

**Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universität zu Köln  
Kommissarischer Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. S. Herzig**

**Untersuchungen zur Toxikokinetik von Acrylamid  
und seiner Metabolite N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein und  
N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)cystein  
nach oraler Aufnahme acrylamidhaltiger Nahrung**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von  
Panagiota Pournara  
aus Larisa/Griechenland**

**Promoviert am 21. April 2010**

Gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln 2010

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter  
 1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. U. Fuhr  
 2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. M. A. Rothschild


### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der hier angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Köln, den 30.10.2009

Panagiota Pournara

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Universitätsprofessor Dr. med. U. Fuhr und von mir selbst durchgeführt worden.

Teile der Messungen zur Urindetektion von GAMA und AAMA sind von Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung (IBMP) in Nürnberg-Heroldsberg (Leitung: Prof. Dr. med. F. Sörgel) sowie den Mitarbeitern des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin (IPASUM) in Erlangen (Leitung: Prof. Dr. med. H. Drexler) durchgeführt worden.

## **Danksagung**

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Uwe Fuhr danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die jederzeit großzügige Förderung der vorliegenden Dissertation und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung der Arbeit sowie vor allem für die ständige Bereitschaft, sich Problemen und Fragen, nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit, anzunehmen.

Bei Herrn Dr. med. Alexander Jetter bedanke ich mich vor allem für die Einführung in die Auswertung klinischer Studien und für Fragen zum Studienablauf und deren Durchführung.

Bei Frau Dr. rer. nat. Stefanie Harlfinger bedanke ich mich für ihre tatkräftige und hervorragende praktische sowie theoretische Hilfe bei der Anfertigung des Versuchsaufbaus und bei der Durchführung der LC-MS/MS Messungen.

Herrn Dr. med. Andreas Lazar danke ich für seine Unterstützung während der Studie und Herrn Privatdozent Dr. rer. medic. Dirk Taubert danke ich für seine Bereitstellung von Reaktionsgleichungen im Strukturformeleditor ISIS/Draw zwecks grafischer Aufbereitung.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung (IBMP) in Nürnberg-Heroldsberg (Leitung: Prof. Dr. med. F. Sörgel) sowie den Mitarbeitern des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin (IPASUM) in Erlangen (Leitung: Prof. Dr. med. H. Drexler) bedanke ich mich ganz herzlich für die durchgeführten Messungen von AAMA und GAMA, die einen Teil dieser Arbeit darstellen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Acrylamid .....	1
1.2 Entstehung von Acrylamid in der Nahrung .....	3
1.3 Acrylamid in verschiedenen Nahrungsmitteln.....	7
1.4 Metabolismus und Toxikokinetik .....	9
1.5 Problemstellung .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry).....	15
2.1.1 Herstellung acrylamidhaltiger Nahrung (Studienchips) .....	16
2.1.1.1 Probenaufarbeitung .....	16
2.1.1.2 Extraktion .....	18
2.1.1.3 Ultrazentrifugation .....	18
2.1.2 LC-MS/MS Methodenentwicklung .....	19
2.1.3 Messung des Acrylamidgehaltes in Studienchips .....	21
2.2 Klinische Studie .....	23
2.2.1 Studiendesign.....	24
2.2.2 Probanden .....	24
2.2.2.1 Probandenauswahl.....	25
2.2.3 Mögliche unerwünschte Ereignisse und Risiken.....	28
2.3 Studiendurchführung.....	29
2.3.1 Studienablauf .....	29
2.3.2 Probennahme .....	32
2.3.3 Bearbeitung und Handhabung der Urin- und Blutproben .....	32
2.3.4 Dokumentation .....	33
2.3.5. Analytik der Urinproben.....	34
2.3.5.1 Konzentrationsmessungen von Acrylamid und Glycidamid.....	34
2.3.5.2 Konzentrationsmessungen von AAMA und GAMA .....	36
2.3.6. Auswertung.....	40
2.3.6.1 Pharmakokinetische Parameter und Kurvenanpassungen.....	40
2.3.6.2 Deskriptive Statistik .....	45

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1 Bestimmung des Acrylamidgehaltes in Studienchips.....	47
3.1.1 Konzentrations- und Mengenbestimmungen.....	47
3.1.2 Individuelle Aufnahmedosis von Acrylamid .....	48
3.2 Individuelle Ausscheidungen von Acrylamid und seiner Metabolite.....	49
3.2.1 Nachweis von Acrylamid im Urin.....	49
3.2.1.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung .....	49
3.2.1.2 Kinetik der Acrylamid-Elimination .....	52
3.2.1.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung .....	53
3.2.2 Nachweis von AAMA im Urin.....	58
3.2.2.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung .....	58
3.2.2.2 Kinetik der AAMA-Elimination .....	61
3.2.2.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung.....	62
3.2.3 Nachweis von GAMA im Urin.....	65
3.2.3.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung .....	65
3.2.3.2 Kinetik der GAMA-Elimination .....	68
3.2.3.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung.....	69
3.3 Vergleichende Analyse zwischen Acrylamid, AAMA und GAMA.....	72
3.3.1 Individuelles Ausscheidungsverhältnis zwischen AAMA und GAMA .....	72
3.3.2 Zeitgang der mittleren Stoffmengenveränderungen .....	73
3.3.3 Bestimmung der mittleren Exkretionsraten.....	74
3.3.4 Kurvenanpassungen der mittleren kumulativen fraktionellen Ausscheidung .....	76
3.3.5 Gesamtstatistik.....	78
3.3.5.1 Vergleich der toxikokinetischen Parameter .....	79
3.3.5.2 Abhängigkeit der Ausscheidungsraten vom Uringewicht.....	81
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>85</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Veröffentlichungen.....</b>	<b>113</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>114</b>

## **Abkürzungsverzeichnis:**

AA	Acrylamid
AAMA	N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein
AAVal-Hb	N-2-carbomoyl-ethylvaline (Acrylamid-Hämoglobin Addukt)
Ae	Amount excreted (ausgeschiedene Menge)
AMG	Arzneimittelgesetz
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AU	Arbitrary Units
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BGBL	Bundesgesetzblatt
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
CPMP	Consolidated Plan Management Process
CYP	Cytochrom P450
EEC	European Economic Community
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
ESI	Elektro-Spray Ionisation
FDA	Food and Drug Administration
GA	Glycidamid
GAMA	N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)cystein
GAVal-Hb	N-(R,S)-2-hydroxy-2-carbomoyl-ethylvaline (Glycidamid-Hämoglobin Addukt)
GCP	Good Clinical Practice
GMP	Good Manufacturing Practice (Gute Herstellungspraxis)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBMP	Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung
i.p.	intraperitoneal
IPASUM	Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KPH	Klinische Pharmakologie (Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Mass-Spectrometry/Mass-Spectrometry
LOD	Limit of Detection
ppm	Parts Per Million
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SOP	Standard Operating Procedures

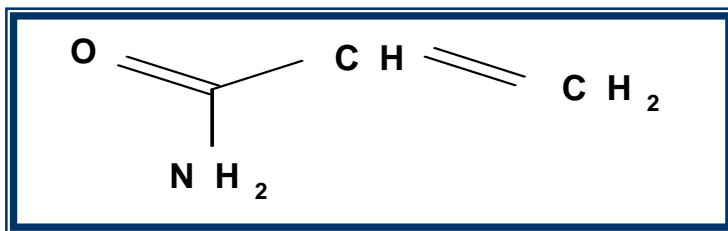


# 1. Einleitung

Der Nachweis hoher Acrylamidkonzentrationen in gebackenen und frittierten Nahrungsmitteln hat in jüngster Zeit weltweit Besorgnis ausgelöst. Acrylamid hat sich im Tierversuch bei Nagetieren als krebserregend erwiesen und wurde deshalb von der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen“ eingestuft (IARC, 1993). Bisher ergaben sich jedoch aus epidemiologischen Studien keine eindeutigen Hinweise auf eine Steigerung des Kanzerogenitäts- oder Mutagenitätsrisikos für den Menschen durch Acrylamid (Marsh et al., 1999; Mucci et al., 2003). Da jeder Mensch mit der Nahrung pro Tag etwa 40 bis 70 µg Acrylamid aufnimmt (Livsmedelsverket, 2002), ist es wegen des nicht auszuschließenden Krebsrisikos von entscheidender Bedeutung, die Aufnahme, Verstoffwechslung und Ausscheidung von Acrylamid beim Menschen näher zu untersuchen.

## 1.1 Acrylamid

Acrylamid (AA) ist in seiner Reinform eine farblose kristalline Substanz mit der Summenformel  $C_3H_5NO$ . Nach den IUPAC-Regeln wird Acrylamid systematisch als 2-Propenamid benannt (Abb. 1).



**Abb. 1:** Strukturformel von Acrylamid  $C_3H_5NO$  (2-Propenamid).

Acrylamid besitzt folgende Eigenschaften:

- es ist gut wasserlöslich (Friedman, 2003)
- es besitzt eine hohe Affinität zu Hämoglobin (Bergmark et al., 1991; 1993)
- es weist ein genotoxisches Potential durch DNA-Adduktion auf (Baum et al., 2005)
- es wird im Tiermodell durch *Cytochrom P-450 2E1* in sein Epoxy-Derivat Glycidamid metabolisiert (Ghanayem et al., 2005; Settels et al., 2008)
- es wird im Urin sowohl unverändert als auch in Form verschiedener Metabolite ausgeschieden (Boettcher et al., 2006a; Bjellaas et al., 2007)

Anhand seiner chemischen Struktur kann Acrylamid den organischen Verbindungen der Amide zugeordnet werden, zumal es mindestens eine Aminogruppe besitzt und aus der Hydrolyse von Nitrilen entsteht (CONH<sub>2</sub>-Gruppe). Die Doppelbindungen (Vinylgruppe) und die Aminogruppe verleihen Acrylamid seine Reaktivität und stellen die reaktiven Zentren dar, die bei der Reaktion mit anderen Substanzen umgesetzt werden. An der Aminogruppe können Hydratisierung, Dehydrierung und Alkoholyse stattfinden.

Neben seiner industriellen Nutzbarkeit nimmt Acrylamid eine wichtige Stellung in der Lebensmittelchemie ein, weil in der letzten Zeit hohe Acrylamidmengen in verschiedenen gebackenen und frittierten Nahrungsmitteln entdeckt wurden (*Friedman, 2003; Mucci et al., 2008*).

Acrylamid entsteht in freier Form während der Aufbereitung und Erhitzung von Nahrungskomponenten (*Mottram et al., 2002*). Neben seines neurotoxischen Charakters (*Miller und Spencer, 1985*) wurde auch die kanzerogene Wirkung im Rattenmodell erkannt, so dass der Verzehr acrylamidhaltiger Lebensmittel auch ein potentiell gesundheitliches Risiko für den Menschen darstellen kann (*Bull et al., 1984*). Weiterhin liegt eine signifikante Korrelation zwischen Brustkrebsrisiko und der Konzentration von Hämoglobinaddukten vor (*Olesen et al., 2008*). Dieser Befund aus der kontrollierten Fallstudie bekräftigt das von der IARC formulierte Kanzerogenitätsrisiko für den Menschen.

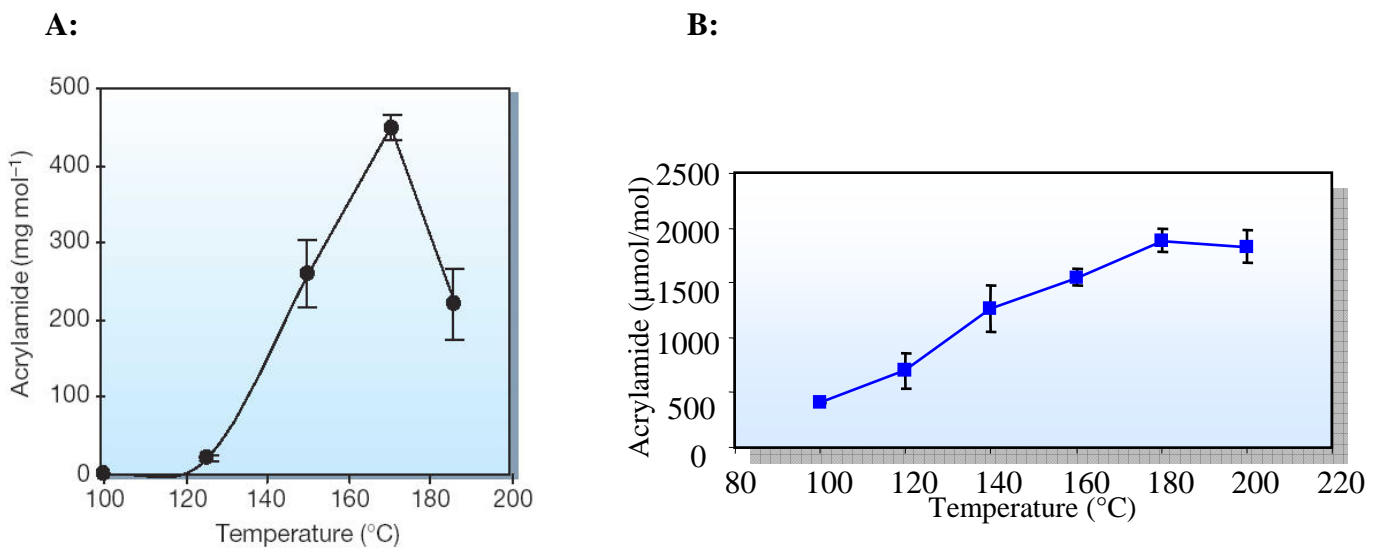
Damit die Gefährdung einer in der Nahrung vorkommenden Substanz für den Menschen bewertet werden kann, muss deren toxisches Potential ermittelt werden. Dies geschieht häufig durch Versuche an Nagetieren (oder anderen Tiermodellen) aber auch mittels *in vitro* Methoden. Das geeignete Beurteilungskonzept zeichnet sich durch eine Kombination von *in-vivo* Daten und *in-vitro* Untersuchungen bei Tieren und Menschen aus. Zur Identifizierung des möglichen Gefahrenpotentials werden solche Daten verwendet, die aus tierexperimentellen oder epidemiologischen Studien stammen, damit sowohl das gesundheitliche Risiko beim Menschen als auch das Dosis-Wirkungsverhältnis bestimmt werden können (*Renwick et al., 2003*). Die Gefährlichkeit eines Stoffes für den Menschen wird durch das Zusammenwirken von zwei Parametern charakterisiert: die Konzentration und seine Aufnahmemenge durch den Menschen (Exposition) entscheiden darüber, ob gesundheitliche Folgen auftreten können oder nicht (*Schlatter, 2002*). Hinweise auf eine mögliche kanzerogene Wirkung von Stoffen in Lebensmitteln ergeben sich zumeist aus tierexperimentellen Untersuchungen. Für Acrylamid wurden solche experimentellen Versuche bereits zahlreich durchgeführt und können als erste Anhaltspunkte zur Risikobeurteilung seines toxischen Einflusses auf den Menschen betrachtet werden.

