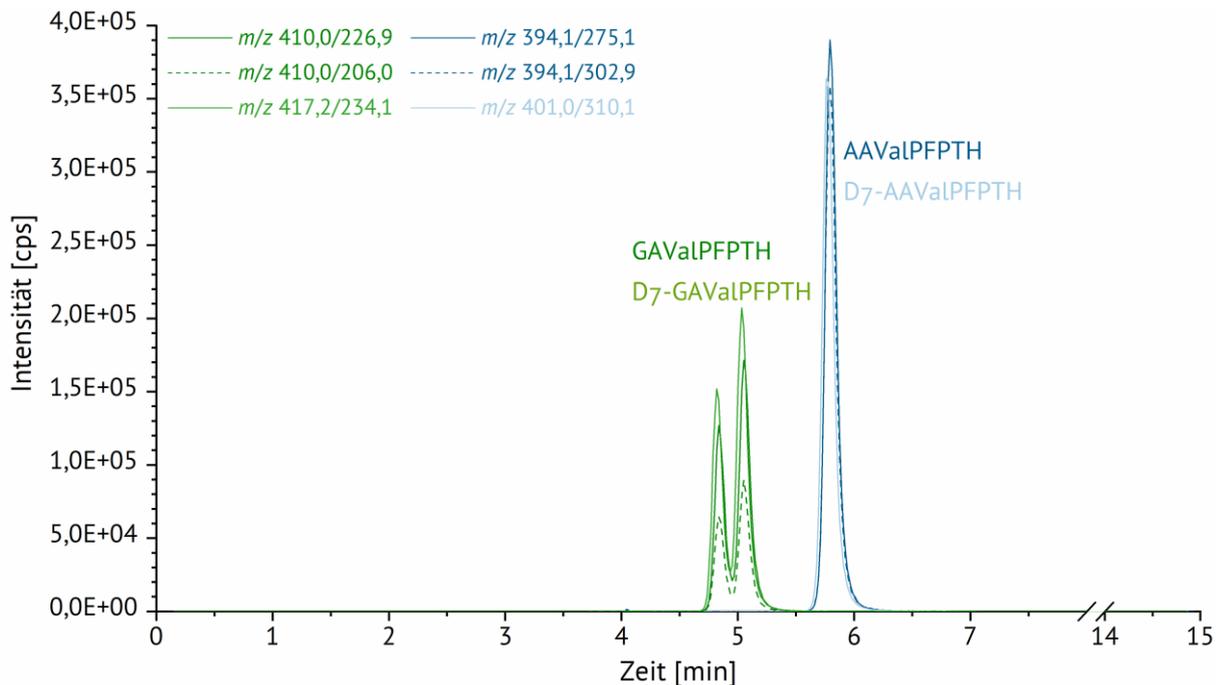


Abbildung 6-5 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus eines Standard-Gemisches der PFPTH-Derivate der Hämoglobin-Addukte aus jeweils 10 ng/ml AAVaIPFPTH, D₇-AAVaIPFPTH, GAVaIPFPTH und D₇-GAVaIPFPTH. AAVaIPFPTH 1-(2-Carbamoyl-ethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin; GAVaIPFPTH 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin.

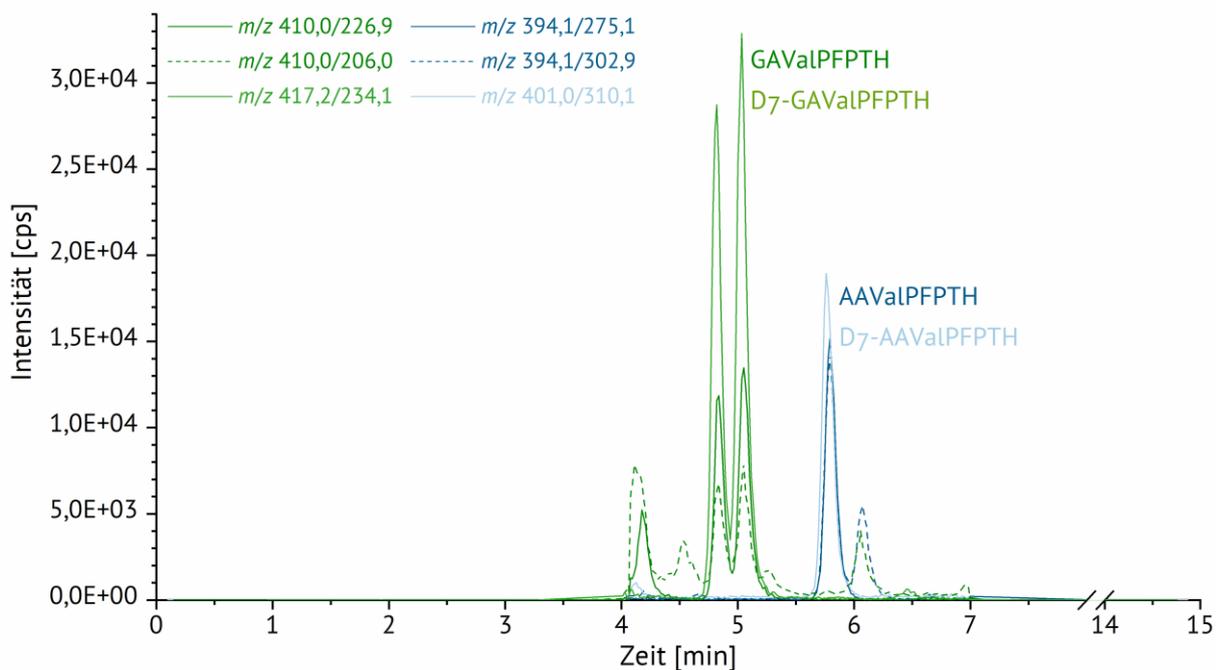


Abbildung 6-6 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus einer aufgearbeiteten Blutprobe (P6, 1. Blutentnahme, n=2, Humanstudie I) mit je 2 ng D₇-AAVaIPFPTH und D₇-GAVaIPFPTH als internem Standard. AAVaIPFPTH 1-(2-Carbamoyl-ethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin; GAVaIPFPTH 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin.

6.1.4. Quantifizierung von Acrylamid aus Modell-Reaktionen

Da Probemessungen der Modell-Reaktionsansätze ergaben, dass die HPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln (siehe Kapitel 9.3) nicht sensitiv genug war, um Acrylamid in den Modell-Reaktionsansätzen quantifizieren zu können, wurde diese Methode mit dem Ziel optimiert, den LOD und LOQ zu senken. Zusätzlich sollte neben der vorhandenen Quantifier-Spur eine zusätzliche Qualifier-Spur in der MRM-Methode implementiert werden, um eine mögliche Acrylamid-Bildung besser verifizieren zu können. Die Methodik der Optimierung ist in Kapitel 9.9.1 näher dargelegt.

Da im Gegensatz zu den mittels SPE aufgearbeiteten Lebensmittel-Proben in den aufgearbeiteten Modell-Ansätzen keine verbleibende störende Matrix anzunehmen war, konnte zur Steigerung der Sensitivität eine UHPLC-Methode entwickelt werden. Eine chromatographische Trennung von Acrylamid von einem nicht relevanten Stör-Peak konnte durch Verwendung der UHPLC-Säule Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μ m) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit entsprechender Vorsäule realisiert werden. Die Elution erfolgte isokratisch bei einer Fließmittelzusammensetzung von 99 % 0,1%iger Essigsäure in Wasser_{dd} und 1 % Methanol.

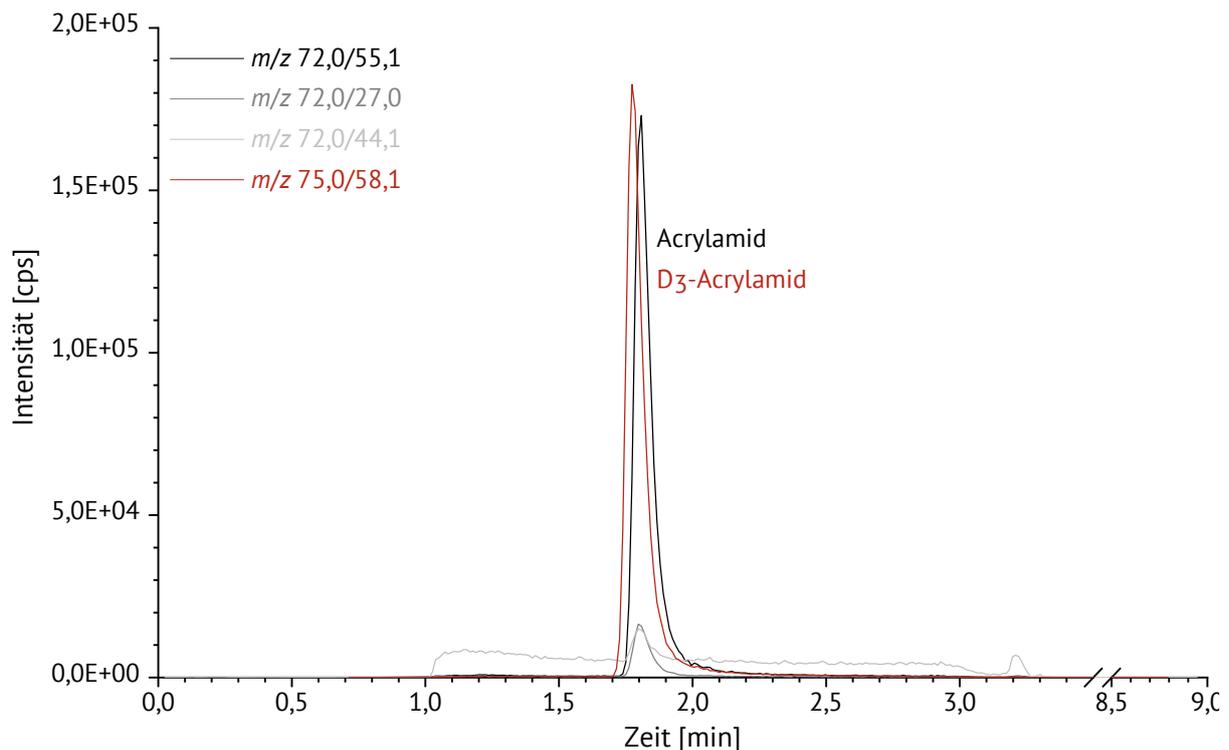


Abbildung 6-7 UHPLC-MS/MS-Chromatogramm im positiven MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 50 ng/ml Acrylamid und D_3 -Acrylamid.

Durch erneutes Optimieren der substanzspezifischen MS-Parameter (siehe Kapitel 9.2) konnte der Quantifier-Übergang m/z 72/55 um die Qualifier-Übergänge m/z 72/27 sowie m/z 72/44 ergänzt werden. Wie im UHPLC-MS/MS-Chromatogramm in Abbildung 6-7 ersichtlich ist, waren jedoch die Intensitäten der Qualifier-Übergänge im Verhältnis zur ausgesprägten Basislinie, insbesondere bei m/z 72/44, gering. Dies ist auf die geringe molekulare Masse von Acrylamid von 71 g/mol zurückzuführen, bei dessen Fragmentierung nur wenige spezifische Fragmente entstehen können.

Die so verwendete Methode wies einen LOD von 0,25 ng/ml und einen LOQ von 0,5 ng/ml auf und war somit um circa den Faktor 10 sensitiver als die Quantifizierungsmethode, welche zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln verwendet wurde.

Neben der chromatographischen Trennung und der massenspektrometrischen Detektion wurde ebenso die Probenaufarbeitung mittels SPE modifiziert, da durch die wässrige Matrix und das größere Probenvolumen der Modell-Reaktionsansätze im Vergleich zur Lebensmittelanalytik keine wässrige Extraktion nötig war. Die Waschschritte der SPE konnten ebenfalls verkürzt werden. Die finale Methode ist in Kapitel 9.9.3 beschrieben. Es ergab sich eine Wiederfindung von 114 ± 6 %, welche mit drei unterschiedlichen Konzentrationen jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Mithilfe dieser modifizierten SIVA-Methode konnte Acrylamid in den Modell-Reaktionsansätzen quantifiziert werden, deren Ergebnisse in Kapitel 6.3 näher beschrieben werden.

6.2. Humanstudie I

Bei der Humanstudie I handelte es sich um eine 13-tägige Interventionsstudie, welche unter kontrollierten Bedingungen mit zwölf Probanden, unterteilt in zwei Gruppen, durchgeführt wurde. Während die Probanden der Gruppe A an zwei Studientagen (Tag 6 und Tag 10) Acrylamid-haltige Lebensmittel konsumierten, erhielten die Probanden der Gruppe B eine Acrylamid-minimierte Ernährung während des gesamten Studienzeitraumes sowie eine Einmalgabe von stabilisotopen-markiertem Acrylamid ($^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid) an Tag 6. Das Studiendesign und weitere Informationen zur Studie finden sich in Kapitel 4.

Dieses Kapitel enthält Ergebnisse, welche bereits unter dem Titel „*Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background*“ in *Archives of Toxicology* mit [open access](#) publiziert wurden [Goempel *et al.*, 2017].

6.2.1. Körpergewichtsentwicklung der Probanden während der Studie

Das Ausüben von Leistungssport und eine Körpergewichtsreduzierung stehen im Zusammenhang mit oxidativem Stress [Marseglia *et al.*, 2014; Kawamura und Muraoka, 2018], welcher wiederum im Rahmen einer endogenen Acrylamid-Bildung diskutiert wurde [Tareke *et al.*, 2008; Tareke *et al.*, 2009]. Aufgrund dessen sollte das Körpergewicht der Probanden während des Studienzeitraumes möglichst konstant bleiben und sportliche Betätigungen wurden untersagt. Diese Vorgabe wurde von den Probanden eingehalten (siehe Kapitel 4.8). Zudem erhielten die Probanden während des Studienzeitraumes eine isokalorische Ernährung (siehe Tabelle 4-3, S. 41) mit im Mittel 2.408 ± 83 kcal/d während der *Washout*-Phase, welches den Zufuhrempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung entsprach. Die Referenzwerte für die tägliche Energieaufnahme liegen dort bei geringer körperlicher Arbeit bei 2.400 kcal/d für 19–24 Jährige bzw. bei 2.300 kcal/d für 25–50 Jährige [DGE, 2015].

Zur Dokumentation der Körpergewichtsentwicklung wogen sich die Probanden jeden Morgen vor dem Frühstück (vor 08:00 Uhr) auf einer handelsüblichen Personenwaage. Die so erhaltene Entwicklung der Körpergewichte ist in Abbildung 6-8 dargestellt, die einzelnen Daten finden sich in Anhang A.1. Es zeigten einige Probanden während der ersten *Washout*-Phase (Tage 1–5) eine signifikante Körpergewichtsreduktion ($p < 0,001$), zwischen Tag 5 und Tag 13 wurde hingegen keine signifikante Körpergewichtsabnahme beobachtet. Im Mittel entwickelte sich das Körpergewicht der Probanden der Gruppe A von $79,5 \pm 3,1$ kg (Tag 1) zu $77,8 \pm 3,6$ kg (Tag 13) sowie von den Probanden der Gruppe B von $80,6 \pm 7,4$ kg zu $78,9 \pm 6,8$ kg. Durch den Verzehr hochkalorischer Lebensmittel an Tag 10 durch die Probanden der Gruppe A hatten diese eine um circa 20 % erhöhte Energieaufnahme mit 2.897 kcal/d, welche jedoch keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Probanden hatte. Alle dokumentierten Körpergewichte finden sich in Anhang 0 (S. 189). Die leicht erhöhten Körpergewichtsdaten in den ersten Studientagen lassen sich wahrscheinlich durch die vorherige Ernährungsweise der Probanden und das Umstellen der Ernährung im Rahmen der 13-tägigen Studie erklären.

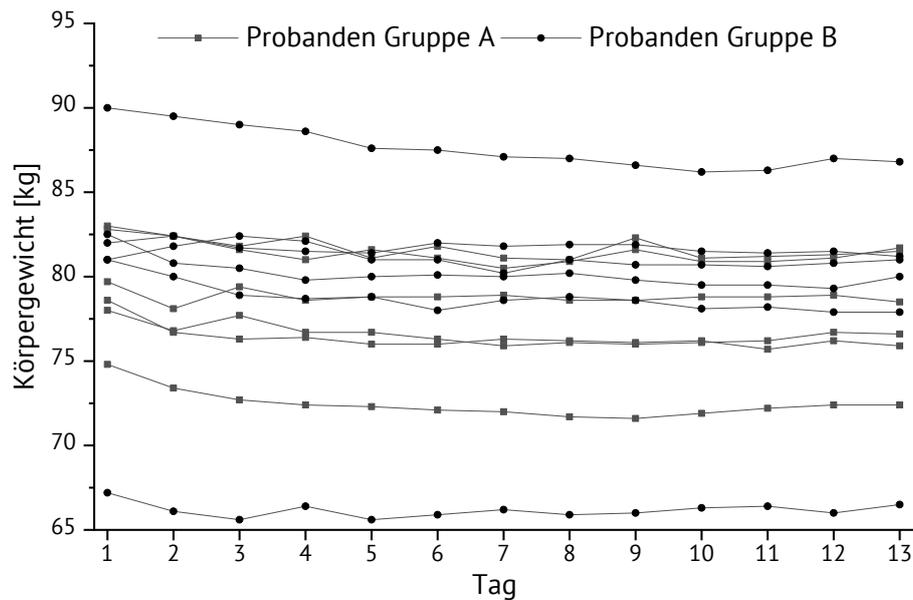


Abbildung 6-8 Entwicklung des Körpergewichts der einzelnen Probanden während Humanstudie I.

6.2.2. Acrylamid-Gehalte der Studienlebensmittel

Die Messungen sowie Auswertung der Ergebnisse dieses Kapitels wurden von Frau Dipl.-LMChem. Laura Tedsen im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

Die Acrylamid-Gehalte aller Duplikate der verzehrfähigen Mahlzeiten, einzelnen Lebensmittel und Getränke wurden mit der in Kapitel 9.3 beschriebenen SIVA-Methode quantifiziert. Vor der Messung mittels HPLC-ESI-MS/MS im positiven MRM-Modus erfolgte die Probenaufarbeitung der homogenisierten Lebensmittel mittels wässriger Extraktion und SPE. Während an den *Washout*-Tagen komplette Mahlzeiten als Duplikate homogenisiert wurden, wurden die Lebensmittel der Gruppe A an Tag 10 (*high AA*) einzeln homogenisiert und analysiert. Der von Gruppe A an Tag 6 und Tag 10 getrunkene Kaffee sowie die dazu verwendeten Kaffeepads wurden ebenfalls einzeln analysiert. Die Quantifizierung der Acrylamid-Gehalte der Lebensmittel diente der Bestimmung der täglichen alimentären Acrylamid-Aufnahme der Probanden während des Studienzeitraumes. Ausschließlich in Lebensmitteln, welche an den beiden Interventionstagen der Gruppe A (Tag 6 bzw. Tag 10) konsumiert wurden, wurden quantifizierbare Acrylamid-Gehalte detektiert. Einzelne Lebensmittel und Mahlzeiten, welche an den *Washout*-Tagen verzehrt wurden, wiesen hingegen alle Acrylamid-Gehalte unterhalb des LOD auf.

In Tabelle 6-2 sind die Acrylamid-Gehalte aller in der Humanstudie I verzehrten einzelnen Lebensmitteln bzw. Mahlzeiten mit den dazugehörigen LODs und LOQs gelistet.

Tabelle 6-2 Ermittelte Acrylamid-Gehalte der Duplikat-Mahlzeiten und -Lebensmittel der Humanstudie I mit matrixabhängigen Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ).

Lebensmittel / Mahlzeit	Acrylamid [µg/kg]	LOD [µg/kg]	LOQ [µg/kg]
Lebensmittel Intervention (Tag 6, Tag 10)			
Pommes frites (Mittagessen)	2.778±133	6,3	21,0
Pommes frites (Abendessen)	2.127±161	4,4	14,7
Kartoffelchips	1.100±50	4,7	15,6
Knäckebrötchen	396±23	4,6	15,3
Kaffeepulver*	241±11	6,9	22,9
Frühstückscerealien	182±8	2,6	8,8
Schwedische Hafertaler	143±7	4,2	13,9
Gebrühter Kaffee**	15,9±0,5	0,9	3,0
Hähnchenschnitzel	<LOQ	2,6	18,8
Ketchup	<LOD	5,1	17,1
Sourcream	<LOD	3,4	11,4
Marmelade	<LOD	1,9	6,4
Milch	<LOD	0,8	2,7
„heißes“ Wasser (Gruppe B)	<LOD	1,2	4,1
Lebensmittel/Mahlzeiten Washout			
Apfelsaft	<LOD	0,7	2,2
Orangensaft	<LOD	1,4	4,5
Honig	<LOD	1,6	5,4
Naturjoghurt + Obstsalat	<LOD	0,6	2,1
Gekochte Kartoffeln + Kaisergemüse ¹	<LOD	1,3	4,5
Spaghetti Carbonara + gedämpfte Putenbrust ¹	<LOD	1,8	5,9
Hühnerfrikassee + Reis ²	<LOD	2,3	7,6
Nudeln + Tomatensoße + Hackfleischbällchen + Naturjoghurt ²	<LOD	1,6	5,4
Gekochte Kartoffeln + Kräuterquark ³	<LOD	3,5	11,5
Gnocchi + Tomatensoße + Kaisergemüse ³	<LOD	1,3	4,3
Griechischer Joghurt + Banane + Orange ¹	<LOD	0,6	2,1
Griechischer Joghurt + Banane + Apfel ²	<LOD	0,8	2,8
Griechischer Joghurt + Apfel + Orange ³	<LOD	0,6	2,0
Mineralwasser still	<LOD	0,5	1,8
Mineralwasser mit Kohlensäure	<LOD	0,8	2,7
Leitungswasser	<LOD	0,6	2,0

* Kaffeepad

** 125 ml Kaffee-Getränk aus 1 Kaffeepad (7,5 g) mit einer Senseo®-Kaffeepad-Maschine hergestellt

¹ Bestandteil Washout-Mahlzeit Nr. 1² Bestandteil Washout-Mahlzeit Nr. 2³ Bestandteil Washout-Mahlzeit Nr. 3

Von den in Humanstudie I verzehrten Lebensmitteln wiesen stark erhitzte Kartoffelprodukte wie Pommes frites (2.127–2.778 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und Kartoffelchips (1.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) die höchsten Acrylamid-Gehalte auf.

Bei den in der Studie verzehrten Kartoffelchips handelte es sich um kommerziell erhältliche Kartoffelchips mit Paprika-Geschmack, welche ein Bio-Siegel trugen. Diese wurden vor Studienbeginn im Rahmen eines Forschungspraktikums von Frau Dipl.-LMChem. Christine Friedland aus mehreren konventionell erhältlichen Produkten in Bezug auf ihren hohen Acrylamid-Gehalt ausgewählt, der über dem 95. Perzentil von 949 $\mu\text{g}/\text{kg}$ der von der EFSA [2015] ermittelten Daten lag. Die Pommes frites, welche Bestandteil des Mittag- und Abendessens der Gruppe A an Tag 10 waren, wurden hingegen aus frischen, geschälten Kartoffeln (mehligkochend, *Solanum tuberosum* L. cv. Gunda) vom Küchen- und Studienpersonal zubereitet und in einer *Prof-Line*-Fritteuse (Fritel, Hasselt, Belgien) zubereitet. Die rohen, nicht gewässerten Kartoffelscheiben wurden jeweils so lange stark frittiert, bis eine intensive Bräunung (siehe Abbildung 6-9) zu erkennen war. Dieses starke Erhitzen von nicht vorbehandelten Kartoffelscheiben sollte hierbei eine Zubereitungsart widerspiegeln, welche in manchen privaten Haushalten möglicherweise praktiziert wird.

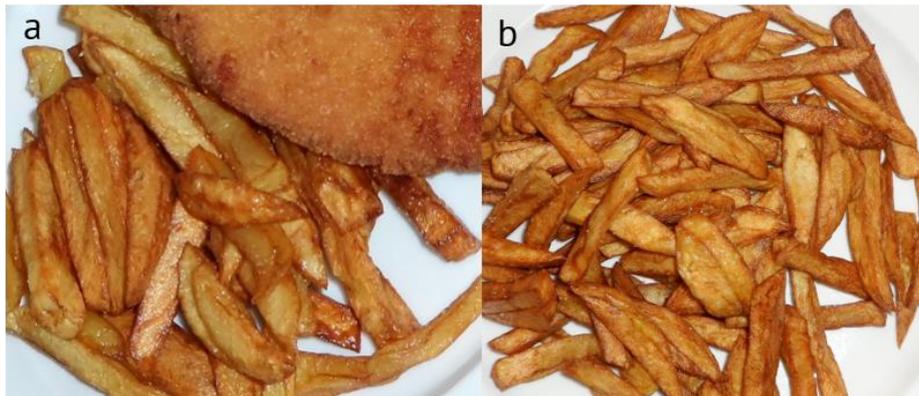


Abbildung 6-9 Zubereitete Pommes frites, welche von den Probanden der Gruppe A der Humanstudie I an Studientag 10 zum (a) Mittagessen und (b) Abendessen konsumiert wurden.

Die zum Mittagessen zubereiten Pommes frites enthielten so 2.778 ± 133 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Acrylamid, die zum Abendessen 2.127 ± 161 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Im Vergleich zu den von der EFSA [2015] zusammengetragenen Werten für Pommes frites und Bratkartoffeln, deren 95. Perzentil bei 971 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. für frisch oder vorgekocht verkaufte Pommes frites bei 1.888 $\mu\text{g}/\text{kg}$ war, lagen die in Humanstudie I als Studienlebensmittel verwendeten Pommes frites somit am Maximum der dokumentierten Acrylamid-Gehalte für Pommes frites. Eine Studie von Mesias *et al.* [2018] erfasste Acrylamid-Gehalte von in 73 unterschiedlichen spanischen Haushalten zubereiteten Pommes frites. Dort zeigte sich, dass circa 45 % aller Proben den gemäß Verordnung (EU) 2017/2158³ geltenden Richtwert von 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Pommes frites überstiegen. Des Weiteren waren bei circa 7 % der

³ Verordnung (EU) 2017/2158 der Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln, Anhang V.

analysierten Proben der Acrylamid-Gehalt höher 2.000 µg/kg, das 95. Perzentil lag dabei bei 2.028 µg/kg [Mesias *et al.*, 2018], welches somit in einer Größenordnung mit den in Humanstudie I verzehrten Pommes frites lag. Dies verdeutlicht, dass die verwendete Methode zum Frittieren der Pommes frites in europäischen Haushalten Verwendung findet. Die sich daraus ergebenden hohen Acrylamid-Gehalte können demnach zu einer Unterschätzung der alimentären Acrylamid-Aufnahme führen, wenn wie bei der Erhebung der EFSA [2015] die Abschätzung anhand von Median- bzw. Mittelwerten erfolgt.

Da es sich bei den verzehrten Pommes frites nichtsdestotrotz um sehr hohe analysierte Acrylamid-Gehalte handelte, wurden sowohl die beiden verzehrfertigen Pommes frites Gerichte als auch die rohen Kartoffeln, aus denen die Pommes frites hergestellt wurden, auf ihre Gehalte an Gesamtzucker und reduzierenden Zuckern untersucht, welche in Tabelle 6-3 dargestellt sind. Die Analyse erfolgte nach der Methode nach Luff-Schoorl, welche in Kapitel 9.1 näher beschrieben ist.

Tabelle 6-3 Gehalte an Gesamtzucker und reduzierenden Zuckern der Pommes frites (Mittag- und Abendessen) bzw. Kartoffeln, aus der die Pommes frites zubereitet worden sind.

Probe	Gesamtzucker [mg/100 g]	Reduzierende Zucker [mg/100 g]
Pommes frites Mittagessen	2.750±83	2.135±23
Pommes frites Abendessen	2.991±120	2.108±119 ¹
rohe Kartoffel ²	1.325±1	1.137 ±23

Dargestellt sind Mittelwert ± Mittelabweichung (n=2)

¹ n=3: Mittelwert ± Standardabweichung

² *Solanum tuberosum* L. cv. Gunda

Die zum Mittagessen verzehrten Pommes frites wiesen mit 2.750 mg/100 g einen leicht geringeren Gesamtzucker-Gehalt auf als die zum Abendessen konsumierten Pommes frites mit 2.991 mg/100 g. Die Gehalte an reduzierenden Zuckern waren hingegen bei beiden Pommes frites Analysen mit 2.135 bzw. 2.108 mg/100 g vergleichbar, sodass sich hieraus nicht der höhere Acrylamid-Gehalt der zum Mittagessen verzehrten Pommes frites ableiten lässt, da beide Pommes-frites-Mahlzeiten einen ähnlichen Restgehalt an reduzierenden Zuckern aufwiesen.

Die rohe Kartoffel wies einen Gesamtzucker-Gehalt von 1.325 mg/100 g und einen Gehalt an reduzierenden Zuckern von 1.137 mg/100 g auf. In einer Studie von Becalski *et al.* [2004], welche den Einfluss von freiem Asparagin und verschiedenen Zuckern (Glucose, Fructose, Saccharose) in rohen Kartoffeln auf die beim Frittieren entstehenden Acrylamid-Gehalte untersuchte, lagen die Gesamtzucker-Gehalte der untersuchten Kartoffeln in einem Bereich von 0,86–23 mg/g (≅ 86–2.300 mg/100 g). Die in Humanstudie I verwendeten Kartoffeln lagen ebenso in diesem Bereich. Nach dem Frittieren der geschnittenen, rohen Kartoffeln, welche ähnliche Werte an reduzierenden Zuckern (als Summe von Fructose und Glucose) aufwiesen, ergaben bei Asparagin-Gehalten von 5.85–8.82 mg/g Acrylamid-Gehalte zwischen 1.242–1.823 µg/kg im fertigen Produkt [Becalski *et al.*, 2004].

Um neben dem Gehalt an reduzierenden Zuckern auch den Einfluss von Asparagin auf die Acrylamid-Entstehung der Lebensmittel der Humanstudie I abschätzen zu können, wurden im Oktober 2015 die oben genannten Proben ebenso extern durch die Institut Kuhlmann GmbH (Ludwigshafen, DE) auf ihre Gehalte an Protein und Asparagin als bekannte Acrylamid-Vorläuferverbindung [Mottram *et al.*, 2002; Shepherd *et al.*, 2010; Amrein *et al.*, 2003] analysiert, welche in Tabelle 6-4 gelistet sind. Das freie Asparagin wurde dabei mittels Aminosäureanalysator, das Gesamteiweiß nach der Methode nach Kjeldahl bestimmt. Während von den beiden Pommes frites Proben jeweils zwei Aliquote getrennt voneinander analysiert wurden, wurde von der rohen Kartoffel lediglich ein Aliquot untersucht.

Da sich der Asparagin-Gehalt der Pommes Frites Probe Nr. 2 (Mittagessen) mit 5,9 mg/100 g wesentlich von der der Probe Nr. 1 (Pommes frites Mittagessen) mit 587 mg/100 g unterscheidet, wird dieser Wert nicht weiter betrachtet, da ein Faktorfehler um die Größe 100 in der Berechnung oder Messfehler nicht mit Sicherheit auszuschließen sind.

Tabelle 6-4 Asparagin- und Eiweißgehalte der Pommes frites (Mittag- und Abendessen) bzw. Kartoffeln, aus der die Pommes frites zubereitet worden sind (analysiert durch Institut Kuhlmann GmbH). N= eiweißspezifischer Stickstoff-Faktor

Probe	Probenbeschreibung	Asparagin [mg/100 g]	Eiweiß (Nx6,25) [g/100 g]
Nr. 1	grobes, bräunliches Pulver	587	4,0
Nr. 2	grobes, gelbliches Pulver	5,9	4,4
Nr. 3	grobes, bräunliches Pulver	724	4,2
Nr. 4	grobes, bräunliches Pulver	735	4,7
Nr. 5	rohe Kartoffel am Stück	312	2,5

Nr. 1, Nr. 2: Pommes frites Mittagessen

Nr. 3, Nr. 4: Pommes frites Abendessen

Nr. 5: Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Gunda)

Die zum Abendessen verzehrten Pommes frites wiesen mit 724–735 mg/100 g im Vergleich zu den zum Mittagessen verzehrten Pommes frites einen höheren Asparagin-Gehalt auf, welches in einer Linie mit den Acrylamid-Gehalten ist. Der Eiweiß-Gehalt der abends verzehrten Pommes frites war mit 4,2–4,7 g/100 g ebenfalls geringfügig höher als die gemessenen Eiweiß-Gehalte der Pommes frites, welche zum Mittagessen konsumiert wurden (4,0–4,4 g/100 g). Die rohe Kartoffel, welche zur Zubereitung der Pommes frites verwendet wurde, wies einen Asparagin-Gehalt von 312 mg/100 g und einen Eiweiß-Gehalt von 2,5 g/100 g auf. Damit lag diese im Vergleich zu den in der Studie von Becalski *et al.* [2004] untersuchten Kartoffeln 1,5–11,4 mg/g (\cong 150–1.140 mg/100 g) im unteren Bereich.

Aus den oben genannten Werten der rohen Kartoffel ergibt sich ein molares Verhältnis von Asparagin zu reduzierenden Zuckern von 0,374, welches niedriger als das von Muttucumaru *et al.* [2017] postulierte Verhältnis von $2,257 \pm 0,149$ ist, unter dem die Asparagin-Konzentration einen Effekt auf die Acrylamid-Bildung habe. Andere Studien zuvor zeigten jedoch, dass die Acrylamid-

Bildung vorwiegend von dem Gehalt an reduzierenden Zuckern abhängt und der Asparagin-Gehalt bei der thermischen Acrylamid-Bildung im Vergleich zu dem der reduzierenden Zuckern eher eine untergeordnete Rolle spielt [Amrein *et al.*, 2003; Becalski *et al.*, 2004].

In Brotwaren und Gebäck wie Knäckebrot, Cerealien oder Kekse wurden mit 143–396 µg/kg geringere Acrylamid-Gehalte als in den frittierten Kartoffelprodukten nachgewiesen. Das für die Humanstudie I ausgewählte Knäckebrot lag mit 396±23 µg/kg über dem von der EFSA ermittelten europäischen Mittelwert von 171 µg/kg und lag darüber hinaus über dem in der Verordnung (EU) 2017/2158⁴ festgelegten Richtwert von 350 µg/kg.

Das an Studientag 6 von den Probanden der Gruppe A konsumierte Kaffee-Getränk enthielt 15,9 µg/kg bzw. 15,9 µg/l (unter der Annahme einer Dichte von 1 g/ml) Acrylamid. Da Acrylamid sehr gut wasserlöslich ist [IFA, 2018], stimmte der gemessene Wert von 241±11 µg/kg des Kaffeepulvers gut mit dem verzehrfertigen Getränk überein, welches aus 7,5 g Kaffeepulver pro 125 ml Getränk in einer Senseo®-Kaffeepad-Maschine (Philips GmbH, Hamburg, DE) zubereitet wurde. Der Acrylamid-Gehalt des Kaffeepulvers lag dabei nah an dem für Europa ermittelten Mittelwert von 249 µg/kg [EFSA, 2015] und überschritt ebenfalls nicht den festgelegten Richtwert von 400 µg/kg der Verordnung (EU) 2017/2158⁴. Somit konnte der Studienkaffee erfolgreich verwendet werden, um einen durchschnittlichen täglichen Kaffeekonsum zu reflektieren, welcher an Tag 6 in Gruppe A hinsichtlich des Einflusses auf die Ausscheidung der Acrylamid-Biomarker AAMA und GAMA untersucht werden sollte.

Das Hähnchenschnitzel, welches von den Probanden der Gruppe A an Tag 10 konsumiert wurde, wies Acrylamid-Gehalte unterhalb des LOQ (18,8 µg/kg) auf.

Weitere Lebensmittel dieses Interventionstages (Marmelade, Sourcream, Milch) enthielten keine nachweisbaren Mengen Acrylamid. Darüber hinaus lagen alle Acrylamid-Werte der in den *Washout*-Phasen konsumierten Lebensmittel und Mahlzeiten sowie der während des Studienzeitraumes getrunkenen Mineralwässer (still bzw. medium) unterhalb des jeweiligen LODs.

6.2.3. Acrylamid-Aufnahme während des Studienzeitraumes

Anhand der Acrylamid-Gehalte der Studienlebensmittel sowie der jeweiligen Verzehrmenen konnte die tägliche alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probanden ermittelt werden, welche anschließend in Bezug zur Ausscheidung der Mercaptursäuren gesetzt wurde. Die alimentär aufgenommene Menge Acrylamid eines Studientages stellt die Summe der Produkte aus Verzehrmenen und Acrylamid-Gehalten aller verzehrter Lebensmittel dar. Da in Humanstudie I die Frage einer möglichen endogenen Bildung von Acrylamid beleuchtet werden sollte, wurde die maximale Acrylamid-Aufnahme anhand des *Upper-Bound*- (UB-) Ansatzes der EFSA berechnet.

⁴ Verordnung (EU) 2017/2158 der Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln, Anhang V.

Dabei wurde für Lebensmittel, deren Acrylamid-Gehalte unter dem LOQ lagen, der LOQ-Wert als Acrylamid-Gehalt angenommen und für Lebensmittel, welche keine nachweisbaren Mengen Acrylamid (<LOD) enthielten, der LOD-Wert als Acrylamid-Gehalt herangezogen [EFSA, 2015].

Die maximale tägliche Aufnahme während der *Washout*-Phase betrug 4,2 µg Acrylamid, entsprechend 0,05–0,06 µg/kg KG/d. Während an Tag 6 Gruppe B 1 µg/kg KG ¹³C₃D₃-Acrylamid als Bolus zu sich nahmen, tranken die Probanden der Gruppe A über den Tag 6 verteilt vier Tassen frisch zubereiteten Kaffee, welches zu einer gesamten Acrylamid-Aufnahme von 12,1 µg (0,15–0,17 µg/kg KG) an diesem Interventionsstag führte. Der Kaffeekonsum alleine trug dabei mit 7,9 µg zur gesamten täglichen Aufnahme von 12,1 µg Acrylamid bei. Am Tag 10 entsprach die Aufnahme von 1.140 µg Acrylamid durch Lebensmittel wie Pommes frites, Kartoffelchips und Knäckebrot (siehe Tabelle 4-2) einer Körpergewichts-bezogenen Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG.

Wenngleich die Acrylamid-Aufnahme während der *Washout*-Studientage und ebenso des Kaffee-Interventionstages der Gruppe A unterhalb der Schätzung der EFSA [2015] der chronischen täglichen Acrylamid-Exposition von 0,4–0,6 µg/kg KG (Median) für Erwachsene lag, überstieg die Acrylamid-Aufnahme der Gruppe A an Tag 10 das 95. Perzentil von circa 2 µg/kg KG/d um den Faktor 7–8. Dies lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass an Tag 10 fast ausschließlich (hoch)erhitzte Lebensmittel verzehrt wurden, welche unter dem Aspekt ausgewählt wurden, möglichst hohe Acrylamid-Gehalte zu enthalten. Zum anderen wurden die Pommes frites, welche zum Mittagessen und Abendessen konsumiert wurden, besonders stark frittiert, um eine Zubereitungsart darzustellen, wie sie in manchen Haushalten praktiziert wird. Im Gegensatz zur gewerblichen Zubereitung liegen der privaten Zubereitung keine Richtwerte zugrunde. Wie auch Mesias *et al.* [2018] schlussfolgerten, kann so eine in Privathaushalten vorkommende Zubereitungsart zu einer Unterschätzung der eigentlichen Acrylamid-Exposition führen.

6.2.4. Renale Bezugsgrößen

Um Diurese bedingte Schwankungen im Urin zu relativieren, kann als Bezugsgröße zur Bestimmung einer Stoffmengenkonzentration, wie die der Mercaptursäuren AAMA und GAMA, im Urin zusätzlich der Kreatinin-Gehalt (*ucr, urinary creatinine*) angegeben werden. Ebenso ist eine Sammlung des Gesamturins, in der klinischen Chemie beispielsweise über 24 h, möglich [Schaller *et al.*, 1993].

Entsprechend wurde während des 13-tägigen Studienzeitraumes der Humanstudie I der gesamte Urin in unterschiedlichen Zeiträumen gesammelt (siehe Abbildung 4-1 in Kapitel 4.3 Studiendesign). Die Urinvolumina ergaben sich nach Ermittlung des Uringewichtes unter der Annahme einer Dichte von 1 g/ml (siehe Kapitel 9.4). Eine Übersicht aller dokumentierten Urinvolumen befindet sich im Anhang A.2 ab Seite 190. Der Proband P4 gab im Urinsammelzeitraum 2 (4–8 h) an Tag 11 keine Urinprobe ab, sodass der darauffolgende Urinsammelzeitraum folglich auch die Analyten des fehlenden Zeitraums enthielt.

Im Mittel schieden die Probanden $2,8 \pm 0,5$ l Urin pro Tag aus. Die maximale Urinausscheidung erfolgte an Tag 6 mit $3,6 \pm 0,8$ l, welches auf den Konsum von zusätzlichem Kaffee (500 ml) bei den Probanden der Gruppe A bzw. heißem Wasser (500 ml) bei den Probanden der Gruppe B zurückzuführen ist. Somit lag die mittlere Urin-Ausscheidung der Probanden über dem Durchschnitt von 1,5 l/d [Thieme, 2019]. Ein Grund hierfür könnten die vorgeschriebenen Mahlzeiten sein, welche jeweils 200 ml Fruchtsaft als Getränk einschlossen (siehe Tabelle 4-1), sodass die Probanden eine gesteigerte Aufnahme an Getränken aufwiesen. Zudem war es gemäß dem Studiendesign den Probanden untersagt, intensiven Sport zu betreiben. Durch das Transpirieren während sportlicher Tätigkeiten sinkt entsprechend das Wasservolumen, welches sonst über den Urin ausgeschieden wird.

Neben dem Urinvolumen wurde von Frau Dipl.-LMChem. Laura Tedsen während ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit der ucr-Gehalt des Urins als Bezugsgröße für die Mercaptursäuren AAMA und GAMA bestimmt (siehe Kapitel 9.5). Die ucr-Gehalte der Urinproben sind in Anhang A.3 gelistet.

6.2.5. Ausscheidung der Mercaptursäuren

Im Rahmen der Humanstudie I wurde ein Monitoring der Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA über den gesamten Studienzeitraum von 13 Tagen durchgeführt. Während an den ersten fünf Studientagen (*Washout*) der Urin in 24-h-Intervallen gesammelt und analysiert wurde, umfassten die Studientage 6–12 jeweils drei 4-stündige Intervalle sowie einen 12-h-Sammelurin über Nacht. Am letzten Studientag wurde der Gesamturin in zwei 12-h-Intervallen abgegeben. Durch Gewinnen des Gesamturins war es möglich, die absolut ausgeschiedenen Mengen der beiden Mercaptursäuren zu ermitteln. Neben einer volumenbasierten Bestimmung der Ausscheidung, konnte die Kinetik auch ucr-basiert verfolgt werden. Somit konnte zum einem die Basislinie der Mercaptursäure-Ausscheidung nach minimierter-Acrylamid-Aufnahme ermittelt werden, zum anderen konnte der Einfluss einer alimentären Aufnahme von Acrylamid durch Lebensmittel (Gruppe A) bzw. nach Einmalgabe von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid auf die Kinetik der Biomarker bestimmt werden.

Die Quantifizierung der Mercaptursäuren im Urin der Probanden erfolgte durch SIVA nach Probenaufarbeitung mittels SPE und UHPLC-Trennung sowie Detektion mit negativer Ionisierung mittels ESI-MS/MS. Die genaue Methodik ist in Kapitel 9.6.2 erläutert. Die Aufarbeitung und Messung der Urinproben dreier Probanden (P1, P4, P11) wurde von Frau Dipl.-LMChem. Laura Tedsen während Ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt. Die so ermittelten Gehalte der Mercaptursäuren sind im Anhang A.4 (Seite 194) für Gruppe A und in Anhang A.5 (Seite 196) für Gruppe B tabellarisch zusammengefasst. Die induktive sowie deskriptive statistische Auswertung der Mercaptursäuren erfolgte extern durch Frau Dipl.-Statistikerin Dr. Dorothea Schipp (Rosenthal-Bielatal, DE).

Mercaptursäure-Ausscheidung während der *Washout*-Phasen. Während der initialen *Washout*-Phase nahm die AAMA-Ausscheidung der Gruppe A, wie in Abbildung 6-10-a (Seite 68) dargestellt,

von 281 ± 138 nmol (162 ± 91 nmol/g ucr) an Tag 1 auf 116 ± 52 nmol (61 ± 39 nmol/g ucr) an Tag 5 ab. Auch die Ausscheidung an GAMA (Abbildung 6-12) nahm innerhalb der ersten fünf Studientage von 57 ± 15 nmol/d (35 ± 17 nmol/g ucr) auf 34 ± 13 nmol/d (18 ± 11 nmol/g ucr) ab. Nach neuntägigem kontinuierlichen *Washout* mit einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d und zusätzlichen Konsum von Kaffee an Tag 6 (Gruppe A), welcher nur zu einer leicht erhöhten Acrylamid-Aufnahme von 0,15–0,17 µg/kg KG an diesem Tag führte, wurden an Tag 9 die niedrigsten Level der Mercaptursäuren in der Gruppe A quantifiziert. An Tag 9 wurden 91 ± 54 nmol AAMA sowie 25 ± 12 nmol GAMA innerhalb von 24 h erfasst.

Unmittelbar vor dem Interventionsstag *high AA* (Tag 10) schieden die Probanden der Gruppe A im Übernacht-Sammelurin an Tag 9 lediglich noch 55 nmol/g ucr und einem Bereich von 28–133 nmol/g ucr AAMA sowie 15 nmol/g ucr (9–34 nmol/g ucr) GAMA aus. Da diese Mercaptursäure-Level der Gruppe A von Tag 9 noch unter denen von Tag 5 mit 61 ± 39 nmol/g ucr für AAMA und 18 ± 11 nmol/g ucr für GAMA lagen, war zum Zeitpunkt des weiter unten beschriebenen, ersten Interventionsstages *Kaffee* an Tag 6 der *Washout*-Prozess noch nicht abgeschlossen.

Gruppe B wies zu Studienbeginn ein höheres Ausgangsniveau der Mercaptursäuren im Vergleich zur Gruppe A auf, welches in Abbildung 6-11-a und Abbildung 6-13 zu sehen ist. Die renale Ausscheidung von AAMA der Gruppe B betrug am ersten Studientag 517 ± 391 nmol (286 ± 229 nmol/g ucr) und umfasste einen Bereich von 95–1.192 nmol. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gruppe A sank die AAMA-Ausscheidung der Gruppe B innerhalb der ersten fünf Studientagen kontinuierlich auf 186 ± 141 nmol/d, bis zum Studienende an Tag 13 auf 136 ± 102 nmol/d ab. Auch die GAMA-Ausscheidung der Gruppe B befand sich zu Beginn der Studie mit 78 ± 56 nmol/d über der der Gruppe A und sank im weiteren Verlauf der Studie auf 29 ± 17 nmol/d an Tag 13.

Die AAMA-Ausscheidung aller Probanden ($n=12$) betrug an Tag 1 im Mittel 399 nmol (224 nmol/g ucr) und wies mit einem Bereich von 93–1.192 nmol bzw. 56–695 nmol/g ucr eine hohe Spannweite auf, welches ebenso an der Darstellung der individuellen AAMA-Ausscheidungen der Probanden in den ersten neun Studientagen in der Abbildung 6-10-b bzw. Abbildung 6-11-b zu sehen ist. An Tag 9 umfasste die AAMA-Ausscheidung aller Probanden nur noch einen Bereich von 41–329 nmol. Auch das GAMA/AAMA- bzw. GA/AA-Verhältnis, welches als Maß der metabolischen Aktivierung von Acrylamid zu Glycidamid herangezogen werden kann [EFSA, 2015], zeigte diese interindividuellen Unterschiede. So betrug zu Studienbeginn das GAMA/AAMA-Verhältnis der Gruppe A $0,23 \pm 0,08$ bei einem Bereich von 0,14–0,31, während das GAMA/AAMA-Verhältnis bei Gruppe B, die höhere Ausgangswerte der Mercaptursäure-Ausscheidung aufwies, im Mittel bei $0,16 \pm 0,05$ lag und einen Bereich von 0,08–0,24 umfasste. An Tag 9 wiesen beide Gruppen vergleichbare GAMA/AAMA-Verhältnisse mit $0,29 \pm 0,04$ (0,24–0,33) für Gruppe A bzw. $0,25 \pm 0,07$ (0,16–0,37) für Gruppe B auf. Auch in einer Studie von Fuhr *et al.* [2006] lag das GAMA/AAMA-Verhältnis unmittelbar vor Intervention mit $0,204 \pm 0,062$ in einem ähnlichen Bereich.

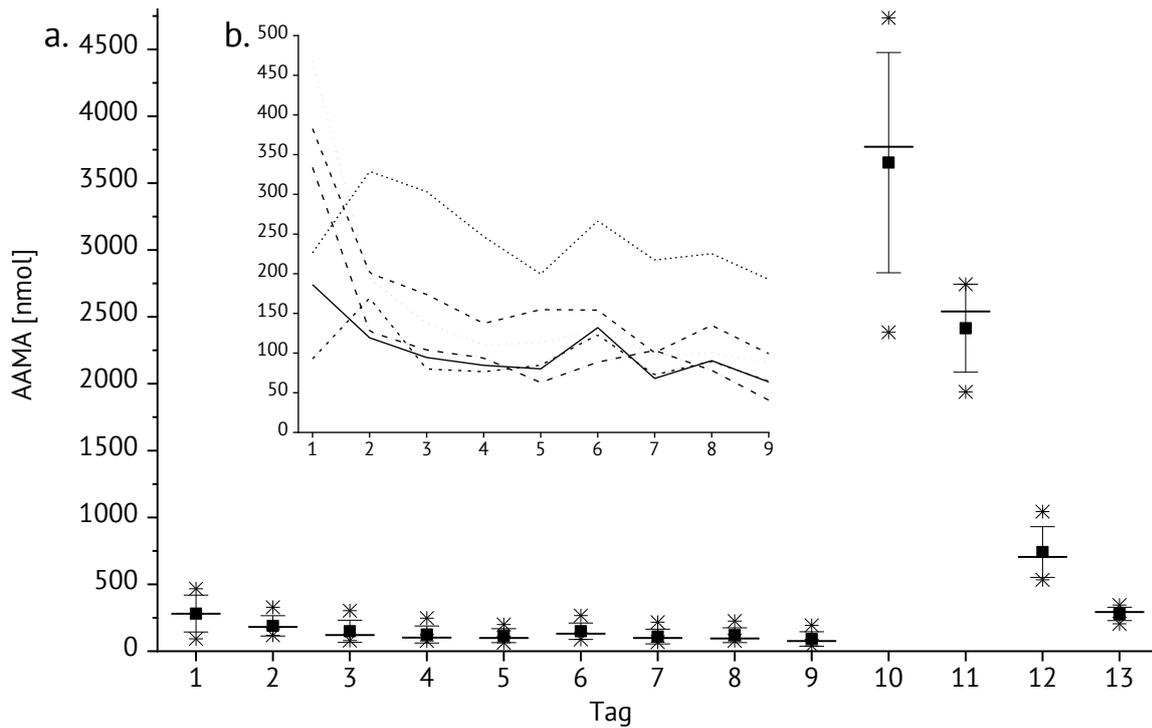


Abbildung 6-10 a) Tägliche AAMA-Ausscheidung der Gruppe A (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I und b) individuelle Entwicklung der AAMA-Ausscheidung von Tag 1–9 jedes einzelnen Probanden der Gruppe A. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Acrylamid). Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

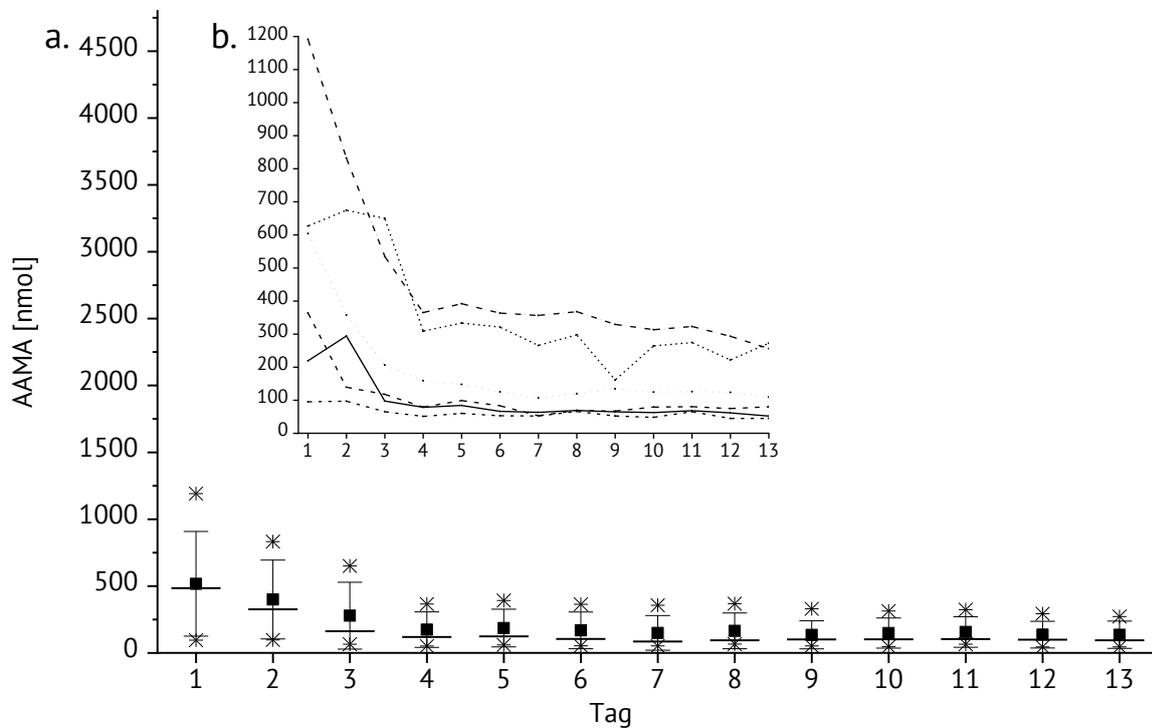


Abbildung 6-11 a) Tägliche AAMA-Ausscheidung der Gruppe B (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I und b) individuelle Entwicklung der AAMA-Ausscheidung von Tag 1–9 jedes einzelnen Probanden der Gruppe B bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/d. Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

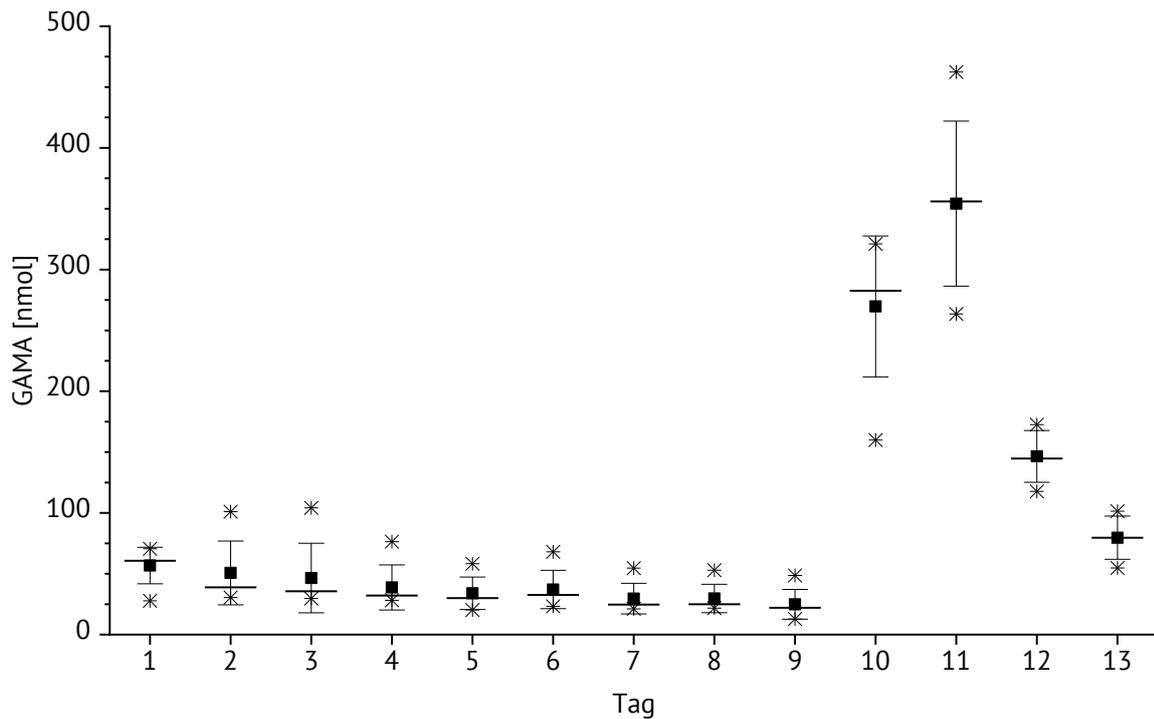


Abbildung 6-12 Tägliche GAMA-Ausscheidung der Gruppe A (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 µg/kg KG Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 µg/kg KG Acrylamid), Tage 1–5, 7–9, 11–13: *Washout* (maximale Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d). Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

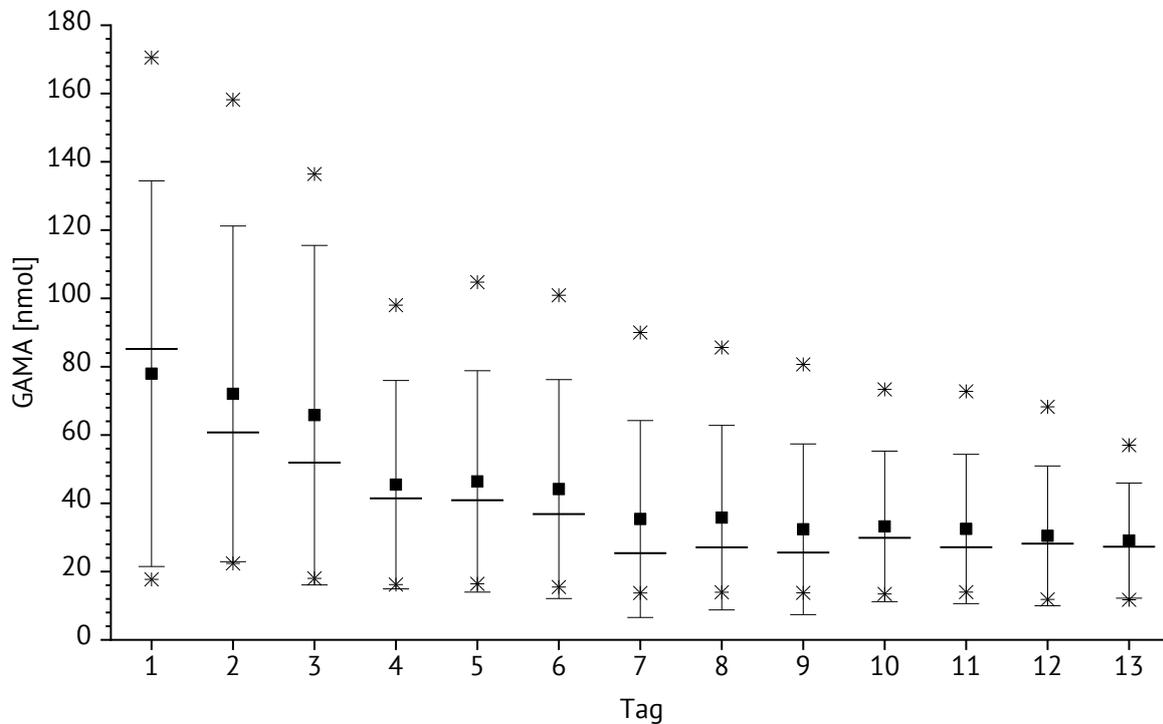


Abbildung 6-13 Tägliche GAMA-Ausscheidung der Gruppe B (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d. Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Der Median aller Probanden von 349 nmol/d (170 nmol/g ucr) an Tag 1 lag somit zwar im gleichen Bereich wie bei zuvor publizierten Humanstudien an Nichtrauchern, die Median-Werte von 0,13–0,16 $\mu\text{mol/g}$ ucr berichteten [Kellert *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2008], die maximal erfasste AAMA-Ausscheidung von 1.192 nmol/d (695 nmol/g ucr) eines Probanden der Gruppe B überstieg jedoch die gemessenen maximalen Ausscheidungen an AAMA dieser Studien (0,38–0,59 nmol/g ucr). Auch der Median der initialen GAMA-Ausscheidung lag mit 63 nmol/d (29 nmol/g ucr) im Bereich der Literatur (0,02–0,04 $\mu\text{mol/g}$ ucr) [Kellert *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2008].

Obwohl diese initiale Ausscheidung der Mercaptursäuren über der publizierter Daten von Nichtrauchern lag (siehe Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6), lässt sich allein durch die Gehalte dieser kein Rückschluss auf einen eventuellen Tabakkonsum vor Studienbeginn ziehen, da auch eine alimentäre Acrylamid-Aufnahme zu einer Mercaptursäure-Ausscheidung in den oben genannten Größenordnungen führen kann. So wies in einer Studie von Wang *et al.* [2017] das c_{max} nach Acrylamid-Aufnahme von 12,6 $\mu\text{g/kg}$ KG über Kartoffelchips einen Wert von 1.533 nmol/g ucr auf. Entsprechend könnten die hohen initialen Level der Mercaptursäuren einiger Probanden auf den vorangegangenen Verzehr hoch erhitzter Lebensmittel unmittelbar vor Beginn der Humanstudie I hindeuten, deren Studiendesign restriktive Ernährungsvorgaben vorsah. Unterstützt wird diese These durch die Körpergewichtsabnahme in den ersten Studientagen (siehe Kapitel 6.2.1), welche nahelegt, dass einige Probanden unmittelbar vor Studienbeginn große Mengen eventuell hoch erhitzter Lebensmittel zu sich nahmen.

Dies verdeutlicht, dass um solche systematischen Fehler zu Beginn der Studie zu vermeiden, eine Kontrolle oder Einschränkung der Ernährung bereits vor dem eigentlichen Studienbeginn zu einem Probandenkollektiv führen könnte, das in Bezug auf die Ausscheidung der gemessenen Biomarker ein homogeneres Bild zeigen könnte und bei zukünftigen vergleichbaren Studien bedacht werden sollte. Auch in einer Studie von Wang *et al.* [2017] wurden vier von ursprünglich 110 Probanden ausgeschlossen, da sie sehr hohe Level der vermessenen Mercaptursäuren (>200 ng/ml als Summe von AAMA, AAMA-SO, GAMA und *iso*-GAMA) zeigten. Im Vergleich hierzu schieden die restlichen 101 Probanden der Studie im Mittel lediglich 78,3 \pm 33,1 ng/ml (440,0 \pm 204,6 nmol/g ucr) an Mercaptursäuren bzw. 22,2 \pm 8,3 ng/ml (239,4 \pm 137,2 nmol/g ucr) AAMA aus. Im Vergleich hierzu lag das maximale initiale AAMA-Level des Probanden der Humanstudie I bei 120 ng/ml.

Bedingt durch den bereits oben beschriebenen Probanden der Gruppe B mit sehr hohem initialem AAMA-Level von 1.192 nmol/d sowie einen weiteren Probanden derselben Gruppe mit ebenfalls hohem AAMA-Level zu Studienbeginn von 627 nmol/d, nahmen die in Abbildung 6-11 dargestellten Maximalwerte bis Studienende weiter ab. Es ergaben sich zwischen Tag 7–13 konstante Ausscheidungslevel in einem Bereich von 135–165 nmol/d (Mittel) bzw. 100–133 nmol/d (Median) für AAMA und 17–29 nmol/d (Mittel) bzw. 25–30 nmol/d (Median) für GAMA. Zudem befanden sich die Gehalte der Mercaptursäuren AAMA und GAMA in allen Urinproben der Humanstudie im quantifizierbaren Bereich.

Diese gleichbleibende AAMA-Exkretion lässt sich indikativ in eine tägliche Hintergrundbelastung mit Acrylamid oder einer sonstigen Mercaptursäure-Vorläuferverbindung konvertieren. Unter Berücksichtigung einer Ausscheidung von 30 % einer Acrylamid-Dosis als AAMA innerhalb von 24 h und der maximalen Acrylamid-Aufnahme von 4,2 µg/d während der *Washout*-Periode kann ein Acrylamid-Hintergrundlevel abgeschätzt werden. Somit ist die AAMA-Ausscheidung der Gruppe B des letzten Studientages äquivalent zu einem Acrylamid-Basislevel von 0,3–0,4 µg/kg KG. Aus der AAMA-Ausscheidung der Gruppe A an Tag 9 ergibt sich entsprechend ein Acrylamid-Basislevel von 0,2 µg/kg KG.

Die der Humanstudie I vorhergehende Studie von Ruenz *et al.* [2016] errechnete ebenfalls ein Basislevel von 0,2–0,3 µg/kg KG/d anhand einer Ausscheidung von 93±31 nmol/d nach dreitägigem *Washout*, während dem maximal 21–41 ng/kg KG/d Acrylamid über die Studienmahlzeiten aufgenommen wurden. Da in beiden Humanstudien auch bei einer Acrylamid-minimierten Ernährung von 21–63 ng/kg KG/d (0,3–0,9 nmol/kg KG/d) täglich circa 0,09–0,14 µmol AAMA renal ausgeschieden wurden, könnte diese überproportionale Mercaptursäure-Ausscheidung als ein kontinuierliches endogenes Basislevel angesehen werden, welches in keinem Zusammenhang mit einer bekannten exogenen Exposition mit Acrylamid steht. Eine potentielle exogene Exposition mit Acrylamid konnte durch die Wahl des Studienortes in Form eines im Pfälzer Wald gelegenen Gästehauses ausgeschlossen werden, da es in dessen unmittelbarer Nähe keinen motorisierten Verkehr, offene Feuerstellen oder Raucher gab, welches zu einer ungewollten exogenen Acrylamid-Exposition hätte führen können.

Zuvor ergaben sich bereits Indizien für ein endogenes Acrylamid-Basislevel in einer Studie an 54 Sprague-Dawley-Ratten. Diese nahmen über einen Zeitraum von zwei Wochen maximal 0,1 µg/kg KG/d Acrylamid über das Futter auf, dessen Acrylamid-Gehalt unterhalb des LOD von 0,5 µg/kg Futter lag. Die Mercaptursäure-Ausscheidung als Summe von AAMA und GAMA der Kontrollgruppe lag jedoch bei 0,84±0,12 nmol innerhalb von 16 h, welches einer Acrylamid-Aufnahme von 0,6–0,7 µg/kg KG entsprach. Unter Berücksichtigung der maximalen täglichen Acrylamid-Aufnahme über das Futter entsprach dies einem Basislevel von 0,5–0,6 µg/kg KG/d [Watzek *et al.*, 2012a].

Eine mögliche Erklärung für den konstanten Hintergrund der Mercaptursäure-Ausscheidung von 0,05–0,07 µmol/g ucr könnte im Zusammenhang mit der Bildung der sogenannten *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) im menschlichen Körper stehen, welche in der Lage sind, die Funktion von Struktur- und anderen Proteinen zu beeinträchtigen [Vistoli *et al.*, 2013]. Die Bildung der AGE stellt eine Form der endogenen Maillard-Reaktion im lebenden Körper dar, bei der kontinuierlich reduzierende Zucker oder andere Carbonyle mit Amino-Gruppen von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen reagieren. Während dieser Reaktion können potentielle Acrylamid-Vorläuferverbindungen entstehen, welche zur Bildung von Acrylamid-Spuren unter physiologischen Bedingungen beitragen können.

Um eine mögliche Bindung von Acrylamid an Lebensmittelbestandteile oder körpereigene Verbindungen mit anschließender Freisetzung ausschließen zu können, welche ebenfalls zu

einem Basislevel an Mercaptursäuren führen könnte, wurde im Rahmen dieser Humanstudie I ebenfalls die Kinetik von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AAMA}$ nach oraler Gabe von $1\ \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-Acrylamid}$ untersucht, da diese stabile Isotopenverteilung natürlich nicht vorkommt. Die Ergebnisse hierzu finden sich nachfolgend in diesem Kapitel.

Mercaptursäure-Ausscheidung von Gruppe A nach Intervention an Tag 6 (Kaffee). An Tag 6 konsumierten die Probanden der Gruppe A zusätzlich zu den *Washout*-Mahlzeiten (Nr. 3, siehe Tabelle 4-1, Seite 39) vier Portionen à 125 ml eines Kaffee-Getränkes, welches in einer Acrylamid-Aufnahme von $12,1\ \mu\text{g}$ ($0,15\text{--}0,17\ \mu\text{g}/\text{kg KG}$) resultierte, von denen $7,9\ \mu\text{g}$ durch das Kaffee-Getränk aufgenommen wurden. Dies führte zu einer leicht erhöhten mittleren AAMA-Ausscheidung von $149\pm 61\ \text{nmol}$ am Interventionstag im Vergleich zum vorherigen Tag 5 ($p<0,01$), an dem die Probanden dieser Gruppe $116\pm 52\ \text{nmol}$ ausschieden. Bedingt durch das höhere Ausgangslevel der Probanden der Kontrollgruppe B, welche an Tag 6 vier Tassen à 125 ml heißes Wasser zu sich nahmen, lag in dieser Gruppe die AAMA-Ausscheidung mit $186\pm 141\ \text{nmol}$ an Tag 5 bzw. $169\pm 137\ \text{nmol}$ an Tag 6 noch über der der Interventionsgruppe A. Die AAMA-Ausscheidung der Gruppe B erreichte erst ab Tag 9 ein ähnliches Niveau wie das der Gruppe A nach Kaffee-Intervention. Wie in Abbildung 6-14 dargestellt, ergab sich im Vergleich der Gruppen zur Basislinie Tag 5 zwar ein signifikanter Unterschied der AAMA-Exkretion, dieser lag jedoch bei Betrachtung der absoluten Werte nicht im biologisch relevanten Bereich, sondern im Bereich des AAMA-Hintergrundlevels, welches bei den Probanden der Gruppe B bei kontinuierlichem *Washout* zwischen $135\text{--}165\ \text{nmol}$ (Tag 7–13) lag.

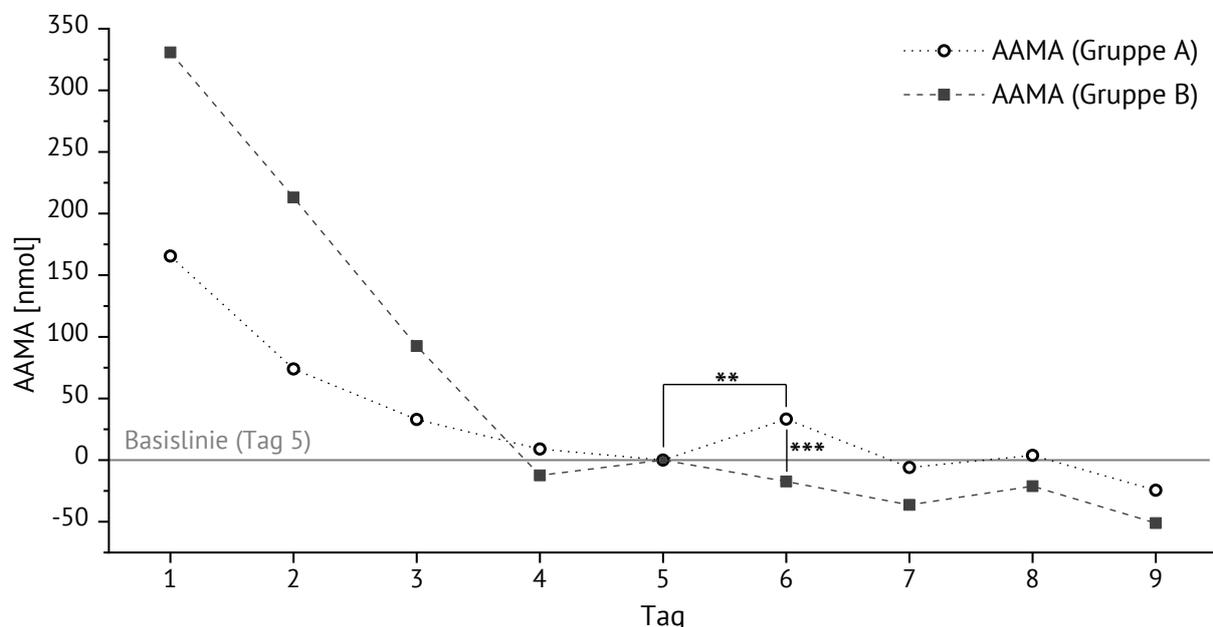


Abbildung 6-14 AAMA-Kinetik beider Gruppen, dargestellt als Differenzen zur Basislinie Tag 5. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Die GAMA-Ausscheidung der Gruppe A nahm nach Kaffee-Intervention an Tag 6 ebenfalls in geringem Maße zu. Während die Probanden an Tag 5 im Mittel $34\pm 13\ \text{nmol}$ GAMA ausschieden, waren es am Interventionstag $37\pm 16\ \text{nmol}$. Im Vergleich der Interventionsgruppen war der

Mittelwert der Gruppe A nach Kaffee-Konsum signifikant höher ($p < 0,05$) als der Mittelwert der Kontrollgruppe B. Allerdings nahmen die GAMA-Level an den folgenden *Washout*-Tagen weiter ab, sodass auch bei der GAMA-Ausscheidung durch das noch nicht erreichte konstante Hintergrund-Level eine Beschreibung der Kinetik der Mercaptursäure-Ausscheidung nach Kaffee-Konsum nicht sinnvoll erschien.

Mercaptursäure-Ausscheidung von Gruppe A nach Intervention Tag 10 (*high AA*). Wie aus Abbildung 6-10 und Abbildung 6-12 (Seite 68f) ersichtlich ist, wurde nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme an Tag 10 (14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) ein starker Anstieg der Mercaptursäure-Ausscheidung beobachtet. Die renalen Exkretionskinetiken von GAMA und AAMA der Gruppe A, welche auf renal ausgeschiedenes ucr bezogen wurden, sind zudem in Abbildung 6-15 dargestellt.

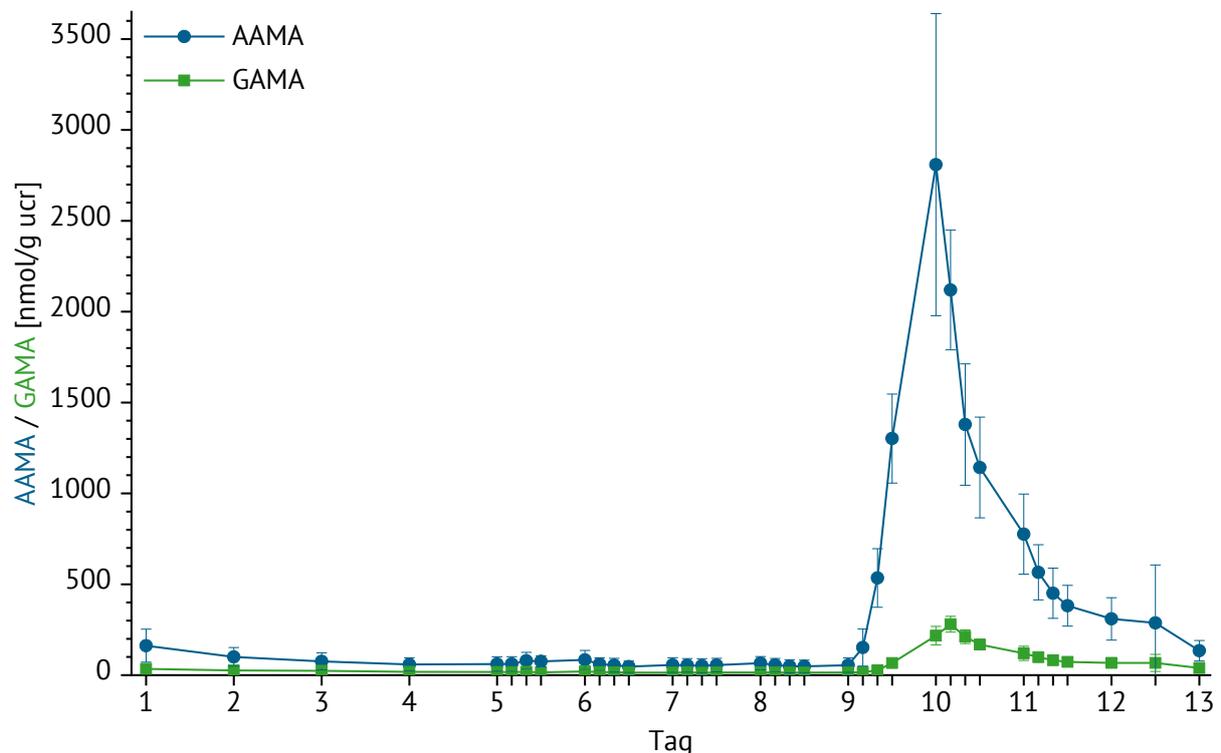


Abbildung 6-15 Renale Ausscheidungskinetiken von AAMA und GAMA der Gruppe A ($n=6$) während der 13-tägigen Humanstudie I. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ Acrylamid), Tage 1–5, 7–9, 11–13: *Washout* (maximale Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$). Tagesnummerierung auf x-Achse stellt zeitliches Ende des jeweiligen Studientages dar. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Unmittelbar vor dem Interventionsstag 10 schieden die Probanden der Gruppe A im Übernachturin 55 ± 40 nmol/ ucr aus. Durch die Aufnahme hoch erhitzter Lebensmittel stieg die AAMA-Ausscheidung rasch auf ein Maximum von 2.794 ± 736 nmol/g ucr innerhalb von 25 ± 2 h an. Bis zum Studienende an Tag 13 war die Exkretion von AAMA noch nicht abgeschlossen, da das AAMA-Level mit 133 ± 58 nmol/g ucr im Übernachturin des letzten Studientages über dem des Tages 9 lag. Es ergab sich daraus eine Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (AUC, engl. *area under curve*) von 74.588 ± 14.361 h x nmol/g ucr.

Einen Überblick über die ermittelten Kinetik-Daten gibt Tabelle 6-5.

Tabelle 6-5 Kinetik-Daten der AAMA- und GAMA-Ausscheidung der Gruppe A der Humanstudie I nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme (14,1–15,9 µ/kg KG). Angegeben sind Mittelwert±Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Parameter	n	AAMA	GAMA
c_{Washout} [nmol/g ucr]	6	55±40 (28–133)	15±10 (9–34)
c_{max} [nmol/g ucr]	6	2.794±736 (1.956–4.153)	266±39 (206–300)
t_{max} [h]	6	25±2 (24–28)	28±0 (28)
AUC [h x nmol/g ucr]	5*	74.588±14.361 (63.748–98.248)	8.570±1.380 (6.721–10.387)

c_{Washout} Washout-Konzentration -12–0 h vor Intervention; c_{max} maximale Konzentration; t_{max} Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung; AUC Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (engl. *area under curve*); AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein. * Die AUC wurde ohne Proband 11 ermittelt, da für diesen Probanden im Sammelzeitraum 11(2) keine Urinprobe vorlag.

Die Ausscheidung von GAMA ergab hingegen eine flachere Kurve, welche auch langsamer anstieg. Während die Probanden der Gruppe A vor Intervention 15±10 nmol/g ucr ausschieden, lag die maximale Konzentration von GAMA nach *high AA* Intervention bei 266±39 nmol/g ucr, welche 28 h nach Beginn des Interventionstages erreicht wurde. Auch die Exkretion von GAMA war bis Studienende nicht abgeschlossen, welche sich in einer Konzentration von 39±18 nmol/g ucr des letzten Urinsammelzeitpunktes widerspiegelte. Es ergab sich eine AUC von 8.570±1.380 h x nmol/g ucr.

Innerhalb von 24 h wurden 23±5 % der an Tag 10 aufgenommenen Acrylamid-Menge von 1.140 µg als AAMA und 1,7±0,4 % als GAMA ausgeschieden. Bis zum Studienende an Tag 13 (96 h) wurden insgesamt 44±5 % der Acrylamid-Menge als AAMA und 5,3±0,9 % als GAMA nachgewiesen. Da die beide Mercaptursäure-Level auch nach 96 h noch über dem Ausgangswert von Tag 9 lagen, liegen die absolut ausgeschiedenen Mengen von AAMA und GAMA wahrscheinlich noch über diesen Angaben. Einen Überblick über die einzelnen absolut ausgeschiedenen Mengen gibt Tabelle 6-6.

Tabelle 6-6 Absolut ausgeschiedene Mengen der Mercaptursäuren AAMA und GAMA sowie prozentuale Ausscheidung nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG (Interventionstag *high AA*, Tag 10) der Gruppe A bis Studienende der Humanstudie I.

	<i>Washout</i> 24 h [Tag 9]	<i>high AA</i> 24 h [Tag 10]	<i>Washout</i> 48 h [Tag 10+11]	<i>Washout</i> 72 h [Tag 10–12]	<i>Washout</i> 96 h [Tag 10–13]
AAMA [nmol]	91±54	3.654±824	5.950±780	6.811±865	7.089±875
AAMA [%]	-	23±5	38±6	42±5	44±5
GAMA [nmol]	25±12	270±58	628±115	774±133	854±149
GAMA [%]	-	1,7±0,4	3,9±0,7	4,8±0,8	5,3±0,9

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein.

Im Vergleich der verschiedenen angegebenen Parameter der Mercaptursäuren zeigte sich, dass nach sehr hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG die Ausscheidung von Acrylamid in Form von AAMA um das circa 8- bis 11-fach der in Form von GAMA überwiegt.

Während in Gruppe B das GAMA/AAMA-Verhältnis ab Tag 8 bis Studienende in einem relativ konstanten Bereich von im Mittel 0,22–0,25 lag, zeigten die Probanden der Gruppe A am Interventionstag 10 ein mittleres GAMA/AAMA-Verhältnis von $0,07 \pm 0,01$. Dieses stieg an den folgenden Studientagen jedoch wieder auf ein Verhältnis von $0,30 \pm 0,10$ am letzten Studientag an und entsprach somit wieder dem des Tag 9 vor Intervention mit $0,29 \pm 0,04$. Probanden einer Humanstudie von Fuhr *et al.* [2006] wiesen nach Konsum von Kartoffelchips (12,4 µg/kg KG) im Intervall von 4–6 h nach Intervention ebenfalls mit $0,027 \pm 0,007$ ein sehr geringes GAMA/AAMA-Verhältnis auf.

Die Probanden der Vorgängerstudie von Ruenz *et al.* [2016] schieden nach niedriger bzw. hoher Acrylamid-Aufnahme von 0,06–0,09 µg/kg KG bzw. 1,3–1,8 µg/kg KG innerhalb von 24 h 27–30 % als AAMA und 3–4 % als GAMA aus. Darüber hinaus wurden innerhalb von 72 h 58 % als AAMA sowie 7–10 % als GAMA ausgeschieden, welches im Vergleich zur Humanstudie I mit 42 ± 5 % (AAMA) und $4,8 \pm 0,8$ % (GAMA) leicht höhere prozentuale Ausscheidungen darstellen. In Humanstudie I wurden an Tag 10 (*high AA*) jedoch wesentlich höhere Acrylamid-Mengen über die Studienlebensmittel aufgenommen als in der vorausgegangenen Studie, sodass die Mercaptursäure-Ausscheidung auch nach 72 h mit 742 ± 189 nmol an Tag 12 im Vergleich zu Basislinie Tag 9 mit 91 ± 54 nmol noch stark erhöht war. Im Gegensatz hierzu war in der Studie von Ruenz *et al.* [2016] die AAMA-Ausscheidung nach 72 h mit 148 ± 30 nmol/d nur noch leicht im Vergleich zur Basislinie von 115 ± 21 nmol/d erhöht. Das Verhältnis der AAMA- zur GAMA-Ausscheidung war jedoch in beiden Studien vergleichbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch sehr hohe Acrylamid-Aufnahmen durch die Nahrung, wie es beispielsweise durch starkes Frittieren und Erhitzen in manchen Haushalten üblich sein kann, nicht zu einer negativen Verschiebung zugunsten des oxidativen Metabolismus führen.

Darüber hinaus wiesen beide Studien eine vergleichbare maximale Konzentration auf. Während in Humanstudie I die Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG zu einem c_{\max} von 2.794 ± 736 nmol/g ucr nach 25 h führte, resultierte die um circa den Faktor 10 geringere Acrylamid-Aufnahme von Ruenz *et al.* [2016] von 1,3–1,8 µg/kg KG auch zu einer zehnfach niedrigeren maximalen Konzentration von $0,29$ µmol/g ucr nach 24–28 h.

Weitere publizierte Studien wiesen Studiendesigns auf, welche auf einer einmaligen anstelle einer kontinuierlichen über den Tag verteilten Acrylamid-Aufnahme beruhten [Fuhr *et al.*, 2006; Watzek *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2017]. Entsprechend lassen sich diese Studien besser zu der im Folgenden beschriebenen oralen Einmalgabe des stabilisotopen-markierten $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamids in Bezug setzen.

$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Ausscheidung von Gruppe B nach Intervention Tag 6 (1 µg/kg KG $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid).

An Tag 6 um 08:00 Uhr erhielten die Probanden der Gruppe B eine Einmalgabe von 1 µg/kg KG des stabilisotopen-markierten $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamids in Mineralwasser. Dieses wurde entsprechend zu

der stabilisotopen-markierten Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA metabolisiert, welches in Abbildung 6-16 dargestellt ist, und konnte ab dem ersten Sammelzeitraum an Tag 6 (08:00–12:00 Uhr) im Urin der Probanden detektiert werden. In den Sammelurinproben der ersten fünf Tage war $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA nicht detektierbar, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass eine sechsfach isotopen-markierte Mercaptursäure natürlich vorkommt.

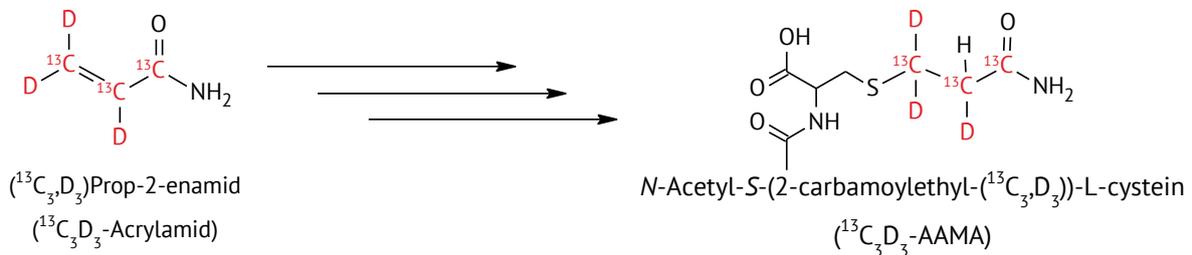


Abbildung 6-16 Chemische Strukturen von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid und der korrespondierenden Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA. GSH Glutathion.

Die Kinetik von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA im Vergleich zur Ausscheidung der nicht markierten Mercaptursäure AAMA ist in Abbildung 6-17 dargestellt, die kinetischen Kenngrößen sind in Tabelle 6-7 gelistet.

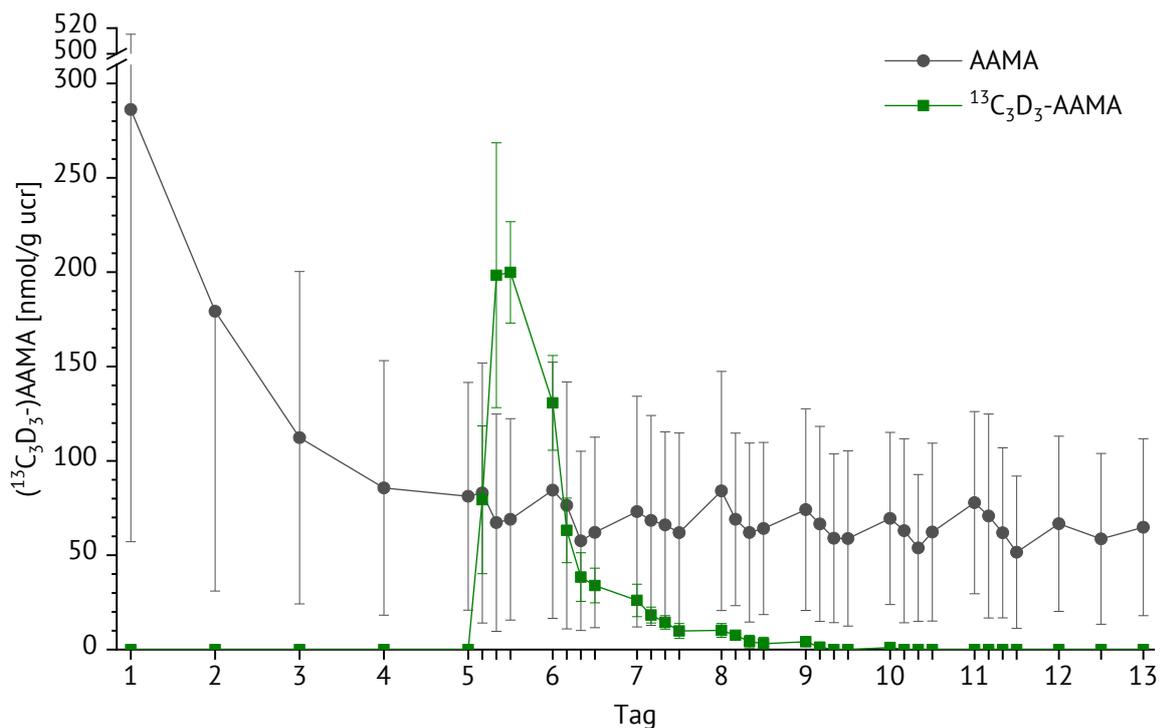


Abbildung 6-17 Kinetik der Ausscheidung von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA im Vergleich zu der von AAMA der Gruppe B ($n=6$) während der 13-tägigen Humanstudie I bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$, Tag 6: orale Einmalgabe von 1 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid. Tagesnummerierung auf x-Achse stellt zeitliches Ende des jeweiligen Studientages dar. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-($^{13}\text{C}_3\text{D}_3$)-L-cystein.

Tabelle 6-7 Kinetik-Daten der $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Ausscheidung der Gruppe A der Humanstudie I nach oraler Einmalgabe von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung sowie Minimum und Maximum.

Parameter	n	$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA
c_{Washout} [nmol/g ucr]	6	nicht detektierbar
c_{max} [nmol/g ucr]	6	224 \pm 51 (161–291)
t_{max} [h]	6	10,7 \pm 2,1 (8–12)
AUC [h x nmol/g ucr]	6	5.053 \pm 819 (4.020–6.094)

c_{Washout} Washout-Konzentration -12–0 h vor Intervention; c_{max} maximale Konzentration; t_{max} Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung; AUC Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (engl. *area under curve*); $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-($^{13}\text{C}_3\text{D}_3$)-L-cystein.