Im Laufe einer zweijährigen Untersuchung der Krebsinzidenz bei Ratten wurde Acrylamid in verschiedenen Dosen von 0 (Kontrolle), 0,01, 0,1, 0,5 und 2,0 mg/kg/Tag mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Anzahl der Gehirn- und Magentumoren sowie Tumorbildungen in Schilddrüse, Brust und Hoden stiegen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei höheren Acrylamid-Dosen signifikant an. Der erste Effekt wurde bei 0,5 mg/kg/Tag beobachtet und entspricht unter Verwendung des Trans-Spezies-Konversionsfaktors von 7,05 einer Acrylamid-Dosis von 0,076 mg/kg/Tag beim Menschen (*Tyla et al., 2000; Johnson et al., 1986; Dearfield et al., 1995*). Aus der Extrapolation für diese tägliche Dosis ergibt sich für den Menschen ein Krebsrisiko in der Größenordnung von  $10^{-3}$  (*Rice, 2005; Dybing und Sanner, 2003*), welcher nur als vorläufiger Wert gelten kann und durch die aktuelle Studienlage zu epidemiologischen Daten nicht abgesichert ist.

## **1.2 Entstehung von Acrylamid in der Nahrung**

Die schwedische Behörde für Lebensmittelsicherheit (Swedish National Food Administration, NFA) hat durch den Nachweis von Acrylamid in Nahrungsmitteln im April 2002 auf ein bislang unbekanntes und vor allem nicht in der Öffentlichkeit diskutiertes Gesundheitsrisiko aufmerksam gemacht. Mit einer neuen Analysemethode wurden unterschiedlich hohe Mengen von Acrylamid in Lebensmitteln nachgewiesen. Als Folge dieser Ergebnisse konnte die schon länger andauernde Diskussion über die Toxizität von Acrylamid und die Empfehlungen zur Vermeidung von Acrylamid in Nahrungsmitteln weiter voran getrieben werden. Dies führte europa- und weltweit dazu, dass auch andere Lebensmittelbehörden Untersuchungen durchgeführt haben, die diese Befunde bestätigen konnten (*Svensson et al., 2003*), wie z.B. in Großbritannien (*British Food Standard Agency; [www.food-standards.gov.uk](http://www.food-standards.gov.uk)*), in Norwegen (*[www.snt.no](http://www.snt.no)*), in der Schweiz (*Swiss Federal Office of Public Health, 2002*), in Deutschland (*[www.bfr.bund.de](http://www.bfr.bund.de)*) und in den USA (*[www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)*). Einige Monate später wurde gezeigt, dass Acrylamid als ein Produkt aus der Maillard-Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierten Zuckern hervorgeht (*Mottram et al., 2002; Stadler et al., 2002*). Dabei handelt es sich um einen nicht-enzymatischen Prozess, in dessen Verlauf Zucker mit Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen zu heterozyklischen Endprodukten reagieren. Die Maillard Reaktion trägt zur Bildung von Aromastoffen und braunen Pigmenten in gebackenen, gebratenen und gerösteten Lebensmitteln bei. Asparagin ist eine hauptsächlich in Kartoffeln und Getreide enthaltene Aminosäure, die eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Acrylamid spielt (*Mottram et al., 2002*), weil große Mengen von Acrylamid

in Höhe von 221 mg/(mol Aminosäure) während der Reaktion einer äquimolaren Mischung aus Asparagin und Glukose bei einer Temperatur von 185°C unter Einwirkung von Phosphatpuffer im verschlossenen Glasrohr gemessen werden konnten (Abb. 2A). Die Festphasen Reaktion einer äquimolaren Mischung aus Asparagin und Glukose bei steigenden Temperaturen führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Abb. 2B). Für alle anderen, unter den gleichen Reaktionsbedingungen getesteten bekannten Aminosäuren wurde in jeweils getrennten Experimenten eine vergleichsweise deutlich niedrigere Ausbeute von Acrylamid festgestellt, so dass Asparagin die Acrylamid-Entstehung dominiert (Tab. 1).



**Abb. 2:** Temperaturabhängige Acrylamidbildung. **A:** Verlauf der Acrylamidbildung bei der Reaktion von 0,1 mmol Asparagin und 0,1 mmol D-Glukose nach Inkubation für 20 min unter Einwirkung von Phosphatpuffer (pH-Wert 5,5). **B:** Verlauf der Acrylamidbildung während einer Festphasenreaktion von 0,2 mmol Asparagin und 0,2 mmol D-Glukose nach Temperatureinwirkung von 30 min (Nestle, Research Center, 2002).

**Tab. 1:** Acrylamidbildung durch Zucker-Aminosäure-Systeme

Aminosäure/ Zucker	Asparagin (Asn) [μmol/mol]	Glutamin (Gln) [μmol/mol]	Methionin (Met) [μmol/mol]	Cystein (Cys) [μmol/mol]
D-Fructose	1134 ± 119	20,3 ± 0,8	11,1 ± 1,9	4,4 ± 0,5
D-Galactose	559 ± 140	12,6 ± 0,9	9,8 ± 1,2	3,1 ± 1,7
D-Glucose	1305 ± 323	14,0 ± 2,7	8,1 ± 1,5	n.b.
Lactose	88 ± 11	13,5 ± 2,1	10,4 ± 2,7	4,7 ± 0,4
Saccharose	1518 ± 114	11,9 ± 1,3	5,9 ± 1,3	3,5 ± 1,9

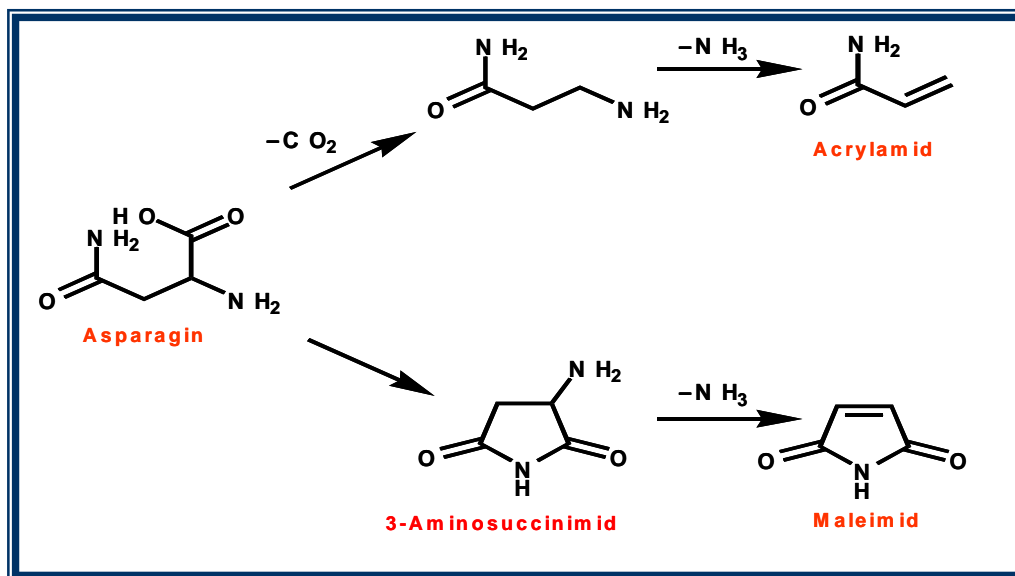
Co-Pyrolyse von Aminosäuren und ausgewählten Kohlenhydraten bei 180°C für 20 Minuten<sup>1</sup> (Ausbeute von Acrylamid in μmol pro mol Reaktant). Analyse von Acrylamid mittels LC-MS/MS, wobei der Übergang *m/z* 72>27 für die Quantifizierung benutzt wurde. Alle Zahlen sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten. n.b.: nicht bestimmbar, unterhalb der Bestimmungsgrenze. <sup>1</sup> jeweils 0,2 mmol von den Reaktanten (aus: Nestle, Research Center, 2002; Stadler et al., Nature, 2002).

Asparagin kann auch in Abwesenheit von reduzierten Zuckern (Glukose) durch Decarboxylierung und nachfolgender Desaminierung des Zwischenproduktes zu Acrylamid umgesetzt werden (Abb. 3), obwohl noch ein Nebenweg zur Bildung von Maleimid besteht (Stadler et al., 2002; Yalayan et al., 2003). Bei Anwesenheit von reduzierten Zuckern folgt aus der Reaktion mit Asparagin die Bildung einer „Schiffschen Base“, die als Zwischenprodukt durch die Entstehung eines Amadori-Produktes und Oxazolidin-5-on stabilisierend wirkt (Yalayan et al., 2003). Im weiteren Reaktionsablauf ermöglicht nur das decarboxylierte Amadori-Produkt die Bildung von Acrylamid. Wenn dies nicht der Fall ist, erfolgt die Umsetzung des Succinimid-Amadori-Produktes in Succinimid (Abb. 4). Dies deutet daraufhin, dass ein bestimmter Faktor die Reaktion beeinflusst, so dass entweder die Bildung von Acrylamid oder Succinimid begünstigt wird.

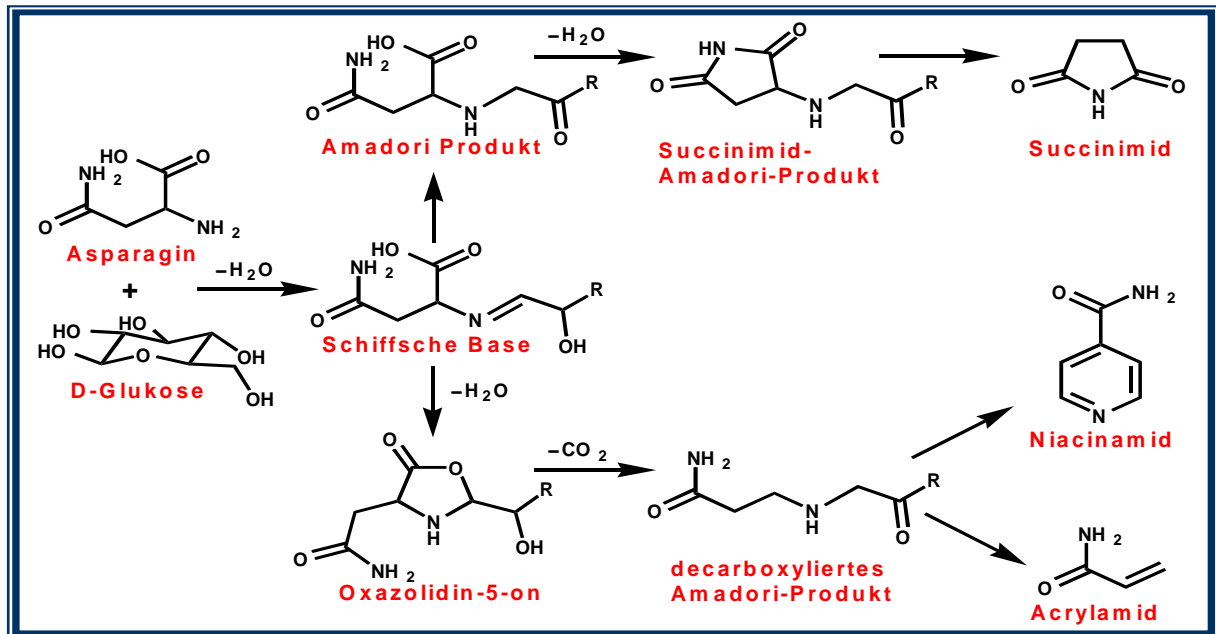
Die Bildung von Acrylamid verstärkt sich vor allem unter Einwirkung höherer Temperaturen, so dass die Acrylamidkonzentration in Nahrungsmitteln durch Vermeiden solcher Temperaturen reduziert werden kann (Yalayan et al., 2003). Bis jetzt publizierte Daten geben für den Frittierprozess oder das Rösten eine Grenztemperatur von  $>120^{\circ}$  C an, ab der Acrylamid in der Nahrung in signifikanten Mengen entsteht: nach Analyse zweier verschiedener kohlenhydrathaltiger Proben lag das detektierte Acrylamid vor Erhitzung mit einem Gehalt von  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  unter der Bestimmungsgrenze, während nach Erhitzung überhalb der Grenztemperatur ein deutlicher Anstieg des Acrylamidgehaltes auf  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden wurde (Tareke et al., 2000; Tareke et al., 2002).

In weiteren Versuchen stellte sich deutlich heraus, dass frittierte Kartoffeln unter hohen Temperaturen einen sehr hohen Acrylamidgehalt aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnte eine entsprechende Acrylamidmenge in nativen oder gekochten Nahrungsmitteln nicht quantifiziert werden (Svensson et al., 2003). Kartoffeln zeichnen sich nicht nur durch einen hohen Kohlenhydratanteil, sondern ebenfalls durch hohe Asparaginkonzentrationen aus, woraus sich die gesteigerten Acrylamidmengen nach Erhitzung überhalb der Grenztemperatur erklären. Damit geht die Bildung von Acrylamid primär von Asparagin aus (Becalski et al., 2003). Zur Bestimmung der Acrylamidkonzentrationen in den verschiedenen Nahrungsmitteln wurden auch andere Verfahren eingesetzt. Öl, welches längere Zeit zum Frittieren genutzt wurde und mit Schwefelstoffen oder verbrannten Partikeln kontaminiert war, enthielt nachweislich kein Acrylamid. Speiseöle wurden zusätzlich auf die Bildung des starken Umweltgiftes Acrolein (2-Propenal, Aldehyd der 2-Propensäure) untersucht. Aus den Ergebnissen folgte, dass sich Acrolein mit aus Fetten gebildetem Wasserdampf verflüchtigt und auf diesem Weg nicht mehr als Reaktionspartner für die Entstehung von Acrylamid in

frittierten Lebensmitteln zur Verfügung steht (Becalski et al., 2003). Außerdem besteht eine Korrelation zwischen den Konzentrationsschwankungen von Acrylamid und dem Wassergehalt in den Lebensmitteln, weil vor allem in Produkten, bei denen der Wassergehalt temperaturbedingt weitestgehend reduziert war, besonders hohe Acrylamidwerte beobachtet wurden (amtliche Mitteilung, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 2002). In getrockneten Kartoffeln waren nach Erhitzen für 1 Stunde überhalb der Grenztemperatur von 120°C ohne Zugabe von Öl Acrylamidgehalte von 20-30 ppm nachweisbar. Beim Vergleich der Reaktion zwischen Asparagin und Glukose in Wasser (175°C, 10 min) und dem Ablauf unter „trockenen“ Bedingungen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied feststellen, da die Acrylamidproduktion in beiden Fällen 1,35 nmol/μmol betrug (Becalski et al., 2003). Weitere Ergebnisse belegen, dass der **Bräunungsgrad** von gebackenen, frittierten, gebratenen oder gerösteten Nahrungsmitteln **keinen Anhaltspunkt** für den Acrylamidgehalt bietet. Vielmehr ist die **Art der Zubereitung** wichtig, weil z.B. gebratene Kartoffeln höhere Acrylamidwerte als frittierte Kartoffeln aufweisen (Ahn et al., 2002).



**Abb. 3:** Reaktionsschema zur Beschreibung der Abbauwege von Asparagin. Im ersten Reaktionsweg (oben) führt eine Decarboxylierung von Asparagin zu einem Zwischenprodukt, aus dessen Desaminierung letztlich Acrylamid entsteht. Der zweite Reaktionsweg (unten) zeichnet sich durch eine Zyklisation aus, so dass sich 3-Aminosuccinimid bildet. Aus der nachfolgenden Desaminierung folgt das Endprodukt Maleimid (Yalayan et al., 2003).



**Abb. 4:** Mechanismus der Bildung von Acrylamid aus primären Aminen und reduzierten Zuckern. Bei der Reaktion primärer Amine wie Asparagin mit Aldehyden (Zucker: Aldosen, hier D-Glukose) und Ketonen (Zucker: Ketosen) laufen folgende Vorgänge ab: Das Amin greift aufgrund seines nukleophilen Charakters das Carbonyl-C-Atom an und bildet ein Zwischenprodukt (Zwitter-Ion), das formal durch Verschiebung eines Protons vom N- zum O-Atom in das eigentliche Additionsprodukt übergeht. Dieses ist nicht stabil, sondern eliminiert unter Säurekatalyse leicht Wasser. Das Kondensationsprodukt heißt allgemein „Schiffsche Base“. Ein zweites Tautomer steht mit der zunächst gebildeten Schiffschen Base im Gleichgewicht. Abhängig davon, welches der Tautomere hydrolysiert bzw. decarboxyliert wird, erhält man zwei verschiedene Reaktionsprodukte, das Succinimid-Amadori-Produkt bzw. das decarboxylierte Amadori-Produkt. Aus dem letzteren Produkt besteht die Möglichkeit der Spaltung in zwei chemische Verbindungen, dem aromatischen Niacinamid oder dem Amid Acrylamid.  $R=H$ ,  $[CH(OH)]_nCH_2(OH)$ ;  $n=0-3$  (Yalayan et al., 2003).

### 1.3 Acrylamid in verschiedenen Nahrungsmitteln

In letzter Zeit befassen sich zahlreiche Studien mit der Bestimmung des Acrylamidgehaltes in verschiedenen Lebensmitteln. Von den bisher kontrollierten und analysierten Proben gehören frittierte Kartoffeln und auf Getreidebasis hergestellte Produkte zu den acrylamidreichsten Lebensmitteln überhaupt. Dem Prozess der Zubereitung kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu (Taubert et al., 2004; Taeymans et al., 2004). Für die Zubereitung werden sowohl die Zeit als auch die Temperatur berücksichtigt. Die Dauer der Erhitzung überhalb der Grenztemperatur von  $120^{\circ}\text{C}$  ist ein Vorhersage-Parameter für den Acrylamidgehalt. Geeignete Methoden zur Bestimmung des Acrylamidgehaltes sind GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) und LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry). Bei GC-MS werden die Acrylamidmengen nach Bromierung des Acrylamids indirekt analysiert, während mittels LC-MS/MS Acrylamid direkt erfasst wird, so dass LC-MS/MS eine wesentlich vorteilhaftere Methode darstellt (Taubert et al., 2004).

Experimentell wurden auf diese Weise Acrylamidmengen in frittierten Kartoffeln, French Fries und Getreideprodukten bestimmt. Diese Mengen entsprachen näherungsweise den Werten der schwedischen NFA: es wurden Acrylamidgehalte (ng/g) von 530-3700 in frittierten Kartoffeln (NFA: 330-2300) und 200-1900 in French Fries (NFA: 300-1100) ermittelt (*Becalski et al., 2003*). In Anbetracht dieser hohen Acrylamidmengen in Lebensmitteln hat das Bundesamt für Gesundheit in Deutschland eigene Versuche durchgeführt, mit dem Ziel, eine repräsentative Liste acrylamidhaltiger Produkte zu erstellen. Dazu wurden Acrylamidkonzentrationen in bekannten Lebensmitteln gemessen und daraus die mittlere Acrylamidbelastung nach Verzehr dieser Produkte abgeschätzt. Für die Gesamtbevölkerung zeigte sich dabei eine deutlich geringere tägliche Acrylamidbelastung von 0,5 µg/kg Körpergewicht (Tab. 2A) als bei der jüngeren bzw. heranwachsenden Bevölkerung mit 3,4 µg/kg Körpergewicht (Tab. 2B).

**Tab. 2: Acrylamidbelastung durch täglichen Verzehr von verschiedenen Lebensmitteln in Deutschland**

**A:**

Lebensmittel	Mittlere tägliche Verzehrmenge [g/Tag]	Belastung mit Acrylamid [µg/kg]	Mittlere Aufnahme	
			[µg/Tag]	[µg/kg KG/Tag]
Früstückszerealien	22,76	104	2,37	0,04
Knäckebrot	8,81	237	2,09	0,03
Kekse, Waffeln	14,43	264	3,81	0,06
Kartoffel- Knabberzeugnisse	15,22	793	12,07	0,20
Pommes frites (frittiert)	30,06	454	13,65	0,23
<b>Gesamt</b>			<b>33,98</b>	<b>0,57</b>

**B:**

Lebensmittel	Mittlere tägliche Verzehrmenge [g/Tag]	Belastung mit Acrylamid [µg/kg]	Mittlere Aufnahme	
			[µg/Tag]	[µg/kg KG/Tag]
Früstückszerealien	92,21	257	23,70	0,40
Knäckebrot	24,45	612	14,96	0,25
Kekse, Waffeln	50,00	797	39,85	0,66
Kartoffel- Knabberzeugnisse	57,14	1514	86,51	1,44
Pommes frites (frittiert)	49,29	767	37,81	0,63
<b>Gesamt</b>			<b>202,83</b>	<b>3,38</b>

**A:** Durchschnittlicher Verzehr von Lebensmitteln mit mittlerer Acrylamidbelastung in der Gesamtbevölkerung.  
**B:** Hoher Verzehr von Lebensmitteln mit hoher Acrylamidbelastung in der Altersklasse der 15- bis 18-Jährigen (*Madle et al., 2003; Dybing et al., 2005*). KG: Körpergewicht.



## 1.4 Metabolismus und Toxikokinetik

Acrylamid wird nach oraler Verabreichung vollständig absorbiert und gleichmäßig über alle Gewebe verteilt. In Untersuchungen an Ratten und Kaninchen konnte die Substanz bereits 30min nach Applikation in allen Geweben nachgewiesen werden (*Edwards, 1975; Hashimoto und Aldridge, 1970; Miller et al., 1982; Ramsey et al., 1984*). Die Verteilung im fötalen Gewebe bei Mäusen und Ratten ist mit der Verteilung im Gewebe der Muttertiere vergleichbar (*Ikeda et al., 1983; Marlowe et al., 1986*). Eine Speicherung von Acrylamid konnte bei der Ratte in Erythrozyten – vermutlich durch Bindung an die Sulfhydrylgruppe des Hämoglobins (*Bergmark et al., 1991; Hashimoto und Aldridge, 1970*) – beobachtet werden (*Ramsey et al., 1984*). Bis zu 72 Stunden nach einmaliger i.v. Gabe von 10 mg radioaktiv-markiertem [<sup>14</sup>C]-Acrylamid pro kg Körpergewicht konnte ein Plateau-Spiegel von 12% der verabreichten Dosis im Vollblut wiedergefunden werden. Dagegen wurde die Radioaktivität schnell aus dem Plasma eliminiert (*Miller et al., 1982*). Trotz dieser Befunde können die Verhältnisse in Nagetieren nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Jedoch wurde beim Menschen gezeigt, dass Acrylamid sowohl die Blut-Plazenta-Schranke im *in-vitro* Model als auch die Blut-Milchschanke *in-vivo* überwinden kann (*Sörgel et al., 2002*). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass Acrylamid auch beim Menschen jedes Gewebe erreichen kann.

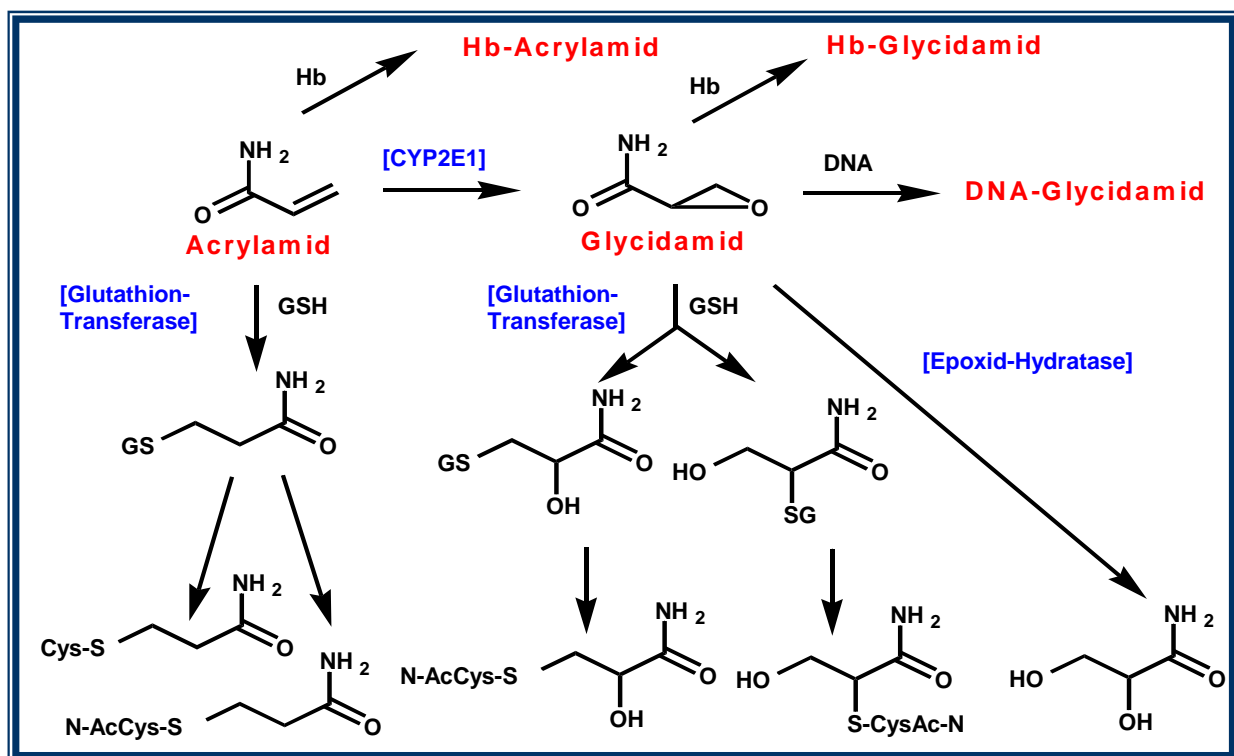
Der Metabolismus von Acrylamid ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Abb. 5). Insbesondere fehlt der direkte Nachweis vermutlich aktiver Metaboliten *in vivo*. Primär wird Acrylamid in der Ratte und Maus durch Glutathion-Konjugation in der Phase-II-Reaktion (Entgiftungsreaktion) zu nicht toxischen Mercaptursäuren umgesetzt (*Miller et al., 1982*), wobei der Hauptmetabolit N-Acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cystein ist. Außerdem unterliegt Acrylamid einer oxidativen Biotransformation in der Phase-I-Reaktion, indem die Doppelbindung von Acrylamid oxidiert wird und damit das reaktive Epoxid Glycidamid entsteht (*Sega et al., 1990*). Diese Reaktion wird im murinen Modell durch das Enzym Cytochrom P-450 (Gen CYP 2E1) katalysiert (*Sumner et al., 1999; Settels et al., 2008*).