Die Ausscheidungskinetik von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA zeigt, dass die maximale Konzentration von 224 \pm 51 nmol/g ucr (c_{max}) bereits 10,7 \pm 2,1 h Stunden nach oraler Aufnahme erreicht wurde, welches ein vergleichbares t_{max} mit anderen publizierten Daten [Wang *et al.*, 2017; Ruenz *et al.*, 2016; Kopp und Dekant, 2009; Boettcher *et al.*, 2006a] bzw. ein leicht höheres t_{max} im Vergleich zu Studien von Watzek *et al.* [2012b] und Fuhr *et al.* [2006] darstellte. Nach Erreichen des Maximums nahm die Eliminationskurve von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA wieder ab, sodass bis zum Studienende nur noch geringe Spuren der stabilisotopen-markierten Mercaptursäure (<LOQ, nahe LOD) in zwei von sechs Urinproben nachweisbar waren. Dies resultierte in einer AUC von 5.053 \pm 819 h x nmol/g ucr (4.020–6.094 h x nmol/g ucr), welche im gleichen Verhältnis zur AUC von AAMA der Gruppe A (siehe Tabelle 6-5) nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG war. Die Eliminationskurve des stabil-isotopenmarkierten $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA schnitt etwa 30 h nach der Einnahme das konstante Hintergrundlevel der natürlich vorkommenden Mercaptursäure AAMA. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass das gleichbleibende Acrylamid-Hintergrundlevel nicht auf einer Bindung an körpereigene Verbindung mit anschließender Wiederfreisetzung aus einem tiefen Körperkompartiment basiert. Dagegen spricht weiterhin, dass Acrylamid sehr gut wasserlöslich ist (2.040 g/l) [Raters *et al.*, 2019] und sich folglich schnell im gesamten Körperwasserkompartiment verteilen kann und auch schnell renal eliminiert werden kann. Darüber hinaus führt der Angriff zellulärer Nucleophile wie Glutathion an die α,β -ungesättigte Bindung des Acrylamids zu kovalenten Thioether-Bindungen, welche als unempfindlich gegen Hydrolyse oder enzymatische Spaltungen gelten. Auch die aus den Glutathion-Addukten im weiteren Verlauf des Phase-II-Metabolismus gebildeten Mercaptursäuren sind gut wasserlöslich und werden schnell renal ausgeschieden wie zahlreiche Studien in der Vergangenheit zeigten [Kadry *et al.*, 1999; Kopp und Dekant, 2009; Boettcher *et al.*, 2006a; Ruenz *et al.*, 2016].

Wie auch in Tabelle 6-8 zu sehen ist, wurden innerhalb von 24 h nach Gabe 30 \pm 4 % der Dosis als $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA ausgeschieden, welches im Vergleich zur AAMA-Ausscheidung der Gruppe A nach *high-AA*-Intervention an Tag 10 mit 23 \pm 5 % der aufgenommen Acrylamid-Menge von 14,1–15,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG zwar einen höheren Anteil darstellte, dies sich jedoch auf die unterschiedlichen

Verabreichungszeiträume zurückführen lässt. Während die Einmalgabe des stabilisotopenmarkierten $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamids der Gruppe B zu Beginn des Studientages erfolgte und somit c_{\max} mit 10,7 h bereits am gleichen Studientag erreicht wurde, nahmen die Probanden der Gruppe A hochoverhitze Lebensmittel über den gesamten Studientag 10 auf, das zu einem zeitlich verzögerten c_{\max} bei 25 ± 2 h führte, welches rechnerisch in Tag 11 der Studie fällt. Entsprechend glichen sich nach 48 h die prozentualen Ausscheidungsmengen von AAMA der Gruppe A mit 38 ± 6 % mit denen von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA der Gruppe B mit 37 ± 5 % an. Nach 96 h bzw. 120 h entsprach die Ausscheidungs menge an $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA 41 ± 5 % der Dosis, welches wiederum geringfügig unter der AAMA-Menge der Gruppe A mit 44 ± 5 % nach 96 h lag.

Tabelle 6-8 Absolut ausgeschiedene Mengen der Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA sowie prozentuale Dosis-Anteile nach oraler Gabe von $1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid der Gruppe B der Humanstudie I.

	$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid	Washout	Washout	Washout	Washout
	24 h [Tag 6]	48 h [Tag 6+7]	72 h [Tag 6–8]	96 h [Tag 6–9]	120 h [Tag 6–10]
$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA [nmol]	303 ± 39	377 ± 52	403 ± 58	412 ± 60	414 ± 62
$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA [%]	30 ± 4	37 ± 5	40 ± 5	41 ± 5	41 ± 5

$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-($^{13}\text{C}_3\text{D}_3$)-L-cystein.

In einer Studie von Fuhr *et al.* [2006] schieden Probanden nach einer einmaligen Acrylamid-Aufnahme von $12,4 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ durch den Verzehr von Kartoffelchips innerhalb von 72 h mit $50,0 \pm 9,4$ % der Dosis als AAMA sowie $5,9 \pm 1,2$ % als GAMA noch einen höheren Anteil an der Gesamtdosis aus im Vergleich zu dieser Studie mit einer Ausscheidung von 40 ± 5 % bei einem Bereich von 33–45 % der Dosis als $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA innerhalb von 72 h. Auch Kopp und Dekant [2009] sowie Boettcher *et al.* [2006a] publizierten mit jeweils circa 50 % innerhalb von 24 h höhere prozentuale Ausscheidungen der aufgenommenen Dosen in Form von AAMA. In der Humanstudie von Ruenz *et al.* [2016] wurden innerhalb von 72 h nach Acrylamid-Aufnahme von $0,6$ – $0,8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ bzw. $1,3$ – $1,8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ sogar 58 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge als AAMA ausgeschieden. Durch Betrachtung des prozentualen Bereichs, den die Probanden dieser Studie ausschieden, wird jedoch deutlich, dass dies ebenso auf interpersonelle Schwankungen zurückführbar sein kann. So lag der Bereich der prozentualen $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Ausscheidung innerhalb von 24 h zwischen 24–35 % und nach 96 h zwischen 33–46 % der Dosis von $1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid. Solche interindividuellen Schwankungen können auf unterschiedliche Stoffwechselumsätze und -status zwischen den Probanden hinweisen, welche möglicherweise zum Teil auf Enzym polymorphismen zurückzuführen sind. Polymorphismen für Enzyme, welche im Acrylamid-Metabolismus involviert sind, sind zum Beispiel beschrieben für Cytochrom P450 2E1 [Neafsey *et al.*, 2009], verschiedene GST wie GSTM1, GSTT1 und GSTP1 [Ginsberg *et al.*, 2009] und die im weiteren Verlauf des Metabolismus vorkommende NAT1 und NAT2 [Walker *et al.*, 2009].

6.2.6. Level der Hämoglobin-Addukte

Neben den Mercaptursäuren als Kurzzeit-Biomarker der Exposition wurden auch die Hb-Addukte des Acrylamids, AAVal, und Glycidamids, GAVal, am *N*-terminalen Valin als Langzeit-Biomarker der Exposition bestimmt. Hierfür wurde den Probanden zu Beginn, in der Mitte sowie am Ende der Humanstudie I Blutproben genommen und das Hämoglobin isoliert. Die Isolation des Hämoglobins wurde unmittelbar nach der jeweiligen Blutentnahme von Frau Dr. Meike Rünz durchgeführt. Die Quantifizierung der Hb-Addukte erfolgte nach einem modifizierten Edman-Abbau in Form der PFPTH-Derivate mittels UHPLC-ESI-MS/MS nach Probenaufarbeitung durch SPE. Die analytische Methodik ist in Kapitel 9.8 detailliert beschrieben. Die so erhaltenen mittleren Level der Hb-Addukte sind in Tabelle 6-9 dargestellt.

Tabelle 6-9 Hämoglobin-Addukt-Level von Acrylamid (AAVal) and Glycidamid (GAVal) während der Humanstudie I. Die Blutentnahmen fanden zu Beginn der Studie (1), am Morgen des 8. Studientages (2) sowie am Ende der Studie (3) statt.

Blutentnahme	AAVal [pmol/g Hämoglobin]		GAVal [pmol/g Hämoglobin]	
	Gruppe A (n=6)	Gruppe B (n=6)	Gruppe A (n=6)	Gruppe B (n=6)
1	24,5±19,7	46,4±44,1	17,2±16,0	27,5±25,8
2	22,3±17,6	38,4±34,9	15,9±14,5	23,3±21,5
3	26,0±16,1	34,0±32,6	18,7±13,5	20,9±20,7

AAVal *N*-(2-carbamoylethyl)-valin; GAVal *N*-(*R,S*)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin.

Zu Studienbeginn wiesen die Probanden (n=12) eine mittlere AAVal-Konzentration von 35,5 pmol/g Hb und eine mittlere GAVal-Konzentration von 22,3 pmol/g Hb auf. Durch die BMI-abhängige Randomisierung der Probanden in zwei Gruppen ergaben sich mittlere AAVal-Level von 24,5±19,7 pmol/g Hb für Gruppe A und 46,4±44,1 pmol/g Hb für Gruppe B. Auch die GAVal-Level von Gruppe B waren mit 27,5±25,8 pmol/g Hb im Vergleich zur Gruppe A mit 17,2±16,0 pmol/g Hb deutlich höher.

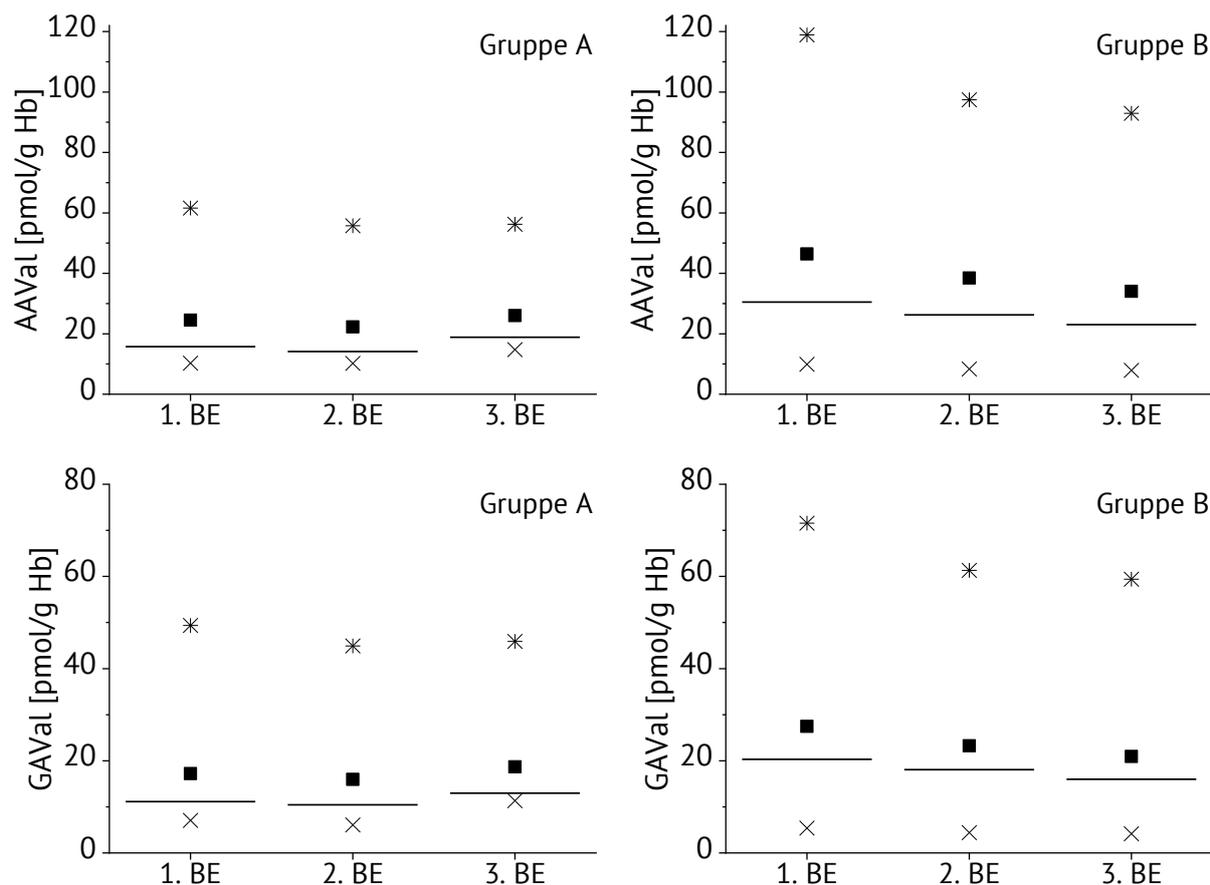


Abbildung 6-18 Hämoglobin-Addukt-Level von Acrylamid (AAVal, oben) and Glycidamid (GAVal, unten) von Gruppe A (links) und Gruppe B (rechts) der Humanstudie I. Die Blutentnahmen (BE) fanden zu Beginn der Studie (1), am Morgen des 8. Studientages (2) sowie am Ende der Studie (3) statt. ■ Mittelwert; — Median; * Maximum; x Minimum; AAVal *N*-(2-carbamoyl-ethyl)-valin; GAVal *N*-(*R,S*)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin.

Wie Abbildung 6-18 zeigt, umfassten die AAVal- bzw. GAVal-Werte der ersten Blutentnahme von Gruppe B mit 9,9–118,9 pmol/g Hb bzw. 5,4–71,6 pmol/g Hb einen deutlichen größeren Bereich als die entsprechenden Werte der Gruppe A mit 12,1–61,6 pmol/g Hb bzw. 7,0–49,4 pmol/g Hb. Diese Beobachtung stimmte mit den an Tag 1 ausgeschiedenen Mengen der Mercaptursäuren überein. Wie der Vergleich mit Abbildung 6-10 (Seite 68) und Abbildung 6-11 (Seite 68) zeigt, lag auch die maximale AAMA-Ausscheidung von Gruppe B mit 1.192 nmol/d (695 nmol/g ucr) über der von Gruppe A mit 467 nmol/d (316 nmol/g ucr) zu Studienbeginn. Dies legt nahe, dass die erhöhten Biomarker-Level dieses Probanden neben einen alimentären Ursprung auch auf den Konsum von Tabakrauch vor Studienbeginn zurückzuführen sein könnten. Eine Überprüfung der Einhaltung des Ausschlusskriteriums „Raucher“ zum Beispiel anhand eines Biomarker-Monitoring von Cotinin oder CYMA wie in Humanstudie II (siehe Kapitel 6.4.5) war nicht Bestandteil des Ethikvotums der Humanstudie I und demnach wurden diese Expositionsbiomarker nicht erfasst.

Darüber hinaus zeigten die Level der Hb-Addukte einen zu der Ausscheidung der Mercaptursäuren gleichsinnigen, jedoch wesentlich weniger ausgeprägten Verlauf, sodass sich die kontrollierte

Acrylamid-Aufnahme während des 13-tägigen Studienzeitraums ebenso in den gemessenen AAVal- und GAVal-Leveln zeigte.

Während der 13-tägigen *Washout*-Phase der Gruppe B nahmen die AAVal- und GAVal-Level bei jeder Blutentnahme ab, sodass die Hb-Addukt-Level zu Studienende bei $34,0 \pm 32,6$ pmol/g Hb (AAVal) und $20,9 \pm 20,7$ pmol/g Hb (GAVal) lagen ($p < 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest). Wie in Abbildung 6-18 zu erkennen ist, nahmen dabei die Hb-Addukt-Level des Probanden mit den höchsten Hb-Addukt-Leveln (gekennzeichnet als Maxima) in stärkerem Maße ab als die des Probanden mit den niedrigsten Hb-Addukt-Leveln der Gruppe B (gekennzeichnet als Minima). So zeigte der Proband mit den geringsten AAVal-Leveln der ersten Blutentnahme nur eine sehr geringe Abnahme von $9,9$ pmol/g Hb auf $7,9$ pmol/g Hb, während die Level des Probanden mit den höchsten AAVal-Leveln der ersten Blutentnahme von $118,9$ pmol/g Hb innerhalb von 13 Tagen auf $92,9$ pmol/g Hb sanken. Die prozentuale Abnahme der AAVal-Konzentrationen war jedoch mit circa 20–22 % bei beiden Probanden ungefähr gleich. Im Mittel nahm die Konzentration an AAVal um 22,3 % (5–40 %) ab. Daraus lässt sich schließen, dass die Hb-Addukte des Acrylamids bei einem angenommenen linearen Abbau eine geringere Halbwertszeit als 60 Tage haben, welches einer Abnahme von circa 11 % innerhalb des 13-tägigen Studienzeitraums sprechen würde [Fennell *et al.*, 1992].

Eine Abnahme der Hb-Addukt-Level konnte auch von der ersten zur zweiten Blutentnahme in Gruppe A beobachtet werden. Dort nahmen die AAVal-Level von in Mittel $24,5 \pm 19,7$ pmol/g Hb auf $22,3 \pm 17,6$ pmol/g Hb und die GAVal-Level von $17,2 \pm 16,0$ pmol/g Hb auf $15,9 \pm 14,5$ pmol/g Hb jeweils leicht ab. Somit hatte die im Vergleich zum *Washout* leicht erhöhte Acrylamid-Aufnahme an Tag 6 durch Konsum von vier Tassen Kaffee ($0,15$ – $0,17$ µg/kg KG, vgl. Kapitel 6.2.3) keinen messbaren Einfluss auf die im Hämoglobin quantifizierbaren Mengen an Addukten. Im Gegensatz hierzu führte die Acrylamid-Aufnahme von $14,1$ – $15,9$ µg/kg KG durch hocherhitzte Lebensmittel an Tag 10 zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) beider Hb-Addukt-Level im Blut der letzten Blutentnahme am Studienende, welche mit $26,0 \pm 16,1$ pmol/g Hb (AAVal) bzw. $18,7 \pm 13,5$ pmol/g Hb (GAVal) zudem die Hb-Addukt-Level zu Studienbeginn überstiegen.

Dass eine einmalige Acrylamid-Aufnahme zu einer messbaren Erhöhung der Hb-Addukte führen kann, zeigte auch eine Studie von Doroshyenko *et al.* [2009]. Dort stiegen nach Konsum einer Portion Kartoffelchips (1 mg bzw. $13,9$ µmol Acrylamid) die AAVal-Level im Blut von 16 Probanden von 39 (24–62) pmol/g Hb auf 47 (36–65) pmol/g Hb innerhalb von 24 h an. Ebenso zeigte sich ein Anstieg der GAVal-Level von 28 (17–48) pmol/g Hb vor Acrylamid-Aufnahme auf 32 (23–48) pmol/g Hb 24 h nach Konsum der Kartoffelchips [Doroshyenko *et al.*, 2009].

In der Literatur finden sich des Weiteren beinahe ausschließlich Studien, bei denen die Hb-Addukt-Level von Acrylamid in einem Probandenkollektiv einmalig erfasst wurden. Während die AAVal- und GAVal-Level der Gruppe A vergleichbar mit denen bereits publizierter Daten für Nichtraucher waren (siehe Tabelle 2-9 und Tabelle 2-10, Seite 28), überstiegen die mittleren Level der Gruppe B insbesondere zu Studienbeginn die durch Humanbiomonitoring erfassten

mittleren Konzentrationen. Dies lässt sich vor allem auf einen Probanden der Gruppe B zurückführen, welcher mit 118,9 pmol/g Hb zu Studienbeginn eine sehr hohe Konzentration an AAVal im Blut hatte. Diese entsprach ungefähr dem Median von 121 pmol/g Hb, welcher von Vesper *et al.* [2008] an 255 Rauchern ermittelt wurde. Zum Vergleich lag in dieser Studie der Median der AAVal-Level bei 42,5 pmol/g Hb für Nichtraucher bei einem Bereich von 24,2–88,3 pmol/g Hb. Ebenso umfasste keine weitere der in Tabelle 2-9 (Seite 28) genannten Studien maximal gemessene Konzentrationen für Nichtraucher, welche im Bereich dieses Probanden lagen.

Da keine Kontrolle der Probanden in Bezug zu ihren Angaben des Nichtraucherstatus vorgenommen wurde, z. B. durch erfassen der Cotinin- und CYMA-Gehalte im Urin oder des Acrylnitril-Hb-Adduktes *N*-2-(cyanoethyl)-valin im Blut [Schettgen *et al.*, 2003; Schettgen *et al.*, 2004], konnten keine Rückschlüsse über den Ursprung der punktuell hohen Hb-Addukt- und Mercaptursäure-Level zu Studienbeginn gezogen werden, welche auf eine Langzeit-Exposition mit Acrylamid hinweisen.

6.3. Modell-Reaktionen zur endogenen Bildung von Acrylamid

Um weitere Erkenntnisse zu einer potentiellen endogenen Acrylamid-Bildung zu erhalten, wurden einfache Modell-Reaktionen durchgeführt, um eine Maillard-Reaktion mit möglichen endogenen Acrylamid-Präkursoren unter physiologischen Bedingungen zu simulieren.

Hierzu wurden als endogen vorkommende Stickstoff-Donatoren bekannte Acrylamid-Vorläufer-Aminosäuren (siehe Kapitel 2.1.1.1) bzw. Harnstoff eingesetzt, welche in Phosphat-gepufferter Salzlösung (pH 7,4) in äquimolaren Gemischen mit endogenen Carbonylverbindungen wie reduzierenden Zuckern, Pyruvat, Phosphoenolpyruvat oder dem bei der AGE-Bildung eine Rolle spielenden Methylglyoxal bei 37 °C bis zur Analyse mittels UPLC-MS/MS nach Aufkonzentrierung mittels SPE für bis zu 86 Tage gelagert wurden. Die hierzu durchgeführten experimentellen Arbeiten sind näher in Kapitel 9.9 beschrieben. Die ermittelten Daten finden sich in Anhang A.6 ab Seite 199.

Während in den Reaktionsansätzen von D-Glucose mit L-Glutaminsäure, D/L-Methionin oder Harnstoff kein Acrylamid nachgewiesen werden konnte (<LOD), wiesen die Reaktionsansätze von D-Glucose und L-Asparagin ab 28 Tagen Inkubation detektierbare Mengen Acrylamid auf, welche jedoch unterhalb des LOQ lagen. Auch die Reaktionsansätze von L-Asparagin und Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat wiesen keine nachweisbaren Mengen Acrylamid auf.

Bei den Reaktionsansätzen von L-Asparagin mit D-Ribose bzw. Methylglyoxal (siehe Abbildung 6-19) wurde hingegen eine zeitabhängige Acrylamid-Bildung beobachtet, welche in Abbildung 6-20 zu sehen ist. Sowohl Methylglyoxal als unerwünschtes Beiprodukt der Glykolyse [Allaman *et al.*, 2015] als auch D-Ribose, welche als Ribose-5-phosphat ein Grundbaustein der Ribonukleinsäuren und Adenosinphosphate darstellt, kommen als Reaktionspartner zur Aminosäure L-Asparagin ubiquitär im Organismus vor.

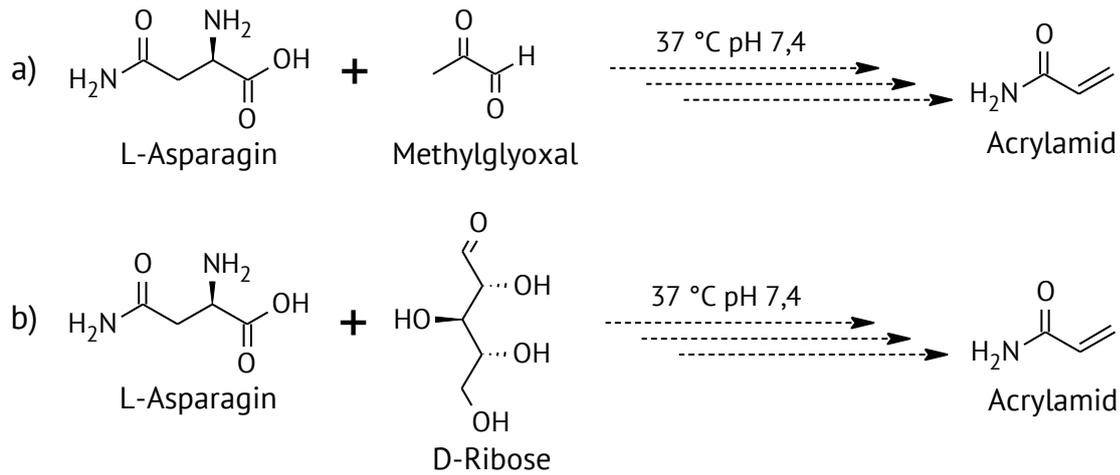


Abbildung 6-19 Übersicht über die Strukturen, deren Modell-Reaktion mit L-Asparagin unter physiologischen Bedingungen zu quantifizierbaren Mengen Acrylamid führten.

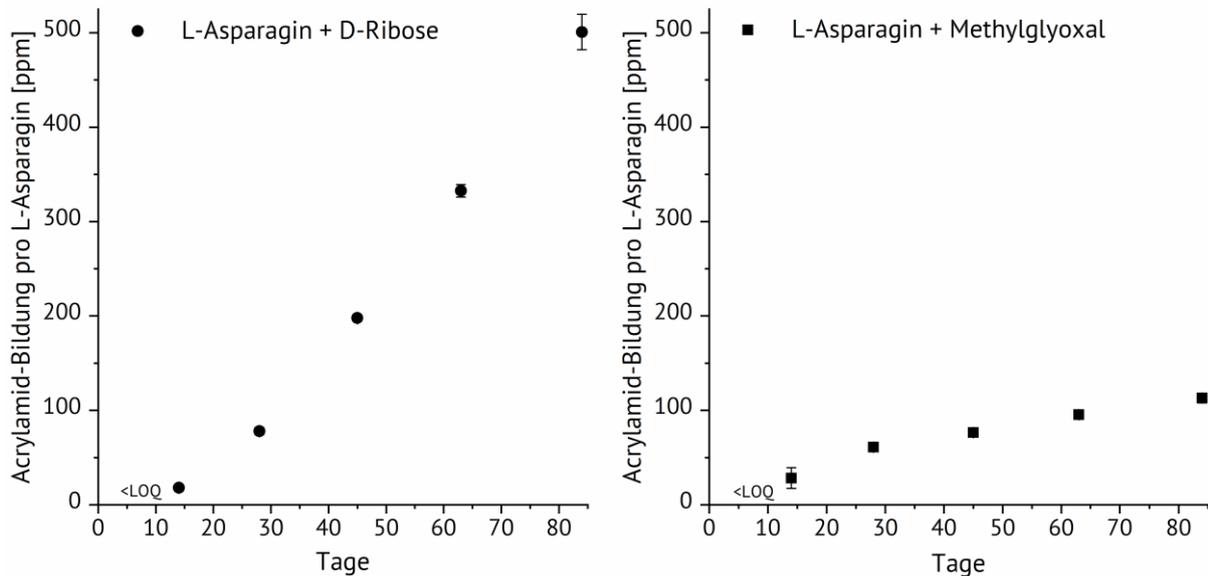


Abbildung 6-20 Bildung von Acrylamid aus (links) L-Asparagin und D-Ribose bzw. (rechts) aus L-Asparagin und Methylglyoxal bei 37 °C und pH 7,4 über die Zeit. Dargestellt ist die Acrylamid-Bildung in ppm pro eingesetzter Menge L-Asparagin (~15 nmol). LOQ Bestimmungsgrenze (hier 0,007 nmol/ml Acrylamid, entsprechend circa 14 ppm).

Die Bildung von Acrylamid aus dem Reaktionsgemisch von L-Asparagin und D-Ribose zeigte einen progressiven Anstieg. Während nach sieben Tagen die Menge des gebildeten Acrylamids unterhalb des LOQ lag, konnte am zweiten Analysezeitpunkt nach 14 Tagen 18±3 ppm Acrylamid pro eingesetzter Menge L-Asparagin (jeweils circa 15 nmol) quantifiziert werden. Die Menge an gebildetem Acrylamid stieg daraufhin auf bis zu 501±19 ppm Acrylamid pro eingesetzter Menge L-Asparagin nach 84 Tagen Reaktionszeit an.

Im Vergleich hierzu stieg die Acrylamid-Bildung des Reaktionsansatzes von L-Asparagin und Methylglyoxal deutlich langsamer an. So lag die Acrylamid-Bildung nach 14 Tagen zwar bereits bei 28±11 ppm pro eingesetzter Menge L-Asparagin, stieg jedoch bis zum letzten Analysezeitpunkt nach 84 Tagen nur auf 113±5 ppm pro eingesetzter Menge L-Asparagin an. Die

dabei zu beobachtende Bildungskurve legt einen nicht linearen, degressiven Verlauf nahe, welcher sich einer Asymptote anzunähern scheint.

Um den Mechanismus der beobachteten Acrylamid-Bildung aus Methylglyoxal und D-Ribose (siehe Abbildung 6-19) unter physiologischen Bedingungen näher zu untersuchen, könnten zukünftig stabilisotopen-markierte Ausgangsverbindungen eingesetzt werden. Durch Erfassen der im Vergleich zu den nicht-markierten Ausgangsverbindungen verschobenen Massenspektren könnten somit Rückschlüsse auf die Herkunft der Atome des gebildeten Acrylamids und somit den Bildungsmechanismus geschlossen werden. So könnte einerseits die Bildung von Acrylamid aus L-Asparagin wie in Abbildung 2-1 (Seite 3) dargestellt über die Bildung einer Schiff'schen Base auch unter physiologischen Temperaturen ablaufen und somit L-Asparagin auch Kohlenstoff-Donator sein. Andererseits könnte der Kohlenstoff von Methylglyoxal als Grundbaustein für das gebildete Acrylamid dienen. Hier wäre eine Reaktion von Methylglyoxal zu Milchsäure denkbar, welche über Aminierung zum entsprechenden Lactamid und anschließender Dehydratisierung Acrylamid bilden könnte. Eine entsprechende Route wurde bereits von Mack *et al.* [2019] im Rahmen einer Acrylnitril-Syntheseroute aus Milchsäure als Edukt postuliert.

Dennoch geben beide Modell-Reaktionen trotz ihres einfachen Versuchsaufbaus einige Hinweise auf mögliche Bildungswege.

Weder bei D-Ribose noch bei Methylglyoxal handelt es sich um Stickstoff-haltige Moleküle, sodass der Amino-Stickstoff des gebildeten Acrylamids höchstwahrscheinlich aus einer der beiden Amino-Gruppen des L-Asparagins stammt. Wie auch bei der thermischen Acrylamid-Bildung in Lebensmitteln [Mottram *et al.*, 2002; Zyzak *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2004] zeigte L-Asparagin auch in den Modell-Reaktionen die höchste Reaktivität, da andere untersuchte Stickstoff-Donatoren wie L-Glutaminsäure, D/L-Methionin und Harnstoff zu keinen quantifizierbaren Mengen Acrylamid führten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass diese Reaktionen mit Glucose durchgeführt wurden, bei deren Reaktion mit L-Asparagin ebenfalls Acrylamid nur in den Reaktionsansätzen nach 28 Tagen nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden konnte.

Interessanterweise wies in den hier beschriebenen Modell-Reaktionen unter physiologischen Bedingungen die Reaktion von D-Ribose eine höhere Acrylamid-Bildung nach 84 Tagen in Bezug auf das eingesetzte L-Asparagin auf als die Reaktion mit dem Dicarbonyl Methylglyoxal bzw. D-Glucose. Im Gegensatz hierzu zeigte Zyzak *et al.* [2003], dass ab einer Temperatur von >200 °C die Bildung von Acrylamid mit steigender Kettenlänge der Carbonylverbindung (D-Glucose < 2-Desoxyglucose < Ribose < Glyceraldehyd < Glyoxal) abnahm.

6.4. Humanstudie II

Die Humanstudie II umfasste einen zehntägigen Studienzeitraum, bei dem es im Vergleich zur Humanstudie I keine streng kontrollierten Bedingungen für die Probanden gab. An der Humanstudie II nahmen 20 Probanden teil, von denen jeweils zehn Gemischtköstler (fünf männlich, fünf weiblich) bzw. Veganer (fünf männlich, fünf weiblich) waren, welche ihre jeweiligen Ernährungsgewohnheiten während des Studienzeitraumes beibehalten sollten. Das Studiendesign und weitere Informationen zur Studie finden sich in Kapitel 5.

Zur besseren Abschätzung der Acrylamid-Exposition wurden durch die EFSA [2015] zum einen Duplikat-Studien, zum anderen die Untersuchung von Biomarkern im Rahmen dieser Studien empfohlen. Durch Duplikat-Studien ist es möglich, die exakte Acrylamid-Aufnahme anhand der zubereiteten und verzehrten Lebensmittel abzuschätzen. Durch gleichzeitiges Monitoring der Expositionsbiomarker können zudem valide Daten generiert werden, um zukünftig anhand dieser auf eine Acrylamid-Exposition zurückschließen zu können [EFSA, 2015]. Um somit unter normalen Lebensbedingungen die über Lebensmittel aufgenommene Acrylamid-Menge mit der renal ausgeschiedenen Menge der Mercaptursäuren AAMA und GAMA vergleichen zu können, wurden alle konsumierten Lebensmittel und der Gesamturin gesammelt und analysiert. Darüber hinaus erfolgte eine Abschätzung einer möglichen Tabakrauch-Exposition anhand der Biomarker Cotinin und CYMA.

Dieses Kapitel enthält Ergebnisse, welche bereits unter dem Titel „*Biomonitoring of nutritional acrylamide intake by consumers without dietary preferences as compared to vegans*“ in *Archives of Toxicology* mit *open access* publiziert wurden [Goerke *et al.*, 2019].

6.4.1. Acrylamid-Gehalte der verzehrten Lebensmittel

Die Acrylamid-Gehalte der von den Probanden erstellten Lebensmittel-Duplikate wurden wie die Lebensmittel der Humanstudie I mit der in Kapitel 9.3 beschriebenen SIVA-Methode nach Aufarbeitung mittels SPE quantifiziert. Die Aufarbeitungen wurden von Herrn Jan Rotermund als Teil seines Forschungspraktikums im Masterstudiengang Lebensmittelchemie, Frau Christine Friedland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit und Frau Rabea Müller während ihrer Ausbildung zur Chemielaborantin durchgeführt.

Ressourcenbedingt wurden nicht alle Lebensmittel analysiert, welche von den 20 Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes konsumiert wurden. Es wurden solche Lebensmittel ausgewählt, von denen messbare Acrylamid-Gehalte zu erwarten waren, wie beispielsweise hocherhitzte Mahlzeiten oder welche in hohen Mengen von einem Probanden konsumiert wurden. Andere Lebensmittel, deren Prozessierung in der Regel nicht zu nennenswerten Acrylamid-Gehalten führt, wie zum Beispiel Wasser, Erfrischungsgetränke, Säfte, Milchprodukte oder rohes Obst und Gemüse, wurden entsprechend von der Analyse ausgeschlossen [Ruenz *et al.*, 2016; EFSA, 2015].

Die Quantifizierung der Acrylamid-Gehalte der Lebensmittel diente auch in Humanstudie II der Bestimmung der individuellen täglichen alimentären Acrylamid-Aufnahme der Probanden während des Studienzeitraumes (siehe Kapitel 6.4.5) sowie der Abschätzung der Acrylamid-Aufnahme der verschiedenen Probandenkollektive, welche im folgenden Kapitel 6.4.2 näher beschrieben ist. Die Acrylamid-Gehalte gruppierter Lebensmittelkategorien der Humanstudie II sind in Tabelle 6-10 aufgeführt.

Tabelle 6-10 In Lebensmittelkategorien zusammengefasste mittlere, minimale und maximale quantifizierbare Acrylamid-Gehalte verschiedener in Humanstudie II verzehrter Lebensmittel.

	n	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
Erhitzte Kartoffelprodukte ¹	18	119	9	289
Chips und Snacks	11	147	15	481
Fleischhaltige Mahlzeiten mit hocherhitzten Beilagen ²	8	81	29	202
Fleischersatz (z. B. Tofu) \pm Beilagen	12	50	15	100
Vegetarische Gerichte	7	24	5	48
(Belegte) Brotwaren	26	50	8	210
Backwaren und Kekse	22	43	6	241
Süßwaren ³	11	84	9	160
Kaffee-Getränke (\pm Milch)	12	8	4	22

¹ z. B. Pommes frites, Krokette

² v. a. Gerichte aus der Mensa, z. B. Schnitzel mit Pommes frites

³ z. B. Schokolade, Eiscreme (\pm Waffel)

n Anzahl Lebensmittelproben

Kommerziell erhältliche Chips und Snackprodukte waren mit im Mittel 147 $\mu\text{g}/\text{kg}$ die Lebensmittelkategorie, in welcher die höchsten Acrylamid-Gehalte der konsumierten Lebensmittel der Humanstudie II erzielt wurden. Das Maximum von 481 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurde hierbei in einer „Kesselchips“-Probe detektiert. Die hier erfassten Acrylamid-Gehalte lagen im Vergleich zu den von der EFSA [2015] erhobenen Daten für Kartoffelchips und -snacks aus frischen Kartoffeln, welche im Mittel 392 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Acrylamid enthielten, in einem wesentlich niedrigeren Bereich.

Auch während der Humanstudie II verzehrte kartoffelhaltige, hocherhitzte Lebensmittel wie Pommes frites oder Krokette wiesen mit im Mittel 119 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und einem Maximum von 289 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hohe Acrylamid-Gehalte auf, aber auch in dieser Kategorie lagen die ermittelten Acrylamid-Gehalte unter denen des EFSA-Datensatzes von im Mittel 308 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [EFSA, 2015].

Da auch komplette Mahlzeiten wie beispielsweise Gericht der Mensa, in der viele Probanden der Humanstudie II zu Mittag aßen, als eine Probe analysiert wurden, wurden diese in separaten Kategorien betrachtet. Hierbei wiesen fleischhaltige Mahlzeiten mit erhitzten Beilagen höhere Acrylamid-Level (81 $\mu\text{g}/\text{kg}$) auf als solche aus Fleischsurrogaten wie Seitan oder Tofu (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Auch der maximal gemessene Acrylamid-Gehalt lag mit 202 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bei den fleischhaltigen

Mahlzeiten über dem der fleischlosen Mahlzeiten mit 100 µg/kg. Dies lässt sich jedoch weniger auf die Fleischkomponente zurückführen als auf den Anteil an (hoch-) erhitzten Beilagen, welche in der Regel hauptverantwortlich für die gemessenen Acrylamid-Gehalte sind. Im Vergleich hierzu wiesen vegetarische Gerichte wie zum Beispiel Gemüsepfannen im Mittel nur 24 µg/kg Acrylamid auf. Auch der maximal gemessene Acrylamid-Gehalt lag hier nur bei 48 µg/kg, welcher in einem Mensa-Gericht aus Schweizer Käsesalat mit Pommes frites detektiert wurde.

Die beiden Lebensmittelkategorien (belegte) Brotwaren und Backwaren und Kekse wiesen mit 50 µg/kg bzw. 43 µg/kg vergleichbare Mittelwerte auf. Auch die gemessenen Maxima lagen in der gleichen Größenordnung. So wurde bei den Brotwaren das Maximum von 210 µg/kg in einem Walnussbrötchen analysiert, das Maximum von 241 µg/kg der Backwaren in einer Gewürzkuchen-Probe. Auch im Lebensmittelscreening der EFSA wurden für Kuchen und Feingebäck ähnliche Werte ermittelt. So lag in dieser Kategorie das Mittel bei 66 µg/kg und das 95. Perzentil bei 219 µg/kg [EFSA, 2015].

Verschiedene als eine Kategorie zusammengefassten Süßwaren zeigten ein breites Spektrum an Acrylamid-Gehalten und lagen im Mittel bei 84 µg/kg. Während in einer Pralineneis-Probe lediglich 9 µg/kg Acrylamid nachgewiesen werden konnte, lag der ermittelte Acrylamid-Gehalt von Haselnusswaffeln bei 160 µg/kg.

Während der Humanstudie II trank etwa die Hälfte der Probanden Kaffee mit oder ohne Milch bzw. Zucker. Im Mittel wiesen die konsumierten Kaffee-Getränke einen Acrylamid-Gehalt von 8 µg/kg bzw. 8 µg/l bei einer angenommenen Dichte von 1 g/ml auf. Das Maximum von 22 µg/kg wurde in einem Espresso gemessen, welches auf die stärkere Espresso-Röstung zurückzuführen ist [EFSA, 2015; Lantz *et al.*, 2006].

Weitere Acrylamid-Gehalte von verzehrten Lebensmitteln während der Humanstudie II finden sich bei dem jeweiligen Probanden in Kapitel 6.4.5, dem diese Probe jeweils zugeordnet werden konnte.

6.4.2. Acrylamid-Aufnahme der Probanden

Auf Basis der ermittelten Acrylamid-Gehalte der von den 20 Probanden selbst hergestellten Duplikate der verzehrten Lebensmittel sowie der protokollierten Menge und Uhrzeit konnte die tägliche Acrylamid-Aufnahme abgeschätzt werden. Die Acrylamid-Aufnahme wurde individuell für jeden Probanden und Studientag anhand eines *Middle-Bound*-Ansatzes abgeschätzt [EFSA, 2015]. Hierfür wurden alle Acrylamid-Gehalte, deren Werte unter dem LOD lagen, auf 0 µg/kg gesetzt. Der LOD lag in Abhängigkeit von der Lebensmittelmatrix in einem Bereich von 0,3–24 µg/kg. Für Acrylamid-Werte, die >LOD und <LOQ waren, wurde die Hälfte des LOQ-Wertes angesetzt. Die gemessenen LOQ-Werte lagen hierbei in einem Bereich von 1,1–36 µg/kg. Für Lebensmitteln, welche nicht weiter analysiert wurden, wurde ebenso ein Acrylamid-Gehalt von 0 µg/kg angenommen.

Die so ermittelten mittleren Acrylamid-Aufnahmen und Extremwerte der Probanden sowie der einzelnen Probandenkollektive sind in Tabelle 6-11 aufgeführt. Eine Übersicht der individuellen

Acrylamid-Aufnahme der einzelnen Probanden gibt Abbildung 6-21. Eine ausführliche Darstellung der individuellen Studientage jedes Probanden ist hingegen in Kapitel 6.4.5 gegeben.

Tabelle 6-11 Mittlere und absolute maximale tägliche Acrylamid-Aufnahme verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.

	n	Acrylamid-Aufnahme			
		[µg/kg Körpergewicht/Tag]		[nmol/Tag]	
		Mittelwert	Maximum	Mittelwert	Maximum
Alle Probanden	20	0,32	2,51	299	2.200
Männer	10	0,29	1,87	323	2.200
Frauen	10	0,35	2,51	276	2.112
Gemischtköstler	10	0,26	1,58	244	1.097
männlich	5	0,21	0,93	237	1.091
weiblich	5	0,33	1,58	264	1.097
Veganer	10	0,38	2,51	355	2.200
männlich	5	0,38	1,87	409	2.200
weiblich	5	0,39	2,51	301	2.112

n Anzahl Probanden.

Während der zehntägigen Humanstudie II betrug die mittlere alimentäre Acrylamid-Aufnahme aller 20 Probanden 299 ± 178 nmol/d ($0,32 \pm 0,19$ µg/kg KG/d). Es zeigten sich deutliche Schwankungen zwischen den Probanden und den einzelnen Tagen. So lag das in diesem Zeitraum ermittelte Maximum bei 2.200 nmol/d ($2,51$ µg/kg KG/d), gleichzeitig konnte für einzelne Probanden an manchen Studientagen keine Acrylamid-Exposition anhand der konsumierten Lebensmittel (<LOD) festgestellt werden (siehe Abbildung 6-21). Somit lag die in dieser Studie ermittelte mittlere Acrylamid-Aufnahme der Probanden leicht unter dem unteren Bereich der mittleren europäischen Exposition von 0,4–0,9 µg/kg KG, das Maximum der Humanstudie II lag jedoch über dem 95. Perzentil von 0,6–2,0 µg/kg KG [EFSA, 2015].

Männliche Probanden zeigten mit 323 ± 112 nmol/d eine höhere alimentäre Acrylamid-Exposition als weibliche Probanden mit 276 ± 145 nmol/d. Auf Basis des Körpergewichts der Probanden zeigten jedoch weibliche Probanden mit $0,35 \pm 0,20$ µg/kg KG eine höhere durchschnittliche Acrylamid-Exposition als männliche Probanden mit $0,29 \pm 0,18$ µg/kg KG.

Darüber hinaus nahmen sich vegan ernärende Probanden mit 355 ± 228 nmol/d ($0,38 \pm 0,23$ µg/kg KG/d) mehr Acrylamid auf als omnivore Probanden mit durchschnittlich 244 ± 90 nmol/d ($0,26 \pm 0,10$ µg/kg KG/d). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,18$). Mögliche Unterschiede zwischen Omnivoren und Vegetariern (definiert durch den Ausschluss von Fleisch und Fisch aus ihrer Ernährung) wurden bereits von Kotova *et al.* [2015] anhand der Mikronukleus-Häufigkeit in Transferrin-positiven unreifen peripheren Blutretikulozyten sowie der Hämoglobin-Addukt-Level untersucht. Zwar zeigten in dieser Studie Vegetarier ($n=27$) eine signifikant ($p < 0,01$) geringere Häufigkeit an Mikronuklei als das sich nicht vegetarisch ernärende Probandenkollektiv ($n=26$), die Hämoglobin-Addukt-Level von AVal und GVal unterschieden sich jedoch nicht signifikant von Omnivoren ($n=24$) zu Vegetariern ($n=29$) [Kotova *et al.*, 2015].

Bei dem Vergleich der Studien ist jedoch zu beachten, dass es Unterschiede zwischen einer vegetarischen und einer veganen Ernährungsweise geben kann. Zudem handelt es sich wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben bei Hämoglobin-Addukten um Langzeit-Expositionsbiomarker, welche eine kumulative Acrylamid-Exposition über die gesamte Lebensdauer humaner Erythrozyten von circa 120 Tagen widerspiegeln.

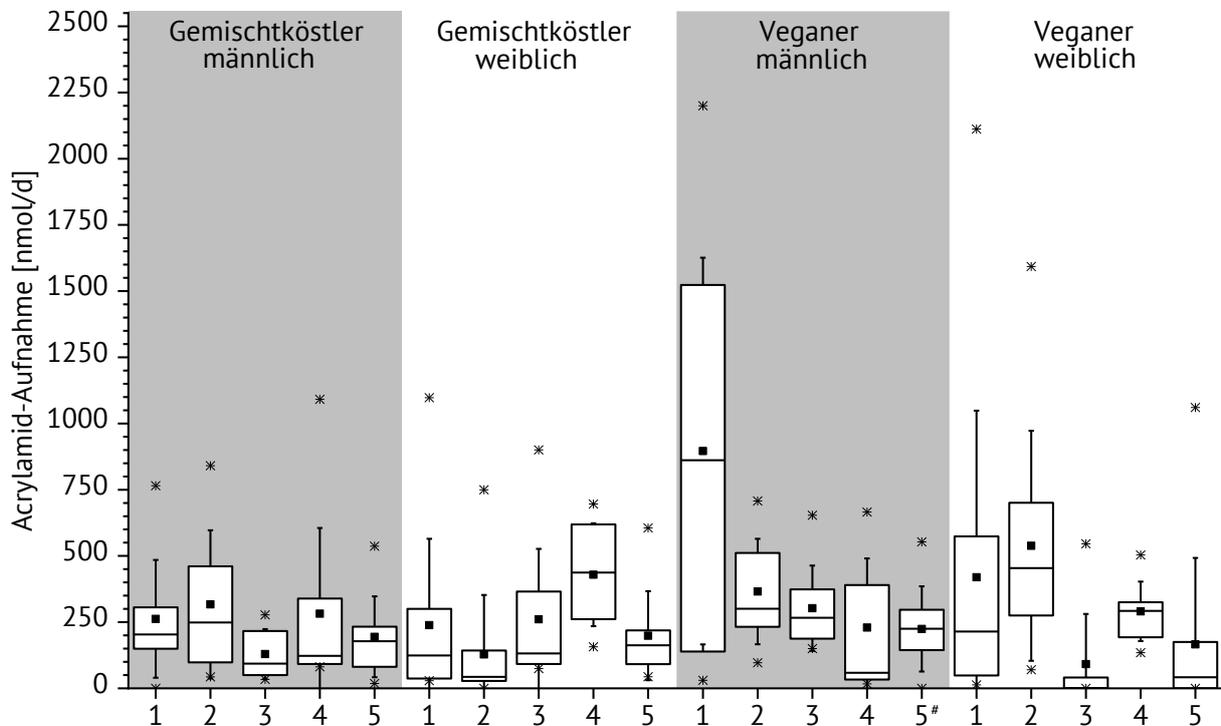


Abbildung 6-21 Überblick über die Acrylamid-Aufnahme jedes Probanden der zehntägigen Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.

Andere Duplikatstudien aus Japan erfassten im Gegensatz zur Humanstudie II mit 24 h bzw. zwei Tagen kürzere Zeitintervalle zur Erfassung der alimentären Acrylamid-Exposition [Yamamoto *et al.*, 2018; Kawahara *et al.*, 2019]. In beiden Studien ergaben sich geringere Acrylamid-Expositionen im Vergleich zu den Daten der Humanstudie II. So ermittelten Yamamoto *et al.* [2018] anhand der Auswertung von Duplikat-Mahlzeiten über zwei Tage eine Acrylamid-Exposition von 0,106 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$, Kawahara *et al.* [2019] ermittelten zwar eine geringere Acrylamid-Aufnahme von 215 $\text{ng}/\text{kg KG}/\text{d}$, der Bereich der Aufnahmemengen (8–1.582 $\text{ng}/\text{kg KG}/\text{d}$) umfasste jedoch ähnlich zu den Daten der Humanstudie II einen weiten Bereich. Neben den deutlich kürzeren Studienzeiträumen könnten auch unterschiedliche länderspezifische Ernährungsgewohnheiten zu den beobachteten Unterschieden beigetragen haben.

Um den Beitrag bestimmter Lebensmittel zur Acrylamid-Aufnahme der omnivoren bzw. veganen Probanden besser abschätzen zu können, wurden diese in Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 6.4.2) und in Bezug zu den Probandenkollektiven gesetzt. Die unterschiedlichen Anteile der einzelnen

Lebensmittelgruppen an der alimentären Acrylamid-Aufnahme von Gemischtköstlern und Veganern ist in Abbildung 6-22 zu sehen.

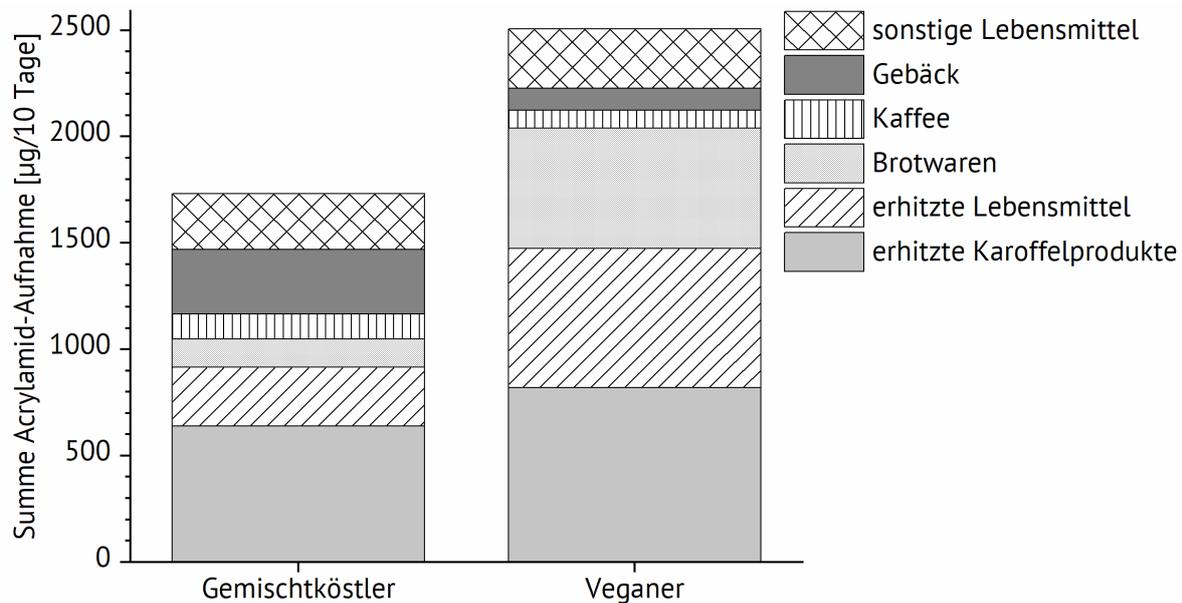


Abbildung 6-22 Vergleich des Beitrags verschiedener Lebensmittelgruppen zur gesamten Acrylamid-Aufnahme während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II von Gemischtköstlern (n=10) und Veganern (n=10, V-m-5: 9 Tage).

Obwohl das Probandenkollektiv mit 20 Probanden recht klein war, lassen sich dennoch Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der individuellen Acrylamid-Exposition über die Nahrung von Faktoren des Lebensstils und der unterschiedlichen Ernährungspräferenzen schließen. Allgemeingültige Aussagen über die Acrylamid-Exposition der deutschen bzw. europäischen Bevölkerung lassen sich hingegen nicht treffen.

Generell trug regelmäßiger Verzehr von rohem Obst und Gemüse wie Salat nicht zu einer Acrylamid-Exposition der Probanden bei, sodass diese im Mittel eine niedrigere Exposition aufwiesen als solche, die regelmäßig erhitze Lebensmittel und Brot- und Backwaren konsumierten. Die höchsten Anteile an der Acrylamid-Aufnahme während des Studienzeitraumes der 20 Probanden machten erhitze Kartoffelprodukte wie Pommes frites oder Kartoffelchips mit durchschnittlich 31 % der Gesamtaufnahme an Acrylamid aus. Weitere erhitze, jedoch nicht frittierte, Mahlzeiten wurden zwar häufiger und regelmäßiger als erhitze Kartoffelprodukte konsumiert, machten jedoch bedingt durch niedrigere Acrylamid-Gehalte nur ein Viertel der Acrylamid-Aufnahme aus. Während der Anteil erhitzter Mahlzeiten bei den Gemischtköstlern nur bei 20 % lag, trugen sie bei den sich vegan ernährenden Probanden zu 29 % zur alimentären Acrylamid-Exposition bei, welches indikativ für den Einfluss verschiedener Ernährungsformen auf die Acrylamid-Aufnahme durch die Ernährung ist.

Die Mehrzahl der Probanden (n=18) verzehrten während des Studienzeitraumes regelmäßig Brotwaren wie (belegte) Brote, Brötchen oder Laugengebäck, welche zu 16 % der Gesamtexposition beitrugen. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Gemischtköstlern (8 %) und Veganern (23 %). Im Gegensatz hierzu wurden Backwaren und Kekse

vorwiegend von sich omnivor ernährenden Probanden konsumiert, welches 15 % ihrer Gesamtaufnahme an Acrylamid ausmachte, im Gegensatz zu veganen Probanden, deren Acrylamid-Gesamtexposition nur zu 5 % über diese Lebensmittelgruppe zustande kam. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Backwaren oftmals nicht vegane Zutaten wie Eier oder Milchprodukte enthalten und somit nicht mit einer veganen Ernährungsweise vereinbar sind.

Sowohl sich vegan als auch sich omnivor ernährende Probanden konsumierten während der Studie regelmäßig Kaffee-Getränke. Im Mittel wurden $18,4 \pm 10,0 \mu\text{g}$ Acrylamid innerhalb von zehn Tagen über das Kaffeetrinken aufgenommen, welches einem Anteil von $11 \pm 5 \%$ der gesamten Aufnahme bei Kaffeetrinkern (11 von 20 Probanden) entsprach. Der Anteil unter allen 20 Probanden entsprach 6 % der Gesamtaufnahme.

Unter Beachtung unterschiedlicher Ernährungskulturen stimmen diese Ergebnisse mit denen von Yamamoto *et al.* [2018] im Wesentlichen überein, welche in ihrer zweitägigen Duplikatstudie in Japan gemischte Speisen, Süßwaren, Gemüse und Getränke als hauptsächlich zur alimentären Acrylamid-Aufnahme beitragende Lebensmittelgruppen identifizierten.

6.4.3. Renale Bezugsgrößen

Wie bereits in Humanstudie I wurden auch für Humanstudie II als Bezugsgrößen für die renal ausgeschiedenen Expositionsbiomarker neben dem gesamten Urinvolumen der ucr-Gehalt der Urinproben herangezogen.

Die Urinvolumina ergaben sich nach Ermittlung des Uringewichtes unter der Annahme einer Dichte von 1 g/ml (siehe Kapitel 9.4) und sind in Anhang A.10 ab Seite 275 zu finden.

Die ermittelten ucr-Gehalte sind in Anhang A.11 gelistet. Die Bestimmung nach der in Kapitel 9.5 beschriebenen Methode wurde zusammen mit Frau Rabea Müller und Frau Dr. Meike Rünz durchgeführt.

Da die Probanden neben den beiden 12-h-Intervallen zusätzlich eine Spoturin-Probe aus dem Morgenurin abgaben, wurde dieser formal in den zweiten Sammelzeitraum von 20:00–08:00 Uhr addiert.

6.4.4. Ausscheidung der Acrylamid-Mercaptursäuren

Neben der Erfassung der Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung wurde in Humanstudie II auch ein Monitoring der Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA über den gesamten Studienzeitraum von zehn Tagen durchgeführt. Hierzu wurde der Gesamturin in zwei 12-h-Intervallen (08:00–20:00 Uhr bzw. 20:00–08:00 Uhr des Folgetages) gesammelt und in einer Doppel- bzw. Dreifachbestimmung analysiert. Zusätzlich erfolgte die Abgabe einer Spoturin-Probe mit dem Morgenurin, also vor 08:00 Uhr, welche separat analysiert wurde. Neben der Bestimmung der absolut ausgeschiedenen Mengen, wurden die renal ausgeschiedenen Mercaptursäuren ebenso in das Verhältnis zum ucr-Gehalt der Urinproben gesetzt.

Die Quantifizierung der Mercaptursäuren im Urin der Probanden erfolgte mit der gleichen Methodik wie bereits für die Urinproben der Humanstudie I, welche in Kapitel 9.6.2 näher

erläutert wird. Die Aufarbeitung und Messung der Urinproben mehrerer Probanden erfolgten durch Frau Dipl.-LMChem. Christine Friedland, Frau Rabea Müller und Frau Dipl.-LMChem. Sabrina Abel. Die so ermittelten Gehalte der Mercaptursäuren sind im Anhang A.12 (Seite 281 ff) tabellarisch zusammengefasst.

In allen Urinproben der Studie konnten die Mercaptursäure AAMA und GAMA quantifiziert werden (>LOQ). Aus Tabelle 6-12 geht die mittlere, minimale sowie maximale Ausscheidung beider Mercaptursäuren der verschiedenen Probandenkollektive hervor.

Tabelle 6-12 Minimale, maximale und mittlere tägliche AAMA- bzw. GAMA-Ausscheidung als absolut ausgeschiedene Mengen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.

	n	AAMA-Ausscheidung [nmol/Tag]			GAMA-Ausscheidung [nmol/Tag]		
		Mittel	Min.	Max.	Mittel	Min.	Max.
Alle Probanden	20	312	46	1.338	45	11	109
Männer	10	325	124	873	52	26	109
Frauen	10	299	46	1.338	38	11	103
Gemischtköstler	10	251	73	514	40	11	85
männlich	5	291	159	514	50	30	85
weiblich	5	211	73	460	30	11	50
Veganer	10	374	46	1.338	50	16	109
männlich	5	360	124	873	53	26	109
weiblich	5	387	46	1.338	46	16	103

AAMA: *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA: *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; n Anzahl Probanden; Min. Minimum; Max. Maximum.

Im zehntägigen Studienzeitraum betrug die mittlere AAMA-Ausscheidung 312 nmol/d (46–1.338 nmol/d) für alle Probanden. Die Ausscheidung von GAMA lag entsprechend als weniger gebildete Mercaptursäure mit durchschnittlich 45 nmol/d (11–109 nmol/d) unter den Werten von AAMA. Gleichsinnig zu der höheren absoluten Acrylamid-Aufnahme der männlichen Probanden schieden diese mit 325 nmol/d (AAMA) bzw. 52 nmol/d (GAMA) auch höhere Level der Mercaptursäuren aus als die weiblichen Probanden mit 299 nmol/d (AAMA) bzw. 38 nmol/d (GAMA). Ebenso schieden vegane Probanden mit 374 nmol/d AAMA und 50 nmol/d GAMA höhere absolute Mengen aus als Gemischtköstler, welche durchschnittlich 251/d nmol AAMA und 40 nmol/d GAMA ausschieden.

Zur Erfassung der Eliminationskinetik und zur Einordnung der Spoturin-Proben in den Gesamtkontext wurde die Mercaptursäure-Ausscheidung zusätzlich in das Verhältnis zur renalen Kreatinin-Ausscheidung (ucr) gesetzt, welche direkt abhängig von der Muskelmasse des jeweiligen Probanden ist und in der Regel somit bei Männern höher als bei Frauen ist. Die um die ucr-Level korrigierten Mercaptursäure-Ausscheidungen der 12-h-Urinsammelzeiträume sind in Tabelle 6-13 gelistet.

Tabelle 6-13 Minimale, maximale und mittlere AAMA- bzw. GAMA Ausscheidung als Kreatinin-korrigierte Konzentrationen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.

	n	AAMA-Ausscheidung [nmol/g ucr/12 h]			GAMA-Ausscheidung [nmol/g ucr/12 h]		
		Mittel	Min.	Max.	Mittel	Min.	Max.
Alle Probanden	397	191	40	1.059	27	11	131
Männer	198	156	47	423	25	13	58
Frauen	199	226	40	1.059	29	11	131
Gemischtköstler	199	136	47	470	21	11	41
männlich	100	122	47	259	21	13	40
weiblich	99	150	57	470	21	11	41
Veganer	198	247	40	1.059	33	14	131
männlich	98	191	75	423	28	17	58
weiblich	100	301	40	1.059	38	14	131

AAMA: *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA: *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; n Anzahl Probanden; Min. Minimum; Max. Maximum; ucr renales Kreatinin.

Auf ucr bezogen lag die mittlere AAMA-Ausscheidung aller Probanden somit bei 191 nmol/g ucr/12 h, die von GAMA bei 27 nmol/g ucr/12 h. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Daten zu Nichtrauchern (siehe Tabelle 2-5 für AAMA, Tabelle 2-6 für GAMA), aus welchem auch dieses Probandenkollektiv gemäß Studiendesign bestand [Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2008]. Interessanterweise lag dennoch die maximal gemessene AAMA-Ausscheidung von 1.059 nmol/g ucr in einem Bereich, welcher von Kellert *et al.* [2006] für gelegentliche Raucher (0,14–1,73 $\mu\text{mol/g ucr}$) bzw. Raucher (0,34–1,52 $\mu\text{mol/g ucr}$) erfasst worden ist. Im Vergleich hierzu umfasste die AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern derselben Studie einen Bereich von 0,06–0,42 $\mu\text{mol/g ucr}$ [Kellert *et al.*, 2006].

Für weibliche Probanden ergab sich auf ucr bezogen eine durchschnittliche AAMA-Ausscheidung von 226 nmol/g ucr/12 h und für männliche Probanden von 156 nmol/g ucr/12 h. Auch die GAMA-Ausscheidung zeigte einen gleichsinnigen Trend von Männern (25 nmol/g ucr/12 h) zu Frauen (29 nmol/g ucr/12 h), lediglich bei den Gemischtköstlern gab es keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der mittleren Ausscheidung, welche in beiden Gruppen bei 21 nmol/g ucr/12 h lag. Auch unter Bezugnahme auf ucr schieden Veganer mehr AAMA (247 nmol/g ucr/12 h) und GAMA (33 nmol/g ucr/12 h) aus als Gemischtköstler mit 136 nmol/g ucr/12 h AAMA und 21 nmol/g ucr/12 h GAMA.

Da jeder Proband in dieser Studie im Gegensatz zum Studiendesign der Humanstudie I seine üblichen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten beibehält, variierte neben der individuellen Acrylamid-Aufnahme (siehe Abbildung 6-21) auch die Ausscheidung von AAMA (Abbildung 6-23) und GAMA (Abbildung 6-24) stark zwischen den einzelnen Probanden als auch zwischen den einzelnen Studientagen.

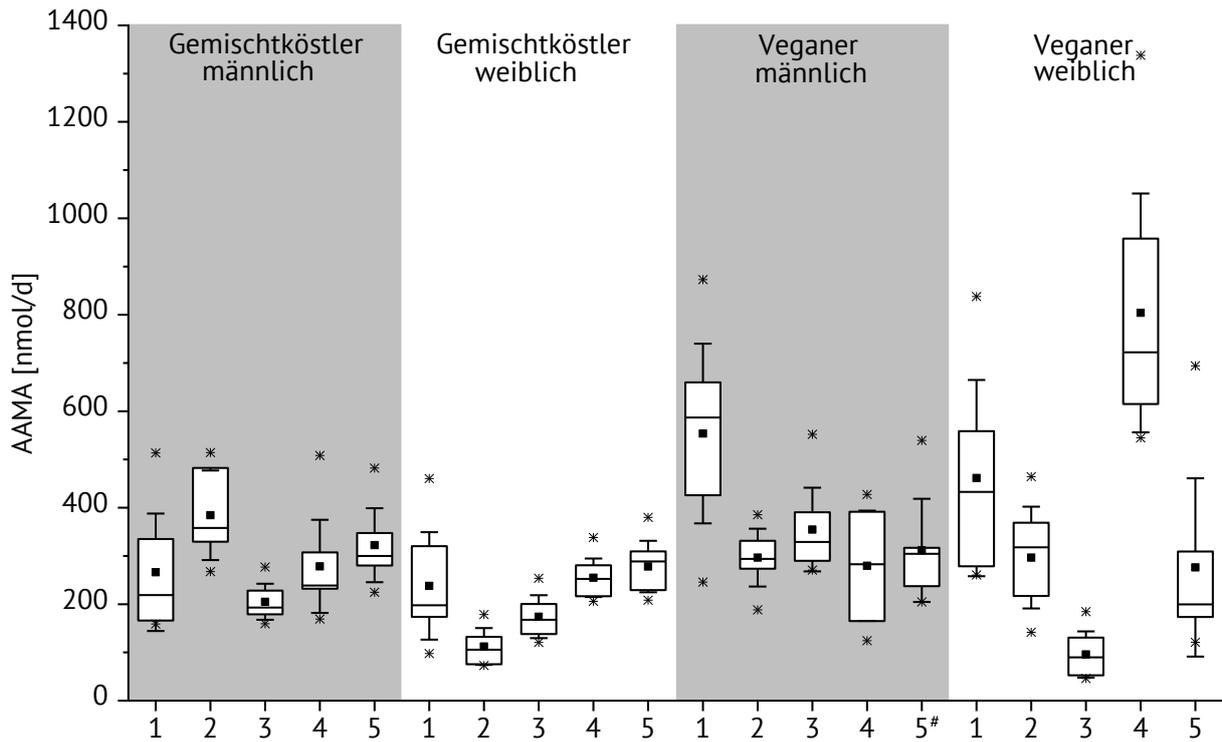


Abbildung 6-23 Übersicht über die AAMA-Ausscheidung jedes Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.

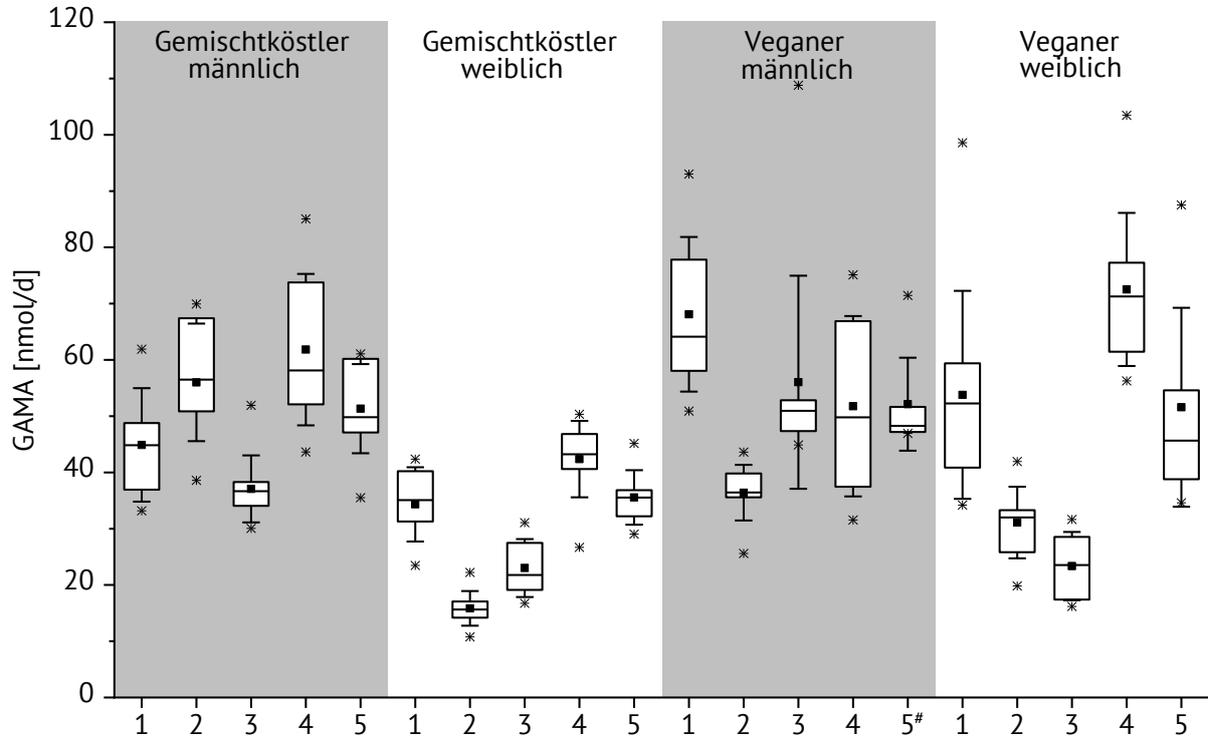


Abbildung 6-24 Übersicht über die GAMA-Ausscheidung jedes Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.

Auffällig hierbei war, dass im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme einige Probanden ein höheres Ausscheidungslevel an Mercaptursäuren zeigten. Insbesondere GK-m-2, GK-m-5, GK-w-5 sowie die beiden veganen Probanden V-w-4 und V-w-5 zeigten im Verhältnis zur erfassten Acrylamid-Aufnahme über Lebensmittel während des Studienzeitraumes eine erhöhte Biomarker-Ausscheidung. Da neben einer alimentären Exposition von Acrylamid auch weitere relevante Expositionswege wie Tabakrauch existieren, wurden die Urinproben nach Einholung des Einverständnisses der Ethikkommission und der Probanden auf ihre Gehalte an Cotinin und CYMA untersucht, welches näher im folgenden Kapitel 6.4.5 beschrieben ist.

6.4.5. Ausscheidung der Tabakrauch-Biomarker Cotinin und CYMA

Neben den Mercaptursäuren AAMA und GAMA wurden auch die mit Tabakrauch assoziierten Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA bestimmt, um eine stellenweise aufgetretene überproportionale Ausscheidung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren im Vergleich zur alimentären Acrylamid-Aufnahme näher beleuchten zu können. Da für diese zusätzlichen Messungen ein Amendment zum Ethikantrag sowie eine zusätzliche schriftliche Einverständniserklärung notwendig waren, konnten die Tabakrauch-Biomarker lediglich in einer Sub-Gruppe von 16 Probanden untersucht werden, da vier Probanden (GK-m-5, GK-w-2, V-m-3 und V-w-2) nicht mehr erfolgreich kontaktiert werden konnten.

Die Quantifizierung erfolgte in den bereits aufgearbeiteten SPE-Eluaten der Urinproben für Cotinin mittels interner Kalibrierung bzw. für CYMA mittels externer Kalibrierung. Details zur Methodik finden sich in Kapitel 9.7.2. Die so ermittelten Gehalte finden sich im Anhang A.13 ab Seite 287.

Wie anhand der Übersicht der Ausscheidungen der einzelnen Probanden (siehe Abbildung 6-25 für Cotinin, Abbildung 6-26 für CYMA) hervorgeht, zeigten jeweils die gleichen Probanden auf beide renale Biomarker eine simultane Antwort nach einer möglichen Tabakrauch-Exposition, sodass im Folgenden weitestgehend nur auf Cotinin eingegangen wird, da hier die Biomarker-Antwort deutlicher als bei CYMA ausfiel.

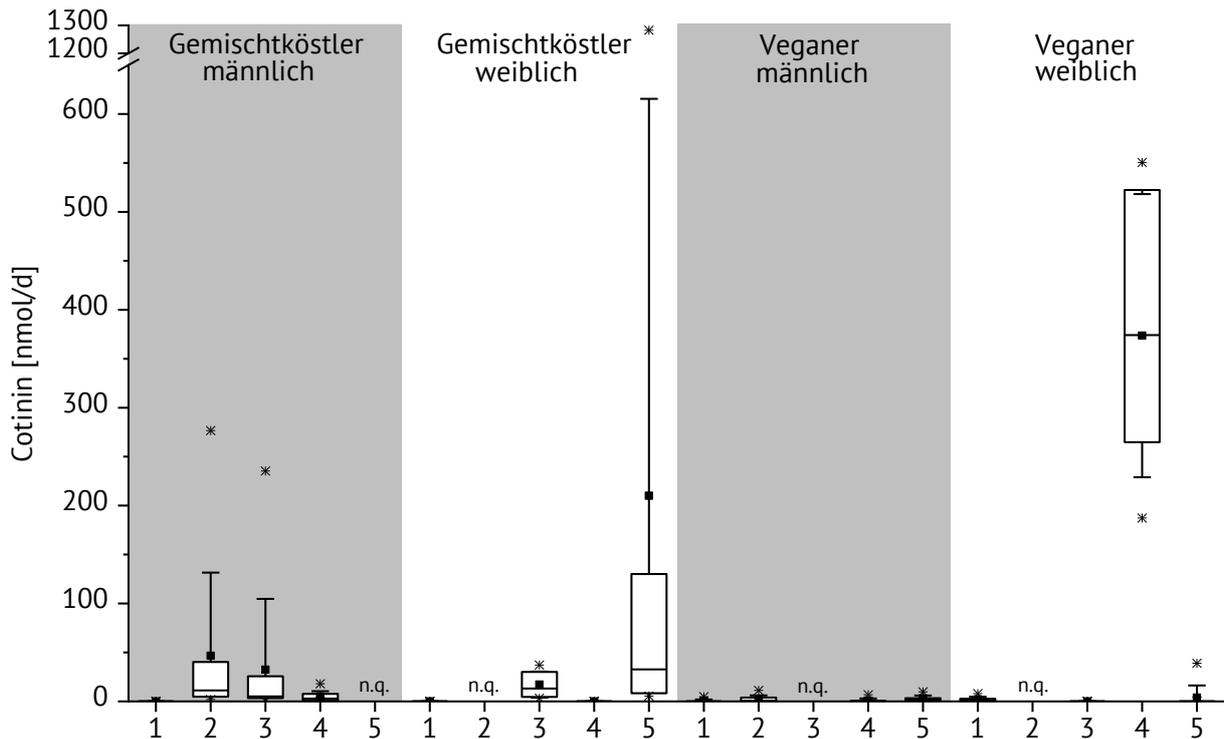


Abbildung 6-25 Übersicht über die Cotinin-Ausscheidung der Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II, die ihre schriftliche Einwilligung zur Quantifizierung gaben. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; n.q. nicht quantifiziert; # für V-m-5 neuntägige Studie.

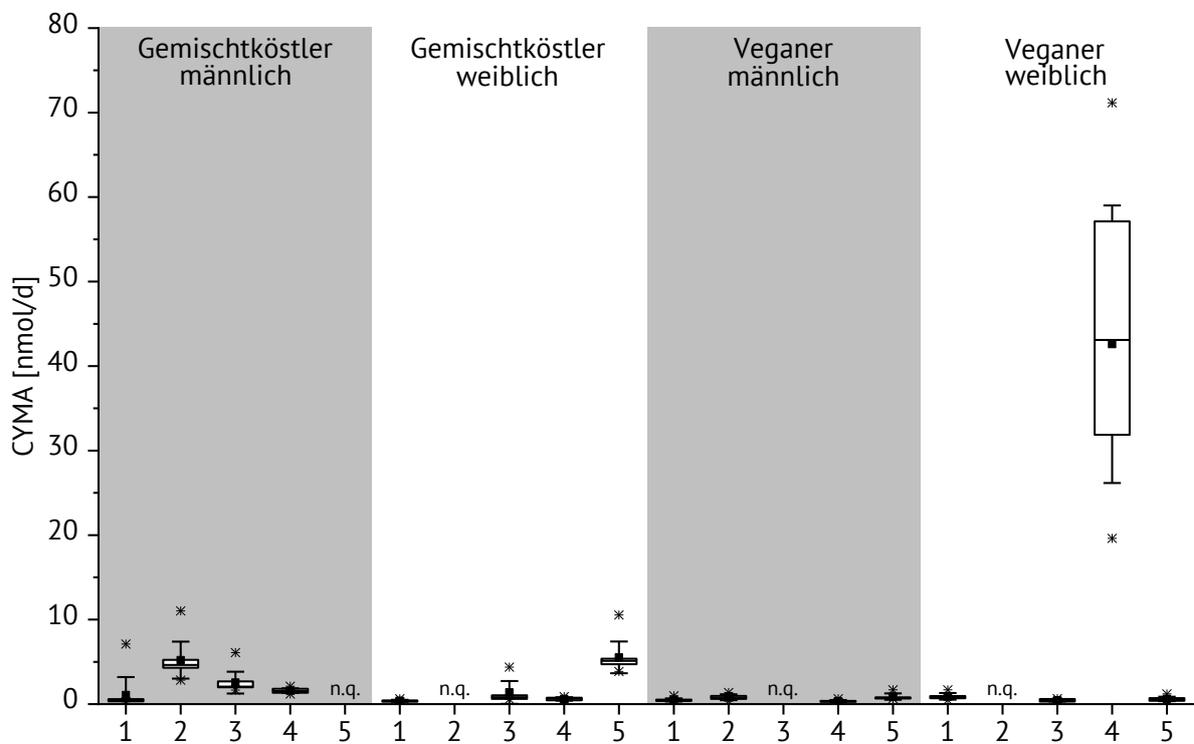


Abbildung 6-26 Übersicht über die CYMA-Ausscheidung der Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II, die ihre schriftliche Einwilligung zur Quantifizierung gaben. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; n.q. nicht quantifiziert; # für V-m-5 neuntägige Studie.

In Tabelle 6-14 sind die gemittelten, minimalen und maximalen molaren Cotinin- und CYMA-Ausscheidungen der verschiedenen Probandenkollektive zusammengefasst. Im Mittel schied die Sub-Gruppe von 16 Probanden pro Tag mit 44 nmol Cotinin im Vergleich zu 4,1 nmol CYMA wesentlich mehr des Nikotin-assoziierten Expositionsbiomarkers aus als der von Acrylnitril hervorgehenden Mercaptursäure CYMA.

Tabelle 6-14 Minimale, maximale und mittlere tägliche Cotinin- und CYMA-Ausscheidung als absolut ausgeschiedene Mengen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.

	n	Cotinin-Ausscheidung [nmol/Tag]			CYMA-Ausscheidung [nmol/Tag]		
		Mittel	Min.	Max.	Mittel	Min.	Max.
Alle Probanden	16	44	<LOD	1.283	4,1	0,2	71,2
Männer	8	11	<LOD	277	1,6	0,2	11,0
Frauen	8	76	<LOD	1.283	6,6	0,2	71,2
Gemischtköstler	8	39	<LOD	1.283	2,3	0,2	11,0
männlich	4	21	<LOD	277	2,6	0,3	11,0
weiblich	4	57	<LOD	1.283	2,0	0,2	10,5
Veganer	8	49	<LOD	550	6,0	0,2	71,2
männlich	4	2	<LOD	11	0,6	0,2	1,7
weiblich	4	95	<LOD	550	11,1	0,3	71,2

CYMA N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cystein; n Anzahl Probanden; Min. Minimum; Max. Maximum; LOD Bestimmungsgrenze.

Da sich in der Literatur oft Angaben zur ausgeschiedenen Menge Cotinin bezogen auf das Urinvolumen finden, finden sich die entsprechenden Parameter in Tabelle 6-15.

Tabelle 6-15 Minimale, maximale und mittlere tägliche Cotinin-Ausscheidung in µg/l verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.

	n	Cotinin-Ausscheidung [µg/l]		
		Mittel	Minimum	Maximum
Alle Probanden	16	4,3	<LOD	208,2
Männer	8	1,5	<LOD	43,3
Frauen	8	7,1	<LOD	208,2
Gemischtköstler	8	6,1	<LOD	208,2
männlich	4	2,7	<LOD	43,3
weiblich	4	9,4	<LOD	208,2
Veganer	8	2,6	<LOD	36,2
männlich	4	0,2	<LOD	1,3
weiblich	4	4,9	<LOD	36,2

LOD Bestimmungsgrenze; n Anzahl Probanden

Bezogen auf das jeweilige Urinvolumen schieden die Probanden (n=16) im Mittel 4,3 µg/l Cotinin pro Tag aus, welches somit unterhalb des Grenzwertes (<5 µg/l) von Schettgen *et al.* [2009] für nicht Tabakrauch-exponierte Nichtraucher liegt. Wie jedoch anhand der erfassten Maxima von 208 µg/l für Frauen bzw. 43 µg/l für Männer und der Einzeldarstellung der Probanden oben zu

sehen ist, lassen sich nicht alle Probanden während des zehntägigen Studienzeitraums in diese Kategorie einordnen. Im Gegensatz hierzu gab es jedoch auch in jeder Gruppe Probanden, die über den Studienzeitraum keine nennenswerten Mengen Cotinin (<LOD) ausschieden und somit keine nennenswerte Exposition mit Tabakrauch hatten.

Im Allgemeinen wiesen vegane Probanden für beide Expositionsbiomarker eine höhere mittlere absolute Ausscheidung als sich omnivor ernährende Probanden auf. So lag die mittlere Cotinin-Ausscheidung für Gemischtköstler während des Studienzeitraums bei 39 nmol/d und für Veganer bei 49 nmol/d. Bezogen auf das Urinvolumen zeigten jedoch vegane Probanden geringere Cotinin-Konzentrationen mit 2,6 µg/l im Vergleich zu Gemischtköstlern mit 6,1 µg/l, welches auf die erhöhte Urin-Ausscheidung der Veganer zurückzuführen ist. Während die Veganer der Sub-Gruppe 236 l Urin im zehntägigen Studienzeitraum (ein Proband neun Tage) abgaben, gaben Gemischtköstler lediglich 133 l Urin im gleichen Zeitraum ab.

Darüber hinaus waren weibliche Probanden der Studie mit im Mittel 76 nmol/d (7,1 µg/l) Cotinin stärker Tabakrauch ausgesetzt als männliche Probanden mit 11 nmol/d (1,5 µg/l). Dieser Trend ist jedoch im Wesentlichen auf zwei weibliche Probanden (GK-w-5 und V-w-4) zurückzuführen, die im Vergleich zu den restlichen analysierten Probanden der Sub-Gruppe wesentlich höhere Mengen Cotinin und CYMA ausschieden. Nähere Details hierzu finden sich im folgenden Kapitel 6.4.5.

6.4.6. Vergleich der Acrylamid-Aufnahme mit der Biomarker-Ausscheidung

Dadurch, dass es während der zehntägigen Humanstudie II keine einheitlichen Ernährungsvorgaben gab, wurde eine personenbezogene Einzelauswertung für jeden Probanden und jeweiligen Studientag durchgeführt. Im Folgenden sind für die jeweiligen alimentären Acrylamid-Aufnahmen sowie die entsprechenden Ausscheidungsraten der Acrylamid-assoziierten Expositionsbiomarker AAMA und GAMA als auch der Tabakrauch-Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA über den Studienzeitraum dargestellt.

6.4.6.1. Gemischtköstler

An der Humanstudie II nahmen zehn Gemischtköstler teil, von denen fünf männlich und fünf weiblich waren. Ihre Ernährungsgewohnheiten, welche die Probanden während des Studienzeitraumes beibehielten, zeichneten sich durch eine omnivore Ernährung aus, d. h. es wurden keine Lebensmittelgruppen wie zum Beispiel solchen tierischen Ursprungs aus der täglichen Ernährung ausgeschlossen. Durchschnittlich nahmen die Gemischtköstler 244 ± 90 nmol/d Acrylamid über die Nahrung zu sich. Die durchschnittliche Mercaptursäure-Ausscheidung lag für AAMA bei 251 ± 104 nmol/d und umfasste einen Bereich von 73–514 nmol/d und für GAMA im Mittel bei 40 ± 14 nmol/d und einem Bereich von 11–85 nmol/d.

6.4.6.1.1. Männliche Gemischtköstler

Gemischtköstler GK-m-1. Der Proband GK-m-1 (siehe Abbildung 6-27) nahm durchschnittlich 262 ± 223 nmol ($0,23 \pm 0,20$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) Acrylamid pro Tag auf. Die tägliche Acrylamid-Aufnahme reichte dabei von nicht quantifizierbar (Tag 10) bis 765 nmol an Tag 3 ($0,00$ – $0,68$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) und lag somit im mittleren Bereich der männlichen Gemischtköstler. Die durchschnittliche Ausscheidung von AAMA betrug 266 ± 122 nmol/d, die von GAMA 45 ± 10 nmol/d. Während des gesamten Studienzeitraum konnten keine Cotinin-Gehalte im Probandenurin quantifiziert werden. Am ersten Studientag schied der Proband 7,1 nmol CYMA aus, an den darauffolgenden Tagen lagen die Werte jedoch <1 nmol/d, sodass sich schlussfolgern lässt, dass dieser Proband keine Exposition mit Tabakrauch während des Studienzeitraums hatte.

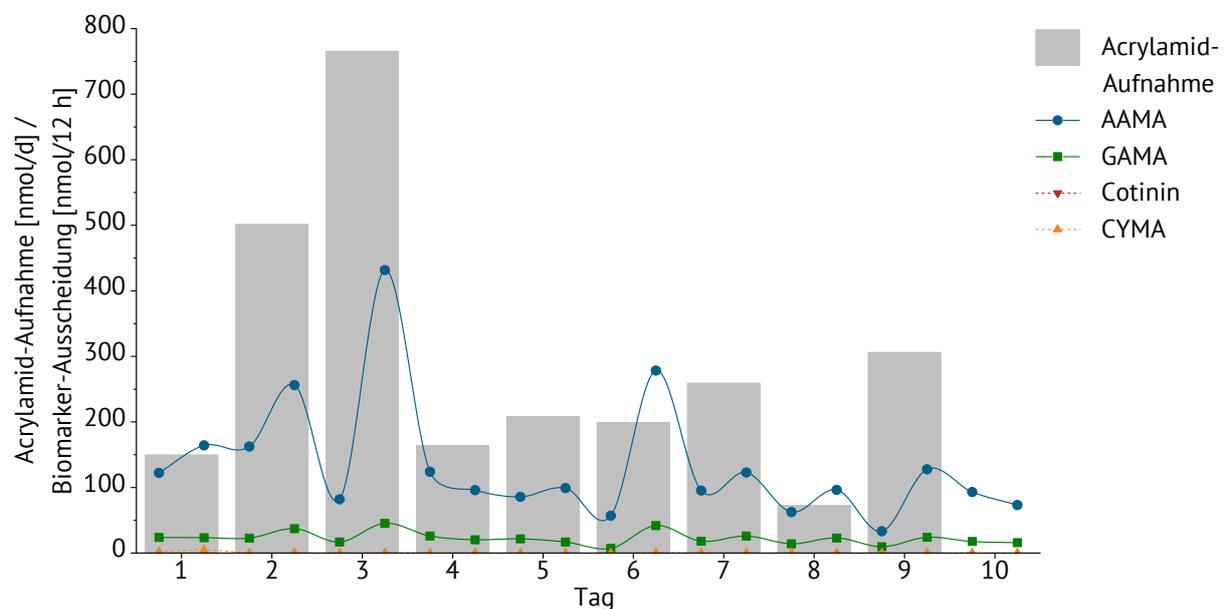


Abbildung 6-27 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-1. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein.

Die höchste alimentäre Acrylamid-Aufnahme des Probanden fand an Tag 2 mit 501 nmol und an Tag 3 mit 765 nmol statt, die jeweils im Wesentlichen auf das Mittagessen (circa 13:00 Uhr) zurückzuführen ist, welches an beiden Tagen in der Mensa vom Probanden zu sich genommen wurde. Beide Mahlzeiten bestanden aus einem hocherhitzten Fleischgericht mit Pommes frites als Beilage. Dies führte jeweils im folgenden Urinsammelzeitraum von 20:00–08:00 Uhr zu einer erhöhten AAMA-Ausscheidung im Vergleich zum jeweiligen Sammelzeitraum davor.

Im Einklang mit der höheren Acrylamid-Aufnahme an Tag 3, stieg ebenso die AAMA-Ausscheidung an Tag 3 von 82 nmol/12 h (126 nmol/g ucr) auf 432 nmol/d (240 nmol/g ucr) stärker an als an Tag 2, bei dem sie von 162 nmol/12 h (146 nmol/g ucr) auf 256 nmol/12 h (196 nmol/g ucr) anstieg. Diese Daten stimmen mit bisherigen Untersuchungen beim Menschen überein, welche nach Gabe von D_3 -Acrylamid ein t_{\max} von 11,5 h für AAMA bestimmten [Boettcher *et al.*, 2006a]. Auch das Maximum nach Gabe von $1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid in Humanstudie I lag mit t_{\max} $10,7 \pm 2,1$ h in einem vergleichbaren Bereich. GAMA als weiterer Expositionsbiomarker von

Acrylamid zeigte ebenso einen Anstieg an beiden Studientagen, welcher jedoch für diesen humanen Nebenmetaboliten insgesamt wesentlich geringer ausfiel [Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Boettcher und Angerer, 2005; Boettcher *et al.*, 2005; Doerge *et al.*, 2007]. So wurde an Tag 3 vom ersten zum zweiten Sammelzeitraum ein Anstieg von 17 nmol/12 h auf 45 nmol/12 h beobachtet.

An Tag 6 konnte ebenfalls ein Anstieg beider Acrylamid-assoziiierter Mercaptursäuren beobachtet werden, welcher sich jedoch nicht mit den an dem Tag konsumierten Lebensmitteln erklären lässt. Während die Acrylamid Aufnahme über die Nahrung mit 199 nmol an Tag 6 einen moderaten Wert annahm, schied der Proband von 20:00–08:00 Uhr des Folgetages mit 278 nmol wesentlich mehr AAMA aus als in dem 12-h-Sammelzeitraum zuvor, in dem nur 57 nmol ausgeschieden wurden. Dies ist möglicherweise auf eine exogene Acrylamid-Exposition zurückzuführen, da der Proband angab, sich an diesem Studientag auf einem Stadtfest und Außenbereich einer Raucherkeipe aufgehalten zu haben. Dies lässt sich jedoch nicht mit den Cotinin-Leveln im Urin belegen, welche <LOD waren. Lediglich für CYMA zeigte sich ein minimal höheres Level an Tag 6 (0,6 nmol) als an den Studientagen 3–5 bzw. 7–10 (0,3–0,4 nmol/d), welches eine mögliche Exposition mit Gasen aus Verbrennungsprozessen nahelegt [Minet *et al.*, 2011].

Gemischtköstler GK-m-2. Im Vergleich zu Proband GK-m-1 schied Proband GK-m-2 mit 384 ± 93 nmol/d (AAMA) bzw. 56 ± 10 nmol/d (GAMA) mehr Mercaptursäuren im zehntägigen Studienzeitraum aus (Abbildung 6-28). Dieser Proband nahm mit im Mittel 317 nmol/d auch mehr Acrylamid auf. Die tägliche Acrylamid-Aufnahme lag dabei in einem Bereich von 43–841 nmol/d. Im Vordergrund der alimentären Acrylamid-Exposition stand der regelmäßige Verzehr von Fast Food wie Pizza, Burger, Sandwiches und Chickenwings sowie Kaffee und Snacks (Schokolade, Eis).