Acrylamid reagiert aufgrund seiner elektrophilen Vinylgruppe direkt mit nukleophilen Hydroxyl-, Amino- und Sulfhydryl-Gruppen verschiedener Makromoleküle (*Hashimoto und Aldridge, 1970*). Eine direkte Alkylierung von DNA durch Acrylamid konnte anhand von *in-vitro* Untersuchungen mit Kalbsthymus-DNA nach einer Reaktionszeit von 40 Tagen bestätigt werden. Die Autoren weisen auf eine für elektrophile Gruppen ungewöhnliche Bindung an die Desoxyribonucleinsäure Adenosin hin (*Solomon et al., 1985*).

Eine direkte Alkylierung von DNA fand in Mäusen nach i.p. Gabe von 46 mg [<sup>14</sup>C]-markiertem Acrylamid pro kg Körpergewicht statt. Dabei war die Bildung von DNA-Addukten im Hoden und der Leber zeitabhängig. Im Hoden erreichte die Bildung von DNA-Addukten nach einer Exposition von 4-6h, in der Leber bereits nach 1-2h ein Maximum. Die Gesamtkonzentration der Addukte war somit in der Leber höher als im Hoden (Sega et al., 1989, 1990). Für die Wechselwirkung von Acrylamid mit den Sulfhydrylgruppen des Hämoglobins fanden Bergmark et al. in Untersuchungen an Ratten (0 bis 100 mg Acrylamid/kg Körpergewicht i.v.) eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen Hämoglobin-Bindungskapazität und Konzentration. Sie errechneten einen Bindungsindex von 6400 pmol (g Hb)<sup>-1</sup>/μmol Acrylamid (kg Körpergewicht)<sup>-1</sup> bei einer einmaligen i.v. Verabreichung von 100 mg/kg Körpergewicht (Bergmark et al., 1991).

Auch das Acrylamid-Epoxy-Derivat Glycidamid besitzt die Fähigkeit, sich mit SH-Gruppen von Proteinen oder auch NH<sub>2</sub>-Gruppen von Nukleinsäuren kovalent zu verbinden. Obwohl die Bildung von DNA-Addukten mit Acrylamid und Glycidamid *in-vitro* nachgewiesen wurde, konnten nach Acrylamid-Aufnahme *in-vivo* nur für Glycidamid DNA-Addukte gefunden werden (Doerge et al., 2005a). Damit ist Glycidamid der viel bedeutsamere Mediator genotoxischer Effekte als Acrylamid und stellt einen potenziell karzinogenen und mutagenen Metaboliten dar (Paulsson et al., 2003; Sega et al., 1990; Calleman et al., 1990, 1992, 1993). Die Adduktion von Acrylamid und Glycidamid an Hämoglobin ermöglicht es, beide Substanzen als zuverlässige Indikatoren der externen Acrylamid- bzw. internen Glycidamidbelastung zu verwenden (*biomarkers*). Nach i.v. Verabreichung von Acrylamid an Ratten konnten Hämoglobinaddukte von Glycidamid im Blut identifiziert werden (Calleman et al., 1990; Bergmark et al., 1991). Im Urin von Ratten und Mäusen wurden Acrylamid und seine Metabolite Glycidamid, N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein (GAMA), 2,3-Dihydroxypropionamid, N-Acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cystein und N-Acetyl-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl)cystein detektiert (Sumner et al., 1992). Acrylamid und Glycidamid sind beide chemisch sehr reaktiv (siehe Adduktionsfähigkeit) und können deshalb auch leicht Reaktionen mit Glutathion eingehen. Im murinen Urin und Gallenflüssigkeit wurden Metabolite von Acrylamid in Form seiner direkten Konjugationsprodukte mit Glutathion sowie als freies oder Glutathion konjugiertes Glycidamid nachgewiesen (Sumner et al., 1992, 1999; Miller et al., 1982). Die Synthese der Konjugate wird durch das zytoplasmatische Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) der Leber und des Gehirns katalysiert.

Acrylamid wird aus allen Geweben bei Ratten (*Miller et al., 1982*) und Mäusen (*Marlowe et al., 1986*) schnell mit einer Halbwertszeit von *ca. 2h* eliminiert. Die länger anhaltende Radioaktivität nach Verabreichung von [<sup>14</sup>C]-markiertem Acrylamid dürfte entweder auf Metaboliten mit langer Retentionszeit oder auf eine Interaktion mit biologischen Molekülen zurückzuführen sein (*Marlowe et al., 1986; Miller et al., 1982*). Für den Blutspiegel betragen die Eliminationshalbwertszeiten *initial ca. 2h (terminal ca. 10h)* und für die meisten Gewebe *ca. 5h bis zu 8 Tage (Miller et al., 1982; Ramsey et al., 1984)*. Für Nervengewebe, Hoden und Haut kann die terminale Halbwertszeit erheblich länger sein (*Miller et al., 1982*). Für das Rückenmark werden bis zu *24 Tage* angegeben (*Tilson et al., 1981*). Die Elimination mit dem Urin erfolgt jedoch hauptsächlich in Form von Metaboliten anstelle der Ausgangsform Acrylamid. Neben der hauptsächlich vorkommenden Mercaptursäure N-Acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cystein wurden auch andere nicht identifizierbare Verbindungen als mögliche Acrylamidmetabolite im Urin nachgewiesen (*Miller et al., 1982*).



**Abb. 5:** Phase-I und Phase-II Metabolismus von Acrylamid. Aus der Phase-I-Reaktion bildet sich durch Oxidation von Acrylamid via Cytochrom P450 sein Epoxy-Derivat Glycidamid. Beide Substanzen reagieren mit Hämoglobin oder DNA zu Hämoglobin- oder DNA-Addukten. Im Phase-II-Metabolismus entstehen aus der Reaktion von Acrylamid und Glycidamid mit Glutathion-S-Transferasen verschiedene Glutathion-Konjugationsprodukte (modifiziert nach *Sumner et al., 1999; Calleman, 1996*).

Acrylamid kann wegen der beobachteten Veränderungen nach oraler Gabe in Tierversuchen auch toxisch für den Menschen sein. Die langjährige Acrylamidexposition von Arbeitern hatte eine periphere Neuropathie zur Folge (*Miller et al., 1985*). In einer weiteren Studie wurde an Ratten eine geringgradige Neuropathie nach Verabreichung von 1 mg Acrylamid/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser nach 92 Tagen an männlichen Tieren beobachtet. Dieser Effekt war auf eine sehr geringe Schädigung des Nervensystems beschränkt und nach 25 Tagen abgeklungen (*Burek et al., 1980*).

Acrylamid besitzt beim Tier sowohl in somatischen als auch germinativen Zellen ausgeprägte klastogene Eigenschaften (Chromosomenaberrationen, Aneuploidie, Polyploidie), wie die Befunde für Lymphoma-Zellen der Maus (*Moore et al., 1987*), für Spermatozyten (*Russo et al., 1994*), für Spermatogonien (*Ehling und Neuhäuser-Klaus, 1992*) und die Ergebnisse aus dem Mikronukleus-Test (*Adler et al., 1988*), dem reziproken Translokationstest (*Shelby et al., 1987*), dem Dominant-Letal-Test (*Shelby et al., 1986; Smith et al., 1986*) sowie dem morphologischen spezifischen Lokus-Test darlegen. Unter Verwendung des spezifischen Lokus-Test lässt sich das Mutagenitätsrisiko infolge einer Acrylamidexposition beim Menschen nur abschätzen (*Russell et al., 1991; Ehling und Neuhäuser-Klaus, 1992*). Eine punktmutagene Wirkung konnte *in-vitro* mit und ohne metabolische Aktivierung im Salmonella/Mikrosomentest sowie mittels des Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl-Transferase-System in CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*, kultivierte Ovarialzellen aus dem chinesischen Hamster) nicht nachgewiesen werden (*Dearfield et al., 1988*). Beim Tier ist ein transplazentarer Übergang für Acrylamid vorhanden (*Ikeda et al., 1983*), die Verteilung im fötalen Gewebe ist vergleichbar mit der im Gewebe der Muttertiere mit Ausnahme der Haut, die eine ungewöhnlich hohe Konzentration aufwies (*Marlowe et al., 1986*). Im Tierversuch wirkt Acrylamid kanzerogen. Dies wird durch positive Ergebnisse bestätigt, die sowohl *in-vitro* Transformationstest-Systeme als auch Langzeit-Kanzerogenitätsstudien liefern. Die mögliche Induktion von Lungentumoren durch Acrylamid wurde in zwei Testreihen mit unterschiedlichen Verabreichungswegen an Mäusen untersucht. Eine signifikante und dosisabhängige Erhöhung der Lungentumorraten wurde sowohl nach oraler als auch nach i.p. Verabreichung von Acrylamid festgestellt ( $p < 0,01$ ), wobei nach i.p. Injektion die kanzerogene Wirkung von Acrylamid etwas stärker als nach oraler Verabreichung war (*Bull et al., 1984*). Für den Menschen konnte weder in einer Kohorten-Studie mit Arbeitern unter hoher Acrylamidexposition ein signifikanter Anstieg der Mortalitätsrate infolge von Krebserkrankungen nachgewiesen werden (*Marsh et al., 1999*), noch konnte in einer weiteren retrospektiven Fall-Kontrollstudie eine erhöhte Krebsinzidenz

nach oraler Aufnahme acrylamidhaltiger Nahrung beobachtet werden (*Mucci et al., 2003*). Außerdem bietet die begrenzte Anzahl epidemiologischer Studien keinen eindeutigen Beweis dafür, ob Acrylamid definitiv kanzerogen für den Menschen ist (*American Cynamid Co., 1984; Sobel et al., 1986*). Der Mangel an positiven Ergebnissen beim Menschen kann aber ein Kanzerogenitätsrisiko nicht sicher ausschließen (*Dearfield et al., 1988*). Deshalb ist Acrylamid auf der IARC-Skala für das Kanzerogenitätsrisiko der Gruppe 2A „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen“ zugeordnet (*Rice, 2005*). Hinsichtlich der Beurteilung des toxischen Potentials von Acrylamid sowie der weiteren toxikokinetischen Reaktionsabläufe und Eliminationsprozesse stellen die im Phase-II-Metabolismus vermutlich auch im Menschen über Glutathion-S-Transferasen gebildeten Konjugate N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein (AAMA aus Acrylamid) und N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)cystein (GAMA aus Glycidamid) wichtige Indikatoren für die Belastung mit Acrylamid und Glycidamid dar, weil die beiden Glutathion-Konjugate AAMA und GAMA sowohl im Urin von Ratten (*Sumner et al., 1992, 2003*) als auch im menschlichen Urin identifiziert worden sind (*Fennell et al., 2005; Boettcher et al., 2005a*). Anhand der Urinausscheidungen von AAMA und GAMA läßt sich dann direkt die renale Entgiftungsrate bestimmen und damit das Ausmaß der toxischen Wirkung im Organismus angeben.

## **1.5 Problemstellung**

Die Annahme, dass mit der Nahrung aufgenommenes Acrylamid auch beim Menschen krebserregend wirken könnte, wurde in epidemiologischen Studien nicht bestätigt (*Pelucchi et al., 2003; Mucci et al., 2004, 2005*). Valide Daten über die Resorption, Verteilung, und Elimination von Acrylamid stammen bisher nur aus Tierexperimenten und weisen auf eine vollständige Resorption und Verteilung über alle Gewebe und auf eine Umwandlung in Metabolite hin, die im Urin ausgeschieden werden. Dagegen stehen für die Toxikokinetik von Acrylamid im Menschen kaum Ergebnisse zur Verfügung. Diese möglichen Stoffwechselwege wurden zuletzt in zwei klinischen Studien untersucht. In der ersten Studie wurden die Ausscheidungsmengen von Acrylamid und seiner Metabolite im Urin 24 Stunden nach oraler Verabreichung einer Acrylamid-Dosis in Höhe von 3 mg/kg Körpergewicht bestimmt (*Fennell et al., 2005, 2006*). In einer zweiten Studie konnten zwei Tage nach Aufnahme einer in Wasser verdünnten Acrylamid-Dosis von 13 µg/kg Körpergewicht die beiden Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Urin gemessen werden (*Boettcher et al., 2005a, 2005b*).

Die nur sehr dünne Datenlage zur Toxikokinetik von Acrylamid im Menschen und die nur sehr eingeschränkt auf den Menschen übertragbaren Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen führte zu dem hier gewählten klinisch-analytischen Ansatz, die Urinausscheidungen von Acrylamid und seiner Metabolite Glycidamid, AAMA und GAMA nach oraler Aufnahme acrylamidhaltiger Nahrung unter standardisierten Bedingungen in einer klinischen Studie mit 6 gesunden Probanden über den Zeitraum von 3 Tagen zu untersuchen. Da sich dieser Versuchsansatz mit interindividuellen Schwankungen in der Toxikokinetik zwischen den Probanden und vor allem mit dem Unterschied zwischen der Aufnahme von Acrylamid aus einer komplexen Nahrungsmatrix und reiner Aufnahme aus dem Trinkwasser befasst, kann eine effektive Risikobewertung der Acrylamidaufnahme für den Menschen vorgenommen werden. Die Hypothese, dass Acrylamid durch orale Nahrungsaufnahme toxische Wirkungen im menschlichen Organismus entfaltet, wird im Rahmen dieser Arbeit anhand folgender pharmakologischer Fragestellungen geprüft:

- Wieviel unverstoffwechseltes Acrylamid kann durch orale Zufuhr acrylamidhaltiger Nahrung in den menschlichen Urin gelangen?
- Welche Ausscheidungsmengen der Metabolite Glycidamid, AAMA und GAMA sind dann im Urin nachweisbar?

## 2. Material und Methoden

Die erste methodische Aufgabe in dieser Arbeit lag in der Erstellung standardisierter acrylamidhaltiger Nahrung und der Bestimmung des Acrylamidgehaltes in diesen Nahrungsproben (Studienchips) mittels kombinierter flüssigkeitschromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren (LC-MS/MS). Als zweites standen die Konzentrationsmessungen von Acrylamid und seiner Metabolite im Urin unter Einsatz auf die Zielsubstanzen angepasster LC-MS/MS-Protokolle und die Auswertung des renalen Ausscheidungsverhaltens zur Charakterisierung der Toxikokinetik im Vordergrund. Der dritte Teil umfasst schließlich die Beschreibung der klinischen Studie.

### 2.1 LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry)

Bei der LC-MS/MS-Methode handelt es sich um ein kombiniertes und hoch sensitives Messverfahren zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung geringster Konzentrationen einer Zielsubstanz in einer Probe (Bereich: 0,5-5,0 ng/ml). Die Methode zeichnet sich durch die Kopplung von der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS) aus. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist ihr Einsatz in der klinischen Pharmakologie von großer Bedeutung. Die LC-MS/MS ermöglicht vor allem die Erniedrigung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen verschiedener Arzneimittel in Blut- oder Urinproben. Dadurch kann die zu verabreichende Dosis an die Probanden immer weiter reduziert werden, so dass sich das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen für die Teilnehmer einer klinischen Studie vermindert.

Trotz der bisher erfolgreich zur Acrylamid-Diagnostik über den Hauptmechanismus einer Bromierung von Acrylamid angewandten GC-MS-Analytik (*Castle et al., 1991; Castle 1993*) hat sich mittlerweile die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von Acrylamid in Nahrungsmitteln etabliert. Bei der GC-MS-Analytik wird vorwiegend die Elektronenstoßionisation (EI<sup>+</sup>) angewandt. Da jedoch die nachzuweisenden Ionen von Acrylamid nicht exakt spezifisch sind, besteht die Gefahr, dass durch Koelution mit anderen Verbindungen die Ergebnisse mittels GC-MS verfälscht werden und LC-MS/MS deshalb vorzuziehen ist.

### **2.1.1 Herstellung acrylamidhaltiger Nahrung (Studienchips)**

Die Herstellung acrylamidhaltiger Nahrungsproben beginnt mit der Zubereitung des Nahrungsmittels durch Frittieren der Kartoffeln über den Zeitraum von 5 Minuten (Studienchips). Danach folgen die Aufarbeitung und die Extraktion von Acrylamid aus den Studienchips.

#### **2.1.1.1 Probenaufarbeitung**

Die Proben wurden aus Kartoffeln der Firma Princess hergestellt. Die Lagerung der Kartoffeln erfolgte unter konstanten Temperaturverhältnissen (8-10°C) sowie unter normaler Luftfeuchtigkeit (95% relative Luftfeuchtigkeit) für eine Woche, wobei in der Zeit keine Sprosse oder Keime sichtbar wurden (*Taubert et al., 2004*).

Die Kartoffeln wurden zuerst mit dem Sparschäler geschält. Die geschälten Kartoffeln wurden unter gleichmäßigem Druck auf dem Gemüsehobel in Scheiben geschnitten und anschließend Portionen von *ca. 150g* abgewogen (Tab. 3). Die Scheiben wurden in einer Schüssel mit Wasser gewaschen, um dadurch die Stärke der Kartoffeln abzuwaschen. Zunächst wurden die Kartoffelscheiben unter Benutzung des Frittierfettes der Firma Unilever Bestfoods GmbH (Biskin Reines Pflanzenöl, Hamburg Deutschland) frittiert (Friteuse: Modell Micro-Filter, Firma Moulinex). Das Frittieren wurde in separaten Vorgängen fortgeführt. Jedes Mal wurde nur eine Portion der Kartoffelscheiben (*150g*) genommen. Mit einem Thermometer wurde vor jedem Frittiervorgang die Temperatur des flüssigen Frittierfettes kontrolliert ( $190\pm 10^{\circ}\text{C}$ ), um eventuell auftretende Abweichungen zu vermeiden (Tab. 3). Die getrockneten Kartoffelscheiben wurden gleichmäßig im Frittierkorb verteilt um ein gleichmäßiges Frittiererergebnis zu gewährleisten. Die Stoppuhr wurde gestartet, sobald der Korb mittels Senkknopf ins heiße Fett abgelassen war. Nach 2min Frittierzeit wurde der Deckel geöffnet und der Korb aus dem heißem Fett genommen, damit ein gleichmäßiges Frittieren erzielt werden konnte. Der Korb wurde nach spätestens 15sec wieder in das Fett abgelassen und der Deckel verschlossen. Der Schüttelvorgang wurde nach 4min Frittierzeit wiederholt. Nach weiteren 5min wurde der Korb aus der Friteuse genommen und zum Abtropfen auf einen mit Küchenpapier bedeckten Teller gestellt. Die frittierten Kartoffelscheiben wurden dann erneut abgewogen und die Temperatur des Frittierfettes nachkontrolliert ( $190\pm 10^{\circ}\text{C}$ ). Nach den Frittiervorgängen war deutlicher Gewichtsverlust festzustellen (Tab. 3). Der Rückgang war darauf zurückzuführen, dass das in den Kartoffeln



bis zu ~80 % enthaltene Wasser während des Frittiervorganges verdampft. Die fertigen Studienchips wurden in einem Topf vermischt. Anschließend wurden daraus 6 Portionen von je ca. 150 g gemacht und in einem Kühlschrank (AEG Arctis no\_frost electronic Model 2494-6GA, AEG Hausgeräte GmbH Nürnberg, Deutschland) bei einer Temperatur von + 4°C aufbewahrt.

**Tab. 3: Gewicht der Kartoffelscheiben in Abhängigkeit der Temperatur**

<b>vor / nach dem Frittieren</b>	<b>Gewicht der Kartoffelscheiben (g)</b>	<b>Temperatur des Frittieröls (°C)</b>
	151,3 / 51,0	196 / 183
	151,7 / 56,2	196 / 189
	150,8 / 57,0	186 / 190
	149,7 / 56,3	190 / 192
	149,2 / 55,5	185 / 181
	151,5 / 62,5	191 / 189
	151,2 / 56,4	192 / 190
	150,9 / 56,4	198 / 184
	150,8 / 62,7	195 / 187
	150,2 / 68,4	187 / 190
	150,6 / 58,1	187 / 188
	151,1 / 64,8	188 / 180
	149,5 / 62,0	191 / 185
	148,5 / 59,0	190 / 185
	150,1 / 60,5	190 / 185
	150,6 / 61,9	190 / 185
150,8 / 57,0	190 / 185	
151,3 / 57,0	190 / 185	

Die Temperatur wurde während des Frittiervorganges konstant gehalten. Abweichungen von  $\pm 10^{\circ}\text{C}$  ließen sich nicht vermeiden. Zudem lag ein fast einheitlicher Gewichtsverlust der fertigen Studienchips von ca. 100g nach jedem Frittiervorgang vor.

### **2.1.1.2 Extraktion**

Die Extraktion wurde mit einer zufälligen Frittierprobe aus *150,3g* Kartoffelscheiben vorgenommen. Das nach dem Frittieren ermittelte Gewicht betrug *56,5g*. Es wurden jeweils 2 Chips genommen und mit flüssigem Stickstoff zermörsert (sechsmalige Wiederholung). Von jedem Vorgang wurden 2 Proben entnommen, in Falcon-Gefäße überführt und auf genau 1g eingewogen. Zusätzlich sind mehrere Chips genommen worden, die anschließend wieder mit Stickstoff homogenisiert wurden. Davon wurden auch zweimal je 1g abgewogen. Von jedem Vorgang blieb eine Probe nativ, die nur mit 20ml 400 mmol/l HClO<sub>4</sub> extrahiert wurde. Die zweite Probe wurde mit reiner Acrylamidlösung (99,9% Reinheit; Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) gemischt. Zu den ersten 2 Proben wurden *100µl* Acrylamidlösung (*6000ng/g*) zugegeben. Die nächsten 2 Proben erhielten je *100µl* Acrylamid (*4000ng/g*), während den letzten 2 Proben je *100µl* Acrylamidlösung (*2000ng/g*) zugesetzt wurden. Zu der Probe aus mehreren Chips wurden *100µl* reines Acrylamid (*4000ng/g*) zugegeben.

Alle Gefäße wurden zunächst fest verschlossen und auf dem Überkopf-Schüttler (Heidolph Instrumente, München, Deutschland) 15min lang bei 40 rpm und bei einer Temperatur von 25°C (normale Zimmertemperatur) gut durchmischt. Anschließend wurden die ungelösten Nahrungsmittelreste in einer Tischzentrifuge (Model Funktion Line, Labofuge 400, Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf) für 3min bei 3000 rpm abzentrifugiert.

### **2.1.1.3 Ultrazentrifugation**

Nach Trennung der Phasen wurden von der oberen Phase mittels einer Pasteurpipette jeweils 6ml abgenommen, in die Ultrazentrifugenröhrchen überfüllt und zur besseren Phasentrennung 30min in der Ultrazentrifuge (Firma Beckmann L8-55, Modell J2-HS) zentrifugiert.

Die Ultrazentrifugation erfolgte wegen der Anzahl der Proben in zwei getrennten Vorgängen für je 30min bei 30000 rpm und bei einer Temperatur von 25°C. Von den Ultrazentrifugenröhrchen wurden schließlich jeweils 4ml abgenommen und diese Volumina in 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Diese 14 Proben wurden bei -20°C eingefroren und für die innerhalb von zwei Tagen geplanten Messungen aufbewahrt.

## 2.1.2 LC-MS/MS Methodenentwicklung

Für die quantitative Analyse von Acrylamid und seiner Metabolite waren vor allem die Wahl der Säule und die Zusammensetzung des Laufmittels von besonderer Bedeutung:

### ○ Säule

Typ Beta Basic 8 (Hypersil-Keystone)

Hypercarbontrennsäule 50 x 2,1 mm (Thermo Electron)

Hypercarbonvorsäule 10 x 2 mm (Thermo Electron)

Dimensionen: 100 mm x 3 mm; 5 µm

### ○ Laufmittel

98 % Wasser + 0,1 % Ameisensäure + 2 % Acetonitril

### ○ Sonstige Parameter

- Injektionsvolumen: 5 µl (Injektionen alle 5min)
- Fließgeschwindigkeit: 300 µl/min
- Temperatur Säulenofen: 20°C
- Temperatur Autosampler und Probenraum: 10°C
- *Reversed-Phase*-Bedingungen bei *isokratischer* Elution der Proben

### MS/MS-Parameter

- positive Elektrospray Ionisationsmethode (ESI<sup>+</sup>) mit der Spannung: 4,5 kV
- Temperatur der Heizkapillare: 300 °C
- Schutzgas: 35 AU
- Zerstäubungs- und Hilfsgas: N<sub>2</sub> (10 AU)
- Kollisionsgas: Argon (1,5 mTorr<sup>1</sup>)

Die LC-MS/MS-Analytik wird oft von äußeren Faktoren beeinflusst. Diese äußeren Schwankungen können insofern die Messungen beeinträchtigen, als dass zwei Substanzen in einer Lösung detektiert werden können, die durchaus die gleiche Konzentration, aber eine unterschiedliche Peakfläche besitzen. Daher muß für jede Probe ein interner Standard definiert und eingesetzt werden.

---

<sup>1</sup> Torr ist eine veraltete Druckeinheit und ist nicht im SI-Einheitensystem eingetragen. 1 Torr entspricht nach der SI-Norm 133,3 Pa.

### Interner Standard

Die Verwendung eines *internen Standards* ist erforderlich, um korrekte und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Mit der Hilfe des internen Standards und der damit verbundenen Wiederfindung sollten Matrixeffekte verhindert werden. Dabei gibt man der zu analysierenden Probe eine bekannte, der zu messenden Substanz chemisch und physikalisch sowie chromatographisch ähnliche Verbindung hinzu. Ab dem Zeitpunkt der Zugabe bis zur Messung verhält sich der interne Standard im Auftrennungsverhalten genauso wie die zu messende Substanz. Man wertet den internen Standard (getrennter und isolierter Peak) gemeinsam mit den anderen Peaks der zu messenden Substanz aus und berechnet daraus die Konzentrationen in Relation zum internen Standard. *Methacrylamid* wurde nach diesen Kriterien als interner Standard ausgewählt.

### Methodenvalidierung

Die Methodenvalidierung dient zum Nachweis, ob die entwickelte Methode für die Analyse des extrahierten Acrylamids geeignet ist. Die Validierung erfolgte gemäß den Richtlinien der SOP (*Standard Operating Procedure*) der Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie der Universität zu Köln, die sich an den internationalen Richtlinien GCP/ICH (*Good Clinical Practice/International Conference of Harmonization*) und FDA (*Food and Drug Administration*) orientierte.

### Qualitätssicherung

Die Qualitätssicherung gewährleistet einerseits zuverlässige und auswertbare Ergebnisse und vermeidet andererseits Fehler im Detektionssystem während der Messung. Die laborinterne Qualitätssicherung erfolgte zunächst mittels des Parameters *Präzision*, welcher auch als relative Standardabweichung (*%RSD*, *relative standard deviation*) oder innere Genauigkeit bezeichnet wird:  $Präzision [\%] = \%RSD = \frac{Standardabweichung}{Mittelwert} \cdot 100$ . Dieses Maß stellt also definitionsgemäß den Variationskoeffizienten dar. Weitere Kenngrößen zur Beurteilung des Meßsystems sind die *Richtigkeit*, welche die mittlere Abweichung zwischen Mess- und Sollwerten angibt ( $\delta [\%] = \frac{\mu - X}{X} \cdot 100$ , mit  $\mu$  = Mittelwert aus allen Sollwerten und  $X$  = Mittelwert aller Messwerte) und die *Wiederfindungsrate W (Recovery)*. In unserem Fall wurde die Präzision als Inter- und Intraday-Werte berechnet (von Messtag zu Messtag und innerhalb einer Messreihe). Die erlaubten Abweichungen lagen im Bereich von bis zu 15%.