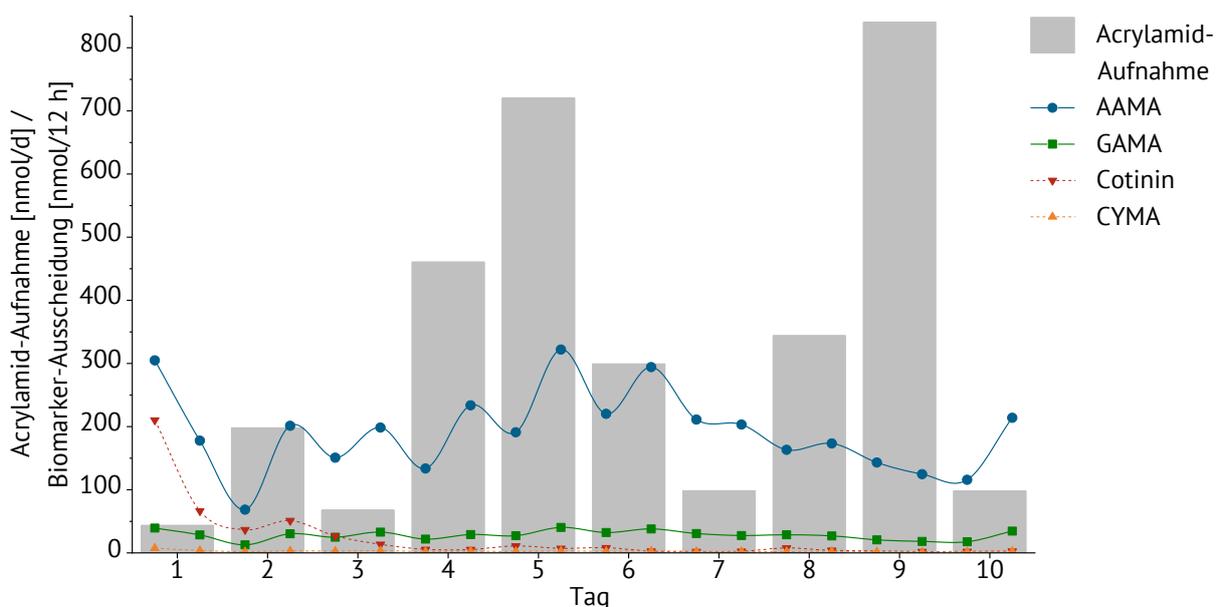


Abbildung 6-28 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-2. AAMA *N*-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CYMA *N*-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cystein; GAMA *N*-acetyl-S-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein.

An den Studientagen 4–6 und 8–9 nahm der Proband besonders hohe Mengen Acrylamid über die Nahrung auf. An allen dieser genannten Tage konsumierte der Proband Haselnuss-Mignon-Schnitten mit einem Acrylamid-Gehalt von 160 µg/kg. Darüber hinaus führte insbesondere der Verzehr von Pizza jeweils an Tag 4 und Tag 5 zu einer Acrylamid-Aufnahme von 461 nmol/d (0,41 µg/kg KG/d) bzw. 720 nmol/d (0,64 µg/kg KG/d). An Tag 9 trug den Großteil zur Acrylamid-Aufnahme der Verzehr eines Mittagessens in der Mensa bei, welches aus Truthahnsteak und Kroketten bestand (55 µg/kg Acrylamid), sowie durch Konsum von Haselnuss-Mignon-Schnitten um 23:00 Uhr.

Im Vergleich hierzu zeigte die Mercaptursäure-Ausscheidung ein ähnliches Bild für die Tage hoher Acrylamid-Aufnahme bzw. deren Folgetage. Im Gegensatz zu GK-m-1 zeigte die Ausscheidung von AAMA und GAMA jedoch ein flacheres Bild. Dies lässt sich durch den regelmäßigeren Konsum Acrylamid-haltiger Lebensmittel über den Tag verteilt erklären, durch welchen weniger auffällige Maxima entstehen wie es beispielsweise beim Einmalverzehr Acrylamid-haltiger Lebensmittel in Kombination mit Fasten der Fall war [Watzek *et al.*, 2012b; Fuhr *et al.*, 2006]. Die Biomarker-Antwort auf den Konsum der Haselnuss-Mignon-Schnitte konnte erst im letzten Urinsammelzeitraum an Tag 10 erfasst werden, in der die AAMA-Ausscheidung von 116 nmol/12h auf 214 nmol/12 h anstieg. Zwar scheint somit das t_{max} verzögert zu sein, liegt aber noch in einem Bereich, welcher in der Literatur bereits beschrieben worden ist. Auch Wang *et al.* [2017] erfassten ein t_{max} für AAMA von 19,1 h, welches oberhalb von Werten anderer Studien liegt [Boettcher *et al.*, 2006a; Goempel *et al.*, 2017].

Am ersten Studientag zeigte der Proband im Vergleich zu einer niedrigen Acrylamid-Aufnahme von 43 nmol bzw. 0,04 µg/kg KG eine erhöhte AAMA-Ausscheidung, welche von 305 nmol/12h auf 145 nmol/12 h abnahm. Diese höheren Level sind wahrscheinlich auf eine Tabakrauch-Exposition vor Studienbeginn zurückzuführen, da auch die Biomarker Cotinin und CYMA am ersten Studientag erhöht waren und an den darauffolgenden Studientagen abnahmen. An Tag 1 schied Proband GK-m-2 277 nmol bzw. 43 µg/l Cotinin aus, welches indikativ für eine hohe passive Belastung mit Tabakrauch ist [Schettgen *et al.*, 2009; Angerer und Schaller, 2001]. Auch die Ausscheidung von CYMA war mit 11 nmol bzw. 2,12 µg/l an Tag 1 erhöht und nahm an den folgenden Tagen ebenso ab. Beide Tabakrauch-Expositionsbiomarker konnten bis Studienende im Urin des Probanden nachgewiesen werden. Da vor Studienbeginn keine Ernährungsprotokolle geführt wurden, können zum Einfluss einer möglichen alimentären Acrylamid-Aufnahme auf die erhöhte Ausscheidung von AAMA und GAMA an Tag 1 keine Aussagen getroffen werden.

Gemischtköstler GK-m-3. Der Gemischtköstler GK-m-3 nahm mit im Mittel 129±94 nmol/d (34–277 nmol/d) von allen männlichen Gemischtköstlern am wenigstens Acrylamid über die Nahrung auf (Abbildung 6-29). In Einklang hiermit schied der Proband durchschnittlich auch die geringste Menge AAMA (205±37 nmol/d) und GAMA (37±6 nmol/d) in dieser Personengruppe aus.

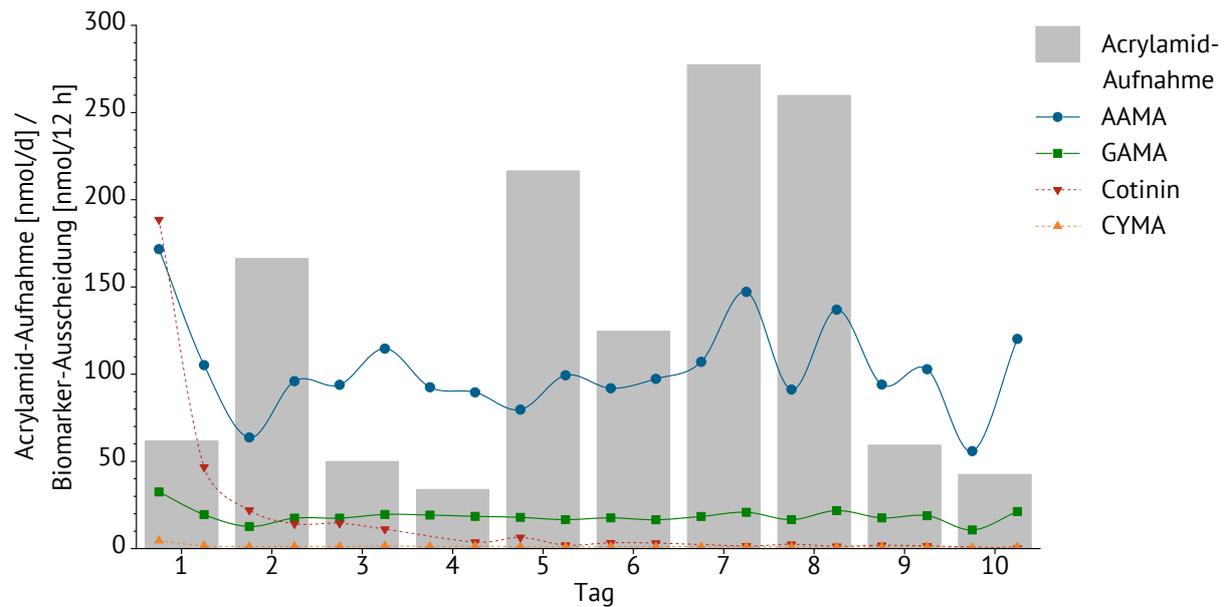


Abbildung 6-29 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-3. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-L-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein.

Die Mercaptursäure-Ausscheidung im Studienzeitraum wurde nur wenig von der geringen Acrylamid-Aufnahme beeinflusst. So lag die Ausscheidung von AAMA in einem Bereich von 160–277 nmol/d und die von GAMA zwischen 30–52 nmol/d. Beide Maxima wurden hierbei am ersten Studientag gemessen, welche sich jedoch auf eine Exposition mit Tabakrauch zurückführen lassen, da auch Cotinin und CYMA eine gleichsinnige Abnahme an den ersten Studientagen zeigten. Die Cotinin-Ausscheidung betrug am ersten Studientag 277 nmol/d (27 µg/l) und sank an Tag 3 auf 40 nmol/d ab. An den restlichen Studientagen lag die Cotinin-Ausscheidung in einem Bereich von 2–18 nmol/d. Auch die Ausscheidung von CYMA war am ersten Studientag mit 6,1 nmol erhöht und lag an allen weiteren Studientagen in einem Bereich von 1,7–2,7 nmol/d. Diese anfänglichen Level weisen auf eine hohe Tabakrauch-Exposition vor oder zu Studienbeginn hin [Schettgen *et al.*, 2009; Angerer und Schaller, 2001] und könnten entsprechend die Level von AAMA und GAMA der ersten Studientage beeinflusst haben, welche im Vergleich zur alimentären Acrylamid-Aufnahme erhöht waren. Darüber hinaus nahm der Proband während dieser Studientage Acrylamid-haltige Lebensmittel über den Tag verteilt zu sich, sodass auch daher die Expositionsbiomarker-Antwort eher gering ausgefallen sein könnte.

Nichtsdestotrotz zeigte sich nach Konsum eines Reisgerichts mit Fisch und Gemüse (34 µg/kg Acrylamid) an Tag 7 um 14:00 Uhr sowie eines Mensa-Gerichtes (6 µg/kg) mit Pommes frites als Beilage (105 µg/kg) an Tag 8 gegen 12:00 Uhr ein Anstieg der AAMA-Ausscheidung im jeweils folgenden Übernachturin, welches im Einklang mit den Ergebnissen der Humanstudie I und Literaturdaten ist [Ruenz *et al.*, 2016; Boettcher *et al.*, 2006a].

Aus der Betrachtung der Werte dieses Probanden geht hervor, dass sich eine Interpretation der Biomarker-Ausscheidung unter normalen Lebensumständen im Vergleich zu einer kontrollierten Acrylamid-Gabe wie in Humanstudie I komplexer gestaltet. Eine hohe Acrylamid-Aufnahme über den Tag verteilt kann zu einer weniger intensiven, aber konstanten Biomarker-Antwort führen.

Eine nur punktuell stattfindende Betrachtung könnte somit zu falschen Aussagen und Schlussfolgerungen zur alimentären Acrylamid-Aufnahme führen.

Gemischtköstler GK-m-4. Der Proband GK-m-4 nahm während der Humanstudie II durchschnittlich 282 nmol (81–1.091 nmol) Acrylamid pro Tag auf und lag somit in einem vergleichbaren Bereich wie GK-m-1 mit 262 nmol/d. Die Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung sowie die Expositionsbiomarker-Ausscheidung des Probanden sind in Abbildung 6-30 dargestellt.

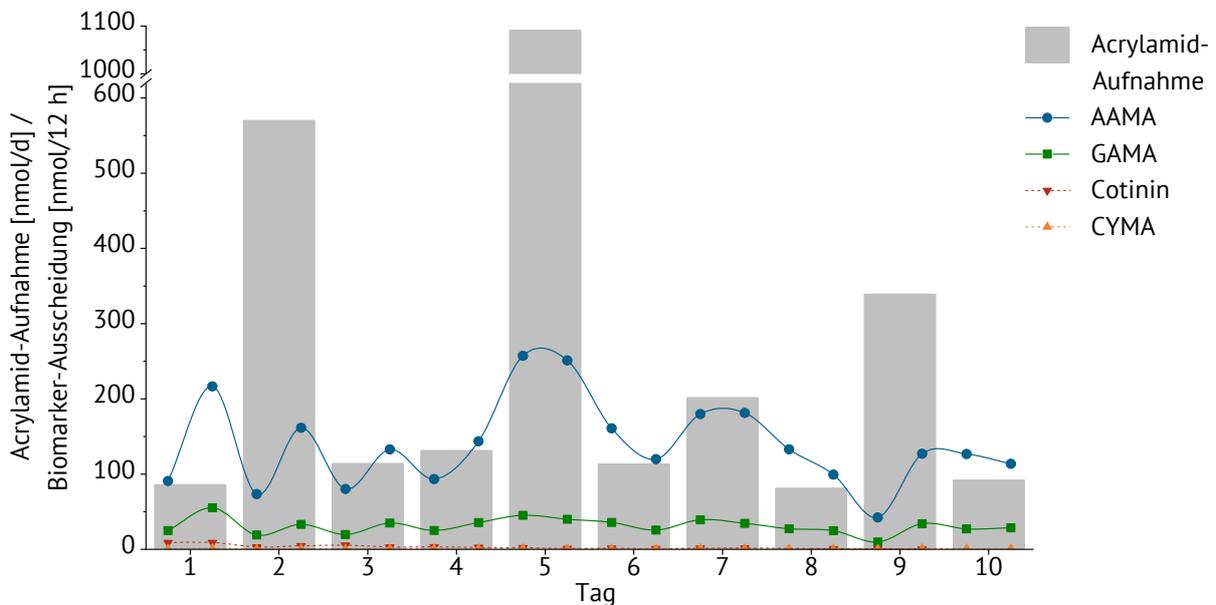


Abbildung 6-30 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-4. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein.

Diese Ähnlichkeit der Probanden spiegelt sich auch in der AAMA-Ausscheidung wider, welche während der zehn Studientage bei GK-m-4 durchschnittlich bei 278 ± 97 nmol/d lag und einen Bereich von 169–508 nmol/d und somit wie die Acrylamid-Aufnahme geringfügig höher war als bei GK-m-1. Die GAMA-Ausscheidung war mit 62 ± 13 nmol/d (44–85 nmol/d) hingegen höher als bei GK-m-1, der nur 45 ± 10 nmol/d im Mittel ausschied. Dieser Unterscheid zeigt sich ebenso in dem höheren GAMA/AAMA-Verhältnis des Probanden GK-m-4, welche im Mittel bei $0,23 \pm 0,03$ (GK-m-1: $0,18 \pm 0,04$) lag und zwischen 0,17–0,26 schwankte und damit nach Proband V-w-3 ($0,28 \pm 0,10$) das höchste GAMA/AAMA-Verhältnis aller Probanden war. Dieses erhöhte GAMA/AAMA-Verhältnis lässt sich möglicherweise auf vorhandene Polymorphismen von Enzymen zurückführen, die am Acrylamid-Metabolismus beteiligt sind, und dadurch den Anteil des oxidativen Metabolismus erhöhen. In einer Studie von Duale *et al.* [2009] zeigten die Autoren bereits in 49 Probanden eine signifikante ($p=0,039$ und $p=0,029$) Assoziation von GSTM1- und GSTT1-Genotypen mit dem GA-Hb/AA-Hb-Verhältnis.

Der Gemischtköstler GK-m-4 hatte insbesondere an drei von zehn Studientage eine hohe Acrylamid-Aufnahme, welche vor allem durch den regelmäßigen Besuch der Mensa für das Mittagessen an allen Öffnungstagen (Montag–Freitag) zustande kam. Ebenso wie GK-m-1 verzehrt GK-m-4 an Tag 2 Schweineschnitzel „Jäger Art“ mit Pommes frites, woraus eine

Acrylamid-Aufnahme von 570 nmol (0,49 µg/kg KG) resultierte. Auch an Tag 5 nahm der Proband sein Mittagessen in der Mensa (Kartoffelsuppe mit Reibekuchen und Apfelmus, 152 µg/kg Acrylamid) ein, welches zum Großteil zu seiner höchsten Acrylamid-Aufnahme des Studienzeitraumes von 1.091 nmol (0,93 µg/kg KG) führte. In diesem Zusammenhang war ebenfalls die Mercaptursäure-Ausscheidung an Tag 5 (508 nmol AAMA und 85 nmol GAMA) sowie im ersten Sammelzeitraum von Tag 6 erhöht. An Tag 9 resultierte eine alimentäre Acrylamid-Exposition von 339 nmol hauptsächlich aus einem Mensagericht mit Kroketten, welches einen Acrylamid-Gehalt von 55,3 µg/kg aufwies. An den übrigen Studientagen mit Ausnahme des Wochenendes (Tag 6+7) speiste der Proband GK-m-4 ebenfalls in der Mensa, wählte jedoch Mahlzeiten wie gekochte Nudel- oder Reisgerichte und Gemüse-Burrito, welche keine quantifizierbaren oder nur geringe Acrylamid-Gehalte aufwiesen. Hierdurch wird deutlich, dass auch bei regelmäßiger Nutzung von Kantinen- oder Mensa-Angeboten dies nicht *per se* mit einer hohen Acrylamid-Aufnahme einhergehen muss. Anhand des Probanden GK-m-4 zeigt sich sehr gut, dass wenn anstelle von hoherhitzen Kartoffelprodukten, welche im Allgemeinen häufig in solchen Betrieben auf dem Speiseplan zu finden sind, gekochte Gerichte gewählt werden, sich eine Acrylamid-reduzierte Ernährung durchaus erreichen lässt.

Gemischtköstler GK-m-5. Die Acrylamid-Aufnahme von Proband GK-m-5 (siehe Abbildung 6-31) betrug durchschnittlich 195 nmol/d (18–537 nmol/d) und lag damit im unteren Bereich der männlichen Gemischtköstler.

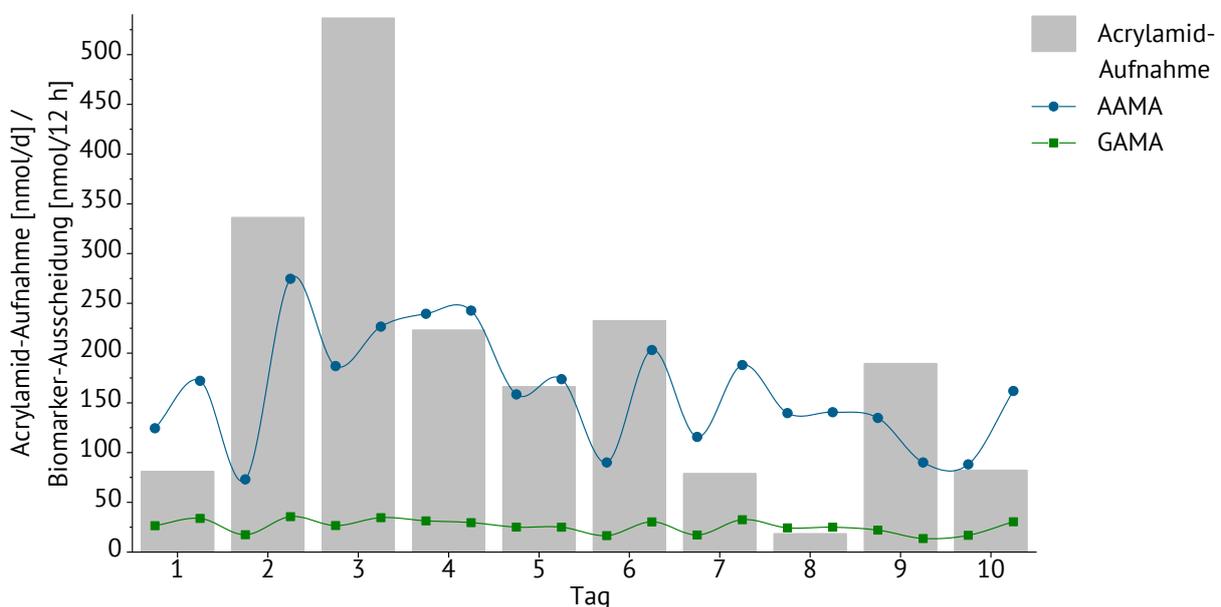


Abbildung 6-31 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren des Gemischtköstlers GK-m-5. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein.

Im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme war im Urin dieses Probanden die Mercaptursäure-Ausscheidung erhöht. Der Proband zeigte die höchste AAMA-Ausscheidung mit 322 nmol/d (225–482 nmol/d) sowie eine mittlere GAMA-Ausscheidung von 51 nmol/d (36–61 nmol/d) der männlichen Gemischtköstler. Da der Proband GK-m-5 zwei Jahre nach der Studie nicht mehr

erfolgreich kontaktiert werden konnte und daher keine Bestimmung von Cotinin und CYMA im Urin erfolgte, kann an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden, ob für diese erhöhte Mercaptursäure-Ausscheidung eine Exposition mit Tabakrauch ursächlich war.

Im Allgemeinen konsumierte der Proband regelmäßig Kaffee-Getränke sowie Snacks und *Convenience-* bzw. *Fast-Food*-Produkte. Durch den Verzehr eines Hot Dogs an Tag 2 um 17:00 Uhr, aus dem vorwiegend die Acrylamid-Aufnahme dieses Tages von 336 nmol resultierte, stieg die AAMA- als auch GAMA-Ausscheidung im folgenden Urinsammelzeitraum von 20:00–08:00 Uhr sprunghaft an und war zudem noch am nächsten Tag erhöht (siehe Abbildung 6-31), sodass sich auch hier die in der Literatur beschriebene Kinetik der Mercaptursäuren auch unter unkontrollierten Bedingungen bestätigte [Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Watzek *et al.*, 2012b; Boettcher *et al.*, 2006a].

Vor allem durch den Verzehr Acrylamid-haltiger Kartoffelchips (271 µg/kg) nahm der Proband an Tag 3 mit 537 nmol (0,47 µg/kg KG) hohe Mengen Acrylamid über die Nahrung zu sich. An den folgenden Tagen 4–6 konsumierte der Proband ebenso Acrylamid-haltige Lebensmittel wie beispielsweise Hack-Lauchsuppe (13 µg/kg), Lasagne Bolognese (4,2 µg/kg), geröstete Erdnüsse (67 µg/kg) und Hot Dogs (31 µg/kg), welche zu einer Acrylamid-Exposition von 166–233 nmol/d (0,15–0,21 µg/kg KG/d) an diesen Studientagen führten.

Entsprechend dieser regelmäßigen alimentären Acrylamid-Aufnahme schied der Proband von Tag 2–8 relativ hohe Mengen AAMA (280–482 nmol/d) und GAMA (47–61 nmol/d) aus. Die GAMA-Ausscheidung des Probanden zeigte sich jedoch wie bei anderen Probanden zuvor ebenfalls weniger sensitiv in der Antwort auf die Aufnahme einzelner Mengen Acrylamid über die Ernährung. Auch bei diesem Probanden erweist sich demnach AAMA als der geeignetere renale Biomarker für die Erfassung einer Acrylamid-Exposition als GAMA.

6.4.6.1.2. Weibliche Gemischtköstler

Gemischtköstlerin GK-w-1. Die Gemischtköstlerin GK-w-1 hatte während der Humanstudie II eine durchschnittliche Acrylamid-Aufnahme von 238 ± 326 nmol/d ($0,34 \pm 0,47$ µg/kg KG). Wie in Abbildung 6-32 zu sehen ist, schwankten die einzelnen Aufnahmemengen jedoch stark zwischen den einzelnen Tagen (29–1.097 nmol/d).

Über den Studienzeitraum wurden durchschnittlich 238 ± 111 nmol/d (98–460 nmol/d) AAMA und 34 ± 7 nmol/d (23–42 nmol/d) GAMA von der Probandin ausgeschieden. Eine Exposition mit Tabakrauch konnte anhand der sehr niedrigen Level von CYMA (0,3–0,6 nmol/d) und Cotinin (<LOD) ausgeschlossen werden.

Die Probandin nahm an drei von zehn Studientagen relativ hohe Mengen Acrylamid zu sich. An Tag 1 resultierte eine Acrylamid-Aufnahme von 400 nmol (0,57 µg/kg KG) zu großen Teilen aus dem Mittagessen in der Mensa (Schweinerückensteak mit Pommes frites, 29 µg/kg Acrylamid). Die höchste Acrylamid-Aufnahme (1.097 nmol, 1,58 µg/kg KG) an Tag 5 wurde hauptsächlich durch Verzehr von Kartoffelpuffern mit Apfelmus (Mensa) verursacht, die erhöhte Acrylamid-Aufnahme an Tag 9 (300 nmol, 0,43 µg/kg KG) durch Verzehr eines weiteren Gerichtes mit Pommes frites in der Mensa.

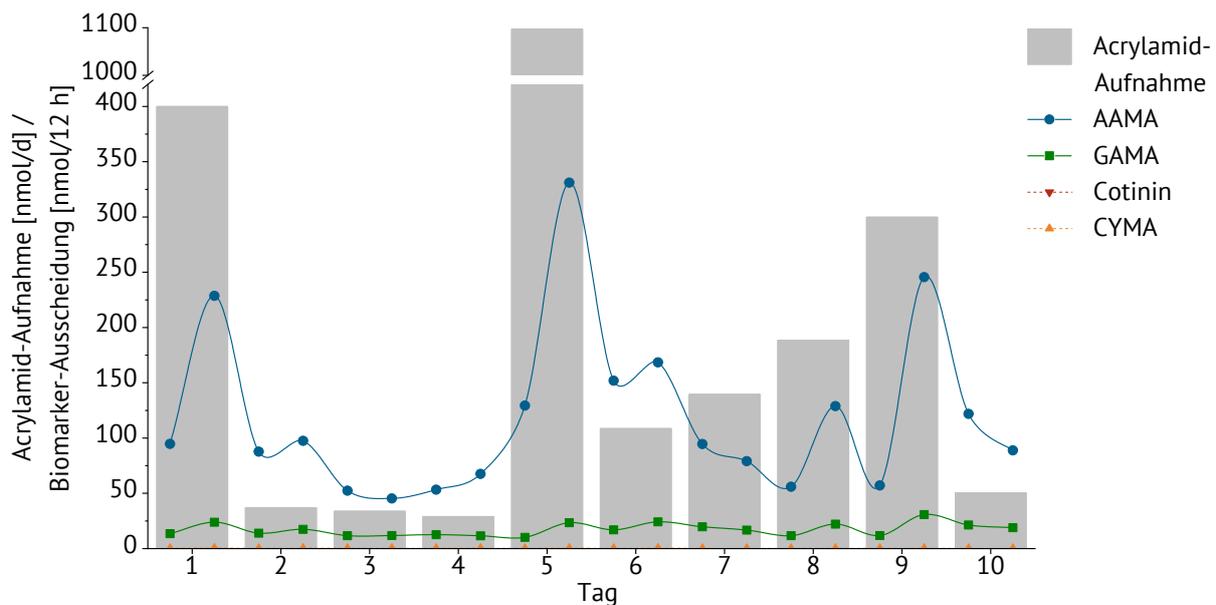


Abbildung 6-32 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-1. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-L-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein.

An Tag 1, Tag 5 und Tag 9 wies jeweils der Übernachturin von 20:00–08:00 Uhr Maxima der AAMA- als auch der GAMA-Ausscheidung auf. So führte beispielsweise die höchste alimentäre Acrylamid-Aufnahme des Studienzeitraums von 1.097 nmol an Tag 5 auch zur höchsten AAMA-Ausscheidung von 460 nmol/d, wovon 331 nmol im Übernachturin erfasst wurden. Die Ausscheidung von GAMA erreichte erst an Tag 6 mit 41 nmol ihr Maxima, welches im Einklang mit publizierten Toxikokinetik-Daten ist, die GAMA sowohl als den weniger als auch langsamer gebildeten Metaboliten von Acrylamid beschrieben [Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Fennell *et al.*, 2006; Watzek *et al.*, 2013].

Die Ausscheidung beider Mercaptursäuren erreichte in den auf Tag 1 und 5 folgenden Sammelzeiträumen innerhalb von drei Tagen wieder ein Minimum, da in diesen Zeiträumen jeweils eine verhältnismäßig geringe alimentäre Exposition mit Acrylamid vorlag. Bedingt durch das Studienende ist nach Acrylamid-Aufnahme an Tag 9 lediglich ein Abfall über 48 h zu erkennen. Diese Trends stimmen mit bisherigen Studien unter kontrollierten Bedingungen überein, welche eine AAMA-Ausscheidung nach hoher Acrylamid-Aufnahme über 72 h beobachteten [Fuhr *et al.*, 2006; Ruenz *et al.*, 2016]. Hierdurch wird jedoch auch deutlich, dass bei Biomonitoring-Studien zur Erfassung einer Acrylamid-Exposition anhand eines Biomarker-Monitorings nicht direkt auf die alimentäre Acrylamid-Exposition des jeweiligen Tages geschlossen werden kann und somit mehrere Tage in Folge, wie beispielsweise in Humanstudie II über zehn Tage, gemonitort werden sollten.

Gemischtköstlerin GK-w-2. Die Probandin GK-w-2 wies mit 128 ± 225 nmol/d ($0,17 \pm 0,30$ µg/kg KG) nahezu die gleiche niedrige absolute Acrylamid-Aufnahme wie Proband GK-m-3 mit 129 nmol/d auf, umfasste jedoch einen weiteren Bereich von <LOD bis zu 750 nmol/d an Tag 3 wie in Abbildung 6-33 zu sehen ist. Während des untersuchten Studienzeitraums stellte diese Aufnahme

die zweit-niedrigste alimentäre Acrylamid-Exposition unter allen Probanden dar. Lediglich die Veganerin V-w-3 nahm mit 91 nmol/d noch weniger Acrylamid auf. Da von der Probandin GK-w-2 keine Einwilligung zur Untersuchung der Urinproben auf deren Cotinin- und CYMA-Gehalte eingeholt werden konnte, lassen sich keine definitiven Aussagen über eine mögliche Tabakrauch-Exposition treffen.

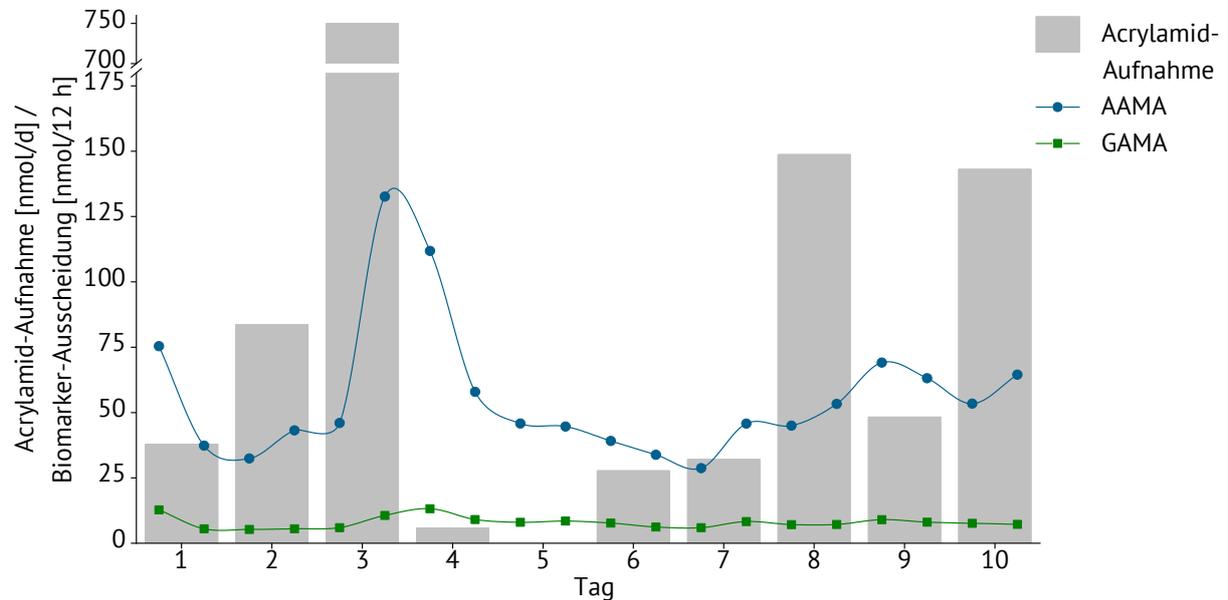


Abbildung 6-33 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren der Gemischtköstlerin GK-w-2. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Im Gegensatz zum Probanden GK-m-3 mit ähnlicher Acrylamid-Aufnahme schied die Probandin GK-w-2 jedoch nur circa die Hälfte an Mercaptursäuren im Studienzeitraum aus. Die AAMA-Ausscheidung lag bei 112 ± 38 nmol/d (73–179 nmol/d) und die GAMA-Ausscheidung bei 16 ± 3 nmol/d (11–22 nmol/d), welches in Übereinstimmung mit der Acrylamid-Aufnahme auch das zweitniedrigste mittlere Ausscheidungslevel der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren darstellte. Wie auch die Acrylamid-Aufnahme der Probandin V-w-3 lag auch die Ausscheidung von AAMA und GAMA in einem niedrigeren Bereich und war somit die geringste aller Studienteilnehmer (Details siehe Kapitel 6.4.6.2.2).

Die höchste tägliche Acrylamid-Aufnahme der Probandin war an Tag 3 mit 750 nmol ($0,99 \mu\text{g}/\text{kg KG}$), welche im Wesentlichen durch den Verzehr von Lasagne um 19:00 Uhr erreicht wurde, die einen Acrylamid-Gehalt von $134 \mu\text{g}/\text{kg}$ aufwies. Infolgedessen stieg die AAMA-Ausscheidung unmittelbar im folgenden Sammelzeitraum von 20:00–08:00 Uhr auf ein Maximum von 133 nmol/12 h an, während die GAMA-Ausscheidung ihr Maximum von 13 nmol/12 h erst einen Sammelzeitraum später (Tag 4, 08:00–20:00 Uhr) erreichte. Beide Mercaptursäuren wurden über einen Zeitraum von circa drei Tagen ausgeschieden, an denen selber keine quantifizierbare oder nur geringe AA-Aufnahme erfolgte. Diese t_{max} -Zeitpunkte der Ausscheidung (AAMA < GAMA) und Exkretion über einen Zeitraum von 72 h stehen in Übereinstimmung mit Literaturdaten [Boettcher *et al.*, 2006a; Fuhr *et al.*, 2006; Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017]. Durch den Verzehr

von insbesondere Windbeuteln (30 µg/kg Acrylamid) an Tag 8 und Tag 10 war ein erneuter Anstieg der Mercaptursäure-Ausscheidung zu beobachten.

Da keine überproportionale Ausscheidung von AAMA und GAMA während der Studienzeitraumes beobachtet wurde, kann trotz fehlender Cotinin- und CYMA-Level davon ausgegangen werden, dass die Probandin keinem Tabakrauch ausgesetzt war. Insgesamt war die Mercaptursäure-Ausscheidung repräsentativ für die alimentäre Acrylamid-Aufnahme der Probandin. Durch den Vergleich mit Proband GK-m-3 wird jedoch auch deutlich, dass ein Monitoring von AAMA und GAMA allein eine höhere alimentäre Acrylamid-Aufnahme suggerieren kann, da bei nahezu identischer Acrylamid-Aufnahme die Mercaptursäure-Ausscheidung durch eine Tabakrauch-Exposition wie bei Proband GK-m-3 stark erhöht sein kann.

Gemischtköstlerin GK-w-3. Wie in Abbildung 6-34 zu sehen ist, umfasste die Acrylamid-Aufnahme der Gemischtköstlerin GK-w-3 einen weiten Bereich von 75–900 nmol/d und lag im Mittel bei 261 ± 266 nmol/d ($0,33 \pm$ µg/kg KG/d).

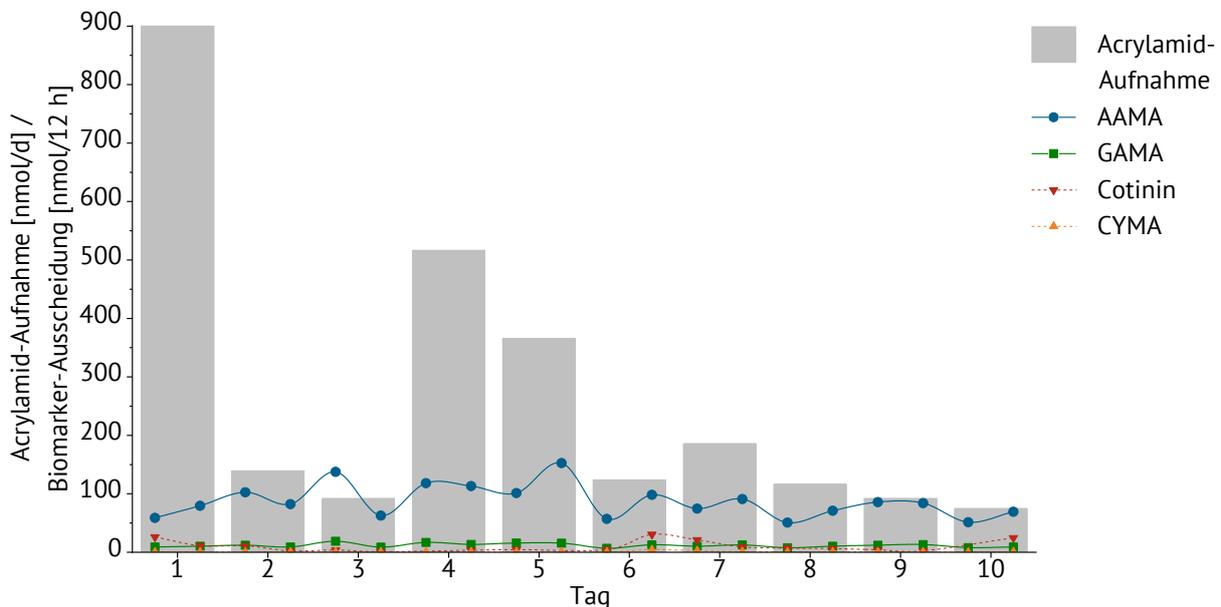


Abbildung 6-34 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-3. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-*L*-cystein.

Obwohl die Acrylamid-Aufnahme somit höher als die der zuvor diskutierten Probandinnen GK-w-1 und GK-w-2 war, lag die mittlere Mercaptursäure-Ausscheidung von 174 ± 44 nmol/d (121–254 nmol/d) AAMA bzw. 23 ± 5 nmol/d (17–31 nmol/d) GAMA zwischen den Werten der ersten beiden Gemischtköstlerinnen GK-w-1 und GK-w-2. Ein Grund hierfür kann in der besonders hohen Acrylamid-Aufnahme von 900 nmol am ersten Studientag liegen. Hier wurden um 20:00 Uhr insgesamt 300 g Hähnchenbrust mit Schweinefleisch und gebackenen Kartoffeln verzehrt, welche einen Acrylamid-Gehalt von 202 µg/kg aufwiesen. Es war in diesem Fall nicht auszuschließen, dass eventuell nicht mit der aufgenommenen Mahlzeit übereinstimmende Mengenanteile von Fleisch zu gebackenen Kartoffeln im abgegebenen und analysierten Duplikat zu einer erheblichen Abweichung von tatsächlicher zu berechneter Acrylamid-Aufnahme geführt haben könnten (vgl.

Kapitel 6.5). Dies würde auch den unerwarteten Befund erklären, dass nach Verzehr dieser Mahlzeit kein starker Anstieg der Mercaptursäure-Exkretion zu beobachten war, welcher eigentlich aus dieser hohen Acrylamid-Aufnahme resultieren müsste.

Auch durch die Acrylamid-Aufnahme an Tag 4 (516 nmol, 0,65 µg/kg KG) durch das Mittagessen in der Mensa (Hähnchen-Cordon-bleu mit Kroketten) und an Tag 5 (365 nmol, 0,46 µg/kg KG) durch Bratkartoffeln mit Brot stieg die Ausscheidung beider Mercaptursäuren auf die gemessenen Maximalwerte an, der Anstieg fiel jedoch im Verhältnis zur Acrylamid-Aufnahme gering aus. An den weiteren Studientagen nahm die Probandin GK-w-3 geringe Mengen Acrylamid durch den Verzehr von Kaffee, Brot und Schokolade auf, sodass auch die Mercaptursäure-Ausscheidung auf einem gleichbleibenden, niedrigen Niveau blieb, obwohl die Probandin insbesondere an dem Wochenende (Tag 6–7) indikativ durch Cotinin-Level von 6–9 µg/l geringen Mengen Tabakrauch ausgesetzt war. Die dennoch geringe Ausscheidung von AAMA und GAMA könnte durch einen GST-Polymorphismus oder aber auch einen unzureichenden Glutathion-Status bedingt sein [Duale *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009; Ginsberg *et al.*, 2009; Neafsey *et al.*, 2009; Doroshenko *et al.*, 2009; Watzek *et al.*, 2013].

Gemischtköstlerin GK-w-4. Die Gemischtköstlerin GK-w-4 (siehe Abbildung 6-35) nahm im Studienzeitraum mit 429 ± 194 nmol/d ($0,48 \pm 0,22$ µg/kg KG/d) am meisten Acrylamid über die Nahrung im Vergleich aller weiblichen Gemischtköstler auf (siehe Abbildung 6-21). Die alimentäre Acrylamid-Aufnahme erstreckte sich über einen Bereich von 157–696 nmol/d, entsprechend 0,18–0,78 µg/kg KG.

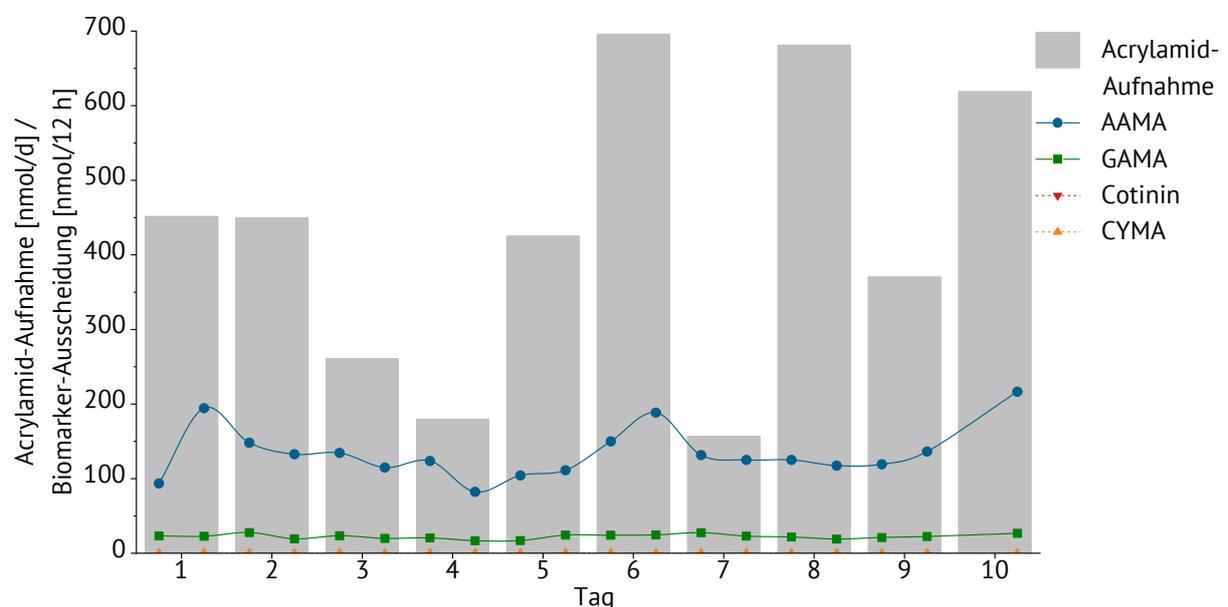


Abbildung 6-35 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-4. Der Sammelzeitraum Tag 10, 08:00–20:00 Uhr, wurde nicht aliquotiert, folglich wurde keine Analytik durchgeführt. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Während die Probandin GK-w-4 ebenfalls die höchste mittlere GAMA-Ausscheidung mit 42 ± 7 nmol/d (16–32 nmol/d) in dieser Probandengruppe zeigte, lag die AAMA-Ausscheidung mit

255±40 nmol/d (206–338 nmol/d) in einem ähnlichen Bereich wie der der Probanden GK-w-1 und GK-w-5 (siehe Abbildung 6-23). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass der Urin des Sammelzeitraumes Tag 10, 08:00–20:00 Uhr, nicht aliquotiert und somit nicht analysiert werden konnte, sodass der Mittelwert durch das Fehlen eines Sammelzeitraumes von 12 h entsprechend geringer ist. Ein Einfluss einer Tabakrauch-Exposition konnte durch das Monitoring von Cotinin (<LOD) und CYMA (0,6±0,2 nmol/d) ausgeschlossen werden.

Die höchsten Werte an Acrylamid während des Studienzeitraumes wurden über regelmäßigen Verzehr von (Klein-) Gebäck (Kekse, Waffeln), Cornflakes und Backwaren (Hefezopf, Schokobrotchen, Brownies) aufgenommen. Die höchste Acrylamid-Gesamtaufnahme von 696 nmol an Tag 6 resultierte aus dem Verzehr von Burgern, Pommes Frites einer *Fast-Food*-Kette, Neapolitaner Waffeln und Cornflakes. Der Verzehr von Schnitzel mit Pommes frites (Mensa) und Neapolitaner Waffeln an Tag 8 führte ebenso zu einer hohen Acrylamid-Aufnahme von 681 nmol/d. Diese Lebensmittelgruppen wurden ebenso von der EFSA [2015] als wesentliche Lebensmittel identifiziert, welche zur alimentären Acrylamid-Aufnahme beitragen.

Die Mercaptursäure-Ausscheidung der Probandin GK-w-4 hatte ähnlich der Probandin GK-w-3 zuvor einen unterproportionalen Charakter, wies jedoch einen gleichsinnigen Verlauf zur Acrylamid-Aufnahme auf. So stimmte das Minimum der AAMA-Ausscheidung von 206 nmol an Tag 4 mit der niedrigsten Acrylamid-Aufnahme des Studienzeitraumes von 180 nmol überein. Des Weiteren lagen die Maxima der Acrylamid-Aufnahme (696 nmol) und der AAMA-Ausscheidung (338 nmol) beide an Tag 6, während die GAMA-Ausscheidung erst am folgenden Studientag den höchsten Wert von 50 nmol/d erreichte.

Gemischtköstlerin GK-w-5. Die durchschnittliche tägliche Acrylamid-Aufnahme der Probandin GK-w-5 betrug 199±168 nmol/d (0,25±0,21 µg/kg KG/d) und lag somit im mittleren Bereich der Daten der weiblichen Gemischtköstler. Im Studienzeitraum wurden im Mittel 278±53 nmol/d (208–380 nmol/d) AAMA sowie 36±5 nmol/d (29–45 nmol/d) GAMA ausgeschieden.

Wie in Abbildung 6-36 dargestellt, verzehrte die Probandin an den ersten sechs Studientagen größere Mengen Acrylamid-haltiger Lebensmittel als an den letzten Studientagen, welches auch durch das Maximum der Acrylamid-Aufnahme an Tag 6 von 606 nmol (0,77 µg/kg KG) durch den Verzehr von Pommes frites mit Ketchup und Mayonnaise (128 µg/kg) bzw. das Minimum von 44 nmol (0,06 µg/kg KG) an Tag 9 reflektiert wird. Die höhere Acrylamid-Aufnahme von im Mittel 282 nmol/d der ersten sechs Studientage ergab sich vorwiegend durch den Konsum von Müsli und Mahlzeiten mit Backwaren wie Schokoladengebäck (9–29 µg/kg), Naan-Brot (49 µg/kg) und Hot Dogs (31 µg/kg). Zudem konsumierte die Probandin GK-w-5 während des gesamten Studienzeitraumes täglich 1–3 Tassen (210–640 ml) eines Kaffee-Getränktes mit Milch, welches einen Acrylamid-Gehalt von 4,1 µg/kg aufwies. An den letzten Studientagen, an denen die Probandin mit im Mittel 74 nmol/d wenig Acrylamid über die Nahrung aufnahm, konsumierte sie vorwiegend Salat, gekochte Gerichte wie Suppen und Eintopf oder gebratene Gerichte wie Bratereis mit Ente und Gemüse oder Speck-Käse-Spätzle, welche nur geringe oder nicht quantifizierbare Mengen Acrylamid enthielten, oder nur kleine Mengen von Lebensmitteln,

welche höhere Acrylamid-Gehalte aufwiesen, wie beispielsweise 30 g eines Brownies mit einem Acrylamid-Gehalt von 29 µg/kg.

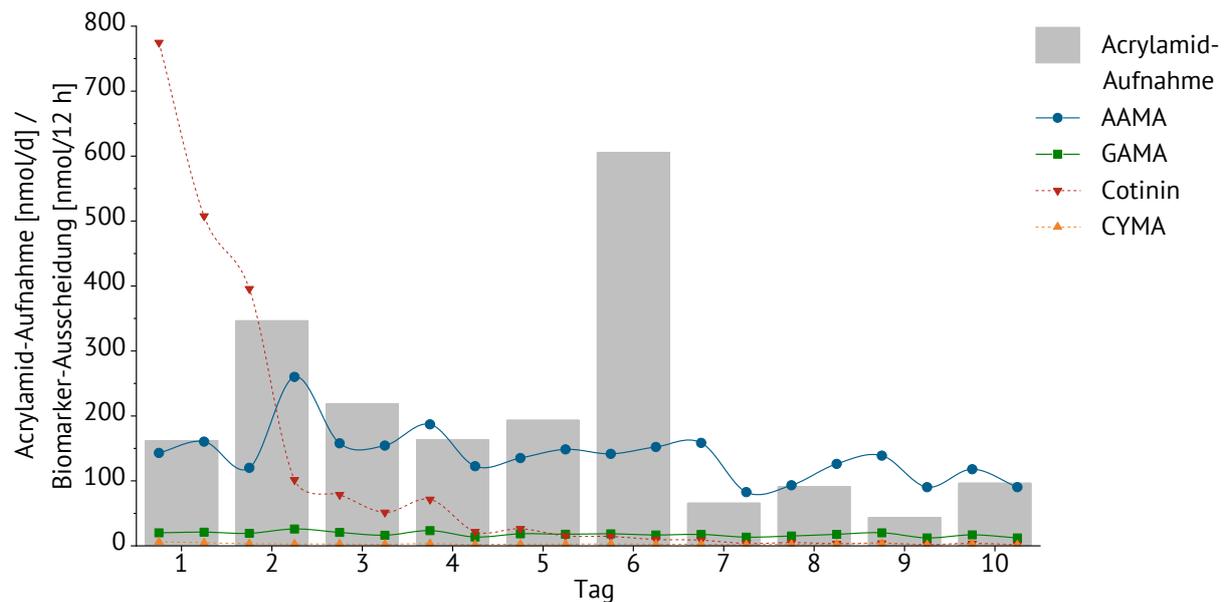


Abbildung 6-36 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-5. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-L-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoyl-ethyl)-L-cystein.

Analog zur unterschiedlich hohen Acrylamid-Aufnahme von der ersten zur zweiten Studiehälfte schied die Probandin auch an den ersten 6,5 Studientagen höhere Mercaptursäure-Level aus als an den letzten 3,5 Studientagen. So lag die AAMA-Ausscheidung in einem Bereich von 284–380 nmol/d zu Beginn und zwischen 208–241 nmol/d zu Studienende. Die GAMA-Ausscheidung lag ebenfalls an den ersten Studientagen mit 35–45 nmol/d in einem höheren Bereich als am Studienende mit 29–33 nmol/d. Die GAMA-Ausscheidung fiel erwartungsgemäß niedriger aus, da GAMA zu wesentlich niedrigeren Anteilen aus einer Acrylamid-Dosis gebildet wird als AAMA [Boettcher *et al.*, 2006a; Fuhr *et al.*, 2006]. Der Anstieg von AAMA in der Folge der hohen Acrylamid-Aufnahme an Tag 6 fiel wesentlich geringer aus, als der Anstieg an Tag 2 mit wesentlich geringerer Acrylamid-Aufnahme wie in Abbildung 6-36 zu sehen ist. Dies lässt sich auf die Zeitpunkte der alimentären Acrylamid-Aufnahme zurückführen. An Tag 6 erfolgte die Acrylamid-Aufnahme unter anderem durch den Verzehr eines Hot Dogs (circa 12:00 Uhr) und insbesondere durch eine Portion Pommes frites gegen 05:00 Uhr des Folgetages, sodass sich kein steiler Anstieg der Mercaptursäure-Exkretion zeigte, sondern ein über 1,5 Tage anhaltendes konstant hohes Level.

Neben der höheren Acrylamid-Aufnahme durch die Nahrung könnte die Biomarker-Exkretion der ersten Studientage zusätzlich durch eine Tabakrauch-Exposition vor oder zu Studienbeginn erhöht gewesen sein. Die Probandin wies an Tag 1 mit 1.283 nmol bzw. 208 µg/l das höchste gemessene Cotinin-Level pro Tag des Probanden-Subkollektivs auf. Dieser Wert befand sich im unteren Bereich publizierter Daten von Rauchern [Thompson *et al.*, 1990; Angerer und Schaller, 2001; Schettgen *et al.*, 2009]. Auch das initiale CYMA-Level lag mit 10,5 nmol/d in einem hohen Bereich im Vergleich zu Werten anderer Probanden. Auffällig ist hierbei, dass während das initiale

Cotinin-Level das Maximum anderer Probanden wie GK-m-2 mit 277 nmol/d (siehe oben) oder V-w-4 mit 550 nmol/d (siehe unten) um circa den Faktor 2–5 überstieg, sich das CYMA-Level in einem ähnlichen Bereich wie bei GK-m-2 (11,0 nmol/d) oder sogar in einem niedrigeren Bereich als bei V-w-4 mit einem Maximum von 71,2 nmol/d befand. Darüber hinaus waren die initialen AAMA-Level der Probandin GK-w-5 im Gegensatz zu anderen Probanden mit erhöhten Cotinin- bzw. CYMA-Exkretionen nicht erhöht bzw. zeigten keinen gleichsinnigen Verlauf zur Tabakrauchbiomarker-Ausscheidung. Dies könnte somit darauf hindeuten, dass die Probandin Nikotin vorwiegend aus einer nicht-pyrolytischen Quelle wie E-Zigaretten aufgenommen hat, da hier im Gegensatz zu pyrolytischen Quellen nur Nikotin, jedoch nicht das pyrolysebedingt gebildete Acrylnitril als Vorläuferverbindung von CYMA aufgenommen werden [Goniewicz *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2020]. Nichtsdestotrotz nahm im Verlauf der Studie die Exkretion beider Tabakrauch-Biomarker konstant auf 5 nmol/d bzw. 1 µg/l Cotinin und 4,0 nmol/d CYMA an Tag 10 ab, sodass davon auszugehen ist, dass keine weitere oder nur geringfügige Exposition mit Tabakrauch stattfand.

6.4.6.2. Veganer

Neben zehn Gemischtköstlern nahmen an der Humanstudie II ebenfalls zehn Veganer (fünf männlich, fünf weiblich) teil, welche ebenfalls ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beibehielten und somit während des gesamten Studienzeitraumes keine tierischen Produkte jeglicher Art zu sich nahmen. Die zehn sich vegan ernährenden Probanden nahmen während der zehn Studientage mit durchschnittlich 355±228 nmol/d mehr Acrylamid als die sich omnivor ernährenden Probanden auf. Die Ausscheidung der Mercaptursäuren lag im Mittel bei 374±233 nmol/d (46–1.338 nmol/d) AAMA bzw. bei 50±15 nmol/d (16–109 nmol/d) GAMA und somit ebenfalls auf einem höheren Niveau als das der Gemischtköstler.

6.4.6.2.1. Männliche Veganer

Veganer V-m-1. Der Veganer V-m-1 nahm während der zehntägigen Humanstudie II durchschnittlich 896±730 nmol/d (0,76±0,62 µg/kg KG/d) Acrylamid über die Nahrung auf, wodurch er die höchste absolute mittlere alimentäre Acrylamid-Aufnahme unter allen Probanden aufwies. Lediglich V-w-2 hatte bezogen auf das Körpergewicht eine minimal höhere relative mittlere Acrylamid-Aufnahme von 0,78 µg/kg KG/d. Die alimentäre Acrylamid-Aufnahme umfasste bei V-m-1 einen Bereich von 30–2.200 nmol/d.

Der Proband wies ebenso die zweithöchste Mercaptursäure-Ausscheidung aller Probanden auf, die höchsten mittleren Exkretionsmengen von AAMA und GAMA wurden in Probandin V-w-4 gemessen, welche jedoch mit 291 nmol/d eine geringere mittlere alimentäre Acrylamid-Aufnahme aufwies (siehe Kapitel 6.4.6.2.2). Die AAMA-Ausscheidung von V-m-1 betrug im Mittel 554±186 nmol/d und umfasste einen Bereich von 246–873 nmol/d. Die GAMA-Ausscheidung lag in einem Bereich von 51–93 nmol/d und wies einen Mittelwert von 68±14 nmol/d auf. Eine mögliche Beeinflussung der AAMA- und GAMA-Ausscheidung durch weitere exogene Acrylamid-Quellen wie Tabakrauch konnte durch die Biomarker Cotinin und CYMA ausgeschlossen werden.

So wies der Proband lediglich an Tag 2 eine Cotinin-Ausscheidung von 5 nmol und an Tag 6 eine minimal erhöhte CYMA-Ausscheidung von 1,0 nmol/d im Gegensatz zu den anderen Studientagen mit 0,3–0,5 nmol/d auf. Der zeitliche Verlauf der Acrylamid-Aufnahme und Expositionsbiomarker-Ausscheidung ist in Abbildung 6-37 dargestellt.

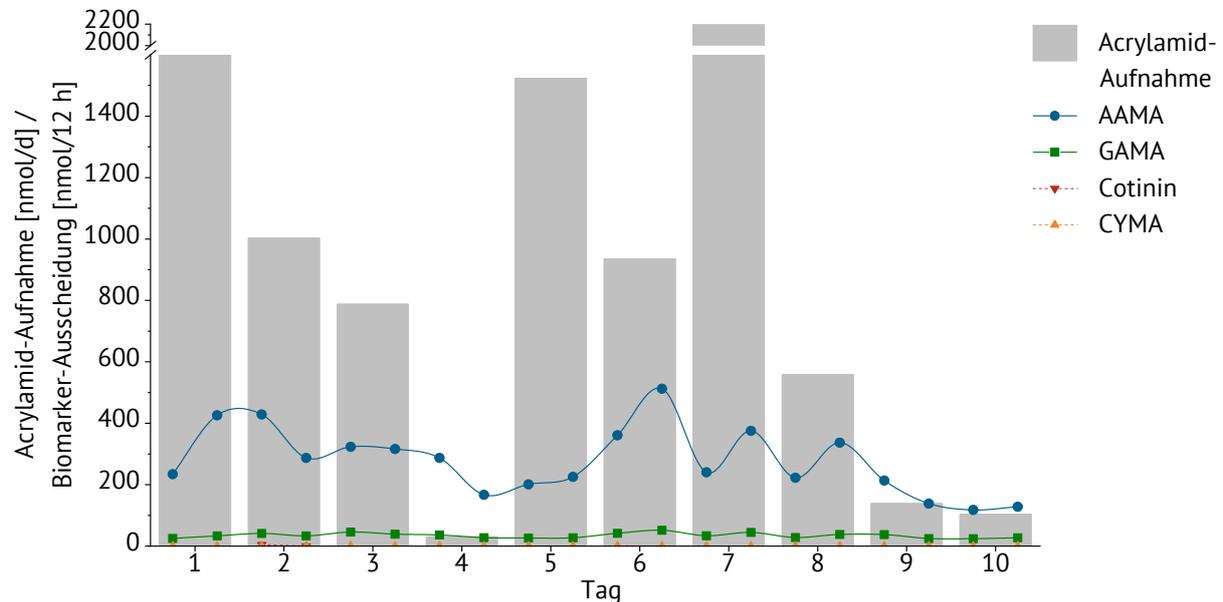


Abbildung 6-37 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-1. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Während der Proband V-m-1 an drei Studientagen (4, 9, 10) nur geringe Mengen Acrylamid (30–139 nmol/d) über die Nahrung aufnahm, indem er vorwiegend Nudel- und Gemüsegerichte verzehrte, nahm er an den restlichen Tagen durchgehend sehr hohe Mengen Acrylamid über die tägliche Ernährung zu sich, welche an diesen Studientagen große Mengen hochoerhitzter Kartoffelprodukte enthielt. So konsumierte der Proband unter anderem Kroketten (289 µg/kg) an den Tagen 1–2, Kartoffelwedges (238 µg/kg) an Tag 3, Pommes frites in der Mensa (71 µg/kg) an Tag 5 sowie nicht näher beschriebene Paprikakartoffeln (56 µg/kg) an den Tagen 6–8.

In Übereinstimmung mit der hohen Acrylamid-Aufnahme an 7 von 10 Studientagen war auch die Ausscheidung von AAMA an diesen Tagen bzw. den Folgetagen mit einem Bereich von 454–873 nmol/d höher als den an den Tagen 5 und 9–10 mit 246–426 nmol/d.

Da der Proband häufig sowohl zum Mittagessen zwischen 11:00–17:00 Uhr sowie abends bis nachts (19:00–01:00 Uhr) hohe Mengen Acrylamid-haltiger Lebensmittel aufnahm, wies die Exkretionskinetik von AAMA und GAMA das Maximum zumeist erst am nächsten Studientag auf und fiel durch die kontinuierliche Aufnahme von Acrylamid eher gleichmäßig aus. Auch zum Frühstück zwischen 07:00–10:00 Uhr verzehrte der Proband vorwiegend Acrylamid-haltige Brot- und Backwaren wie Kürbiskernbrötchen mit diversem Belag (<LOD bzw. 7,2–12,5 µg/kg), (wahrscheinlich veganer) Käsekuchen (5,1 µg/kg) oder Ciabatta-Brötchen mit Belag (5,6 µg/kg). An Tag 7, an dem der Proband V-m-1 mit 2.200 nmol die höchste Acrylamid-Exposition zeigte, verzehrte der Proband neben einem Kürbiskernbrötchen zum Frühstück und Paprikakartoffeln

zum Mittagessen nachts (circa 01:00 h) zudem eine große Portion (680 g) eines Gemüsecurrys (mit Bohnen, Paprika, Blumenkohl, Zucchini), welches einen Acrylamid-Gehalt von 175 µg/kg aufwies. Dieser hohe Gehalt für ein Gemüsegericht deutet darauf hin, dass das Gericht wahrscheinlich bei sehr hohen Temperaturen wie durch starkes Braten des Gemüses zubereitet wurde. Im Gegensatz hierzu wies ein weiteres Gemüsecurry (mit Brokkoli, Blumenkohl) des Probanden nur einen Acrylamid-Gehalt von 4,2 µg/kg auf.

Eine Pauschalisierung von Acrylamid-Gehalten einer Lebensmittelgruppe zur Erfassung der humanen Acrylamid-Exposition kann somit zu einer starken Fehleinschätzung der tatsächlichen Exposition führen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zubereitung in privaten Haushalten einen starken Einfluss auf die Acrylamid-Gehalte verschiedener Lebensmittel ausübt und diese sich auch innerhalb einer eng gefassten Kategorie, wie hier Gemüsecurrys, deutlich unterscheiden können. Durch diesen Probanden wird zudem der Einfluss hoch erhitzter (Kartoffel-) Produkte auf die alimentäre Acrylamid-Aufnahme veranschaulicht.

Veganer V-m-2. Der Veganer V-m-2 nahm während der Humanstudie II durchschnittlich 366 ± 199 nmol/d ($0,34 \pm 0,18$ µg/kg KG/d) Acrylamid auf, die tägliche Aufnahme schwankte dabei in einem Bereich von 97–707 nmol. Die Mercaptursäure-Ausscheidung blieb hingegen auf einem ähnlichen Niveau von 297 ± 60 nmol/d (188–385 nmol/d) AAMA und 36 ± 5 nmol/d (26–44 nmol/d) GAMA, wie in Abbildung 6-38 ersichtlich ist.

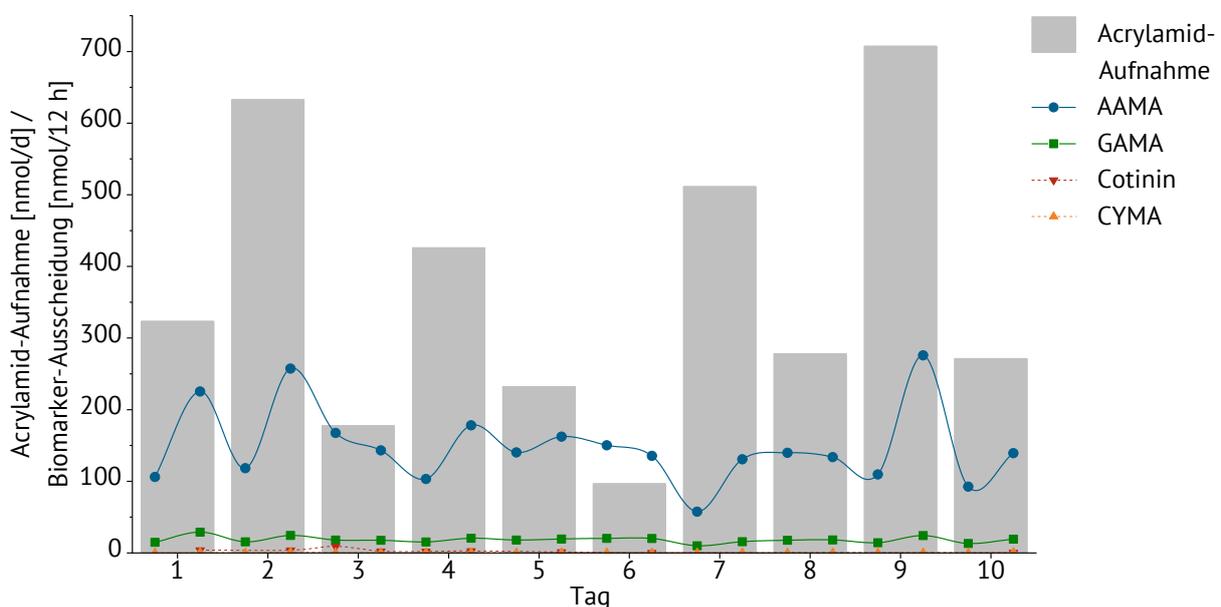


Abbildung 6-38 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-2. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Der Proband zeigte eine geringfügige Exposition [Schettgen *et al.*, 2009; Angerer und Schaller, 2001] mit Tabakrauch in der ersten Studienhälfte. Das Maximum der Cotinin-Ausscheidung lag an Tag 3 bei 11 nmol bzw. 1 µg/l. Auch die CYMA-Level lagen im Vergleich zu anderen Probanden mit 0,4–1,4 nmol/d in einem leicht erhöhten Bereich.

Die relativ gleichbleibende Mercaptursäure-Ausscheidung im Verhältnis zur stark schwankenden Acrylamid-Aufnahme lässt sich damit erklären, dass der Proband V-m-2 im zehntägigen Studienzeitraum abwechselnd viel und wenig Acrylamid über die Nahrung aufnahm. So erreichte der Proband an den Tagen 2, 4, 7 und 9 eine hohe Acrylamid-Aufnahme im Bereich von 426–707 nmol/d, während diese an den Tagen 1, 3, 5, 6 und 10 mit 97–323 nmol/d verhältnismäßig niedrig ausfiel.

An den Studientagen 1, 2, 7 und 9 verzehrte der Proband unterschiedliche Mengen eines belegten Dinkelbrotes (7,6–18,5 µg/kg) und eines Olivenbrotes, welches ohne Belag einen hohen Acrylamid-Gehalt von 143 µg/kg sowie mit Belag entsprechend niedrigere Gehalte aufwies. Zudem konsumierte er Acrylamid-haltiges veganes Grillgut wie Tofu-Wiener (52 µg/kg) an Tag 2 und Tag 4, Seitan-Würstchen mit Brötchen (12 µg/kg) an Tag 2 bzw. in der Pfanne gebratene Seitanwürstchen (77 µg/kg) an Tag 9 sowie verschiedene vegane Gerichte mit Tofu oder Gemüse, welche geringe Acrylamid-Gehalte aufwiesen. An den zehn Studientagen konsumierte der Proband ebenfalls regelmäßig Kaffee und aß weitere vegane Gerichte wie Sojapudding, eine Hirsepfanne, Gnocchi mit Soja-Schnitzel, mexikanischen Eintopf und Müsli mit Kokosmilch, in denen jeweils ebenso Acrylamid nachweisbar war.

Durch Betrachtung dieses Probanden wird deutlich, dass für eine aussagekräftige Korrelation der Mercaptursäure-Ausscheidung mit der Acrylamid-Aufnahme eine Betrachtung über einen längeren Zeitraum, zum Beispiel wie hier in Humanstudie II über zehn Tage, zu bevorzugen ist, da eine Betrachtung der Expositionsbiomarker einzelner Tage zu einer Über- oder aber auch Unterschätzung der tatsächlichen Acrylamid-Aufnahme führen könnte.

Veganer V-m-3. Während des zehntägigen Studienzeitraums lag die Exposition des Proband V-m-3 durchschnittlich bei 303 ± 161 nmol/d ($0,36 \pm 0,19$ µg/kg KG/d) Acrylamid. Die tägliche alimentäre Aufnahme variierte hierbei von 153–653 nmol/d, wie in Abbildung 6-39 zu sehen ist. Der Proband schied im Durchschnitt (Bereich) während der zehn Tage 355 ± 87 nmol/d (271–552 nmol/d) AAMA sowie 56 ± 19 nmol/d (45–109 nmol/d) GAMA aus. Die maximalen Exkretionen beider Mercaptursäuren erfolgten an Tag 1, durch die auf eine sehr hohe Acrylamid-Aufnahme unmittelbar vor Studienbeginn geschlossen werden kann. Da der Proband für das zweite Amendment zur Humanstudie II (siehe Kapitel 5.1) nicht mehr erfolgreich kontaktiert werden konnte und folglich die Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA nicht bestimmt werden durften, kann somit kein Rückschluss auf die Acrylamid-Expositionsquelle vor Studienbeginn und eine eventuelle Beeinflussung der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren durch eine Tabakrauch-Exposition während der Studie gezogen werden.

An den ersten Studientagen verzehrte der Proband vorwiegend Pilz- oder Tofu-Bratlinge, Pommes frites und eine Gemüsepfanne, welche zu einer Acrylamid-Aufnahme zwischen 153–277 nmol/d während der Tage 1–5 führten. Entsprechend unterlag auch die Mercaptursäure-Ausscheidung von Tag 1 bis Tag 6 (08:00–20:00 Uhr) mit 154 ± 23 nmol/12 h (119–201 nmol/12 h) AAMA und 26 ± 4 nmol/12 h (22–36 nmol/12 h) GAMA keiner großen Schwankung.

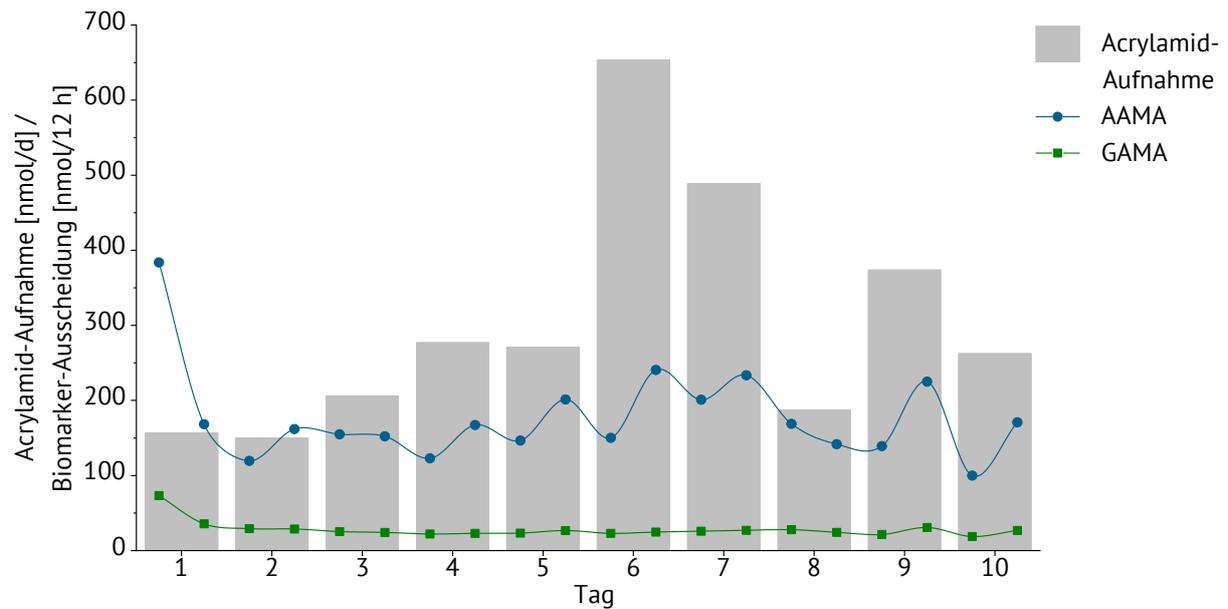


Abbildung 6-39 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren des Veganers V-m-3. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

An Tag 6 nahm der Proband V-m-3 durch den Verzehr von Süßkartoffeln (71 µg/kg), einer Gemüsepfanne (21 µg/kg) sowie Erdnusscreme (50 µg/kg) insgesamt 653 nmol Acrylamid auf, welches die höchste Aufnahme dieses Probanden während des Studienzeitraumes darstellte. Da die Süßkartoffeln mit 71 µg/kg einen nennenswerten Acrylamid-Gehalt aufwiesen, wurden diese wahrscheinlich hocherhitzt, obwohl dies im Ernährungsprotokoll des Probanden V-m-3 nicht näher spezifiziert wurde. Durch eine genauere Beschreibung oder Photographien hätten einige Lebensmittel der Humanstudie II besser eingeordnet bzw. eingeschätzt werden können. Bei größer angelegten Studien könnte dies beispielsweise durch die Verwendung einer Smartphone-App realisiert werden.

Da der größte Anteil der Acrylamid-Aufnahme des sechsten Studientages zwischen 15:00–20:00 Uhr erfolgte, stieg auch die Ausscheidung von AAMA von 150 nmol/12 h (08:00–20:00 Uhr) auf 240 nmol/12 h im Übernachtsurin dieses Studientages sprunghaft an, sodass auch die Kinetik von AAMA mit vorherigen Studien übereinstimmte [Ruenz *et al.*, 2016; Boettcher *et al.*, 2006a; Fuhr *et al.*, 2006]. Im Gegensatz hierzu zeigte die GAMA-Ausscheidung an diesem sowie anderen Studientagen keine nennenswerte Beeinflussung durch eine alimentäre Acrylamid-Aufnahme. Lediglich an Tag 1 waren die GAMA- sowie die AAMA-Level erhöht. Hierdurch wird erneut bestätigt, dass AAMA als bedeutend sensitiverer Biomarker einer Acrylamid-Exposition angesehen werden kann als GAMA. Der wesentlich weniger ausgeprägte Anstieg von GAMA im Gegensatz zu AAMA wird bei diesem Probanden auch an den letzten Studientagen sichtbar. So wurden von V-m-3 an Tag 7 491 nmol Acrylamid in erster Linie durch den Verzehr von Salzstangen (171 µg/kg) aufgenommen. Während die AAMA-Ausscheidung mit 434 nmol/d auf einem ähnlich hohen Niveau wie am Studientag zuvor mit 391 nmol/d lag, lag die GAMA-Ausscheidung an Tag 7 mit 53 nmol/d weiterhin im Bereich der Studientag 2–10, an welchem die GAMA-Ausscheidung in einem Bereich von 45–58 nmol/d lag. Während der Proband an Tag 8 mit 187 nmol vergleichsweise wenig Acrylamid aufnahm und auch die AAMA-Ausscheidung an diesem Tag

leicht abnahm (siehe Abbildung 6-39), blieben auch hier die GAMA-Level gleich. An den letzten beiden Studientagen stieg die alimentäre Acrylamid-Aufnahme durch den Verzehr einer Bohnenpfanne (43 µg/kg) an Tag 9 sowie von Salzstangen erneut an, was sich ebenfalls in einer Erhöhung der AAMA-Ausscheidung im jeweiligen Übernachturin zeigte.

Generell verzehrte der Proband regelmäßig vegane Fleischsurrogate wie Tofu sowie Brotwaren wie Kürbiskernbrötchen und Laugenbrezeln, die zur täglichen Acrylamid-Exposition beitrugen. Zwar konsumierte der Proband V-m-3 auch mehrere Mahlzeiten mit gebratenem Gemüse, die Acrylamid-Gehalte lagen jedoch im Gegensatz zu den analysierten Mahlzeiten von V-m-1 in einem wesentlich niedrigeren Bereich. Hieraus lässt sich wie bereits in Humanstudie I die Bedeutung der Zubereitungsart privater Haushalte auf die Acrylamid-Gehalte ableiten. Obwohl beide vegane Probanden ähnliche Lebensmittel bevorzugten, wiesen sie mit 896 nmol/d (V-m-1) bzw. 303 nmol/d (V-m-3) sehr unterschiedliche mittlere Acrylamid-Aufnahmen auf. Neben den unterschiedlichen Acrylamid-Gehalten der verzehrten Lebensmittel spielten jedoch auch die unterschiedlichen Verzehrsmengen eine Rolle. So nahm V-m-1 entsprechend des höheren Körpergewichts auch größere Portionen zu sich. Die wesentlich höhere Acrylamid-Aufnahme relativierte sich jedoch auch entsprechend bei Bezug auf das Körpergewicht mit durchschnittlich 0,76 µg/kg KG/d für V-m-1 im Vergleich zu 0,36 µg/kg KG/d für V-m-3.

Veganer V-m-4. Die Acrylamid-Aufnahme von V-m-4 betrug während der Humanstudie II im Mittel 230 ± 261 nmol/d ($0,21 \pm 0,23$ µg/kg KG/d) bei einem Bereich von 17–665 nmol/d und war somit die geringste der männlichen Veganer. Die AAMA-Ausscheidung betrug 280 ± 114 nmol/d (124–428 nmol/d), die GAMA-Ausscheidung lag bei 52 ± 16 nmol/d (32–75 nmol/d). Lediglich an zwei Studientagen konnten quantifizierbare Mengen Cotinin im Urin des Probanden nachgewiesen werden, welche jedoch mit 1 nmol/d (Tag 6) bzw. 7 nmol/d (Tag 7) sehr gering waren. Da auch die CYMA-Level während der Humanstudie in einem durchgängig niedrigen Bereich von 0,2–0,6 nmol/d lagen, kann davon ausgegangen werden, dass keine Beeinflussung der Acrylamid-Biomarker durch Tabakrauch-Exposition vorlag.

Wie in Abbildung 6-40 zu sehen ist, nahm V-m-4 an den ersten drei Studientagen sowie am letzten Studientag im Vergleich zu den Tagen 4–9 hohe Mengen Acrylamid auf. An Tag 1–2 verzehrte der Proband einen in den Ernährungsprotokollen nicht näher beschriebenen Auflauf, welcher einen Acrylamid-Gehalt von 54 µg/kg aufwies, sowie mehrere Brotwaren mit und ohne Belag, deren Acrylamid-Gehalte in einem Bereich von <LOD bis 69 µg/kg lagen.

An Tag 3 und Tag 10 wurden jeweils hocherhitzte Kartoffelprodukte wie Pommes frites oder Rosmarin-Kartoffeln verzehrt. Anhand der hier verzehrten Produkte zeigte sich, dass gewerblich hergestellte Produkte (Mensa, Fast Food Unternehmen) mit 103–110 µg/kg zum einen vergleichbare, jedoch im Verhältnis zu den im privaten Bereich zubereiteten Produkten (Rosmarinkartoffeln, Pommes frites) mit 8,6–63 µg/kg höhere Gehalte aufwiesen.

Nichtsdestotrotz lagen die Acrylamid-Gehalte der gewerblich hergestellten Produkte wesentlich unter dem Richtwert von 500 µg/kg der Verordnung (EU) 2017/2158⁵.

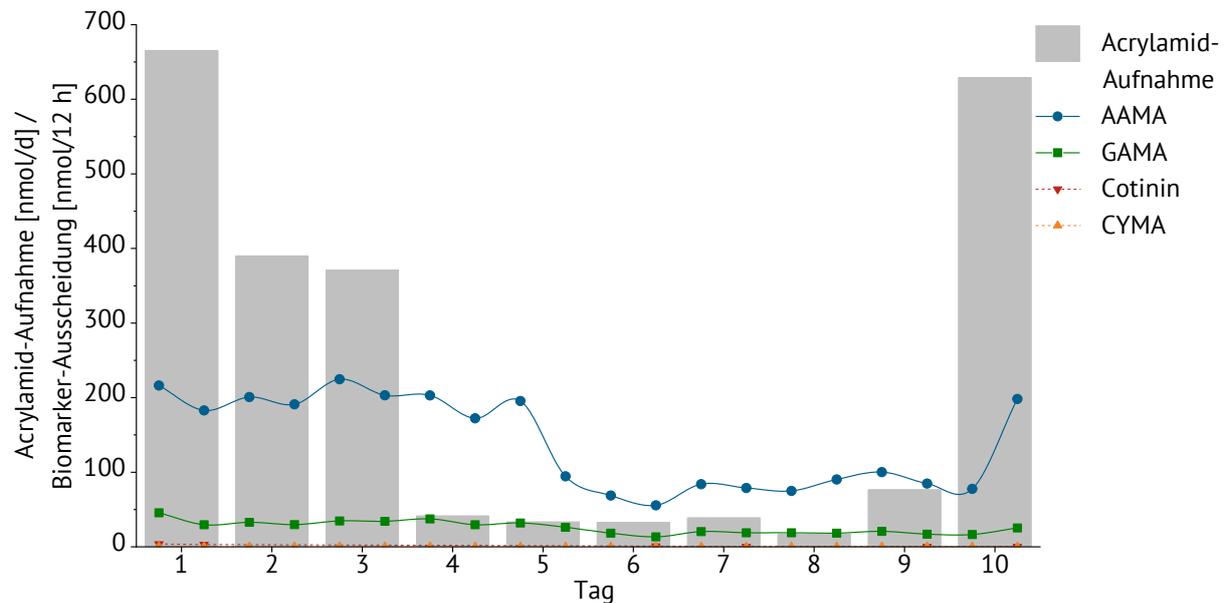


Abbildung 6-40 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-4. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

An den anderen Studientagen ernährte sich der Proband V-m-4 vorwiegend von Acrylamid-armen Lebensmitteln wie Nudelgerichten, Obst, Salat und Gemüse sowie Brotwaren und belegten Brötchen, welche den Großteil der Acrylamid-Aufnahme dieser Studientage ausmachten.

Bedingt durch die hohe Acrylamid-Aufnahme an Tag 1–3 schied der Proband V-m-4 in der ersten Studiehälfte hohe Mengen der assoziierten Mercaptursäuren aus. Somit lag die AAMA-Ausscheidung von Tag 1–5 bei durchschnittlich 377 ± 52 nmol/d, die von GAMA bei 66 ± 7 nmol/d. An Tag 6 war die Ausscheidung von AAMA (124 nmol/d) und GAMA (32 nmol/d) im Vergleich zu anderen Studientagen am geringsten. Aus den verhältnismäßig geringen Acrylamid-Aufnahmen an Tag 7 (42 nmol/d) und Tag 8 (17 nmol/d) resultierte eine ebenso geringe Mercaptursäure-Ausscheidung von 82 nmol/12 h AAMA und 19 nmol/12 h GAMA. Durch die sehr hohe Acrylamid-Aufnahme von 629 nmol/d an Tag 10 zwischen 15:00–19:00 Uhr stieg im letzten Sammelzeitraum Tag 10 (20:00–08:00 Uhr) die Biomarker-Ausscheidung erneut sprunghaft von 78 nmol/12 h auf 198 nmol/12 h (AAMA) bzw. von 16 nmol/12 h auf 25 nmol/12 h (GAMA) an.

Durch diesen Probanden zeigt sich, dass zum einen regelmäßiger Verzehr von Brotwaren zu einer konstanten, jedoch niedrigen Acrylamid-Aufnahme führten und zum anderen Spitzen in der Acrylamid-Aufnahme insbesondere durch hochoverhitzte Kartoffelprodukte induziert waren. Wie bereits in Studien zuvor war vor allem AAMA indikativ für eine Acrylamid-Aufnahme und kann als Expositionsbiomarker fungieren [Ruenz *et al.*, 2016].

⁵ Verordnung (EU) 2017/2158 der Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln, Anhang IV.

Veganer V-m-5. Der vegan lebende Proband V-m-5 (siehe Abbildung 6-41) musste die Studie bereits einen Tag früher beenden, sodass im Folgenden lediglich neun Studientage berücksichtigt wurden und sich entsprechende Werte auf diesen verkürzten Zeitraum beziehen.

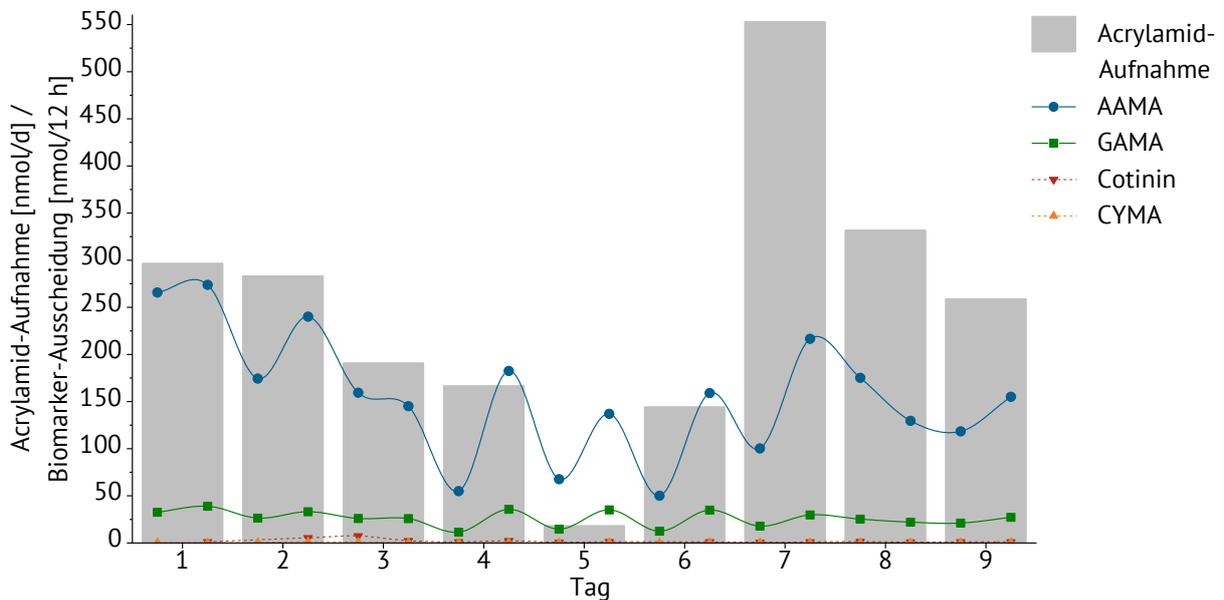


Abbildung 6-41 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-5. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Die Acrylamid-Aufnahme war während dieser neun Tage mit im Mittel 249 ± 149 nmol/d ($0,22 \pm 0,13$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) im unteren Bereich der männlichen Veganer anzusiedeln und umfasste Werte von 18–553 nmol/d.

Die mittlere Ausscheidung von AAMA lag mit 312 ± 107 nmol/d (205–539 nmol/d) hingegen etwas höher, welches sich auf eine geringe, jedoch konstante Hintergrundexposition mit Tabakrauch zurückführen lässt [Angerer und Schaller, 2001; Schettgen *et al.*, 2009]. Entsprechend schied Proband V-m-5 zwischen 1–10 nmol/d (0–1 $\mu\text{g}/\text{l}$) Cotinin aus. Auch die detektierten CYMA-Level waren mit einem Bereich von 0,5–1,7 nmol/d leicht höher als bei Probanden, bei denen keine nachweisbaren Mengen Cotinin im Urin vorhanden waren. Die GAMA-Ausscheidung lag im Mittel bei 52 ± 8 nmol/d und schwankte in einem Bereich von 47–71 nmol/d und war somit genauso hoch wie bei V-m-4, welcher jedoch geringfügig weniger Acrylamid über den Studienzeitraum aufnahm. Im Verhältnis zu anderen Probanden der Humanstudie II konnte, wie in Abbildung 6-41 dargestellt ist, ein gleichsinniger Verlauf der AAMA- und GAMA-Ausscheidung beobachtet werden. Insbesondere an den Studientagen 4–7, an welchen die AAMA-Ausscheidung jeweils von 08:00–20:00 Uhr bedeutend geringer ausfiel als im entsprechenden darauffolgenden Übernachturin von 20:00–08:00 Uhr, zeigte auch die GAMA-Ausscheidung diesen Trend. Die Kinetik stimmte im Wesentlichen mit den jeweiligen Acrylamid-Expositionszeiträumen überein, da der Proband V-m-5 oftmals Acrylamid-haltige Lebensmittel vom späten Vormittag bis Nachmittag zu sich nahm und die Maxima entsprechend im Übernachturin erfasst wurden [Boettcher *et al.*, 2006a; Fuhr *et*

al., 2006; Ruenz *et al.*, 2016]. Ebenso ging eine erhöhte Acrylamid-Aufnahme mit einem Anstieg der Mercaptursäure-Exkretion einher und *vice versa*.

Der Proband V-m-5 zeigte wenig Varianz in der Wahl der Lebensmittel, welche im Studienzeitraum konsumiert wurden. Ein Hauptbestandteil seiner Ernährung unter der Woche (montags bis freitags) stellten verschiedene Laugengebäckwaren (6,6–11,6 µg/kg) oder andere Brötchen (9,5–43 µg/kg) sowie diverse Kaffee-Getränke (6,5–10,8 µg/kg) dar. An weiteren Studientagen verzehrte er unterschiedliche Nudelgerichte wie Lasagne (6,4 µg/kg) oder Nudeln mit Soßen, welche keine quantifizierbaren Mengen Acrylamid enthielten. Zudem wurden von V-m-5 regelmäßig Süßigkeiten wie vegane Nougat-Schokolade (107 µg/kg), Marzipan-Schokolade (49 µg/kg) und Kuchen (149 µg/kg), aber auch herzhaftere Snacks wie Kartoffelchips (80 µg/kg), verschiedene Nuss-Mischungen (<LOD) sowie karamellisierte Sonnenblumenkerne (106 µg/kg) verzehrt.

Die Ernährungsgewohnheiten des Probanden widerlegen die allgemein getroffene Annahme, dass ein veganer Lebensstil mit einer gesteigerten Aufnahme von Obst und Gemüse einhergeht, welches der Proband V-m-5 zwar auch gelegentlich konsumierte, jedoch keinen elementaren Bestandteil seiner Mahlzeiten darstellte. Während der regelmäßige Konsum von Brotwaren und Kaffee-Getränken zu einer konstanten Acrylamid-Aufnahme führten, ergaben sich Maxima meist durch Acrylamid-haltige Snacks und Süßwaren.