### Wiederfindung (Recovery)

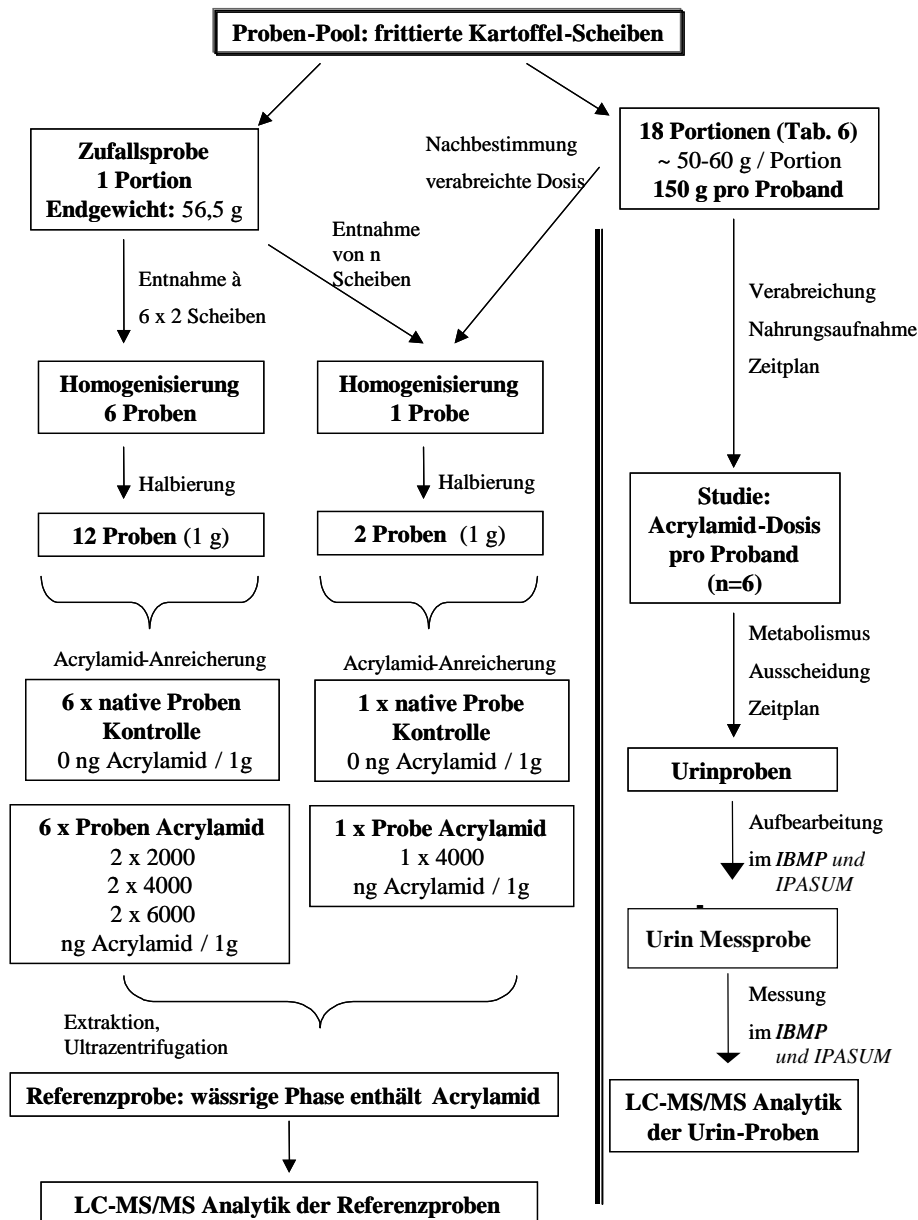
Die **Wiederfindung** als Maß für die Ausbeute des Analyten nach allen Aufarbeitungsschritten im Vergleich zu einer nicht aufgearbeiteten Lösung variiert z.B. durch eine mögliche Unterdrückung der Bildung von verschiedenen Ionen in unterschiedlichen Matrizen (Rydberg et al., 2003). Die **Wiederfindungsrate**  $W$  berechnet sich aus der gemessenen sowie der zugesetzten Konzentration und wird in % angegeben ( $W = C_{\text{gemessen}}/C_{\text{zugesetzt}} \cdot 100$ ). Sie sollte im Bereich zwischen **80 und 120%** liegen.

### **2.1.3 Messung des Acrylamidgehaltes in Studienchips**

Die Probanden erhielten eine definierte Portion der zubereiteten acrylamidhaltigen Nahrung, deren Acrylamidgehalt zuvor mittels LC-MS/MS bestimmt wurde und näherungsweise *1 mg* betrug (siehe Ergebnisse, Kapitel 3.1).

Es war notwendig die verabreichte Acrylamid-Dosis in den Studienchips durch eine zweite Messung direkt nach der Studie zu bestätigen, damit die individuell applizierte Dosis für jeden Probanden abgesichert werden konnte (Doppelbestimmung). Diese Methode gewährleistet, dass die später gemessenen Konzentrationen und Mengen von Acrylamid und seiner Metabolite im Urin mit der tatsächlich oral aufgenommenen Acrylamid-Dosis (Referenzmenge) als Ausgangspunkt des Metabolismus verglichen werden können.

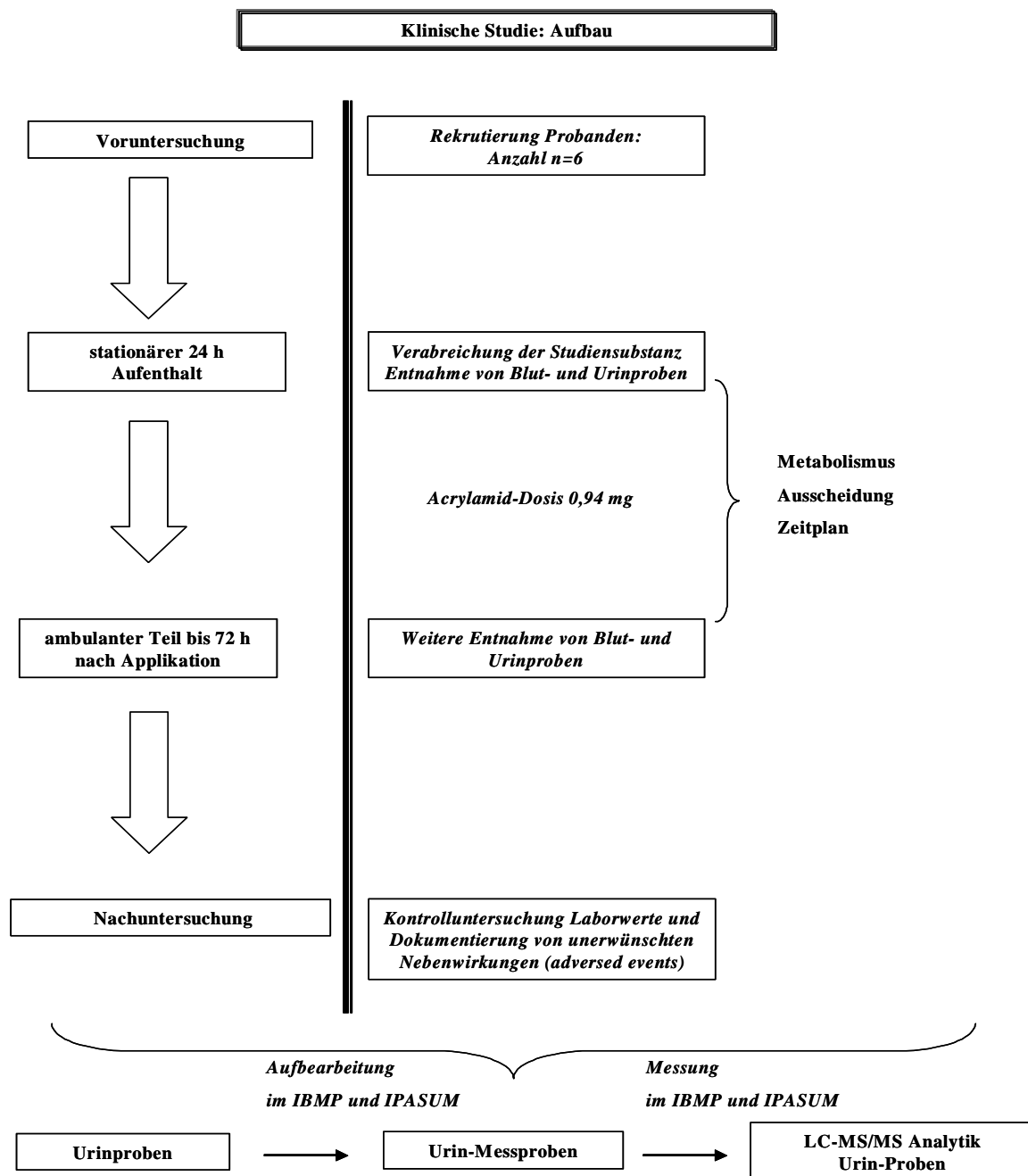
Die gesamte Durchführung des Experimentes, von der Herstellung der Studienchips (siehe Kapitel 2.1.1) bis zur Messung des Acrylamidgehaltes in der Nahrung ist hier schematisch als Zusammenfassung aller dieser Einzelschritte im Detail dargestellt (Abb. 6). Die abschließenden Konzentrationsmessungen und Mengenbestimmungen wurden mit je 500  $\mu\text{l}$  einer Probe durchgeführt (Referenzprobe).



**Abb. 6:** Flussdiagramm zur Beschreibung der einzelnen experimentellen Abschnitte von der Herstellung der Studienchips (siehe Kapitel 2.1.1), der Verteilung dieser Nahrungsproben für die verschiedenen Verarbeitungsphasen (linker Ast) und orale Verabreichung (rechter Ast) bis hin zur technischen Datenerfassung und Messung des Acrylamidgehaltes sowohl in den gewonnenen Referenz- als auch Urinproben der Probanden.

## 2.2 Klinische Studie

Der Metabolismus, die renale Ausscheidung und damit die Toxikokinetik des mit der Nahrung verabreichten und oral aufgenommenen Acrylamids im menschlichen Körper konnte nur mittels einer klinischen Studie aufgeklärt und beurteilt werden. Die Organisationsstruktur (Abb. 7) beschreibt schematisch den prinzipiellen Ablauf und verdeutlicht die einzelnen und wichtigsten Schritte dieser klinischen Studie. Die gesamte Planung und die Durchführung sind in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.



**Abb. 7:** Aufbau der klinischen Studie und Gesamtablauf bis zur Herstellung und Messung der Proben.

### **2.2.1 Studiendesign**

Bei dieser Studie handelte es sich um eine offene, randomisierte, 1-Perioden-Studie mit 6 gesunden, kaukasischen freiwilligen Probanden (3 männliche und 3 weibliche Teilnehmer). Der Antrag zur Beurteilung des Forschungsvorhabens (Durchführung der Studie), der Prüfplan sowie die Probandeninformation und Einverständniserklärung wurden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln eingereicht. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln ist die zuständige Kommission für alle innerhalb der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln durchgeführten klinischen Studien. In ihrer Sitzung hat sie das Thema ausführlich behandelt und stimmte der Durchführung der Studie mit einem positiven Votum zu.

Im Rahmen dieser Studie sind alle entsprechende gesetzliche Bestimmungen und Verordnungen berücksichtigt worden.

### **2.2.2 Probanden**

Die Untersuchung sollte 6 junge, gesunde, männliche und weibliche Personen (Nichtraucher) im Alter von 20-45 Jahren einschließen (Tab. 4). Bei einer vor der Studie stattgefundenen Einführungsveranstaltung wurden die Probanden über den Ablauf der Studie und die vorgesehenen Eingriffe und Studienbelastung aufgeklärt. Die Einwilligung der Probanden wurde vom aufklärenden Arzt in Form einer Probandeninformation bzw. Einverständniserklärung schriftlich festgehalten.



**Tab. 4: Demographische Daten der Studienteilnehmer (Probanden)**

PROBAND	ALTER	KÖRPERGRÖSSE	KÖRPERGEWICHT	KÖRPERGEWICHT	BMI	BMI
	(Jahre)	(m)	(kg) Voruntersuchung	(kg) Nachuntersuchung	(kg/m <sup>2</sup> ) Voruntersuchung	(kg/m <sup>2</sup> ) Nachuntersuchung
#1 (w)	23	1,75	64,6	64,5	21,1	21,1
#2 (w)	21	1,64	55,2	53,0	20,5	19,9
#3 (w)	28	1,76	80,0	80,3	25,8	25,9
#4 (m)	22	1,81	75,2	76,4	23,0	23,3
#5 (m)	35	1,95	97,2	97,1	25,6	25,5
#6 (m)	31	1,84	80,1	81,1	23,7	23,9
Mittelwert	26,67	1,79	75,38	75,40	23,28	23,27
Median	25,50	1,79	77,60	78,35	23,35	23,60
SD	5,61	0,10	14,44	15,16	2,21	2,38
Minimum	21	1,64	55,2	53,0	20,5	19,9
Maximum	35	1,95	97,2	97,1	25,8	25,9

Zur Identifikation der einzelnen Probanden wurden zwar während der Messungen und Auswertungen die Initialien verwendet, jedoch wurden sie in dieser Arbeit zur vollständigen Anonymisierung nicht mehr weiter angegeben (semi-anonymisierte Rohdatenerfassung und Primärauswertung). Die demographischen Daten standen im Einklang mit den für die Studie vorgesehenen Einschlusskriterien.