6.4.6.2.2. Weibliche Veganer

Veganerin V-w-1. Die vegan lebende Probandin V-w-1 nahm während der Duplikatstudie zwischen 13–2.112 nmol/d Acrylamid (siehe Abbildung 6-42) und im Mittel 419 ± 629 nmol/d ($0,50 \pm 0,75$ µg/kg KG/d) auf, welches der vierthöchsten alimentären Exposition aller Probanden entsprach und beinahe identisch mit der der Probandin GK-w-4 war.

Über den Studienzeitraum betrug die mittlere AAMA-Ausscheidung 461 ± 203 nmol/d bei einem Bereich von 261–838 nmol/d. In Übereinstimmung mit der hohen Acrylamid-Aufnahme war dies auch eine hohe Ausscheidung der primär gebildeten Mercaptursäure im Vergleich aller Probanden. Auch die Ausscheidung von GAMA war mit im Mittel 54 ± 18 nmol/d (34–99 nmol/d) im oberen Bereich aller Probanden. Ein geringer Einfluss durch Exposition mit Tabakrauch während der Humanstudie II lässt sich durch die Ausscheidung geringer Mengen Cotinin (<LOD bis zu 8 nmol/d) und CYMA (0,5–1,7 nmol/d) vermuten.

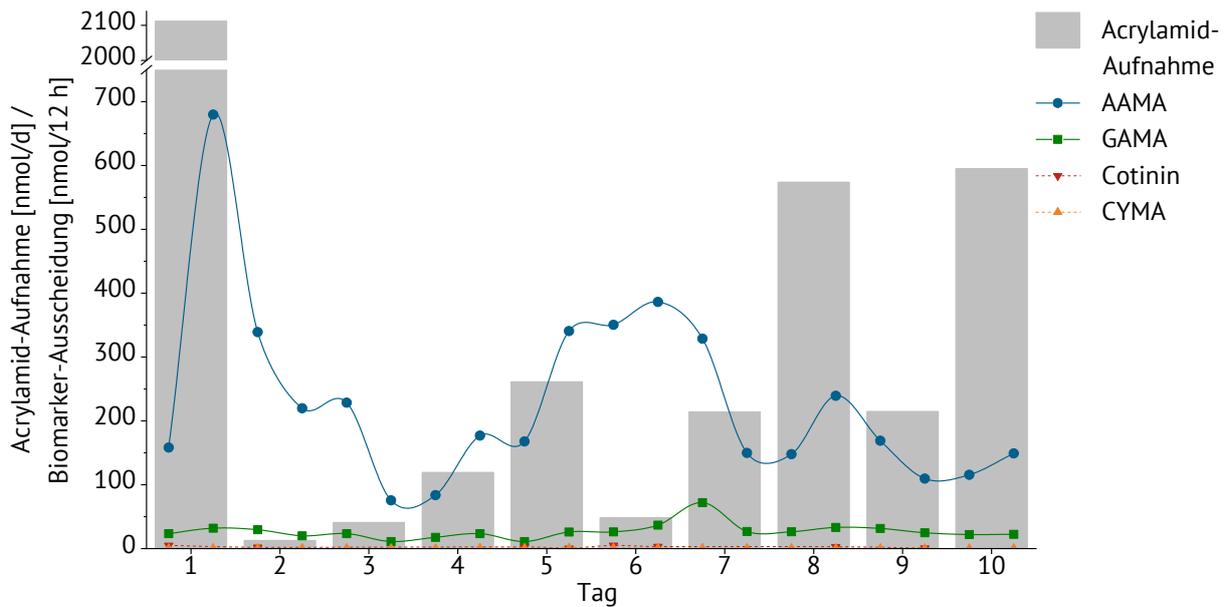


Abbildung 6-42 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-1. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

An Tag 1 hatte die Probandin mit 2.112 nmol (2,51 µg/kg KG) die höchste Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung während des Studienzeitraums. Hier verzehrte sie zum einen gegen 11:30 Uhr Krokettchen (185 µg/kg), zum anderen gegen 16:00 Uhr Pommes frites mit Curry (243 µg/kg), sodass auch durch Probandin V-w-1 deutlich wird, dass hocherhitzte Kartoffelprodukte hauptverantwortlich für hohe Acrylamid-Aufnahmemengen sind [EFSA, 2015]. Infolgedessen stieg die AAMA-Exkretion von 158 nmol/12 h tagsüber (08:00–20:00 Uhr) zum nächsten Sammelzeitraum über Nacht (20:00–08:00 Uhr) sprunghaft auf 680 nmol/12 h an. Die Ausscheidung von GAMA stieg ebenfalls von 23 nmol/12 h auf 32 nmol/12 h an. Bedingt durch die niedrige alimentäre Acrylamid-Aufnahme an Tag 2 (13 nmol) und Tag 3 (41 nmol), sank die AAMA-Ausscheidung von 838 nmol an Tag 1 auf 261 nmol an Tag 4. Ebenso sank die GAMA-Ausscheidung von 55 nmol/d auf 41 nmol/d. Entsprechend den Daten der Humanstudie I (siehe Kapitel 6.2.5) und weiterer publizierter Studien [Ruenz *et al.*, 2016; Watzek *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2017] zeigte sich auch hier, dass der Großteil einer Acrylamid-Aufnahme innerhalb von drei Tagen als AAMA ausgeschieden wird. Ein prozentualer Anteil lässt sich hier jedoch nicht aussagekräftig bestimmen, da der Basislinienwert an Tag 1 mit 630 nmol/12 h bereits sehr hoch lag, wodurch auch auf eine Acrylamid-Exposition vor Studienbeginn geschlossen werden kann. Zudem könnten diese Werte durch die oben genannte Exposition mit Tabakrauch vor oder zu Studienbeginn beeinflusst sein.

Während die Probandin V-w-1 an Tag 5 ebenfalls einen deutlichen Anstieg der AAMA-Ausscheidung nach Acrylamid-Aufnahme zeigte, wurde im Gegensatz zu dem Abfall der AAMA-Exkretion zu Studienbeginn auch an Tag 6 eine hohe AAMA-Ausscheidung beobachtet, obwohl die alimentäre Acrylamid-Aufnahme an diesem Tag mit 48 nmol sehr gering war. Dies könnte an einer passiven Exposition durch Verbrennungsgase liegen, da die Probandin an Tag 5–6 die höchsten Cotinin- und CYMA-Level aufwies und auch im retrospektiven Fragebogen (siehe

Anhang A.9, Seite 273) angab, sich währenddessen in der Nähe von Rauch (öffentliche Raucherbereiche, Stadtfest mit offenem Feuer) aufgehalten zu haben. Daneben konsumierte die Probandin von Tag 5–7 regelmäßig roten und schwarzen Reis mit Gemüse und Tofu. Da es sich hierbei um ein heterogenes Gemisch handelt, bei dem ein Acrylamid-Gehalt von 12,4 µg/kg analysiert wurde, kann der tatsächliche Acrylamid-Gehalt abweichen und auch von Mahlzeit zu Mahlzeit variiert haben, welches für alle Duplikate heterogener Mahlzeiten als einer der Schwächen im Studiendesign der Humanstudie II angesehen werden kann.

Veganerin V-w-2. Die Probandin V-w-2 wies im Studienzeitraum eine durchschnittliche Acrylamid-Aufnahme von 538 ± 434 nmol/d ($0,78 \pm 0,63$ µg/kg KG/d) auf, welche sich über einen weiten Bereich von 70–1.593 nmol/d erstreckte und in Abbildung 6-43 zu dargestellt ist.

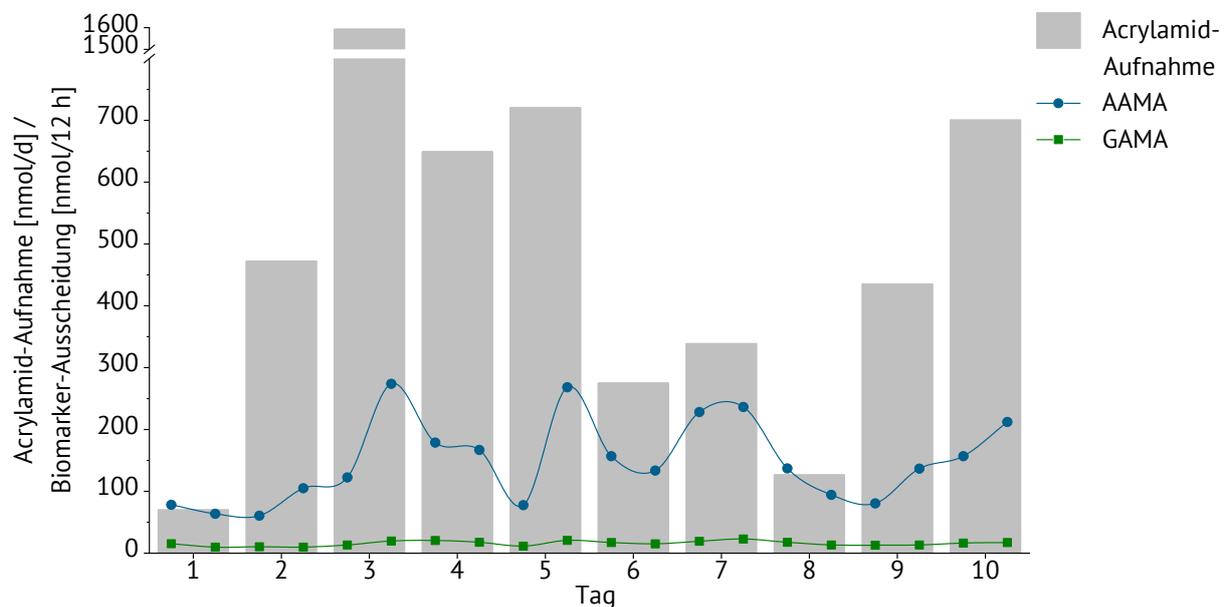


Abbildung 6-43 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren der Veganerin V-w-2. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Im Gegensatz zur hohen alimentären Acrylamid-Aufnahme schied Probandin V-w-2 durchschnittlich lediglich 297 ± 105 nmol/d (142–464 nmol/d) AAMA sowie 31 ± 6 nmol/d (20–42 nmol/d) GAMA aus. Eine Aussage über eine zusätzliche exogene Acrylamid-Exposition in Form von Tabakrauch kann für diese Probandin nicht getroffen werden, da auch sie nicht mehr erfolgreich kontaktiert werden konnte, um das Einverständnis zur Messung der Tabakrauch-Expositionsbiomarker einzuholen. Dennoch gab die Probandin retrospektiv an, sich an Tag 6 in einer Bar, Restaurant oder Diskothek aufgehalten zu haben (siehe Tabelle 0-94, Seite 274), sodass sich ein gewisser nicht-alimentärer Einfluss vermuten lässt.

Die Probandin V-w-2 konsumierte regelmäßig verschiedene Brotwaren wie Baguette (4 µg/kg), Pita (150 µg/kg) oder Knäckebrot (38 µg/kg), welche oftmals mit Salaten oder Gemüse kombiniert wurden, und somit stark zur täglichen Acrylamid-Aufnahme beitrugen. Ebenso leisteten Schokolade (335 µg/kg) und Kesselchips (481 µg/kg) einen Beitrag zur hohen Acrylamid-Aufnahme dieser Probandin. Daneben verzehrte die Probandin V-w-2 jedoch auch täglich

Smoothies und gelegentlich Nudelgerichte, welche keine quantifizierbaren Mengen Acrylamid enthielten.

Zwar stieg die AAMA-Exkretion nach der höchsten Acrylamid-Aufnahme von 1.593 nmol (Pita) von 165 nmol an Tag 2 auf über das Doppelte an Tag 3 mit 396 nmol an, fiel jedoch im Verhältnis zur sehr hohen Acrylamid-Aufnahme über Lebensmittel eher gering aus. Dies zeigte sich ebenso an Tag 5 und Tag 10, an denen jeweils ein unterproportionaler Anstieg der AAMA-Exkretion im Vergleich zur Acrylamid-Aufnahme zu beobachten war. GAMA hingegen zeigte auf keine der genannten Acrylamid-Expositionen eine nennenswerte Antwort. Auch bei dieser Probandin ist ein Enzym-Polymorphismus, der am Acrylamid-Metabolismus beteiligten Enzyme wie beispielsweise Cytochrom P450 2E1 [Neafsey *et al.*, 2009], verschiedene GST wie GSTM1, GSTT1 und GSTP1 [Ginsberg *et al.*, 2009] und die im weiteren Verlauf des Metabolismus vorkommende NAT1 und NAT2 [Walker *et al.*, 2009] denkbar.

Veganerin V-w-3. Die Veganerin V-w-3 nahm über den zehntägigen Studienzeitraum im Vergleich zu allen Probanden am wenigsten Acrylamid über die Nahrung (91 ± 189 nmol/d; $0,10$ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$) auf. Infolgedessen zeigte die Probandin auch die geringste AAMA-Ausscheidung aller Probanden mit durchschnittlich 96 ± 48 nmol/d und einem Bereich von 46–185 nmol/d. Mit 23 ± 6 nmol/d (16 – 32 nmol/d) schied die Probandin V-w-3 hingegen im Mittel mehr GAMA als GK-w-2 (16 ± 3 nmol/d) und gleich viel wie GK-w-3 (23 ± 5 nmol/d) aus.

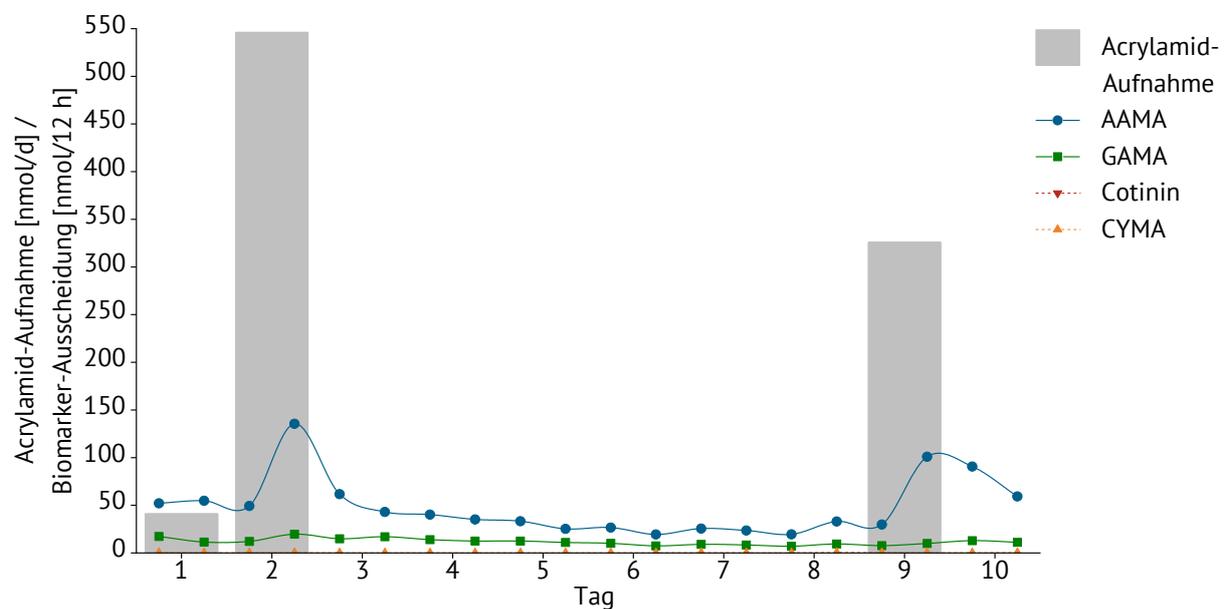


Abbildung 6-44 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-3. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Wie in Abbildung 6-44 dargestellt, konnten nur an drei von zehn Studientagen quantifizierbare Mengen Acrylamid in den von der Probandin V-w-3 verzehrten Lebensmitteln festgestellt werden. So lag die Acrylamid-Aufnahme an Tag 1 bei 41 nmol, an Tag 2 bei 546 nmol/d und an Tag 9 bei 326 nmol/d. Da die Probandin V-w-3 ebenso keine quantifizierbaren Mengen Cotinin im Urin aufwies und die CYMA-Level mit einem Bereich von 0,3–0,6 nmol/d sehr gering und im unteren

Bereich aller Probanden waren, ist zudem davon auszugehen, dass zu dieser geringen alimentären Exposition keine weiteren exogenen Einflüsse eine Rolle spielten.

Am Tag 1 wurden von der Probandin V-w-3 Brot mit und ohne Belag (9,2 bzw. 9,7 µg/kg), am Tag 2 gebratenes Gemüse (Karotte, Zucchini) mit „Sojaschnetzel“ (66 µg/kg) und an Tag 9 „Amaranth, Quinoa mit Paprika und Lauch“ (23 µg/kg) verzehrt, welches die einzigen Mahlzeiten der Probandin waren, die quantifizierbare Mengen Acrylamid enthielten. Zu ihren weiteren Mahlzeiten gehörten vorwiegend Obst pur oder als Smoothie, gemischte Salate, Gemüsegerichte sowie Mineralwasser und Tees als Getränke, in welchen jeweils keine quantifizierbaren Mengen Acrylamid detektiert werden konnten oder diese nicht analysiert wurden, da von den jeweiligen Produkten wie beispielsweise Obst bekannt war, dass sie keine nennenswerten Mengen Acrylamid aufwiesen [Ruenz *et al.*, 2016; EFSA, 2015].

Die Acrylamid-Aufnahme von 546 nmol (0,60 µg/kg KG) hauptsächlich am frühen Abend von Tag 2 führte zu einer maximalen Ausscheidung von AAMA mit 135 nmol/12 h (240 nmol/g ucr) und von GAMA mit 20 nmol/12 h (40 nmol/g ucr) im Übernachturin (20:00–08:00 Uhr) von Tag 2. In Abwesenheit einer weiteren Acrylamid-Aufnahme sank die renale Mercaptursäure-Ausscheidung auf ein konstantes Hintergrundlevel mit einem Mittelwert von 51±5 nmol/d AAMA (48±10 nmol/g ucr) und 19±3 nmol/d (17±3 nmol/g ucr) GAMA zwischen den Tagen 5–8. Bemerkenswert ist, dass die Ausscheidung beider Mercaptursäuren nie den Wert Null erreichte. So wies V-w-3 46 nmol/d AAMA bzw. 16 nmol/d GAMA als niedrigste totale Werte auf. Im Spoturin von Tag 7 ergaben sich bezogen auf ucr jeweils Minima von 37 nmol/g ucr (AAMA) und 13 nmol/g ucr (GAMA). Da in diesem Zeitraum auch keine nennenswerte exogene Acrylamid-Exposition vorlag, deutet dies wie die Befunde der Humanstudie I auf ein endogenes Acrylamid-Hintergrundlevel bei dieser Probandin hin.

Dieses Niveau lag somit noch unter dem der humanen Interventionsstudie von Ruenz *et al.* [2016] mit 14 männlichen Probanden. Dort ergab sich nach dreitägigem Washout mit einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von höchstens 41 ng/kg KG/d eine Ausscheidung von 93±31 nmol/d (0,05±0,02 µmol/g ucr) AAMA bzw. 23±8 nmol/d (0,01±0,004 µmol/g ucr) GAMA. Auch die in Humanstudie I erfassten Acrylamid-Hintergrundlevel lagen im Vergleich zu den Leveln der Probandin V-w-3 etwas höher (siehe Kapitel 6.2.5).

Von der Probandin V-w-3 wurden 64 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge an Tag 2 innerhalb von 72 h als AAMA ausgeschieden, welches etwas höher als die von Ruenz *et al.* [2016] beschriebenen 58 % nach ähnlicher alimentärer Acrylamid-Aufnahme von 0,6–0,8 µg/kg KG/d war. Diese etwas höhere prozentuale Ausscheidung als in der Literatur und in dieser Arbeit beschrieben könnte auch durch die Acrylamid-Aufnahme am ersten Studientag bedingt sein, an dem die Probandin 41 nmol Acrylamid über die Nahrung aufnahm.

Das Maximum der AAMA-Ausscheidung nach Acrylamid-Aufnahme an Tag 2 gegen 18:15 Uhr wurde im sich anschließenden Übernachturin von 20:00–08:00 Uhr nachgewiesen. Dort schied die Probandin V-w-3 135 nmol/12 h bzw. 240 nmol/g ucr aus. Die in diesen Sammelzeitraum

fallende Spoturin-Probe ergab mit 294 nmol/g ucr indes das absolute Maximum, welches somit circa 10–12 h nach Acrylamid-Exposition erreicht wurde.

Auch die Acrylamid-Aufnahme der Probandin V-w-3 an Tag 9 um 19:00 Uhr (326 nmol) führte zu einem erneuten Anstieg der Mercaptursäuren im Urin. Hierdurch stieg die Ausscheidung von 53 nmol an Tag 8 auf 131 nmol an Tag 9 an. Das Maximum lag wie an nach Acrylamid-Aufnahme an Tag 2 erneut im sich anschließenden Übernachturin bzw. Spoturin und somit ebenfalls circa 10–11 h nach Aufnahme. Das t_{\max} der GAMA-Ausscheidung (23 nmol/g ucr) wurde an Tag 10 von 08:00–20:00 Uhr nachgewiesen und trat demnach erwartungsgemäß einen Sammelzeitraum nach dem von AAMA auf [Ruenz *et al.*, 2016; Boettcher *et al.*, 2006b; Boettcher *et al.*, 2006a; Fuhr *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017].

Durch die Analyse der Probandin V-w-3 zeigt sich, dass sich die unter kontrollierten Bedingungen von humanen Interventionsstudien erhaltenen kinetische Parameter auch unter normalen Lebensumständen verifizieren lassen und diese Ergebnisse somit zur Validität der Expositionsbiomarker beitragen.

Veganerin V-w-4. Die Probandin V-w-4 nahm durchschnittlich 291 ± 112 nmol/d ($0,36 \pm 0,14$ µg/kg KG/d) Acrylamid über die Nahrung auf und lag somit nahezu im Mittel aller Probanden. Acrylamid-haltige Lebensmittel, die verzehrt wurden, waren fast ausschließlich Gewürzkaffee (4,8 µg/kg) bzw. entkoffeinierter Kaffee (4,6 µg/kg) sowie Brot und Backwaren wie unterschiedlich belegte Brötchen (<LOD bis 80 µg/kg), Brezeln (18 µg/kg), Kekse (19–91 µg/kg) und unterschiedliche Kuchen (18–61 µg/kg). Der Verzehr von Brotwaren und Backwaren machten 82 % der gesamten Acrylamid-Aufnahme der Veganerin V-w-4 aus, wodurch deutlich wird, dass auch diese Lebensmittelkategorie zu einer nennenswerten, jedoch im Gegensatz zu hocherhitzten Kartoffelprodukten nicht übermäßigen Acrylamid-Zufuhr beitragen kann. Daneben konsumierte die Probandin auch regelmäßig Obst, Gemüse sowie als Getränke Tee und Bier, welche entweder nicht auf ihre Acrylamid-Gehalte untersucht wurden [Ruenz *et al.*, 2016; EFSA, 2015] oder einzelne Stichproben im Falle der Bier- und Tee-Duplikate herangezogen wurden, deren Acrylamid-Gehalte jedoch nicht nachweisbar (Bier) oder nicht quantifizierbar (Tee) waren.

Wie in Abbildung 6-45 zu sehen ist, schied V-w-4 im Verhältnis zur alimentären Acrylamid-Aufnahme sehr hohe Mengen der Mercaptursäuren AAMA und GAMA aus, welche die zusätzliche und nachträgliche Aufnahme der Tabakrauch-Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA in das Studiendesign der Humanstudie II veranlasste.

Mit einer AAMA-Ausscheidung von 804 ± 248 nmol/d (545–1.338 nmol/d) und einer GAMA-Ausscheidung von 73 ± 14 nmol/d (56–103 nmol/d) wies die Probandin eine überproportionale und zudem höchste Biomarker-Exkretion im Vergleich aller Probanden auf.

Im Fragebogen zum Amendment I (siehe Tabelle 0-94) gab die Probandin an, sich an mehreren Tagen pro Woche in der Nähe von offenem Feuer, in öffentlichen Raucherbereichen und in unmittelbarer Umgebung von Rauchern aufgehalten zu haben. Dies wird auch durch die renalen Level von Cotinin (374 ± 145 nmol/d bzw. 19 ± 10 µg/l) und CYMA (43 ± 16 nmol/d) unterstützt, welche ebenso die höchsten Level waren, welche in der Subgruppe (n=16) der Probanden

gemessen wurden. Die ausgeschiedenen Konzentrationen lagen in einem Bereich von 187–550 /nmol/d bzw. 8–36 µg/l für Cotinin und von 20–71 nmol/d für CYMA.

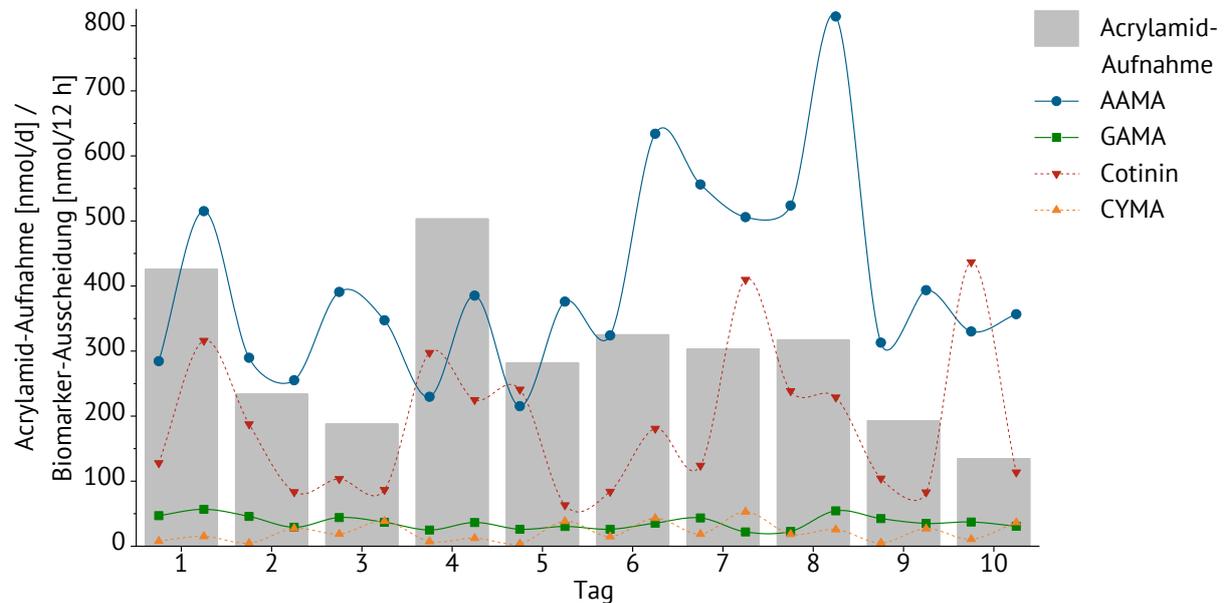


Abbildung 6-45 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-4. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Anhand der Cotinin-Level der Probandin V-w-4 im Vergleich zu Literaturdaten lässt sich ableiten, dass diese wie angegeben regelmäßig und häufig Kontakt zu Rauchern hatte. Gleichzeitig lagen die Cotinin-Konzentrationen im Urin unter typischen Werten, welche im Urin von Rauchern nachgewiesen wurden. Dies zeigt sich beispielsweise im Vergleich zu einer Studie von Thompson *et al.* [1990], welche 11,4 ng/ml (6,9–18,9 ng/ml) Cotinin im Urin von Probanden detektierten, die mit Rauchern zusammenlebten. Die Probandin V-w-4 lag im Mittel zwar am Maximum dieses Bereichs, war jedoch deutlich unter dem arithmetischen Mittel von Rauchern, welches bei 1.691 ng/ml lag [Thompson *et al.*, 1990]. Eine weitere Studie ermittelte eine mittlere renale Cotinin-Ausscheidung von $14,7 \pm 19,5$ ng/ml für Probanden mit mittlerem Kontakt zu Rauchern (8,6–29 h/Woche) und von $29,6 \pm 73,7$ ng/ml für Probanden mit viel Kontakt zu Rauchern (20–80 h/Woche) [Wald *et al.*, 1984]. Schettgen *et al.* [2009] untersuchten in 210 Probanden die Korrelation von CYMA mit Cotinin als Tabakrauch-Expositionsbiomarker in Spoturin-Proben. Auch im Vergleich zu den Daten dieser Studie, welche einen Bereich von 10–60 µg/l für eine hohe Passivrauch-Exposition angab, kann die Probandin V-w-4 zu stark exponierten Passivrauchern eingeordnet werden. Die mittleren CYMA-Level der Probandin ($2,5 \pm 0,6$ µg/l) stimmten hingegen mit den Werten für Probanden mit niedriger Tabakrauch-Exposition überein, welche in der Studie von Schettgen *et al.* [2009] bei einem Median von 3,2 µg/l lagen.

Aus den oben genannten Gründen konnte kein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Acrylamid über die Nahrung und der Ausscheidung von AAMA und GAMA erfasst werden. Vielmehr wird durch die Betrachtung der Probandin V-w-4 deutlich, dass durch ein Monitoring weiterer Expositionsbiomarker mögliche zusätzliche exogene Acrylamid-Quellen identifiziert werden

können und sich demnach die Level der Mercaptursäuren AAMA und GAMA nicht nur auf eine alimentäre Acrylamid-Aufnahme zurückführen lassen.

Veganerin V-w-5. Die Probandin V-w-5 nahm lediglich an fünf von zehn Studientagen der Humanstudie II quantifizierbare Mengen Acrylamid auf, sodass sich eine mittlere Aufnahme von 166 ± 327 nmol/d ($0,20 \pm 0,38$ µg/kg KG/d) ergab, wobei das Maximum bei 1.061 nmol an Tag 1 lag (siehe Abbildung 6-46).

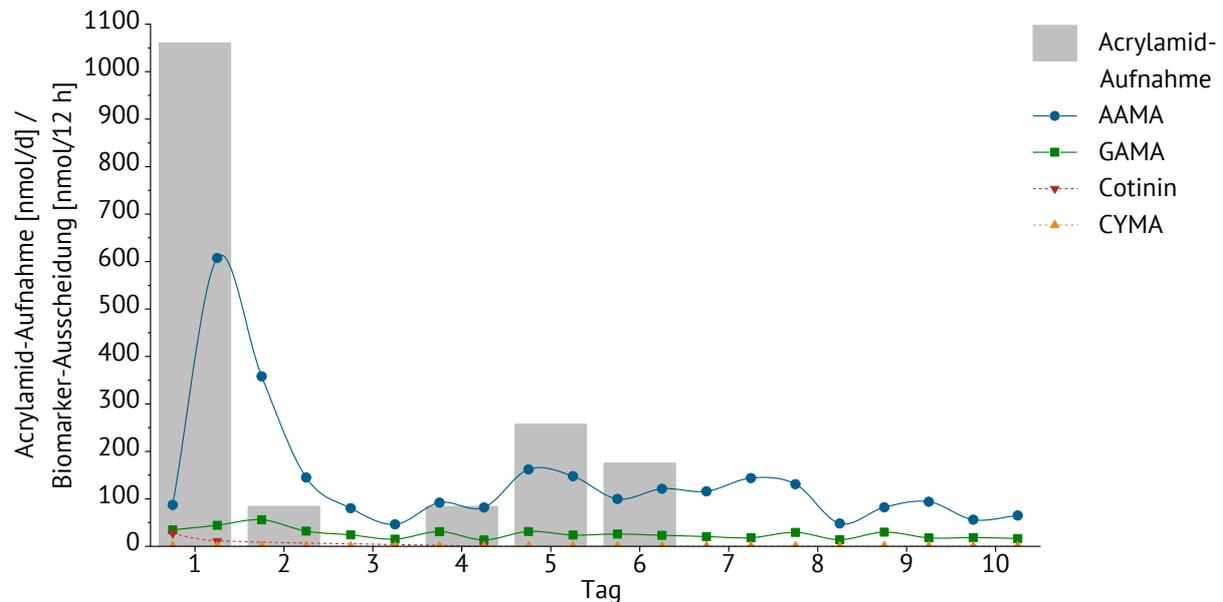


Abbildung 6-46 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-5. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein.

Die mittlere AAMA-Ausscheidung betrug 276 ± 185 nmol/d und umfasste entsprechend der unterschiedlichen Acrylamid-Aufnahme während der Studie einen Bereich von 121–694 nmol/d. Auch die Ausscheidung von GAMA zeigte einen großen Bereich von 35–88 nmol/d und einen Mittelwert von 52 ± 18 nmol/d.

Lediglich am ersten Studientag konnte eine Ausscheidung an Cotinin (39 nmol/d bzw. 3 µg/l) quantifiziert werden. Auch das CYMA-Level war mit 1,2 nmol an Tag 1 im Vergleich zu den restlichen Studientagen (0,3–0,9 nmol/d) leicht erhöht.

Am ersten Studientag (17:00 Uhr) verzehrte die Probandin Kartoffelchips mit Ketchup (366 µg/kg), welches zu einer Acrylamid-Exposition von 1.061 nmol/d (1,25 µg/kg KG/d) führte. Hierdurch stieg die AAMA-Ausscheidung im sich daran anschließenden Übernachturin (20:00–08:00 Uhr) sprunghaft von 87 nmol/12 h auf 607 nmol/12 h an. Binnen 72 h sanken anschließend die AAMA-Level von 694 nmol an Tag 1 auf 126 nmol an Tag 3. Ein Einfluss der konsumierten Paprika-Kartoffelchips (119 µg/kg) an Tag 2, welche zu einer Acrylamid-Aufnahme von 84 nmol führten, auf die Exkretion von AAMA konnte nicht festgestellt werden.

An den Tagen 4–6 nahm die Probandin V-w-5 erneut Acrylamid durch den Verzehr von unter anderem Walnussbrötchen (210 µg/kg), einem Nudelgericht mit Gemüse und Tofu (6 µg/kg) und Paprika-Kartoffelchips (119 µg/kg) auf. Hierdurch stieg an diesen und den folgenden

Studientagen die Mercaptursäure-Exkretion leicht an, fiel jedoch wesentlich geringer als im Vergleich zum Tag 1 aus.

Obwohl die Probandin ab Tag 7 keine quantifizierbaren Mengen Acrylamid über die Nahrung aufnahm, zeigte die Mercaptursäure-Ausscheidung keinen einheitlichen Abfall, sondern schwankte an den restlichen Studientagen zwischen 121–259 nmol/d AAMA. An diesen Tagen verzehrte die Probandin zwar Lebensmittel wie Müsli, Haferflocken, Gemüselasagne, Körner-Laugenstange oder Pancakes, welche aufgrund des Erhitzungsgrades bekannt dafür sind, Acrylamid zu enthalten [EFSA, 2015], es konnten jedoch keine quantifizierbaren oder detektierbaren Mengen Acrylamid in den oben genannten Lebensmitteln ermittelt werden. Dies kann neben einer nicht für die Mahlzeit repräsentativen Duplikat-Erstellung auch an möglichen „Verdünnungseffekten“ gelegen haben. So könnte beispielsweise das Müsli-Gericht zwar Acrylamid enthalten haben, da das Duplikat jedoch auch einen Wasser-Apfelsaft-Anteil enthielt, könnte dies dazu geführt haben, dass die analytische Methode nicht sensitiv genug für die somit „verdünnten“ Acrylamid-Gehalte war. Dennoch könnten diese Lebensmittel geringe Mengen Acrylamid enthalten haben, welche die Biomarker-Ausscheidung positiv beeinflusst haben könnten. Hieraus lässt sich ableiten, dass für eine Duplikat-Studie die Probennahme und die angeschlossene Analytik einen immensen Einfluss auf die Aussagekraft der Ergebnisse haben kann. In zukünftigen Studien ist es ratsam, die vorhandene Acrylamid-Analytik durch beispielsweise eine sensitivere UHPLC-Chromatographie, wie für die Modell-Reaktionen entwickelt (siehe Kapitel 9.9.3), zu ergänzen, um Nachweis- und Bestimmungsgrenzen weiter zu senken.

6.4.7. Vergleich der Biomarker-Ausscheidung von Gesamt- zu Spoturin

Neben dem möglichen Einfluss von Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil auf die Acrylamid-Aufnahme und Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA sollte auch durch einen Vergleich der Ausscheidungsdaten von Gesamturin mit denen von Spoturin ermittelt werden, ob die aufwändige Sammlung des Gesamturins durch eine Sammlung von Spoturin möglicherweise ersetzt werden kann. Dieser Ansatz wurde in der Literatur für viele Biomarker oder sonstige Urinbestandteile wie beispielsweise Metall-Ionen bereits häufig diskutiert [Barregard *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2014]. Insbesondere für die Erfassung von Element-Ionen kamen verschiedene Studien zu dem Schluss, dass eine Sammlung von Gesamturin dem Spoturin vorzuziehen sei bzw. ein zusätzlicher Bezug der Analyten auf Marker wie ucr notwendig sei [Barrett, 2016; Wang *et al.*, 2016; Smolders *et al.*, 2014].

Zusätzlich zur Sammlung des Gesamturins in zwei 12-h-Intervallen wurde am Ende des jeweiligen Studientages, d. h. vor 08:00 Uhr morgens nach dem Aufstehen („Morgenurin“) von den Probanden eine Spoturin-Probe abgegeben. Diese wurde formal dem zweiten Sammelzeitraum des jeweiligen Tages zugerechnet. Da es sich auch bei der Spoturin-Sammlung der Humanstudie II um eine punktuelle Erfassung des Mercaptursäure-Status handelte und keine definierten Zeiträume vorlagen, wurde dementsprechend die Mercaptursäure-Ausscheidung auf den

jeweiligen ucr-Gehalt der Spoturin-Probe bezogen. Da AAMA als vorwiegend gebildete Mercaptursäure sowohl schneller als auch in höheren Mengen ausgeschieden wird als GAMA [Ruenz *et al.*, 2016], wird im Folgenden nur AAMA als Parameter zum Vergleich von Spoturin zu Gesamturin betrachtet.

Tabelle 6-16 gibt eine Übersicht über das prozentuale Verhältnis der jeweiligen auf ucr bezogenen AAMA-Ausscheidung des Spoturins eines Studientages zu dem Mittelwert der beiden Sammelzeiträume des jeweiligen Studientages (08:00–20:00 Uhr und 20:00–08:00 Uhr) bzw. zum jeweiligen Übernachturin (20:00–08:00 h), zu welchem der Spoturin formal zählt.

Tabelle 6-16: Prozentuales Verhältnis des jeweiligen Kreatinin-korrigierten AAMA-Gehaltes des Spoturins des jeweiligen Studientages zu (a) den gemittelten Sammelzeiträumen des gleichen Studientages (08:00–20:00 Uhr und 20:00–08:00 Uhr) und (b) des Übernacht-Sammelzeitraumes, zu dem der Spoturin gehörte (20:00–08:00 Uhr)

	n	(a)			(b)		
		AAMA _{Spoturin} /AAMA _{Tagesmittel} [%]			AAMA _{Spoturin} /AAMA _{Übernachturin} [%]		
		Mittel	Min.	Max.	Mittel	Min.	Max.
Alle Probanden	198	111	48	254	103	56	180
Männer	99	107	51	173	102	56	140
Frauen	99	114	48	254	104	63	180
Gemischtköstler	99	105	53	177	101	56	140
männlich	50	104	53	151	101	56	140
weiblich	49	106	64	177	101	66	139
Veganer	99	116	48	254	105	63	180
männlich	49	110	51	173	103	72	151
weiblich	50	123	48	254	107	63	180

(a) Verhältnis der Kreatinin-korrigierten AAMA-Ausscheidung des Spoturins des jeweiligen Studientages zur der der gemittelten Tagesausscheidung (100 %)

(b) Verhältnis der Kreatinin-korrigierten AAMA-Ausscheidung des Spoturins des jeweiligen Studientages zur der des Übernachturins (100 %)

Im Mittel lag der ucr-korrigierte AAMA-Gehalt des Spoturins aller Probanden mit 111 % im Verhältnis zum gemittelten Tageswert (100 %) etwas höher. Als Minimum wurden jedoch lediglich 48 % der AAMA-Ausscheidung des Tages im Spoturin quantifiziert, das Maximum wies hingegen mit 254 % circa die 2,5-fache Menge auf. Der Vergleich der AAMA-Gehalte des Spoturins zu dem dazugehörigen Übernachturin als 100 %-Referenz zeigte eine bessere Übereinstimmung mit im Mittel 103 %. Hierbei lagen das Minimum bei 56 % sowie das Maximum bei 180 %. Des Weiteren zeigte der Spoturin der sich vegan ernährenden Probanden mit 116/105 % eine größere Abweichung mit Tagesmittel/Übernachturin als der der sich omnivor ernährenden Probanden mit 105/101 %. Die Abweichung war ebenso bei weiblichen Probanden höher als bei männlichen Probanden (vgl. Tabelle 6-16).

So zeigte sich zwar im Allgemeinen eine solide Übereinstimmung der Spoturin-Gehalte insbesondere zu den jeweiligen Übernachturin-Leveln, konnten jedoch im Einzelfall stark voneinander abweichen. Exemplarisch sind in Abbildung 6-47 die ucr-korrigierte AAMA-Exkretionskinetiken in 12-h-Intervallen zum Vergleich der jeweiligen Spoturin-Gehalte der Probanden GK-m-2 sowie V-w-3 dargestellt. Während GK-m-2 eine gute Übereinstimmung mit $102\pm 29\%$ (Spot zu Tagesmittel) bzw. $100\pm 23\%$ (Spot zu Übernachturin) zeigte, zeigten die entsprechenden Werte bei V-w-3 eine Abweichung von $129\pm 51\%$ bzw. $116\pm 34\%$.

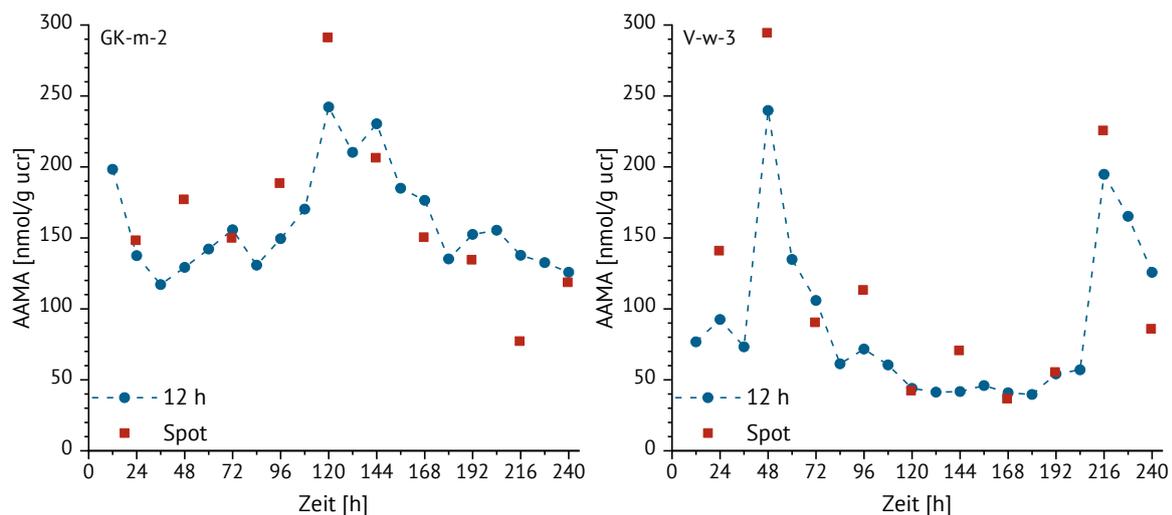


Abbildung 6-47 Vergleich der Kreatinin-korrigierten AAMA-Ausscheidung von Spoturin zum Gesamturin, welcher in 12-h-Intervallen gesammelt wurde. (links) GK-m-2 (rechts) V-w-3.

Bei Betrachtung der Kinetik von Proband GK-m-2 (Abbildung 6-47 links) fällt auf, dass der Spoturin an Tag 5 (120 h) mit 291 nmol/g ucr wesentlich höher liegt als der entsprechende Übernachturin mit 242 nmol/g ucr und somit die AAMA-Ausscheidung des fünften Studientages überproportional reflektieren würde. Das hohe AAMA-Level des Spoturins lässt sich auf den Konsum mehrere Acrylamid-haltiger Lebensmittel an Tag 5 zwischen 17:00–18:00 Uhr zurückführen, welche mit 23,5 µg beinahe die Hälfte von 51,2 µg Acrylamid an diesem Studientag ausmachten. Dadurch, dass das Maximum der AAMA-Ausscheidung circa 12 h nach Aufnahme erreicht wird [Goempel *et al.*, 2017], reflektiert der hohe AAMA-Gehalt des Spoturins von Tag 5 somit sehr gut die Kinetik der AAMA-Ausscheidung des Probanden. An Tag 9 hingegen nahm der Proband GK-m-2 mit 59,8 µg ähnliche hohe Mengen Acrylamid auf wie an Tag 5, der AAMA-Gehalt der Spoturin-Probe lag jedoch mit 77 nmol/g ucr wesentlich niedriger als der entsprechende Übernachturin (138 nmol/g ucr) oder das Tagesmittel mit 147 nmol/g ucr. An diesem Studientag nahm der Proband im Gegensatz zu Tag 5 über die Hälfte der insgesamt aufgenommenen Menge Acrylamid vormittags (10:00 bis circa 12:00 Uhr) bzw. sehr spät abends (23:00 Uhr) zu sich, sodass hier der Spoturin die Acrylamid-Aufnahme des Studientages unzureichend reflektiert. Nichtsdestotrotz ergaben sich im Mittel repräsentative Werte für die AAMA-Ausscheidung des Probanden.

Bei dem zweiten Beispiel zum Vergleich der AAMA-Ausscheidung von Gesamturin zu Spoturin handelt es sich um Probandin V-w-3, welche in Abbildung 6-47 rechts dargestellt ist. Wie in

Kapitel 6.4.6.2.2 beschrieben, nahm die Probandin nur an drei von zehn Studientagen quantifizierbare Mengen Acrylamid auf, da sie sich überwiegend von Obst und Rohkost ernährte. Während die AAMA-Ausscheidung, die sich aus dem Gesamturin ergab, diese alimentäre Acrylamid-Exposition gut reflektierte, zeigte insbesondere der Spoturin an Tag 4 und Tag 6 höhere Level als der Gesamturin. Dies lässt sich möglicherweise mit den hohen ausgeschiedenen Urinvolumen der Probandin erklären, die innerhalb von zehn Studientagen 55 l Urin ausschied, welches im Vergleich zu den mittleren Urinvolumen der Humanstudie I beinahe das Doppelte darstellte (siehe Kapitel 6.2.4). Als Folge dessen unterschritten die nicht verdünnten Urinproben der Probanden oftmals die Kalibriergeraden der ucr-Bestimmung, sodass hier auch ein messbedingter Fehler vorliegen könnte. Im Gegensatz hierzu ließ sich AAMA auch in im Verhältnis zu anderen Proben stark verdünnten Urinproben ohne Schwierigkeiten nachweisen.

Aus den oben genannten Werten sowie den beiden Beispielen lässt sich schlussfolgern, dass bei moderaten Urinvolumen und konstanter Acrylamid-Aufnahme eine Sammlung des Spoturins anstelle des aufwändigeren Gesamturins durchaus vergleichbare Ergebnisse liefern kann, wenn das Mittel über mehrere Studientage betrachtet wird. Bei der Erfassung der Exkretionskinetik nach Acrylamid-Aufnahme ergaben sich jedoch durch das t_{\max} von AAMA, welches bei circa 12 h liegt [Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017; Boettcher *et al.*, 2006a; Wang *et al.*, 2017], teils erhebliche Abweichungen, sodass bei zukünftigen Studien dieser Art nicht nur einmal pro Tag Spoturin abgegeben werden sollte, sondern durch beispielsweise eine zusätzliche Sammlung am Abend zweimal pro Tag. Hierdurch könnten zeitliche Unterschiede der Acrylamid-Exposition besser kompensiert und erfasst werden und dennoch auf eine Sammlung des Gesamturins verzichtet werden. Nichtsdestotrotz lassen sich totale Expositionsbiomarker-Level lediglich im Gesamturin bestimmen, da Spoturin-Proben auch bei mehrmaliger Sammlung pro Tag immer den Bezug wie auf ucr benötigen [Barrett, 2016]. Darüber hinaus ist bei der Sammlung von Spoturin im Gegensatz zu definierten Sammelzeiträumen auf eine Angabe der genauen Uhrzeit zu achten, welches im Fall der Humanstudie II nicht erfolgte.

6.5. Stärken und Limitierungen der Duplikatstudien

Human- und Umweltbiomonitoring sind wichtige Instrumente zur quantitativen Abschätzung einer Exposition im Rahmen einer Risikobewertung eines Stoffes [Marquard *et al.*, 2019]. Zur besseren Abschätzung der Acrylamid-Exposition wurden durch EFSA [2015] Duplikatstudien und die Untersuchung von Biomarkern im Rahmen dieser Studien empfohlen. Hierdurch ist es möglich, eine alimentäre Acrylamid-Aufnahme exakt anhand der verzehrten Lebensmittel abzuschätzen. Gleichzeitiges Monitoring der Expositionsbiomarker generiert zudem valide toxikokinetische Daten, um anhand dieser auf eine Acrylamid-Exposition zurückschließen zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Humanstudie II deckt hierbei als Duplikatstudie sowohl Elemente des Humanbiomonitorings als auch des Umweltbiomonitorings ab und verknüpft diese. Durch Humanstudie I wurden zudem unter streng kontrollierten Studienbedingungen

toxikokinetische Daten der renalen Kurzzeit-Expositionsbiomarker AAMA und GAMA und der Hämoglobin-Addukte AAV_{al} und GAV_{al} als Langzeit-Expositionsbiomarker gewonnen. Durch die beiden Humanstudien I und II zeigten sich sowohl Stärken als auch Limitierungen der von der EFSA [2015] vorgeschlagenen Methodik der Duplikatstudien.

Durch das Monitoring der konsumierten Lebensmittel konnte die exogene Belastung mit Acrylamid als Lebensmittelkontaminante bestimmt werden. Während die Probanden der Humanstudie I einem vorgegebenem Ernährungsplan folgten, der dazu diente, eine bestimmte alimentäre Acrylamid-Exposition zu erreichen oder zu vermeiden und Duplikate der verzehrten Lebensmittel durch das Studienpersonal angefertigt wurden, waren die Probanden der Humanstudie II an keine Ernährungsvorgaben gebunden und erstellten Duplikate ihrer verzehrten Lebensmittel eigenständig. Durch dieses Vorgehen bei Humanstudie II mussten somit weniger Annahmen getroffen werden als bei einer Erfassung der Ernährungsgewohnheiten alleinig über Fragebögen oder Lebensmittelkörbe mit anschließender Kalkulation der Acrylamid-Aufnahme durch Zuhilfenahme publizierter Lebensmittelmonitoring-Daten. Diese Methodik wird beispielsweise in epidemiologischen Studien angewandt, welche Probanden über einen längeren Zeitraum begleiten und eine Analyse einzelner Lebensmittel somit nicht realisierbar ist [Kotemori *et al.*, 2018].

Neben den genannten Vorteilen einer Duplikatstudie ergaben sich jedoch auch Limitierungen durch die von den Probanden der Humanstudie II eigenständig erstellten Duplikat-Mahlzeiten. Obwohl die Probanden darin geschult wurden, repräsentative Mahlzeitenduplikate zuzubereiten, könnte dies, wie es in einzelnen Beispielen zu sehen war (siehe Kapitel 6.4.5) zu einer etwas erhöhten Variabilität der analytischen Ergebnisse geführt haben. Hier sind mehrere Fehlerquellen in Betracht zu ziehen. Zum einen kann die Zusammensetzung bzw. der Acrylamid-Gehalt eines Duplikates von der tatsächlich verzehrten Mahlzeit abweichen, insbesondere in Bezug auf die Mengen der Einzelkomponenten eines Gerichtes (z. B. Angabe „Rohkostsalat mit Brot“ der Probandin V-w-2), aber auch des Aliquotierungszeitpunktes des Duplikates (z. B. Backwaren mit unterschiedlichen Backzeiten), zum anderen wurden bei einzelnen Mahlzeiten in den Ernährungsprotokollen nur ungefähre Mengenangaben protokolliert (z. B. „circa 500–700 g Döner“, „1 Boll-Burger“). Zudem wären in einzelnen Fällen Fotografien der Lebensmittel oder Mahlzeiten zur Klärung des Erhitzungsgrades nützlich gewesen. So ließ sich beispielsweise beim Auswerten der Studie nicht mehr feststellen, ob das Gericht „Paprikakartoffeln“ des Probanden V-m-1 der Humanstudie II hochoverhitzt bzw. gebraten wurde und ob es sich um Paprika als Gemüse oder Gewürz gehandelt hatte. Im Gegensatz hierzu wurden alle Komponenten der Mahlzeiten der Humanstudie I für jeden Probanden einzeln gewogen und Duplikate der gesamten Mahlzeit erstellt, sodass diese repräsentative Duplikate der tatsächlich verzehrten Mahlzeiten darstellten. Neben der Erfassung der alimentären Acrylamid-Aufnahme wurde ebenso mittels Humanbiomonitoring der Acrylamid-Expositionsbiomarker AAMA und GAMA die innere Exposition der Probanden beider Humanstudien zeitlich aufgelöst bestimmt.

Durch eine kontrollierte und einheitliche Acrylamid-Aufnahme der Probanden der Humanstudie I konnten zwar weitere Erkenntnisse zur Toxikokinetik und ein mögliches endogenes Hintergrundlevel der Expositionsbiomarker gewonnen werden, spiegelten jedoch nicht die individuelle Exposition und die daraus resultierende Ausscheidung der Biomarker wider. Durch Humanstudie II konnten neben der Exkretionskinetik unter unkontrollierten Bedingungen zusätzliche, nicht ernährungsbedingte Acrylamid-Expositionsquellen ermittelt werden. Da die von den Probanden während des Studienzeitraums erstellten Ernährungsprotokolle keine zusätzliche Erfassung ihrer Aktivitäten umfasste, wurden diese circa ein Jahr später abgefragt und wiesen entsprechende Lücken auf. Durch das Monitoring der mit Tabakrauch assoziierten Biomarker Cotinin und CYMA konnte jedoch eine passive Exposition gegenüber Rauch von Grillen, Lagerfeuer und/oder passivem Tabakrauch indikativ erfasst werden. Es konnten nicht mehr alle Probanden erfolgreich kontaktiert werden, sodass die Tabakrauch-Biomarker nur in 16 der 20 Probanden bestimmt werden durften.

Da die Probanden während der Humanstudie II auch ihre gewohnten Tagesabläufe verfolgten und im Gegensatz zu Humanstudie I während des Studienzeitraums nicht unter Aufsicht des Studienpersonals standen, besteht keine Sicherheit, dass alle Lebensmittel erfasst wurden und auch der gesamte Urin der Probanden gesammelt und abgegeben wurde. Lediglich ein Proband der Humanstudie II berichtete, dass er aus Versehen circa 100 ml Urin nicht in den dafür vorgesehenen Behälter abgegeben habe.

Dennoch lieferte diese zehntätigen Humanstudie II als Duplikatstudie neue Einblicke in die humane Acrylamid-Exposition. Durch das zwar kleine Probandenkollektiv, welches jedoch aus sich omnivor und vegan ernährenden Probanden bestand, konnte der Einfluss individueller Ernährungspräferenzen und Lebensgewohnheiten auf sowohl die Acrylamid-Aufnahme als auch die Expositionsbiomarker-Ausscheidung untersucht werden. Obwohl es zur Untersuchung eines möglichen endogenen Hintergrundlevels einer kontrollierten Studienumgebung wie in Humanstudie I bedarf, ergaben sich dennoch auch solche Hinweise bei einer Probandin der Humanstudie II, wodurch sich die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Humanstudie I auf unkontrollierte Bedingungen zeigt. Eine mögliche endogene Bildung sollte entsprechend neben exogenen Acrylamid-Quellen wie Tabakrauch bei der Kalkulation einer Acrylamid-Exposition anhand von Expositionsbiomarker-Daten berücksichtigt werden.

Mit Hilfe der Kombination des Monitorings von Lebensmitteln als auch Expositionsbiomarkern konnte somit ein umfassenderes Bild der Exposition mit Acrylamid als bei separater Betrachtung erstellt werden. Es zeigt jedoch auch, dass es sich bei den von der EFSA [2015] empfohlenen Duplikatstudien und Biomarker-Monitoring um eine komplexe Methodik handelt, deren Übertragung auf einen für die europäische Bevölkerung repräsentativen Maßstab nicht ohne weiteres möglich ist.

7. ZUSAMMENFASSUNG UND FAZIT

Acrylamid als hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminante besitzt eine Relevanz für die Risikobewertung von Lebensmitteln, da sowohl toxische Wirkungen als auch eine relevante Humanexposition vorliegen. So sind neben der Einstufung als möglicherweise kanzerogen beim Menschen (Gruppe 2A) durch die IARC [1994] ebenso neurotoxische und reproduktionstoxische Effekte beschrieben [NTP, 2012].

Hauptsächlich erfolgt die Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln bei Temperaturen >120 °C aus Aminosäuren wie Asparagin und reduzierenden Zuckern im Rahmen der Maillard-Reaktion [Mottram *et al.*, 2002]. Hierdurch zählen insbesondere stark erhitzte Kartoffelprodukte wie Kartoffelchips und Pommes frites, Getreideprodukte und Kaffee zu den am stärksten belasteten Gruppen kommerzieller Lebensmittel [EFSA, 2015]. Als Konsequenz hieraus ist seit 2017 die Verordnung (EU) 2017/2158 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln in Kraft, welche den rechtlichen Rahmen für gewerbliche Lebensmittelproduzenten regelt. Neben der Exposition durch Lebensmittel, welche durch die EFSA auf 0,4–1,9 µg/kg KG/d für Erwachsene geschätzt wurde, kann Acrylamid auch durch Tabakrauch aufgenommen werden. So finden sich im Hauptstrom einer Zigarette circa 1,1–2,3 µg Acrylamid [Smith *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit vorangegangenen Tier- und Humanstudien ergaben sich zudem Hinweise auf eine mögliche endogene Bildung von Acrylamid, welche auf ein Hintergrund-Level von 0,2–0,7 µg/kg KG/d schließen ließen [Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016].

Zur besseren Abschätzung der Acrylamid-Exposition wurden durch die EFSA [2015] zum einen Duplikat-Studien, zum anderen die Untersuchung von Biomarkern im Rahmen dieser Studien empfohlen. Durch Duplikat-Studien ist es möglich, die Acrylamid-Aufnahme exakt anhand der zubereiteten und verzehrten Lebensmittel abzuschätzen. Durch gleichzeitiges Monitoring der Expositionsbiomarker können zudem valide Daten generiert werden, um zukünftig anhand dieser auf eine Acrylamid-Exposition zurückschließen zu können.

Im Rahmen einer humanen Interventionsstudie an zwölf Probanden unter streng kontrollierten Bedingungen wurde die Ausscheidung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA als Kurzzeit-Expositionsbiomarker sowie das Level der Hämoglobin-Addukte AAVal und GAVal als Langzeit-Expositionsbiomarker nach niedriger alimentärer Acrylamid-Aufnahme durch Kaffee sowie hoher alimentärer Aufnahme durch hochehrhitzte Lebensmittel untersucht. Durch Einmalgabe von stabilisotopen-markierten ¹³C₃D₃-Acrylamids konnten zudem weitere, spezifische Informationen zur AAMA-Ausscheidungskinetik erhalten werden. Durch eine gleichzeitige *Washout*-Phase, in welcher nur sehr geringe Mengen Acrylamid aufgenommen wurden, konnten weitere Erkenntnisse zu einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung erhalten werden.

Die Studie umfasste 13 Studientage, von denen die Probanden nach Tag 5 in zwei Gruppen unterteilt wurden. Gruppe A erhielt eine Acrylamid-minimierte Diät (*Washout*) sowie an Tag 6 (*Kaffee*) zusätzlich hierzu vier Tassen eines Kaffee-Getränks und an einem zweiten Interventionstag (Tag 10) Mahlzeiten, aus denen eine hohe Acrylamid-Aufnahme resultierte (*high AA*). Gruppe B erhielt während des gesamten Studienzeitraums eine *Washout*-Diät und zusätzlich an Tag 6 eine orale Einmalgabe von 1 µg/kg KG $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid in Wasser.

Während der *Washout*-Phasen konsumierten die Probanden Lebensmittel, die keine quantifizierbaren Acrylamid-Gehalte aufwiesen, woraus sich eine maximale tägliche Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG für diese Studientage ergab. Durch den Konsum eines Kaffee-Getränkes (500 ml) mit einem Acrylamid-Gehalt von 15,9 µg/kg ergab sich eine leicht erhöhte Aufnahme von 0,15–0,17 µg/kg KG für Gruppe A. An Tag 10 ergab sich für dieselbe Gruppe eine sehr hohe Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG, welche sich insbesondere durch stark frittierte Pommes frites (2.127 bzw. 2.778 µg/kg) ergab, die beispielhaft für die Lebensmittelzubereitung war, wie sie möglicherweise punktuell in privaten Haushalten praktiziert wird.

Durch Bestimmung der Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Urin der Probanden konnte die Acrylamid-Aufnahme in das Verhältnis zur Biomarker-Exkretion gesetzt werden.

In Gruppe A zeigte sich zwar ein signifikanter Anstieg der Mercaptursäuren nach Kaffeekonsum, bei Betrachtung beider Gruppen wich der Effekt jedoch nicht vom Hintergrundbereich der AAMA-Ausscheidung während des *Washouts* ab. Nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme (*high AA*) wurden im Mittel 44 % der aufgenommenen Acrylamid-Menge innerhalb von 96 h als AAMA und 5 % als GAMA ausgeschieden. Im Vergleich dazu wurden in der Studie von Ruenz *et al.* [2016] circa 58 % des aufgenommenen Acrylamids innerhalb von 72 h als AAMA ausgeschieden. Dies scheint zwar ein bemerkenswerter Unterschied zu sein, jedoch legt die Kinetik der Mercaptursäuren nahe, dass die AAMA-Ausscheidung im Urin nach 96 h (Studienende) nach sehr hoher Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen war. Darüber hinaus lag die individuelle AAMA-Ausscheidung der Probanden der Gruppe A innerhalb von 96 h zwischen 38–51 % der alimentären Acrylamid-Aufnahme. Solche interindividuellen Schwankungen können auf Unterschiede im Metabolismus-Status und -Umsatz hinweisen, welche möglicherweise zum Teil auf Polymorphismen von Enzymen zurückzuführen sind, welche am Acrylamid-Metabolismus beteiligt sind [Neafsey *et al.*, 2009; Ginsberg *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009].

Trotz der hohen alimentären Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG an Tag 10 stimmte der AUC-Wert von AAMA (6,78 h × µmol) der Gruppe A im Verhältnis mit dem AUC-Wert von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA (0,41 h × µmol) nach oraler Verabreichung von 1 µg/kg KG der Gruppe B überein, was das Verhältnis der unterschiedlichen Acrylamid-Aufnahmemengen gut widerspiegelt. Dies gilt auch für GAMA mit einer AUC von (0,76 h × µmol), die etwa 11 % der AAMA-AUC entspricht. Hieraus lässt sich ableiten, dass auch bei sehr hohen Aufnahmemengen an Acrylamid keine Verschiebung der Biomarker-Ausscheidung zugunsten von GAMA als oxidativen Metaboliten

auftritt und somit die Mercaptursäuren auch bei sehr hohen Acrylamid-Aufnahmen verlässliche Biomarker einer Acrylamid-Exposition darstellen.

Interessanterweise zeigten auch die Hämoglobin-Addukte als Langzeit-Expositionsbiomarker einen durch die Acrylamid-Aufnahme von 14,1–15,9 µg/kg KG induzierten geringen, jedoch signifikanten Anstieg im Blut der Probanden. Im Gegensatz hierzu nahmen die Level während der *Washout*-Phasen kontinuierlich ab. Hierdurch zeigte sich, dass auch die Hämoglobin-Addukte-Level in einem relativ kurzen Zeitraum im Verhältnis zur durchschnittlichen Lebensdauer von 120 Tagen von Erythrozyten eine Acrylamid-Exposition aufzeigen können.

Durch den 13-tägigen Washout der Gruppe B (maximal 0,05–0,06 µg/kg KG/d) nahm die Mercaptursäure-Ausscheidung in den ersten Studientagen ab und ergab ab der zweiten Studiehälfte ein recht konstantes Hintergrundlevel. Am letzten Studientag betrug die AAMA-Ausscheidung der Gruppe B 136±102 nmol/d und die GAMA-Ausscheidung 29±17 nmol/d.

Nach oraler Aufnahme von 1 µg/kg KG stabilisotopen-markierten ¹³C₃D₃-Acrylamid schieden die Probanden der Gruppe B 41 % der aufgenommenen Dosis als die entsprechend stabilisotopen-markierte Mercaptursäure ¹³C₃D₃-AAMA aus. Die Kinetik zeigte ein t_{\max} von 11 h bei einem c_{\max} von 224 nmol/g ucr, welches in Übereinstimmung mit den Daten von Ruenz *et al.* [2016] ist. Die ¹³C₃D₃-AAMA Ausscheidung schnitt 30 h nach Aufnahme die Basislinie der AAMA-Ausscheidung und näherte sich anschließend der Bestimmungsgrenze. Dies spricht neben der guten Wasserlöslichkeit von Acrylamid gegen das Konzept einer anhaltenden Freisetzung aus Körperkompartimenten. Unterstützt wird dies zudem von der Michael-Reaktivität von Acrylamid, durch welche nukleophile Angriffe an die α,β-ungesättigte Bindung zu stabilen kovalenten Bindungen wie Thioether-Bindungen führt, welche als resistent gegen enzymatische Spaltungen oder Hydrolyse gelten.

Unter Annahme einer Ausscheidung von 30 % einer Acrylamid-Dosis als AAMA innerhalb von 24 h, wie es die Kinetik von ¹³C₃D₃-AAMA zeigte, und Berücksichtigung der maximalen Acrylamid-Ausscheidung von 0,05–0,06 µg/kg KG/d ließen sich AAMA-Ausscheidung von Tag 13 der Gruppe B bzw. von Tag 9 der Gruppe A indikativ in ein Acrylamid-Hintergrundlevel umrechnen, welches nicht mit einer exogenen Exposition zusammenhängt. Auf dieser Basis ergab sich ein Netto-Acrylamid-Hintergrundlevel von 0,2 µg/kg KG (Tag 9, Gruppe A) bzw. 0,3–0,4 µg/kg KG (Tag 13, Gruppe B), welches in Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen ist, die ein Acrylamid-Hintergrundlevel von 0,3–,4 µg/kg KG (Mensch) bzw. 0,6–0,7 µg/kg KG (Ratte) bestimmten [Ruenz *et al.*, 2016; Watzek *et al.*, 2013]. Eine mögliche Erklärung für diesen anhaltenden Hintergrund könnten endogene chemische Reaktionen vom Maillard-Typ sein, durch welche auch im lebenden Organismus kontinuierliche Reaktionen zwischen Carbonylen und Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen ablaufen, welche ebenso im Zusammenhang mit der AGE-Bildung im menschlichen Körper stehen [Vistoli *et al.*, 2013].

Zur weiteren Abklärung einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung wurden einfach Modell-Reaktionen unter physiologischen Bedingungen (37 °C, phosphatgepufferte Salzlösung mit pH 7,4) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl ein äquimolares Gemisch aus L-Asparagin und

D-Ribose als auch aus L-Asparagin und Methylglyoxal zu quantifizierbaren Mengen Acrylamid führten. Sowohl Methylglyoxal als unerwünschtes Beiprodukt der Glykolyse [Allaman *et al.*, 2015] als auch D-Ribose, welche in Form von Ribose-5-phosphat ein Grundbaustein der Ribonukleinsäuren oder auch Adenosinphosphate darstellt, kommen als Reaktionspartner zur Aminosäure L-Asparagin ubiquitär im Organismus vor. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen legen nahe, dass die Reaktionspartner prinzipiell zur Bildung von Acrylamid *in vivo* führen können. Auch Tareke *et al.* [2009; 2008] führten bereits Versuche zu einer endogenen Acrylamid-Bildung durch, welche einen Einfluss von oxidativem Stress auf das endogene Acrylamid-Level nahelegten.

Um neben einem möglichen endogenen Beitrag zur Ausscheidung der Biomarker AAMA und GAMA auch weitere exogene Einflussfaktoren wie Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil näher zu beleuchten, wurde eine weitere Duplikat-Studie durchgeführt.

An der Humanstudie nahmen jeweils 10 Gemischtköstler und Veganer teil, welche im 10-tägigen Studienzeitraum ihre Ernährungspräferenzen und Lebensgewohnheiten beibehielten. Die Erfassung der alimentären Acrylamid-Aufnahme erfolgte anhand der Analyse der im Studienzeitraum konsumierten Lebensmittel, von denen die Probanden eigenständig Duplikate erstellten. Gleichzeitig wurde der Urin der Probanden hinsichtlich der Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren AAMA und GAMA sowie in einer Subgruppe (n=16) zusätzlich auf die Tabakrauch-Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA untersucht.

Die mittlere Acrylamid-Aufnahme während der Studie betrug $0,32 \pm 0,19 \mu\text{g/kg KG/d}$, es zeigten sich jedoch deutliche Variabilitäten zwischen den Tagen und den Probanden. Obwohl nicht signifikant, nahmen Veganer mehr Acrylamid auf ($0,38 \pm 0,23 \mu\text{g/kg KG/d}$) als Gemischtköstler ($0,26 \pm 0,10 \mu\text{g/kg KG/d}$) sowie weibliche Probanden mit $0,35 \pm 0,20 \mu\text{g/kg KG}$ mehr als männliche Probanden mit $0,29 \pm 0,18 \mu\text{g/kg KG}$. Die ermittelten Acrylamid-Aufnahmemengen lagen somit leicht unter dem unteren Bereich der mittleren Exposition in Europa von $0,4\text{--}0,9 \mu\text{g/kg KG}$. Die erfassten Maxima der Acrylamid-Aufnahme lagen bei $1,58 \mu\text{g/kg KG}$ (Gemischtköstler) bzw. bei $2,51 \mu\text{g/kg KG}$ (Veganer) und demnach im bzw. über dem 95. Perzentil Erwachsener in Europa, das zwischen $0,6\text{--}2,0 \mu\text{g/kg KG}$ lag [EFSA, 2015].

Der Verzehr von hochoverhitzten Kartoffelprodukten wie Pommes frites mit im Mittel $119 \mu\text{g/kg}$ Acrylamid und Chips und Snacks ($147 \mu\text{g/kg}$) führten bei allen Probanden zu einer erhöhten Acrylamid-Aufnahme sowie einer erhöhten renalen Ausscheidung von AAMA. Auch der tägliche Verzehr von hitzebehandelten Mahlzeiten mit Fleisch- oder Fleischsurrogaten sowie von Brot- und Backwaren trug wesentlich zur Gesamtaufnahme von Acrylamid bei. Im Vergleich hierzu trug der Konsum von Kaffee-Getränken mit im Mittel $8 \mu\text{g/kg}$ Acrylamid nur geringfügig zur alimentären Acrylamid-Exposition bei. Im Allgemeinen trugen zur Acrylamid-Aufnahme der sich vegan ernährenden Probanden insbesondere Pfannengerichte mit gebratenem Gemüse und Fleischsurrogaten wie Tofu oder Seitan sowie Brotwaren bei, während bei sich omnivor ernährenden Probanden fleischhaltige Mahlzeiten wie Burger, Aufläufe und Backwaren einen

größeren Anteil an der alimentären Acrylamid-Exposition innehatten. Probanden mit regelmäßigem Verzehr von rohem Obst und Gemüse wie Salat wiesen hingegen eine niedrigere Acrylamid-Aufnahme auf. Diese Ernährungspräferenz ließ sich jedoch nicht einem Probandenkollektiv zuordnen, sondern trat in beiden Gruppen auf.

Im zehntägigen Studienzeitraum betrug die mittlere AAMA-Ausscheidung 312 nmol/d für alle Probanden, die Ausscheidung von GAMA lag als Nebenmetabolit mit durchschnittlich 45 nmol/d unter den Werten von AAMA. Gleichsinnig zu der höheren absoluten Acrylamid-Aufnahme der männlichen Probanden bzw. Veganer schieden diese auch höhere Level der Mercaptursäuren als weibliche Probanden bzw. Gemischtköstler aus.

Um ein umfassendes Bild der Herkunft der individuellen Acrylamid-Aufnahme sowie der Biomarker-Antwort zu erhalten, erfolgte eine Betrachtung der einzelnen Probanden. Hierbei wurden auch die Tabakrauch-Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA betrachtet, um eine punktuell aufgetretene überproportionale Ausscheidung von AAMA und GAMA im Vergleich zur alimentären Acrylamid-Aufnahme evaluieren zu können.

Im Vergleich der beiden Tabakrauch-Expositionsbiomarker zeigte sich Cotinin als wesentlich sensitiver als CYMA auf eine (ungewollte) Tabakrauch-Exposition. So lagen die gemessenen Cotinin-Level in einem Bereich von nicht detektierbar bis 1.283 nmol/d, die CYMA-Level lagen in einem Bereich von 0,2–71,2 nmol/d. In der Einzelbetrachtung zeigte sich jedoch, dass beide Biomarker auf eine Noxe gleichsinnig reagierten und somit auch CYMA prinzipiell geeignet ist, als Expositionsbiomarker für Tabakrauch zu fungieren. Durch das zusätzliche Monitoring der Tabakrauch-Expositionsbiomarker war es möglich, eine punktuell aufgetretene überproportionale AAMA- und GAMA-Ausscheidung im Verhältnis zur Acrylamid-Aufnahme über Lebensmittel auf eine Exposition mit Tabakrauch zurückführen zu können. Insbesondere ein weiblicher Proband schied über den gesamten Studienzeitraum wesentlich mehr AAMA und GAMA aus als die alimentäre Acrylamid-Aufnahme anhand der Duplikate vermuten ließ. Anhand der Cotinin-Level lies sich dies jedoch auf eine starke Passivrauch-Belastung der Probandin zurückführen. Hierdurch wird deutlich, dass in Studien, bei denen die Erfassung der alimentären Acrylamid-Aufnahme anhand der Biomarker erfolgen soll, das Mitführen weiterer Expositionsbiomarker für ein umfassendes Bild zwingend notwendig ist. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei einem weiteren weiblichen Probanden, dass auch nach sechs Tagen ohne quantifizierbare Acrylamid-Aufnahme durch die Ernährung und ohne nachweisbare Tabakrauch-Exposition die Ausscheidung an AAMA und GAMA auch unter nicht kontrollierten Bedingungen ein konstantes Hintergrundlevel von 46 nmol/d für AAMA bzw. 16 nmol/d für GAMA annahm, welches ebenfalls als Indiz für eine endogene Acrylamid-Bildung gesehen werden kann.

Zusammengenommen unterstreichen die hier präsentierten Ergebnisse, dass neben einer Acrylamid-Aufnahme durch die Ernährung auch andere exogene Faktoren wie Tabakrauch und möglicherweise endogen gebildetes Acrylamid einen erheblichen Einfluss auf die Expositionsbiomarker AAMA und GAMA haben können. Die alimentäre Acrylamid-Exposition hängt dabei stark von individuellen Ernährungspräferenzen und des jeweiligen Lebensstils ab.

8. GERÄTE, CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

8.1. Geräte

Druckluft-Kompressor

SF4 9,8-FF

Atlas Copco Kompressoren und Drucklufttechnik GmbH, Essen, DE

Kühl-/Gefrierschränke

Liebherr Comfort/Premium (-21 °C)

Liebherr-International AG, Bulle, CH

Liebherr Comfort/Premium (4 °C)

Liebherr-International AG, Bulle, CH

Magnetrührer

MR 3001 K

Heidolph, Schwabach, DE

MR Mini

Heidolph, Schwabach, DE

MR 82

Heidolph, Schwabach, DE

Massenspektrometer

QTRAP® 5500

AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, DE

Vorvakuumpumpe Varian MS 40+

Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Plattenphotometer

Synergy 2

BioTek Instruments Inc., Winooski, USA

pH-Meter

pH 522

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, DE

Pipetten

Research

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Research plus

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Platten-Schüttler

3015

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE

SPE-Kammer

CHROMABOND® Vacuum Manifold

Macherey Nagel, Düren, DE

Stickstoffgenerator

NGM 22

cmc Instruments GmbH, Eschborn, DE

Thermomixer

Thermomixer comfort

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Trockenschrank

APT. Line BD

Binder GmbH, Tuttlingen, DE

UHPLC-System

Infinity Series 1290

Agilent Technologies, Santa Clara, USA

1290 BinPump G4220A

1290 Thermostat G1330B

1290 Sampler G4226A

1290 TCC G1316C

Vakuumpumpen

SP 402 SA-V

Schwarzer Precision GmbH + Co. KG, Essen, DE

CVC 3000

Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim, DE

Vakuumentrifuge

Concentrator Plus

Eppendorf AG, Hamburg, DE

Vortexmischer

Vortex Genius 3
REAX D R

IKA Werke GmbH + Co. KG, Staufen, DE
Heidolph, Schwabach, DE

Waagen

XP6V Excellence Plus
CP224 S
1507

Mettler Toledo LLC., Columbus, USA
Sartorius, Göttingen, DE
Sartorius, Göttingen, DE

Zentrifugen

Micro Star 17
Centrifuge 5804 R
Rotina 35

VWR International LLC, Radnor, USA
Eppendorf AG, Hamburg, DE
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE

8.2. Chemikalien

Acetonitril

HiPerSolv CHROMANORM, HPLC-MS
Promochem, LC-MS

VWR International LLC, Radnor, USA
LGC Standards, Wesel, DE

Acrylamid

Acrylamid (p. A.)
D₃-Acrylamid
¹³C₃D₃-Acrylamid

Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Toronto Research Canada, Toronto, CA
Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Luis, USA
Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Luis, USA

Ameisensäure (p. A.)**Ammoniumformiat (97 %)****Asparagin (>98 %, HPLC)****(D)-Glucose (wasserfrei)****Dinatriumhydrogenphosphat (p. A.)****DL-Methionin (99+ %)****(D)-Ribose****Essigsäure (ULC/MS)****Ethylacetat****Formamid (p. A.)****Hämoglobin-Addukte****AAValPFPTH**

1-(2-carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin

Synthese von [Berger *et al.*, 2011]

D₇-AAValPFPTH

1-(2-carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-d₇-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin

Synthese von [Berger *et al.*, 2011]

GAValPFPTH

1-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin

Synthese von [Berger *et al.*, 2011]

D₇-GAValPFPTH

1-(R,S)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-d₇-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin

Synthese von [Berger *et al.*, 2011]

Harnstoff (z. A., 99,5 %)**Isopropanol (p. A.)****Kaliumdihydrogenphosphat**

Fisher Chemicals, Loughborough, GB

Fisher Chemicals, Loughborough, GB

Merck KGaA, Darmstadt, DE

Kreatinin-Assay-Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Kreatinin-Standard-Lösung (20 mg/dl)	
Farbreagenz	
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	
Säure-Lösung	
Natriumborat-Lösung	
Tensid-Lösung	
L-Glutaminsäure (>99 %)	Alfa Aesar, Heysham, GB
Mercaptursäuren	
AAMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein	
D₃-AAMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein	
CEMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein	
Bis(dicyclohexylamin)-Salz	
D₃-CEMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein	
Bis(dicyclohexylamin)-Salz	
CYMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)-L-cystein	
D₃-CYMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)-L-cystein	
GAMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein Dicyclohexylammonium-Salz	
D₃-GAMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein	
HPMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)-L-cystein Dicyclohexylammonium-Salz	
D₃-HPMA	Toronto Research Canada, Toronto, CA
<i>N</i> -(Acetyl-d ₃)- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)-L-cystein Dicyclohexylammonium-Salz	
Methanol	
HiPerSolv CHROMANORM, HPLC-MS	VWR International LLC, Radnor, USA
HiPerSolv CHROMANORM, UHPLC	VWR International LLC, Radnor, USA
Promochem, HPLC	LCG Standards, Wesel, DE
Promochem, LC-MS	LCG Standards, Wesel, DE
Methylglyoxal (40 % wt)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogenphosphat · 7 H₂O	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumpyruvat (≥99 %)	Sigma Aldrich Co. LLC, St. Luis, USA
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>n</i>-Hexan	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Pentafluorphenylisothiocyanat (≥97 %, GC)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Phosphoenolpyruvat Kaliumsalz (99 %)	Alfa Aesar, Heysham, GB

rac-Cotinin (±)-1-(Methyl)-5-(2-pyridinyl)-2-pyrrolidinon	Toronto Research Canada, Toronto, CA
rac-D₃-Cotinin (±)-1-(Methyl-d ₃)-5-(2-pyridinyl)-2-pyrrolidinon	Toronto Research Canada, Toronto, CA
Salzsäure	Bernd Kraft, Duisburg, DE
Standard Chemical Kit	AB Sciex Pte Ltd, Framingham, USA
with Low/High Concentration PPGs	
POS PPG 2E-7 M	
NEG PPG 3E-5 M	
ES Tuning Mix	
ES Tuning Dilution Solvent	
Wasserstoffperoxid (30 %)	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE

8.3. Verbrauchsmaterialien

96-Well-Microplatten	Greiner BIO ONE, Frickenhausen, DE
Diaphragma (Laboratory Film Parafilm® "M")	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
HPLC-Vial-Mikroeinsätze (0,1 ml, 31x6 mm, Klarglas)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, DE
HPLC-Vials (32x11,6 mm, Braunglas)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, DE
HPLC-Vial-Schraubkappen	
PP, 9 mm, 6 mm Loch	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, DE
PP, 9 mm, ohne Loch	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, DE
Magnetrührstäbchen (20x6 mm, zylindrisch)	VWR International, Radnor, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner BIO ONE, Frickenhausen, DE
Polypropylen-Gefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner BIO ONE, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	
10 µl, 200 µl, 1.000 µl	Greiner BIO ONE, Frickenhausen, DE
5.000 µl	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Restriktionskapillare (Tub PEEK Yel 1/16x.007x5 m)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SPE-Kartuschen	
Isolute® ENV+, 500 mg, 6 ml	Biotage AB, Uppsala, SE
Isolute® ENV+, 100 mg, 10 ml XL	Biotage AB, Uppsala, SE
Spritze (1 ml Gastight® #1001)	Hamilton Co., Reno, USA
(U)HPLC-Säulen	
Kinetex PFP (100x2,1 mm, 100 Å, 2,6 µm)	Phenomenex, Torrance, USA
Luna C8(2) (150x4,6 mm, 3 µm)	Phenomenex, Torrance, USA
Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 µm)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
(U)HPLC-Vorsäulen	
Kinetex PFP (2x2,1 mm)	Phenomenex, Torrance, USA
Luna C8(2) (4x3 mm)	Phenomenex, Torrance, USA
Zorbax Eclipse XDB-C18 (5x4,6 mm, 1,8 µm)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

9. METHODEN

Im folgenden Kapitel sind alle finalen Methoden beschrieben, welche für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse verwendet wurden. Zudem wird näher auf die Entwicklung und Validierung dieser Analysenmethoden eingegangen. Alle (U)HPLC-ESI-MS/MS-Messungen wurden mit einem 1290 Infinity Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) UHPLC-System gekoppelt an eine QTRAP® 5500 (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, DE) MS durchgeführt.

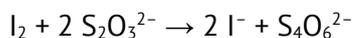
9.1. Bestimmung der (gesamt-) reduzierenden Zucker

Die reduktometrische Bestimmung der reduzierenden Zucker vor Inversion und der gesamt-reduzierenden Zucker nach Inversion erfolgte nach der Methode von Luff-Schoorl [Matissek *et al.*, 2018]. Diese wurden in den beiden Duplikaten der Pommes frites (mittags, abends) sowie der zur Herstellung verwendeten rohen Kartoffel der Humanstudie I bestimmt.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Reduktion der in der Probe in einem definierten Überschuss vorliegenden Cu^{2+} -Ionen durch reduzierende Zucker zu Cu_2O . Der Überschuss an Cu^{2+} -Ionen wurde iodometrisch bestimmt. Hierbei ergibt sich folgende Reaktion:



Das dabei entstandene elementare Iod wurde mittels Thiosulfat-Lösung titrimetrisch bestimmt:



Zur Ermittlung des gesamt-reduzierenden Zuckers wurde die in der Probelösung vorliegende nicht-reduzierende Saccharose gemäß der deutschen Zollvorschrift mit Salzsäure in die Monosaccharide Glucose und Fructose invertiert und ebenfalls wie oben beschrieben bestimmt. Aus der Differenz der Werte nach der Inversion zu vor der Inversion ergab sich der Gehalt an Saccharose.

9.2. Ermitteln von substanz- und gerätespezifischen MS-Parametern

Um eine sensitive massenspektrometrische Detektion von Molekül-Ionen zu erreichen, mussten für jeden Analyten sowohl substanz- als auch gerätespezifische MS-Parameter optimiert werden. Zu den substanzspezifischen Parametern gehören verschiedene Potentiale, die entlang des Ionengangs des Triple-Quadrupols der QTRAP® 5500 angelegt werden, welche eine optimale Weiterleitung der gewünschten Analyt-Ionen zum Detektor ermöglichen. Die substanzspezifischen MS-Parameter ließen sich automatisch mit den *Tuning Tool „Compound Optimization“* der installierten MS-Software Analyst 1.6.1 (AB Sciex, Ontario, CAN) optimieren.

Hierfür wurden die einzeln in Fließmittel gelösten Analyten (5–50 ng/ml) mittels der geräteeigenen Spritzeninfusionspumpe kontinuierlich mit einer konstanten Flussrate von 10 µl/min in die MS appliziert. Dies ermöglichte bei einer gleichzeitigen Variation der verschiedenen Parameter, deren Optima zu bestimmen.

Um die MRM-Methoden zu optimieren, wurde zunächst jeweils anhand eines *Full Scans* die exakte Q1-Masse ermittelt, um anschließend das entsprechende *declustering potential* (DP) zu optimieren. Das DP diente hierbei dem Entfernen von (Lösungsmittel-) Clustern, welche die Ionisierung des Analyten vermindern. Mithilfe eines darauffolgenden Produkt-Ionen-Scans (MS²) wurden anschließend mögliche Fragment-Ionen ermittelt. Dabei wird die *collision energy* (CE) variiert, da die Bildung der Fragmente abhängig von der auf sie einwirkenden Energie ist. Geringe CE-Werte führen entsprechend zu großen, geladenen Fragmenten und kleinen, nicht detektierbaren Neutralteilchen, während große CE-Werte zu kleinen Molekül-Ionen führen. Je nach Anzahl der gewünschten MRM-Übergänge wurden die CE- und die *cell exit potential* (CXP-) Werte nochmals für jede Fragmentierung optimiert. Letzteres dient der Beschleunigung der geladenen Fragmente aus dem dritten Quadrupol zum Detektor. Anschließend erstellte das *Tuning Tool* automatisch eine MRM-Methode, bei der anschließend die gerätespezifischen MS-Parameter optimiert werden konnten.

Die Ermittlung der gerätespezifischen Parameter erfolgte ebenso über das *Tuning Tool* „*Compound Optimization*“. Hierbei wurde allerdings als Einstellung die *Flow Injection Analysis* (FIA) gewählt, bei der die gelösten Analyten (s. o.) mittels (U)HPLC-Anlage in die MS injiziert wurden. Die Fließmittelzusammensetzung und Flussrate sollten hierbei denen der Elutionszeit der Analyten der HPLC-Methode entsprechen. Statt einer (U)HPLC-Säule wurde jedoch eine Restriktionskapillare (Tub PEEK Yel 1/16x.007x5m) verwendet, welche ohne chromatographische Trennung für eine Erhöhung des Gegendrucks sorgte. Anschließend wurden alle gerätespezifischen Parameter ausgehend von einer selbstgewählten Voreinstellung und in einem selbstgewählten Bereich nacheinander dreifach vermessen. Zunächst wurde das optimale *curtain gas* (CUR) ermittelt, welches am Eingang des Ionenkanals nicht in der Gasphase vorliegende Moleküle etc. entfernt. Als ESI-Quellenparameter wurden die an der Nadel angelegte Spannung (IS) die Temperatur (TEM), das Verneblungsgas (Gas 1) sowie das Heizergas (Gas 2) optimiert. Das *collisionally activated dissociation gas* (CAD), welches in der Stoßzelle (Q2) die Fragmentierung unterstützt, wurde im MRM-Modus standardmäßig auf *medium* gesetzt und nicht optimiert. Anhand aller Messungen ermittelt das *Tuning Tool* die gemittelten optimalen Parameter für alle MRM-Spuren, sodass in Bezug auf die beste Sensitivität einer MRM-Spur die gerätespezifischen MS-Parameter manuell angepasst werden sollten.

Nachdem alle MS-Parameter und eine chromatographische Methode vorlagen, musste zuletzt die *dwell time* an die Peakbreite der Analyten angepasst werden. Diese und somit die Zykluszeit mussten so angepasst werden, dass auf dem schmalsten Analyt-Peak >10 Datenpunkte lagen, um eine reproduzierbare Quantifizierung zu ermöglichen. Im *scheduled*-MRM-Modus wurde die *dwell time* automatisch durch die angegebene Retentionszeit, das Messfenster und die Anzahl an Spuren

festgelegt. Im *shuttled*-MRM-Modus konnten alle Parameter für jede Periode einzeln festgelegt werden. Zudem musste hierbei der Zeitpunkt des Periodenwechsels eingestellt werden.

9.3. Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln

Die Bestimmung der Acrylamid-Gehalte in Lebensmitteln erfolgte mittels SIVA nach einer bereits im Arbeitskreis etablierten Methode [Ruenz *et al.*, 2016] mit einigen Modifikationen. Die Quantifizierung der Acrylamid-Gehalte der Lebensmittel der Humanstudie I erfolgte mindestens als Dreifachbestimmung, die der Humanstudie II mindestens als Doppelbestimmung.

Probenaufarbeitung und Festphasenextraktion. Je nach zu erwartetem Acrylamid-Gehalt und Matrix wurden 1–10 g bei Lebensmitteln und bis zu 30 g bei Getränken der homogenisierten und aufgetauten Probe eingewogen. Anschließend wurden die Proben auf ein Volumen von 30 ml mit bidestilliertem (dd) Wasser aufgefüllt und mit D₃-Acrylamid als internen Standard versetzt. Zu Lebensmitteln der Humanstudie I, bei denen hohe Acrylamid-Gehalte erwartet wurden, wurden 500 ng des internen Standards hinzugesetzt, zu allen anderen Lebensmitteln der Humanstudie I und II jeweils 250 ng. Nach Extraktion (1 h, RT) wurden die Proben zentrifugiert (3000 g, 30 min) und 10 ml des Überstandes zur Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Für die Acrylamid-Bestimmung in Lebensmitteln wurden Isolute® ENV+ Kartuschen (500 mg; 6 ml) von Biotage (Uppsala, SE) verwendet, welche zuerst mit 4 ml Methanol konditioniert sowie mit 8 ml Wasser_{dd} equilibriert wurden. Nach Aufgabe des Überstandes, wurden die Kartuschen mit 4 ml Wasser_{dd} gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 ml Methanol/Wasser (60/40, v/v), wobei die Kartuschen zuletzt mittels Vakuums für 5 min getrocknet wurden. Anschließend wurden die SPE-Eluats auf circa 1 ml mittels Vakuumzentrifugation eingengt und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 30 min).