### 2.2.2.1 Probandenauswahl

#### Einschlusskriterien für Probanden

- Männliche und weibliche Kaukasier
- Alter 20-45 Jahre
- Normales Körpergewicht (BMI = Body Mass Index 20-27 kg/m<sup>2</sup>)
- Gesund entsprechend den Ergebnissen der umfangreichen Voruntersuchung
- Absicht und Fähigkeit zur Erklärung des schriftlichen Einverständnisses zur Teilnahme an der Studie nach Bereitstellung umfassender Informationen

#### Ausschlusskriterien für Probanden

- Personen mit wesentlichen klinischen Störungen (entsprechend den Ergebnissen der Anamnese, der körperlichen Untersuchung, der Vitalfunktionsprüfung und eines EKGs mit 12 Ableitungen)
- Personen mit der Vorgeschichte einer größeren chirurgischen abdominalen Intervention oder einer Peritonitis innerhalb des letzten Jahres
- Personen mit Gicht
- Personen mit einer Psychose (aktuell oder anamnestisch bekannt)
- Personen mit Epilepsie
- Personen mit Hirnschaden

- Personen mit peripher Polyneuropathie
  - Personen mit koronarer Herzkrankheit
  - Personen mit der Vorgeschichte eines Myokardinfarkts
  - Personen mit Lebererkrankungen
  - Personen mit Nierenerkrankungen
  - Personen mit Hypothyreoidismus
  - Personen mit Diabetes Mellitus
  - Personen mit chronischen Infektionen
  - Personen mit allergischer Kontaktdermatitis (z. B. gegen Gummi)
  - Personen mit relevanten akuten Infektionen oder mit akuten behandlungsbedürftigen Allergien (einschließlich Arzneimittelallergien) innerhalb der letzten zwei Wochen
  - Personen mit umgebungs- oder berufsbedingter Exposition gegenüber Acrylamid, Ethylendibromid oder seinen Dämpfen
- 
- Personen mit klinisch relevanter Abweichung von den Normwerten bei Laborparametern, die wie folgt definiert ist:
    - positives Ergebnis der Hepatitis- und HIV – Serologie, das durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist
    - positives Ergebnis des Urinscreenings nach Substanzmissbrauch, das durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist
    - mehr als grenzwertig positives Ergebnis der Urinanalyse (Combur9®), das durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist (ohne Berücksichtigung des pH-Wertes)
    - Hämatokrit, Hämoglobin, MCV, MCH, MCHC, Erythrozytenzahl, Gesamtleukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Prothrombinzeit (Quick), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), SGOT (ASAT), SGPT (ALAT), Kalium, Natrium, Kreatinin, Glucose: jeder Wert von mehr als 10 % außerhalb des entsprechenden Referenzbereichs, der durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist
    - $\gamma$ -GT, Alkalische Phosphatase, Lactatdehydrogenase (LDH), Gesamtprotein, Albumin, Harnstoff, Harnsäure, fT3, fT4, TSH basal: jeder Wert von mehr als 20 % außerhalb des entsprechenden Referenzbereichs, der durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist
    - Gesamtbilirubin, Cholesterin, Triglyzeride, Differentialblutbild: jeder Wert von mehr als 50 % außerhalb des entsprechenden Referenzbereichs, der durch eine zweite Untersuchung bestätigt worden ist

Ausnahmen sind nach Entscheidung des Leiters der Klinischen Prüfung möglich (z. B. Ausschluss eines Probanden mit einer Erhöhung von weniger als 10 % oberhalb des entsprechenden Referenzbereichs für  $\gamma$ -GT, SGOT und SGPT)

- Personen mit Medikamenteneinnahme beginnend zwei Wochen vor der Studie oder während der Studie (Ausnahmen möglich nach Entscheidung des Leiters der Klinischen Prüfung, z.B. Einzeldosen von Paracetamol bei akuten Schmerzen oder topisches Aciclovir bei Herpes labialis)
- Personen mit Einnahme eines Arzneimittels mit einer langen Eliminationshalbwertszeit (> 24 Std.) innerhalb von vier Wochen vor dem ersten Studientag
- Personen mit chronischer Arzneimittelbehandlung (> 3 Tage) innerhalb von acht Wochen vor dem ersten Studientag
- Personen mit Teilnahme an einer Arzneimittelprüfung mit einem neuen Wirkstoff innerhalb der letzten 8 Wochen vor Beginn der jetzigen Studie
- Personen mit Teilnahme an einer Arzneimittelprüfung mit einem registrierten Wirkstoff innerhalb der letzten 4 Wochen vor Beginn der jetzigen Studie
- Personen mit Blut- oder Plasmaspende innerhalb der letzten 4 Wochen vor Beginn der jetzigen Studie
- Aktuelle Raucher, definiert als Personen, die innerhalb der letzten sechs Monate zumindest eine Zigarette geraucht haben (oder Zigarre, Pfeife)
- Personen mit bekannter oder vermuteter Abhängigkeit von („sozial anerkannten“) Drogen, einschl. Personen, die mehr als 30 g Alkohol täglich trinken
- Personen mit Alkohol- oder Drogenabhängigkeit in der Vorgeschichte
- Personen mit einer schweren Erkrankung in der Vorgeschichte, die mit der Zielsetzung der Studie interferieren könnte (z.B. psychiatrische Erkrankung, Epilepsie)
- Personen, die auf acrylamidreiche Nahrungsmittel (z. B. Kartoffelchips, Pommes frites, Roggenbrot), Alkohol, methylxanthinhaltige Getränke und Nahrungsmittel sowie auf Grapefruitsaft und –fruchtfleisch nicht ab 72 Stunden vor der ersten Einnahme der Prüfmedikation bis 48 Stunden nach der letzten Einnahme der Prüfmedikation verzichten wollen oder können
- Personen mit besonderer Diät (z.B. Vegetarier) oder einem Lebensstil (inkl. extreme körperliche Aktivitäten wie Leistungssport und Gewichtheben), der mit der Studie in Konflikt geraten könnte
- Personen, die eine elektive Behandlung im Krankenhaus innerhalb eines Monats nach der letzten Einnahme der Prüfmedikation planen

- Personen, die sich bekanntermaßen oder vermutlich nicht an Studienanweisungen halten oder die bekanntermaßen oder vermutlich nicht verlässlich oder vertrauenswürdig sind
- Personen, die bekanntermaßen oder vermutlich nicht dazu in der Lage sind, die als Teil der formalen Aufklärung erhaltenen Informationen (Einverständniserklärung) zu verstehen und zu bewerten, insbesondere in Hinsicht auf die sie erwartenden Risiken und Unannehmlichkeiten
- Personen mit absehbaren Problemen für das erfolgreiche Legen von Venenverweilkathetern an den Unterarmen
- *Nur für weibliche Teilnehmer:* Positives Ergebnis des Schwangerschaftstests
- *Nur für weibliche Teilnehmer:* Die Probandin benutzt nicht oder ist nicht bereit, während der Studie adäquate empfängnisverhütende Methoden zu benutzen, wie sie in der Probandeninformation aufgeführt sind
- *Nur für weibliche Teilnehmer:* Stillende Mutter

### 2.2.3 Mögliche unerwünschte Ereignisse und Risiken

Im Rahmen der Studie wurde eine Dosis von ca. 1 mg Acrylamid durch Verzehr eines acrylamidhaltigen Nahrungsmittels in Form von standardisierten Studienchips verabreicht. Bei den acrylamidhaltigen Zubereitungen handelte es sich um Nahrungsmittel gemäß dem “Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz”. Die mittlere tägliche Acrylamidzufuhr mit der Nahrung ist schwierig abzuschätzen, zumal genaue Angaben über die zu Hause zubereitenden Mahlzeiten nicht zur Verfügung stehen (*Hilbig et al., 2004*). In einer doppelten Ernährungsstudie in der Schweiz im Jahr 2002 wurde die tägliche Acrylamidzufuhr bei Erwachsenen auf  $0,28 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  geschätzt (*BAG, 2002*). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) beläuft sich die durchschnittliche Acrylamidzufuhr auf  $0,3$  bis  $0,8 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  für die repräsentative Population (*WHO, 2002*). Somit ist die Zufuhr einer Tagesdosis im Bereich von 1 mg Acrylamid mit der Nahrung als realistischer Aufnahmewert anzusehen. Es ist davon auszugehen, dass eine größere Gruppe von Personen mehrfach im Jahr diese Menge erreicht oder sogar überschreitet. Es ist nicht auszuschließen, dass die Einnahme von 1 mg Acrylamid ein geringfügig erhöhtes Lebenszeit-Krebsrisiko verursachen kann. Weitere unerwünschte Wirkungen der Studiensubstanz sind aber nicht zu erwarten.

Für Acrylamid sind im Tierversuch teratogene Effekte nachgewiesen worden. Kontrollierte Studien an Schwangeren fehlen. Daher soll Acrylamid in dieser Studie aus

Sicherheitsgründen bei Schwangeren und stillenden Müttern nicht angewendet werden. Diese dürfen daher an der Studie nicht teilnehmen.

Die Venenpunktion und/oder das Legen von Venenverweilkathetern zur Blutentnahme kann Schmerzen verursachen und gelegentlich zu Thrombosen und Thrombophlebitiden führen.

## **2.3 Studiendurchführung**

Die Studienteilnehmer haben sich durch ihre Einwilligung in die Studie dazu bereit erklärt, sich einer gründlichen Untersuchung und Befragung durch einen Arzt vor Beginn der Studie zu unterziehen. Die Untersuchungen und Befragungen beinhalteten die Berücksichtigung früherer Erkrankungen, eine gründliche allgemeine körperliche Untersuchung, ein EKG, eine Urinuntersuchung (einschließlich eines Alkohol- und Drogentests sowie einen Schwangerschaftstest für weibliche Studienteilnehmer) und klinisch-chemische Laboruntersuchungen (einschließlich Hepatitis B-, Hepatitis C- und HIV-Test). Da Arzneimittel und Nahrungsmittel Wechselwirkungen miteinander haben können, wurden die Teilnehmer zu aktuell eingenommenen Arzneimitteln und Nahrungsmitteln befragt. Die Teilnahme an dieser Untersuchung setzte voraus, dass die Personen gesund waren und keine Medikamente regelmäßig einnehmen würden. Anhand der Ergebnisse der Voruntersuchung und gemäß der vorgegebenen Einschluß- und Ausschlußkriterien (siehe Kapitel 2.2.2.1) haben sich die leitenden Ärzte für die 6 Teilnehmer entschieden. Anschließend erfolgte die Hauptphase der Studie: stationärer Aufenthalt der Probanden, die Applikation der Studiensubstanz (Acrylamid in Studienchips) und die Probennahme (Urin- und Blutproben). Die Studie endete mit der abschließenden Nachuntersuchung der Probanden, die ähnlich wie die Voruntersuchung, eine gründliche allgemeine körperliche Untersuchung umfasste (siehe Abb. 7 aus Kapitel 2.2).

### **2.3.1 Studienablauf**

11 Stunden vor Einnahme der Prüfsubstanzen um 20:00 Uhr wurden die Studienteilnehmer in die Probandenstation aufgenommen. Alkoholkonsum, die Aufnahme von Grapefruitsaft (*Jetter et al., 2002*), von acrylamidreichen Nahrungsmitteln (z.B. Pommes frites, Kartoffelchips, Knäckebrot) und von methylxanthinhaltigen Nahrungsmitteln oder Getränken (z.B. Kaffee, schwarzer Tee, „Red Bull“, Kakao, Schokolade) waren 72 Stunden vor Einnahme der Prüfsubstanzen bis zum Verlassen der Probandenstation nicht gestattet. Die

chemischen Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Substanzen nehmen eine Schlüsselstellung für die Gefährdung des Menschen ein (Renwick et al., 2003). Die Studienleitung behielt sich vor, innerhalb der Studienphase stichprobenartig zu einem beliebigen Zeitpunkt zusätzliche Drogen- und Alkoholtests durchzuführen.

Die Studie bestand aus einer Studienphase, in der das Nahrungsmittel verabreicht wurde. Am Abend der Aufnahme in die Probandenstation wurden während aller Studienperioden Blutdruck, Puls und Körpertemperatur bestimmt sowie Drogen- und Alkoholtests und bei weiblichen Teilnehmern Schwangerschaftstests durchgeführt.

Im Rahmen der Studie wurde eine Dosis von 1 mg Acrylamid durch Verzehr der acrylamidhaltigen Studienchips (siehe Kapitel 2.1.2) mit 240 ml Wasser verabreicht. Die Zeitpunkte (in Stunden) wurden absolut und relativ zum Zeitpunkt der oralen Gabe (absoluter Nullpunkt 0:00) angegeben (Tab. 6).