Messung mittels HPLC-ESI-MS/MS. Ein Aliquot (1 µl) des aufkonzentrierten SPE-Eluats wurde zur Messung mittels HPLC-ESI-MS/MS eingesetzt. Für die chromatographische Separation der Proben wurde eine *reversed phase*- (RP-) HPLC-Säule (Phenomenex Luna C8 (2), 150 x 4,6 mm, 3 µm) mit entsprechender Vorsäule verwendet. Die Gradientenelution (siehe Tabelle 9-1) wurde mit 0,05%iger wässriger Essigsäure (Fließmittel A) und Methanol (Fließmittel B) durchgeführt.

Tabelle 9-1 Schritte der Gradientenelution zur HPLC-Methode der Acrylamid-Analytik.

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	500	99	1
1	500	99	1
12	500	95	5
13	500	10	90
18	500	10	90
19	500	99	1
24	500	99	1

Fließmittel A 0,05%ige wässrige Essigsäure; Fließmittel B Methanol.

Die Detektion erfolgte nach positiver Ionisierung im MRM-Modus mit den in Tabelle 9-2 ersichtlichen Parametern. Die Peak-Integration erfolgte mithilfe der Software MultiQuant™ 2.1 (Sciex, Ontario, CAN).

Tabelle 9-2 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter zur Detektion von Acrylamid und D₃-Acrylamid.

Substanzspezifische Parameter							
Analyt	Q1	Q3	dw	DP	EP	CE	CXP
Acrylamid	72,009	55,067	100	36	10	16	15
D ₃ -Acrylamid	74,998	58,060	100	36	10	15	7
Gerätespezifische Parameter							
CUR	CAD	IS	TEM	Gas 1	Gas 2		
40	Medium	4.500	550	70	40		

Q1 Quadrupol 1 [*m/z*]; Q3 Quadrupol 3 [*m/z*]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; CE *collision energy* [V]; CXP *cell exit potential* [V]; dw *dwell time* [msec]; CUR *curtain gas* N₂ [psi]; CAD *collisionally activated dissociation gas* N₂ [psi]; IS *ionspray voltage* [V]; TEM Temperatur [°C]; Gas 1 Verneblungsgas N₂ [psi]; Gas 2 Heizergas N₂ [psi].

9.4. Bestimmung des Uringewichts und -volumina

Das erhaltene Uringewicht der einzelnen Sammelzeiträume der Humanstudien ergab sich durch Wiegen der Urinsammelbehältnisse abzüglich des zuvor ermittelten mittleren Leergewichtes aus der Messung von jeweils zehn Behältern. Unter der Annahme einer Dichte von 1 g/ml wurden die bestimmten Uringewichte in die entsprechenden Volumina umgewandelt.

9.5. Bestimmung von Kreatinin im Urin

Die photometrische Bestimmung von Kreatinin (ucr) als renale Bezugsgröße in den Urinproben wurde mindestens als Doppelbestimmung mithilfe eines Kreatinin-Assay-Kits der Firma Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Die Urinproben wurden je nach zu erwartetem ucr-Gehalt 1:2 bis 1:60 mit Wasser_{dd} verdünnt. Ausgehend von einer ucr-Stammlösung (20 mg/dl) wurden pro 96-Well-Platte zwei Acht-Punkt-Standardreihen von 0–15 mg/dl hergestellt. Als alkalische Pikrat-Lösung diente eine Mischung aus 2 ml Natriumborat-Lösung, 6 ml Tensid-Lösung, 10 ml Farbreagenz und 3,6 ml NaOH-Lösung (1 M). In jedes Well einer 96-Well-Platte wurden jeweils 15 µl verdünnte Urinprobe bzw. Kreatinin-Standard-Lösung pipettiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 150 µl alkalischer Pikratlösung gestartet und mit Abdeckfolie auf einem Plattenschüttler abgedunkelt inkubiert (10 min, RT). Danach wurde die Absorption der 96-Well-Platte ohne Abdeckfolie bei 500 nm gemessen, der Farbkomplex durch Zugabe von 5 µl Säure-Lösung zerstört und die 96-Well-Platte erneut auf einem Plattenschüttler inkubiert (20 min, RT). Eine zweite Messung der Absorption ohne Abdeckfolie erfolgte im Anschluss bei 500 nm. Zur Auswertung wurde die

korrigierte Absorbanz herangezogen, welche sich aus der Subtraktion der Werte der zweiten Messung von denen der ersten Messung ergaben. Zudem wurden diese Werte um den gemessenen Wert des Kreatinin-Standards 0 mg/dl (Blindwert) korrigiert. Die Bestimmung des Kreatinin-Gehaltes ergab sich über die externe Kalibrierung (0–15 mg/dl).

9.6. Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine UHPLC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt und validiert, um die Acrylamid-Mercaptursäuren GAMA und AAMA bzw. $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA sowie die Acrolein-Mercaptursäuren HPMA und CEMA quantifizieren zu können. Dabei wurden an dieser Stelle jedoch lediglich AAMA, GAMA und $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA betrachtet. Die Ergebnisse der Mercaptursäuren HPMA und CEMA finden sich in der Publikation von Ruenz *et al.* [2019].

9.6.1. Etablierung und Validierung der UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren

Chromatographie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bereits für das gleiche HPLC-MS/MS-System bestehende Methode von Ruenz *et al.* [2016] auf eine UHPLC-Säule übertragen, um die Sensitivität bei gleichzeitiger Verkürzung der Analysenzeit zu erhöhen. Zum Ermitteln der besten chromatographischen Trennung wurden ausgehend von der ursprünglichen Methode jeweils mehrere Gradienten mit zwei UHPLC-Säulen, eine Kinetex C8 (100x2,1 mm, 2,6 μm) von Phenomenex (Torrance, USA) und eine Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μm) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA), getestet. Da die beste chromatographische Trennung auf letzterer erreicht wurden, wurde mit der Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μm) weiter verfahren. Als Fließmittel blieben 0,1 % wässrige Essigsäure und Acetonitril bestehen, welche zur Gradientenelution eingesetzt wurden. Des Weiteren wurden zur Optimierung der Chromatographie die Flussrate (600–650 $\mu\text{l}/\text{min}$), die Temperatur des HPLC-Säulenofens (20–30 $^\circ\text{C}$) und das Injektionsvolumen (1–10 μl) variiert.

Probenaufarbeitung. Neben der Entwicklung der UHPLC-Methode wurde auch die bereits im Arbeitskreis etablierte Probenaufarbeitung mittels SPE [Watzek *et al.*, 2012b; Ruenz *et al.*, 2016] angepasst. Hierfür wurde das eingesetzte Proben- und Puffervolumen auf 1 ml bzw. 3 ml reduziert sowie die Mengen der internen Standards auf 100 ng D_3 -AAMA, 25 ng D_3 -GAMA, 200 ng D_3 -HPMA und 50 ng D_3 -CEMA festgesetzt. Zudem wurde eine geeignete Verdünnung der SPE-Eluatete getestet. Die Wiederfindung wurde als Dreifachbestimmung mit 1 ml Standard-Lösungen in der *Washout*-Urinprobe P2-Tag 13 (0–12 h) mit vier unterschiedlichen Konzentrationen (mittlere ermittelte Konzentration, mittlere ermittelte Konzentration $\pm 30\%$, hohe Konzentration) jedes Analyten bestimmt [Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., 2004]. Die verwendeten

Standard-Ansätze mit den Konzentrationen der jeweiligen Analyten sind in Tabelle 9-3 gelistet. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der in Kapitel 9.6.2 beschriebenen SPE-Methode.

Tabelle 9-3 Eingesetzte Standard-Konzentrationen, welcher zu der Urinprobe P2-Tag 13(0–12 h) aufdotiert wurden, zur Bestimmung der Wiederfindung von AAMA, GAMA, HPMA und CEMA.

Ansatz	AAMA [ng/ml]	GAMA [ng/ml]	HPMA [ng/ml]	CEMA [ng/ml]
1	210	21	210	91
2	300	30	300	130
3	390	39	390	169
4	800	80	800	250

AAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein; CEMA *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA *N*-Acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein; HPMA *N*-Acetyl-*S*-(3-hydroxypropyl)-L-cystein.

MS-Detektion. Anstelle der zuvor von Ruenz *et al.* [2016] verwendeten D₃-Mercaptursäuren, die zuvor im Arbeitskreis Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand ausgehend von D₃-Acrylamid bzw. D₃-Glycidamid synthetisiert wurden, wurden für die Urinproben der Humanstudien als interne Standards am *N*-Acetyl-Rest D₃-markierte Mercaptursäuren verwendet. Entsprechend mussten für diese gemäß Kapitel 9.2 die substanzspezifischen MS-Parameter optimiert werden. Hierfür wurden von jedem Analyten einzeln (außer ¹³C₃D₃-AAMA) Lösungen mit einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet. Die entsprechenden MS-Spektren der internen Standards sind in Abbildung 9-2 und Abbildung 9-4 dargestellt, die *enhanced-product-ion*- (EPI-) Spektren der Analyten in Abbildung 9-1 und Abbildung 9-3.

Da für ¹³C₃D₃-AAMA kein entsprechender Standard vorlag, wurden die substanzspezifischen MS-Parameter mithilfe einzeln programmierter HPLC-ESI-MS- bzw. HPLC-ESI-MS/MS-Läufe manuell auf Grundlage der bekannten Parameter für AAMA bzw. D₃-AAMA optimiert. Als Probe diente eine mittels SPE-aufgereinigte Urinprobe des Probanden P12 des Sammelzeitraumes Tag 6(2). Als zugrundeliegende HPLC-Methode diente für die Quantifier-Spur die von Ruenz *et al.* [2016] entwickelte Methode, für die Qualifier-Spur die in Kapitel 9.6.2 beschriebene UHPLC-Methode. Die exakte Q1-Masse, basierend auf einer monoisotopischen Massen von 240,0963 Da, und daraufhin das entsprechende DP wurden anhand von Q1-*multiple-ions*-Scans optimiert. Durch MS²-Messungen wurden die Optima und die dazugehörigen CE-Werte der Fragmente (Q3-Massen) bestimmt. Das CXP wurde als letztes durch MRM-Methoden festgelegt. Das daraus resultierende MS²-Spektrum ist in Abbildung 9-5 dargestellt.

Da die Messungen der Mercaptursäuren im *scheduled*-MRM-Modus durchgeführt wurden, wurden anstelle der *dwell time* die zu erwarteten Retentionszeiten in der Methode hinterlegt. Anhand der Peakbreiten und einer minimalen Anzahl von 15 Messpunkten pro Peak wurden zudem das MRM *detection window* und die *Target Scan Time* festgelegt.

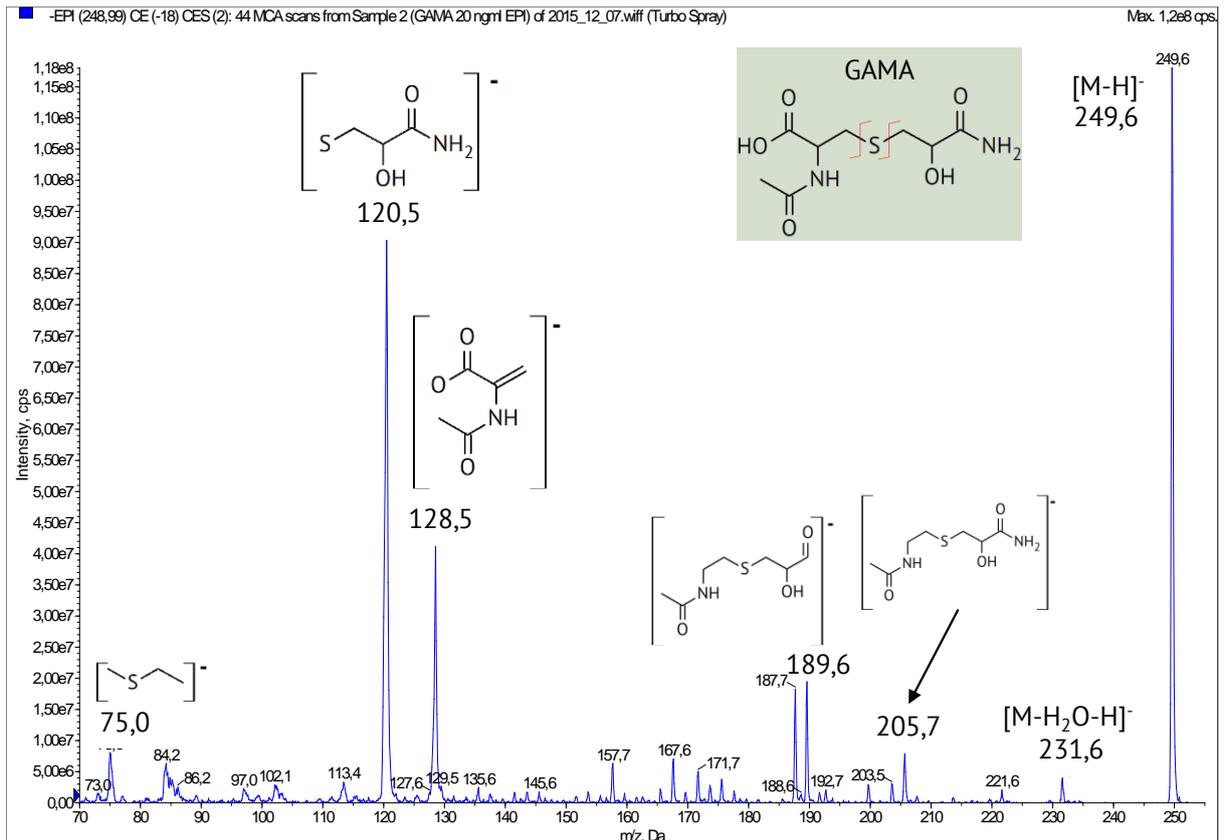


Abbildung 9-1 EPI-Spektrum von 20 ng/ml GAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -35, CE -18, CES 2; Scanrate: 200 Da/s, 44 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 μ l/min).

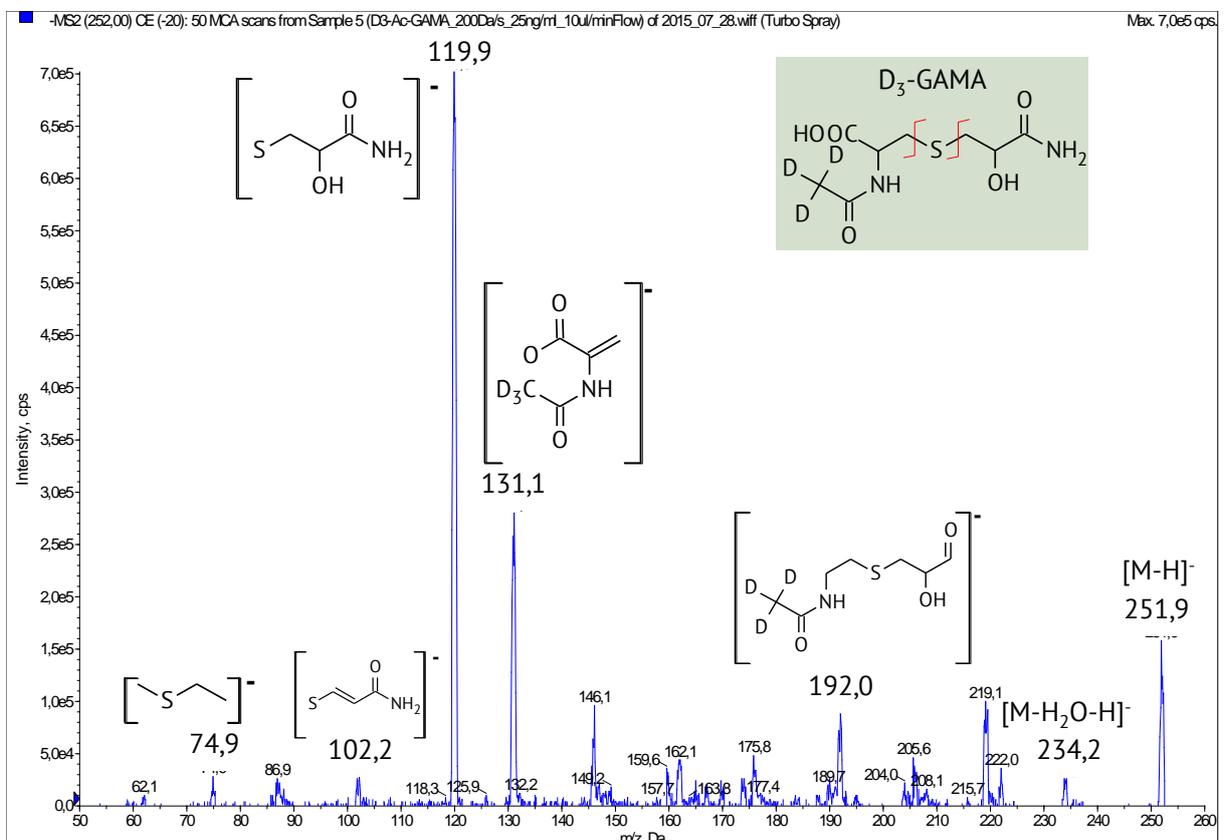


Abbildung 9-2 MS²-Spektrum von 25 ng/ml D₃-GAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30, CE -20, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 μ l/min).

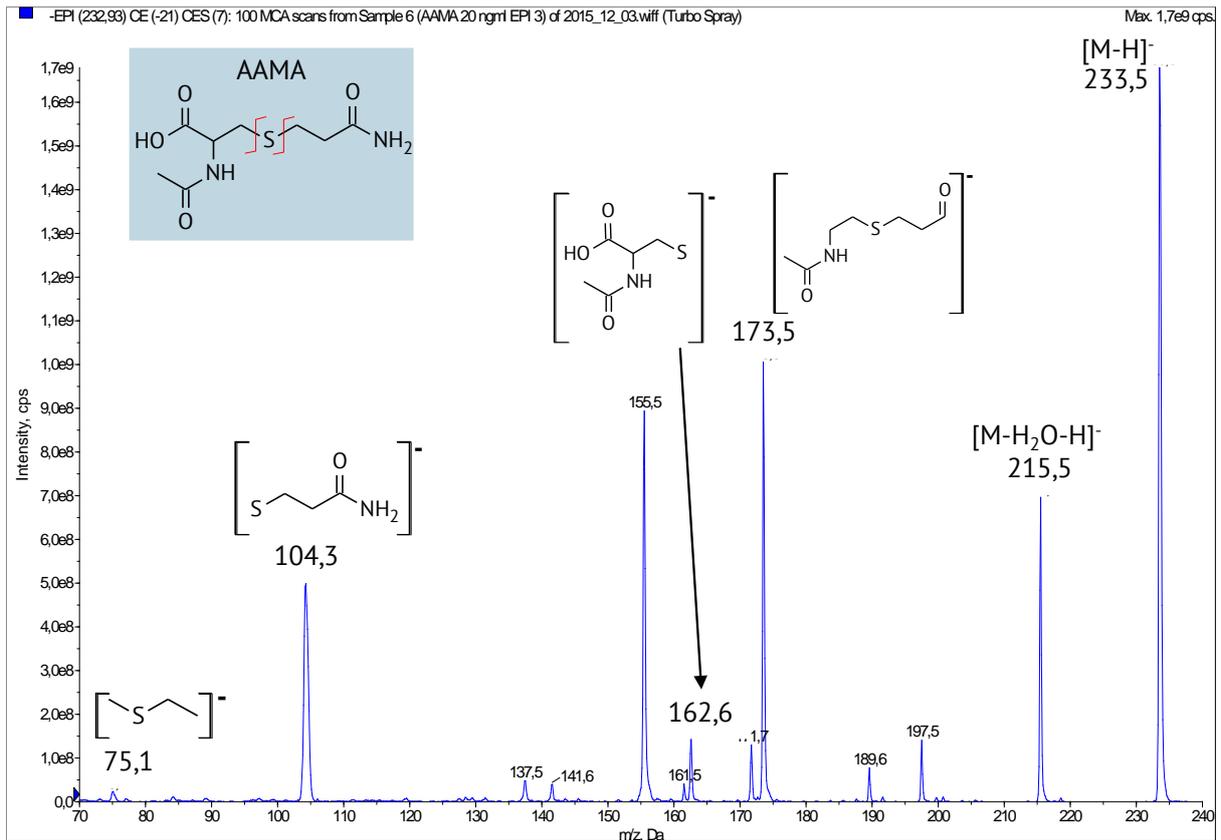


Abbildung 9-3 EPI-Spektrum von 20 ng/ml AAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -21 V, CES 7 V, Scanrate: 10.000 Da/s, 100 Zyklen, *Linear Ion Trap Fill Time* 150 msek, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

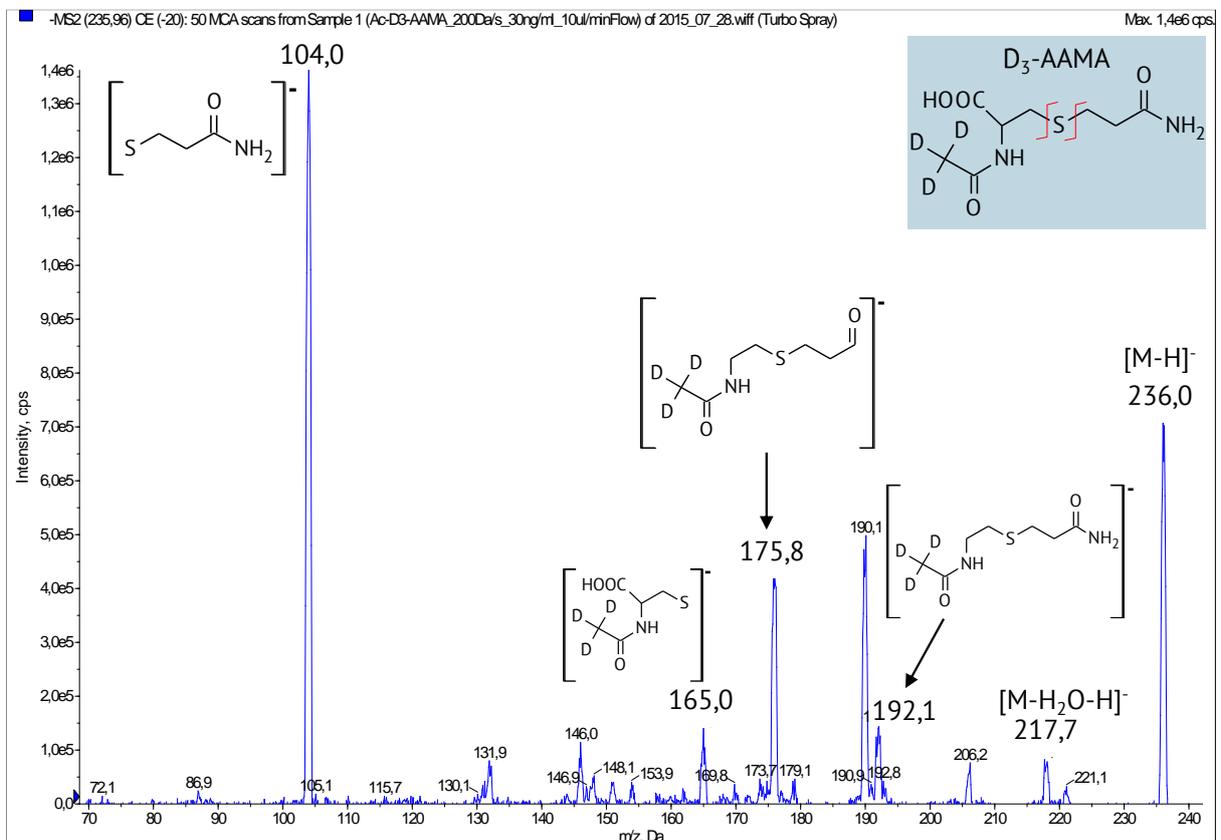


Abbildung 9-4 MS²-Spektrum von 30 ng/ml D₃-AAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -55 V, CE -20 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

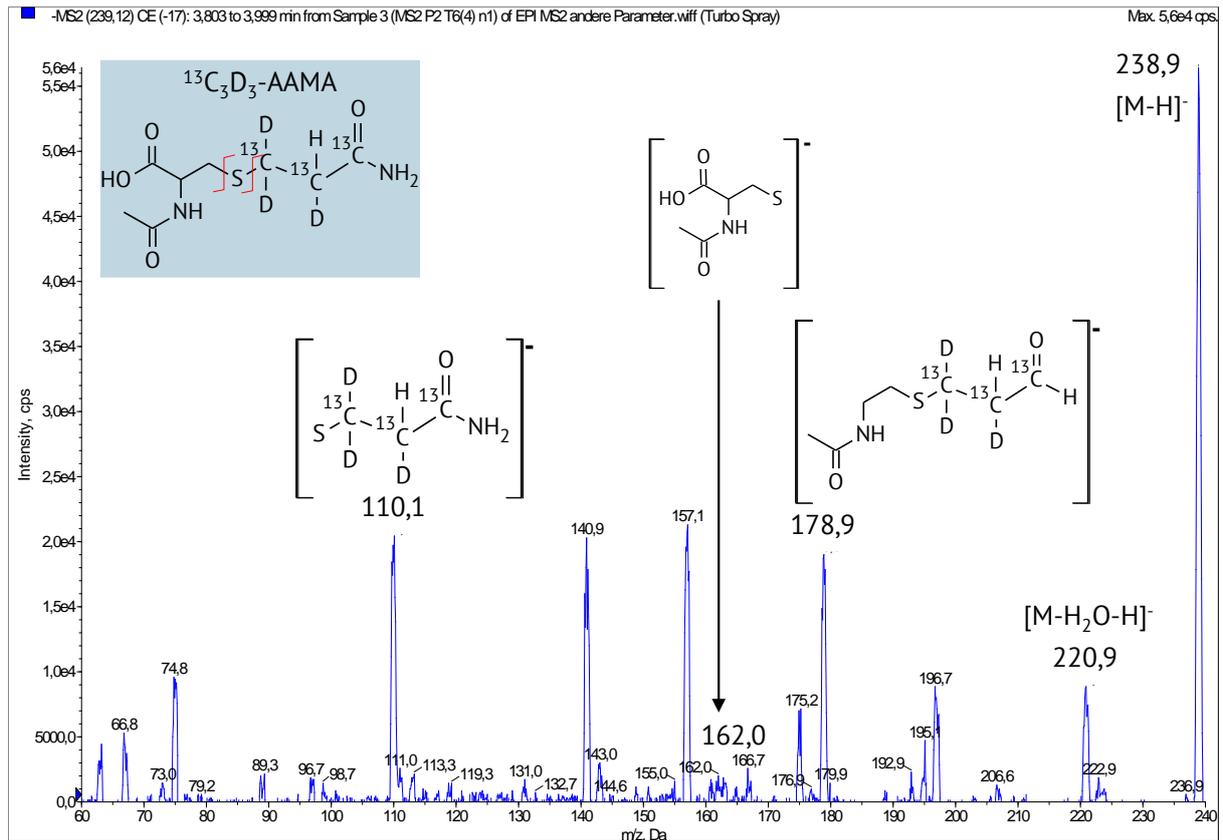


Abbildung 9-5 MS²-Spektrum zur Zeit der Elution von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AAMA}$ der Urinprobe P2-Tag 6 (20–24 h) n1 (3,8–4,0 min) nach negativer Ionisierung (Scanrate: 200 Da/s, sonstige Parameter entsprechend der Quantifizierungsmethode in Kapitel 9.6.2).

Validierung. Die Messpräzision der UHPLC-MS/MS-Methode wurde durch die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt. Dazu wurde eine Lösung verwendet, die je 25 ng/ml der Mercaptursäuren AAMA, GAMA, HPMA, CEMA und die entsprechen internen Standards D₃-AAMA, D₃-GAMA, D₃-HPMA und D₃-CEMA enthielt. Zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde die Lösung an einem Tag fünfmal hintereinander vermessen, zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinander folgenden Tagen. Die Lagerung der Lösung erfolgte im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C.

Die Bestimmung des LOD und LOQ erfolgte empirisch durch verdünnen von wässrigen Standard-Lösungen bis zu einer Konzentration, bei der eine Peakhöhe des Signals erreicht wurde, die für den LOD das Dreifache des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (engl. *signal-to-noise ratio*, S/N) und für den LOQ das Zehnfache des S/N entsprach. Die Quantifizierung von $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AAMA}$ erfolgte als AAMA.

9.6.2. Methode zur Bestimmung von Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren in Urin

Die in diesem Kapitel beschriebene Methode wurde verwendet, um die Mercaptursäuren AAMA und GAMA in den Urinproben beider Humanstudien sowie $^{13}\text{C}_3\text{D}_3\text{-AAMA}$ in denen der Humanstudie I zu quantifizieren, und wurde bereits in Goepel *et al.* [2017] publiziert.

Probenaufarbeitung und Festphasenextraktion. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Urinproben (1 ml) mit 3 ml Ammoniumformiat-Puffer (50 mM, pH 2,5) verdünnt. Als interne Standards wurden 100 ng D₃-AAMA, 25 ng D₃-GAMA, 200 ng D₃-HPMA und 50 ng D₃-CEMA hinzugesetzt. Das equilibrierte Gemisch wurde mit Salzsäure (4 N) auf pH 2,5±0,5 eingestellt und zur SPE eingesetzt. Die SPE-Kartuschen Isolute® ENV+ (100 mg; 10 ml) von Biotage wurden mit 4 ml Methanol konditioniert sowie mit je 4 ml Wasser_{dd} und Salzsäure (pH 2,5) equilibriert. Nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen mit 2 ml Salzsäure (pH 2,5) und anschließend mit 1 ml Salzsäure/Methanol (90/10, v/v, pH 2,5) gewaschen. Nach Trocknem unter gemäßigttem Vakuum wurden die Analyten mit 1,85 ml Methanol/Ameisensäure (99/1, v/v, pH 2,5) von den Kartuschen eluiert. Die Eluate wurden daraufhin durch Vakuumzentrifugation auf circa 100 µl eingeeengt und mit 0,1%iger wässriger Essigsäure auf ein Endvolumen von circa 2 ml aufgefüllt. Während die Urinproben der Probanden von Humanstudie II und die der Gruppe A von Humanstudie I noch weiter 1:4 mit 0,1%iger wässriger Essigsäure verdünnt wurden, wurden die Urinprobanden der Probanden von Gruppe B der Humanstudie I nicht weiter verdünnt.

Messung mittels UHPLC-ESI-MS/MS. Die Trennung der Analyten erfolgte bei einem Injektionsvolumen von 2 µl mittels RP-Chromatographie unter Verwendung einer Zorbax Eclipse XDB-C18-Säule (50x4,6 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies) mit entsprechender UHPLC-Vorsäule sowie Gradientenelution (siehe Tabelle 9-4) bei 20 °C. Als wässriges Fließmittel A diente 0,1%ige wässrige Essigsäure und als organisches Fließmittel B Acetonitril.

Tabelle 9-4 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Mercaptursäure-Analytik.

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	600	99	1
2,0	600	99	1
5,0	600	90	10
5,1	600	10	90
8,1	600	10	90
8,2	600	99	1
12	600	99	1

Fließmittel A 0,1%ige wässrige Essigsäure; Fließmittel B Acetonitril.

Die Detektion erfolgte mit negativer Ionisierung im *scheduled*-MRM Modus. Die Analyten wurden im erwarteten Retentionszeitraum für 70 Sek bei einer MRM-Zykluszeit von 1,2 sek detektiert. Alle geräte- und substanzspezifischen MS-Parameter sind in Tabelle 9-5 ersichtlich. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Tool *Quantitate* der Software Analyst 1.6.1.

Tabelle 9-5 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Mercaptursäure-Analytik.

Substanzspezifische Parameter							
Analyt	Q1	Q3	exp. Time	DP	EP	CE	CXP
AAMA 1	232,966	104,000	3,9	-30	-10	-20	-11
AAMA 2	232,966	162,000	3,9	-30	-10	-14	-13
¹³ C ₃ D ₃ -AAMA 1	239,115	110,025	3,9	-40	-10	-20	-11
¹³ C ₃ D ₃ -AAMA 2	239,115	162,082	3,9	-40	-10	-15	-14
D ₃ -AAMA	235,964	103,900	3,9	-55	-10	-20	-5
GAMA 1	248,985	120,000	2,2	-35	-10	-22	-11
GAMA 2	248,985	128,100	2,2	-35	-10	-16	-9
D ₃ -GAMA	252,003	119,700	2,2	-30	-10	-20	-11
HPMA 1	220,021	91,000	5,4	-5	-10	-18	-9
HPMA 2	220,021	88,900	5,4	-5	-10	-30	-9
D ₃ -HPMA	222,929	91,000	5,4	-50	-10	-18	-7
CEMA 1	233,949	104,900	5,6	-40	-10	-20	-11
CEMA 2	233,949	128,000	5,6	-40	-10	-14	-11
D ₃ -CEMA	236,925	105,000	5,6	-25	-10	-20	-9
Gerätespezifische Parameter							
CUR	CAD	IS	TEM	Gas 1	Gas 2		
50	Medium	-4.500	550	50	70		

Q1 Quadrupol 1 [*m/z*]; Q3 Quadrupol 3 [*m/z*]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; *exp. Time* erwartete Retentionszeit [min]; CE *collision energy* [V]; CXP *cell exit potential* [V]; CUR *curtain gas* N₂ [psi]; CAD *collisionally activated dissociation gas* N₂ [psi]; IS *ionspray voltage* [V]; TEM Temperatur [°C]; Gas 1 Verneblungsgas N₂ [psi]; Gas 2 Heizergas N₂ [psi]; AAMA *N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein*; CEMA *N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cystein*; GAMA *N-Acetyl-S-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein*; HPMA *N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystein*.

9.7. Bestimmung von Cotinin und CYMA

Zur Erfassung weiterer exogener Acrylamid-Quellen wie Tabakrauch wurden die Expositionsbiomarker Cotinin und CYMA in den aufgearbeiteten Urinproben der Probanden der Humanstudie II erfasst, welche zuvor ihre Einwilligung in das zweite Amendment gaben (16 von 20 Probanden). Eine UHPLC-ESI-MS/MS-Methode zur simultanen Quantifizierung beider Analyten wurde hierzu im Rahmen dieser Arbeit zuvor entwickelt und validiert. Diese Methode ist bereits in Goerke *et al.* [2019] veröffentlicht worden.

9.7.1. Entwicklung und Validierung einer UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Cotinin und CYMA

Chromatographie. Für die chromatographische Trennung der Analyten Cotinin und CYMA wurde die UHPLC-Säule Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 µm) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) getestet, auf der eine ausreichende Basislinientrennung erreicht werden konnte. Der final verwendete Gradient (siehe Tabelle 9-7) wurde ausgehend von einem Standard-Gradienten

(Anstieg von 1–70 % Fließmittel A innerhalb von 15 min) entwickelt. Als Fließmittel A wurden 0,1%ige wässrige Essigsäure bzw. 0,1%ige wässrige Ameisensäure und als Fließmittel B Methanol und Acetonitril miteinander verglichen sowie die Temperatur des Säulenofens (20–35 °C) und das Injektionsvolumen (0,1–5 µl) variiert.

MS-Detektion. Die Ermittlung der MS-Parameter wurde entsprechend der in Kapitel 9.2 beschriebenen Methodik durchgeführt. Die gerätespezifischen MS-Parameter wurden mittels FIA-Optimierungen ermittelt, bei denen Lösungen mit einer Konzentration von 5 ng/ml Cotinin bzw. 5 ng/ml CYMA verwendet wurden. Das Injektionsvolumen betrug 2 µl, als Fließmittel diente 0,1%ige wässrige Essigsäure/Acetonitril (50/50, v/v) bei einer Flussrate von 600 µl/min. Alle Parameter wurden als Triplikat-Messungen mit einer Dauer von 1 min (Cotinin) bzw. 2 min (CYMA) bestimmt.

Die substanzspezifischen MS-Parameter wurden mit Standard-Lösungen aus jeweils 5 ng/ml *rac*-Cotinin, D₃-*rac*-Cotinin bzw. D₃-CYMA sowie 20 ng/ml CYMA optimiert. Die daraus resultierten MS-Spektren mit den Fragmenten der verwendeten Quantifizier- bzw. Qualifizier-Spuren sind ab Abbildung 9-6ff dargestellt. Der Zeitpunkt des Periodenwechsels der *shuttled*-MRM-Methode von positiver zu negativer Polarisierung wurde empirisch festgelegt. Zuletzt wurde für beide Perioden die *dwell-time* einzeln empirisch optimiert.

Probenaufarbeitung. Da für die Quantifizierung von Cotinin und CYMA die bereits vorhandenen SPE-Eluate der Urinproben herangezogen wurden, wurde empirisch der Konzentrationsbereich beider Analyten in den SPE-Eluaten durch Vermessen verschiedener Proben und Verdünnungen eruiert. Auf dieser Basis wurden geeignete Verdünnungen und die Konzentration des internen Standards D₃-Cotinin festgelegt. Die Quantifizierung von CYMA konnte aufgrund von Verunreinigung des vorhandenen D₃-CYMA-Standards nicht mittels SIVA durchgeführt werden. Ebenso lieferte die Verwendung des strukturell ähnlichen D₃-HPMA als internen Standard keine reproduzierbaren Ergebnisse, sodass für die Quantifizierung von CYMA eine externe Kalibrierung verwendet wurde.

Die SPE-Wiederfindung der Analyten wurde als Dreifachbestimmung mit 1 ml Standard-Lösungen mit vier unterschiedlichen Konzentrationen (mittlere gefundene Konzentration ±30 %, hohe Konzentration) jedes Analyten bestimmt. Die verwendeten Standard-Ansätze mit den Konzentrationen der jeweiligen Analyten sind in Tabelle 9-3 gelistet.

Tabelle 9-6 Eingesetzte Standard-Lösungen zur Bestimmung der Wiederfindung von Cotinin und CYMA.

Ansatz	Cotinin [ng/ml]	D ₃ -Cotinin [ng/ml]	CYMA [ng/ml]	D ₃ -CYMA [ng/ml]
1	10	25	10	50
2	150	25	50	50
3	300	25	100	50
4	1500	50	300	100

CYMA N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cystein.

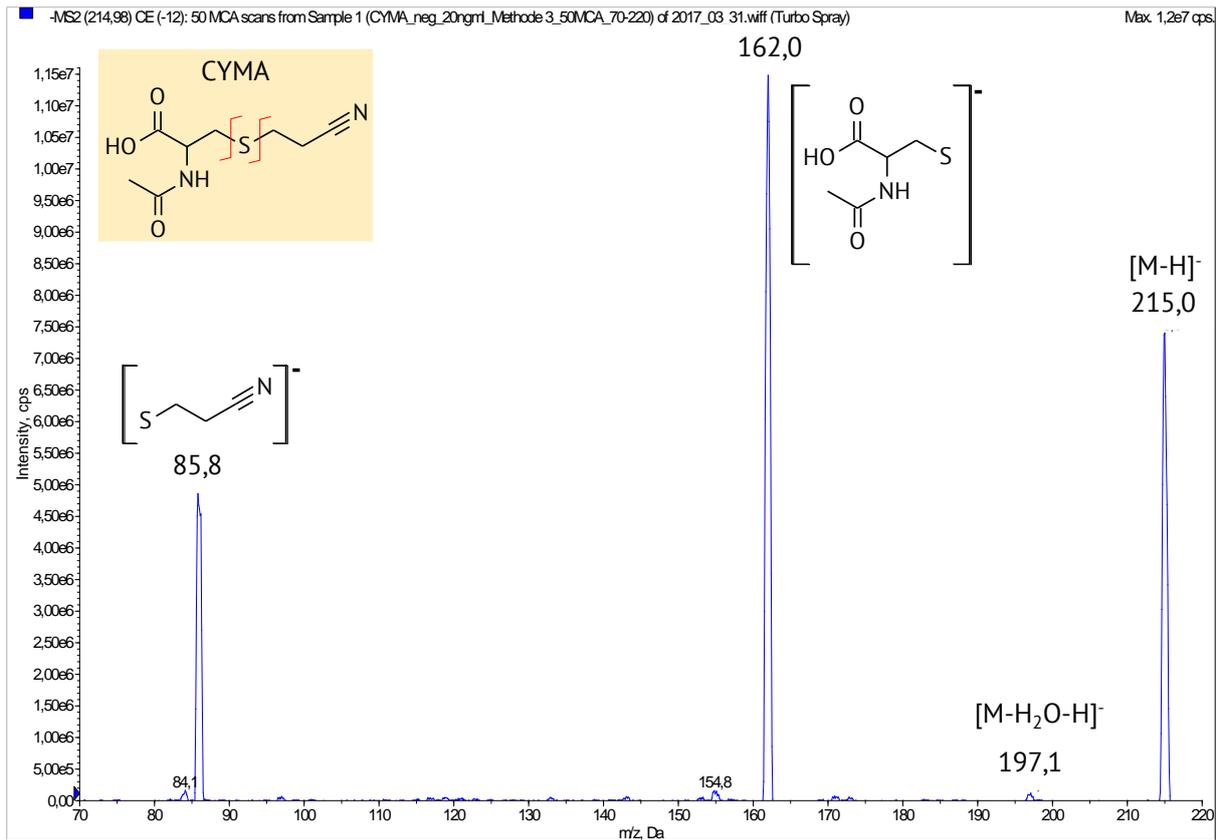


Abbildung 9-6 MS²-Spektrum von 20 ng/ml CYMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -12 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

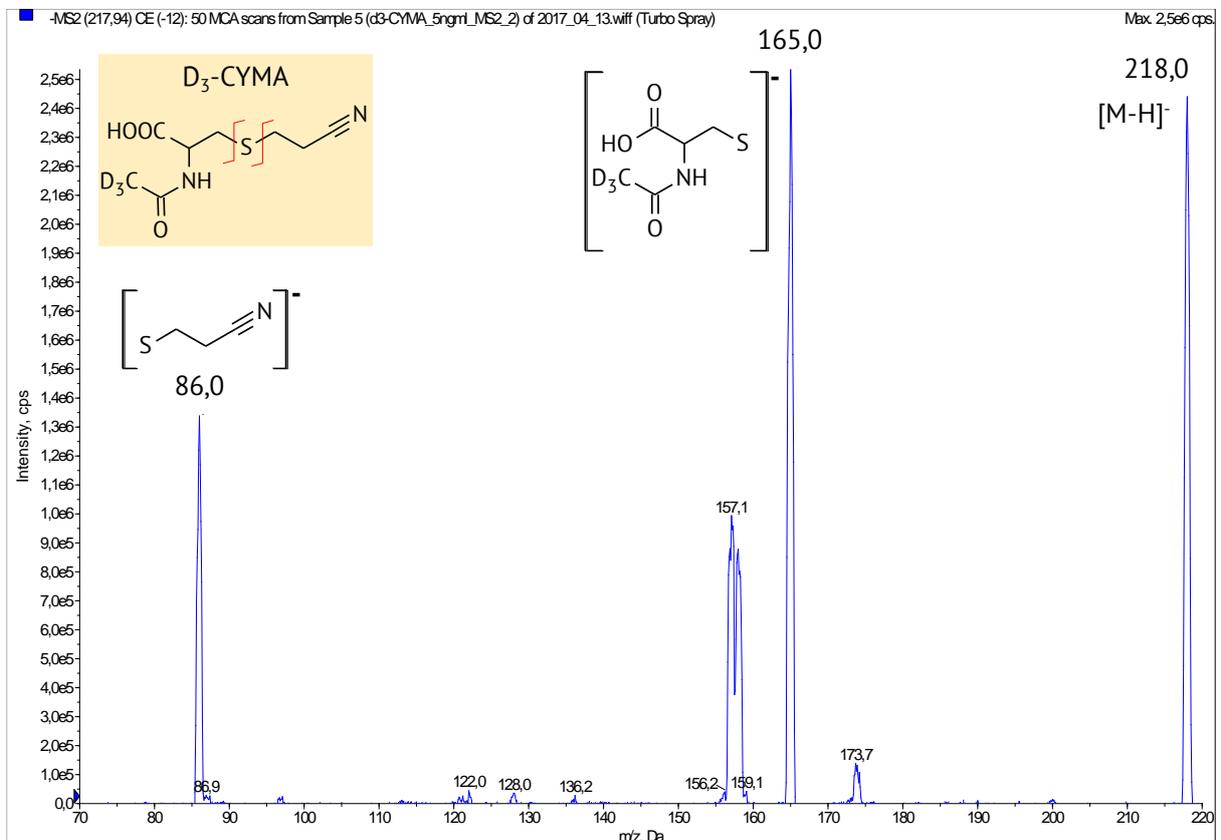


Abbildung 9-7 MS²-Spektrum von 5 ng/ml D₃-CYMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -12 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

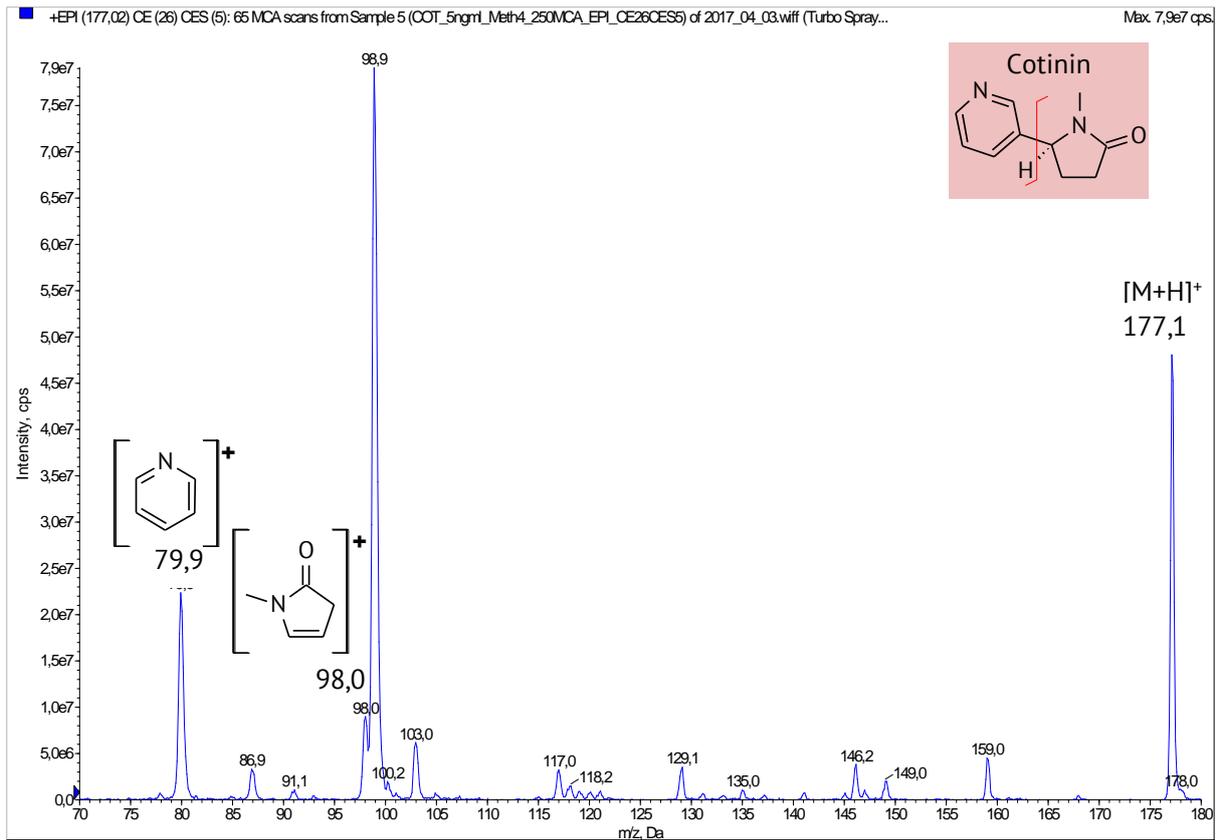


Abbildung 9-8 EPI-Spektrum von 5 ng/ml Cotinin nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 121 V, CE 26 V, CES 5 V, Scanrate: 200 Da/s, 65 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

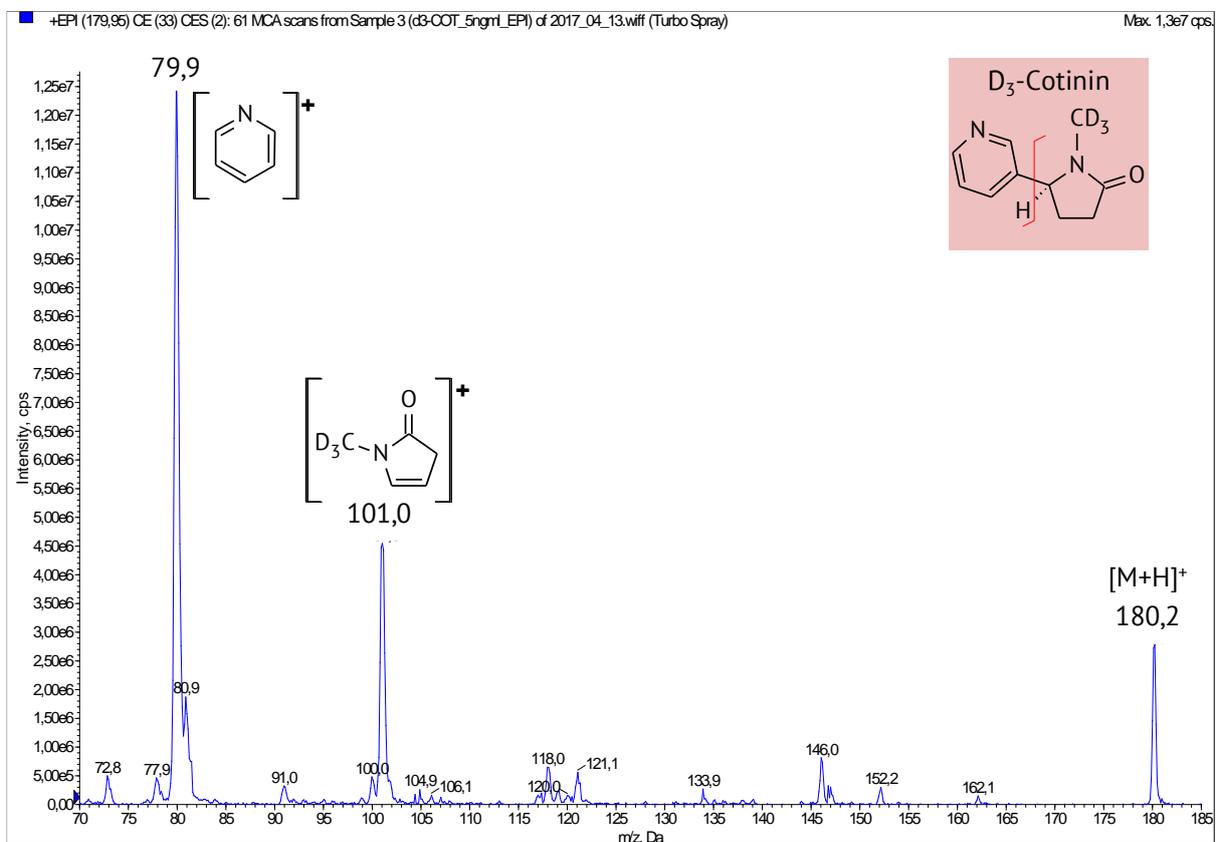


Abbildung 9-9 EPI-Spektrum von 5 ng/ml D₃-Cotinin nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 111 V, CE 33 V, CES 2 V, Scanrate: 200 Da/s, 61 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

Validierung. Die Messpräzision der UHPLC-MS/MS-Methode wurde durch die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt. Dazu wurde eine Lösung mit einer Konzentration von je 10 ng/ml Cotinin, D₃-Cotinin und CYMA verwendet, die zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität an einem Tag fünfmal hintereinander und zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils einmal vermessen wurde. Die Lagerung der Lösung erfolgte im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C.

Die Bestimmung des LOD und LOQ erfolgte empirisch durch verdünnen von wässrigen Standard-Lösungen bis zu einer Konzentration, bei der eine Peakhöhe des Signals erreicht wurde, die für den LOD das Dreifache des S/N und für den LOQ das Zehnfache des S/N entsprach.

Die Bestimmung von CYMA erfolgte über externe Kalibrierung. Die entsprechenden Lösungen der Kalibrierung wurden vor den Proben jedes Probanden erneut vermessen.

9.7.2. Methode zur Bestimmung von Cotinin und CYMA in Urin

Die mittels der in Kapitel 9.6.2 beschriebenen Methode aufgearbeiteten SPE-Eluate der Mercaptursäure-Bestimmung wurden mit einer wässrigen D₃-Cotinin-Lösung (4 ng/ml) im Verhältnis 1:4 verdünnt. CYMA wurde mittels externer Kalibriergeraden quantifiziert. Hierfür wurde eine Kalibriergerade (0,05–100 ng/ml) unmittelbar vor den jeweiligen Proben eines Probanden vermessen. Die Messung erfolgte mittels UHPLC-ESI-MS/MS im *shuttled*-MRM-Modus bei einem Injektionsvolumen von 2 µl pro Messung. Die Trennung der Analyten erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 20 °C als RP-Chromatographie mit einer Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit entsprechender Vorsäule. Zur Gradientenelution (Tabelle 9-7) wurden als Fließmittel A 0,1%ige wässrige Essigsäure und als Fließmittel B Acetonitril verwendet.

Tabelle 9-7 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Tabakrauch-Biomarker-Analytik.

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	600	96	4
0,5	600	96	4
3,8	600	91	9
3,9	600	5	95
7,0	600	5	95
7,1	600	96	4
10	600	96	4

Fließmittel A 0,1%ige wässrige Essigsäure; Fließmittel B Acetonitril.

Die massenspektrometrische Messung erfolgte im *shuttled*-MRM-Modus, da sich Cotinin besser im negativen Modus ionisieren lässt als CYMA, welches im positiven Modus ionisiert wurde. Somit ergaben sich zwei MRM-Perioden, von denen die erste zur Detektion von Cotinin eine negative Ionisierung aufwies, die zweite Periode hingegen eine positive Ionisierung zur Detektion von

CYMA. Der Wechsel der Ionisierung erfolgte nach 3 min. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Multiquant 2.1 (Sciex Ontario, CAN).

Tabelle 9-8 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Cotinin- und CYMA-Analytik.

Substanzspezifische Parameter								
Analyt	Q1	Q3	dw	DP	EP	CE	CXP	Periode
Cotinin 1	176,995	80,100	250	121	10	31	10	1
Cotinin 2	176,995	98,100	250	121	10	29	10	1
D ₃ -Cotinin	179,949	80,100	250	121	10	35	8	1
CYMA 1	214,982	162,000	250	-30	-10	-12	-13	2
CYMA 2	214,982	86,100	250	-30	-10	-18	-7	2

Gerätespezifische Parameter						
Periode	CUR	CAD	IS	TEM	Gas 1	Gas 2
1	25	Medium	2.000	500	60	60
2	25	Medium	-2.000	500	60	60

Q1 Quadrupol 1 [*m/z*]; Q3 Quadrupol 3 [*m/z*]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; CE *collision energy* [V]; CXP *cell exit potential* [V]; dw *dwell time* [msec]; CUR *curtain gas N₂* [psi]; CAD *collisionally activated dissociation gas N₂* [psi]; IS *ionspray voltage* [V]; TEM Temperatur [°C]; Gas 1 Verneblungsgas N₂ [psi]; Gas 2 Heizergas N₂ [psi]; CYMA N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cystein.

9.8. Bestimmung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids

Die Acrylamid- bzw. Glycidamid-Hämoglobin-Addukte der Blutproben der Humanstudie I wurden als N-terminale Valin-Addukte AAVal und GAVal durch einen modifizierten Edman-Abbau bestimmt, aus dem Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate (AAValPFPTH bzw. GAValPFPTH) hervorgehen. Die Quantifizierungsmethode musste hierfür auf Grundlage einer zuvor im Arbeitskreis verwendeten SPE-HPLC-ESI-MS/MS-Methode von Frau Rosita Meyer weiter optimiert werden.

9.8.1. Optimierung der SPE-UHPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Hämoglobin-Addukten

Chromatographie. Die chromatographische Trennung der PFPTH-Derivate der Hämoglobin-Addukte AAVal und GAVal sollte auf eine UHPLC-Methode übertragen werden. Hierzu wurden die Säulen Luna C8(2) mit den Abmaßen 150x2,0 mm bei 3 μ sowie 150x3,0mm bei 3 μ , Luna C18(2) (250x4,6 mm, 3 μ , 100 Å) und Kinetex PFP (100x2,1 mm, 100 Å, 2,6 μ m) getestet, die alle von der Firma Phenomenex (Torrance, USA) stammten. Der finale Gradient (siehe Tabelle 9-9, Seite 163) wurde mit der Säule Kinetex PFP (100x2,1 mm, 100 Å, 2,6 μ m) entwickelt, die die beste Basislinientrennung der beiden Analyten aufwies und zudem die Isomere von GAValPFPTH nicht vollständig trennte, da diese zusammen quantifiziert wurden. Als Fließmittel A wurde 0,1%ige wässrige Ameisensäure gegen 0,1%ige wässrige Essigsäure verglichen und mit letzterer

fortgefahren. Als Fließmittel B blieb Acetonitril bestehen. Des Weiteren wurden die Temperatur des Säulenofens (20–40 °C) und die Flussrate (200–250 µl/min) variiert.

MS-Detektion. Die Ermittlung der substanzspezifischen MS-Parameter wurde entsprechend der in Kapitel 9.2 beschriebenen Methodik mit Standard-Lösungen durchgeführt, die jeweils 10 ng/ml der Analyten (AAValPFPTH, D₇-AAValPFPTH, GAValPFPTH und D₇-GAValPFPTH) gelöst in Methanol/Wasser_{dd} (50/50, v/v) enthielten. Die daraufhin gemessenen EPI-Spektren sind in Abbildung 9-10 bis Abbildung 9-13 dargestellt. Auf eine Optimierung der gerätespezifischen MS-Parameter wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Probenaufarbeitung. Die bereits im Arbeitskreis etablierte SPE-Methode wurde hinsichtlich der eingesetzten Hämoglobin-Menge (25–50 mg) und entsprechend der benötigten Mengen an Formamid, Natronlauge, des Derivatisierungsreagenz PFPITC sowie der Mengen der internen Standards D₇-AAValPFPTH und D₇-GAValPFPTH angepasst. Ebenfalls wurde die Zeit zum Lösen des Hämoglobins in Formamid erweitert. Zudem wurde getestet, ob relevante Mengen der Analyten und internen Standards auf den SPE-Kartuschen nach dem Waschen (10 ml Wasser_{dd}/Methanol, 50/50, v/v) verblieben, indem eine erneute Aufarbeitung mit einer Blankprobe bestehend aus Formamid, Natronlauge und PFPITC ohne Hämoglobin (siehe Kapitel 9.8.2, Probenaufarbeitung) durchgeführt wurde.

Validierung. Die Messpräzision der UHPLC-MS/MS-Methode wurde durch die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt. Dazu wurde eine Lösung mit einer Konzentration von je 10 ng/ml AAValPFPTH, D₇-AAValPFPTH, GAValPFPTH und D₇-GAValPFPTH verwendet, die zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität an einem Tag fünfmal hintereinander und zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils einmal vermessen wurde. Die Lagerung der Lösung erfolgte im Autosampler der HPLC-Anlage bei 6 °C.

Die Bestimmung des LOD und LOQ erfolgte empirisch durch Verdünnen von wässrigen Standard-Lösungen bis zu einer Konzentration, bei der eine Peakhöhe des Signals erreicht wurde, die für den LOD das Dreifache des S/N und für den LOQ das Zehnfache des S/N entsprach.

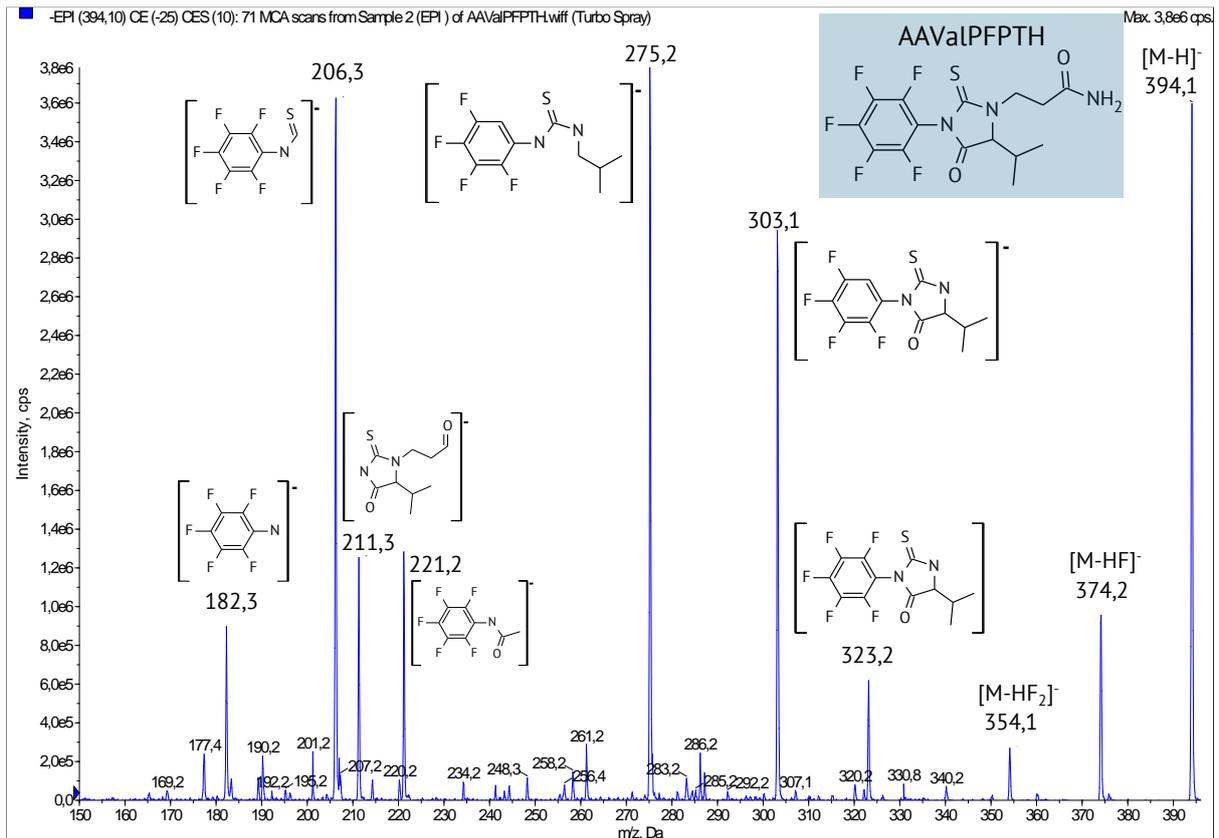


Abbildung 9-10 EPI-Spektrum von 10 ng/ml AAVaPPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110, CE -25 V, CES 10 V, Scanrate: 200 Da/s, 71 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

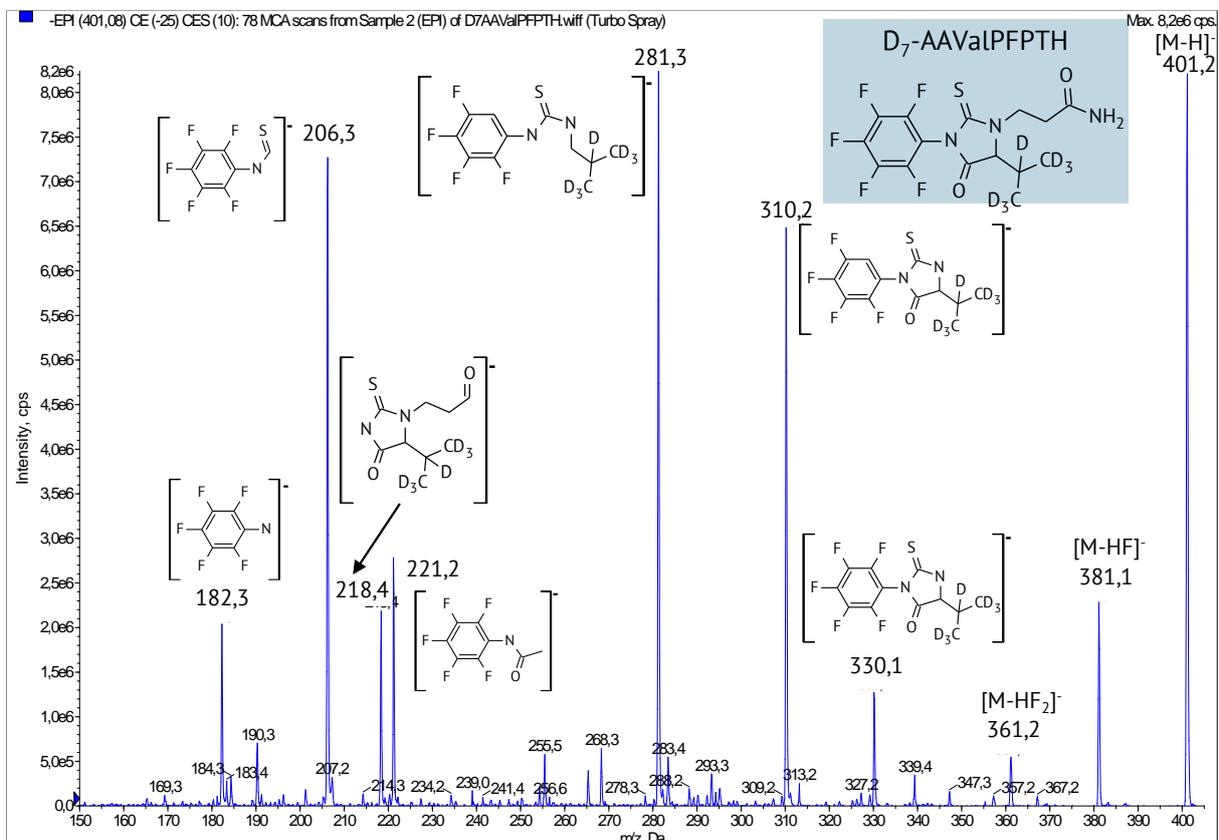


Abbildung 9-11 EPI-Spektrum von 10 ng/ml D₇-AAVaPPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -125 V, CE -25 V, CES 10 V, Scanrate: 200 Da/s, 78 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

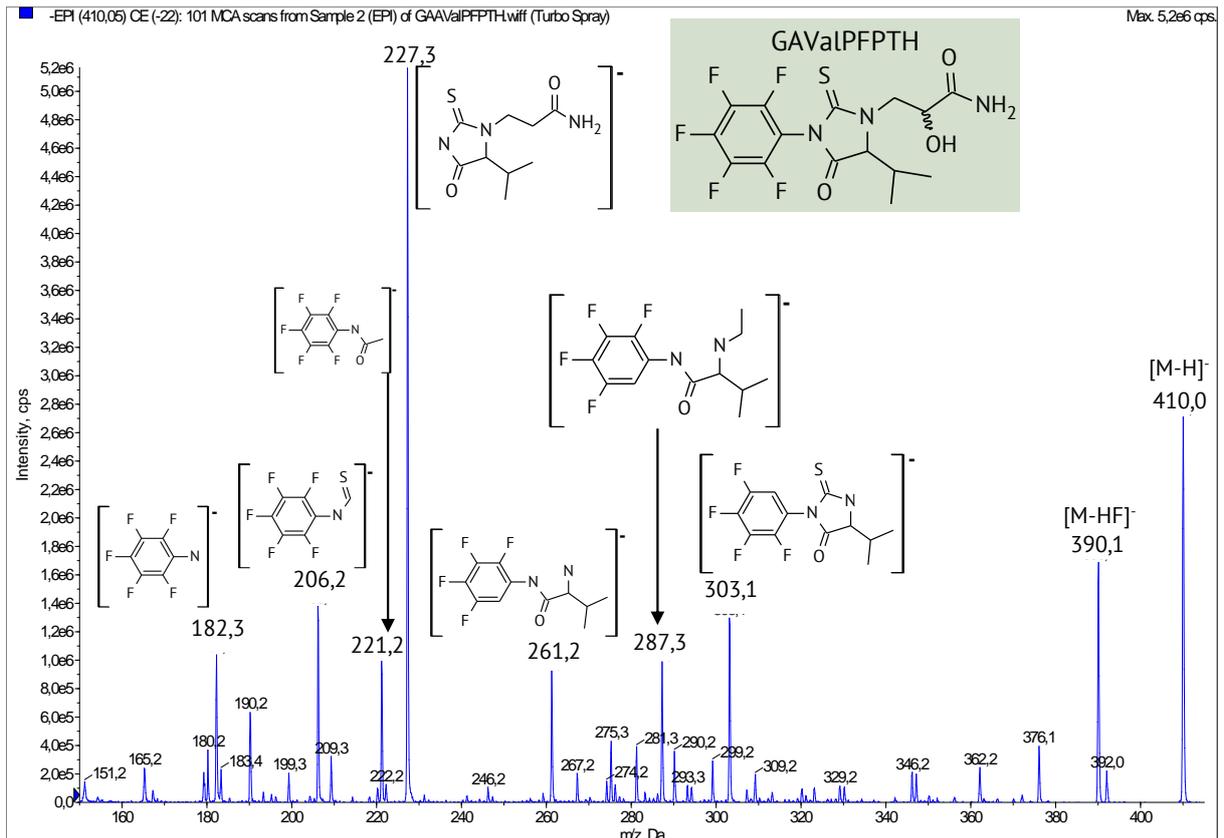


Abbildung 9-12 EPI-Spektrum von 10 ng/ml GAValPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110 V, CE -22 V, Scanrate: 200 Da/s, 101 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 μ l/min).

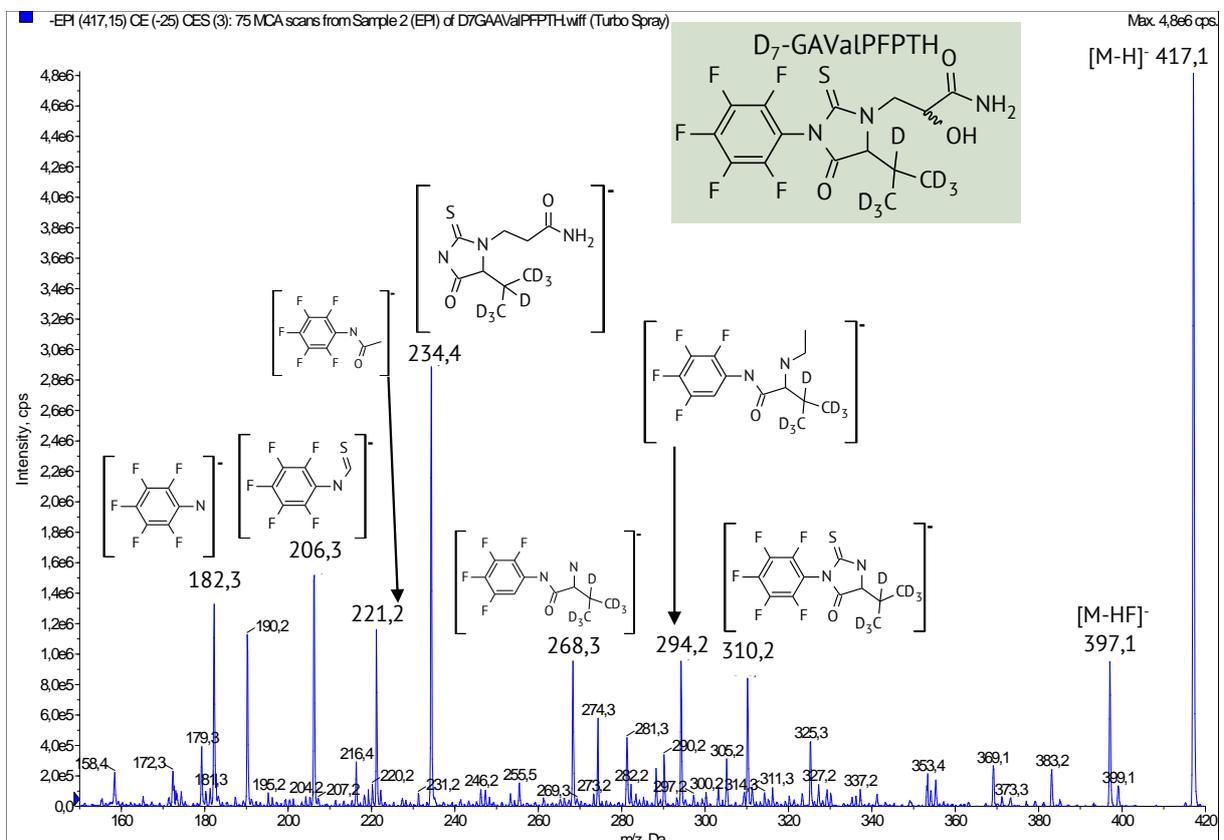


Abbildung 9-13 EPI-Spektrum von 10 ng/ml D₇-GAValPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110 V, CE -25 V, CES 3 V, Scanrate: 200 Da/s, 75 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 μ l/min).

9.8.2. Methode zur Bestimmung von Hämoglobin-Addukten des Acrylamids

Isolierung des Hämoglobins. Die Isolierung des Hämoglobins aus den Blutproben der Humanstudie I erfolgte unmittelbar nach Blutentnahme während der Studie und wurde von Frau Dr. Meike Rünz durchgeführt.

Die erhaltenen Blutproben (9 ml) wurden zentrifugiert (10 min, 3.000 g, RT) und der Überstand entfernt. Der Rückstand (Erythrozyten) wurde gedrielt und jeweils dreimal mit 2 ml isotonischer NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 3.000 g, RT) und der Überstand jeweils entfernt. Die Hämolyse der Erythrozyten erfolgte durch Zugabe von 2 ml Wasser_{dd}, starkem Schütteln und anschließendem Einfrieren bei -30 °C über Nacht. Nach dem Auftauen wurden die Erythrozyten erneut stark geschüttelt, mit 10 ml HCl in Isopropanol (50 mM) versetzt und erneut kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 3.500 g, RT) wurden die Überstände vereinigt und zur vollständigen Ausfällung des Hämoglobins mit 8 ml Ethylacetat versetzt, für >2 h bei 4 °C belassen, zentrifugiert (3 min, 1.250 g, RT) und der Überstand verworfen. Das so erhaltene Hämoglobin-Pellet wurde jeweils zweimal mit Ethylacetat und *n*-Hexan (jeweils 5 ml) gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschrift zentrifugiert (3 min, 1.250 g, RT) und die Waschflüssigkeit verworfen wurde. Das so erhaltene Hämoglobin-Pellet wurde zum Trocknen über Nacht im Digestorium belassen und bis zur weiteren Analytik bei -21 °C gelagert.

Probenaufarbeitung. Zur weiteren Analytik wurden jeweils 25 mg Hämoglobin eingewogen und in 1,5 ml Formamid über Nacht unter leichtem Schwenken gelöst. Die Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von 20 µl Natronlauge (1 M) sowie 20 µl PFPITC. Anschließend wurden die Proben für 120 min bei 45 °C leicht geschüttelt (800 rpm) und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 2 ng D₇-AAValPFPTH und 2 ng D₇-GAValPFPTH hinzugegeben. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 1,6 ml gesättigter NaCl-Lösung, 6 ml Wasser_{dd} und starkem Schütteln gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 4.000 g, RT) wurde der Überstand mittels SPE weiter aufgearbeitet.

Festphasenextraktion. Zur SPE wurden Isolute® ENV+ (100 mg; 10 ml) Kartuschen von Biotage (Uppsala, Schweden) verwendet, welche mit 4 ml Methanol konditioniert wurden. Anschließend wurden die Kartuschen mit 4 ml Wasser_{dd} und 2 ml Formamid/Wasser_{dd} (50/50, v/v) equilibriert. Nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen mit 2 ml Wasser_{dd} und 1 ml Methanol/Wasser_{dd} (50/50, v/v) gewaschen. Die Analyten wurden mit 1,5 ml Methanol von den Kartuschen eluiert, welche anschließend 5 min unter gemäßigttem Vakuum getrocknet wurden. Die SPE-Kartuschen wurden jeweils nur einmal verwendet. Die Eluate wurden mittels Vakuumzentrifugation auf circa 150 µl aufkonzentriert und die restlichen Proteine mittels Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde zur Messung mittels UHPLC-ESI-MS/MS eingesetzt.

Messung mittels UHPLC-MS/MS. Die chromatographische Trennung der PFPTH-Derivate erfolgte mit einer Kinetex PFP-Säule (100x2,1 mm, 100 Å, 2,6 µm) der Firma Phenomenex (Torrance, USA) bei einer Temperatur von 40 °C. Zur Gradientenelution (siehe Tabelle 9-9) dienten als

Fließmittel A 0,1%ige wässrige Essigsäure und als Fließmittel B Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Tabelle 9-9 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Hämoglobin-Addukte-Analytik.

Zeit [min]	Flussrate [µl/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	250	90	10
0,5	250	90	10
0,6	250	60	40
1,2	250	60	40
6,0	250	55	45
6,1	250	10	90
6,5	350	10	90
9,5	350	10	90
10,0	250	10	90
10,0	250	90	10
15,0	250	90	10

Fließmittel A 0,1%ige wässrige Essigsäure; Fließmittel B Acetonitril.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im MRM-Modus mit den in Tabelle 9-10 zusammengefassten Parametern. Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe von Multiquant 2.1 (Sciex, Ontario, CAN).

Tabelle 9-10 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Hämoglobin-Addukte-Analytik.

Substanzspezifische Parameter							
Analyt	Q1	Q3	dw	DP	EP	CE	CXP
AAValPFPTH 1	394,094	275,100	160	-100	-10	-30	-11
AAValPFPTH 2	394,094	302,900	160	-100	-10	-22	-31
D ₇ -AAValPFPTH	401,089	310,100	160	-125	-10	-24	-17
GAValPFPTH 1	410,045	226,900	160	-110	-10	-22	-11
GAValPFPTH 2	410,045	206,000	160	-110	-10	-38	-13
D ₇ -GAValPFPTH	417,168	234,100	160	-75	-10	-22	-15
Gerätespezifische Parameter							
CUR	CAD	IS	TEM	Gas 1	Gas 2		
50	Medium	-4.500	500	25	50		

Q1 Quadrupol 1 [m/z]; Q3 Quadrupol 3 [m/z]; dw *dwell time* [msec]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; CE *collision energy* [V]; CXP *cell exit potential* [V]; CUR *curtain gas* N₂ [psi]; CAD *collisionally activated dissociation gas* N₂ [psi]; IS *ionspray voltage* [V]; TEM Temperatur [°C]; Gas 1 Verneblungsgas N₂ [psi]; Gas 2 Heizergas N₂ [psi]; AAValPFPTH 1-(2-Carbamoyl-ethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin; GAValPFPTH 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin.

9.9. Modell-Reaktionen zur Bildung von Acrylamid

Zur Untersuchung einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung wurden Modell-Reaktionen unter physiologischen Bedingungen äquimolarer Mischungen jeweils einer Aminosäure und eines Carbonyls durchgeführt. Für eine ausreichend sensitive Bestimmung von Acrylamid in den Modell-Ansätzen wurde zuvor die für die Lebensmittelanalytik verwendete SPE-HPLC-ESI-MS/MS-Methode auf UHPLC-Konditionen übertragen und die Aufarbeitung entsprechend angepasst.

9.9.1. Optimierung der HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Acrylamid in Modell-Ansätzen

Chromatographie. Um diskretere Peaks und damit einhergehend eine höhere Sensitivität für die Detektion von Acrylamid zu erreichen, wurden die UHPLC-Säulen Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μm) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) und Fusion RP-18 (50x2,0 mm, 4 μm) von Phenomenex (Torrance, USA) getestet. Da durch Verwendung der Zorbax Eclipse XDB-C18 mit entsprechender Vorsäule eine Trennung des Acrylamid-Peaks von einem nicht relevanten Stör-Peak erfolgen konnte, wurde diese Säule bei isokratischen Konditionen mit 99 % Fließmittel A (0,1%ige wässrige Essigsäure) und 1 % Fließmittel B (Methanol) verwendet.

MS-Detektion. Um zusätzlich zur vorhandenen Quantifier-Spur (m/z 72/55) noch Qualifier-Spuren hinzufügen zu können, wurden die substanzspezifischen Parameter gemäß der in Kapitel 9.2 beschriebenen Methodik mit einer Standard-Lösungen aus 50 ng/ml Acrylamid optimiert. Nach Einfügen zwei weiterer Qualifier-Spuren wurde die *dwell-time* empirisch optimiert. Die mit den optimierten MS-Parametern aufgenommenen MS²-Spektren sind in Abbildung 9-14 (Acrylamid) und Abbildung 9-15 (D₃-Acrylamid) zu sehen.

Probenaufarbeitung. Die zur Lebensmittelanalytik etablierte Probenaufarbeitung mittels Wasserextraktion und SPE wurde entsprechend der wässrigen und Phosphat-gepufferten Matrix und dem größeren Probenvolumen der Modell-Ansätze angepasst. Entsprechend wurde die Wasserextraktion durch Equilibrieren des internen Standards D₃-Acrylamid durch starkes Schütteln ersetzt und die Waschschrte der SPE verkürzt. Die SPE-Wiederfindung wurde als Dreifachbestimmung mit Standard-Lösungen durchgeführt, die 10 ng, 50 ng und 250 ng Acrylamid in jeweils 30 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,3) enthielten.

Validierung. Die Bestimmung des LOD und LOQ erfolgte empirisch durch Verdünnen von wässrigen Standard-Lösungen bis zu einer Konzentration, bei der eine Peakhöhe des Signals erreicht wurde, die für den LOD das Dreifache des S/N und für den LOQ das Zehnfache des S/N entsprach. Die Lösungen der Kalibrierung wurden vor jeder Messreihe erneut vermessen.

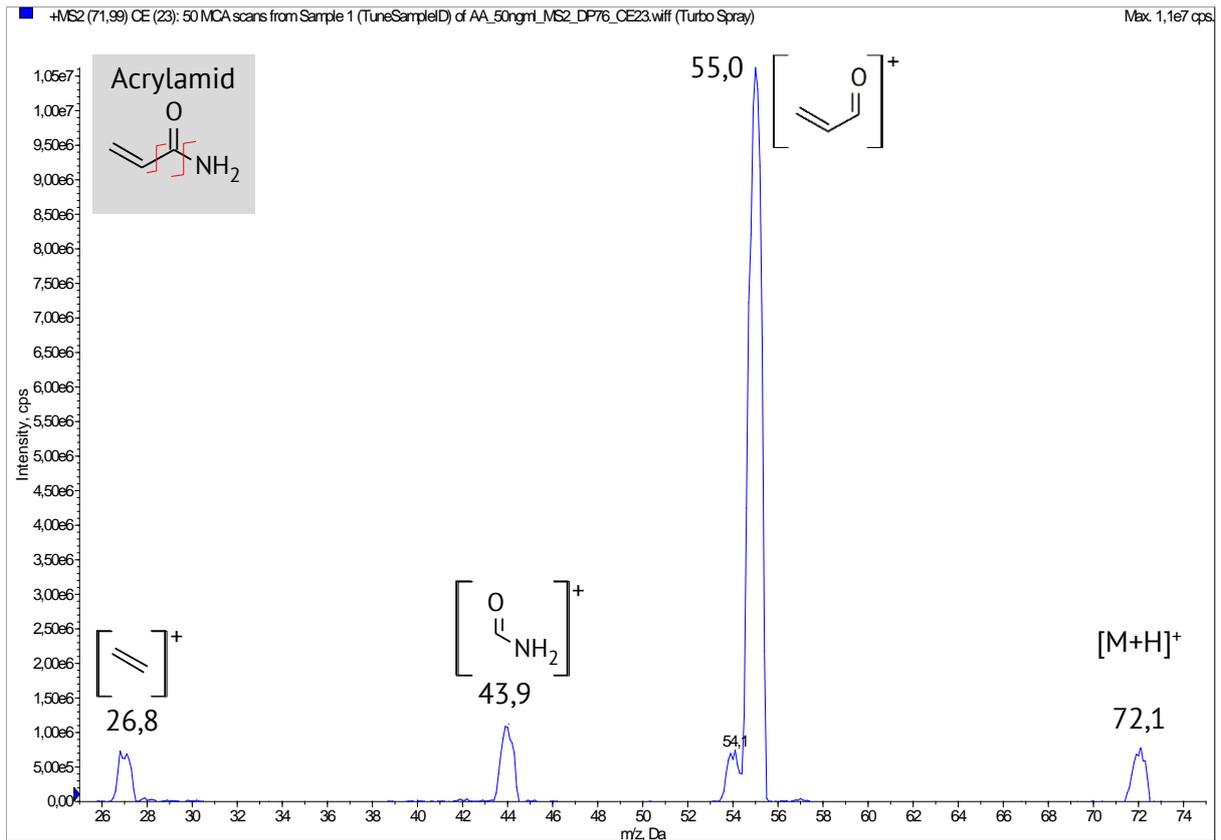


Abbildung 9-14 MS²-Spektrum von 50 ng/ml Acrylamid nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 76 V, CE 23 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

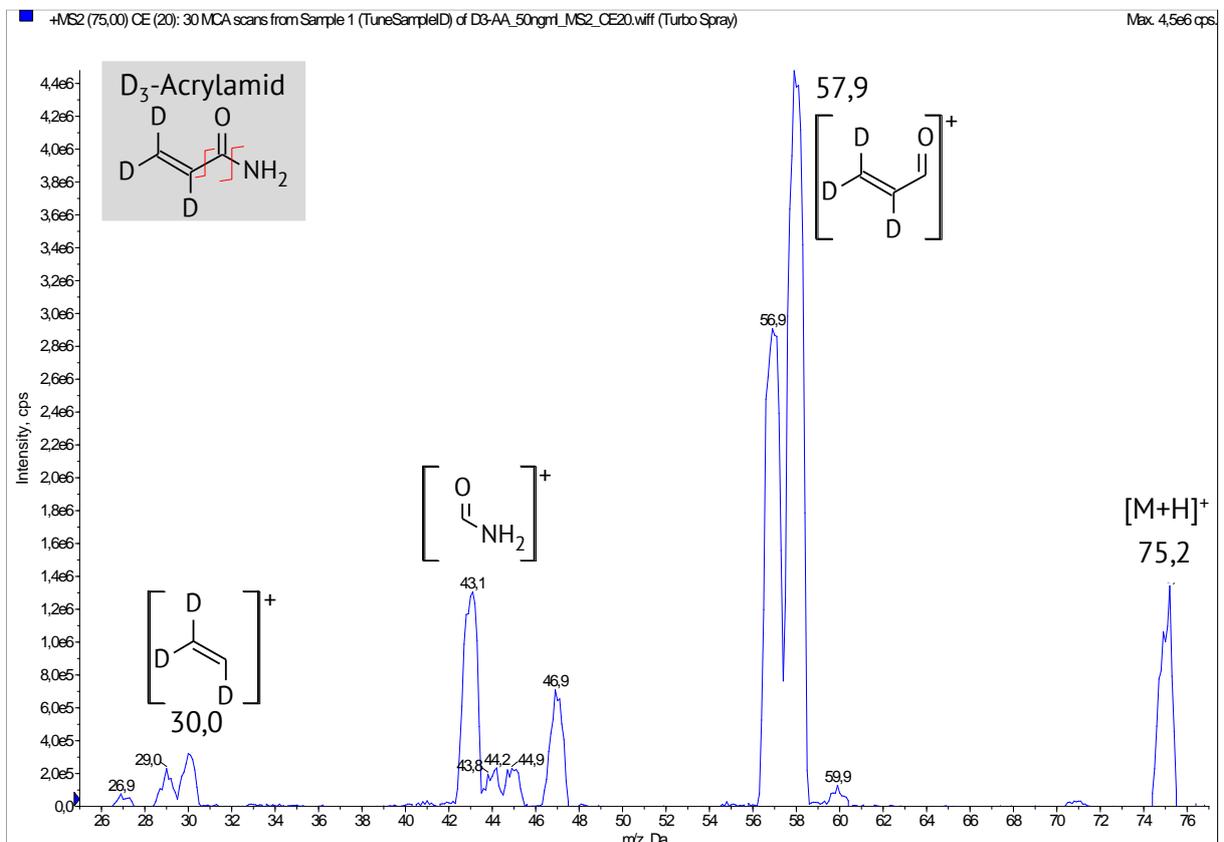


Abbildung 9-15 MS²-Spektrum von 50 ng/ml D₃-Acrylamid nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 36 V, CE 20 V, Scanrate: 200 Da/s, 30 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).

9.9.2. Ansatz der Modell-Reaktionen

Alle Modell-Lösungen wurden in PBS (pH 7,3) angesetzt und jede Reaktion als Triplikat-Messung (n=3) durchgeführt. Hierzu wurde eine zehnfach konzentrierte PBS-Lösung aus 90 g NaCl, 4,09 g Na₂HPO₄, 2,1 g KH₂PO₄ in 1000 ml angesetzt, deren pH-Wert auf 7,3 eingestellt wurde. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und nach dem Abkühlen auf RT zum Herstellen der Modell-Reaktionslösungen verwendet. In je einen 250-ml-Messkolben wurden die in Tabelle 9-11 gelisteten Substanzen jeweils so eingewogen, dass je eine 5 mM Endkonzentration daraus resultierte.

Tabelle 9-11 Angesetzte Modell-Reaktionen zur Untersuchung einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung.

Ansatz	Substanz 1	Substanz 2
1	L-Asparagin	D-Glucose
2	L-Asparagin	D-Ribose
3	L-Asparagin	Methylglyoxal
4	L-Asparagin	Pyruvat
5	L-Asparagin	Phosphoenolpyruvat
6	L-Glutaminsäure	D-Glucose
7	D/L-Methionin	D-Glucose
8	Harnstoff	D-Glucose

Anschließend wurden 25 ml des zehnfach konzentrierten PBS-Puffers (pH 7,3) hinzugefügt und mit Wasser_{dd} (pH 7,3) auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem vollständigen Lösen der Substanzen wurden die Lösungen gleichmäßig auf sieben PP-Gefäße mit 50 ml Fassungsvermögen verteilt (~35 ml) und bei 37 °C in einem Trockenschrank gelagert und ab und zu geschüttelt. Die Entnahme erfolgte nach 7, 14, 28, 45, 63 und 84 Tagen. Das siebte Aliquot diente als Rückstellprobe.

9.9.3. Methode zur Bestimmung von Acrylamid in Modell-Lösungen

Aufreinigung mittels Festphasenextraktion. Die Aufarbeitung der Modell-Lösungen erfolgte angelehnt an die in Kapitel 9.3 beschriebene Methode zur Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln. Aus dem aliquotiertem Versuchsansatz (RT) wurden 30 ml entnommen und mit 100 ng D₃-Acrylamid versetzt und stark geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert, wobei als SPE-Kartuschen Isololute® ENV+ (100 mg; 10 ml) dienten. Diese wurden mit 4 ml Methanol konditioniert, mit 4 ml Wasser_{dd} equilibriert und nach der Probenaufgabe mit 3 ml Wasser_{dd} gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 ml Methanol/Wasser (60/40, v/v) und anschließendem Trocknen der Kartuschen unter gemäßigttem Vakuum. Vor der Messung mittels UHPLC-ESI-MS/MS wurden die Eluate auf <1 ml mittels Vakuumzentrifugation aufkonzentriert.

Messung mittels UHPLC-ESI-MS/MS. Als chromatographische Säule wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 (50x4,6 mm, 1,8 μm) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit entsprechender Vorsäule verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch bei 99 % Fließmittel A (0,05%ige wässrige Essigsäure) und 1 % Fließmittel B (Methanol) sowie einer konstanten Temperatur von 25 °C. Anschließend wurde die Säule gespült und rekonditioniert (Gradient siehe Tabelle 9-12). Die Retentionszeit von Acrylamid und D₃-Acrylamid lag jeweils bei 1,79 min.

Tabelle 9-12 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Acrylamid-Analytik der Modell-Reaktionen.

Zeit [min]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	600	99	1
2,0	600	99	1
2,1	600	10	90
5,0	600	10	90
5,1	600	99	1
9,0	600	99	1

Fließmittel A 0,05%ige wässrige Essigsäure; Fließmittel B Methanol.

Bei der massenspektrometrischen Detektion wurden die gerätespezifischen Parameter aus Tabelle 9-2 übernommen, es wurden jedoch zwei Qualifier-Spuren ergänzt (Tabelle 9-13). Die Integration der Analyt-Peaks erfolgte mithilfe der Software Multiquant 2.1 (Sciex, Ontario, CAN).

Tabelle 9-13 Substanzspezifische MS-Parameter der Acrylamid-Bestimmung der Modell-Reaktionen.

Analyt	Q1	Q3	dw	DP	EP	CE	CXP
Acrylamid 1	72,009	55,069	170	36	10	16	15
Acrylamid 2	72,009	27,000	170	36	10	33	12
Acrylamid 3	72,009	44,100	170	36	10	23	8
D ₃ -Acrylamid	74,998	58,060	170	36	10	15	7

Q1 Quadrupol 1 [m/z]; Q3 Quadrupol 3 [m/z]; dw *dwell time* [msec]; DP *declustering potential* [V]; EP *entrance potential* [V]; CE *collision energy* [V]; CXP *cell exit potential* [V].

9.10. Induktive und deskriptive Statistik

Die induktive sowie deskriptive Statistik der Mercaptursäure-Ausscheidung der Humanstudie I wurde von Frau Dr. Dipl.-Statistikerin Dorothea Schipp (Rosenthal-Bielatal, DE) durchgeführt. Weitere statistische Angaben in dieser Arbeit wurden mittels der Software Microsoft® Excel® 2013 bzw. 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) bzw. Origin 2018 64 bit (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

Datenaufbereitung und deskriptive Statistik der Mercaptursäure-Ausscheidung der Humanstudie I. Pro Proband wurden intra-individuelle Differenzen für jeden Zeitpunkt zum Ausgangsniveau vor dem Interventionstagen 6 bzw. 10 gebildet. Dadurch konnten Unterschiede in der Ausgangsbasis jedes Probanden geeignet berücksichtigt werden. Für AAMA- und GAMA-

Werte ohne Bezug auf ucr wurden die Einzelmessungen am selben Tag über Summenbildung zusammengefasst, um die Vergleichbarkeit der Mengen durch Betrachtung gleich langer Zeiträume zu gewährleisten.

Die Kinetiken wurden anhand der Fläche unter der Ausscheidungsmengen-Zeit-Kurve (engl. *area under curve*, AUC), der Spitzenmengen im Urin (c_{\max}), sowie des Zeitpunktes des Auftretens der Spitzenmenge (t_{\max}) verglichen. Die AUC berechnet sich als:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} ((t_{i+1} - t_i) * (c_i + c_{i+1}))$$

Dabei bezeichnen c_i die Konzentrationen zum Zeitpunkt t_i .

Induktive Statistik. Zum Vergleich der Gruppen wurden Verfahren für zwei unabhängige Stichproben herangezogen. Aufgrund der geringen Stichprobengröße beider Humanstudien waren Tests der Normalverteilungshypothese kaum aussagekräftig. Der Vergleich der Gruppenmittelwerte wurde parametrisch über den Zwei-Stichproben-t-Test oder der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummen-Tests durchgeführt. Die statistischen Tests der Humanstudie I überprüften die Hypothese „Es bestehen keine Unterschiede in den Mittelwerten (Medianen) der Gruppen“ gegen die zweiseitige Alternativhypothese „Die Unterschiede in den Mittelwerten der Dosierungen sind von Null verschieden“. Die Tests wurden zum 5 %-Signifikanzniveau durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham K, Monien B, Lampen A (2017) Biomarker der internen Exposition gegenüber toxikologisch relevanten Kontaminanten in Lebensmitteln. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz:1–7. doi: 10.1007/s00103-017-2558-1
- Aitio A (1999) Biomarkers and their use in occupational medicine. Scandinavian journal of work, environment & health 25(6):521–528
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2015) Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. Frontiers in neuroscience 9:23. doi: 10.3389/fnins.2015.00023
- Alwis KU, Blount BC, Britt AS, Patel D, Ashley DL (2012) Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). Analytica chimica acta 750:152–160. doi: 10.1016/j.aca.2012.04.009
- Amrein TM, Bachmann S, Noti A, Biedermann M, Barbosa MF, Biedermann-Brem S, Grob K, Keiser A, Realini P, Escher F, Amadó R (2003) Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(18):5556–5560. doi: 10.1021/jf034344v
- Andrzejewski D, Roach JAG, Gay ML, Musser SM (2004) Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(7):1996–2002. doi: 10.1021/jf0349634
- Angerer J, Schaller K-H (2001) Analyses of hazardous substances in biological materials, vol. 8. WILEY-VCH Verlag, Weinheim
- Barber D, Hunt J, Ehrich M, Lehning E, LoPachin R (2001) Metabolism, Toxicokinetics and Hemoglobin Adduct Formation in Rats Following Subacute and Subchronic Acrylamide Dosing. NeuroToxicology 22(3):341–353. doi: 10.1016/S0161-813X(01)00024-9
- Barregard L, Ellingsen DG, Berlinger B, Weinbruch S, Harari F, Sallsten G (2021) Normal variability of 22 elements in 24-hour urine samples - Results from a biobank from healthy non-smoking adults. International journal of hygiene and environmental health 233:113693. doi: 10.1016/j.ijheh.2021.113693
- Barrett JR (2016) Studies Need More than a Spot Sample: Variability of Urinary Metal Levels over Time. Environmental health perspectives 124(4):A77. doi: 10.1289/ehp.124-A77
- Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Merz K, Rudolphi M, Zankl H, Eisenbrand G (2005) Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. Mutation research 580(1-2):61–69. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.11.007
- Becalski A, Lau BP-Y, Lewis D, Seaman SW, Hayward S, Sahagian M, Ramesh M, Leclerc Y (2004) Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(12):3801–3806. doi: 10.1021/jf0349376
- Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. Epidemiologic reviews 18(2):188–204. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a017925
- Benowitz NL, Jacob P (1987) Metabolism, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nicotine in Man. In: Martin WR, Loon GR, Iwamoto ET, Davis L (eds) Tobacco Smoking and Nicotine. A Neurobiological Approach, vol 31. Springer US, Boston, MA, pp 357–373
- Benowitz NL, Jacob P (1994) Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. Clinical pharmacology and therapeutics 56(5):483–493. doi: 10.1038/clpt.1994.169
- Benowitz NL, Jacob P, Fong I, Gupta S (1994) Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 268(1):296–303

- Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, Jones RT, Osman AL (1983) Cotinine disposition and effects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 34(5):604–611. doi: 10.1038/clpt.1983.222
- Berger F (2010) Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Lebensmittelkontaminante Acrylamid in Ratte und Mensch: Metabolism and bioavailability of the food contaminant acrylamide in rat and human. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern
- Berger FI, Feld J, Bertow D, Eisenbrand G, Fricker G, Gerhardt N, Merz K-H, Richling E, Baum M (2011) Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: A study in rats. *Mol Nutr Food Res* 55(3):387–399. doi: 10.1002/mnfr.201000234
- Bergmark E (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology* 10(1):78–84. doi: 10.1021/tx960113p
- Bergmark E, Calleman CJ, He FS, Costa LG (1993) Determination of Hemoglobin Adducts in Humans Occupationally Exposed to Acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 120(1):45–54. doi: 10.1006/taap.1993.1085
- Bjellaas T, Janák K, Lundanes E, Kronberg L, Becher G (2005) Determination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 35(10-11):1003–1018. doi: 10.1080/00498250500356506
- Bjellaas T, Olesen PT, Frandsen H, Haugen M, Stølen LH, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G (2007a) Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicological Sciences* 98(1):110–117. doi: 10.1093/toxsci/kfm091
- Bjellaas T, Stølen LH, Haugen M, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G (2007b) Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. *Food and Chemical Toxicology* 45(6):1020–1026. doi: 10.1016/j.fct.2006.12.007
- Boettcher M, Bolt H, Drexler H, Angerer J (2006a) Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch Toxicol* 80(2):55–61. doi: 10.1007/s00204-005-0011-y
- Boettcher MI, Angerer J (2005) Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC–ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 824(1):283–294
- Boettcher MI, Bolt HM, Angerer J (2006b) Acrylamide exposure via the diet: influence of fasting on urinary mercapturic acid metabolite excretion in humans. *Archives of toxicology* 80(12):817–819. doi: 10.1007/s00204-006-0123-z
- Boettcher MI, Schettgen T, Kütting B, Pischetsrieder M, Angerer J (2005) Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutation research* 580(1-2):167–176. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.11.010
- Bramer SL, Kallungal BA (2003) Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers* 8(3-4):187–203. doi: 10.1080/13547500310012545
- Brathen E, Knutsen S (2005) Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry* 92(4):693–700. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.030
- Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V. (2004) Qualitätssicherung - Handbuch Validierung analytischer Verfahren für die Arzneimittel-Herstellung: HPLC, DC, Titration und GC Etablierung von Referenzstandards Systemeignungstests, Verfahrenstransfer, Revalidierung, 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. BAH
- Carlsson H, Stedingk H von, Nilsson U, Törnqvist M (2014) LC–MS/MS Screening Strategy for Unknown Adducts to N-Terminal Valine in Hemoglobin Applied to Smokers and Nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology* 27(12):2062–2070. doi: 10.1021/tx5002749
- DGE (2015) New Reference Values for Energy Intake. *Annals of nutrition & metabolism* 66(4):219–223. doi: 10.1159/000430959

- Diekmann J, Wittig A, Stabbert R (2008) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. *Journal of Chromatographic Science* 46(7):659–663. doi: 10.1093/chromsci/46.7.659
- Doerge DR, Twaddle NC, Boettcher MI, McDaniel LP, Angerer J (2007) Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicology Letters* 169(1):34–42. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.12.002
- Doroshenko O, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, Reith Y, Lazar A, Taubert D, Kirchheiner J, Baum M, Eisenbrand G, Berger F-I, Bertow D, Berkessel A, Sörgel F, Schömig E, Tomalik-Scharte D (2009) In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 18(2):433–443. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0832
- Duale N, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen JE, Frandsen H, Olesen PT, Brunborg G (2009) Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 108(1):90–99. doi: 10.1093/toxsci/kfn269
- EFSA (2015) Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal* 2015 13(6):321. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4104
- Eisenbrand G (2020) Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure. *Archives of toxicology*. doi: 10.1007/s00204-020-02794-3
- FAO/WHO (2002) Health implications of acrylamide in food: Report of a Joint FAO/WHO consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25 - 27 June 2002. Food safety programme. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- FAO/WHO (2006) Safety evaluation of certain contaminants in food: Prepared by the sixty-fourth meeting of the Joint FAO. FAO food and nutrition paper, vol 82. World Health Organization, Geneva
- FAO/WHO (2011) Evaluation of Certain Contaminants in Food: Seventy-second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report. World Health Organization, Geneva
- Fennell TR, Friedman MA (2005) Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Advances in experimental medicine and biology* 561:109–116. doi: 10.1007/0-387-24980-X_9
- Fennell TR, Kedderis GL, Sumner SC (1991) Urinary metabolites of 1,2,3-¹³Cacrylonitrile in rats and mice detected by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology* 4(6):678–687. doi: 10.1021/tx00024a013
- Fennell TR, Sumner SC, Walker VE (1992) A model for the formation and removal of hemoglobin adducts. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1(3):213
- Fennell TR, Sumner SCJ, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA (2006) Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences* 93(2):256–267. doi: 10.1093/toxsci/kfl069
- Fennell TR, Sumner SCJ, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences* 85(1):447–459. doi: 10.1093/toxsci/kfi069
- Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, 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 PM, Barnes JM (1966) Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *British Journal of Industrial Medicine* 23(3):210–221. doi: 10.1136/oem.23.3.210
- Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Tungeln LS von, Beland FA, Marques MM, Doerge DR (2003) DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research in Toxicology* 16(10):1328–1337. doi: 10.1021/tx034108e

- Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, Doerge DR (2005) Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences* 88(2):311–318. doi: 10.1093/toxsci/kfi307
- Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, 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, Critical reviews* 12(5-6):389–439. doi: 10.1080/10937400903158375
- Goempel K, Tedsen L, Ruenz M, Bakuradze T, Schipp D, Galan J, Eisenbrand G, Richling E (2017) Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background. *Archives of toxicology* 91(11):3551–3560. doi: 10.1007/s00204-017-1990-1
- Goerke K, Ruenz M, Lampen A, Abraham K, Bakuradze T, Eisenbrand G, Richling E (2019) Biomonitoring of nutritional acrylamide intake by consumers without dietary preferences as compared to vegans. *Archives of toxicology* 93(4):987–996. doi: 10.1007/s00204-019-02412-x
- Goniewicz ML, Gawron M, Smith DM, Peng M, Jacob P, Benowitz NL (2017) Exposure to Nicotine and Selected Toxicants in Cigarette Smokers Who Switched to Electronic Cigarettes: A Longitudinal Within-Subjects Observational Study. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 19(2):160–167. doi: 10.1093/ntr/ntw160
- Hagmar L, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aperia P, Granath F, Axmon A (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian journal of work, environment & health* 27(4):219–226. doi: 10.5271/sjweh.608
- Hansen SH, Olsen AK, Søderlund EJ, 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. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.012
- Hartmann EC, Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J (2009) N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-L-cysteine (iso-GAMA) a further product of human metabolism of acrylamide: comparison with the simultaneously excreted other mercaptuic acids. *Archives of toxicology* 83(7):731–734. doi: 10.1007/s00204-008-0369-8
- Hartmann EC, Boettcher MI, Schettgen T, Fromme H, Drexler H, Angerer J (2008) Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15):6061–6068
- Hartmann EC, Latzin JM, Schindler BK, Koch HM, Angerer J (2011) Excretion of 2,3-dihydroxy-propionamide (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. doi: 10.1007/s00204-010-0605-x
- Hashimoto K, Aldridge WN (1970) Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochemical Pharmacology* 19(9):2591–2604. doi: 10.1016/0006-2952(70)90009-2
- Hashimoto K, Sakamoto J, Tanii H (1981) Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Archives of toxicology* 47(3):179–189
- Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3(10):733–744
- Heudorf U, Hartmann E, 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. doi: 10.1016/j.ijheh.2008.04.006
- Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology* 14(7):767–790. doi: 10.1021/tx000260u
- Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological reviews* 57(1):79–115. doi: 10.1124/pr.57.1.3
- IARC (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Industrial Chemicals 60:389–433

- IFA (2018) GESTIS-Stoffdatenbank, Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung.: Acrylamid. <https://www.dguv.de/ifa/gestis/gestis-stoffdatenbank/index.jsp>
- Jakubowski M, Linhart I, Pielas G, Kopecký J (1987) 2-Cyanoethylmercapturic acid (CEMA) in the urine as a possible indicator of exposure to acrylonitrile. *British Journal of Industrial Medicine* 44(12):834–840
- Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L, Zhong L (2007) Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 21(8):1486–1492. doi: 10.1016/j.tiv.2007.06.011
- Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS (1999) Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7(2):127–133. doi: 10.1016/S1382-6689(99)00005-8
- Kawahara J, Zheng Y, Terui M, Shinohara A, Uyama K, Yoneyama M, Nakajima D, Shibata Y, Adachi S (2019) Dietary exposure to acrylamide in a group of Japanese adults based on 24-hour duplicate diet samples. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*:1–11. doi: 10.1080/19440049.2018.1555378
- Kawamura T, Muraoka I (2018) Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. *Antioxidants* 7(9). doi: 10.3390/antiox7090119
- Kellert M, Scholz K, Wagner S, Dekant W, 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(1-2):58–66. doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.026
- Kim TH, Shin S, Kim KB, Seo WS, Shin JC, Choi JH, Weon K-Y, Joo SH, Jeong SW, Shin BS (2015) Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Talanta* 131:46–54. doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.042
- Koch HM, Aylward LL, Hays SM, Smolders R, Moos RK, Cocker J, Jones K, Warren N, Levy L, Bevan R (2014) Inter- and intra-individual variation in urinary biomarker concentrations over a 6-day sampling period. Part 2: Personal care product ingredients. *Toxicology Letters* 231(2):261–269. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.023
- Kopp EK, 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. doi: 10.1016/j.taap.2008.12.001
- Kopp EK, Sieber M, Kellert M, 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. doi: 10.1021/jf801715f
- Kotemori A, Ishihara J, Nakadate M, Sawada N, Iwasaki M, Sobue T, Tsugane S (2018) Validity of a Self-administered Food Frequency Questionnaire for the Estimation of Acrylamide Intake in the Japanese Population: The JPHC FFQ Validation Study. *Journal of epidemiology* 28(12):482–487. doi: 10.2188/jea.JE20170186
- Kotova N, Frostne C, Abramsson-Zetterberg L, Tareke E, Bergman R, Haghdoost S, Paulsson B, Törnqvist M, Segerbäck D, Jenssen D, Grawé J (2015) Differences in micronucleus frequency and acrylamide adduct levels with hemoglobin between vegetarians and non-vegetarians. *European Journal of Nutrition* 54(7):1181–1190. doi: 10.1007/s00394-014-0796-7
- Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinase N, Honma M (2006) Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation research* 603(2):151–158. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.11.006
- Kraus D, Rokitta D, Fuhr U, 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. doi: 10.3109/15376516.2012.759307

- Kuo H-W, Yang J-S, Chiu M-C (2002) Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Chromatography B* 768(2):297–303. doi: 10.1016/S1570-0232(01)00613-4
- Lantz I, Ternité R, Wilkens J, Hoenicke K, Guenther H, van der Stegen GHD (2006) Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. *Mol Nutr Food Res* 50(11):1039–1046. doi: 10.1002/mnfr.200600069
- Latzin JM, Schindler BK, Weiss T, Angerer J, Koch HM (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. doi: 10.1007/s00216-011-5692-x
- Luo X, Carmella SG, Chen M, Jensen JA, Wilkens LR, Le Marchand L, Hatsukami DK, Murphy SE, Hecht SS (2020) Urinary Cyanoethyl Mercapturic Acid, a Biomarker of the Smoke Toxicant Acrylonitrile, Clearly Distinguishes Smokers From Nonsmokers. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 22(10):1744–1747. doi: 10.1093/ntr/ntaa080
- Mack D, Schätzle S, Traa Y, Klemm E (2019) Synthesis of Acrylonitrile from Renewable Lactic Acid. *ChemSusChem* 12(8):1653–1663. doi: 10.1002/cssc.201802914
- Manière I, Godard T, Doerge DR, Churchwell MI, Guffroy M, Laurentie M, Poul J-M (2005) DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation research* 580(1-2):119–129. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.10.012
- Marquard H, Schäfer SG, Barth H (2019) *Toxikologie*, 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart
- Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T (2014) Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences* 16(1):378–400. doi: 10.3390/ijms16010378
- Matissek R, Fischer M, Steiner G (2018) *Lebensmittelanalytik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- McCollister DD, Oyen F, Rowe VK (1964) Toxicology of acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 6(2):172–181
- Mesias M, Delgado-Andrade C, Holgado F, Morales FJ (2018) Acrylamide content in French fries prepared in households: A pilot study in Spanish homes. *Food Chemistry* 260:44–52. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.140
- Miller MJ, Carter DE, Sipes IG (1982) Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 63(1):36–44. doi: 10.1016/0041-008X(82)90024-2
- Minet E, Cheung F, Errington G, Sterz K, 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
- Mojska H, Gielecińska I (2013) Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 64(3):173–181
- Moldoveanu SC, Gerardi AR (2011) Acrylamide Analysis in Tobacco, Alternative Tobacco Products, and Cigarette Smoke. *Journal of Chromatographic Science* 49(3):234–242. doi: 10.1093/chrscl/49.3.234
- Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419:448 EP -. doi: 10.1038/419448a
- Muttucumaru N, Powers SJ, Elmore JS, Dodson A, Briddon A, Mottram DS, Halford NG (2017) Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation. *Food Chemistry* 220:76–86. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.199
- Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B (2009) Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 12(5-6):362–388. doi: 10.1080/10937400903158359

- Nixon BJ, Stanger SJ, Nixon B, Roman SD (2012) Chronic Exposure to Acrylamide Induces DNA Damage in Male Germ Cells of Mice. *Toxicological Sciences* 129(1):135–145. doi: 10.1093/toxsci/kfs178
- NTP (2012) Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide (CASRN 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). National Toxicology Program technical report series(575):1–234
- Pan J, Chung F-L (2002) Formation of cyclic deoxyguanosine adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids under oxidative conditions. *Chemical Research in Toxicology* 15(3):367–372
- Paulsson B, Athanassiadis I, Rydberg P, Törnqvist M (2003) Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 17(16):1859–1865. doi: 10.1002/rcm.1116
- Petersen GO, Leite CE, Chatkin JM, Thiesen FV (2010) Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: development of a HPLC method and comparison of matrices. *Journal of separation science* 33(4-5):516–521. doi: 10.1002/jssc.200900575
- Raters M, Sefkow M, Baum M, Schieber A (2019) Acrylamid. Thieme Gruppe (<https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-01-00620>, abgerufen am 23.01.2021)
- Rietjens IMCM, Dussort P, Günther H, Hanlon P, Honda H, Mally A, O'Hagan S, Scholz G, Seidel A, Swenberg J, Teeguarden J, Eisenbrand G (2018) Exposure assessment of process-related contaminants in food by biomarker monitoring. *Archives of toxicology*. doi: 10.1007/s00204-017-2143-2
- 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. doi: 10.1007/s00204-015-1494-9
- Ruenz M, Goerke K, Bakuradze T, Abraham K, Lampen A, Eisenbrand G, Richling E (2019) Sustained Human Background Exposure to Acrolein Evidenced by Monitoring Urinary Exposure Biomarkers. *Mol Nutr Food Res* 63(24):e1900849. doi: 10.1002/mnfr.201900849
- Rydberg P, Lüning B, Wachtmeister CA, Eriksson L, Törnqvist M (2002) Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts: mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoin. *Chemical Research in Toxicology* 15(4):570–581. doi: 10.1021/tx000247
- Schaller K-H, Angerer J, Lehnert G (1993) Bio-Monitoring in der Arbeits-und Umweltmedizin. *Dt Ärztebl* 90
- Schettgen T, Bertram J, Kraus T (2012) Accurate quantification of the mercapturic acids of acrylonitrile and its genotoxic metabolite cyanoethylene-epoxide in human urine by isotope-dilution LC-ESI/MS/MS. *Talanta* 98:211–219. doi: 10.1016/j.talanta.2012.06.074
- Schettgen T, Musiol A, Alt A, Ochsmann E, Kraus T (2009) A method for the quantification of biomarkers of exposure to acrylonitrile and 1,3-butadiene in human urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 393(3):969–981. doi: 10.1007/s00216-008-2510-1
- Schettgen T, Rossbach B, Kütting B, Letzel S, Drexler H, Angerer J (2004) Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *International journal of hygiene and environmental health* 207(6):531–539. doi: 10.1078/1438-4639-00324
- Schettgen T, Weiss T, Drexler H, Angerer J (2003) A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int J Hyg Environ Health* 206(1):9–14. doi: 10.1078/1438-4639-00195
- Shepherd L, Bradshaw JE, Dale M, McNicol JW, Pont S, Mottram DS, Davies HV (2010) Variation in acrylamide producing potential in potato: Segregation of the trait in a breeding population. *Food Chemistry* 123(3):568–573. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.070

- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000) "IARC Group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 38(4):371–383. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00156-8
- Smolders R, Koch HM, Moos RK, Cocker J, Jones K, Warren N, Levy L, Bevan R, Hays SM, Aylward LL (2014) Inter- and intra-individual variation in urinary biomarker concentrations over a 6-day sampling period. Part 1: metals. *Toxicology Letters* 231(2):249–260. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.08.014
- Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419:449 EP -. doi: 10.1038/419449a
- Stadler RH, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S, Goldmann T, Hau J, 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. doi: 10.1021/jf0495486
- Stedingk H von, Rydberg P, Törnqvist M (2010) A new modified Edman procedure for analysis of N-terminal valine adducts in hemoglobin by LC-MS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 878(27):2483–2490. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.03.034
- Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research in Toxicology* 12(11):1110–1116. doi: 10.1021/tx990040k
- Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR (1992) Characterization and quantitation of urinary metabolites of 1,2,3-¹³Cacrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology* 5(1):81–89. doi: 10.1021/tx00025a014
- Sumner SC, Selvaraj L, Nauhaus SK, Fennell TR (1997) Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chemical Research in Toxicology* 10(10):1152–1160. doi: 10.1021/tx9602123
- Sumner SCJ, Williams CC, Snyder RW, Krol WL, Asgharian B, Fennell TR (2003) Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicological Sciences* 75(2):260–270. doi: 10.1093/toxsci/kfg191
- Tareke E, Heinze TM, Gamboa da Costa G, 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, Ali SF (2008) Acrylamide: A Dietary Carcinogen Formed in Vivo? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15):6020–6023. doi: 10.1021/jf703749h
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002) Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(17):4998–5006. doi: 10.1021/jf020302f
- Thieme (ed) (2019) Römpp Online-Lexikon: "Harn", zuletzt geprüft am 19.06.2019
- Thompson SG, Stone R, Nanchahal K, Wald NJ (1990) Relation of urinary cotinine concentrations to cigarette smoking and to exposure to other people's smoke. *Thorax* 45(5):356–361. doi: 10.1136/thx.45.5.356
- Tilson HA, Cabe PA (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. doi: 10.1016/0041-008X(79)90319-3
- Törnqvist M, Mowrer J, Jensen S, Ehrenberg L (1986) Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Analytical biochemistry* 154(1):255–266
- Umweltbundesamt (2008) Acrylamid und Human-Biomonitoring. Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes (Acrylamide and human biomonitoring. Position of the Human Biomonitoring Committee of the Federal Environmental Agency). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 51(1):98–108. doi: 10.1007/s00103-008-0424-x
- Urban M, Kavvadias D, Riedel K, Scherer G, Tricker AR (2006) Urinary Mercapturic Acids and a Hemoglobin Adduct for the Dosimetry of Acrylamide Exposure in Smokers and Nonsmokers. *Inhalation Toxicology* 18(10):831–839. doi: 10.1080/08958370600748430

- Vesper HW, Slimani N, Hallmans G, Tjønneland A, Agudo A, Benetou V, Bingham S, Boeing H, Boutron-Ruault M-C, Bueno-de-Mesquita HB, Chirlaque D, Clavel-Chapelon F, Crowe F, Drogan D, Ferrari P, Johansson I, Kaaks R, Linseisen J, Lund E, Manjer J, Mattiello A, Palli D, Peeters PHM, Rinaldi S, Skeie G, Trichopoulou A, Vineis P, Wirfält E, Overvad K, Strömberg U (2008) Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15):6046–6053. doi: 10.1021/jf703750t
- Vikström AC, Warholm M, Paulsson B, Axmon A, Wirfält E, Törnqvist M (2012) Hemoglobin adducts as a measure of variations in exposure to acrylamide in food and comparison to questionnaire data. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 50(7):2531–2539. doi: 10.1016/j.fct.2012.04.004
- Vistoli G, Maddis D de, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, 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. doi: 10.3109/10715762.2013.815348
- Vleeschouwer K de, van der Plancken I, van Loey A, Hendrickx ME (2007) Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology progress* 23(3):722–728. doi: 10.1021/bp060389f
- Wald N, Boreham J, Bailey A, Ritchie C, Haddow J, Knight G (1984) Urinary Cotinine As Marker Of Breathing Other People's Tobacco Smoke. *The Lancet* 323(8370):230–231. doi: 10.1016/S0140-6736(84)92156-1
- Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B (2009) Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 12(5-6):440–472. doi: 10.1080/10937400903158383
- Wang Q, Chen X, Ren Y, Chen Q, Meng Z, Cheng J, Zheng Y, Zeng W, Zhao Q, Zhang Y (2017) 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* 91(5):2107–2118. doi: 10.1007/s00204-016-1869-6
- Wang Y-X, Feng W, Zeng Q, Sun Y, Wang P, You L, Yang P, Huang Z, Yu S-L, Lu W-Q (2016) Variability of Metal Levels in Spot, First Morning, and 24-Hour Urine Samples over a 3-Month Period in Healthy Adult Chinese Men. *Environmental health perspectives* 124(4):468–476. doi: 10.1289/ehp.1409551
- Watzek N, Böhm N, Feld J, Scherbl D, Berger F, Merz KH, Lampen A, Reemtsma T, Tannenbaum SR, Skipper PL (2012a) N 7-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, Doroshenko O, Fuhr U, Tomalik-Scharte D, Baum M, Eisenbrand G, Richling E (2012b) Profiling of mercapturic acids of acrolein and acrylamide in human urine after consumption of potato crisps. *Mol Nutr Food Res* 56(12):1825–1837. doi: 10.1002/mnfr.201200323
- Watzek N, Scherbl D, Schug M, Hengstler JG, Baum M, Habermeyer M, Richling E, Eisenbrand G (2013) Toxicokinetics of acrylamide in primary rat hepatocytes: coupling to glutathione is faster than conversion to glycidamide. *Archives of toxicology* 87(8):1545–1556
- Witt KL, Livanos E, Kissling GE, Torous DK, Caspary W, Tice RR, 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* 649(1-2):101–113. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.08.004
- Wu C-F, Uang S-N, Chiang S-Y, Shih W-C, Huang Y-F, Wu K-Y (2012) Simultaneous quantitation of urinary cotinine and acrylonitrile-derived mercapturic acids with ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 402(6):2113–2120. doi: 10.1007/s00216-011-5661-4

- Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G, Shi J (2014) Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology* 69:1–12. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.037
- Yamada H, Kobayashi M (1996) Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 60(9):1391–1400. doi: 10.1271/bbb.60.1391
- Yamamoto J, Ishihara J, Kotemori A, Nakadate M, Sobue T (2018) Validity of Estimated Acrylamide Intake by the Dietary Record Method and Food Frequency Questionnaire in Comparison with a Duplicate Method: A Pilot Study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 64(5):340–346. doi: 10.3177/jnsv.64.340
- Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14):3999–4003. doi: 10.1021/jf0300947
- Yener Y (2013) Effects of long term low dose acrylamide exposure on rat bone marrow polychromatic erythrocytes. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 88(6):356–360. doi: 10.3109/10520295.2013.790561
- Yener Y, Dikmenli M (2009) Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food and Chemical Toxicology* 47(8):2120–2123. doi: 10.1016/j.fct.2009.05.037
- Zeiger E, Recio L, Fennell TR, Haseman JK, Snyder RW, Friedman M (2009) Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 107(1):247–257. doi: 10.1093/toxsci/kfn214
- Zhang Y, Wang Q, Cheng J, Zhang J, Xu J, Ren Y (2015) Comprehensive profiling of mercapturic acid metabolites from dietary acrylamide as short-term exposure biomarkers for evaluation of toxicokinetics in rats and daily internal exposure in humans using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 894:54–64. doi: 10.1016/j.aca.2015.08.033
- Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem* 51(16):4782–4787

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1 Eigenschaften von Acrylamid [IFA, 2018].....	2
Tabelle 2-2 Acrylamid-Gehalte verschiedener Lebensmittelgruppen [modifiziert nach EFSA, 2015].	7
Tabelle 2-3 Prozentuale renale Ausscheidung von Acrylamid-assoziierten Mercaptursäuren innerhalb von 24 h nach Einmalgabe von Acrylamid in Wasser von Nagern und Menschen (modifiziert nach Kopp und Dekant [2009], EFSA [2015]).	15
Tabelle 2-4 Acrylamid-Exposition in $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ verschiedener Altersgruppen der europäischen Allgemeinbevölkerung gemäß [EFSA, 2015].	20
Tabelle 2-5 Humanstudien zur Erfassung der AAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern und Rauchern.	23
Tabelle 2-6 Humanstudien zur Erfassung der GAMA-Ausscheidung von Nichtrauchern und Rauchern.	23
Tabelle 2-7 Kinetische Parameter der Mercaptursäure-Ausscheidung nach Konsum von Kartoffelchips, entsprechend einer Acrylamid-Aufnahme von $12,6 \mu\text{g}/\text{kg KG}$, einer humanen Interventionsstudie von Wang <i>et al.</i> [2017].	25
Tabelle 2-8 Kinetische Parameter der Mercaptursäure-Ausscheidung nach niedriger (Tag 4) und hoher (Tag 7) Acrylamid-Aufnahme der humanen Interventionsstudie von Ruenz <i>et al.</i> [2016].	26
Tabelle 2-9 Publierte Humanstudien zu AAVal-Leveln im Blut verschiedener Personengruppen.	28
Tabelle 2-10 Publierte Humanstudien zu GAVal-Leveln im Blut verschiedener Personengruppen.	29
Tabelle 4-1 Ernährungsplan für das <i>Washout</i> -Mahlzeiten Nr. 1–3.	39
Tabelle 4-2 Ernährungsplan der Probanden der Gruppe A an Tag 10 (<i>high AA</i>).	41
Tabelle 4-3 Kalorienaufnahme der Probanden während der 13-tägigen Humanstudie I.	41
Tabelle 4-4 Randomisierung und Informationen über Alter, Körpergewicht, Körpergröße sowie <i>body mass index</i> (BMI) der Probanden der Humanstudie I zum Zeitpunkt der Voruntersuchung.	43
Tabelle 5-1 Informationen über Geschlecht, Körpergewicht, -größe, BMI und Alter der Probanden der Humanstudie II zum Zeitpunkt der Voruntersuchung sowie die in dieser Arbeit verwendete Codierung, die Ernährungsform während der Studie und die Gruppe der Studiendurchführung.	47
Tabelle 6-1 Messpräzision der Acrylamid- und Acrolein-Mercaptursäuren-Analytik.	50
Tabelle 6-2 Ermittelte Acrylamid-Gehalte der Duplikat-Mahlzeiten und -Lebensmittel der Humanstudie I mit matrixabhängigen Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ).	60
Tabelle 6-3 Gehalte an Gesamtzucker und reduzierenden Zuckern der Pommes frites (Mittag- und Abendessen) bzw. Kartoffeln, aus der die Pommes frites zubereitet worden sind.	62
Tabelle 6-4 Asparagin- und Eiweißgehalte der Pommes frites (Mittag- und Abendessen) bzw. Kartoffeln, aus der die Pommes frites zubereitet worden sind (analysiert durch Institut Kuhlmann GmbH). N= eiweißspezifischer Stickstoff-Faktor	63
Tabelle 6-5 Kinetik-Daten der AAMA- und GAMA-Ausscheidung der Gruppe A der Humanstudie I nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme ($14,1\text{--}15,9 \mu\text{g}/\text{kg KG}$). Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum und Maximum.	74
Tabelle 6-6 Absolut ausgeschiedene Mengen der Mercaptursäuren AAMA und GAMA sowie prozentuale Ausscheidung nach hoher alimentärer Acrylamid-Aufnahme von $14,1\text{--}15,9 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ (Interventionsstag <i>high AA</i> , Tag 10) der Gruppe A bis Studienende der Humanstudie I.	74
Tabelle 6-7 Kinetik-Daten der $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Ausscheidung der Gruppe A der Humanstudie I nach oraler Einmalgabe von $1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung sowie Minimum und Maximum.	77
Tabelle 6-8 Absolut ausgeschiedene Mengen der Mercaptursäure $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA sowie prozentuale Dosis-Anteile nach oraler Gabe von $1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$ $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -Acrylamid der Gruppe B der Humanstudie I.	78

Tabelle 6-9 Hämoglobin-Addukt-Level von Acrylamid (AAVal) and Glycidamid (GAVal) während der Humanstudie I. Die Blutentnahmen fanden zu Beginn der Studie (1), am Morgen des 8. Studientages (2) sowie am Ende der Studie (3) statt.	79
Tabelle 6-10 In Lebensmittelkategorien zusammengefasste mittlere, minimale und maximale quantifizierbare Acrylamid-Gehalte verschiedener in Humanstudie II verzehrter Lebensmittel.....	86
Tabelle 6-11 Mittlere und absolute maximale tägliche Acrylamid-Aufnahme verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.....	88
Tabelle 6-12 Minimale, maximale und mittlere tägliche AAMA- bzw. GAMA-Ausscheidung als absolut ausgeschiedene Mengen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.	92
Tabelle 6-13 Minimale, maximale und mittlere AAMA- bzw. GAMA Ausscheidung als Kreatinin-korrigierte Konzentrationen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.....	93
Tabelle 6-14 Minimale, maximale und mittlere tägliche Cotinin- und CYMA-Ausscheidung als absolut ausgeschiedene Mengen verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.	97
Tabelle 6-15 Minimale, maximale und mittlere tägliche Cotinin-Ausscheidung in µg/l verschiedener Personengruppen während der zehntägigen Humanstudie II.....	97
Tabelle 6-16: Prozentuales Verhältnis des jeweiligen Kreatinin-korrigierten AAMA-Gehaltes des Spoturins des jeweiligen Studientages zu (a) den gemittelten Sammelzeiträumen des gleichen Studientages (08:00–20:00 Uhr und 20:00–08:00 Uhr) und (b) des Übernacht-Sammelzeitraumes, zu dem der Spoturin gehörte (20:00–08:00 Uhr).....	129
Tabelle 9-1 Schritte der Gradientenelution zur HPLC-Methode der Acrylamid-Analytik.....	145
Tabelle 9-2 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter zur Detektion von Acrylamid und D ₃ -Acrylamid.	146
Tabelle 9-3 Eingesetzte Standard-Konzentrationen, welcher zu der Urinprobe P2-Tag 13(0–12 h) aufdotiert wurden, zur Bestimmung der Wiederfindung von AAMA, GAMA, HPMA und CEMA.	148
Tabelle 9-4 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Mercaptursäure-Analytik.....	152
Tabelle 9-5 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Mercaptursäure-Analytik.....	153
Tabelle 9-6 Eingesetzte Standard-Lösungen zur Bestimmung der Wiederfindung von Cotinin und CYMA.	154
Tabelle 9-7 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Tabakrauch-Biomarker-Analytik.....	157
Tabelle 9-8 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Cotinin- und CYMA-Analytik.....	158
Tabelle 9-9 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Hämoglobin-Addukte-Analytik.....	163
Tabelle 9-10 Substanz- und gerätespezifische MS-Parameter der Hämoglobin-Addukte-Analytik.....	163
Tabelle 9-11 Angesetzte Modell-Reaktionen zur Untersuchung einer möglichen endogenen Acrylamid-Bildung.....	166
Tabelle 9-12 Schritte der Gradientenelution zur UHPLC-Methode der Acrylamid-Analytik der Modell-Reaktionen.....	167
Tabelle 9-13 Substanzspezifische MS-Parameter der Acrylamid-Bestimmung der Modell-Reaktionen.....	167
Tabelle 0-1 Dokumentierte Körpergewichte der Probanden der Humanstudie I. Das Wiegen erfolgte nüchtern vor dem Frühstück (08:00 Uhr) des jeweiligen Studientages.....	189
Tabelle 0-2 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 1–6 der Humanstudie I.....	190
Tabelle 0-3 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 7–12 der Humanstudie I.....	191
Tabelle 0-4 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 1–6 der Humanstudie I. n. b. nicht bestimmt, da Proband in diesem Sammelzeitraum keinen Urin abgegeben hat.	192
Tabelle 0-5 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 7–12 der Humanstudie I.....	193
Tabelle 0-6 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe A der Humanstudie I.....	194
Tabelle 0-7 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe A der Humanstudie I.....	195
Tabelle 0-8 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.....	196

Tabelle 0-9 $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.....	197
Tabelle 0-10 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.	198
Tabelle 0-11 Übersicht über die Acrylamid-Bildung (in ppm) der jeweils 5 mM Reaktionsansätze 1–4 in 250 ml. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung.....	199
Tabelle 0-12 Übersicht über die Acrylamid-Bildung (in ppm) der jeweils 5 mM Reaktionsansätze 5–8 in 250 ml. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung.....	199
Tabelle 0-13 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	200
Tabelle 0-14 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).....	201
Tabelle 0-15 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).....	202
Tabelle 0-16 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	203
Tabelle 0-17 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).....	204
Tabelle 0-18 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).....	205
Tabelle 0-19 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).....	206
Tabelle 0-20 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	207
Tabelle 0-21 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).....	208
Tabelle 0-22 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).....	209
Tabelle 0-23 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).....	210
Tabelle 0-24 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	211
Tabelle 0-25 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–7 (Humanstudie II).....	212
Tabelle 0-26 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).....	213
Tabelle 0-27 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).....	214
Tabelle 0-28 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–8 (Humanstudie II).....	215
Tabelle 0-29 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).....	216
Tabelle 0-30 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).....	217
Tabelle 0-31 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–6 (Humanstudie II).....	218
Tabelle 0-32 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).....	219
Tabelle 0-33 Von GK-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–5 (Humanstudie II).....	220
Tabelle 0-34 Von GK-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–10 (Humanstudie II).....	221
Tabelle 0-35 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	222
Tabelle 0-36 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).....	223
Tabelle 0-37 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–9 (Humanstudie II).....	224
Tabelle 0-38 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	225
Tabelle 0-39 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).....	225
Tabelle 0-40 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).....	226
Tabelle 0-41 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).....	227
Tabelle 0-42 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).....	228
Tabelle 0-43 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).....	229
Tabelle 0-44 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).....	230
Tabelle 0-45 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–8 (Humanstudie II).....	231
Tabelle 0-46 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).....	232
Tabelle 0-47 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).....	232
Tabelle 0-48 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).....	233
Tabelle 0-49 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).....	234
Tabelle 0-50 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–9 (Humanstudie II).....	235
Tabelle 0-51 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	236
Tabelle 0-52 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).....	236
Tabelle 0-53 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).....	237

Tabelle 0-54 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).....	238
Tabelle 0-55 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).....	239
Tabelle 0-56 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).....	240
Tabelle 0-57 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	241
Tabelle 0-58 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).....	242
Tabelle 0-59 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–4 (Humanstudie II).....	243
Tabelle 0-60 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–6 (Humanstudie II).....	244
Tabelle 0-61 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–8 (Humanstudie II).....	245
Tabelle 0-62 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).....	246
Tabelle 0-63 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).....	247
Tabelle 0-64 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–4 (Humanstudie II).....	248
Tabelle 0-65 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–7 (Humanstudie II).....	249
Tabelle 0-66 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).....	250
Tabelle 0-67 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	251
Tabelle 0-68 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).....	252
Tabelle 0-69 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).....	253
Tabelle 0-70 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).....	254
Tabelle 0-71 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9 (Humanstudie II).....	255
Tabelle 0-72 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).....	255
Tabelle 0-73 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–5 (Humanstudie II).....	256
Tabelle 0-74 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–9 (Humanstudie II).....	257
Tabelle 0-75 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	258
Tabelle 0-76 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).....	258
Tabelle 0-77 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–6 (Humanstudie II).....	259
Tabelle 0-78 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).....	260
Tabelle 0-79 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).....	261
Tabelle 0-80 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–9 (Humanstudie II).....	262
Tabelle 0-81 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	263
Tabelle 0-82 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).....	263
Tabelle 0-83 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–4.1 (Humanstudie II).....	264
Tabelle 0-84 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4.2–5 (Humanstudie II).....	265
Tabelle 0-85 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).....	266
Tabelle 0-86 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).....	267
Tabelle 0-87 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).....	268
Tabelle 0-88 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).....	268
Tabelle 0-89 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–5 (Humanstudie II).....	269
Tabelle 0-90 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).....	270
Tabelle 0-91 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).....	271
Tabelle 0-92 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 1–7 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.8.	273
Tabelle 0-93 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 8–14 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.7.	273
Tabelle 0-94 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 14–20 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.7.	274
Tabelle 0-95 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 1–7 der Humanstudie II.....	275
Tabelle 0-96 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 8–14 der Humanstudie II. P13 beendete die Studie bereits nach neun Tagen.....	276
Tabelle 0-97 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 15–20 der Humanstudie II.	277

Tabelle 0-98 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 1–7 der Humanstudie II.	278
Tabelle 0-99 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 8–14 der Humanstudie II.	279
Tabelle 0-100 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 15–20 der Humanstudie II.	280
Tabelle 0-101 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	281
Tabelle 0-102 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	282
Tabelle 0-103 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	283
Tabelle 0-104 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	284
Tabelle 0-105 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	285
Tabelle 0-106 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	286
Tabelle 0-107 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	287
Tabelle 0-108 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	288
Tabelle 0-109 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	289
Tabelle 0-110 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	290
Tabelle 0-111 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	291
Tabelle 0-112 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.	292

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1 Hitzeinduzierte Bildung von Acrylamid aus Asparagin und reaktiven Carbonylen [modifiziert nach Zyzak <i>et al.</i> , 2003].	3
Abbildung 2-2 Postulierter Nebenbildungsweg von Acrylamid durch Oxidation und Aminierung von Acrolein [modifiziert nach Mottram <i>et al.</i> , 2002].	4
Abbildung 2-3 Metabolismus von Acrylamid. AA Acrylamid; 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; Ade Adenin; DHPA 2,3-Dihydroxypropanamid; DHPS 2,3-Dihydroxypropansäure; DNA Desoxyribonucleinsäure; GA Glycidamid; GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; GSH Glutathion; Gua Guanin; Hb Hämoglobin; <i>iso</i> -GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein.	11
Abbildung 2-4 Bildung der Mercaptursäuren AAMA, GAMA, <i>iso</i> -GAMA sowie von AAMA-SO ausgehend von Acrylamid bzw. Glycidamid. AA Acrylamid; 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; GA Glycidamid; GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein; GSH Glutathion; <i>iso</i> -GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein.	13
Abbildung 2-5 Acrylamid- (AAVal) bzw. Glycidamid-Addukte (GAVal) an das <i>N</i> -terminale Valin des Hämoglobins mit anschließender Derivatisierung mit Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPTC) und Freisetzung der Thiohydantoin-Derivate AAValPFPTH und GAValPFPTH [modifiziert nach Paulsson <i>et al.</i> , 2003].	27
Abbildung 2-6 Metabolische Bildung von Cotinin aus Nicotin über das Nikotin-1'(5)-Iminium-Ion [modifiziert nach Benowitz und Jacob, 1987].	31
Abbildung 2-7 Metabolische Bildung von <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)-L-cystein (CYMA) ausgehend von Acrylnitril durch Konjugation mit Glutathion (GSH) und anschließendem Abbau [modifiziert nach Wu <i>et al.</i> , 2012].	33
Abbildung 4-1 Studiendesign der 13-tägigen humanen Interventionsstudie I. Jeder Studientag begann um 08:00 Uhr. <i>Washout</i> : Acrylamid-minimierte Diät; Kaffee: 4x125 ml Kaffee über den Tag verteilt; ¹³ C ₃ D ₃ -AA: Gabe von 1 µg/kg KG des stabilisotopen-markierten ¹³ C ₃ D ₃ -Acrylamids; <i>high</i> AA: Aufnahme stark erhitzter Lebensmittel.; BE: Blutentnahme.	38
Abbildung 6-1 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen <i>scheduled</i> -MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 25 ng/ml AAMA, D ₃ -AAMA, GAMA, D ₃ -GAMA, HPMA, D ₃ -HPMA, CEMA, D ₃ -CEMA. AAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein; CEMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein; HPMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)-L-cystein.	49
Abbildung 6-2 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen <i>scheduled</i> -MRM-Modus einer aufgearbeiteten Urinprobe (V-w-4 Tag 8(1) n=2, Humanstudie II) mit 100 ng D ₃ -AAMA, 25 ng D ₃ -GAMA, 200 ng D ₃ -HPMA und 50 ng D ₃ -CEMA als internem Standard. AAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-L-cystein; CEMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxyethyl)-L-cystein; GAMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-L-cystein; HPMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(3-hydroxypropyl)-L-cystein.	50
Abbildung 6-3 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im <i>shuttled</i> -MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 10 ng/ml Cotinin, D ₃ -Cotinin, CYMA, D ₃ -CYMA. Die Ionisierung erfolgt in der ersten Periode (0,00–2,99 min) im positiven Modus, in der zweiten Periode (3,00–11,00 min) negativ. Die MRM-Spur von D ₃ -CYMA wurde in der finalen Methode zur Messung der Studienproben der Humanstudie II entfernt.	52
Abbildung 6-4 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im <i>shuttled</i> -MRM-Modus einer aufgearbeiteten Urinprobe (V-w-4 Tag 8(1) n=2, Humanstudie II) mit 3 ng D ₃ -Cotinin als internem Standard. Die Ionisierung erfolgt in der ersten Periode (0,00–3,1 min) im positiven Modus, in der zweiten Periode	

- (3,1–11,00 min) negativ. Die MRM-Spur von D₃-CYMA wurde bei der Messung der Studienproben der Humanstudie II entfernt. CYMA *N*-Acetyl-*S*-(2-cyanoethyl)-*L*-cystein..... 53
- Abbildung 6-5 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus eines Standard-Gemisches der PFPTH-Derivate der Hämoglobin-Addukte aus jeweils 10 ng/ml AAVaPFPTH, D₇-AAVaPFPTH, GAVaPFPTH und D₇-GAVaPFPTH. AAVaPFPTH 1-(2-Carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin; GAVaPFPTH 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin..... 55
- Abbildung 6-6 UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus einer aufgearbeiteten Blutprobe (P6, 1. Blutentnahme, n=2, Humanstudie I) mit je 2 ng D₇-AAVaPFPTH und D₇-GAVaPFPTH als internem Standard. AAVaPFPTH 1-(2-Carbamoylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin; GAVaPFPTH 1-(R,S)-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin..... 55
- Abbildung 6-7 UHPLC-MS/MS-Chromatogramm im positiven MRM-Modus eines Standard-Gemisches aus jeweils 50 ng/ml Acrylamid und D₃-Acrylamid..... 56
- Abbildung 6-8 Entwicklung des Körpergewichts der einzelnen Probanden während Humanstudie I. 59
- Abbildung 6-9 Zubereitete Pommes frites, welche von den Probanden der Gruppe A der Humanstudie I an Studientag 10 zum (a) Mittagessen und (b) Abendessen konsumiert wurden. 61
- Abbildung 6-10 a) Tägliche AAMA-Ausscheidung der Gruppe A (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I und b) individuelle Entwicklung der AAMA-Ausscheidung von Tag 1–9 jedes einzelnen Probanden der Gruppe A. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 µg/kg KG Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 µg/kg KG Acrylamid). Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein..... 68
- Abbildung 6-11 a) Tägliche AAMA-Ausscheidung der Gruppe B (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I und b) individuelle Entwicklung der AAMA-Ausscheidung von Tag 1–9 jedes einzelnen Probanden der Gruppe B bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d. Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein..... 68
- Abbildung 6-12 Tägliche GAMA-Ausscheidung der Gruppe A (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 µg/kg KG Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 µg/kg KG Acrylamid), Tage 1–5, 7–9, 11–13: *Washout* (maximale Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d). Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein. 69
- Abbildung 6-13 Tägliche GAMA-Ausscheidung der Gruppe B (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d. Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein. 69
- Abbildung 6-14 AAMA-Kinetik beider Gruppen, dargestellt als Differenzen zur Basislinie Tag 5. ** p<0,01; *** p<0,001; AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein..... 72
- Abbildung 6-15 Renale Ausscheidungskinetiken von AAMA und GAMA der Gruppe A (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I. Tag 6: Intervention *Kaffee* (0,15–0,17 µg/kg KG Acrylamid); Tag 10: Intervention *high AA* (14,1–15,9 µg/kg KG Acrylamid), Tage 1–5, 7–9, 11–13: *Washout* (maximale Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d). Tagesnummerierung auf x-Achse stellt zeitliches Ende des jeweiligen Studientages dar. AAMA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-*L*-cystein; GAMA *N*-acetyl-*S*-(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)-*L*-cystein..... 73
- Abbildung 6-16 Chemische Strukturen von ¹³C₃D₃-Acrylamid und der korrespondierenden Mercaptursäure ¹³C₃D₃-AAMA. GSH Glutathion..... 76
- Abbildung 6-17 Kinetik der Ausscheidung von ¹³C₃D₃-AAMA im Vergleich zu der von AAMA der Gruppe B (n=6) während der 13-tägigen Humanstudie I bei einer maximalen Acrylamid-Aufnahme von 0,05–0,06 µg/kg KG/d, Tag 6: orale Einmalgabe von 1 µg/kg KG ¹³C₃D₃-Acrylamid. Tagesnummerierung auf

x-Achse stellt zeitliches Ende des jeweiligen Studientages dar. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)-($^{13}\text{C}_3\text{D}_3$)- <i>L</i> -cystein.....	76
Abbildung 6-18 Hämoglobin-Addukt-Level von Acrylamid (AAVal, oben) and Glycidamid (GAVal, unten) von Gruppe A (links) und Gruppe B (rechts) der Humanstudie I. Die Blutentnahmen (BE) fanden zu Beginn der Studie (1), am Morgen des 8. Studientages (2) sowie am Ende der Studie (3) statt. ■ Mittelwert; — Median; * Maximum; x Minimum; AAVal <i>N</i> -(2-carbamoylethyl)-valin; GAVal <i>N</i> -(<i>R,S</i>)-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valin.	80
Abbildung 6-19 Übersicht über die Strukturen, deren Modell-Reaktion mit <i>L</i> -Asparagin unter physiologischen Bedingungen zu quantifizierbaren Mengen Acrylamid führten.....	83
Abbildung 6-20 Bildung von Acrylamid aus (links) <i>L</i> -Asparagin und <i>D</i> -Ribose bzw. (rechts) aus <i>L</i> -Asparagin und Methylglyoxal bei 37 °C und pH 7,4 über die Zeit. Dargestellt ist die Acrylamid-Bildung in ppm pro eingesetzter Menge <i>L</i> -Asparagin (~15 nmol). LOQ Bestimmungsgrenze (hier 0,007 nmol/ml Acrylamid, entsprechend circa 14 ppm).....	83
Abbildung 6-21 Überblick über die Acrylamid-Aufnahme jedes Probanden der zehntägigen Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.	89
Abbildung 6-22 Vergleich des Beitrags verschiedener Lebensmittelgruppen zur gesamten Acrylamid-Aufnahme während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II von Gemischtköstlern (n=10) und Veganern (n=10, V-m-5: 9 Tage).....	90
Abbildung 6-23 Übersicht über die AAMA-Ausscheidung jedes Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.....	94
Abbildung 6-24 Übersicht über die GAMA-Ausscheidung jedes Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; # für V-m-5 neuntägige Studie.....	94
Abbildung 6-25 Übersicht über die Cotinin-Ausscheidung der Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II, die ihre schriftliche Einwilligung zur Quantifizierung gaben. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; n.q. nicht quantifiziert; # für V-m-5 neuntägige Studie.	96
Abbildung 6-26 Übersicht über die CYMA-Ausscheidung der Probanden während des zehntägigen Studienzeitraumes der Humanstudie II, die ihre schriftliche Einwilligung zur Quantifizierung gaben. Boxen: interquartiler Bereich; Whisker Standardabweichung; ■ Mittelwert; — Median; * Minimum bzw. Maximum; n.q. nicht quantifiziert; # für V-m-5 neuntägige Studie.	96
Abbildung 6-27 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-1. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	99
Abbildung 6-28 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-2. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	100
Abbildung 6-29 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-3. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	102
Abbildung 6-30 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Gemischtköstlers GK-m-4. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	103
Abbildung 6-31 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren des Gemischtköstlers GK-m-5. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	104

Abbildung 6-32 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-1. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	106
Abbildung 6-33 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren der Gemischtköstlerin GK-w-2. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	107
Abbildung 6-34 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-3. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	108
Abbildung 6-35 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-4. Der Sammelzeitraum Tag 10, 08:00–20:00 Uhr, wurde nicht aliquotiert, folglich wurde keine Analytik durchgeführt. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	109
Abbildung 6-36 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Gemischtköstlerin GK-w-5. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	111
Abbildung 6-37 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-1. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	113
Abbildung 6-38 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-2. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	114
Abbildung 6-39 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren des Veganers V-m-3. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	116
Abbildung 6-40 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-4. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	118
Abbildung 6-41 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin des Veganers V-m-5. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	119
Abbildung 6-42 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-1. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	121
Abbildung 6-43 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren der Veganerin V-w-2. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	122
Abbildung 6-44 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-3. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	123
Abbildung 6-45 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-4. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	126
Abbildung 6-46 Acrylamid-Aufnahme und -Ausscheidung der Mercaptursäuren sowie Cotinin der Veganerin V-w-5. AAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein; CYMA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)- <i>L</i> -cystein; GAMA <i>N</i> -acetyl- <i>S</i> -(2-hydroxy-2-carbamoylethyl)- <i>L</i> -cystein.....	127
Abbildung 6-47 Vergleich der Kreatinin-korrigierten AAMA-Ausscheidung von Spoturin zum Gesamturin, welcher in 12-h-Intervallen gesammelt wurde. (links) GK-m-2 (rechts) V-w-3.....	130

Abbildung 9-1 EPI-Spektrum von 20 ng/ml GAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -35, CE -18, CES 2; Scanrate: 200 Da/s, 44 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	149
Abbildung 9-2 MS ² -Spektrum von 25 ng/ml D ₃ -GAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30, CE -20, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	149
Abbildung 9-3 EPI-Spektrum von 20 ng/ml AAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -21 V, CES 7 V, Scanrate: 10.000 Da/s, 100 Zyklen, <i>Linear Ion Trap Fill Time</i> 150 msek, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).....	150
Abbildung 9-4 MS ² -Spektrum von 30 ng/ml D ₃ -AAMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -55 V, CE -20 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	150
Abbildung 9-5 MS ² -Spektrum zur Zeit der Elution von ¹³ C ₃ D ₃ -AAMA der Urinprobe P2-Tag 6 (20–24 h) n1 (3,8–4,0 min) nach negativer Ionisierung (Scanrate: 200 Da/s, sonstige Parameter entsprechend der Quantifizierungsmethode in Kapitel 9.6.2).	151
Abbildung 9-6 MS ² -Spektrum von 20 ng/ml CYMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -12 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	155
Abbildung 9-7 MS ² -Spektrum von 5 ng/ml D ₃ -CYMA nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -30 V, CE -12 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	155
Abbildung 9-8 EPI-Spektrum von 5 ng/ml Cotinin nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 121 V, CE 26 V, CES 5 V, Scanrate: 200 Da/s, 65 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	156
Abbildung 9-9 EPI-Spektrum von 5 ng/ml D ₃ -Cotinin nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 111 V, CE 33 V, CES 2 V, Scanrate: 200 Da/s, 61 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	156
Abbildung 9-10 EPI-Spektrum von 10 ng/ml AAVaPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110, CE -25 V, CES 10 V, Scanrate: 200 Da/s, 71 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	160
Abbildung 9-11 EPI-Spektrum von 10 ng/ml D ₇ -AAValPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -125 V, CE -25 V, CES 10 V, Scanrate: 200 Da/s, 78 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	160
Abbildung 9-12 EPI-Spektrum von 10 ng/ml GAVaPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110 V, CE -22 V, Scanrate: 200 Da/s, 101 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).....	161
Abbildung 9-13 EPI-Spektrum von 10 ng/ml D ₇ -GAVaPFPTH nach negativer Ionisierung (-4.500 V, DP -110 V, CE -25 V, CES 3 V, Scanrate: 200 Da/s, 75 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	161
Abbildung 9-14 MS ² -Spektrum von 50 ng/ml Acrylamid nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 76 V, CE 23 V, Scanrate: 200 Da/s, 50 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	165
Abbildung 9-15 MS ² -Spektrum von 50 ng/ml D ₃ -Acrylamid nach positiver Ionisierung (5.500 V, DP 36 V, CE 20 V, Scanrate: 200 Da/s, 30 Zyklen, Flussrate der Spritzenpumpe: 10 µl/min).	165

ANHANG

A.1. Körpergewichte der Probanden (Humanstudie I)

Tabelle 0-1 Dokumentierte Körpergewichte der Probanden der Humanstudie I. Das Wiegen erfolgte nüchtern vor dem Frühstück (08:00 Uhr) des jeweiligen Studientages.

Tag	Körpergewicht [kg]											
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
1	79,7	82	81	83	82,5	81,0	78,0	67,2	78,6	82,8	74,8	90,0
2	78,1	82,4	81,8	82,4	80,8	80,0	76,8	66,1	76,7	82,4	73,4	89,5
3	79,4	81,7	82,4	81,6	80,5	78,9	77,7	65,6	76,3	81,8	72,7	89,0
4	78,6	81,5	82,1	81	79,8	78,7	76,7	66,4	76,4	82,4	72,4	88,6
5	78,8	81,4	81,0	81,6	80,0	78,8	76,7	65,6	76,0	81,1	72,3	87,6
6	78,8	82,0	81,0	81,1	80,1	78,0	76,3	65,9	76,0	81,8	72,1	87,5
7	78,9	81,8	80,2	80,5	80,0	78,6	75,9	66,2	76,3	81,1	72,0	87,1
8	78,6	81,9	81,0	80,9	80,2	78,8	76,1	65,9	76,2	81,0	71,7	87,0
9	78,6	81,9	80,7	81,6	79,8	78,6	76,0	66,0	76,1	82,3	71,6	86,6
10	78,8	81,5	80,7	80,9	79,5	78,1	76,1	66,3	76,2	81,1	71,9	86,2
11	78,8	81,4	80,6	80,9	79,5	78,2	76,2	66,4	75,7	81,2	72,2	86,3
12	78,9	81,5	80,8	81,1	79,3	77,9	76,7	66,0	76,2	81,3	72,4	87,0
13	78,5	81,2	81,0	81,7	80,0	77,9	76,6	66,5	75,9	81,5	72,4	86,8

A.2. Urinvolumina (Humanstudie I)

Tabelle 0-2 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 1–6 der Humanstudie I.

Sammelzeitraum	Urinvolumen [ml]					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Tag 1 (0–24 h)	2786	1783	2097	2594	1601	2332
Tag 2 (0–24 h)	2365	3216	2883	3414	2735	2004
Tag 3 (0–24 h)	3300	2490	2997	4330	2522	2246
Tag 4 (0–24 h)	2786	2333	3825	2883	2268	1506
Tag 5 (0–24 h)	2990	2417	2435	2760	2477	2184
Tag 6 (0–4 h)	698	776	1058	700	774	269
Tag 6 (4–8 h)	1250	1064	928	1123	208	705
Tag 6 (8–12 h)	631	468	1253	625	656	856
Tag 6 (12–24 h)	785	946	568	1235	1484	643
Tag 7 (0–4 h)	999	284	721	163	597	272
Tag 7 (4–8 h)	417	1135	903	620	235	361
Tag 7 (8–12 h)	844	498	309	490	174	273
Tag 7 (12–24 h)	776	522	762	873	1084	704
Tag 8 (0–4 h)	737	500	497	1108	643	293
Tag 8 (4–8 h)	871	900	317	129	192	179
Tag 8 (8–12 h)	947	722	1265	233	639	647
Tag 8 (12–24 h)	1185	894	691	980	921	936
Tag 9 (0–4 h)	1037	594	210	759	329	545
Tag 9 (4–8 h)	425	1089	362	926	548	425
Tag 9 (8–12 h)	1118	357	1054	592	863	397
Tag 9 (12–24 h)	919	1183	608	1049	681	1060
Tag 10 (0–4 h)	408	505	644	561	627	501
Tag 10 (4–8 h)	737	959	336	397	615	317
Tag 10 (8–12 h)	379	567	965	773	442	252
Tag 10 (12–24 h)	785	916	527	1125	1022	991
Tag 11 (0–4 h)	628	356	248	287	640	277
Tag 11 (4–8 h)	360	1106	436	n. b.	137	438
Tag 11 (8–12 h)	1495	335	377	736	718	604
Tag 11 (12–24 h)	658	985	627	1142	541	903
Tag 12 (0–4 h)	1151	614	223	672	410	277
Tag 12 (4–8 h)	400	954	416	858	200	886
Tag 12 (8–12 h)	1035	750	956	339	1158	392
Tag 12 (12–24 h)	855	629	1234	1165	478	496
Tag 13 (0–12 h)	2657	2303	2380	1549	1588	984
Tag 13 (12–24 h)	455	715	677	738	673	786

Tabelle 0-3 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 7–12 der Humanstudie I.

Sammelzeitraum	Urinvolumen [ml]					
	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Tag 1 (0–24 h)	3151	3074	3940	2187	1841	2200
Tag 2 (0–24 h)	2953	4004	2702	2810	2803	2375
Tag 3 (0–24 h)	3865	3924	2833	3207	2803	2375
Tag 4 (0–24 h)	3942	3670	3698	2947	2549	2617
Tag 5 (0–24 h)	4247	2874	3153	1753	2777	1953
Tag 6 (0–4 h)	1379	673	542	603	1101	343
Tag 6 (4–8 h)	831	855	1842	1289	1125	770
Tag 6 (8–12 h)	1139	523	511	1212	826	714
Tag 6 (12–24 h)	1758	2247	610	905	1526	485
Tag 7 (0–4 h)	991	689	1053	225	351	158
Tag 7 (4–8 h)	934	694	367	1159	229	183
Tag 7 (8–12 h)	459	405	637	254	513	308
Tag 7 (12–24 h)	1203	1918	476	665	734	1060
Tag 8 (0–4 h)	1304	710	580	655	817	283
Tag 8 (4–8 h)	358	343	986	607	100	598
Tag 8 (8–12 h)	312	682	1656	399	1090	223
Tag 8 (12–24 h)	1476	1470	767	882	1072	959
Tag 9 (0–4 h)	594	643	1192	1137	866	193
Tag 9 (4–8 h)	330	636	1122	1046	819	325
Tag 9 (8–12 h)	872	714	705	669	121	219
Tag 9 (12–24 h)	1135	1690	689	365	1114	740
Tag 10 (0–4 h)	1059	879	629	982	465	264
Tag 10 (4–8 h)	465	759	316	362	844	495
Tag 10 (8–12 h)	706	715	206	358	468	212
Tag 10 (12–24 h)	1144	1855	756	659	1023	589
Tag 11 (0–4 h)	1263	464	558	140	1332	389
Tag 11 (4–8 h)	808	321	629	725	924	474
Tag 11 (8–12 h)	324	640	391	535	348	189
Tag 11 (12–24 h)	1274	1763	783	605	1679	730
Tag 12 (0–4 h)	1175	415	722	1213	636	435
Tag 12 (4–8 h)	502	568	1218	615	347	523
Tag 12 (8–12 h)	556	824	1039	400	970	453
Tag 12 (12–24 h)	1175	1717	886	888	704	640
Tag 13 (0–12 h)	1701	1662	2510	2623	1960	1322
Tag 13 (12–24 h)	1389	2343	1174	448	597	485

A.3. Kreatinin-Gehalte der Urinproben (Humanstudie I)

Tabelle 0-4 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 1–6 der Humanstudie I. n. b. nicht bestimmt, da Proband in diesem Sammelzeitraum keinen Urin abgegeben hat.

Urinprobe	Kreatinin-Gehalt [g/l]					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Tag 1 (0–24 h)	0,88	0,75	1,15	0,83	1,39	0,74
Tag 2 (0–24 h)	0,95	1,01	0,60	0,47	0,97	0,98
Tag 3 (0–24 h)	0,68	0,81	0,79	0,46	0,89	0,96
Tag 4 (0–24 h)	0,88	0,97	0,49	0,68	0,99	1,29
Tag 5 (0–24 h)	0,75	1,03	0,99	0,86	0,96	1,11
Tag 6 (0–4 h)	0,79	0,30	0,41	0,42	0,41	0,79
Tag 6 (4–8 h)	0,38	0,47	0,37	0,32	1,49	0,66
Tag 6 (8–12 h)	0,53	0,45	0,32	0,38	0,64	0,44
Tag 6 (12–24 h)	1,42	1,37	2,00	0,97	0,77	1,66
Tag 7 (0–4 h)	0,38	0,61	0,64	1,02	0,43	1,38
Tag 7 (4–8 h)	0,93	0,54	0,42	0,36	1,44	0,53
Tag 7 (8–12 h)	0,41	0,58	0,71	0,76	1,43	1,23
Tag 7 (12–24 h)	1,46	2,21	1,29	1,32	1,23	1,91
Tag 8 (0–4 h)	0,61	0,78	0,82	0,34	0,70	1,42
Tag 8 (4–8 h)	0,44	0,46	0,81	0,77	1,42	1,34
Tag 8 (8–12 h)	0,45	0,49	0,38	1,41	0,78	0,49
Tag 8 (12–24 h)	0,95	1,33	1,20	1,33	1,24	1,32
Tag 9 (0–4 h)	0,36	0,60	1,48	0,50	0,95	0,84
Tag 9 (4–8 h)	0,55	0,35	0,48	0,22	0,87	0,68
Tag 9 (8–12 h)	0,44	0,51	0,34	0,45	0,48	0,84
Tag 9 (12–24 h)	1,25	1,11	1,84	1,05	1,45	1,07
Tag 10 (0–4 h)	0,97	0,53	0,50	0,47	0,48	0,84
Tag 10 (4–8 h)	0,62	0,49	0,95	1,02	0,70	0,59
Tag 10 (8–12 h)	1,08	0,50	0,63	0,62	0,50	1,47
Tag 10 (12–24 h)	1,32	1,22	2,17	0,87	1,30	1,41
Tag 11 (0–4 h)	0,59	0,56	0,37	1,28	0,35	1,58
Tag 11 (4–8 h)	0,68	0,46	1,03	n. b.	1,92	0,83
Tag 11 (8–12 h)	0,34	0,97	1,10	0,87	0,76	0,38
Tag 11 (12–24 h)	1,63	1,16	1,92	1,08	2,12	1,38
Tag 12 (0–4 h)	0,36	0,62	1,59	0,50	0,84	1,12
Tag 12 (4–8 h)	0,63	0,42	0,78	0,30	1,12	0,55
Tag 12 (8–12 h)	0,48	0,52	0,47	0,97	0,93	0,46
Tag 12 (12–24 h)	1,27	1,56	1,00	0,92	2,18	2,41
Tag 13 (0–12 h)	0,41	0,48	0,41	0,45	0,50	0,83
Tag 13 (12–24 h)	2,40	1,50	2,14	2,03	1,95	1,54

Tabelle 0-5 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 7–12 der Humanstudie I.

Urinprobe	Kreatinin-Gehalt [g/l]					
	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Tag 1 (0–24 h)	0,47	0,55	0,55	0,64	0,59	0,75
Tag 2 (0–24 h)	0,56	0,50	0,62	1,27	0,64	0,95
Tag 3 (0–24 h)	0,48	0,42	0,73	0,69	0,66	1,40
Tag 4 (0–24 h)	0,48	0,49	0,80	0,75	0,77	0,78
Tag 5 (0–24 h)	0,46	0,60	0,54	1,45	0,53	1,11
Tag 6 (0–4 h)	0,27	0,53	1,27	0,80	0,18	0,85
Tag 6 (4–8 h)	0,17	0,36	0,32	0,33	0,28	0,42
Tag 6 (8–12 h)	0,39	0,25	0,54	0,34	0,35	0,39
Tag 6 (12–24 h)	0,52	0,35	0,53	1,35	0,59	2,76
Tag 7 (0–4 h)	0,38	0,52	1,04	0,72	0,66	2,60
Tag 7 (4–8 h)	0,34	0,41	0,91	0,57	0,82	0,97
Tag 7 (8–12 h)	0,36	0,40	0,41	1,05	0,68	1,18
Tag 7 (12–24 h)	0,90	0,52	2,19	1,74	1,27	1,02
Tag 8 (0–4 h)	0,35	0,43	0,32	0,45	0,33	1,54
Tag 8 (4–8 h)	0,63	0,98	0,63	0,59	2,49	0,48
Tag 8 (8–12 h)	0,82	0,46	0,14	1,41	0,23	0,62
Tag 8 (12–24 h)	0,65	0,55	1,43	1,37	0,86	1,40
Tag 9 (0–4 h)	0,60	0,48	0,33	0,31	0,27	2,19
Tag 9 (4–8 h)	0,75	0,34	0,26	0,38	0,44	0,92
Tag 9 (8–12 h)	0,36	0,28	0,27	0,32	1,71	1,38
Tag 9 (12–24 h)	0,79	0,51	0,60	2,89	0,65	0,58
Tag 10 (0–4 h)	0,37	0,38	1,61	0,49	0,57	0,58
Tag 10 (4–8 h)	0,76	0,36	1,22	0,85	0,31	0,57
Tag 10 (8–12 h)	0,32	0,44	1,28	1,71	0,57	1,25
Tag 10 (12–24 h)	0,98	0,42	1,39	1,80	0,91	2,57
Tag 11 (0–4 h)	0,27	0,83	0,61	2,28	0,19	1,05
Tag 11 (4–8 h)	0,41	0,69	0,58	0,73	0,24	0,56
Tag 11 (8–12 h)	0,87	0,62	0,56	0,75	0,42	2,21
Tag 11 (12–24 h)	1,38	0,49	1,47	2,02	0,61	1,83
Tag 12 (0–4 h)	0,32	0,68	0,36	0,37	0,20	0,72
Tag 12 (4–8 h)	0,48	0,50	0,39	0,58	0,83	0,66
Tag 12 (8–12 h)	0,63	0,33	0,34	0,50	0,23	0,80
Tag 12 (12–24 h)	0,77	0,48	1,11	1,51	1,20	1,56
Tag 13 (0–12 h)	0,48	0,37	0,36	0,37	0,28	0,70
Tag 13 (12–24 h)	0,67	0,51	1,10	2,44	1,28	3,01

A.4. Mercaptursäure-Ausscheidung Gruppe A (Humanstudie I)

Tabelle 0-6 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe A der Humanstudie I.

Urinprobe	AAMA [nmol]						MW±SD
	P1	P4	P7	P9	P10	P11	
Tag 1 (0–24 h)	186,2	382,8	466,5	334,0	92,8	226,3	281±138
Tag 2 (0–24 h)	119,2	200,8	194,1	126,9	169,3	328,9	190±76
Tag 3 (0–24 h)	94,4	173,9	137,5	103,8	79,9	303,4	149±83
Tag 4 (0–24 h)	84,5	137,3	110,1	93,7	76,5	246,8	125±64
Tag 5 (0–24 h)	80,1	154,7	113,3	62,9	84,8	199,7	116±52
Tag 6 (0–4 h)	20,0	18,5	22,3	23,9	18,0	25,2	21±3
Tag 6 (4–8 h)	27,7	23,3	10,1	29,7	24,3	48,2	27±12
Tag 6 (8–12 h)	24,5	16,7	24,8	15,4	26,6	28,4	23±5
Tag 6 (12–24 h)	60,0	95,7	73,0	19,5	54,2	164,8	78±49
Tag 7 (0–4 h)	15,3	9,4	22,1	47,5	6,0	28,8	22±15
Tag 7 (4–8 h)	12,6	13,3	13,4	11,0	20,9	24,1	16±5
Tag 7 (8–12 h)	11,4	14,8	6,8	7,2	7,8	38,2	14±12
Tag 7 (12–24 h)	28,8	62,9	55,4	37,6	37,6	126,1	58±36
Tag 8 (0–4 h)	14,1	22,8	20,8	5,9	8,3	34,3	18±11
Tag 8 (4–8 h)	12,1	5,1	10,2	16,1	11,1	31,8	14±9
Tag 8 (8–12 h)	14,6	16,9	11,7	8,1	20,2	32,6	17±9
Tag 8 (12–24 h)	49,6	90,1	57,3	48,1	50,2	126,6	70±32
Tag 9 (0–4 h)	11,8	21,9	19,2	12,8	11,4	29,5	18±7
Tag 9 (4–8 h)	6,3	10,8	9,5	8,3	11,8	42,8	15±14
Tag 9 (8–12 h)	13,9	13,4	12,3	5,0	6,8	24,1	13±7
Tag 9 (12–24 h)	31,6	52,8	47,1	14,5	34,4	96,6	46±28
Tag 10 (0–4 h)	63,1	23,5	52,0	42,3	72,4	89,6	57±23
Tag 10 (4–8 h)	293,8	136,3	180,0	146,1	179,7	201,5	190±56
Tag 10 (8–12 h)	548,3	502,2	304,0	289,9	773,1	459,8	480±178
Tag 10 (12–24 h)	2821,2	1723,0	3280,6	2613,0	3140,9	3985,0	2927±755
Tag 11 (0–4 h)	689,3	735,4	839,3	609,8	635,7	671,8	697±82
Tag 11 (4–8 h)	264,7	n. a.	485,9	404,1	701,9	416,9	455±160
Tag 11 (8–12 h)	462,9	739,6	332,1	217,9	380,6	242,4	396±191
Tag 11 (12–24 h)	660,4	1177,1	1086,3	707,3	872,2	1159,3	944±229
Tag 12 (0–4 h)	149,7	237,2	262,9	130,2	194,0	84,8	176±67
Tag 12 (4–8 h)	72,9	141,1	129,3	184,5	111,5	169,5	135±40
Tag 12 (8–12 h)	114,4	172,4	154,0	113,5	61,3	104,5	120±39
Tag 12 (12–24 h)	196,9	493,0	327,6	300,4	221,7	322,0	310±105
Tag 13 (0–12 h)	112,3	200,7	157,5	102,4	124,4	143,7	140±36
Tag 13 (12–24 h)	93,0	101,2	187,6	189,0	110,5	150,6	139±43

MW Mittelwert; SD Standardabweichung; n. a. nicht aliquotiert

Tabelle 0-7 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe A der Humanstudie I.

Urinprobe	GAMA [nmol]						MW±SD
	P1	P4	P7	P9	P10	P11	
Tag 1 (0–24 h)	56,9	59,1	64,3	62,3	27,7	70,5	57±15
Tag 2 (0–24 h)	39,3	38,3	38,0	30,5	57,0	101,0	51±26
Tag 3 (0–24 h)	37,3	41,5	33,9	29,7	32,3	104,2	46±29
Tag 4 (0–24 h)	30,5	32,7	31,5	33,2	28,2	76,4	39±19
Tag 5 (0–24 h)	27,1	38,1	32,4	20,2	27,5	58,2	34±13
Tag 6 (0–4 h)	6,2	4,4	5,9	7,8	5,2	7,5	6±1
Tag 6 (4–8 h)	6,7	6,6	2,5	7,3	5,3	11,6	7±3
Tag 6 (8–12 h)	4,9	3,6	5,2	3,2	5,2	7,4	5±1
Tag 6 (12–24 h)	16,5	20,5	17,2	4,9	15,0	41,5	19±12
Tag 7 (0–4 h)	4,9	2,2	5,8	13,5	1,9	8,3	6±4
Tag 7 (4–8 h)	3,9	3,5	4,4	3,4	7,6	6,5	5±2
Tag 7 (8–12 h)	3,7	3,8	2,2	2,6	2,7	10,4	4±3
Tag 7 (12–24 h)	8,6	13,6	12,8	9,8	11,9	29,5	14±8
Tag 8 (0–4 h)	4,8	6,0	5,8	2,0	3,4	8,8	5±2
Tag 8 (4–8 h)	3,6	1,2	2,7	4,9	3,7	7,3	4±2
Tag 8 (8–12 h)	4,3	3,9	3,0	3,2	5,4	8,4	5±2
Tag 8 (12–24 h)	12,2	18,0	12,9	11,7	12,5	28,5	16±7
Tag 9 (0–4 h)	3,8	4,9	4,7	3,7	3,7	7,3	5±1
Tag 9 (4–8 h)	2,0	2,9	2,6	2,7	4,0	10,8	4±3
Tag 9 (8–12 h)	4,6	3,6	3,7	1,8	2,2	5,9	4±2
Tag 9 (12–24 h)	10,5	12,2	12,1	4,6	10,4	24,6	12±7
Tag 10 (0–4 h)	4,3	3,2	5,8	11,0	7,0	9,0	7±3
Tag 10 (4–8 h)	11,3	8,1	8,2	7,9	9,5	10,8	9±1
Tag 10 (8–12 h)	29,2	25,4	14,3	14,6	44,3	22,4	25±11
Tag 10 (12–24 h)	243,5	123,1	248,4	229,3	260,2	267,5	229±53
Tag 11 (0–4 h)	110,1	79,8	102,0	80,8	95,8	85,2	92±12
Tag 11 (4–8 h)	46,8	n. a.	66,9	60,6	123,8	57,5	71±30
Tag 11 (8–12 h)	85,5	92,8	47,8	29,8	69,7	31,4	59±27
Tag 11 (12–24 h)	139,0	133,5	137,1	92,5	173,1	184,0	143±32
Tag 12 (0–4 h)	37,8	28,4	36,8	18,9	49,2	16,7	31±12
Tag 12 (4–8 h)	19,0	17,8	18,9	26,8	29,6	37,0	25±8
Tag 12 (8–12 h)	31,0	21,4	24,4	17,5	16,0	24,6	22±5
Tag 12 (12–24 h)	66,9	67,1	53,1	54,5	71,1	94,4	68±15
Tag 13 (0–12 h)	45,4	38,5	33,7	23,1	52,1	49,2	40±11
Tag 13 (12–24 h)	40,1	16,2	40,0	44,0	43,2	52,3	39±12

MW Mittelwert; SD Standardabweichung; n. a. nicht aliquotiert

A.5. Mercaptursäure-Ausscheidung Gruppe B (Humanstudie I)

Tabelle 0-8 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.

Urinprobe	AAMA [nmol]						MW±SD
	P2	P3	P5	P6	P8	P12	
Tag 1 (0–24 h)	219,0	363,8	604,0	1191,5	95,2	626,8	517±391
Tag 2 (0–24 h)	293,9	139,2	357,5	832,4	96,9	674,1	399±295
Tag 3 (0–24 h)	97,4	117,9	206,2	534,6	65,1	649,7	278±250
Tag 4 (0–24 h)	78,5	79,2	158,9	365,1	51,1	308,9	174±133
Tag 5 (0–24 h)	83,9	99,0	147,9	391,9	59,9	333,2	186±141
Tag 6 (0–4 h)	7,6	15,1	18,2	40,2	11,7	43,8	23±15
Tag 6 (4–8 h)	13,6	8,9	12,6	58,9	8,7	49,7	25±23
Tag 6 (8–12 h)	6,1	14,6	23,5	61,5	3,6	28,8	23±21
Tag 6 (12–24 h)	39,1	44,6	70,8	202,5	28,9	198,5	97±81
Tag 7 (0–4 h)	5,0	14,7	12,8	66,2	10,5	58,0	28±27
Tag 7 (4–8 h)	16,1	8,5	14,0	26,5	6,8	16,9	15±7
Tag 7 (8–12 h)	7,7	5,7	12,4	47,5	3,4	39,2	19±19
Tag 7 (12–24 h)	34,4	24,0	68,0	216,1	31,7	151,3	88±79
Tag 8 (0–4 h)	11,0	12,6	25,2	68,4	8,0	46,0	29±24
Tag 8 (4–8 h)	11,7	7,7	15,0	34,0	9,5	32,6	18±12
Tag 8 (8–12 h)	4,1	15,1	23,9	44,4	8,0	16,0	19±14
Tag 8 (12–24 h)	42,2	33,9	55,6	220,9	40,4	203,0	99±88
Tag 9 (0–4 h)	11,4	12,2	17,9	67,1	11,5	43,0	27±23
Tag 9 (4–8 h)	9,0	5,1	24,9	37,5	5,1	33,8	19±15
Tag 9 (8–12 h)	5,2	10,6	22,8	43,7	5,9	34,0	20±16
Tag 9 (12–24 h)	39,3	39,2	68,8	181,0	29,6	50,4	68±57
Tag 10 (0–4 h)	7,6	10,3	16,3	62,2	8,2	17,2	20±21
Tag 10 (4–8 h)	12,1	8,9	21,8	25,2	6,7	25,8	17±9
Tag 10 (8–12 h)	7,0	14,5	11,2	48,7	6,9	26,7	19±16
Tag 10 (12–24 h)	36,1	45,7	75,3	177,2	26,2	194,3	92±74
Tag 11 (0–4 h)	5,4	2,5	11,5	57,2	9,0	48,0	22±24
Tag 11 (4–8 h)	11,7	12,3	12,1	40,0	4,9	25,0	18±13
Tag 11 (8–12 h)	8,2	10,9	27,7	30,2	11,5	45,9	22±15
Tag 11 (12–24 h)	42,7	54,7	74,5	195,5	39,7	155,5	94±66
Tag 12 (0–4 h)	11,5	9,8	20,6	47,3	8,7	38,8	23±16
Tag 12 (4–8 h)	11,3	9,7	11,2	61,8	7,5	37,8	23±22
Tag 12 (8–12 h)	9,8	13,4	26,1	18,5	6,3	38,1	19±12
Tag 12 (12–24 h)	29,3	42,0	65,8	165,8	22,3	107,1	72±55
Tag 13 (0–12 h)	23,3	29,2	39,1	102,3	13,5	96,3	51±39
Tag 13 (12–24 h)	28,7	50,7	70,1	153,8	31,3	176,1	85±64

MW Mittelwert; SD Standardabweichung

Tabelle 0-9 $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.

Urinprobe	$^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AAMA [nmol]					
	P2	P3	P5	P6	P8	P12
Tag 1 (0–24 h)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tag 2 (0–24 h)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tag 3 (0–24 h)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tag 4 (0–24 h)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tag 5 (0–24 h)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tag 6 (0–4 h)	5,6	46,6	21,5	11,5	47,4	25,5
Tag 6 (4–8 h)	75,5	66,0	40,9	67,2	84,8	94,0
Tag 6 (8–12 h)	43,4	83,5	67,6	74,0	31,2	52,3
Tag 6 (12–24 h)	182,3	116,9	116,5	135,1	130,9	195,6
Tag 7 (0–4 h)	15,1	19,5	11,6	23,8	23,4	31,0
Tag 7 (4–8 h)	36,9	8,2	10,6	7,7	10,9	7,0
Tag 7 (8–12 h)	13,2	4,4	8,0	12,1	4,5	15,0
Tag 7 (12–24 h)	36,2	11,5	30,7	36,3	25,9	39,9
Tag 8 (0–4 h)	9,4	4,5	8,0	8,0	5,4	8,8
Tag 8 (4–8 h)	7,7	2,1	3,9	3,2	4,9	4,9
Tag 8 (8–12 h)	1,9	3,0	5,2	3,9	2,8	2,2
Tag 8 (12–24 h)	12,7	4,1	8,3	14,1	9,0	21,0
Tag 9 (0–4 h)	3,1	1,5	2,2	3,3	3,0	3,3
Tag 9 (4–8 h)	2,3	<LOQ	2,8	1,6	<LOQ	2,3
Tag 9 (8–12 h)	1,1	<LOQ	<LOQ	1,7	<LOQ	2,2
Tag 9 (12–24 h)	6,4	3,1	5,0	5,7	<LOQ	3,1
Tag 10 (0–4 h)	1,1	<LOQ	<LOQ	1,6	<LOQ	<LOQ
Tag 10 (4–8 h)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 10 (8–12 h)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
Tag 10 (12–24 h)	3,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,5
Tag 11 (0–4 h)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 11 (4–8 h)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Tag 11 (8–12 h)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
Tag 11 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
Tag 12 (0–4 h)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 12 (4–8 h)	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
Tag 12 (8–12 h)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
Tag 12 (12–24 h)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
Tag 13 (0–12 h)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
Tag 13 (12–24 h)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ

n. d. nicht detektierbar; LOD Nachweisgrenze; LOQ Bestimmungsgrenze

Tabelle 0-10 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Probanden der Gruppe B der Humanstudie I.

Urinprobe	GAMA [nmol]						MW±SD
	P2	P3	P5	P6	P8	P12	
Tag 1 (0–24 h)	17,7	86,3	90,1	170,5	18,9	84,2	78±56
Tag 2 (0–24 h)	37,4	48,2	73,2	158,2	22,4	92,9	72±49
Tag 3 (0–24 h)	20,0	49,3	54,5	136,4	18,0	116,6	66±50
Tag 4 (0–24 h)	17,5	35,8	47,1	98,0	16,2	58,1	45±31
Tag 5 (0–24 h)	18,5	40,4	41,5	104,8	16,4	56,9	46±32
Tag 6 (0–4 h)	1,8	6,8	5,4	11,0	3,1	7,4	6±3
Tag 6 (4–8 h)	3,6	4,1	3,8	16,4	2,6	9,2	7±5
Tag 6 (8–12 h)	1,6	6,4	7,1	17,0	1,3	6,3	7±6
Tag 6 (12–24 h)	9,3	19,0	21,1	56,5	8,5	35,7	25±18
Tag 7 (0–4 h)	1,2	6,8	3,9	17,7	3,1	9,4	7±6
Tag 7 (4–8 h)	4,0	4,3	4,3	7,6	2,7	3,5	4±2
Tag 7 (8–12 h)	1,9	2,4	3,6	13,4	1,2	7,6	5±5
Tag 7 (12–24 h)	6,6	8,9	16,6	51,3	7,7	22,7	19±17
Tag 8 (0–4 h)	2,2	5,2	6,8	17,3	2,5	7,2	7±6
Tag 8 (4–8 h)	2,9	3,2	4,0	8,4	2,8	5,7	5±2
Tag 8 (8–12 h)	1,1	5,9	6,7	11,5	2,5	2,7	5±4
Tag 8 (12–24 h)	7,8	9,8	12,6	48,4	7,6	30,0	19±17
Tag 9 (0–4 h)	2,1	4,2	4,4	15,6	2,8	6,2	6±5
Tag 9 (4–8 h)	2,2	2,0	6,6	9,1	1,6	5,5	4±3
Tag 9 (8–12 h)	1,2	4,3	6,3	10,4	1,7	5,6	5±3
Tag 9 (12–24 h)	8,4	14,3	17,6	45,6	7,7	9,0	17±14
Tag 10 (0–4 h)	1,6	4,1	4,7	15,7	2,5	2,8	5±5
Tag 10 (4–8 h)	2,7	4,0	6,3	6,6	2,9	5,4	5±2
Tag 10 (8–12 h)	1,8	5,8	3,3	11,9	2,4	4,7	5±4
Tag 10 (12–24 h)	7,3	14,0	17,5	39,1	6,4	25,8	18±12
Tag 11 (0–4 h)	1,1	1,1	3,4	13,4	2,4	6,7	5±5
Tag 11 (4–8 h)	2,9	4,4	3,0	9,6	1,5	4,2	4±3
Tag 11 (8–12 h)	1,9	3,7	7,4	7,5	3,3	6,9	5±2
Tag 11 (12–24 h)	8,0	15,8	15,5	42,2	7,6	21,3	18±13
Tag 12 (0–4 h)	2,2	3,3	4,8	10,5	2,0	5,4	5±3
Tag 12 (4–8 h)	2,6	3,5	2,8	13,9	1,9	5,8	5±5
Tag 12 (8–12 h)	2,2	4,8	7,2	4,4	1,8	6,0	4±2
Tag 12 (12–24 h)	6,3	14,7	15,2	39,4	6,1	15,9	16±12
Tag 13 (0–12 h)	5,9	12,1	11,5	24,7	4,8	15,6	12±7
Tag 13 (12–24 h)	5,8	15,5	15,5	32,4	8,4	22,3	17±10

MW Mittelwert; SD Standardabweichung

A.6. Daten der Modell-Reaktionen zur endogenen Bildung von Acrylamid

Tabelle 0-11 Übersicht über die Acrylamid-Bildung (in ppm) der jeweils 5 mM Reaktionsansätze 1–4 in 250 ml. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung.

Tag	Acrylamid-Bildung [ppm]			
	Reaktionsansatz 1*	Reaktionsansatz 2*	Reaktionsansatz 3*	Reaktionsansatz 4*
7	212 \pm 119	10 \pm 2	10 \pm 3	<LOQ
14	309 \pm 18	18 \pm 3	28 \pm 11	<LOD/<LOQ
28	440 \pm 77	78 \pm 4	61 \pm 3	<LOD/<LOQ
45	548 \pm 81	198 \pm 2	76 \pm 3	<LOD/<LOQ
63	346 \pm 46	333 \pm 7	95 \pm 4	<LOD/<LOQ
84	495 \pm 55	501 \pm 19	113 \pm 5	<LOD/<LOQ

- *
 1: L-Asparagin + D-Glucose
 2: L-Asparagin + D-Ribose
 3: L-Asparagin + Methylglyoxal
 4: L-Asparagin + Pyruvat

LOD Nachweisgrenze; LOQ Bestimmungsgrenze

Tabelle 0-12 Übersicht über die Acrylamid-Bildung (in ppm) der jeweils 5 mM Reaktionsansätze 5–8 in 250 ml. Dargestellt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung.

Tag	Acrylamid-Bildung [ppm]			
	Reaktionsansatz 5*	Reaktionsansatz 6*	Reaktionsansatz 7*	Reaktionsansatz 8*
7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14	<LOD/<LOQ	<LOD/<LOQ	<LOD	<LOD/<LOQ
28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
45	<LOD/<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
63	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD/<LOQ
84	<LOD/<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD/<LOQ

- *
 5: L-Asparagin + Phosphoenolpyruvat
 6: L-Asparagin + L-Glutaminsäure
 7: L-Asparagin + D/L-Methionin
 8: L-Asparagin + Harnstoff

LOD Nachweisgrenze; LOQ Bestimmungsgrenze

A.7. Ernährungsprotokolle und Acrylamid-Gehalte der verzehrten Lebensmittel der Humanstudie II

Tabelle 0-13 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	09:00–13:00	500	Sprudelwasser	n. a.
1	09:53	150	Yoo Fruit	<LOD
1	12:30	863	Mensa 2 + Suppe ohne Salat (Schinken-Sahne Nudeln)	<LOD
1	14:00–19:00	500	Sprudelwasser	n. a.
1	14:35	300	Pepsi light lemon	n. a.
1	16:02	150	Jogurt mild	n. a.
1	20:00–21:00	900	Sprudelwasser	n. a.
1	20:30	158	Würstchen mit Senf und Ketchup	21,9
1	20:30	281	Brötchen Schinken	15,4
1	20:30	113	Brötchen Teewurst	25,0
1	21:00–23:59	700	Sprudelwasser	n. a.
2	09:00–14:00	1.000	Sprudelwasser	n. a.
2	10:00	150	Yoo Fruit	<LOD
2	12:30	291	Mensa 2 (Jägerschnitzel, Pommes) + Suppe ohne Salat	100,1
2	13:30	300	Pepsi light lemon	n. a.
2	16:30	300	Pepsi light lemon	n. a.
2	20:30	150	Yoo Fruit	<LOD
2	21:00	178	Würstchen mit Ketchup und Senf	21,9
2	21:00	168	Brötchen Schinken	15,4
2	21:00	500	Sprudelwasser	n. a.
3	09:40	150	Yoo Fruit	<LOD
3	10:00–17:00	700	Sprudelwasser	n. a.
3	12:30	389	Mensa 2 ohne Salat 1/2 Kaltschale (Cevapcici Pommes)	134,5
3	14:10	300	Pepsi light lemon	n. a.
3	17:00	230	Bier	<LOD
3	17:45	272	Pizza	7,6*
3	20:00	280	Bier	<LOD
3	20:00–22:15	500	Sprudelwasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-14 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	09:30	150	Yoo Fruit	<LOD
4	10:00–17:00	1.000	Sprudelwasser	n. a.
4	12:40	637	Mensa 1 (Burrito) mit Salat 1/2 Kaltschale	5,6*
4	14:30	300	Pepsi light lemon	n. a.
4	16:15	230	Bier	<LOD
4	17:00	800	Radler	n. a.
4	20:45	324	Brötchen Teewurst	25,0
4	20:45	88	Dipp	n. a.
4	0:00–03:00	1.100	Sprudelwasser	n. a.
5	11:30	150	Yoo Fruit	<LOD
5	11:30–18:00	1.000	Sprudelwasser	n. a.
5	16:45	71	Rocher-Eis	9,3
5	17:30	45	<i>Pan tostado con tomate</i>	49,8
5	17:30	330	Bier	<LOD
5	20:00–21:00	1.000	Bier	<LOD
5	21:30	80	Baguette	39,6
5	21:30	125	Dipp	n. a.
5	21:30	195	Würstchen mit Ketchup und Senf	21,9
5	21:30	157	Brötchen Käse	26,7
5	21:30	45	Mars	5,7*
5	21:30	330	Bier	<LOD
5	22:00	600	Sprudelwasser	n. a.
6	5:00–8:00	1.000	Sprudelwasser	n. a.
6	11:00	300	Yoo Fruit	<LOD
6	14:40	170	Brötchen Schinken	15,4
6	14:40	113	Brötchen Käse	26,7
6	16:00	330	Bier	<LOD
6	16:00	200	Sekt	n. a.
6	16:00	1.000	Sprudelwasser	n. a.
6	19:30	120	Baguette	39,6
6	19:30	44	Dipp	n. a.
6	19:30	104	Salat	n. a.
6	19:30	330	Bitburger	<LOD
6	19:30	115	Pommes	30,7
6	19:30	308	Schweinefilet mit Gorgonzolasoße	<LOD
6	20:30	500	Radler	n. a.
6	20:30	94	Tiramisu	1,1*
6	20:30	500	Leitungswasser	n. a.
6	23:00	400	Weizen	<LOD
6	23:00	108	Tiramisu	1,1*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-15 Von GK-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	10:00	123	Brötchen mit Gorgonzola und Bergkäse	19,6
7	22:00	110	Brötchen mit Bergkäse	26,7
7	10:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	10:00	108	Tiramisu	1,1*
7	12:30	500	Leitungswasser	n. a.
7	13:30	56	<i>Pan tostado con tomate</i>	49,8
7	15:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	17:00	108	Brötchen mit Bergkäse	26,7
7	17:00	253	Tiramisu	1,1*
7	17:00	500	Cola light	n. a.
7	17:00	150	Leitungswasser	n. a.
7	22:00	90	Schweinefilet mit Gorgonzolasoße	<LOD
7	22:00	261	Brötchen mit Bergkäse	26,7
7	22:30	500	Leitungswasser	n. a.
8	09:00	150	Yoo Fruit	<LOD
8	9:00–11:00	250	Sprudelwasser	n. a.
8	12:30	551	Mensa 2 ohne Kaisergemüse 2/3 Kaltschale (Putengulasch Nudeln)	4,2*
8	16:52	300	Pepsi light lemon	n. a.
8	17:00–19:00	250	Sprudelwasser	n. a.
8	19:30	235	Gnocchi	9,0*
8	19:30	205	Fleisch Curry	3,6*
8	22:00	700	Sprudelwasser	n. a.
9	09:30	150	Yoo Fruit	<LOD
9	10:00–14:00	300	Leitungswasser	n. a.
9	12:30	393	Mensa 1 2/3 Salat ohne Kaltschale (Truthansteak, Kroketten)	55,3
9	15:50	300	Pepsi light lemon	n. a.
9	18:00–19:00	300	Leitungswasser	n. a.
9	19:00	291,25	(Vier-)Käsepizza	<LOD
9	19:00	400	Multisaft	n. a.
9	22:00	300	Sprudelwasser	n. a.
10	08:44	150	Yoo Fruit	<LOD
10	11:11	300	Multisaft	n. a.
10	12:30	451	Mensa 1 komplett (Rindergeschnetztes Spätzle)	<LOD
10	14:00–16:00	300	Leitungswasser	n. a.
10	17:00	300	Pepsi light lemon	n. a.
10	19:00	340	Die Knusperfrische Peperoni-Salami	<LOD
10	22:55	500	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-16 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	12:00	863	Mensa 2 ohne Salat (Schinken-Sahne-Nudeln)	<LOD
1	12:00	400	Sprite Zero	n. a.
1	13:00	100	Milchkaffee	5,9
1	15:00	400	Iso-Sport-Getränk	n. a.
1	15:00	180	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBC-Sauce)	5,8*
1	15:00	100	Karamell-Pudding	<LOD
1	19:00	1.500	Volvic Kirsch-Geschmack	n. a.
1	20:30	250	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBC-Sauce)	5,8*
1	23:00	200	Bier	<LOD
2	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)	7,6
2	11:30	390	Mensa 1 komplett (Schafskäse Baguette)	<LOD
2	11:30	500	Leitungswasser	n. a.
2	13:30	200	Milchkaffee	5,9
2	15:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
2	16:30	230	Sandwich I (Leberwurst, Käse, BBC-Sauce)	5,8*
2	16:30	200	Nuss-Nougat-Croissant	26,0
2	18:00	500	Iso-Sport-Getränk	n. a.
2	19:00	1.500	Leitungswasser	n. a.
2	21:00	300	Pizza Speciale	13,6
2	23:00	400	Kilkenny Bier	<LOD
3	10:00	150	Kaffee (schwarz, 1 Pad)	7,6
3	12:00	402	Mensa 1 ohne Salat (Seelachs, Reis, Bechamel)	<LOD
3	12:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	13:00	120	Sandwich-Eis	4,8*
3	15:00	190	Banane	n. a.
3	15:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	15:30	150	Apfel	n. a.
3	15:30	180	Banane	n. a.
3	15:30	500	Leitungswasser	n. a.
3	19:00	200	Cheeseburger	9,0*
3	19:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	19:00	180	Banane	n. a.
3	21:30	140	Sandwich II (Leberwurst, Käse, BBC-Sauce)	9,3*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-17 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)	7,6
4	13:00	370	Pizza Vegetale	46,8
4	13:00	500	Leitungswasser	n. a.
4	14:00	120	Sandwich-Eis	4,8*
4	14:00	500	Leitungswasser	n. a.
4	17:00	200	Johannisbeersaft	n. a.
4	17:00	500	Leitungswasser	n. a.
4	17:30	250	Eis (Cookie Dough)	4,5*
4	18:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
4	18:00	500	Leitungswasser	n. a.
4	18:00	160	Banane	n. a.
4	20:00	200	Bollburger	9,3*
4	20:00	330	Radler	n. a.
4	20:00	500	Leitungswasser	n. a.
4	23:00	1.000	Bier	<LOD
4	23:00	500	Leitungswasser	n. a.
5	11:00	160	Banane	n. a.
5	11:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
5	11:00	100	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
5	13:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
5	13:00	250	Eis (Cookie Dough)	4,5*
5	14:30	175	Pizza Vegetale	46,8
5	14:30	175	Pizza Speciale	13,6
5	15:00	200	Johannisbeersaft	n. a.
5	15:00	500	Leitungswasser	n. a.
5	16:00	500	Iso-Sport-Getränk	n. a.
5	17:00	200	Chickenwings mit süß-saurer Soße und Brot	38,3
5	17:00	400	Pizza Thunfisch	31,6
5	17:30	2.000	Leitungswasser	n. a.
5	17:30	150	Espresso	21,7
5	02:00	330	Radler	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-18 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
6	11:00	500	Leitungswasser	n. a.
6	11:00	150	Banane	n. a.
6	11:30	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
6	13:30	1.000	Leitungswasser	n. a.
6	13:30	400	Pizza Speciale	13,6
6	14:00	150	Kaffee (1 Pad, schwarz)	7,6
6	14:00	30	Vollmilchschokolade (ganze Nuss)	15,4*
6	16:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
6	16:00	100	Eis (Cookie Dough)	4,5*
6	19:00	500	Iso-Sport-Getränk	n. a.
6	19:00	280	Sandwich (Leberwurst, Käse, BBC-Sauce)	5,8*
6	20:00	50	Vollmilchschokolade (ganze Nuss)	15,4*
6	20:00	200	Johannisbeersaft	n. a.
6	23:00	1.200	Radler	n. a.
6	23:00	200	Cheeseburger	9,0*
6	24:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	11:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	14:00	200	Hähnchensteak	21,9
7	14:00	150	Kartoffelpüree	n. a.
7	14:00	50	Feldsalat mit Balsamico	n. a.
7	14:00	150	Aufbackbrötchen	7,8*
7	15:00	110	Gelatelli-Eis	n. a.
7	15:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	16:30	115	Snickers (Intense Choc)	12,7*
7	16:30	500	Leitungswasser	n. a.
7	20:00	100	Pizza mit Salami und Gemüse	<LOD
7	20:00	150	RAPP-Multisaft	n. a.
7	22:00	1.000	Leitungswasser	n. a.

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-19 Von GK-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
8	10:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)	7,6
8	11:30	67	Mensa 1, ½ Cordon-Bleu, ½ Salat	5,9*
8	11:30	102	Mensa 1 (Pommes)	104,9
8	15:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	15:00	160	Nektarine	n. a.
8	16:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	16:00	160	Banane	n. a.
8	19:30	160	Nektarine	n. a.
8	19:30	200	Vollkornbrot (süß-saure Sauce, Schwarzwälder-Schinken, Gouda-Käse)	4,1*
8	20:00	500	Iso-Fit-Getränk	n. a.
8	23:00	150	Eis (Cookie Dough)	4,5*
8	24:00	1.000	Radler	n. a.
8	24:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	10:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
9	10:00	300	Kaffee (schwarz, 2 Pads)	7,6
9	10:00	50	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
9	11:15	393	Mensa 1(Truthahnsteak, Kroketten), 1/2 Salat	55,3
9	11:15	500	Leitungswasser	n. a.
9	14:00	60	Sandwich-Eis	4,8*
9	16:00	500	Leitungswasser	n. a.
9	16:00	60	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
9	16:00	160	Banane	n. a.
9	19:00	1.000	Radler	n. a.
9	19:00	500	Leitungswasser	n. a.
9	23:00	240	Sandwich (Mischbrot, Schwarzwälder- Schinken, Knoblauch-Dressing, Gouda-Käse)	7,9*
9	23:00	500	Leitungswasser	n. a.
9	23:00	100	Haselnuss-Mignon-Schnitte	159,7
10	10:00	150	Milchkaffee	5,9
10	10:00	200	Nuss-Nougat Croissant	26,0
10	12:15	338,25	Mensa 1: ½ Suppe, ¾ Spätzle mit Fleisch	<LOD
10	12:15	500	Leitungswasser	n. a.
10	14:30	150	Milchkaffee	5,9
10	16:00	500	Leitungswasser	n. a.
10	18:00	500	Leitungswasser	n. a.
10	22:30	360	Crepes mit Marmelade	<LOD
10	22:30	300	Leitungswasser	n. a.
10	23:30	150	Apfel	n. a.
10	23:30	500	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-20 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	10:00	200	Glas Wasser aus der Leitung	n. a.
1	11:40	808	Mensa (Schinken-Sahne-Nudeln)	<LOD
1	12:30	1.000	Mineralwasser (Plastikflasche)	n. a.
1	16:10	250	Kaffee (2 Pads), schwarz	7,6
1	18:00	250	Leitungswasser	n. a.
1	18:00	180	Belegtes Brötchen mit Butter, Schinken und Käse	5,9*
1	20:15	400	Glas Wasser	n. a.
1	20:15	122	Belegtes Brötchen wie 18,00	5,9*
1	20:30	120	Belegtes Brötchen wie 18,00	5,9*
1	22:00	200	Bier	<LOD
2	08:20	250	Kaffee (2 Pads), schwarz	7,6
2	09:40	250	Leitungswasser	n. a.
2	11:30	390	Mensa 1 (Schafskäse Baguette)	<LOD
2	12:30	250	Leitungswasser	n. a.
2	13:12	125	Avocado (2/3)	n. a.
2	14:00–20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
2	14:00–20:00	50	Haselnussschnitte	133,8
2	22:00	600	Döner	5,4*
2	22:30	500	Bier (Pils)	<LOD
3	11:00	90	Nuss-Nougat-Croissant	26,0
3	11:30	402	Mensa 1 (Seelachs Reis)	<LOD
3	13:00	90	Sandwich-Eis	4,8*
3	11:30–14:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	13:45	110	Apfel	n. a.
3	14:10	150	Banane	n. a.
3	15:09	157	Apfel	n. a.
3	16:35	120	Brötchen mit Leberkäse, Käse und Butter	5,5*
3	19:50	160	Apfel	n. a.
3	20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	21:30	100	Toastbrot (Leberkäse, BBQ-Sauce, Käse)	<LOD
3	22:30	150	Pfefferminztee mit Honig	0,7*
3	23:30	150	Grüner Tee mit Honig	<LOD

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-21 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	05:35	200	Haferflocken mit Banane + Honig	2,0*
4	09:05	100	Kaffee	7,6
4	12:00	400	ACE-Saft	n. a.
4	12:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
4	13:00	600	Pasta mit gebackenen Tomaten, Olivenöl, Knoblauch	<LOD
4	14:00	150	Apfel	n. a.
4	16:30	500	Leitungswasser	n. a.
4	17:30	250	Johannisbeersaft	n. a.
4	18:10	200	Belegtes Brötchen	5,5*
4	21:00	60	1 Banane	n. a.
4	21:00	200	Johannisbeersaft	n. a.
4	23:00	200	Pfefferminztee	0,7*
5	00:00	90	Banane	n. a.
5	09:00	250	Kaffee (2 Pads)	7,6
5	09:15	90	Belegtes Brötchen	5,5*
5	12:00	250	Glas Leitungswasser	n. a.
5	12:00	60	Banane	n. a.
5	14:00	175	½ Pizza vegetarisch	46,8
5	14:00	175	½ Pizza Speciale	13,6
5	15:41	150	Kaffee (1 Pad)	7,6
5	16:30	157	Apfel	n. a.
5	17:00	200	Johannisbeersaft	n. a.
5	20:00	250	Grüner Tee + Honig	<LOD
5	21:00	100	Brot, Leberkäse, Käse, Butter	12,8

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-22 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	09:00	250	Grüner Tee + Honig	<LOD
6	09:00	130	Brot, Leberkäse, Butter, Käse	12,8
6	09:30	250	Kaffee (2 Pads)	7,6
6	11:00	150	Apfel	n. a.
6	11:00	250	Leitungswasser	n. a.
6	14:00	420	Spaghetti Bolognese	
6	14:30	150	Kaffee	8,7
6	14:30	200	Leitungswasser	n. a.
6	14:35	70	Käsekuchen	<LOD
6	16:30	250	Leitungswasser	n. a.
6	18:30	150	Toastbrot belegt	9,3*
6	18:30	200	Grüner Tee	<LOD
6	20:00	100	Nuss-Nougat-Croissant	26,0
6	20:00	150	Johannisbeersaft	n. a.
6	22:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
6	22:00	150	Johannisbeersaft	n. a.
7	08:10	250	Leitungswasser	n. a.
7	08:45	250	Kaffee (2 Pads)	7,6
7	13:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	14:00	500	Reis mit Fisch, Oliven, Knoblauch, Kartoffeln	33,9
7	14:30	100	Kaffee	8,7
7	17:00	250	Johannisbeersaft gemischt mit Leitungswasser	n. a.
7	20:00	150	Pizza Vegetarisch+ Salami	<LOD
7	22:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	22:30	150	ACE-Saft	n. a.
8	06:30	250	Grüner Tee+ Honig	<LOD
8	09:30	250	Kaffee (2 Pads)	7,6
8	11:30	134	Mensa Essen 1, nur 1/2 Salat	5,9*
8	11:30	102	Mensa Pommes frites	104,9
8	13:00	100	Kaffee (1 Pad)	7,6
8	13:00	93	Nuss-Nougat-Croissant	26,0
8	13:30	160	Nektarine	n. a.
8	13:40	100	Banane	n. a.
8	14:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	17:15	200	Brot belegt mit Käse, Wurst, Butter	6,7*
8	18:00	144	Nektarine	n. a.
8	19:00	95	Toastbrot belegt mit Käse, Wurst, Butter	<LOD
8	19:30	90	Banane	n. a.
8	20:30	125	Eis (Cookie-Dough)	4,5*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-23 Von GK-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
9	09:30	250	Kaffee (2 Pads)	7,6
9	09:45	250	Grüner Tee + Honig	<LOD
9	12:00	450	Pasta mit gehackten Tomaten, Olivenöl, Knoblauch	<LOD
9	13:25	125	Kaffee (1 Pads)	7,6
9	14:00	150	Nektarine	n. a.
9	15:00	250	Leitungswasser	n. a.
9	15:00	90	Banane	n. a.
9	19:45	200	Brot belegt mit BBQ-Sauce, Käse und Wurst	6,8*
9	21:00	500	Wasser	n. a.
10	09:00	250	Grüner Tee + Honig	<LOD
10	09:15	100	Brot mit Käse und Butter	6,8*
10	12:30	451	Mensa 1 (Rindergeschnetztes Spätzle)	<LOD
10	13:00	250	Leitungswasser	n. a.
10	13:20	178	Apfel	n. a.
10	14:30	160	Apfel	n. a.
10	14:30	90	Banane	n. a.
10	15:00	250	Kaffee (2 Pads) Neue Marke	9,4
10	16:30–19:00	1.500	Leitungswasser	n. a.
10	20:30	200	Baguette belegt mit Schinken, Käse und Butter	<LOD
10	22:00	700	Leitungswasser	n. a.

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-24 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	vor 8:00	k. A.	Streuselkuchen	k. A. v.
1	12:30	808	Mensa 2 komplett (Schinken-Sahne-Nudeln)	<LOD
1	13:00	200	Kaffee	5,9
1	16:00	200	Kaffee	5,9
1	18:30	66	3 Hanuta	56,9
1	22:30	300	Nudeln	n. a.
1	22:30	300	Schweinefleisch	<LOD
1	ganzer Tag	1.500	Leitungswasser	n. a.
2	05:00	500	Orangensaft	n. a.
2	06:30	150	Müsli mit Milch	2,1*
2	12:00	390	Mensa 2 (Schnitzel Jäger Art, Pommes frites) + Salat ohne Kaltschale	100,1
2	14:00	200	Kaffee	5,9
2	20:30	400	Cola	n. a.
2	20:30	300	Nudeln	n. a.
2	ganzer Tag	300	Schweinefleisch	<LOD
2	05:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	06:30	150	Müsli mit Milch	2,1*
3	08:00	500	Cola	n. a.
3	10:00	200	Kaffee	5,9
3	11:00	200	Kaffee	5,9
3	13:00	402	Mensa 1 (Seelachs, Reis)	<LOD
3	13:30	400	Kaffee	5,9
3	14:00	22	Hanuta	56,9
3	18:00	22	Hanuta	56,9
3	18:00	200	Milchreis	n. a.
3	18:00	50	Studentenfutter	11,8
3	22:45	150	Nudeln mit Pesto	<LOD

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; k. A. keine Angabe; k. A. v. kein Aliquot vorhanden; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-25 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	06:30	150	Müsli mit Milch	2,1*
4	10:00	400	Kaffee	5,9
4	13:00	637	Mensa 1 komplett (Burrito)	5,6*
4	15:00	500	Cola	n. a.
4	15:30	22	Hanuta	56,9
4	16:00	1.500	Leitungswasser	n. a.
4	16:30	200	Bollburger	9,3*
4	19:30	660	Radler	n. a.
4	21:30	150	Nudeln mit Pesto	<LOD
4	22:00–01:00	2.000	Bier (Bitburger)	<LOD
5	06:30	150	Müsli mit Milch	2,1*
5	08:00	248	2 Brötchen mit Beilage Laugenbrötchen	5,5*
5	09:00	500	Cola	n. a.
5	10:00	400	Kaffee	5,9
5	12:30	470	Mensa 2 komplett (Kartoffelsuppe, Puffer, Apfelmus)	152,0
5	15:00	500	Cola	n. a.
5	15:30	70	Studentenfutter	11,8
5	21:30	22	Hanuta	56,9
5	23:00	150	Nudeln mit Pesto	<LOD
5	ganzer Tag	3.000	Leitungswasser	n. a.
6	06:30	150	Müsli mit Milch	2,1*
6	08:00	700	Leitungswasser	n. a.
6	13:00	200	Pizza	13,6
6	15:00	22	Hanuta	56,9
6	17:00	1.500	Leitungswasser	n. a.
6	22:00	200	gegrilltes Fleisch + Karottensalat + Kräuterbaguette	18,9
6	22:00	500	Bier	n. a.
6	22:00	330	Sprite	n. a.
7	08:00	150	Müsli mit Milch	2,1*
7	15:00	674	300 g Nudeln mit 200 g Bratwurst und 3 Eiern	19,6
7	18:30	200	Schokomüsli mit Milch	3,9*
7	22:00	500	Bier	n. a.
7	ganzer Tag	3.000	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-26 Von GK-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
8	06:30	200	Schokomüsli mit Milch	3,9*
8	06:45	200	Kaffee	5,9
8	12:00	551	Mensa 2 komplett (Putengulasch, Nudeln)	4,2*
8	15:30	500	Cola	n. a.
8	17:00	500	Cola	n. a.
8	17:00	70	Studentenfutter	11,8
8	17:00	170	Frikadellen-Brötchen (Mensa)	4,0*
8	22:00	150	Nudeln mit Pesto	<LOD
8	ganzer Tag	2.500	Leitungswasser	n. a.
9	06:30	200	Schokomüsli mit Milch	3,9*
9	11:30	393	Mensa 1 (Truthahnsteak Kroketten)	55,3
9	14:00	500	Cola	n. a.
9	15:30	500	Cola	n. a.
9	15:30	70	Studentenfutter	11,8
9	20:30	220	Fleischkäsebrötchen mit Ketchup	3,5*
9	21:00 - 22:00	990	Bier	n. a.
9	ganzer Tag	1.500	Leitungswasser	n. a.
10	06:30	200	Schokomüsli mit Milch	3,9*
10	08:30	248	2 Laugenbrötchen mit Frischkäse	5,5*
10	12:30	451	Mensa 1 komplett (Rindergeschnetzeltes Spätzle)	<LOD
10	15:30	400	Kaffee	5,9
10	15:30	22	Hanuta	56,9
10	19:00	200	Schokomüsli mit Milch	3,9*
10	ganzer Tag	2.000	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-27 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	14:00	589	Pizza Margarita	4,2*
1	14:00	233	Leitungswasser	n. a.
1	17:30	230	Leitungswasser	n. a.
1	19:00	236	Weltmeisterbrot (Salami u. Emmentaler)	6,5*
1	19:00	460	Leitungswasser	n. a.
1	21:00	539	Nougat Kissen, Milch 3,5 %	3,3*
2	10:00	233	Leitungswasser	n. a.
2	11:00–17:00	750	Active O2 Apfel Kiwi	n. a.
2	17:00	750	Hot-Dog (Ikea)	31,0
2	19:45		Leitungswasser	n. a.
2	17:00	200	Smoothie Blueberry and Raspberry	n. a.
2	21:30	900	Hühner-Nudel-Eintopf	<LOD
2	21:30	75	Muffin Schoko	8,9*
2	23:00	250	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)	n. a.
3	08:30	40	Muffin Schoko	8,9*
3	08:30	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
3	11:30	350	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei	6,9*
3	11:30	500	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)	n. a.
3	12:00–15:00	750	Active O2 Apfel Kiwi	n. a.
3	18:00	450	Leitungswasser	n. a.
3	20:30	120	Chips Chakalaka	270,8
3	21:00	500	Frühstücks Nektar (Orange-Maracuja mit Honig)	n. a.
3	21:00	130	Salat	n. a.
3	21:00	450	Spaghetti mit Olivenöl, Zwiebel, Tomaten, Garnelen	<LOD
3	21:00	40	Brot	49,1
3	21:15	350	Pfirsichsaft	n. a.
4	11:00	150	Brötchen mit Schinken und Griebenschmalz	2,9*
4	12:00–14:00	750	Active O2 Apfel Kiwi	n. a.
4	15:00	800	Hack-Lauchsuppe	13,2*
4	15:00	50	Brötchen	4,8*
4	16:00–18:00	350	Active O2 Apfel Kiwi	n. a.
4	18:00	500	Cola-Weizen	n. a.
4	19:30	550	Active O2 Apfel Kiwi	n. a.
4	19:45	350	Hack-Lauchsuppe	13,2*
4	19:50	250	Banane mit Quark Genuss Himbeer Rhabarber	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-28 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
5	09:30	150	Brötchen mit Schinken und Griebenschmalz	2,9*
5	12:30	320	Banane	n. a.
5	13:00	100	Hack-Lauchsuppe	13,2*
5	17:00	500	Eistee Wildkirsch	n. a.
5	18:00	800	Lasagne Bolognese	4,2*
5	18:00–21:00	500	Eistee Wildkirsch	n. a.
5	21:00	100	Erdnüsse	67,3
6	11:30	420	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
6	11:30	66	Zimtschnecke	8,5
6	11:45	300	Hot Dog	31,0
6	15:00	280	Fleischbällchen	4,4*
6	15:00	400	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
6	18:00–22:00	1.200	Coca Cola	n. a.
6	23:30	500	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
6	02:00	500	Cola-Weizen	n. a.
7	11:30	80	Croissant	21,2
7	14:50	230	Suppe	<LOD
7	14:50	560	Bratreis mit Gemüse und Ente	4,0*
7	14:50	400	Eistee	n. a.
7	19:00	400	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
7	21:00	330	Coca Cola	n. a.
7	01:00	700	Cola Weizen	n. a.
8	11:30	300	Kartoffelsalat	<LOD
8	14:00	375	Obstgarten Pfirsich Maracuja	n. a.
8	19:00	450	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei	2,9*
8	20:00	250	Obstgarten Pfirsich Maracuja	n. a.
8	14:00–21:00	1.000	Eistee	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-29 Von GK-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
9	11:15	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
9	11:15	66	Zimtschnecke	8,5
9	12:30	300	Hot Dog	31,0
9	14:00	250	Energy Drink (Summer Mojito)	n. a.
9	15:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
9	16:30	200	Hühner-Nudel-Eintopf	<LOD
9	16:30	200	Rinderkraftbrühe	<LOD
9	16:30	52	Brötchen	4,8*
9	16:45	60	Brownie	28,7
9	20:00	300	Speck-Käse-Spätzle	<LOD
9	19:00–20:30	1.000	Cola Weizen	n. a.
9	20:30	250	Obstgarten Pfirsich Maracuja	n. a.
10	13:00	800	Lasagne Bolognese	4,2*
10	18:00	500	Cola	n. a.
10	20:00	500	Cola	n. a.
10	21:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
10	23:00	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
10	00:00	500	Cola Weizen	n. a.
10	01:00	500	Cola Weizen	n. a.
10	01:00	300	Reis mit Currysauce	2,9*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-30 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	12:30	863	Mensa 1 komplett (Schweinerückensteak Pommes)	29,2
1	14:00	250	Mineralwasser classic	n. a.
1	17:00	250	Leitungswasser	n. a.
1	19:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
1	20:30	147	Würstchen (Geflügelbratwurst, extrawürzig) mit Senf und Ketchup	21,9
1	20:30	35	Aufbackbrötchen	<LOD
1	22:30	200	Sprudelwasser	n. a.
2	11:00	16	Vegane Schokolade	106,3
2	12:30	390	Mensa 1 + Salat + 2x Kaltschale (Schafskäse Baguette)	<LOD
2	15:30	100	Sekt	n. a.
2	17:30	500	Leitungswasser	n. a.
2	20:45	250	Sprudelwasser	n. a.
2	21:15	159	Würstchen mit Ketchup und Senf	5,9*
2	21:15	44	Aufbackbrötchen	<LOD
2	21:30	250	Sprudelwasser	n. a.
2	22:40	250	Sprudelwasser	n. a.
3	12:15	402	Mensa 1 + Salat + 2x Kaltschale (Seelachsfilet Reis)	<LOD
3	14:35	300	Roter Saft	n. a.
3	16:30	500	Leitungswasser	n. a.
3	17:45	318	Pizza Salami + Pizza Käse	7,6*
3	18:30	500	Mineralwasser classic	n. a.
3	22:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	22:00	150	Yoo Fruit Mango-Maracuja	<LOD
4	08:00	250	Leitungswasser	n. a.
4	12:15	500	Mineralwasser classic	n. a.
4	12:30	236	Würstchen mit Senf	8,7
4	12:30	300	Radler	n. a.
4	13:30	76	Eis	n. a.
4	17:00	800	Radler	n. a.
4	17:30	250	Mineralwasser classic	n. a.
4	20:45	93,7	Aufbackbrötchen	<LOD
4	20:45	115,6	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)	n. a.
4	20:45	131,9	Paprika + Tomate	n. a.
4	22:45	250	Sprudelwasser	n. a.
4	23:00	250	Sprudelwasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-31 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
5	11:00	125	Leitungswasser	n. a.
5	12:15	470	Mensa 2: ½ Suppe, Kartoffelpuffer, Apfelmus	152,0
5	13:00	125	Leitungswasser	n. a.
5	15:00	250	Sprudelwasser	n. a.
5	16:45	71	Mangoeis	n. a.
5	17:45	200	Sprudelwasser	n. a.
5	17:45	500	Radler	n. a.
5	17:45	59,8	<i>Pan tostado con tomate</i>	49,8
5	20:00	900	Radler	n. a.
5	21:30	61	Baguette (Peperonibaguette)	39,6
5	21:30	45	Aufbackbrötchen	<LOD
5	21:30	107	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)	n. a.
5	21:30	195	Würstchen mit Ketchup und Senf	5,9*
5	21:30	500	Radler	n. a.
5	22:00	250	Sprudelwasser	n. a.
6	11:00	250	Leitungswasser	n. a.
6	11:30	250	Leitungswasser	n. a.
6	14:40	93	Aufbackbrötchen	<LOD
6	14:40	72,4	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)	n. a.
6	14:40	250	Leitungswasser	n. a.
6	15:20	120	Buttergemüse	n. a.
6	16:00	110	Sekt	n. a.
6	16:00	250	Leitungswasser	n. a.
6	17:45	71	Rocher-Eis	9,3
6	18:00	400	Radler	n. a.
6	19:30	46	Baguette (Peperonibaguette)	39,6
6	19:30	27	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)	n. a.
6	19:30	101	Salat	n. a.
6	19:30	162	Pommes (selbstgemacht im Backofen)	30,7
6	19:30	62	Schweinefilet mit Pilzsoße	3,0*
6	19:30	75	Schweinefilet mit Gorgonzolasoße	<LOD
6	19:30	500	Radler	n. a.
6	21:00	250	Leitungswasser	n. a.
6	21:30	71	Tiramisu	1,1*
6	22:00	250	Leitungswasser	n. a.
6	23:00	300	Maracuja-Schorle	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-32 Von GK-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	10:00	101	Brötchen mit Gorgonzola und Bergkäse	19,6
7	10:00	250	Leitungswasser	n. a.
7	11:45	172	Buttergemüse	n. a.
7	11:45	250	Zitronenwasser	n. a.
7	13:00	107	<i>Pan tostado con tomate</i>	49,8
7	13:00	250	Zitronenwasser	n. a.
7	14:30	250	Zitronenwasser	n. a.
7	16:15	78	Pommes (selbstgemacht im Backofen)	30,7
7	17:00	250	Zitronenwasser	n. a.
7	18:15	94	Aufbackbrötchen	<LOD
7	18:15	75,4	Schweinefilet mit Pilzsoße	3,0*
7	18:15	45,8	Dipp (Zwiebel-Schmand-Dipp)	n. a.
7	22:00	45	Himbeereis	n. a.
7	22:00	500	Orangensaft mit Eiswürfeln	n. a.
8	11:00	250	Leitungswasser	n. a.
8	12:30	183	Mensa 1 vegetarisch + Salat + ½ Kaltschale (Sellerieschnitzel)	13,5
8	15:00	102	Pommes Mensa 1	104,9
8	17:30	250	Leitungswasser	n. a.
8	18:00	150	Yoo Fruit Mango-Maracuja	<LOD
8	18:00	500	Mineralwasser classic	n. a.
8	21:30	500	Leitungswasser	n. a.
8	21:30	45	Aufbackbrötchen	<LOD
8	22:45	80	Schweinefilet mit Pilzsoße	3,0*
8	11:00	150	Leitungswasser	n. a.
9	11:45	383	Mensa 2 vegetarisch + Salat + Kaltschale (Käsesalat Pommes)	48,4
9	13:15	250	Leitungswasser	n. a.
9	13:15	125	Kirschkuchen	11,2
9	16:45	250	Zitronenwasser	n. a.
9	19:00	201	Flammkuchen (Käse & Lauch)	6,9*
9	20:30	125	Orangensaft mit Eiswürfeln	n. a.
9	21:30	300	Orangensaft mit Eiswürfeln	n. a.
10	12:30	451	Mensa 1 komplett (Rindergeschnetzeltes Spätzle)	<LOD
10	16:00	250	Roter Saft	n. a.
10	16:30	250	Roter Saft	n. a.
10	18:10	72	<i>Pan tostado con tomate</i>	49,8
10	20:00	500	Mineralwasser classic	n. a.
10	20:45	990	Radler	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-33 Von GK-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	12:30	90	2x Brot mit Leberwurst	4,6*
1	12:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
1	12:30	300	Kaffee	7,6
1	19:00	300	Leitungswasser	n. a.
1	19:30	450	Müsli	<LOD
2	10:00	450	Müsli	<LOD
2	10:00	300	Kaffee	7,6
2	15:30	250	Zimt-Fächer	9,2
2	20:30	150	Zimt-Fächer	9,2
2	20:30	400	Nektarinen	n. a.
3	09:30	90	2x Brot mit Leberwurst	4,6*
3	09:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
3	09:30	300	Kaffee	7,6
3	09:30	300	Leitungswasser	n. a.
3	09:30	120	Mini-Windbeutel mit Sahnefüllung	29,9
3	17:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
3	17:30	300	Orangensaft	n. a.
3	19:00	350	Lasagne	134,3
3	19:00	600	Orangensaft	n. a.
4	08:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
4	08:30	300	Orangensaft	n. a.
4	10:30	90	2x Brot mit Leberwurst	4,6*
4	10:30	300	Orangensaft	n. a.
4	19:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
4	19:30	300	Orangensaft	n. a.
4	19:30	350	Nektarinen	n. a.
5	08:30	450	Müsli	<LOD
5	08:30	300	Orangensaft	n. a.
5	19:00	400	Fanta	n. a.
5	23:00	450	Müsli	<LOD
5	23:00	300	Orangensaft	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-34 Von GK-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	08:30	55	Brot mit Käse	<LOD
6	08:30	45	Brot mit Leberwurst	4,6*
6	08:30	150	Nektarinen	n. a.
6	08:30	300	Orangensaft	n. a.
6	15:00	150	Kirschtasche	4,8*
6	15:00	200	2x Käsebrötchen	5,2*
6	15:00	150	Ananas	n. a.
6	21:00	150	Ananas	n. a.
6	21:00	150	Nektarinen	n. a.
6	21:00	300	Orangensaft	n. a.
7	11:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
7	11:30	450	Müsli	<LOD
7	11:30	600	Leitungswasser	n. a.
7	11:30	300	Orangensaft	n. a.
7	21:30	400	Spaghetti mit Gemüse	<LOD
7	21:30	300	Orangensaft	n. a.
7	21:30	300	Kaffee	7,6
7	22:30	300	Ananas	n. a.
8	08:30	600	Leitungswasser	n. a.
8	08:30	110	2x Brot mit Käse	<LOD
8	16:00	150	Heringsfilet mit Tomatensoße	5,4*
8	16:00	1.200	Leitungswasser	n. a.
8	18:00	250	Mini-Windbeutel mit Sahnefüllung	29,9
8	18:00	300	Kaffee	7,6
9	08:30	600	Leitungswasser	n. a.
9	11:00	110	2x Brot mit Käse	<LOD
9	11:00	300	Fanta	n. a.
9	15:30	250	Eiscreme	<LOD
9	17:00	400	Paella	8,6*
9	21:00	500	Eiscreme	<LOD
10	08:30	110	Brot mit Käse (2x)	<LOD
10	08:30	45	Brot mit Leberwurst	4,6*
10	08:30	300	Kaffee	7,6
10	14:00	450	Müsli	<LOD
10	14:00	45	Brot mit Leberwurst	4,6*
10	19:00	250	Mini Windbeutel	29,9
10	19:00	300	Ananas	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-35 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	09:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
1	09:00	130	1 Apfel	n. a.
1	09:00	250	Leitungswasser	n. a.
1	09:30	200	Kaffee	8,7
1	09:30	20	Schokolade	64,7
1	13:00	70	Bretzel mit Käse	5,4*
1	13:00	250	Leitungswasser	n. a.
1	14:45	350	Penne mit Napoli-Soße	<LOD
1	14:45		1 Würstchen	
1	16:00	170	1 Pfirsich, 3 Aprikosen	n. a.
1	16:00	250	Leitungswasser	n. a.
1	20:00	300	Hähnchenbrust/Schweinefleisch, gebackene Kartoffeln	201,9
1	20:00	200	Sekt	n. a.
2	10:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
2	10:00	130	1 Apfel	n. a.
2	10:00	250	Wasser	n. a.
2	10:30	200	Kaffee	8,7
2	10:30	20	Halbbitterschoko	64,7
2	10:30	250	Wasser	n. a.
2	13:00	390	Mensa 1: Schafskäse mit Gemüse und Salat	<LOD
2	16:30	100	1 Brezel	22,8
2	16:30	250	Wasser	n. a.
2	20:00	300	Reis mit Gemüse und Fleisch, Hähnchenbrust in Sahnesoße	15,3*
2	20:00	250	Wasser	n. a.
2	20:00	200	Secco	n. a.
3	09:30	250	Wasser	n. a.
3	09:30	130	1 Apfel	n. a.
3	09:30	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
3	09:50	200	Kaffee	8,7
3	09:50	20	Schokolade	64,7
3	13:00	300	Schlemmer-Geschnetzeltes, Hähnchen mit Zwiebeln + Sahne	<LOD
3	13:00	250	Wasser	n. a.
3	15:00	200	Grapefruitsaft	n. a.
3	15:00	100	2 Aprikosen, 1 Pfirsich	n. a.
3	20:00	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse	35,0
3	20:00	250	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-36 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	08:00	250	Wasser	n. a.
4	08:00	130	1 Apfel	n. a.
4	08:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
4	08:10	200	Kaffee	8,7
4	08:10	20	Schokolade	64,7
4	08:10	100	Wasser	n. a.
4	13:00	516	Mensa 2: Hähnchen mit Kroketten und Salat	54,9
4	13:30	200	Kaffee	8,7
4	13:30	250	Wasser	n. a.
4	15:00	60	2 Aprikosen	n. a.
4	15:00	200	Grapefruitsaft	n. a.
4	19:30	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse	36,3
4	19:30	150	Multivitaminsaft	n. a.
5	07:45	250	Wasser	n. a.
5	07:45	130	1 Apfel	n. a.
5	07:45	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
5	08:00	200	Kaffee mit Milch	8,7
5	08:00	20	Schokolade	64,7
5	08:00	250	Wasser	n. a.
5	14:00	250	Bratkartoffeln mit Brot (1 Scheibe)	76,5
5	16:30	60	Käsekuchen	<LOD
5	16:30	200	Kaffee mit Milch	8,7
5	18:00	170	Pizza mit Hähnchen und Gemüse	12,2*
5	18:00	200	Multivitamin-Saft	n. a.
6	09:30	250	Wasser	n. a.
6	09:30	130	1 Apfel	n. a.
6	09:30	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
6	09:40	200	Kaffee mit Milch	8,7
6	09:40	20	Schokolade	64,7
6	09:40	50	Käsekuchen	<LOD
6	14:00	380	Spaghetti Bolognese	<LOD
6	14:00	200	Multivitaminsaft	n. a.
6	15:00	100	1 Brezel	22,8
6	15:00	250	Wasser	n. a.
6	17:30	30	Eis am Stiel	<LOD
6	17:30	250	Wasser	n. a.
6	19:30	100	1 Scheibe Brot mit Käse	35,0
6	19:30	200	Sekt	n. a.
6	19:30	200	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-37 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	09:40	250	Wasser	n. a.
7	09:40	130	1 Apfel	n. a.
7	09:40	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
7	09:55	200	Kaffee mit Milch	8,7
7	09:55	20	Schokolade	64,7
7	12:30	200	Wasser	n. a.
7	12:30	200	Multivitaminsaft	n. a.
7	14:30	300	Fisch mit Gemüse + Kartoffeln (gebacken)	33,9
7	14:30	250	Multivitamin-Schorle	n. a.
7	16:00	200	Wasser	n. a.
7	19:30	100	Pizza mit Gemüse und Salami	<LOD
7	19:30	250	Wasser	n. a.
8	09:00	250	Wasser	n. a.
8	09:00	130	1 Apfel	n. a.
8	09:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
8	09:30	200	Kaffee mit Milch	8,7
8	09:30	20	Schokolade	64,7
8	13:50	370	Pasta Napoli, 1 Würstchen	<LOD
8	ganzer Tag	2.000	Leitungswasser	n. a.
8	15:00	60	Käsekuchen	<LOD
8	15:00	200	Kaffee mit Milch	8,7
8	15:30	180	2 Pfirsiche	n. a.
8	19:00	100	1 Scheibe Brot mit Frischkäse und Käse	35,0
9	09:20	250	Wasser	n. a.
9	09:20	130	1 Apfel	n. a.
9	09:20	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
9	09:35	200	Kaffee mit Milch	8,7
9	09:35	20	Schokolade	64,7
9	14:00	300	Borsch, dazu Schwarzbrot	<LOD
9	15:00	40	1 Pfirsich	n. a.
9	16:00	30	Eis am Stiel	<LOD
9	19:00	100	Brot mit Käse	35,0
9	ganzer Tag	2.000	Leitungswasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-38 Von GK-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	10:00	250	Haferbrei mit Wasser und Milch	<LOD
10	10:00	80	1 Apfel	n. a.
10	10:00	250	Leitungswasser	n. a.
10	10:15	200	Kaffee mit Milch	8,7
10	10:15	20	Schokolade	64,7
10	13:00	100	Brezel	22,8
10	14:30	300	Suppe mit Gemüse	<LOD
10	16:00	50	Pfirsich	
10	19:30	250	Pfannkuchen mit Erdbeermarmelade und etwas saurer Sahne	<LOD

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-39 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	07:00	150	Hefezopf	5,1*
1	07:00	250	Kakao	n. a.
1	07:00	150	Wasser	n. a.
1	07:50	150	Wasser	n. a.
1	09:30–11:30	750	Wasser	n. a.
1	12:30	600	Coca Cola light	n. a.
1	12:30	303	veg. Pizza	7,0
1	14:30–17:15	800	Wasser	n. a.
1	18:00	205	Frikadellen + Ketchup	68,5
1	18:00	287	Brokkoli	n. a.
1	18:00–19:45	800	Wasser	n. a.
1	18:30	63	Gewürzkuchen	240,6
1	20:00–22:15	750	Wasser	n. a.
1	03:00	50	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-40 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
2	07:40	200	Schokobrotchen	22,4
2	07:40	250	Kakao	n. a.
2	07:40	250	Wasser	n. a.
2	08:32–10:40	800	Wasser	n. a.
2	12:05	315	Lasagne mit Spinat und Schafskäse	<LOD
2	11:00–14:40	1.000	Wasser	n. a.
2	14:45–18:10	700	Wasser	n. a.
2	17:10	144	Neapolitaner Waffeln	155,9
2	17:10	250	Coca Cola light	n. a.
2	20:05	165	Tomate + Mozzarella	n. a.
2	20:05	247	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße	20,4
2	19:50–20:50	800	Wasser	n. a.
2	21:00–22:50	150	Wasser	n. a.
2	01:15	150	Wasser	n. a.
3	07:15	130	Schoko-Cornflakes	62,5
3	07:15	250	Milch	n. a.
3	07:15	250	Wasser	n. a.
3	08:40–09:00	300	Wasser	n. a.
3	12:15	432	Puten-Döner (selbstgemacht)	2,4*
3	09:30–12:30	800	Wasser	n. a.
3	12:30–15:45	800	Wasser	n. a.
3	16:40	71	Nuss Eishörnchen	37,0
3	16:50	250	Coca Cola light	n. a.
3	16:50	122	Frischeiwaffeln	4,6*
3	18:50–21:50	800	Wasser	n. a.
3	19:45	144	Tomate-Mozzarella	n. a.
3	19:45	175	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße	20,4
3	19:45	250	Coca Cola light	n. a.
3	21:50	71	Nuss Eishörnchen	37,0
3	21:55–23:00	400	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-41 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	07:35	144	Schoko-Cornflakes	62,5
4	07:35	300	Milch	n. a.
4	07:35	300	Wasser	n. a.
4	08:30–12:20	500	Wasser	n. a.
4	10:35–15:00	1.300	Wasser	n. a.
4	13:15	572	Mensa (Picatta Nudeln Tomatensoße), keine Kaltschale	<LOD
4	13:15		1,5 Salat	n. a.
4	13:45	71	Schokoeis	n. a.
4	15:30–18:50	750	Wasser	n. a.
4	17:15	300	Coca Cola light	n. a.
4	17:15	85	Frischeiwaffeln	4,6*
4	18:35	182	Pizza mit Schinken	4,1*
4	19:00–21:50	800	Wasser	n. a.
4	19:45	71	Nuss-Eishörnchen	37,0
4	19:00–23:00	100	Wasser	n. a.
5	07:11	129	Schoko-Cornflakes	62,5
5	07:11	250	Milch	n. a.
5	07:11	250	Wasser	n. a.
5	08:40–10:00	600	Wasser	n. a.
5	10:35–13:30	800	Wasser	n. a.
5	10:45	65	Neapolitaner Waffeln	155,9
5	12:30	159	Pizza mit Schinken	4,1*
5	12:30	84	Mensa Spaghetti mit Tomatensoße	<LOD
5	13:40	800	Wasser	n. a.
5	16:10	200	Sprudelwasser	n. a.
5	16:10	109	Schoko-Brownies	25,6
5	16:45	200	Sprudelwasser	n. a.
5	18:50	637	Nizza Salat	n. a.
5	18:50	200	Sprudelwasser	n. a.
5	21:35	300	Wasser	n. a.
5	21:35	55	Neapolitaner Waffeln	155,9

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-42 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	08:00	111	Schoko-Cornflakes	62,5
6	08:00	250	Milch	n. a.
6	08:00	300	Wasser	n. a.
6	08:50–12:00	800	Wasser	n. a.
6	12:40	149	Burger King Pommes	174,7
6	12:40	290	Big King	21,9
6	12:40	500	Coca Cola light	n. a.
6	13:45	500	Coca Cola light	n. a.
6	14:30	800	Wasser	n. a.
6	16:18	65	Neapolitaner Waffeln	155,9
6	19:30–21:30	800	Wasser	n. a.
6	20:30	287	Schafskäse mit Tomaten	<LOD
6	20:30	286	Salat mit Tomaten, Paprika, Käse, Ei, Sauren Gurken, Gurken	n. a.
7	08:00	130	Schoko-Cornflakes	62,5
7	08:00	250	Milch	n. a.
7	08:00	300	Wasser	n. a.
7	08:50–12:50	800	Wasser	n. a.
7	13:00–18:00	800	Wasser	n. a.
7	12:55	309	Mensa Vegetarische Lasagne	<LOD
7	14:25	316	Schokocroissant	9,6*
7	14:25	500	Cola Mix Zero	n. a.
7	20:15	600	Cola 4	n. a.
7	20:15	234	Veg. Mühlen-Nuggets + süße Chilisoße	<LOD
7	20:15	338	Bohnen-Mais-Salat	n. a.
7	21:50	100	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-43 Von GK-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
8	07:00	133	Schoko-Cornflakes	62,5
8	07:00	200	Milch	n. a.
8	07:00	200	Wasser	n. a.
8	09:10–14:00	1.200	Wasser	n. a.
8	11:55	409	Mensa: Schnitzel + Pommes	42,1
8	11:55		1 Salat	n. a.
8	11:55	98	Ketchup	<LOD
8	11:55	130	Neapolitaner Waffeln	155,9
8	14:00–18:00	750	Wasser	n. a.
8	18:40	300	Cola Mix Zero	n. a.
8	19:02	347	Schafskäse mit Tomaten	<LOD
8	19:52	71	Nuss-Eishörnchen	37,0
8	20:00	300	Wasser	n. a.
9	07:20	118	Schoko-Cornflakes	62,5
9	07:20	200	Milch	n. a.
9	07:20	300	Wasser	n. a.
9	08:50–12:00	800	Wasser	n. a.
9	12:00–15:00	800	Wasser	n. a.
9	12:10	142	Spaghetti mit Soja und Garnelen	n. a.
9	12:25	65	Neapolitaner Waffeln	155,9
9	15:15	700	Wasser	n. a.
9	16:36	600	Coca Cola light	n. a.
9	16:36	276	Schokobrotchen	22,4
9	21:42	200	Wasser	n. a.
9	22:25	71	Nuss-Eishörnchen	37,0
10	07:20	136	Schoko-Cornflakes	62,5
10	07:20	250	Milch	n. a.
10	07:20	300	Wasser	n. a.
10	08:05–13:00	800	Wasser	n. a.
10	13:00–16:45	800	Wasser	n. a.
10	13:20	144	Tomaten	n. a.
10	13:20	350	Vollkornnudeln mit Thunfisch in Öl	n. a.
10	16:40	216	Oreo Kekse Schoko	82,1
10	16:40	600	Coca Cola light	n. a.
10	19:45	500	Wasser	n. a.
10	19:55	287	Tomate + Mozzarella	n. a.
10	21:25	300	Coca Cola light	n. a.
10	22:00	216	Oreo Kekse Schoko	82,1
10	22:00	300	Coca Cola light	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-44 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	07:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
1	12:40	258	Naturjoghurt mit Apfel und Müsli	29,5
1	13:15	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
1	15:45	400	Rinderkraftbrühe	<LOD
1	18:15	346	Nudeln mit Geschnetzeltem (Schwein) und Champignons	4,7*
1	19:30	250	Leitungswasser	n. a.
1	21:30	250	Leitungswasser	n. a.
1	21:30	300	Kakao	1,7*
2	07:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
2	07:30	30	Brownie	28,7
2	09:30	215	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
2	12:00	250	Naturjoghurt mit Apfel und Müsli	29,5
2	17:00	450	Hot-Dog	31,0
2	17:00	200	Smoothie	n. a.
2	19:45	300	Leitungswasser	n. a.
2	21:30	400	Hühner-Nudel-Eintopf	<LOD
2	21:30	76	Muffin Schoko	8,9*
3	08:30	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
3	08:30	50	Muffin Schoko	8,9*
3	11:30	210	Brötchen mit gebr. Schinken Putenbrust, Ei	6,9*
3	11:30	200	Frühstücks-Nektar	n. a.
3	15:00	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
3	16:45	230	Müsli mit Milch	37,2
3	21:00	200	Frühstücks-Nektar	n. a.
3	18:00	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
3	21:30	130	Salat	n. a.
3	21:30	270	Spaghetti	<LOD
3	21:30	50	Naan-Brot	49,1
3	23:18	200	Pfirsichsaft	n. a.
3	23:18	100	Leitungswasser	n. a.
4	08:55	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
4	09:50	116	Brötchen	4,8*
4	15:00	360	Hack-Lauchsuppe	13,2*
4	15:00	53	Brötchen	4,8*
4	18:00	400	Cola-Weizen	n. a.
4	19:30	200	Active O2	n. a.
4	19:30	320	Hack-Lauchsuppe	13,2*
4	19:50	50	Nutella-Brötchen	19,1
4	15:00	350	Fanta	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-45 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
5	07:20	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
5	12:15	240	Müsli mit Milch	37,2
5	17:30	300	Rinderkraftbrühe	<LOD
5	17:30	100	2 Brötchen	4,8*
5	20:15	200	Leitungswasser	n. a.
5	21:15	200	Leitungswasser	n. a.
5	22:00	100	Salat	n. a.
5	22:00	291	Kürbis-Kartoffel-Karotte-Auflauf	10,5
5	22:30	250	Kakao	1,7*
6	11:30	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
6	11:45	300	Hot-Dog	31,0
6	12:00	66	Zimtschnecke	8,5
6	15:00	220	Fleischbällchen	4,4*
6	15:15	230	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
6	22:00	400	Radler	n. a.
6	23:30	200	Red Bull (Blueberry) mit Wodka	n. a.
6	01:00	200	Red Bull (Blueberry) mit Wodka	n. a.
6	02:00	250	Fanta	n. a.
6	22:30	158	Hamburger	5,7*
6	03:30	230	Pommes mit Ketchup + Mayo	128,5
7	09:45	330	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
7	11:15	80	Croissant	21,2
7	14:15	240	Suppe Huhn	<LOD
7	14:15	200	Bratreis mit Gemüse und Ente	4,0*
7	18:30	200	Bratreis mit Gemüse und Ente	4,0*
7	19:00–23:00	1.000	Eistee Wildkirsch	n. a.
8	07:30	255	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
8	10:15	75	Müsli mit Milch	37,2
8	13:00	250	Bratreis mit Gemüse und Ente	4,0*
8	15:45	210	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
8	15:45	182	Dampfnudel mit Vanillesoße	4,2*
8	22:15	378	Hühner-Nudel-Eintopf	<LOD

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-46 Von GK-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
9	07:30	255	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
9	09:50	30	Brownie	28,7
9	12:10	500	Salat + Joghurtdressing	n. a.
9	15:00	230	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
9	16:30	700	Rinderkraftbrühe	<LOD
9	16:30	200	Hühner-Nudel-Topf	<LOD
9	16:30	52	Brötchen	4,8*
9	20:00	240	Speck-Käse-Spätzle	<LOD
9	20:00	200	Coca Cola	n. a.
9	23:00	400	Leitungswasser	n. a.
10	07:40	200	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
10	10:30	120	Vanille-Quark	n. a.
10	10:45	138	Speck-Käse-Spätzle	<LOD
10	12:15	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
10	14:10	30	Brownie	28,7
10	16:20	400	Hühner-Nudel-Topf	<LOD
10	16:20	52	Brötchen	4,8*
10	17:35	220	Kaffee (Arbeit) mit Milch 1,5 % und Zucker	4,1
10	20:30	180	Sekt	n. a.
10	22:20	174	Brötchen überbacken	12,9
10	22:30	30	Brownie	28,7

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-47 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	08:00	750	Leitungswasser	n. a.
1	08:00	150	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und veganem Aufschnitt	7,8*
1	13:00	100	Leitungswasser	n. a.
1	16:00	160	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate	7,2*
1	17:00	400	Kroketten	288,8
1	17:00	120	Ketchup	<LOD
1	17:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
1	19:00	250	Curry mit Broccoli und Blumenkohl	4,2*
1	21:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
1	21:00	80	1/2 Brötchen mit Tomate und Margarine	7,2*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-48 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
2	09:00	350	Ciabattabrötchen mit Aufstrich "Aubergine", veg. Mortadella und Tomate	5,6*
2	09:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
2	11:00	500	Mate-Zitrone Eistee	<LOD
2	13:00	240	Kroketten	288,8
2	13:00	60	Ketchup	n. a.
2	14:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
2	19:00	1.000	Couscouspfanne mit Zucchini, Paprika und Aubergine	<LOD
2	19:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
2	20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	08:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	09:00	190	Kürbiskernbrötchen mit Tomaten und Margarine	7,2*
3	09:00	110	Ciabattabrötchen mit Aufstrich/ Mortadella	5,6*
3	10:00	120	Mate Zitronen Eistee	<LOD
3	11:00	450	Minz-Limonade	n. a.
3	11:00	430	Couscouspfanne	<LOD
3	14:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	17:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	18:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
3	18:00	450	Wassermelone	n. a.
3	20:00	310	Tofuburger	5,4
3	20:00	200	Salat mit Radieschen, Karotten, Gurken und Tomate+ Kerne	<LOD
3	20:00	220	Kartoffelwedges	237,9
3	20:00	250	Coca-Cola	n. a.
3	20:00	15	Senf Mittelscharf	n. a.
3	23:00	500	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-49 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	09:00	180	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate	7,2*
4	10:00	450	Coca-Cola	n. a.
4	12:00	650	Wassermelone	n. a.
4	13:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
4	13:00	190	Wassermelone	n. a.
4	13:00	616	Penne mit Tofu & Broccoli	<LOD
4	17:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
4	17:00	275	Penne mit Tofu & Broccoli	<LOD
4	20:00	160	Tofuburger	5,4
4	20:00		Leitungswasser	n. a.
4	21:00	540	Wassermelone	n. a.
4	23:00	500	Leitungswasser	n. a.
5	07:00	500	Leitungswasser	n. a.
5	09:00	250	Kürbiskernbrötchen mit Guacamole	<LOD
5	09:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
5	11:00	314	Mensa Essen 1, nur Pommes	70,6
5	11:00	150	Mensa 1 Ketchup	<LOD
5	12:00	1.000	Coca Cola	n. a.
5	14:00	650	Wassermelone	n. a.
5	15:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
5	18:00	400	Mate-Eistee "Menta Limon"	n. a.
5	21:00	485	Curry mit Bohnen, Paprika, Blumenkohl und Zucchini	174,8
5	21:00	77	Brot	17,5
6	07:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
6	07:00	290	Kürbiskernbrötchen-Sandwich	11,1*
6	14:00	770	Paprikakartoffeln	55,7
6	14:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
6	18:00	330	Paprikakartoffeln	55,7
6	20:00	485	Wassermelone	n. a.
6	21:00	420	Tofu mit Gemüse und Sacha-Soße	4,6*
6	21:00	275	Reisbeilage	<LOD
6	24:00	100	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-50 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	08:00	205	Wassermelone	n. a.
7	08:00	900	Leitungswasser	n. a.
7	12:00	400	Malzbier	<LOD
7	13:00	650	Paprikakartoffeln	55,7
7	15:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
7	17:00	180	Kürbiskernbrötchen mit Margarine und Tomate	7,2*
7	20:00	375	Linseneintopf	<LOD
7	20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
7	00:45	680	Curry mit Bohnen, Paprika, Blumenkohl und Zucchini	174,8
7	00:45	250	Leitungswasser	n. a.
8	09:00	170	Kürbiskernbrötchen mit Aufstrich, Mortadella(veg) und Tomate	12,5*
8	09:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
8	15:00	675	Paprikakartoffel	55,7
8	15:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
8	20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
8	22:00	520	Zucchininudeln mit Broccoli	<LOD
9	10:00	185	Kürbiskernbrötchen mit Tomate und Margarine	7,2*
9	10:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
9	15:00	395	Börek mit Spinat-, Kichererbsen und Sojaback-Füllung	15,9
9	15:00	250	Coca Cola	n. a.
9	18:00	235	Käsekuchen (vegan)	5,1*
9	18:00	190	Erdbeeren	n. a.
9	20:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
9	22:00	300	Spinat mit Kichererbsen, Tomaten und Sojahack	3,6*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-51 Von V-m-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	09:00	250	Coca Cola	n. a.
10	09:00	1000	Leitungswasser	n. a.
10	10:00	145	Käsekuchen	5,1*
10	10:00	210	Brötchen mit Ratatouille	7,3*
10	14:00	330	Zucchiniudeln mit Broccoli und Karotten	<LOD
10	14:00	165	Spinat mit Kichererbsen (siehe Tag 9)	3,6*
10	14:00	250	Coca Cola	n. a.
10	15:00	1000	Leitungswasser	n. a.
10	18:00	365	Waffeln mit Kirschen	4,9*
10	22:00	380	Spinat mit Kichererbsen (siehe Tag 9)	3,6*
10	22:00	190	Kürbiskernbrötchen mit Tomate und Margarine	7,2*
10	22:00	200	Coca Cola	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-52 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	10:00	230	Müsli mit Kokosmilch	4,4*
1	10:00	450	Frühstückssaft	n. a.
1	11:30	300	Sprudel	n. a.
1	13:30	450	Tofu mit Reis und Zwiebeln	<LOD
1	13:30	300	Cola	n. a.
1	15:00	300	Leitungswasser	n. a.
1	16:00	650	Kaffee	7,9
1	19:00	930	Mexikanischer Eintopf	6,6*
1	19:00	75	Olivenbrot	142,8
1	19:00	400	Leitungswasser	n. a.
1	21:00	900	Früchtetee	n. a.
1	22:30	40	Banane	n. a.
1	24:00	500	Sprudel	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-53 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
2	08:00	280	Müsli mit Kokosmilch	4,4*
2	08:00	250	Orangensaft	n. a.
2	08:00	300	Kaffee	7,9
2	10:00	200	Sprudel	n. a.
2	12:30	900	Ananassaft	n. a.
2	14:00	200	Olivenbrot	142,8
2	14:00	60	Auberginenaufstrich	<LOD
2	19:00	300	Leitungswasser	n. a.
2	19:00	100	Tofuwieners	51,6
2	20:00	140	Seitanwurst mit Weck	12,1*
2	20:00	500	Bier	n. a.
2	21:00	330	Bier	n. a.
2	21:00	135	Tomatenbrötchen	44,3
2	22:00	330	Bier	n. a.
2	24:00	500	Bier	n. a.
2	02:00	400	Sprudel	n. a.
3	08:00	300	Sprudel	n. a.
3	09:00	460	Müsli mit Kokosmilch	4,4*
3	09:00	250	Orangensaft	n. a.
3	11:30	200	Komraumkaffee	4,8
3	13:00	750	Kaffee	7,9
3	14:00	200	Mexikanischer Reis	18,7
3	14:00	300	Leitungswasser	n. a.
3	15:30	100	Kokosmilch	n. a.
3	15:30	200	Erdbeeren mit Sojasahne	n. a.
3	17:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	19:00	470	Vegane Spätzle mit dkl. Soße	<LOD
3	20:00	300	Leitungswasser	n. a.
3	21:00	130	Erdbeeren mit Sojasahne	n. a.
3	23:30	560	Malzbier	0
3	01:00	350	Sprudel	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-54 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	08:00	220	Dinkelbrot mit veganem Aufschnitt	9,3*
4	08:00	190	Dinkelbrot mit Kräuteraufstrich	18,5
4	08:00	250	Orangensaft	n. a.
4	09:00	150	Dinkelbrot mit Nougatcreme	10,7*
4	09:00	100	Grüner Tee	n. a.
4	09:00	350	Sprudel	n. a.
4	11:00	800	Grüner Tee	n. a.
4	13:00	150	Komraumkaffee	4,8
4	14:00	500	Tofu mit Reis und Zwiebeln	<LOD
4	14:00	400	Cola	n. a.
4	16:00	700	Leitungswasser	n. a.
4	19:00	100	Salat mit Balsamicodressing	n. a.
4	19:00	225	Grillwiener aus Tofu	99,5
4	19:00	200	Tomaten	n. a.
4	23:00	700	Sprudel	n. a.
4	01:00	400	Cola	n. a.
4	03:00	500	Sprudel	n. a.
5	09:00	150	Orangensaft	n. a.
5	09:00	360	Haferflocken mit Sojamilch	<LOD
5	09:00	400	Kaffee	7,9
5	10:00	200	Sprudel	n. a.
5	12:00	750	Kaffee	7,9
5	13:00	180	Erdbeeren mit Sojasahne	n. a.
5	13:00	200	Bananen	n. a.
5	15:00	600	Leitungswasser	n. a.
5	16:00	170	Dinkelbrot mit Kräuteraufstrich	18,5
5	16:00	225	Dinkelbrot mit veg. Aufschnitt	9,3*
5	18:00	95	Dinkelbrot mit veg. "Käse"	9,3*
5	18:00	700	Sprudel	n. a.
5	20:30	200	Hirsepfanne	6,6*
5	22:30	330	Malzbier	<LOD
5	23:30	700	Sprudel	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-55 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	08:00	200	Leitungswasser	n. a.
6	09:00	195	Sojamilch mit Haferflocken	<LOD
6	09:00	250	Orangensaft	n. a.
6	09:00	125	Dinkelbrot mit veganem Käse	9,3*
6	09:00	115	Dinkelbrot mit Nougatcreme	10,7*
6	11:00	700	Sprudel	n. a.
6	12:30	560	Schwarzer Tee	n. a.
6	14:00	200	Gemüsereis	8,3*
6	16:00	300	Erdbeeren mit Sojasahne	n. a.
6	17:00	1.900	Eistee	n. a.
6	20:00	500	Nudeln aus Mais und Seitansoße	5,6*
6	23:00	330	Malzbier	<LOD
6	01:00	500	Sprudel	n. a.
7	08:00	200	Sprudel	n. a.
7	09:30	250	Orangensaft	n. a.
7	09:30	315	Haferflocken mit Sojamilch	<LOD
7	09:30	300	Kaffee	7,9
7	13:00	70	Olivenbrot	142,8
7	13:00	220	Fettuccine mit Pesto	n. a.
7	13:00	300	Leitungswasser	n. a.
7	14:30	660	Schwarzer Tee	n. a.
7	17:00	250	Leitungswasser	n. a.
7	17:00	300	Erdbeeren mit Sojasahne	n. a.
7	20:00	120	Olivenbrot	142,8
7	20:00	50	Auberginenaufstrich	<LOD
7	20:00	115	Olivenbrot mit Tomatenaufstrich	59,7
7	20:00	300	Leitungswasser	n. a.
7	22:00	990	Malzbier	<LOD
7	01:00	400	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-56 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
8	09:00	250	Orangensaft	n. a.
8	09:00	290	Haferflocken mit Sojamilch	<LOD
8	09:00	300	Kaffee	7,9
8	11:00	500	Leitungswasser	n. a.
8	13:30	160	Dinkelbrot mit veganem "Käse"	9,3*
8	13:30	250	Orangensaft	n. a.
8	13:30	80	Dinkelbrot mit Humuspaste	7,6*
8	13:30	180	Dinkelbrot mit Ingwer-Curry-Aufstrich	9,7*
8	13:30	160	Dinkelbrot mit Karamellaufstrich	7,6*
8	15:30	1.000	Grüner Tee	<LOD
8	17:30	500	Leitungswasser	n. a.
8	20:00	520	Gnocchi mit Sojaschnitzel	23,7
8	22:00	660	Malzbier	<LOD
8	24:00	350	Sprudel	n. a.
9	08:00	400	Haferflocken mit Sojamilch	<LOD
9	08:00	250	Frühstückssaft	n. a.
9	09:00	300	Kaffee	7,9
9	11:00	450	Kaffee	7,9
9	12:00	150	Komraumkaffee	4,8
9	13:30	350	Sprudel	n. a.
9	13:30	145	Olivenbrot mit Tomatenaufstrich	59,7
9	13:30	140	Olivenbrot mit veganer Salami	79,6
9	13:30	100	Olivenbrot mit Humuspaste	109,5
9	15:00	1.000	Ananassaft	n. a.
9	17:00	400	Sprudel	n. a.
9	19:00	200	Sojapudding	7,2*
9	20:00	560	Bier	n. a.
9	22:00	150	Seitanwürste aus Pfanne	76,7
9	22:00	400	Glutenfreie Spirelli mit dunkler Soße	<LOD
9	22:00	650	Leitungswasser	n. a.
9	24:00	450	Sprudel	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-57 Von V-m-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	07:30	360	Haferflocken mit Sojamilch	<LOD
10	07:30	250	Frühstückssaft	n. a.
10	07:30	300	Kaffee	7,9
10	09:00	600	Kaffee	7,9
10	10:30	250	Sojapudding	7,2*
10	11:30	300	Komraumkaffee	4,8
10	12:00	300	Bananen	n. a.
10	13:00	1.000	Eistee	n. a.
10	16:00	200	Sprudel	n. a.
10	18:00	1.000	Eistee	n. a.
10	19:30	500	Tofu mit Reis und Erdnusscreme	18,0
10	20:00	100	Leitungswasser	n. a.
10	21:00	200	Leitungswasser	n. a.
10	22:00	1.000	Bier	n. a.
10	00:00	1.000	Bier	n. a.
10	01:00	730	Bier	n. a.
10	02:00	500	Bier	n. a.
10	03:00	800	Coca Cola	n. a.
10	05:00	500	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-58 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	08:50	275	Müsli mit Soja-Milch	<LOD
1	09:15	112	Banane	n. a.
1	10:00	700	Leitungswasser	n. a.
1	12:45	180	Tofu-Würstchen mit Zwiebeln	17,9
1	12:45	240	Salat	n. a.
1	12:45	45	Gewürz-Ketchup	<LOD
1	13:00–15:00	950	Leitungswasser	n. a.
1	16:00	81	Banane	n. a.
1	20:30	350	Pilz-Bratlinge	22,6
1	20:30	41	Gewürz-Ketchup	<LOD
1	21:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
1	23:00	300	Leitungswasser	n. a.
2	10:00	282	Laugenbrötchen mit Aufstrich und Schnittlauch	<LOD
2	10:00	300	Pfefferminztee	0,7
2	12:00	700	Leitungswasser	n. a.
2	17:00	700	Leitungswasser	n. a.
2	17:15	189	Pilz-Bratlinge	22,6
2	17:15	42	Gewürz-Ketchup	<LOD
2	17:15	220	Ginger Ale	n. a.
2	17:30	58	Cuorcini (Schokoherzen)	47,6
2	17:30	72	Tappsy (Katjes)	n. a.
2	20:00	660	Bier	<LOD
2	21:00	160	Pilz-Bratlinge	22,6
2	21:00	56	Tappsy (Katjes)	n. a.
2	22:00	230	Bier	<LOD
2	23:00	700	Leitungswasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-59 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
3	09:15	105	Kürbiskernbrötchen	10,3*
3	09:15	72	Brotaufstrich Curry	<LOD
3	09:15	430	Multivitaminsaft	n. a.
3	13:00	300	Leitungswasser	n. a.
3	13:15	180	Tofu-Bratling	70,1
3	13:15	152	Rucola-Salat	n. a.
3	13:15	105	Radieschen	n. a.
3	13:15	73	Gewürz-Ketchup	<LOD
3	13:15	320	Ginger Ale	n. a.
3	13:15	700	Leitungswasser	n. a.
3	14:00	390	Bananen-Soja-Milch	n. a.
3	16:00	700	Leitungswasser	n. a.
3	19:00	134	Weltmeisterbrötchen	<LOD
3	19:00	49	Johannisbeer-Marmelade	n. a.
3	19:00	32	Schnittlauch	n. a.
3	19:00	40	Brotaufstrich Curry	<LOD
3	19:30	250	Leitungswasser	n. a.
3	19:30	72	Kessel-Chips Salz & Pfeffer	13,0*
3	21:00–23:00	1.260	Leitungswasser	n. a.
4	09:00	52	Radieschen	n. a.
4	09:00	89	Weltmeisterbrötchen	<LOD
4	09:00	3.330	Multivitaminsaft	n. a.
4	09:00	29	Johannisbeer-Marmelade	n. a.
4	09:00	33	Brotaufstrich-Curry	<LOD
4	13:00	471	Pommes-frites	37,4
4	13:00	52	Rucola-Salat	n. a.
4	13:00	75	Gewürz-Ketchup	<LOD
4	13:00	320	Ginger-Ale	n. a.
4	13:15	700	Leitungswasser	n. a.
4	13:30	63	Tappsy (Katjes)	n. a.
4	17:00	1.000	Leitungswasser	n. a.
4	17:30	45	Kessel-Chips Salz & Pfeffer	13,0*
4	19:00	80	Weltmeisterbrötchen	<LOD
4	19:00	95	Bio Veggie Aufschnitt	15,9*
4	19:00	42	Brotaufstrich-Curry	<LOD
4	19:30	45	Tappsy (Katjes)	n. a.
4	20:00	700	Leitungswasser	n. a.
4	23:10	250	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-60 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
5	10:00	145	Laugenbrezel	8,1*
5	10:00	39	Brotaufstrich Curry	<LOD
5	10:00	45	Brotaufstrich Pastacuitta	63,5
5	10:00	385	Multivitaminsaft	n. a.
5	12:15	550	Gemüsepfanne	21,2
5	12:30	700	Leitungswasser	n. a.
5	12:45	63	Tappsy (Katjes)	n. a.
5	15:00	700	Leitungswasser	n. a.
5	18:30	100	Kürbiskernbrötchen	10,3*
5	18:30	85	Brotaufstrich Curry	<LOD
5	18:30	40	Brotaufstrich Pastacuitta	63,5
5	18:30	62	Radieschen	n. a.
5	20:45	200	Leitungswasser	n. a.
5	22:30	1.000	Weißbier naturtrüb	n. a.
5	23:00	200	Leitungswasser	n. a.
6	11:00	105	Laugenbrezel	8,1*
6	11:00	56	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
6	11:00	75	Erdnusscreme	49,7
6	11:00	71	Kürbiskernbrötchen	10,3*
6	11:00	400	Multivitaminsaft	n. a.
6	12:00	400	Bananen-Soja-Milch	n. a.
6	14:00	350	Leitungswasser	n. a.
6	15:15	342	Gemüsepfanne	21,2
6	15:15	31	Gewürz-Ketchup	<LOD
6	15:30	300	Leitungswasser	n. a.
6	20:00	480	Süßkartoffel	70,6
6	20:00	350	Reissalat	<LOD
6	21:15	400	Bier (Bitburger)	<LOD
6	21:15	400	Bier (Erdinger)	n. a.
6	22:30	700	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-61 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	08:45	200	Pfefferminztee	0,7*
7	08:45	100	Laugenbrezel	8,1*
7	08:45	37	Erdnusscreme	49,7
7	10:40	70	Kürbiskernbrötchen	10,3*
7	10:40	30	Brotaufstrich Curry	<LOD
7	10:40	36	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
7	10:40	300	Multivitaminsaft	n. a.
7	12:45	55	Süßkartoffel	70,6
7	12:45	120	Reissalat	<LOD
7	12:45	90	Tofu-Bratling	84,5
7	12:45	220	Leitungswasser	n. a.
7	14:00	450	Leitungswasser	n. a.
7	15:30	68	Salzstangen	170,9
7	15:30	50	Multivitaminsaft	n. a.
7	15:30	300	Bananen-Soja-Milch	n. a.
7	16:00	400	Leitungswasser	n. a.
7	19:00	151	Kürbiskernbrötchen	10,3*
7	19:00	88	Erdnusscreme	49,7
7	19:00	37	Brotaufstrich Pastacuitta	63,5
7	19:00	40	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
7	19:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	21:30	250	Leitungswasser	n. a.
8	09:15	103	Laugenbrezel	8,1*
8	09:15	44	Brotaufstrich Curry	<LOD
8	09:15	60	Erdnusscreme	49,7
8	09:15	37	Brotaufstrich Pastacuitta	63,5
8	09:15	425	Multivitaminsaft	n. a.
8	09:15	90	Weltmeisterbrötchen	<LOD
8	10:30	36	Tappsy (Katjes)	n. a.
8	14:00	200	Farfalle-Nudeln	n. a.
8	14:00	380	Tofu mit Sauce	15,4
8	14:00	400	Leitungswasser	n. a.
8	14:00	200	Rote Schorle	n. a.
8	16:00	350	Leitungswasser	n. a.
8	20:00	170	Zucchini gebraten	7,7*
8	20:00	212	Couscous	<LOD
8	20:00	165	Fladenbrot	<LOD
8	21:00	330	Bier	<LOD
8	22:15	350	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-62 Von V-m-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
9	09:30	164	Weltmeisterbrötchen	<LOD
9	09:30	78	Brotaufstrich Curry	<LOD
9	09:30	39	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
9	09:30	45	Erdnusscreme	49,7
9	09:30	350	Multivitaminsaft	n. a.
9	12:45	72	Tappsy (Katjes)	n. a.
9	12:45	200	Leitungswasser	n. a.
9	13:00	402	Bohnenpfanne	43,1
9	13:15	63	Courcini	47,6
9	13:30	400	Leitungswasser	n. a.
9	17:30	380	Müsli + Sojamilch	<LOD
9	17:30	200	Soja-Milch	<LOD
9	19:00	79	Fladenbrot	<LOD
9	19:00	54	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
9	19:00	49	Brotaufstrich Pastacuitta	63,5
9	19:00	100	Tofu-Basilikum	8,9*
9	19:00	400	Rote Schorle	n. a.
9	22:30	350	Leitungswasser	n. a.
9	23:00	200	Leitungswasser	n. a.
10	08:50	99	Laugenbrezel	8,1*
10	08:50	82	Kürbiskernbrötchen	10,3*
10	08:50	52	Erdnusscreme	49,7
10	08:50	47	Brotaufstrich Curry	<LOD
10	08:50	40	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
10	08:50	200	Multivitaminsaft	n. a.
10	11:00	300	Mineralwasser	n. a.
10	13:10	277	Zucchini	n. a.
10	13:10	171	Couscous	n. a.
10	13:10	50	Tofu-Basilikum	8,9*
10	13:10	35	Gewürzketchup	<LOD
10	13:10	200	Leitungswasser	n. a.
10	13:30	30	Courcini	47,6
10	15:00	72	Tappsy (Katjes)	n. a.
10	19:00	80	Weltmeisterbrötchen	<LOD
10	19:00	101	Laugenbrezel	8,1*
10	19:00	40	Brotaufstrich Aubergine	<LOD
10	19:00	47	Erdnusscreme	49,7
10	19:00	39	Johannisbeer-Marmelade	n. a.
10	20:00	55	Salzstangen	170,9
10	23:30	200	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-63 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	11:15	163	Tomaten	n. a.
1	11:15	81	Brot mit Shiitake	<LOD
1	11:15	96	Brot mit Pflaumenmus	69,4
1	11:15	215	Leitungswasser	n. a.
1	11:00–13:00	500	Leitungswasser	n. a.
1	18:00	520	Auflauf	54,4
1	17:00–18:30	1.100	Leitungswasser	n. a.
1	20:00	227	Auflauf	54,4
1	20:00–22:00	800	Leitungswasser	n. a.
2	07:50	125	Tomaten	n. a.
2	07:50	67	Brot mit Pflaumenmus	69,4
2	07:50	55	Brot mit Shiitake	<LOD
2	07:50	600	Leitungswasser	n. a.
2	13:15	83	Brezel (getoastet)	20,5
2	13:15	257	Leitungswasser	n. a.
2	11:00–14:00	210	Leitungswasser	n. a.
2	15:00	660	Leitungswasser	n. a.
2	15:00	34	Brezel (getoastet)	20,5
2	15:15	380	Auflauf	54,4
2	15:15	330	Leitungswasser	n. a.
2	15:20	140	Banane	n. a.
2	17:20	500	Leitungswasser	n. a.
2	20:15	240	Leitungswasser	n. a.
2	21:30	660	Leitungswasser	n. a.
2	21:30	100	Tomaten	n. a.
2	21:30	42	Brot mit Shiitake	<LOD
2	22:00	280	Leitungswasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-64 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
3	08:15	136	Gurke	n. a.
3	08:15	115	Rustinobrötchen mit Ratatouille	4,9*
3	08:20	62	Rustinobrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
3	08:20	330	Leitungswasser	n. a.
3	08:40	160	Leitungswasser	n. a.
3	11:45	228	Mensa Essen 2 / Pommes	110,1
3	11:45	139	Mensa Essen 2 / Ketchup	<LOD
3	11:45	207	Mensa Essen 2 / Kaltschale	n. a.
3	13:00	330	Leitungswasser	n. a.
3	13:30–16:00	740	Leitungswasser	n. a.
3	13:30–16:00	500	Club-Mate	<LOD
3	16:00–19:00	1.100	Leitungswasser	n. a.
3	17:20	306	Salat	n. a.
3	17:20	76	Kürbiskernbrötchen (getoastet)	5,3*
3	22:00	330	Leitungswasser	n. a.
3	23:30	330	Leitungswasser	n. a.
3	00:30	330	Leitungswasser	n. a.
4	08:15	93	Gurke	n. a.
4	08:15	74	Rustinibrötchen mit Ratatouille	4,9*
4	08:15	42	Rustinibrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
4	08:15	330	Leitungswasser	n. a.
4	12:00	572	Mensa Essen 2 Veg. / Spaghetti mit Tomatensauce (große Portion)	<LOD
4	12:00	207	Kaltschale	n. a.
4	12:00	476	Leitungswasser	n. a.
4	15:00	46	Bio-Mango-Sorbet	n. a.
4	14:00	189	Club-Mate	<LOD
4	14:00–18:00	350	Leitungswasser	n. a.
4	15:20	330	Leitungswasser	n. a.
4	20:00	660	Leitungswasser	n. a.
4	20:00	80	Brezel	20,5
4	20:20	47	Gurke	n. a.
4	20:20	84	Rustinabrötchen mit Ratatouille	4,9*
4	20:20	64	Rustinabrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
4	20:30	330	Leitungswasser	n. a.
4	22:00	340	Orangensaft + Likör 43	n. a.
4	22:00	400	Radler	n. a.
4	00:00	850	Hefe-Weißbier	n. a.
4	01:00	330	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-65 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
5	10:00	69	Gurke	n. a.
5	10:00	78	Rustinbrötchen mit Ratatouille	4,9
5	10:00	70	Rustinbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9
5	12:00	135	Gurke	n. a.
5	12:00	80	Brezel	20,5
5	12:00	311	Club-Mate	<LOD
5	15:00	330	Leitungswasser	n. a.
5	18:30	100	Banane	n. a.
5	18:30	330	Leitungswasser	n. a.
5	20:00	740	Leitungswasser	n. a.
5	23:30	300	Leitungswasser	n. a.
6	08:10	330	Leitungswasser	n. a.
6	08:10	54	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
6	08:10	84	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille	4,9*
6	08:10	115	Tomate	n. a.
6	08:30	200	Leitungswasser	n. a.
6	13:00	500	Leitungswasser	n. a.
6	13:00	80	Brezel	20,5
6	13:00	400	Salat	n. a.
6	14:20	330	Leitungswasser	n. a.
6	19:00	420	Mate-Tee	<LOD
6	20:00	514	Sushi	n. a.
6	20:00	330	Leitungswasser	n. a.
6	21:00	280	Schwarzer Tee	<LOD
6	22:30	330	Leitungswasser	n. a.
6	00:30	155	Leitungswasser	n. a.
7	08:40	62	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
7	08:40	83	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille	4,9*
7	08:40	330	Leitungswasser	n. a.
7	12:00	300	Club-Mate	<LOD
7	16:00	200	Leitungswasser	n. a.
7	17:15	550	Salat	n. a.
7	17:15	82	Brezel	20,5
7	17:15	68	Kürbiskernbrötchen (getoastet)	5,3*
7	17:00–21:00	200	Club-Mate	<LOD
7	17:00–21:00	540	Leitungswasser	n. a.
7	22:30	660	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-66 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
8	07:00	110	Tomate	n. a.
8	07:00	330	Leitungswasser	n. a.
8	07:00	60	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
8	07:00	77	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille	4,9*
8	10:00	250	Club-Mate	<LOD
8	12:00	250	Club-Mate	<LOD
8	12:00	108	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
8	10:00–13:00	300	Leitungswasser	n. a.
8	16:00	330	Leitungswasser	n. a.
8	18:00	330	Leitungswasser	n. a.
8	20:45	222	Salat	n. a.
8	20:45	584	Nudeln mit Soße	n. a.
8	20:45	550	Radler	n. a.
8	22:45	330	Leitungswasser	n. a.
8	00:30	300	Leitungswasser	n. a.
9	08:00	82	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
9	08:00	68	Kürbiskernbrötchen mit Ratatouille	4,9*
9	08:00	125	Tomate	n. a.
9	08:00	330	Leitungswasser	n. a.
9	10:00	330	Leitungswasser	n. a.
9	13:00	111	Kürbiskernbrötchen mit Erdbeermarmelade	4,9*
9	13:00	200	Leitungswasser	n. a.
9	13:00	85	Brezel (getoastet)	20,5
9	13:00–15:00	270	Leitungswasser	n. a.
9	15:30–19:00	270	Leitungswasser	n. a.
9	16:50	400	Nudeln mit Soße	n. a.
9	19:30	500	Club-Mate	<LOD
9	21:45	480	Nudeln mit Soße	n. a.
9	21:45	42	Brezel	20,5
9	21:45	500	Club-Mate	<LOD
9	23:40	180	Pommes	8,6
9	20:00–24:00	740	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-67 Von V-m-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	09:00	131	Tomate	n. a.
10	09:00	170	Brot mit Auberginencreme	5,0*
10	09:30	462	Pfefferminztee	0,7*
10	09:00–12:00	740	Leitungswasser	n. a.
10	13:30	150	Kuchen	9,8
10	13:45	360	Leitungswasser	n. a.
10	14:30	150	Salat	n. a.
10	14:30	360	Rosmarinkartoffeln	62,3
10	15:00	330	Leitungswasser	n. a.
10	16:00–19:00	550	Leitungswasser	n. a.
10	18:45	175	Pommes_BK	102,8
10	23:00	330	Leitungswasser	n. a.
10	23:00	330	Leitungswasser	n. a.
10	23:30	80	Brezel (getoastet)	20,5

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-68 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–3 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	09:30	500	Leitungswasser	n. a.
1	09:30	300	3 Gourmetstangen	6,6*
1	11:00	100	Café Crema	10,8
1	13:00	100	Kaffee Asta	6,5
1	14:00	100	Gourmetstange	6,6*
1	14:30	200	Kaffee Asta	6,5
1	15:30	453	Bananen	n. a.
1	16:00	200	Leitungswasser	n. a.
1	16:00	60	Chips: Chipsfrisch gesalzen	80,0
1	17:30	650	Aktivschorle Pfirsich-Melone	n. a.
1	20:30	650	Grapefruit-Limonade	n. a.
1	21:30	215	Bananen	n. a.
1	21:30	100	Schokolade dunkle Nougat	106,3
2	09:00	600	Leitungswasser	n. a.
2	09:00	110	Knoblauchbrötchen	35,4
2	09:30	200	2 Gourmetstangen	6,6*
2	12:00	200	Caffé Crema	10,8
2	13:30	50	Chips: Chipsfrisch gesalzen	80,0
2	13:30	200	2 Gourmetstangen	6,6*
2	15:00	400	Hefeweizen	n. a.
2	17:00	310	Bananen	n. a.
2	18:30	600	Leitungswasser	n. a.
2	20:00	500	Ratskrone Pilsener	n. a.
2	20:00	140	Seitanwürstchen mit Weck	12,1*
2	21:00	330	Karlsberg Pils	n. a.
2	21:00	135	Tomatenbrötchen	42,7
2	24:00	500	Karlsberg Pils	n. a.
2	02:30	330	Karlsberg Pils	n. a.
3	09:30	230	Karlsberg Pils	n. a.
3	09:30	160	2 Laugenweck	11,6*
3	11:00	800	Leitungswasser	n. a.
3	11:00	100	Komraum Kaffee	4,8
3	12:30	160	Tomatenbrötchen	42,7
3	12:30	200	Caffé Crema	10,8
3	16:00	400	Leitungswasser	n. a.
3	16:00	80	Laugenweck	11,6*
3	17:00	600	Leitungswasser	n. a.
3	18:30	200	2 Gourmetstangen	6,6*
3	20:00	600	Mineralwasser	n. a.
3	22:00	500	Mineralwasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-69 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	08:30	300	Mineralwasser	n. a.
4	10:00	400	Leitungswasser	n. a.
4	10:00	490	Bananen	n. a.
4	12:00	300	Leitungswasser	n. a.
4	14:00	120	2 Nespresso	7,3
4	14:00	100	1 Gourmetstange	6,6*
4	15:00	100	Leitungswasser	n. a.
4	17:00	120	2 Nespresso	7,3
4	17:00	100	1 Gourmetstange	6,6*
4	19:00	100	1 Gourmetstange	6,6*
4	19:00	700	Leitungswasser	n. a.
4	20:00	200	Kaffee Asta	6,5
4	21:30	200	Leitungswasser	n. a.
4	22:30	160	Tomatenbrötchen	42,7
4	22:30	500	Leitungswasser	n. a.
5	09:00	300	Leitungswasser	n. a.
5	12:00	800	Leitungswasser	n. a.
5	12:00	150	Exotic Fruchtmix	<LOD
5	12:00	100	Cashewkerne	<LOD
5	15:00	200	Leitungswasser	n. a.
5	17:00	200	Leitungswasser	n. a.
5	18:00	300	Leitungswasser	n. a.
5	18:00	50	Exotic Fruchtmix	n. a.
5	19:00	400	Leitungswasser	n. a.
5	19:00	200	Kaffee Asta	6,5
5	22:00	400	Leitungswasser	n. a.
5	22:00	950	Spaghetti mit Tabasco Chipotle	<LOD
5	23:00	400	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-70 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	09:00	300	Leitungswasser	n. a.
6	11:00	400	Leitungswasser	n. a.
6	14:00	300	Leitungswasser	n. a.
6	15:00	300	Schwarzer Tee	0,6*
6	15:00	470	Tortilla	15,0
6	17:00	200	Leitungswasser	n. a.
6	17:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
6	18:30	400	Leitungswasser	n. a.
6	20:00	400	Leitungswasser	n. a.
6	20:00	200	Fruchtmus Apfel-Erdbeere	n. a.
6	22:00	790	<i>Baked Beans</i>	3,7*
6	22:00	200	Schwarzer Tee	n. a.
6	23:00	200	Fruchtmus Apfel-Erdbeere	n. a.
6	23:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	10:30	500	Leitungswasser	n. a.
7	10:30	420	<i>Baked Beans</i>	3,7*
7	11:30	400	Schwarzer Tee	0,6*
7	13:00	570	Apfelmus Granny Smith	n. a.
7	13:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
7	16:00	250	Kuchen I	148,8
7	16:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
7	18:30	600	Leitungswasser	n. a.
7	21:00	880	Nudeln mit Pilzsoße	<LOD
7	21:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
7	22:00	400	Leitungswasser	n. a.
8	09:00	400	Leitungswasser	n. a.
8	09:00	100	Sonnenblumenkerne karamellisiert	105,9
8	09:00	100	Fruchtmus Apfel-Erdbeere	n. a.
8	11:00	300	Leitungswasser	n. a.
8	12:30	600	Bananen	n. a.
8	12:30	250	Coca Cola	n. a.
8	14:30	250	Coca Cola	n. a.
8	17:30	150	Rittersport Marzipan	49,5
8	17:30	200	Caffé Crema	10,8
8	19:30	200	Schwarzer Tee	0,6*
8	21:00	500	Lasagne	6,4*
8	21:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
8	22:30	700	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-71 Von V-m-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
9	08:00	200	Leitungswasser	n. a.
9	08:00	500	Lasagne	6,4*
9	10:30	500	Leitungswasser	n. a.
9	12:30	200	Caffé Crema	10,8
9	13:30	500	Leitungswasser	n. a.
9	14:30	450	Wurzelbaguette	9,5*
9	15:00	200	Leitungswasser	n. a.
9	16:00	200	Caffé Crema	10,8
9	18:30	100	Rittersport Marzipan	49,5
9	18:30	300	Leitungswasser	n. a.
9	21:00	200	Schwarzer Tee	0,6*
9	22:00	500	Leitungswasser	n. a.
9	23:00	200	Leitungswasser	n. a.
9	24:00	200	Leitungswasser	n. a.
9	23:00	250	Lasagne	6,4*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-72 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	8:00–11:00	750	Leitungswasser	n. a.
1	11:00	200	Reis mit Gemüse	9,3*
1	11:20	253	Kroketten	185,2
1	12:00–15:00	750	Leitungswasser	n. a.
1	15:40	415	Pommes + Curry	242,5
1	15:40–20:40	650	Leitungswasser	n. a.
1	17:50–19:20	900	Bier (schloss Export)	n. a.
1	21:15	222	Soja-Joghurt (Pfirsich)	n. a.
1	21:30	245	Blätterteig mit Spinat und Tofu	3,0*
1	23:00–01:00	1.200	Bier (Beck's)	n. a.
1	01:30–04:30	750	Leitungswasser	n. a.
2	09:10	203	Blätterteig mit Spinat und Tofu	3,0*
2	09:00–11:15	750	Leitungswasser	n. a.
2	13:45	400	Erdbeer-Soja-Milchreis (Pulver)	n. a.
2	14:30	97	Blätterteig mit Spinat und Tofu	3,0*
2	15:00–16:00	503	Couscous-Salat	<LOD
2	15:20–18:00	750	Leitungswasser	n. a.
2	20:30	400	Bananen in Soja-Reismilch	n. a.
2	21:00	338	Salat	n. a.
2	21:00	250	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-73 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
3	07:00–08:00	500	Leitungswasser	n. a.
3	07:55	401	Reis-Nudeln mit Tofu, Tomaten & Ingwer	<LOD
3	09:00–12:00	750	Leitungswasser	n. a.
3	10:15	308	Salat	n. a.
3	14:00–17:00	750	Leitungswasser	n. a.
3	14:00–17:00	543	Reis-Nudeln mit Tofu, Tomaten & Ingwer	<LOD
3	14:30	234	Apfel	n. a.
3	20:40	235	schwarzer+roter Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
3	20:40	300	Multivitaminsaft	n. a.
4	08:00–12:00	750	Leitungswasser	n. a.
4	08:00	80	Banane	n. a.
4	08:20	251	schwarzer + roter Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
4	11:00	181	Apfel	n. a.
4	12:00–15:00	750	Leitungswasser	n. a.
4	13:50	240	schwarzer + roter Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
4	15:00–17:45	750	Leitungswasser	n. a.
4	19:30	300	Multivitaminsaft	n. a.
4	20:00	299	Tofu mit Algen	8,0*
4	20:00	220	Salat	n. a.
4	20:15–22:00	750	Leitungswasser	n. a.
4	21:00	400	Traubenschorle	n. a.
4	22:30–03:30	500	Bier (Schloss Export)	n. a.
4	04:00–08:00	500	Bier (Schloss Export)	n. a.
4	08:00–12:00	500	Bier (Schloss Export)	n. a.
4	08:00	500	Bier (Schloss Export)	n. a.
4	08:20	500	Bier (Schloss Export)	n. a.
4	11:00	500	Leitungswasser	n. a.
5	09:40	400	Leitungswasser	n. a.
5	09:50	371	Salat	n. a.
5	10:20	975	Leitungswasser	n. a.
5	11:40	442	roter + schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
5	12:15	275	Multivitaminsaft	n. a.
5	13:00	253	Apfel	n. a.
5	14:00–19:00	818	roter + schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
5	16:00–20:15	750	Leitungswasser	n. a.
5	20:15	750	Leitungswasser	n. a.
5	22:00–01:30	2.000	Bier (Schloss Export)	n. a.
5	02:00–07:00	1250	Leitungswasser	n. a.
5	02:00	241	roter + schwarzer Reis mit Gemüse+ Tofu	12,4*

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-74 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	08:00–12:00	750	Leitungswasser	n. a.
6	10:10	278	roter+ schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
6	12:20	578	Salat	n. a.
6	12:00–19:00	750	Leitungswasser	n. a.
6	20:00	500	Erdbeer-Soja-Reis-Milch(Pulver)	n. a.
6	17:00	263	Pizza	<LOD
6	21:00	200	Pizza	<LOD
6	21:00–06:00	750	Leitungswasser	n. a.
7	07:30	750	roter+ schwarzer Reis mit Gemüse + Tofu	12,4*
7	08:00–11:00	750	Leitungswasser	n. a.
7	11:45–13:15	750	Leitungswasser	n. a.
7	14:20	590	Reisnudeln mit Tomaten-Kokosmilch	<LOD
7	13:20–17:10	750	Leitungswasser	n. a.
7	15:00	271	Beerenmix mit Kokosmilch	n. a.
7	17:15–22:40	750	Leitungswasser	n. a.
7	19:30	146	Apfel	n. a.
7	20:45	326	Salat mit Tempeh	18,2*
8	08:10	750	Leitungswasser	n. a.
8	08:10–13:00	316	Salat mit Tempeh	18,2*
8	12:00	468	Salat mit Tempeh	18,2*
8	13:00–15:30	750	Leitungswasser	n. a.
8	15:00	174	Tortilla Chips mit Dips	41,5
8	15:30–21:00	750	Leitungswasser	n. a.
8	16:20	320	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu	60,3
8	19:50	251	Apfel	n. a.
8	21:00	500	Erdbeer-Soja-Reismilch	n. a.
9	08:00–11:10	750	Leitungswasser	n. a.
9	08:45	235	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu	60,3
9	11:10–13:40	750	Leitungswasser	n. a.
9	11:45	199	Apfel	n. a.
9	13:25	521	Reisnudeln mit Tomaten-Kokos-Sauce	<LOD
9	13:45	255	Beeren mit Kokosmilch	n. a.
9	13:40–18:00	750	Leitungswasser	n. a.
9	17:00	200	Kakao	n. a.
9	18:10	110	Brötchen mit Erdmandel	7,3*
9	18:00–07:10	750	Leitungswasser	n. a.
9	20:00	500	Schwarzer Tee	0,6*
9	21:50	445	Suppe mit Klößchen	<LOD

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-75 Von V-w-1 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	07:50	511	Suppe mit Klößen	<LOD
10	08:00	750	Leitungswasser	n. a.
10	08:05	340	Schwarzer Tee	0,6*
10	11:00	522	Tofupfanne	62,1
10	19:30	587	Suppe mit Klößchen	<LOD
10	20:00–23:00	350	Leitungswasser	n. a.
10	21:00	400	Erdbeer-Soja-Reis-Milch	n. a.
10	22:30	161	Reisnudeln mit Langbohnen + Tofu	60,3

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-76 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	08:30	300	Wasser	n. a.
1	08:45	240	Kaffee mit Sojasahne	8,6*
1	11:00	450	Türkischer Salat mit Brot	6,5*
1	11:30–16:00	800	Wasser	n. a.
1	16:00	680	Smoothie (Banane, Kiwi, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)	n. a.
1	16:30–20:00	400	Wasser	n. a.
1	20:30	340	Linsennudeln mit Curry	n. a.
1	20:30	300	Wasser	n. a.
1	21:00–23:00	340	Wasser	n. a.
2	07:30–11:00	400	Wasser	n. a.
2	11:00	310	Grüner Smoothie (Mangold, Petersilie, Banane, Apfel, Pflaume, Leinsamen, Mandeln)	n. a.
2	12:00	450	Türkischer Salat mit Brot	6,5*
2	13:30–19:00	950	Wasser	n. a.
2	14:15	40	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
2	19:00	300	Vegane Mettbrötchen mit Tomaten	12,8
2	19:00	40	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
2	19:00–23:59	500	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-77 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–6 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
3	08:30	200	Wasser	n. a.
3	08:30	650	Grüner Smoothie	n. a.
3	11:00	350	Pita	149,8
3	14:30	200	Chinesischer Tee	n. a.
3	11:00–19:30	750	Wasser	n. a.
3	19:30	350	Pita	149,8
3	19:30	25	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
3	19:30–24:00	530	Wasser	n. a.
3	21:00	400	Bier	n. a.
4	09:30–20:00	1.100	Wasser	n. a.
4	10:00	25	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
4	11:15	520	Rohkostsalat mit Brot	3,5*
4	14:30	690	Obst-Smoothie (Banane, Birne, Pflaume, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)	n. a.
4	18:15	140	Pita	149,8
4	20:00	330	Alkoholfreies Bier	n. a.
4	22:00–02:00	400	Wasser	n. a.
4	23:00	100	Pita	149,8
4	01:00	330	Leitungswasser	n. a.
5	08:00–20:00	600	Wasser	n. a.
5	09:15	650	Smoothie (Banane, Apfel, Pflaume, Hibiskus, Leinsamen, Hirseflocken)	n. a.
5	16:00	500	Veganes Mettbrot mit Tomaten	<LOD
5	16:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
5	22:00	230	Pita	149,8
5	22:00–24:00	500	Wasser	n. a.
6	09:00–12:00	500	Wasser	n. a.
6	10:30	400	Türkischer Salat mit Brot	6,5*
6	10:30	100	Schwarztee	n. a.
6	16:30	270	Nudelsalat	<LOD
6	16:30	50	Baguette	4,0*
6	16:30	320	Gemüsespieße (Aubergine, Zucchini, Pilze)	<LOD
6	12:00–22:00	750	Wasser	n. a.
6	20:00–24:00	300	Wasser	n. a.
6	22:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-78 Von V-w-2 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 7–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
7	09:00–13:00	600	Wasser	n. a.
7	11:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
7	13:30	300	Grüner Smoothie (Petersiliengrün, Spinat, Mango, Banane, Apfel, Leinsamen)	n. a.
7	16:15	560	2 x Alkoholfreies Bier	n. a.
7	17:30	80	Veganes Grillsteak	78,8
7	17:30	340	Nudelsalat	<LOD
7	17:30	120	Baguette mit Kräutersauce	8,6*
7	17:30–22:00	750	Wasser	n. a.
8	08:00–18:00	600	Wasser	n. a.
8	09:15	350	Grüner Smoothie	n. a.
8	10:30	20	Dunkle Schokolade	335,2
8	12:00	300	Nudelsalat	<LOD
8	12:00	60	Knäckebrot	38,3
8	12:00	180	Baguette mit Kräutersauce	<LOD
8	15:30	400	Salbeitee	n. a.
8	18:00–19:00	750	Wasser	n. a.
8	19:30	540	Obst-Smoothie	n. a.
8	19:30–23:00	300	Wasser	n. a.
8	22:00	250	Linsennudeln	n. a.
9	09:00–17:00	900	Wasser	n. a.
9	09:15	440	Möhren-Smoothie (Apfel, Möhren, Ingwer, Mandeln)	n. a.
9	10:40	30	Dunkle Schokolade	335,2
9	12:00	450	Rohkostsalat	n. a.
9	12:00	90	Knäckebrot	38,3
9	15:00	100	Kaffee Americano	6,9
9	18:00–24:00	300	Wasser	n. a.
9	22:45	210	Nudeln mit Knoblauch	n. a.
9	23:00	50	Schokolade mit Mandeln (dunkel)	335,2
10	10:00–16:00	900	Wasser	n. a.
10	10:15	310	Nudeln mit Knoblauch	n. a.
10	16:45	470	Cigköften	3,7*
10	18:30	100	Kesselchips	480,6
10	18:00–24:00	1.350	Wasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-79 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–4 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	09:00–11:00	1.000	Mineralwasser	n. a.
1	11:45	156	Brot mit Marmelade & Butter	9,2*
1	11:45	416	Obstsalat (Apfel, Nektarine, Aprikose, Pflaumen)	n. a.
1	11:45–13:06	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
1	13:10–17:10	1.000	Mineralwasser	n. a.
1	15:00	707	Zwetschgen (ohne Kern)	n. a.
1	18:00–21:00	1.500	Indischer Chai Classic	n. a.
1	18:40	532	Salat mit Tomaten	n. a.
1	18:40	494	Chinesische Gemüsepfanne	<LOD
1	18:40	153	Brot	9,7*
1	22:35–24:00	200	Mineralwasser	n. a.
2	00:00–10:55	1.000	Mineralwasser	n. a.
2	11:00	185	Brot mit Marmelade & Butter	9,2*
2	11:00	472	Obstteller	n. a.
2	11:00–14:00	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
2	14:05–18:00	2.000	Mineralwasser	n. a.
2	15:50	1.026	Wassermelone	n. a.
2	18:15	559	Karotten, Zucchini, Soja Schnitzel in Pfanne inkl. Soße: Gemüsebrühe mit Mehl	66,4
2	18:15	433	Salat: Zucchini, Karotten, Tomate, Paprika, Pilze	n. a.
2	18:45–21:30	1.500	Indischer Chai Classic	n. a.
3	08:30–11:50	1.500	Mineralwasser	n. a.
3	12:00	663	Smoothie Bowl mit Nektarinen & Birnen, Topping: Banane & gefrorene Himbeeren	n. a.
3	12:00–15:00	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
3	15:15	1.880	Wassermelone	n. a.
3	16:30–19:20	1.500	Mineralwasser	n. a.
3	19:00	773	Couscous mit Gemüse (Tomaten, Pilze, Auberginen)	<LOD
3	20:15	700	Mineralwasser	n. a.
4	09:00–12:00	500	Mineralwasser	n. a.
4	12:25	1.250	Smoothie Bowl	n. a.
4	13:00–17:00	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
4	17:20–18:30	2.000	Mineralwasser	n. a.
4	18:30	1.312	Gemüsebrühe mit Zucchini & Karotten und Basmati Reis	n. a.
4	19:45–24:00	1.000	Mineralwasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-80 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 5–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
5	00:00–08:30	500	Mineralwasser	n. a.
5	11:20	733	Smoothie Bowl (2) (Banane, Aprikose mit gefrorenen Himbeeren)	n. a.
5	09:00–11:00	200	Mineralwasser	n. a.
5	12:00–18:00	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
5	19:05	856	Rice Rolls gefüllt mit Süßkartoffeln, Salat, Basilikum, Paprika & Pilze	<LOD
5	20:00–24:00	1.000	Mineralwasser	n. a.
6	08:30–15:00	1.000	Mineralwasser	n. a.
6	12:20	513	Kiwis	n. a.
6	12:20	913	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)	n. a.
6	15:30–18:20	1.500	Indischer Chai Classic	n. a.
6	18:25	715	Salat	n. a.
6	18:25	253	Mais mit Soja-Butter	<LOD
6	19:00	559	Bananen Smoothie mit Rosinen	n. a.
6	19:00	1.000	Mineralwasser	n. a.
7	09:30–11:00	500	Mineralwasser	n. a.
7	11:15	524	Obstsalat (Apfel, Pflaume, Banane, Nektarine)	n. a.
7	11:15–14:30	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
7	15:15–22:00	2.500	Mineralwasser	n. a.
7	16:00	778	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)	n. a.
7	19:15	946	Süßkartoffel, Kohlrabi & Tomate	n. a.
8	08:00–09:45	200	Mineralwasser	n. a.
8	09:50	400	Bananen Smoothie mit Himbeeren & Kokosraspeln (gefroren)	n. a.
8	10:00–14:20	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
8	10:00	1.014	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)	n. a.
8	14:30–17:30	700	Mineralwasser	n. a.
8	18:00–20:20	1.500	Indischer Chai Classic	n. a.
8	18:20	1.140	Spaghetti mit Brokkoli	<LOD
8	21:00–24:00	200	Mineralwasser	n. a.
9	09:00–13:00	1.000	Mineralwasser	n. a.
9	13:30	1.677	Nektarine, Pflaume, Pfirsich (platt)	n. a.
9	14:00–19:00	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
9	19:00	620	Salat mit Gurke & Paprika	n. a.
9	19:00	1.000	Amaranth & Quinoa mit Paprika & Lauch	23,2
9	20:00–24:00	500	Mineralwasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-81 Von V-w-3 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
10	09:00	300	Mineralwasser	n. a.
10	13:15	462	warme Himbeeren mit Rosinen & Cashewkerne	<LOD
10	13:15	934	Obststeller (Nektarine, Apfel, Pfirsich (platt))	n. a.
10	13:30–19:20	1.500	Grüner Tee Vanille	<LOD
10	18:40	560	Salat mit Tomaten	n. a.
10	18:40	876	Madras Curry mit Basmati Reis & Paprika	<LOD
10	18:20–22:00	1.200	Mineralwasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-82 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
1	09:15	150	Gewürzkaffee	4,8
1	09:30–11:00	500	Mineralwasser	n. a.
1	09:40	80	Baquette Brötchen	<LOD
1	09:40	200	Schwarzer Tee	n. a.
1	10:00	200	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
1	11:15	250	Mineralwasser	n. a.
1	12:00	70	Brötchen	16,2*
1	13:50	100	Brezel	17,6*
1	14:45	100	Brezel	17,6*
1	13:50–15:30	400	Leitungswasser	n. a.
1	16:00	180	Brötchen mit Olivenaufstrich	80,0
1	16:00–16:45	400	Leitungswasser	n. a.
1	17:45	120	Brötchen mit Olivenaufstrich	80,0
1	17:30–18:00	400	Leitungswasser	n. a.
1	19:20	300	Mineralwasser	n. a.
1	21:00	150	Mandarinen	n. a.
1	20:20–22:00	350	Mineralwasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-83 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 2–4.1 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
2	07:10	600	Leitungswasser	n. a.
2	07:45	250	Gewürzkaffee	4,8
2	08:00	90	Mandarine	n. a.
2	09:15–11:30	400	Leitungswasser	n. a.
2	09:20	200	Brezel	17,6*
2	09:45–10:15	500	entkoffeinierter Kaffee	4,6
2	13:00–15:00	400	Leitungswasser	n. a.
2	13:20	900	Linseneintopf mit Gemüse	<LOD
2	16:45	120	Brötchen mit Olivenaufstrich	80,0
2	16:45	100	Zucchini	<LOD
2	17:15–18:30	400	Leitungswasser	n. a.
2	20:08	900	Bier	n. a.
2	21:10–22:15	450	Mineralwasser	n. a.
3	07:15–08:15	650	Leitungswasser	n. a.
3	09:00	250	Gewürzkaffee	4,8
3	09:15	280	Mandarinen	n. a.
3	09:30	300	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
3	12:45	250	Brombeeren	n. a.
3	12:50	115	Brezel	17,6*
3	12:30–15:00	400	Leitungswasser	n. a.
3	13:15	120	Brötchen mit Kichererbsen	73,0
3	15:00–17:00	400	Leitungswasser	n. a.
3	15:40	940	Linseneintopf mit Gemüse	<LOD
3	18:40	200	Mineralwasser	n. a.
3	19:20	1000	Bier	n. a.
3	20:45–22:00	500	Mineralwasser	n. a.
3	21:30	240	Brombeeren	n. a.
4	07:00	600	Leitungswasser	n. a.
4	07:40	250	Gewürzkaffee	4,8
4	07:55	250	Brombeeren	n. a.
4	09:15–12:15	400	Leitungswasser	n. a.
4	09:20	100	Brezel	17,6*
4	09:30	100	Brötchen mit Kichererbsen	73,0
4	09:30	80	Zucchini	<LOD
4	10:00	500	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
4	12:15	100	Brötchen mit Kichererbsen	73,0
4	12:15	80	Zucchini	<LOD
4	13:15–15:30	400	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-84 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 4.2–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
4	15:15	40	Brötchen mit Senf-Rucola	38,9
4	15:15	70	China Kohl	<LOD
4	15:30–17:30	400	Leitungswasser	n. a.
4	17:20	90	Brötchen mit Senf-Rucola	38,9
4	17:20	70	China Kohl	<LOD
4	17:40	100	Brezel	17,6*
4	20:00	200	Mineralwasser	n. a.
4	20:00	500	Apfelschorle	n. a.
4	20:00	100	Doppelkeks	90,9
4	21:00	300	Mineralwasser	n. a.
5	06:30–07:00	600	Leitungswasser	n. a.
5	07:35	250	Gewürzkafee	4,8
5	07:50	250	Brombeeren	n. a.
5	09:15–12:15	400	Leitungswasser	n. a.
5	09:15	200	Brezel	17,6*
5	10:00	500	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
5	13:15	75	China Kohl	<LOD
5	13:15	90	Brötchen mit Senf Rucola	38,9
5	13:15–15:00	400	Leitungswasser	n. a.
5	15:10	75	China Kohl	<LOD
5	15:10	90	Brötchen mit Senf Rucola	38,9
5	16:15	400	Pfefferminztee	0,7
5	17:20	130	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich	32,7
5	17:20	110	Auberginen	<LOD
5	17:20–18:00	400	Leitungswasser	n. a.
5	18:00	100	Brezel	17,6*
5	20:00	250	Leitungswasser	n. a.
5	21:00	1.000	Bier	n. a.
5	21:00–22:00	550	Mineralwasser	n. a.
5	22:30–07:00	300	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-85 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–7 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
6	08:20	600	Leitungswasser	n. a.
6	08:45	250	Gewürzkaffee	4,8
6	09:10	50	Doppelkeks	90,9
6	09:10	170	Mandarinen	n. a.
6	09:40	300	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
6	10:45–14:00	500	Leitungswasser	n. a.
6	14:00–17:30	700	Mineralwasser	n. a.
6	10:55	100	Brezel	17,6*
6	14:15	90	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich	32,7
6	14:15	90	Auberginen	<LOD
6	15:30	60	Banane	n. a.
6	16:45	90	Mandarinen	n. a.
6	17:30	90	Brötchen mit Pilzcremeaufstrich	32,7
6	17:30	90	Auberginen	<LOD
6	18:00–20:00	300	Mineralwasser	n. a.
6	19:00	175	Mandarinen	n. a.
6	19:45	200	Grüner Tee	n. a.
6	21:30	500	Bier	n. a.
6	21:45	450	Smore's	18,5
6	23:00	400	Mineralwasser	n. a.
6	23:00–07:00	300	Leitungswasser	n. a.
7	11:45	600	Leitungswasser	n. a.
7	11:55	250	Gewürzkaffee	4,8
7	12:20	300	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
7	12:45	500	Traubenmost	n. a.
7	13:25	250	Chili Chai	n. a.
7	13:40	400	Bier	n. a.
7	13:50	300	Nudelsalat mit Broccoli	<LOD
7	14:10	500	Bier	n. a.
7	14:45	150	Brownie	61,2
7	14:50	200	Mandelkuchen Beere	18,3
7	14:55	500	Bier	n. a.
7	15:45	500	Bier	n. a.
7	16:35	250	Chili Chai	n. a.
7	17:30	500	Weinschorle	n. a.
7	19:30	500	Mineralwasser	n. a.
7	22:00	100	Brownie	61,2
7	22:30	300	Leitungswasser	n. a.
7	23:00–07:00	300	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-86 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 8–9 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
8	08:45	600	Leitungswasser	n. a.
8	09:15	30	Brownie	61,2
8	10:00	250	Gewürzkaffee	4,8
8	10:10	170	Doppelkeks	90,9
8	10:30	300	Schwarzer Tee	n. a.
8	13:40	300	Linsensuppe	<LOD
8	14:30	500	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
8	15:45	100	Brezel	17,6*
8	17:00	250	Plantain Bananen	n. a.
8	17:00	400	Leitungswasser	n. a.
8	19:00–21:30	500	Mineralwasser	n. a.
8	20:00	200	Zuckerschoten	<LOD
9	07:00	600	Leitungswasser	n. a.
9	07:45	250	Gewürzkaffee	4,8
9	09:15	200	Brezel	17,6*
9	09:45–14:30	500	Leitungswasser	n. a.
9	10:45	400	Schwarzer Tee	n. a.
9	11:50	500	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
9	14:30	750	Tofu Tortellini	7,9*
9	15:00–17:00	400	Leitungswasser	n. a.
9	17:10	350	Bohneneintopf	n. a.
9	17:15–18:30	400	Leitungswasser	n. a.
9	18:00	300	Ingwer Zitrone Tee	n. a.
9	19:45	900	Bier	n. a.
9	20:30	500	Mineralwasser	n. a.
9	21:40	40	Smore's	18,5
9	22:30–07:00	250	Leitungswasser	n. a.

* ½ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-87 Von V-w-4 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
10	09:15	600	Leitungswasser	n. a.
10	09:40	250	Gewürzkaffee	<LOD
10	10:00	250	Tofu Tortellini	7,9*
10	10:45	300	Schwarzer Tee	n. a.
10	11:00	125	Brombeeren	n. a.
10	12:00–15:30	500	Leitungswasser	n. a.
10	12:30	200	Brezel	17,6*
10	16:00	500	Entkoffeinierter Kaffee	4,6
10	17:00	100	Brezel	17,6*
10	17:00	410	Linsensuppe	<LOD
10	17:10	300	Leitungswasser	n. a.
10	19:30	900	Bier	n. a.
10	21:15	250	Mineralwasser	n. a.
10	22:15–07:00	300	Leitungswasser	n. a.

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-88 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 1–2 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
1	11:00–12:20	1.060	Leitungswasser	n. a.
1	11:55	310	Reis mit Cha. (Kichererbsencurry)	<LOD
1	12:45	1.060	Leitungswasser	n. a.
1	17:00	206	Kartoffelchips mit Ketchup	366,0
1	17:00	413	Rohkost (Tomate, Gurke, Karotte, Kohlrabi)	n. a.
1	17:00–18:00	330	Leitungswasser	n. a.
1	20:00	150	Eis: Waldfrucht, Honigmelonen-Minze	n. a.
2	07:45–08:30	1060	Leitungswasser	n. a.
2	08:00	570	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
2	13:00–15:00	700	Leitungswasser	n. a.
2	14:10	550	Spaghetti mit Tomatensoße	<LOD
2	18:00	50	Chips Red Paprika	119,1
2	18:00–19:00	560	Fritz Cola	n. a.
2	20:45	7	Spaghetti Strawberry Sour (Schlangen)	<LOD
2	20:35–21:20	360	Leitungswasser	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-89 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 3–5 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
3	09:30–10:25	650	Leitungswasser	n. a.
3	10:00	427	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
3	10:00	200	Orangensaft	n. a.
3	14:00	370	Spaghetti mit Tomatensoße	<LOD
3	14:15–16:30	650	Leitungswasser	n. a.
3	14:20	7	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)	<LOD
3	19:30	300	Pflaumen	n. a.
3	19:40	180	Karotten	n. a.
3	19:40–20:15	530	Leitungswasser	n. a.
3	21:00–08:00	100	Leitungswasser	n. a.
4	09:15	520	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
4	09:15	200	Orangensaft	n. a.
4	10:00–15:30	550	Leitungswasser	n. a.
4	15:55	450	Reis mit Erdnusssoße & Tofu	<LOD
4	15:55–17:00	530	Leitungswasser	n. a.
4	16:45	7	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)	<LOD
4	17:15–21:00	530	Leitungswasser	n. a.
4	21:30	50	Chips Red Paprika	119,1
4	21:30	300	Ginger Ale	n. a.
4	21:50	52	Spaghetti Strawberry sour (Schlangen)	<LOD
4	22:10	560	Malzbier	<LOD
4	01:00	330	Leitungswasser	n. a.
5	09:30–10:30	650	Leitungswasser	n. a.
5	11:00	1.045	Wassermelone	n. a.
5	13:00	530	Reis mit Erdnusssoße & Tofu	<LOD
5	13:30	80	Wallnussbrötchen	210,0
5	13:30–16:40	650	Leitungswasser	n. a.
5	17:00	330	Malzbier	<LOD
5	18:00	130	Veggie Mini Grillsteaks	11,4*
5	18:00	30	Lupinenrostbratwürstchen	<LOD
5	18:00	130	Körnerbaguette	<LOD
5	18:00	10	Curry-Ketchup	n. a.
5	18:30–20:40	650	Leitungswasser	n. a.
5	21:30	400	Ginger-Ale	n. a.

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-90 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 6–8 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
6	08:30–11:00	650	Leitungswasser	n. a.
6	11:30	200	Orangensaft	n. a.
6	11:30	500	Wassermelone	n. a.
6	11:40	135	Laugenstange mit Körner	<LOD
6	16:30	580	Nudeln mit Tofu, Tomate, Zwiebel, Knobi, Ingwer	6,0*
6	16:30–19:00	500	Leitungswasser	n. a.
6	17:50	40	Spaghetti Strawberry Sour (Schlangen)	<LOD
6	20:25–21:15	700	Sprudel mit Pfefferminzsirup	n. a.
6	20:30	245	Empanadas mit Pilzen & Tomaten	<LOD
6	21:45–23:10	660	Malzbier	<LOD
6	21:45	75	Chips Red Paprika	119,1
7	10:15–12:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	11:00	200	Orangensaft	n. a.
7	11:00	90	Laugenstange mit Körnern	<LOD
7	11:50	360	Pancakes mit Agavendicksaft	<LOD
7	15:45–18:20	500	Leitungswasser	n. a.
7	17:25	40	Spaghetti Strawberry Sour (Schlangen)	<LOD
7	20:25	450	Gemüselasagne mit Mandelcreme	<LOD
7	20:30–23:00	500	Leitungswasser	n. a.
7	21:40	10	Spaghetti Strawberry Sour (Schlangen)	<LOD
8	09:40–10:30	500	Leitungswasser	n. a.
8	09:55	600	Haferflocken mit Wasser, Apfel , Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
8	09:55	200	Orangensaft	n. a.
8	14:30–15:30	650	Leitungswasser	n. a.
8	15:00	365	Maultaschen vegan in Gemüsebrühe	<LOD
8	19:00–20:45	500	Leitungswasser	n. a.
8	20:00	400	Bananeneis (nur Bananen)	n. a.
8	21:00	400	Ginger Ale	n. a.
8	23:20–00:30	500	Leitungswasser	n. a.

* $\frac{1}{2}$ LOQ (Bestimmungsgrenze); LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

Tabelle 0-91 Von V-w-5 verzehrte Lebensmittel und Acrylamid-Gehalte, Tag 9–10 (Humanstudie II).

Tag	Uhrzeit	Menge [g]	verzehrte(s) Lebensmittel	Acrylamid-Gehalt [µg/kg]
9	09:15–21:00	500	Leitungswasser	n. a.
9	09:15	200	Orangensaft	n. a.
9	09:15	530	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
9	15:10	1.200	Wassermelone	n. a.
9	21:30	400	selbstgemachte Limonade	n. a.
9	21:30	720	Jasmin-Reis mit Kaiserschoten & Teriyaki- Tofu & Sesam	<LOD
10	09:30	200	Orangensaft	n. a.
10	09:30	530	Haferflocken mit Wasser, Apfel, Leinsamen, Amaranth, Crunchy Müsli	<LOD
10	14:00	1.625	Wassermelone	n. a.
10	18:30–19:45	500	Leitungswasser	n. a.
10	19:05	870	Avocado-Tomaten-Nudeln	<LOD
10	20:20	330	Fritz Cola	n. a.
10	22:45	200	Ginger-Ale	n. a.

LOD Nachweisgrenze; n. a. nicht analysiert

A.8. Retrospektiver Fragebogen zur Humanstudie II

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.

A.9. Retrospektive Probanden-Aktivitäten (Humanstudie II)

Tabelle 0-92 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 1–7 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.8.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Vorwiegender Aufenthalt							
in Innenräumen				x	x		
im Freien		x	x				x
Aufenthalt in der Nähe von / in / auf							
Rauchern				X (8)	X (k. A., ++)	X (10)	
Bars / Diskotheken / Restaurants	X (6)	X (3)		X (6, 8)		X (2, 4, 10)	X (6)
Raucherbereichen von Bars / Diskotheken / Restaurants				x (8)		x (10)	
öffentlichen Veranstaltungen (z. B. Stadtfest)	X (5, 6)		X (5)				X (5, 6)
Grillstellen / offenem Feuer	X (1, 2, 5)			X (5)	X (6)	X (2, 4, 9)	X (1, 2, 4, 5)

x: im Fragebogen bejaht; k. A. keine Angabe; in Klammern: jeweiliger Studientag; ++ zutreffend für mehrere Tage ohne weitere Angabe

Tabelle 0-93 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 8–14 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.7.

	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Vorwiegender Aufenthalt							
in Innenräumen	x			x			x
im Freien		x	x		x	x	
Aufenthalt in der Nähe von / in / auf							
Rauchern		x (k. A., ++)	x (k. A.)	x (1, 5, 8)		x (2)	
Bars / Diskotheken / Restaurants			x (k. A.)		x (9)	x (2)	x (6)
Raucherbereichen von Bars / Diskotheken / Restaurants			x (k. A.)				
öffentlichen Veranstaltungen (z. B. Stadtfest)		x (6)	x (k. A.)				
Grillstellen / offenem Feuer				x (6)			

x: im Fragebogen bejaht; k. A. keine Angabe; in Klammern: jeweiliger Studientag; ++ zutreffend für mehrere Tage ohne weitere Angabe

Tabelle 0-94 Retrospektive Aktivitäten der Probanden 14–20 der Humanstudie II, evaluiert durch den Fragebogen in Anhang A.7.

	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Vorwiegender Aufenthalt							
in Innenräumen	x		x	x		x	
im Freien							x
Aufenthalt in der Nähe von / in / auf							
Rauchern		x (k. A., ++)		x (k. A., ++)	x (k. A., ++)		x (2, 6, 10)
Bars / Diskotheken / Restaurants	x (6)			x (k. A., ++)	x (4, 6)	x (6)	x (2, 6, 10)
Raucherbereichen von Bars / Diskotheken / Restaurants				x (k. A., ++)	x (4)		
öffentlichen Veranstaltungen (z. B. Stadtfest)				x (k. A., ++)		x (2)	x (k. A., ++)
Grillstellen / offenem Feuer				x (k. A., ++)	x (5)		x (4, 6)

x: im Fragebogen bejaht; k. A. keine Angabe; in Klammern: jeweiliger Studientag; ++ zutreffend für mehrere Tage ohne weitere Angabe

A.10. Urinvolumina (Humanstudie II)

Tabelle 0-95 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 1–7 der Humanstudie II.

Sammel- zeitraum	Urinvolumen [ml]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	715	740	1093	1546	447	985	413
Tag 1 (12–24 h)	1143	320	390	1281	403	1673	266
Tag 1 (Spoturin)	60	65	49	50	60	57	61
Tag 2 (0–12 h)	729	591	1655	1500	336	1727	190
Tag 2 (12–24 h)	990	727	260	1494	236	805	322
Tag 2 (Spoturin)	53	54	67	58	83	60	68
Tag 3 (0–12 h)	383	1272	994	1312	718	2204	537
Tag 3 (12–24 h)	703	353	1095	1992	277	345	506
Tag 3 (Spoturin)	52	71	93	69	86	60	58
Tag 4 (0–12 h)	871	575	2510	779	434	394	1323
Tag 4 (12–24 h)	383	920	1002	2131	586	495	528
Tag 4 (Spoturin)	48	75	69	60	87	68	67
Tag 5 (0–12 h)	724	2840	2000	1273	435	1606	329
Tag 5 (12–24 h)	757	1271	341	744	172	271	954
Tag 5 (Spoturin)	56	82	86	53	91	69	53
Tag 6 (0–12 h)	152	1626	1396	2135	413	863	525
Tag 6 (12–24 h)	1114	653	1099	2037	162	872	948
Tag 6 (Spoturin)	50	58	78	67	85	63	56
Tag 7 (0–12 h)	785	651	1733	898	485	1002	1403
Tag 7 (12–24 h)	920	810	498	914	627	523	351
Tag 7 (Spoturin)	53	75	94	62	65	68	58
Tag 8 (0–12 h)	452	1496	1064	897	768	703	402
Tag 8 (12–24 h)	1243	689	246	994	309	351	285
Tag 8 (Spoturin)	56	63	93	59	67	57	52
Tag 9 (0–12 h)	427	908	627	1025	192	1507	194
Tag 9 (12–24 h)	1060	261	567	961	670	1100	391
Tag 9 (Spoturin)	54	75	71	70	70	71	62
Tag 10 (0–12 h)	724	295	986	800	1286	2740	381
Tag 10 (12–24 h)	438	396	767	907	954	4559	1050
Tag 10 (Spoturin)	53	74	93	53	89	90	49

Tabelle 0-96 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 8–14 der Humanstudie II. P13 beendete die Studie bereits nach neun Tagen.

Sammel- zeitraum	Urinvolumen [ml]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	705	706	2349	985	1109	1561	1486
Tag 1 (12–24 h)	99	522	2509	223	1231	389	947
Tag 1 (Spoturin)	60	66	63	76	82	50	51
Tag 2 (0–12 h)	128	906	835	654	1983	467	1134
Tag 2 (12–24 h)	56	198	857	1017	790	1469	1001
Tag 2 (Spoturin)	54	66	91	88	69	51	74
Tag 3 (0–12 h)	169	868	1629	698	1236	1129	711
Tag 3 (12–24 h)	230	169	330	212	425	167	778
Tag 3 (Spoturin)	62	85	69	78	92	55	64
Tag 4 (0–12 h)	325	954	1167	382	1404	124	1438
Tag 4 (12–24 h)	124	243	3360	265	1790	295	1001
Tag 4 (Spoturin)	68	73	103	79	72	53	78
Tag 5 (0–12 h)	265	470	499	586	1491	128	818
Tag 5 (12–24 h)	91	288	2305	1127	632	301	532
Tag 5 (Spoturin)	53	44	68	78	75	60	56
Tag 6 (0–12 h)	142	495	894	696	1718	242	217
Tag 6 (12–24 h)	56	403	554	636	495	339	889
Tag 6 (Spoturin)	62	55	74	98	77	50	64
Tag 7 (0–12 h)	198	345	2266	2126	2319	236	1717
Tag 7 (12–24 h)	236	206	1498	1045	641	344	410
Tag 7 (Spoturin)	56	58	56	68	71	54	84
Tag 8 (0–12 h)	598	523	1528	1369	1784	517	1452
Tag 8 (12–24 h)	499	866	946	982	826	211	1215
Tag 8 (Spoturin)	62	72	58	85	73	49	75
Tag 9 (0–12 h)	256	1000	2126	885	2273	407	2215
Tag 9 (12–24 h)	472	654	975	1018	1184	325	206
Tag 9 (Spoturin)	80	72	76	79	73	73	60
Tag 10 (0–12 h)	396	903	1857	572	2403	-	857
Tag 10 (12–24 h)	367	713	1039	419	1062	-	1270
Tag 10 (Spoturin)	61	72	101	68	74	-	53

Tabelle 0-97 Urinvolumina der einzelnen Sammelzeiträume der Probanden 15–20 der Humanstudie II.

Sammelzeitraum	Urinvolumen [ml]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	1586	4556	1746	1990	541	466
Tag 1 (12–24 h)	1639	2250	1138	437	462	686
Tag 1 (Spoturin)	61	92	77	35	83	96
Tag 2 (0–12 h)	2587	4518	1549	1570	1076	352
Tag 2 (12–24 h)	1229	2973	1972	583	145	623
Tag 2 (Spoturin)	62	78	77	96	86	61
Tag 3 (0–12 h)	2164	2920	2255	1130	466	607
Tag 3 (12–24 h)	1535	2313	2017	545	159	568
Tag 3 (Spoturin)	64	107	84	127	87	57
Tag 4 (0–12 h)	1781	2621	1420	1354	492	533
Tag 4 (12–24 h)	1699	3100	1047	548	126	796
Tag 4 (Spoturin)	72	83	74	84	83	61
Tag 5 (0–12 h)	1883	1691	1216	2053	601	687
Tag 5 (12–24 h)	1619	1850	2143	750	217	640
Tag 5 (Spoturin)	69	86	93	129	94	82
Tag 6 (0–12 h)	2002	2637	2629	1524	681	333
Tag 6 (12–24 h)	1363	1837	1314	1287	613	1072
Tag 6 (Spoturin)	76	99	93	97	91	80
Tag 7 (0–12 h)	1988	2904	4027	1443	723	956
Tag 7 (12–24 h)	1288	2911	2097	561	339	1218
Tag 7 (Spoturin)	74	65	58	63	75	75
Tag 8 (0–12 h)	2013	2466	1064	1723	651	736
Tag 8 (12–24 h)	1483	3311	1576	1386	218	680
Tag 8 (Spoturin)	68	76	85	88	82	78
Tag 9 (0–12 h)	2167	2245	1021	2309	705	817
Tag 9 (12–24 h)	1212	2379	2020	293	181	482
Tag 9 (Spoturin)	63	79	83	71	88	95
Tag 10 (0–12 h)	2300	1921	2073	1908	1141	554
Tag 10 (12–24 h)	1368	2311	1836	1280	423	923
Tag 10 (Spoturin)	69	62	63	70	71	86

A.11. Kreatinin-Gehalte der Urinproben (Humanstudie II)

Tabelle 0-98 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 1–7 der Humanstudie II.

Urinprobe	Kreatinin-Gehalt [g/l]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	1,73	2,08	1,63	0,64	1,39	0,82	1,45
Tag 1 (12–24 h)	1,03	3,29	2,78	0,81	4,02	0,82	3,10
Tag 1 (Spoturin)	1,64	3,39	2,41	1,01	3,93	1,75	2,81
Tag 2 (0–12 h)	1,52	0,99	0,52	0,75	2,86	0,51	3,03
Tag 2 (12–24 h)	1,19	1,92	3,14	0,39	4,08	1,21	2,09
Tag 2 (Spoturin)	2,44	2,22	3,06	3,16	4,64	1,20	3,19
Tag 3 (0–12 h)	1,70	0,83	1,09	0,86	1,21	0,42	1,29
Tag 3 (12–24 h)	2,42	3,02	0,92	0,61	4,08	1,94	1,30
Tag 3 (Spoturin)	1,91	3,05	0,83	1,24	4,33	3,84	1,04
Tag 4 (0–12 h)	1,10	1,78	0,37	1,46	2,57	2,21	0,60
Tag 4 (12–24 h)	2,19	1,40	1,02	0,42	2,26	1,80	1,29
Tag 4 (Spoturin)	2,51	2,93	0,63	0,86	2,51	1,97	2,56
Tag 5 (0–12 h)	1,58	0,39	0,50	0,82	3,63	0,54	1,93
Tag 5 (12–24 h)	1,12	0,93	2,48	1,16	3,97	2,39	0,64
Tag 5 (Spoturin)	3,98	1,54	2,39	1,66	4,16	3,47	2,11
Tag 6 (0–12 h)	2,66	0,64	0,77	0,51	2,81	1,07	1,31
Tag 6 (12–24 h)	2,21	1,74	0,86	0,57	3,61	0,90	0,95
Tag 6 (Spoturin)	1,40	2,71	1,35	0,73	3,91	2,59	0,68
Tag 7 (0–12 h)	1,26	1,75	0,62	0,84	2,69	0,59	0,53
Tag 7 (12–24 h)	1,50	1,26	1,83	1,20	1,99	1,49	1,56
Tag 7 (Spoturin)	1,51	2,04	2,01	0,80	1,74	1,63	1,75
Tag 8 (0–12 h)	2,05	0,81	0,89	0,94	1,67	1,42	1,60
Tag 8 (12–24 h)	1,09	1,52	3,12	1,04	3,11	2,35	2,97
Tag 8 (Spoturin)	1,80	1,67	3,49	1,14	3,38	2,24	2,45
Tag 9 (0–12 h)	1,65	1,01	1,50	1,22	2,71	0,50	3,12
Tag 9 (12–24 h)	1,57	2,99	1,98	0,79	2,14	0,72	2,03
Tag 9 (Spoturin)	1,55	2,90	1,94	1,35	4,27	2,75	2,07
Tag 10 (0–12 h)	1,77	2,96	0,71	1,60	0,98	0,25	2,18
Tag 10 (12–24 h)	2,41	3,58	1,62	1,00	1,22	0,18	0,53
Tag 10 (Spoturin)	2,42	4,00	2,45	2,69	2,48	0,33	2,75

Tabelle 0-99 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 8–14 der Humanstudie II.

Urinprobe	Kreatinin-Gehalt [g/l]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	1,57	0,80	0,34	1,28	1,12	0,54	0,42
Tag 1 (12–24 h)	2,38	1,06	0,24	2,46	0,69	2,63	0,48
Tag 1 (Spoturin)	3,37	1,72	0,90	2,75	0,87	3,70	1,25
Tag 2 (0–12 h)	3,69	0,74	0,84	1,32	0,44	2,11	0,55
Tag 2 (12–24 h)	3,27	1,85	0,59	0,66	1,01	0,70	0,41
Tag 2 (Spoturin)	4,84	2,10	0,49	1,10	1,42	1,83	0,97
Tag 3 (0–12 h)	3,05	0,91	0,46	1,26	0,79	0,99	0,78
Tag 3 (12–24 h)	2,31	1,23	0,63	2,57	0,99	4,56	0,52
Tag 3 (Spoturin)	2,35	1,65	0,88	3,52	2,02	4,87	1,34
Tag 4 (0–12 h)	1,88	0,85	0,46	2,05	0,61	4,64	0,38
Tag 4 (12–24 h)	2,75	1,94	0,21	2,01	0,35	4,86	0,41
Tag 4 (Spoturin)	2,72	2,96	0,19	2,98	1,49	5,45	1,73
Tag 5 (0–12 h)	2,08	1,76	0,91	1,39	0,56	5,44	0,42
Tag 5 (12–24 h)	4,79	2,30	0,23	0,55	1,05	4,29	1,12
Tag 5 (Spoturin)	4,16	3,17	0,32	1,98	3,42	3,67	1,61
Tag 6 (0–12 h)	3,82	0,73	0,75	1,22	0,41	2,74	1,98
Tag 6 (12–24 h)	4,19	1,36	0,88	1,03	0,88	3,76	0,51
Tag 6 (Spoturin)	4,24	0,91	2,00	1,65	1,01	3,44	0,51
Tag 7 (0–12 h)	2,54	1,72	2,19	0,38	0,33	3,70	0,36
Tag 7 (12–24 h)	2,12	2,24	0,40	0,66	0,82	2,85	0,84
Tag 7 (Spoturin)	3,94	2,59	0,57	0,95	3,48	3,50	2,39
Tag 8 (0–12 h)	0,93	0,81	0,48	0,61	0,49	1,99	0,36
Tag 8 (12–24 h)	0,57	0,56	0,69	0,67	0,95	3,67	0,38
Tag 8 (Spoturin)	2,22	1,25	0,74	1,17	1,11	3,72	0,75
Tag 9 (0–12 h)	2,38	0,61	0,33	0,86	0,42	2,16	0,22
Tag 9 (12–24 h)	0,84	1,05	0,50	0,76	0,68	3,09	1,76
Tag 9 (Spoturin)	1,93	1,42	0,99	1,37	1,16	3,47	2,26
Tag 10 (0–12 h)	1,38	0,64	0,34	1,10	0,32	-	0,74
Tag 10 (12–24 h)	0,66	0,75	0,48	1,84	0,64	-	0,36
Tag 10 (Spoturin)	3,91	1,15	0,78	2,55	2,69	-	0,86

Tabelle 0-100 Kreatinin-Gehalte der Urinproben der Probanden 15–20 der Humanstudie II.

Urinprobe	Kreatinin-Gehalt [g/l]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	0,57	0,15	0,51	0,44	1,38	2,14
Tag 1 (12–24 h)	0,55	0,22	0,88	1,00	1,44	1,99
Tag 1 (Spoturin)	1,10	0,70	0,90	2,82	1,20	2,51
Tag 2 (0–12 h)	0,31	0,15	0,61	0,27	0,56	2,34
Tag 2 (12–24 h)	0,54	0,18	0,30	0,30	2,81	1,70
Tag 2 (Spoturin)	0,74	0,28	1,25	1,72	2,94	1,99
Tag 3 (0–12 h)	0,42	0,16	0,53	0,36	1,35	1,58
Tag 3 (12–24 h)	0,44	0,17	0,46	0,31	2,05	2,33
Tag 3 (Spoturin)	0,55	0,23	1,13	0,88	2,55	2,40
Tag 4 (0–12 h)	0,57	0,25	0,56	0,55	1,76	2,29
Tag 4 (12–24 h)	0,52	0,15	0,94	0,37	3,19	1,82
Tag 4 (Spoturin)	0,94	0,29	1,19	1,22	2,54	1,39
Tag 5 (0–12 h)	0,38	0,32	0,71	0,29	1,18	1,94
Tag 5 (12–24 h)	0,63	0,28	0,26	0,52	2,02	1,94
Tag 5 (Spoturin)	1,24	0,78	1,39	0,37	2,20	2,23
Tag 6 (0–12 h)	0,50	0,24	0,28	0,36	1,07	2,34
Tag 6 (12–24 h)	0,63	0,23	0,65	0,38	0,86	1,39
Tag 6 (Spoturin)	0,87	0,22	1,81	0,49	1,72	0,28
Tag 7 (0–12 h)	0,48	0,19	0,20	0,30	0,98	0,81
Tag 7 (12–24 h)	0,63	0,19	0,28	0,50	0,87	1,17
Tag 7 (Spoturin)	0,79	0,27	2,23	0,62	2,44	1,18
Tag 8 (0–12 h)	0,46	0,20	0,64	0,30	0,91	1,57
Tag 8 (12–24 h)	0,57	0,18	0,47	0,17	2,28	1,90
Tag 8 (Spoturin)	0,77	0,19	0,83	0,76	3,03	1,69
Tag 9 (0–12 h)	0,35	0,23	0,69	0,33	1,36	1,69
Tag 9 (12–24 h)	0,66	0,21	0,22	1,36	2,06	1,29
Tag 9 (Spoturin)	1,27	0,31	0,97	1,43	2,31	1,27
Tag 10 (0–12 h)	-	0,29	0,40	0,29	0,72	1,61
Tag 10 (12–24 h)	0,73	0,20	0,41	0,38	0,84	2,06
Tag 10 (Spoturin)	1,15	0,31	0,73	0,80	2,40	1,44

A.12. AAMA- und GAMA-Ausscheidung (Humanstudie II)

Tabelle 0-101 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	AAMA [nmol]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	122,2	304,8	171,7	234,0	90,8	106,1	94,7
Tag 1 (12–24 h)	150,7	145,1	93,4	405,9	196,5	207,2	177,8
Tag 1 (Spoturin)	13,4	32,5	11,7	19,9	20,1	18,2	50,9
Tag 2 (0–12 h)	162,5	68,4	63,6	428,8	73,3	118,2	87,6
Tag 2 (12–24 h)	230,4	180,2	76,0	233,4	118,5	238,3	76,7
Tag 2 (Spoturin)	25,8	21,1	20,0	53,4	42,9	19,0	20,8
Tag 3 (0–12 h)	81,9	150,7	93,9	322,9	80,2	167,4	52,3
Tag 3 (12–24 h)	407,7	165,7	103,6	285,8	102,5	113,4	40,5
Tag 3 (Spoturin)	23,9	32,6	11,0	30,2	30,2	29,7	4,8
Tag 4 (0–12 h)	124,0	133,5	92,4	287,1	93,4	103,2	53,3
Tag 4 (12–24 h)	85,8	192,3	86,0	159,3	124,6	148,0	54,5
Tag 4 (Spoturin)	10,2	41,3	3,5	7,5	19,0	30,2	13,0
Tag 5 (0–12 h)	85,6	191,0	79,6	200,8	257,2	140,2	129,4
Tag 5 (12–24 h)	75,8	285,0	79,2	200,8	176,8	116,3	287,6
Tag 5 (Spoturin)	23,2	37,0	20,1	24,4	74,3	45,9	43,5
Tag 6 (0–12 h)	56,8	220,2	91,9	360,6	160,7	150,2	151,8
Tag 6 (12–24 h)	270,9	261,7	88,3	492,5	76,2	111,1	160,7
Tag 6 (Spoturin)	7,4	32,6	9,0	19,8	43,8	24,3	7,8
Tag 7 (0–12 h)	95,3	211,1	107,1	240,1	179,7	57,5	94,6
Tag 7 (12–24 h)	115,6	180,3	119,7	363,1	167,2	108,0	68,6
Tag 7 (Spoturin)	7,2	23,0	27,5	12,0	14,1	22,8	10,5
Tag 8 (0–12 h)	62,6	163,1	91,1	222,2	132,8	139,8	56,0
Tag 8 (12–24 h)	91,1	159,1	93,7	314,6	81,5	113,8	110,0
Tag 8 (Spoturin)	5,2	14,2	43,2	22,0	17,8	19,9	19,0
Tag 9 (0–12 h)	33,2	143,0	94,0	213,4	42,2	109,6	57,1
Tag 9 (12–24 h)	122,1	107,7	92,3	125,4	106,3	212,6	215,8
Tag 9 (Spoturin)	5,5	16,9	10,5	12,8	20,7	63,2	29,7
Tag 10 (0–12 h)	92,9	115,7	55,9	117,6	126,7	92,5	121,8
Tag 10 (12–24 h)	66,3	178,5	101,4	111,9	96,5	132,8	76,6
Tag 10 (Spoturin)	6,8	35,3	18,8	16,3	17,0	6,5	12,3

Tabelle 0-102 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	AAMA [nmol]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	75,4	58,7	158,1	383,8	216,2	265,6	78,1
Tag 1 (12–24 h)	20,2	61,7	626,4	123,7	164,5	235,9	56,2
Tag 1 (Spoturin)	17,2	17,7	53,4	44,6	18,2	38,0	7,4
Tag 2 (0–12 h)	32,4	102,5	339,0	119,5	200,7	174,4	60,4
Tag 2 (12–24 h)	19,2	57,4	200,1	138,5	168,2	221,7	88,0
Tag 2 (Spoturin)	24,0	24,8	19,7	23,2	22,8	18,4	16,8
Tag 3 (0–12 h)	46,0	137,6	228,6	154,8	224,5	159,4	122,5
Tag 3 (12–24 h)	97,3	36,6	59,0	99,3	148,2	108,0	225,1
Tag 3 (Spoturin)	35,3	26,1	16,5	52,8	54,8	37,0	48,7
Tag 4 (0–12 h)	111,8	118,2	83,7	122,9	203,0	54,9	178,8
Tag 4 (12–24 h)	36,7	76,5	173,0	116,1	146,3	151,8	124,0
Tag 4 (Spoturin)	21,3	36,7	3,9	51,0	25,9	30,7	42,9
Tag 5 (0–12 h)	45,8	101,2	167,6	146,5	195,4	67,7	77,5
Tag 5 (12–24 h)	28,2	124,5	328,3	163,3	72,1	115,7	227,3
Tag 5 (Spoturin)	16,4	28,1	12,4	38,0	22,4	21,2	41,0
Tag 6 (0–12 h)	39,1	56,9	350,4	150,0	68,8	50,1	156,7
Tag 6 (12–24 h)	15,4	91,5	310,6	194,1	47,8	137,1	121,1
Tag 6 (Spoturin)	18,5	6,7	75,6	46,4	7,8	21,9	12,3
Tag 7 (0–12 h)	28,7	74,7	328,7	200,8	83,9	100,3	228,1
Tag 7 (12–24 h)	29,8	69,8	142,7	215,4	57,3	183,3	155,7
Tag 7 (Spoturin)	16,0	21,1	7,1	18,0	21,5	33,3	80,7
Tag 8 (0–12 h)	45,0	50,8	147,8	168,7	74,8	175,2	137,1
Tag 8 (12–24 h)	35,1	58,6	224,9	123,5	81,0	103,3	84,0
Tag 8 (Spoturin)	18,2	12,2	14,4	18,0	9,1	26,3	10,2
Tag 9 (0–12 h)	69,1	85,8	169,0	139,0	100,1	118,4	80,4
Tag 9 (12–24 h)	45,9	73,8	97,9	203,0	77,4	123,1	87,4
Tag 9 (Spoturin)	17,2	10,2	11,6	21,9	7,5	31,9	49,3
Tag 10 (0–12 h)	53,4	51,3	115,5	99,8	77,6	-	156,8
Tag 10 (12–24 h)	32,0	59,6	130,4	137,0	145,8	-	189,2
Tag 10 (Spoturin)	32,4	9,7	18,6	33,7	52,4	-	22,9

Tabelle 0-103 AAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	AAMA [nmol]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	93,5	52,0	284,4	87,2	143,0	124,4
Tag 1 (12–24 h)	181,8	45,7	475,7	460,7	139,8	143,6
Tag 1 (Spoturin)	12,6	9,0	39,3	146,4	20,6	28,5
Tag 2 (0–12 h)	148,0	49,2	289,7	358,1	120,0	73,0
Tag 2 (12–24 h)	124,8	129,0	205,3	90,6	165,0	248,3
Tag 2 (Spoturin)	7,8	6,4	49,7	54,3	95,0	26,3
Tag 3 (0–12 h)	134,4	61,7	390,8	80,0	157,8	186,9
Tag 3 (12–24 h)	110,6	40,7	307,9	32,0	84,7	201,5
Tag 3 (Spoturin)	4,2	2,2	39,4	14,1	69,5	25,0
Tag 4 (0–12 h)	123,7	40,1	229,6	91,9	186,9	239,5
Tag 4 (12–24 h)	76,8	32,4	342,3	42,8	77,4	228,7
Tag 4 (Spoturin)	5,4	2,7	43,0	38,8	45,2	13,8
Tag 5 (0–12 h)	104,2	33,3	215,3	161,8	135,1	158,4
Tag 5 (12–24 h)	102,9	22,4	310,4	135,1	104,1	145,8
Tag 5 (Spoturin)	8,4	2,8	65,7	12,4	44,4	28,0
Tag 6 (0–12 h)	150,0	26,5	324,1	99,6	141,6	90,1
Tag 6 (12–24 h)	176,3	17,9	510,2	109,9	115,4	199,4
Tag 6 (Spoturin)	12,1	1,5	123,8	11,3	36,6	3,7
Tag 7 (0–12 h)	131,6	25,5	556,0	115,9	158,3	115,7
Tag 7 (12–24 h)	117,0	22,8	392,7	126,1	52,9	175,4
Tag 7 (Spoturin)	8,1	0,6	113,3	17,6	29,8	12,5
Tag 8 (0–12 h)	124,9	19,5	523,7	130,7	93,2	139,6
Tag 8 (12–24 h)	110,5	32,2	759,2	39,9	89,2	127,2
Tag 8 (Spoturin)	6,7	0,8	55,1	7,9	37,0	13,3
Tag 9 (0–12 h)	119,2	29,8	312,9	81,9	138,9	134,7
Tag 9 (12–24 h)	125,2	95,3	341,9	75,0	58,1	74,1
Tag 9 (Spoturin)	11,1	5,5	51,7	18,9	32,1	15,9
Tag 10 (0–12 h)	-	90,6	330,0	56,0	118,0	88,1
Tag 10 (12–24 h)	199,9	57,6	337,3	57,8	62,5	148,6
Tag 10 (Spoturin)	16,6	1,6	19,4	7,0	27,8	13,2

Tabelle 0-104 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	GAMA [nmol]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	23,7	39,3	32,5	24,8	24,8	14,7	13,5
Tag 1 (12–24 h)	21,7	23,3	17,3	31,8	48,1	27,0	19,1
Tag 1 (Spoturin)	1,7	5,1	2,1	1,4	7,1	1,9	4,7
Tag 2 (0–12 h)	22,7	12,7	12,6	41,0	18,9	15,5	13,9
Tag 2 (12–24 h)	33,4	27,6	14,0	25,8	24,0	22,6	13,5
Tag 2 (Spoturin)	3,7	2,7	3,5	7,3	9,2	1,7	3,9
Tag 3 (0–12 h)	16,6	24,8	17,4	45,4	19,7	18,0	11,7
Tag 3 (12–24 h)	42,3	27,7	17,7	35,7	26,0	13,5	10,7
Tag 3 (Spoturin)	3,0	5,2	1,8	2,9	8,8	4,1	1,0
Tag 4 (0–12 h)	25,8	21,8	19,2	35,9	25,0	15,2	12,5
Tag 4 (12–24 h)	17,8	23,9	17,8	25,8	30,7	17,4	9,1
Tag 4 (Spoturin)	2,3	5,1	0,7	1,3	4,9	3,0	2,5
Tag 5 (0–12 h)	21,6	27,1	17,8	26,1	45,1	17,9	10,2
Tag 5 (12–24 h)	13,4	35,9	12,9	24,4	23,9	14,0	19,9
Tag 5 (Spoturin)	3,4	4,3	3,7	2,5	16,0	5,4	3,5
Tag 6 (0–12 h)	7,0	32,2	17,6	41,5	35,6	20,2	16,9
Tag 6 (12–24 h)	40,7	33,4	14,9	49,1	15,4	16,6	23,0
Tag 6 (Spoturin)	1,1	4,3	1,6	2,4	10,1	3,5	1,1
Tag 7 (0–12 h)	17,9	30,5	18,4	33,5	39,2	10,0	19,7
Tag 7 (12–24 h)	24,4	23,9	16,6	42,6	31,4	13,4	14,5
Tag 7 (Spoturin)	1,5	3,4	4,2	1,8	3,1	2,3	2,2
Tag 8 (0–12 h)	14,1	28,6	16,5	27,7	27,2	17,5	11,6
Tag 8 (12–24 h)	21,5	24,6	14,1	34,9	20,0	15,6	18,6
Tag 8 (Spoturin)	1,4	2,1	7,7	2,6	4,8	2,5	3,6
Tag 9 (0–12 h)	9,4	20,4	17,5	37,4	9,7	14,2	11,7
Tag 9 (12–24 h)	22,6	15,6	16,9	22,1	27,8	19,3	25,3
Tag 9 (Spoturin)	1,2	2,6	1,9	2,4	6,1	5,0	5,4
Tag 10 (0–12 h)	17,5	17,5	10,6	23,9	27,1	13,1	21,3
Tag 10 (12–24 h)	14,1	28,8	18,0	23,6	23,7	18,5	16,2
Tag 10 (Spoturin)	1,5	5,5	3,2	3,4	4,9	0,6	2,7

Tabelle 0-105 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	GAMA [nmol]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	12,8	8,8	23,3	73,2	45,6	32,6	15,2
Tag 1 (12–24 h)	3,0	8,6	29,1	26,4	26,8	33,2	8,7
Tag 1 (Spoturin)	2,5	1,7	2,7	9,2	2,7	5,7	1,1
Tag 2 (0–12 h)	5,3	12,0	29,6	29,1	32,8	26,4	10,3
Tag 2 (12–24 h)	2,3	6,5	18,2	25,0	26,3	30,6	8,0
Tag 2 (Spoturin)	3,2	2,4	1,7	3,7	3,3	2,4	1,6
Tag 3 (0–12 h)	5,9	18,7	23,3	25,2	34,6	25,9	13,1
Tag 3 (12–24 h)	8,0	5,2	8,3	15,7	24,4	19,0	16,2
Tag 3 (Spoturin)	2,6	3,6	2,6	8,3	9,6	6,8	3,4
Tag 4 (0–12 h)	13,2	16,8	17,6	22,0	37,4	11,4	20,4
Tag 4 (12–24 h)	5,7	8,8	22,8	15,6	25,6	29,7	13,4
Tag 4 (Spoturin)	3,3	4,5	0,5	7,3	3,9	5,9	4,0
Tag 5 (0–12 h)	8,0	15,6	11,0	23,3	31,8	14,5	11,4
Tag 5 (12–24 h)	5,5	12,8	24,8	21,6	18,8	30,3	17,4
Tag 5 (Spoturin)	3,0	2,7	1,1	5,0	7,3	4,8	3,2
Tag 6 (0–12 h)	7,7	6,7	26,2	22,8	18,2	12,3	17,1
Tag 6 (12–24 h)	2,8	11,6	28,5	20,1	11,3	30,9	13,9
Tag 6 (Spoturin)	3,4	1,0	8,1	4,5	2,0	3,9	1,1
Tag 7 (0–12 h)	5,9	10,3	71,9	25,8	20,3	17,8	19,1
Tag 7 (12–24 h)	5,7	9,0	25,4	24,6	12,8	25,5	13,9
Tag 7 (Spoturin)	2,6	3,3	1,3	2,5	6,0	4,2	8,9
Tag 8 (0–12 h)	7,1	7,5	26,3	27,9	18,7	25,3	17,5
Tag 8 (12–24 h)	4,8	8,7	30,8	21,0	16,4	17,6	11,6
Tag 8 (Spoturin)	2,4	1,6	2,4	3,2	1,7	4,3	1,5
Tag 9 (0–12 h)	9,0	11,9	31,5	21,3	20,6	21,1	12,8
Tag 9 (12–24 h)	5,8	11,4	22,0	27,0	15,3	21,3	9,5
Tag 9 (Spoturin)	2,3	1,6	2,8	3,7	1,6	5,8	3,6
Tag 10 (0–12 h)	7,6	7,9	21,9	18,7	16,4	-	16,3
Tag 10 (12–24 h)	3,9	7,5	19,4	21,4	18,5	-	15,1
Tag 10 (Spoturin)	3,3	1,3	2,9	5,3	6,8	-	1,9

Tabelle 0-106 GAMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	GAMA [nmol]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	23,2	17,2	46,8	34,5	20,1	26,5
Tag 1 (12–24 h)	21,0	9,4	52,9	33,7	18,2	27,9
Tag 1 (Spoturin)	1,7	2,0	3,7	10,4	2,9	5,8
Tag 2 (0–12 h)	27,6	12,0	45,7	55,7	19,2	17,4
Tag 2 (12–24 h)	18,0	18,7	25,2	18,8	16,5	32,5
Tag 2 (Spoturin)	1,2	0,9	3,9	13,0	9,4	3,0
Tag 3 (0–12 h)	23,3	14,7	44,0	23,9	20,6	26,6
Tag 3 (12–24 h)	19,1	16,1	33,5	9,8	9,1	31,4
Tag 3 (Spoturin)	0,7	0,8	3,2	5,1	7,1	3,1
Tag 4 (0–12 h)	20,5	13,9	24,7	30,7	23,2	31,3
Tag 4 (12–24 h)	15,5	11,4	33,1	8,6	8,5	27,7
Tag 4 (Spoturin)	1,2	1,0	3,3	4,7	5,0	1,9
Tag 5 (0–12 h)	16,8	12,4	26,1	31,0	18,3	25,0
Tag 5 (12–24 h)	22,3	9,8	26,2	21,5	12,3	21,1
Tag 5 (Spoturin)	1,8	1,1	4,0	2,1	5,4	3,9
Tag 6 (0–12 h)	24,0	10,0	26,0	25,7	18,4	16,5
Tag 6 (12–24 h)	22,9	6,9	28,7	21,3	12,9	29,8
Tag 6 (Spoturin)	1,8	0,5	6,7	1,8	3,8	0,5
Tag 7 (0–12 h)	27,4	9,0	43,3	20,2	17,4	17,1
Tag 7 (12–24 h)	21,5	8,0	18,2	15,6	8,1	30,4
Tag 7 (Spoturin)	1,4	0,2	3,8	2,4	5,2	2,1
Tag 8 (0–12 h)	21,7	6,9	22,7	29,3	15,1	24,2
Tag 8 (12–24 h)	17,8	9,1	49,7	11,2	11,7	22,4
Tag 8 (Spoturin)	1,2	0,2	4,7	2,7	5,9	2,5
Tag 9 (0–12 h)	21,0	7,6	42,3	29,6	20,0	22,0
Tag 9 (12–24 h)	20,3	9,4	31,0	14,0	7,7	11,2
Tag 9 (Spoturin)	2,0	0,5	3,9	3,7	4,5	2,4
Tag 10 (0–12 h)	-	12,8	37,1	18,2	16,9	16,7
Tag 10 (12–24 h)	24,7	10,7	29,0	14,8	8,5	28,3
Tag 10 (Spoturin)	2,0	0,3	1,6	1,7	3,7	2,1

A.13. Cotinin- und CYMA-Ausscheidung (Humanstudie II)

Tabelle 0-107 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	Cotinin [nmol]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	<LOQ	210,3	188,6	<LOQ	9,0	<LOQ	<LOQ
Tag 1 (12–24 h)	<LOQ	56,3	40,0	<LOQ	7,9	3,7	<LOQ
Tag 1 (Spoturin)	<LOQ	10,1	6,8	<LOQ	1,1	0,1	<LOQ
Tag 2 (0–12 h)	<LOQ	36,6	22,1	4,7	3,1	<LOQ	<LOQ
Tag 2 (12–24 h)	<LOQ	47,6	11,1	<LOQ	3,5	3,3	<LOQ
Tag 2 (Spoturin)	<LOQ	3,6	3,1	0,1	1,1	0,3	<LOQ
Tag 3 (0–12 h)	<LOQ	26,7	14,5	<LOQ	5,4	9,0	<LOQ
Tag 3 (12–24 h)	<LOQ	12,0	10,1	<LOQ	2,4	1,8	<LOQ
Tag 3 (Spoturin)	<LOQ	1,5	1,1	<LOQ	0,7	0,4	<LOQ
Tag 4 (0–12 h)	<LOQ	5,4	<LOQ	<LOQ	3,1	1,9	<LOQ
Tag 4 (12–24 h)	<LOQ	4,1	3,4	<LOQ	2,4	2,3	<LOQ
Tag 4 (Spoturin)	<LOQ	1,2	0,3	<LOQ	0,2	0,4	<LOQ
Tag 5 (0–12 h)	<LOQ	10,8	6,4	<LOQ	2,0	<LOQ	<LOQ
Tag 5 (12–24 h)	<LOQ	6,5	1,5	<LOQ	0,7	1,0	<LOQ
Tag 5 (Spoturin)	<LOQ	0,5	0,5	<LOQ	0,3	0,3	<LOQ
Tag 6 (0–12 h)	<LOQ	8,0	3,3	<LOQ	1,3	<LOQ	<LOQ
Tag 6 (12–24 h)	<LOQ	2,3	3,0	<LOQ	0,5	<LOQ	<LOQ
Tag 6 (Spoturin)	<LOQ	0,4	0,2	<LOQ	0,3	0,2	<LOQ
Tag 7 (0–12 h)	<LOQ	2,0	<LOQ	<LOQ	1,4	<LOQ	<LOQ
Tag 7 (12–24 h)	<LOQ	1,9	1,2	<LOQ	1,5	<LOQ	<LOQ
Tag 7 (Spoturin)	<LOQ	0,4	0,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 8 (0–12 h)	<LOQ	7,7	2,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 8 (12–24 h)	<LOQ	3,6	0,9	<LOQ	0,7	<LOQ	<LOQ
Tag 8 (Spoturin)	<LOQ	0,3	0,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 9 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	1,9	<LOQ	0,5	<LOQ	<LOQ
Tag 9 (12–24 h)	<LOQ	1,7	1,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 9 (Spoturin)	<LOQ	0,3	0,2	<LOQ	0,2	<LOQ	<LOQ
Tag 10 (0–12 h)	<LOQ	2,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 10 (12–24 h)	<LOQ	2,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tag 10 (Spoturin)	<LOQ	0,5	0,2	<LOQ	<LOQ	0,4	<LOQ

LOQ Bestimmungsgrenze

Tabelle 0-108 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	Cotinin [nmol]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	n. q.	26,1	5,1	n. q.	3,7	<LOQ	n. q.
Tag 1 (12–24 h)	n. q.	9,3	<LOQ	n. q.	2,9	0,9	n. q.
Tag 1 (Spoturin)	n. q.	1,8	<LOQ	n. q.	0,2	0,1	n. q.
Tag 2 (0–12 h)	n. q.	10,9	2,0	n. q.	<LOQ	<LOQ	n. q.
Tag 2 (12–24 h)	n. q.	1,6	<LOQ	n. q.	<LOQ	4,6	n. q.
Tag 2 (Spoturin)	n. q.	0,6	<LOQ	n. q.	<LOQ	0,8	n. q.
Tag 3 (0–12 h)	n. q.	3,7	<LOQ	n. q.	<LOQ	7,4	n. q.
Tag 3 (12–24 h)	n. q.	0,6	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,7	n. q.
Tag 3 (Spoturin)	n. q.	0,3	<LOQ	n. q.	<LOQ	0,6	n. q.
Tag 4 (0–12 h)	n. q.	<LOQ	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,0	n. q.
Tag 4 (12–24 h)	n. q.	3,1	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,9	n. q.
Tag 4 (Spoturin)	n. q.	0,2	<LOQ	n. q.	<LOQ	0,3	n. q.
Tag 5 (0–12 h)	n. q.	4,3	2,4	n. q.	<LOQ	0,6	n. q.
Tag 5 (12–24 h)	n. q.	<LOQ	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,1	n. q.
Tag 5 (Spoturin)	n. q.	<LOQ	0,3	n. q.	<LOQ	0,2	n. q.
Tag 6 (0–12 h)	n. q.	4,6	4,9	n. q.	<LOQ	<LOQ	n. q.
Tag 6 (12–24 h)	n. q.	27,3	2,6	n. q.	<LOQ	0,9	n. q.
Tag 6 (Spoturin)	n. q.	3,2	0,5	n. q.	0,8	0,1	n. q.
Tag 7 (0–12 h)	n. q.	21,1	<LOQ	n. q.	<LOQ	0,6	n. q.
Tag 7 (12–24 h)	n. q.	7,3	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,0	n. q.
Tag 7 (Spoturin)	n. q.	1,7	<LOQ	n. q.	0,4	0,1	n. q.
Tag 8 (0–12 h)	n. q.	7,0	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,4	n. q.
Tag 8 (12–24 h)	n. q.	5,6	2,2	n. q.	<LOQ	0,7	n. q.
Tag 8 (Spoturin)	n. q.	0,5	0,5	n. q.	<LOQ	0,2	n. q.
Tag 9 (0–12 h)	n. q.	4,1	<LOQ	n. q.	<LOQ	1,1	n. q.
Tag 9 (12–24 h)	n. q.	2,1	<LOQ	n. q.	<LOQ	0,9	n. q.
Tag 9 (Spoturin)	n. q.	0,2	0,6	n. q.	0,2	0,2	n. q.
Tag 10 (0–12 h)	n. q.	<LOQ	<LOQ	n. q.	<LOQ	-	n. q.
Tag 10 (12–24 h)	n. q.	22,4	<LOQ	n. q.	<LOQ	-	n. q.
Tag 10 (Spoturin)	n. q.	2,2	<LOQ	n. q.	0,2	-	n. q.

LOQ Bestimmungsgrenze

n. q. nicht quantifiziert

Tabelle 0-109 Cotinin-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	Cotinin [nmol]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	128,0	27,4	774,8	n. q.
Tag 1 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	297,3	10,8	461,7	n. q.
Tag 1 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	18,7	0,9	46,1	n. q.
Tag 2 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	187,7	<LOQ	395,6	n. q.
Tag 2 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	65,4	<LOQ	64,0	n. q.
Tag 2 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	18,0	<LOQ	37,7	n. q.
Tag 3 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	103,6	<LOQ	78,7	n. q.
Tag 3 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	70,6	<LOQ	29,1	n. q.
Tag 3 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	16,2	<LOQ	22,4	n. q.
Tag 4 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	297,5	<LOQ	71,5	n. q.
Tag 4 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	211,3	<LOQ	13,6	n. q.
Tag 4 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	13,7	0,2	8,2	n. q.
Tag 5 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	241,0	<LOQ	26,2	n. q.
Tag 5 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	39,9	<LOQ	10,3	n. q.
Tag 5 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	23,3	<LOQ	4,8	n. q.
Tag 6 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	83,9	<LOQ	14,2	n. q.
Tag 6 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	116,1	<LOQ	6,9	n. q.
Tag 6 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	64,8	<LOQ	2,8	n. q.
Tag 7 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	124,0	<LOQ	8,5	n. q.
Tag 7 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	361,9	<LOQ	2,5	n. q.
Tag 7 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	47,8	<LOQ	1,1	n. q.
Tag 8 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	238,8	<LOQ	5,0	n. q.
Tag 8 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	213,7	<LOQ	2,4	n. q.
Tag 8 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	15,1	<LOQ	0,9	n. q.
Tag 9 (0–12 h)	<LOQ	<LOQ	104,4	<LOQ	4,1	n. q.
Tag 9 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	67,8	<LOQ	1,1	n. q.
Tag 9 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	15,2	<LOQ	0,8	n. q.
Tag 10 (0–12 h)	-	<LOQ	436,8	<LOQ	3,8	n. q.
Tag 10 (12–24 h)	<LOQ	<LOQ	94,5	<LOQ	1,3	n. q.
Tag 10 (Spoturin)	<LOQ	<LOQ	19,2	<LOQ	0,4	n. q.

LOQ Bestimmungsgrenze

n. q. nicht quantifiziert

Tabelle 0-110 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	CYMA [nmol]						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Tag 1 (0–12 h)	2,3	7,3	4,5	0,2	0,7	0,2	0,2
Tag 1 (12–24 h)	4,8	3,1	1,4	0,2	1,2	0,7	0,4
Tag 1 (Spoturin)	0,0	0,6	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1
Tag 2 (0–12 h)	0,2	1,6	1,1	0,3	0,4	0,2	0,1
Tag 2 (12–24 h)	0,3	2,6	1,0	0,2	0,7	1,0	0,2
Tag 2 (Spoturin)	0,0	0,3	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0
Tag 3 (0–12 h)	0,1	2,6	1,2	0,2	0,6	0,6	0,2
Tag 3 (12–24 h)	0,3	2,8	1,4	0,3	0,7	0,3	0,2
Tag 3 (Spoturin)	0,0	0,4	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
Tag 4 (0–12 h)	0,1	2,1	1,3	0,2	0,8	0,3	0,2
Tag 4 (12–24 h)	0,2	2,2	1,4	0,3	0,9	0,4	0,2
Tag 4 (Spoturin)	0,0	0,5	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
Tag 5 (0–12 h)	0,2	2,0	1,1	0,2	1,1	0,3	0,1
Tag 5 (12–24 h)	0,2	2,6	0,7	0,1	0,4	0,3	0,3
Tag 5 (Spoturin)	0,1	0,3	0,2	0,0	0,2	0,1	0,0
Tag 6 (0–12 h)	0,1	2,4	1,0	0,6	0,9	0,4	0,2
Tag 6 (12–24 h)	0,5	2,5	0,9	0,3	0,4	0,3	0,4
Tag 6 (Spoturin)	0,0	0,3	0,1	0,0	0,3	0,1	0,0
Tag 7 (0–12 h)	0,1	2,3	1,1	0,2	1,0	0,2	0,1
Tag 7 (12–24 h)	0,2	1,8	0,8	0,2	0,8	0,2	0,1
Tag 7 (Spoturin)	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0
Tag 8 (0–12 h)	0,1	2,1	0,9	0,2	0,7	0,2	0,1
Tag 8 (12–24 h)	0,2	2,1	0,5	0,2	0,4	0,2	0,2
Tag 8 (Spoturin)	0,0	0,2	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0
Tag 9 (0–12 h)	0,1	1,6	1,0	0,2	0,3	0,2	0,1
Tag 9 (12–24 h)	0,2	1,0	0,9	0,1	0,9	0,3	0,2
Tag 9 (Spoturin)	0,0	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
Tag 10 (0–12 h)	0,2	1,7	0,6	0,2	0,8	0,2	0,1
Tag 10 (12–24 h)	0,2	2,0	0,9	0,3	0,6	1,0	0,1
Tag 10 (Spoturin)	0,0	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0

Tabelle 0-111 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	CYMA [nmol]						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Tag 1 (0–12 h)	n. q.	0,5	0,3	n. q.	0,4	0,3	n. q.
Tag 1 (12–24 h)	n. q.	0,5	0,4	n. q.	0,2	0,4	n. q.
Tag 1 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,1	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 2 (0–12 h)	n. q.	0,3	0,4	n. q.	0,3	0,4	n. q.
Tag 2 (12–24 h)	n. q.	0,2	0,3	n. q.	0,1	1,1	n. q.
Tag 2 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,0	n. q.	0,0	0,2	n. q.
Tag 3 (0–12 h)	n. q.	0,4	0,3	n. q.	0,2	0,8	n. q.
Tag 3 (12–24 h)	n. q.	0,1	0,1	n. q.	0,1	0,4	n. q.
Tag 3 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,0	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 4 (0–12 h)	n. q.	0,4	0,1	n. q.	0,2	0,2	n. q.
Tag 4 (12–24 h)	n. q.	0,2	0,7	n. q.	0,2	0,5	n. q.
Tag 4 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,0	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 5 (0–12 h)	n. q.	0,3	0,6	n. q.	0,2	0,2	n. q.
Tag 5 (12–24 h)	n. q.	0,4	1,0	n. q.	0,1	0,4	n. q.
Tag 5 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,1	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 6 (0–12 h)	n. q.	0,1	0,7	n. q.	0,1	0,2	n. q.
Tag 6 (12–24 h)	n. q.	3,9	0,6	n. q.	0,1	0,4	n. q.
Tag 6 (Spoturin)	n. q.	0,4	0,2	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 7 (0–12 h)	n. q.	2,4	0,5	n. q.	0,1	0,3	n. q.
Tag 7 (12–24 h)	n. q.	0,8	0,4	n. q.	0,1	0,3	n. q.
Tag 7 (Spoturin)	n. q.	0,2	0,0	n. q.	0,0	0,0	n. q.
Tag 8 (0–12 h)	n. q.	0,3	0,5	n. q.	0,2	0,4	n. q.
Tag 8 (12–24 h)	n. q.	0,2	0,5	n. q.	0,2	0,2	n. q.
Tag 8 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,0	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 9 (0–12 h)	n. q.	0,3	0,4	n. q.	0,2	0,4	n. q.
Tag 9 (12–24 h)	n. q.	0,4	0,2	n. q.	0,2	0,3	n. q.
Tag 9 (Spoturin)	n. q.	0,0	0,0	n. q.	0,0	0,1	n. q.
Tag 10 (0–12 h)	n. q.	0,3	0,2	n. q.	0,1	-	n. q.
Tag 10 (12–24 h)	n. q.	0,6	0,3	n. q.	0,2	-	n. q.
Tag 10 (Spoturin)	n. q.	0,1	0,0	n. q.	0,1	-	n. q.

n. q. nicht quantifiziert

Tabelle 0-112 CYMA-Gehalte der einzelnen Urinproben der Humanstudie II.

Urinprobe	CYMA [nmol]					
	P15	P16	P17	P18	P19	P20
Tag 1 (0–12 h)	0,3	0,4	7,8	1,0	6,1	n. q.
Tag 1 (12–24 h)	0,4	0,2	13,9	0,2	3,9	n. q.
Tag 1 (Spoturin)	0,0	0,0	1,2	0,0	0,5	n. q.
Tag 2 (0–12 h)	0,5	0,3	4,7	0,2	3,3	n. q.
Tag 2 (12–24 h)	0,3	0,3	24,3	0,2	1,7	n. q.
Tag 2 (Spoturin)	0,0	0,0	2,8	0,1	1,1	n. q.
Tag 3 (0–12 h)	0,3	0,1	18,7	0,2	2,7	n. q.
Tag 3 (12–24 h)	0,2	0,1	34,8	0,1	1,4	n. q.
Tag 3 (Spoturin)	0,0	0,0	3,7	0,0	1,1	n. q.
Tag 4 (0–12 h)	0,4	0,2	7,2	0,3	3,4	n. q.
Tag 4 (12–24 h)	0,3	0,2	10,9	0,3	1,2	n. q.
Tag 4 (Spoturin)	0,0	0,0	1,5	0,1	0,7	n. q.
Tag 5 (0–12 h)	0,2	0,2	4,0	0,6	2,6	n. q.
Tag 5 (12–24 h)	0,4	0,1	32,8	0,3	1,7	n. q.
Tag 5 (Spoturin)	0,0	0,0	5,5	0,0	0,7	n. q.
Tag 6 (0–12 h)	0,4	0,1	14,9	0,2	2,8	n. q.
Tag 6 (12–24 h)	0,3	0,1	33,7	0,3	1,9	n. q.
Tag 6 (Spoturin)	0,0	0,0	9,2	0,0	0,6	n. q.
Tag 7 (0–12 h)	0,3	0,2	18,5	0,2	2,4	n. q.
Tag 7 (12–24 h)	0,3	0,2	45,5	0,2	0,9	n. q.
Tag 7 (Spoturin)	0,0	0,0	7,1	0,0	0,6	n. q.
Tag 8 (0–12 h)	0,3	0,1	18,3	0,2	2,2	n. q.
Tag 8 (12–24 h)	0,1	0,5	24,6	0,1	1,9	n. q.
Tag 8 (Spoturin)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,7	n. q.
Tag 9 (0–12 h)	0,2	0,2	5,0	0,3	3,5	n. q.
Tag 9 (12–24 h)	0,2	0,2	23,7	0,2	0,9	n. q.
Tag 9 (Spoturin)	0,0	0,0	3,1	0,1	0,6	n. q.
Tag 10 (0–12 h)	-	0,2	10,8	0,3	2,6	n. q.
Tag 10 (12–24 h)	0,2	0,4	35,4	0,3	1,0	n. q.
Tag 10 (Spoturin)	0,0	0,0	1,1	0,0	0,4	n. q.

n. q. nicht quantifiziert

LEBENS LAUF

Akademische Ausbildung

- 04/2015–07/2018 **Doktorandin**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
- 09/2009–03/2015 **Studium der Lebensmittelchemie**
Technische Universität Kaiserslautern
Abschluss: 1. Staatsprüfung/Diplom
- 10/2014–03/2015 **Wissenschaftliche Abschlussarbeit**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
„Synthese und HPLC-MS/MS-Analytik von Metaboliten des Furans zur Etablierung einer Quantifizierungsmethode in Humanurin“
- 01/2012–04/2012 **Forschungsarbeit**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe JunProf. Dr. Melanie Esselen
„DNA-Bindevermögen ausgewählter Phenylpropanoide“

PUBLIKATIONEN

Journalbeiträge (*peer-reviewed*)

M. Ruenz, K. Goerke, T. Bakuradze, K. Abraham, A. Lampen, G. Eisenbrand, E. Richling "Sustained human background exposure to acrolein evidenced by monitoring urinary exposure biomarkers", *Mol. Nutr. Food Res.* 2019, 63(24). doi.org/10.1002/mnfr.201900849.

K. Goerke, M. Ruenz, A. Lampen, K. Abraham, T. Bakuradze, G. Eisenbrand, E. Richling "Biomonitoring of nutritional acrylamide intake by consumers without dietary preferences as compared to vegans", *Arch. Toxicol.* 2019, 93:987. doi.org/10.1007/s00204-019-02412-x.

J. I. Kremer, K. Gömpel (Goerke), T. Bakuradze, G. Eisenbrand, E. Richling "Urinary Excretion of Niacin Metabolites in Humans After Coffee Consumption", *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 62, 1700735. doi:10.1002/mnfr.201700735.

K. Goempel (Goerke), L. Tedsen, M. Ruenz, T. Bakuradze, D. Schipp, J. Galan, G. Eisenbrand, E. Richling "Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background", *Arch. Toxicol.* 2017, 91:3551. doi.org/10.1007/s00204-017-1990-1.

Wissenschaftliche Vorträge

K. Gömpel (Goerke), T. Bakuradze, G. Eisenbrand, E. Richling „Urinary background excretion of acrylamide biomarkers“ beim 3rd German Pharm-Tox Summit, 06.–09. März 2018, Göttingen.

K. Gömpel (Goerke) „Biomarker monitoring of dietary acrylamide exposure under controlled and free living conditions“, 3. Promovierendenseminar, 13. September 2017, Fachbereich Chemie, Technische Universität Kaiserslautern.

Poster

J. Kremer, S. Pickard, L. Stadlmair, A. Glaß-Theis, L. Buckel, K. Gömpel (Goerke), T. Bakuradze, G. Eisenbrand, E. Richling „Untersuchung zur Ausscheidung von Metaboliten der Alkylpyrazine nach Kaffeekonsum“, 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 25.–27. September 2017, Würzburg.

K. Gömpel (Goerke), M. Rünz, T. Bakuradze, G. Eisenbrand, E. Richling „The application of stable isotope labelling to investigate the metabolism of acrylamide in humans via HPLC-ESI-MS/MS“, 116th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry, 25.–27. Mai 2017, Kaiserslautern.

J. Kremer, K. Gömpel (Goerke), G. Eisenbrand, E. Richling "Dosimetry of human exposure to Furan by monitoring urinary exposure biomarkers", 2nd German Pharm-Tox Summit, 06.–09. März 2017, Heidelberg.

K. Gömpel (Goerke), M. Rünz, C. Friedland, T. Bakuradze, G. Eisenbrand, A. Lampen, K. Abraham, E. Richling "Alimentäre Acrylamid-Aufnahme und renale Mercaptursäure-Ausscheidung – ein Vergleich zwischen Veganern und Gemischtköstlern", 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.–14. September 2016, Freising.

PERSÖNLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Katharina Goerke geb. Gömpel, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Exogene und endogene Einflussfaktoren auf die Bildung von Acrylamid-Expositionsbiomarkern“ selbstständig verfasst und die für diese Arbeit verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Bestandteile dieser Arbeit wurden bereits auf Tagungen und in Printmedien veröffentlicht (siehe Publikationen). Die vorliegende Dissertation wurde von mir weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet.

Worms, den 04.10.2021

Katharina Goerke