**Tab. 6: Studienverlauf vor und nach Einnahme der acrylamidhaltigen Nahrung**

Zeitpunkte und Maßnahmen relativ zur Gabe der acrylamidreichen Nahrung (in h)		Uhrzeit
-11:00	Ankunft in der Probandenstation, Beginn der Nahrungskarenz	20:00
-10:30	kurze körperliche Untersuchung, EKG, Messung von Blutdruck, Puls und Körpertemperatur, Schwangerschaftstest bei Frauen	20:30
-10:03	Frage nach unerwünschten Ereignissen (nur TEST 1 Periode)	22:00
-9:00	Frage nach unerwünschten Ereignissen (nur TEST 1 Periode)	22:00
-8:00	Frage nach unerwünschten Ereignissen (nur TEST 1 Periode), Gabe von 240 ml Wasser (nur TEST 1 Periode)	23:00
-1:00	Wecken der Probanden, Beibehalten einer liegenden Körperposition, Gabe von 240 ml Wasser, Einbringen der Verweilkatheter, ab diesem Zeitpunkt ist die Aufnahme von Wasser (bis auf das Wasser, welches mit der Prüfmedikation verabreicht wird) nicht mehr erlaubt, das Bett darf ab jetzt nur für Toilettengänge und nur unter Aufsicht und vorheriger Ankündigung beim Studienpersonal verlassen werden	06:00
-0:06	Urinprobe, Beginn der 1. Urinsammlung	06:54
-0:03	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen	06:57
0:00	Verabreichung einer acrylamidreichen Nahrung mit 240 ml Wasser	07:00
+0:15	Blutentnahme	07:15
+0:30	Blutentnahme	07:30
+0:45	Blutentnahme	07:45

+1:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen	08:00
+1:15	Blutentnahme	08:15
+1:30	Blutentnahme	08:30
+1:45	Blutentnahme	08:45
+2:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Verabreichung von 240 ml Wasser, Ende der 2. Urinsammlung	09:00
+2:20	Blutentnahme	09:20
+2:40	Blutentnahme	09:40
+3:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen	10:00
+3:30	Blutentnahme	10:30
+4:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Verabreichung von 240 ml Wasser, Ende der 3. Urinsammlung	11:00
+4:30	Blutentnahme	11:30
+5:00	Blutentnahme	12:00
+6:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Ende der 4. Urinsammlung, Aufnahme eines standardisierten Mittagessens, ab diesem Zeitpunkt darf das Bett (aber nicht die Probandenstation) wieder verlassen werden	13:00
+7:00	Blutentnahme	14:00
+8:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Verabreichung von 240 ml Wasser, Ende der 5. Urinsammlung	15:00
+9:00	Aufnahme einer standardisierten Zwischenmahlzeit	16:00
+10:00	Blutentnahme, Verabreichung von 240 ml Wasser, Ende der 6. Urinsammlung	17:00
+12:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Ende der 7. Urinsammlung, Aufnahme einer standardisierten Abendmahlzeit	19:00
+16:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Ende der 8. Urinsammlung	23:00
+24:00	Blutentnahme, Frage nach unerwünschten Ereignissen, Ende der 9. Urinsammlung, Angebot eines Frühstücks, Entlassung aus der Probandenstation	07:00
+36:00	10. Urinsammlung und Abgabe des Urins in der Probandenstation	19:00
+48:00	11. Urinsammlung und Abgabe des Urins in der Probandenstation	07:00
+72:00	12. Urinsammlung und Abgabe des Urins in der Probandenstation	07:00

### 2.3.2 Probennahme

**3 Minuten vor** sowie **0:15, 0:30, 0:45, 1:00, 1:15, 1:30, 1:45, 2:00, 2:20, 2:40, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00, 10:00, 12:00, 16:00 und 24:00 Stunden** nach Beginn des Verzehrs wurden Blutproben von je 8 ml **stationär** entnommen. Für die Blutentnahme wurden 9 ml Li<sup>+</sup>-heparinisierte Röhrchen verwendet. Die für jeden Probanden individuellen Zeiten der Blutentnahme wurden in den Case Report Forms (CRFs) dokumentiert:

Blutentnahme	
Entnahmesystem	Sarstedt Monovetten [9 ml], Entnahmeevolumen: 8 ml
Kontrolle des Etiketts	⇒ Studienbezeichnung ⇒ Probandennummer ⇒ Probennummer [Abnahmezeitpunkt]

Kurz **vor Einnahme** der acrylamidreichen Nahrung sowie **nach 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12, 12-16, 16-24, 24-36, 36-48 und 48-72 Stunden** wurden **Urinproben von je 24 ml** abgegeben und gesammelt. Urinproben zu den Zeiten **24-36, 36-48 und 48-72 Stunden** wurden jeweils **ambulant** gesammelt und in der Probandenstation abgegeben.

### 2.3.3 Bearbeitung und Handhabung der Urin- und Blutproben

Die Behandlung der Blutproben erfolgte gemäß den Richtlinien der *KPH SOP 3020* „Behandlung von Blut- und Plasmaproben“. Die Monovetten samt Blutproben wurden in die Tischzentrifuge gestellt und bei 3200 Umdrehungen/min für die Dauer von 10min abzentrifugiert. Die Beschleunigung betrug 1992g und die Temperatur 4°C (Tischzentrifuge Funktion Line, Labofuge 400, Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf). Nach der abgeschlossenen Zentrifugation wurden Plasmaproben in die 2 ml Plasmaröhrchen abpipettiert (Eppendorf-Gefäße). Die erforderliche und angegebene Pipetteneinstellung von 650 µl sowie die Etiketten der Plasmaröhrchen wurden noch einmal kontrolliert, die der Zuordnung der Proben zu den 6 Probanden dienten. Für jeden Probanden standen 4 Aliquots (A, B, C und D) zur Verfügung. 500 µl Plasma war das Standardvolumen in jedem Röhrchen. Der Rest ist gleichmäßig auf alle Röhrchen verteilt worden.



Es wurde für jede Flasche das Leergewicht zur Bestimmung des Urinnettogewichtes notiert. Während der Sammelperiode und bis zur letzten ambulanten Urinabgabe wurden die Urinproben im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Nach dem Ende jeder Sammelperiode wurde das Gewicht der Flasche bestimmt und dokumentiert. Die Waage (Typ Kern EW6000-1M) wurde vor jeder Gewichtsbestimmung austariert. Am Ende der Sammelperiode wurde das Vollgewicht (Leergewicht Flasche + Urin) berechnet. Es wurden Einmalpipetten (5 ml) mit Pipettierhilfe benutzt, wobei die Pipettierhilfe vor Arbeitsbeginn kontrolliert wurde. Die zur Verfügung gestellten Proberöhrchen (Urinröhrchen A, B und C) hatten je ein Gesamtvolumen von 13 ml und waren entsprechend beschriftet. Die Aliquots A, B und C wurden mit je 8 ml Urin befüllt und dann wie folgt verfahren:

- Sammelflasche zur Homogenisierung vor dem Pipettieren bei geschlossenem Deckel ohne Schaumbildung zwei- bis dreimal um 360° drehen
- Deckel des Röhrchens nach dem Pipettieren sofort schließen
- Pipette nach jeder Probe wechseln
- Pipettierliste ausfüllen

Für die späteren Messungen wurden die Proben A bis C im Gefrierschrank (VX S 380 Jouan S A, S<sup>t</sup>. Heblain, Frankreich) bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

#### **2.3.4 Dokumentation**

Die Dokumentation der einzelnen Abläufe der Studie erfolgte getrennt für jeden Studienteilnehmer und formgerecht in den entsprechenden Studienunterlagen (*CRFs*, *Case Report Forms*). Darin wurden vom zuständigen Arzt persönliche Daten zur Person eingetragen sowie die Ergebnisse der Voruntersuchung einschließlich der Angaben zu den Ein- und Ausschlusskriterien als Begründung für die Studienteilnahme aufgeführt:

- Ergebnisse der Vor- und Nachuntersuchung (Initialen, Geburtsdatum, klinische Laborparameter, körperliche Untersuchung, Vitalzeichen)
- Einnahmezeit der acrylamidreichen Nahrung
- Entnahmezeiten der Blut- und Urinproben
- Uhrzeit der Mahlzeiten
- Unerwünschte Ereignisse

### 2.3.5 Analytik der Urinproben

Die Urinproben der gesamten Sammelperioden wurden vom Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung in Nürnberg-Heroldsberg (IBMP) auf den Gehalt von unverändertem Acrylamid analysiert und den Probanden zugeordnet. Die Konzentrationsmessungen für GAMA und AAMA wurden im Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin (IPASUM) in Erlangen durchgeführt. In beiden Einrichtungen wurde das wie zuvor im Institut für Pharmakologie in Köln für die Referenz-Acrylamidbestimmungen in den Studienchips (Kapitel 2.1.3) eingesetzte LC-MS/MS-Verfahren, jedoch in modifizierter Form für die Urinbestimmungen angewendet.

#### 2.3.5.1 Konzentrationsmessungen von Acrylamid und Glycidamid

Die Messung von unverändertem Acrylamid im Urin der 6 Studienteilnehmer wurde mit einer dafür speziell entwickelten LC/MS-MS Methode durchgeführt. Die Vorbereitung und Aufarbeitung der Urinproben für die LC-MS/MS-Analytik umfassten die Extraktion, die Aufreinigung und die Konzentrierung des Analyten.

##### Probenaufarbeitung

- *die Urinproben wurden geschüttelt und gemischt*
- *es wurden 6 ml Urin von jeder Probe entnommen*
- *150 µl des internen Standards sowie einer Pufferlösung wurden hinzugegeben*
- *die Gefäße wurden fest verschlossen und für 15 min geschüttelt und gemischt*
- *danach erfolgte die flüssige Extraktion von Acrylamid*
- *200 µl der oberen organischen Phase des Extraktes wurden entnommen und unter Stickstoff (N<sub>2</sub>) bei 35 °C verdampft*
- *vom Probenrückstand wurden je 20 µl abgenommen, in die entsprechenden Gefäße überführt und zur Messung eingesetzt*

## Geräte

Das LC-MS/MS-System war ein PE Sciex API vom Typ 3000 (Sciex API 3000, Applied Biosystems Foster City, CA, USA, Perkin Elmer, Toronto, Ontario, Kanada).

## MS/MS-Parameter

- positive Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI<sup>+</sup>) mit der Spannung: 4,5 kV
- Temperatur der Heizkapillare: 300° C
- Kollisionsgas: Stickstoff (N<sub>2</sub>)

## Nativer und interner Standard

Es wurden zunächst die notwendigen *nativen Standards* hergestellt. Die für die Einschätzung der Qualität des Verfahrens zur Detektion und zur Analyse von Acrylamid und Glycidamid gewählten *internen Standards* sollten bekannte Substanzen beinhalten, die den Zielsubstanzen ähnlich sind, aber *a priori* in den Proben nicht vorkommen (vgl. Kapitel 2.1.3).

## Kalibrierung

Die Urinproben wurden gegen eine Reihe von Urinkalibrationsstandards gemessen. Nach Hinzufügen von acrylamidfreiem Urin wurden die Kalibrationsstandards aufbereitet. Aus der Kalibrationskurve wurde eine Minimalkonzentration von 1 ng/ml Acrylamid im Urin ermittelt. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Konzentration von Acrylamid und internem Standard festzustellen. Die Kalibrationslinearität im Urin lag zwischen 1 und 100 ng/ml. Die Bestimmungsgrenzen waren identisch mit den niedrigsten Kalibrierungswerten.

## Validierung

Wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben, ergaben sich für die *Interday-Präzision (%RSD)* Werte von 1,1 % (1000 ng/ml), 3,3 % (500 ng/ml), 3,1 % (50 ng/ml) und 6,1 % (5 ng/ml) als Maß für die Messqualität der Urinproben. Die Richtigkeit des Acrylamidstandards lag in einem Bereich von 98,6 bis 101,4 %.

### Quantitative Bestimmungsgrenze

Die quantitativen Bestimmungsgrenzen (*limits of quantification, LOQ*) wurden für unverändertes Acrylamid und seinen Metaboliten Glycidamid wie folgt festgelegt:

unverändertes Acrylamid (AA)	$\geq 0,5 \text{ ng/ml}$	(System: <i>API 3000</i> )
Glycidamid (GA)	$\geq 2,5 \text{ ng/ml}$	(System: <i>API 3000</i> )

### LC-MS/MS-Analytik

Die Chromatographie lief unter *Reversed-Phase*-Bedingungen ab. Die Elution erfolgte isokratisch (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.1.3). Das isokratische Lösungssystem enthielt Wasser, Acetat und einen organischen Modifikator als mobile Phase. Die *m/z*-Verhältnisse waren für Arylamid *m/z* 72 → *m/z* 55 und für den internen Standard *m/z* 75 → *m/z* 58. Unter den genannten Analysebedingungen betrug die durchschnittliche Retentionszeit für Acrylamid und den internen Standard 2,4 min (Sörgel et al., 2002).

## **2.3.5.2 Konzentrationsmessungen von AAMA und GAMA**

### Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung orientierte sich im Wesentlichen dem bereits für Acrylamid beschriebenen Procedere (Kapitel 2.3.5.1) mit den folgenden Modifikationen:

- von jeder Probe wurden 4 ml entnommen und in 10 ml Gefäße überführt
- 40 µl Methansäure, 4 ml Ammonium-Puffer (50 mmol/l, pH 2,5) sowie 30 µl interner Standard wurden zu jeder Probe (4 ml) gegeben

### Geräte

Das LC-MS/MS-System war ein PE Sciex API vom Typ 2000 (Sciex API 2000, Applied Biosystems, Langen, Deutschland).

### MS/MS-Parameter

- positive Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI<sup>+</sup>) mit der Spannung: 4,0 kV
- Temperatur der Heizkapillare: 475 °C
- Kollisionsgas: Stickstoff (N<sub>2</sub>)

### Nativer und interner Standard

Der erste Schritt vor der Probenaufarbeitung bestand auch hier in der Vorbereitung nativer Standards. Die folgenden *nativen Standards* wurden hergestellt:

AAMA	10 mg	AAMA-Lösung 1,0 g/l
GAMA	10 mg	GAMA-Lösung 1,0 g/l
Lösungsmittel: Methanol	jeweils 10 ml	

Methanol diente als Lösungsmittel für die AAMA und GAMA. Die hergestellten Lösungen wurden in Glasfläschchen überführt, mit braunem Teflon bedeckt und bei einer Temperatur von +4°C bis zur weiteren Anwendung aufbewahrt. Anschließend wurden die für die Messungen benötigten nativen Standardlösungen I und II hergestellt. Zu diesem Zweck sind die beiden jeweiligen AAMA- und GAMA-Lösungen verdünnt worden:

Standardlösung I	1:10 Verdünnung	100 mg/l
Standardlösung II	1:100 Verdünnung	10 mg/l

Die *internen Standards* waren:

d <sub>3</sub> -AAMA	10 mg/l	5 mg (interner Standard I)
d <sub>3</sub> -GAMA	10 mg/l	5 mg (interner Standard II)
Lösungsmittel: Methanol	100 mg/l	50 ml

### Kalibrierung

Mit Hilfe der Standardlösungen I und II wurde eine Reihe von Kalibrierungsstandards angefertigt, die der Ermittlung von Abweichungen zwischen der gesuchten Substanz und dem internen Standard dienen. Dadurch konnten äußere Einflüsse ausgeschlossen werden, welche Messungen mit hoher Präzision garantieren. Zu diesem Zweck wurden die beiden Lösungen auf Konzentrationen zwischen 5 bis 100 µg/l mit Urin und Wasser verdünnt. Die Kalibrationskurven zeigten einen linearen Verlauf im gewählten Konzentrationsbereich (Korrelationskoeffizient > 0,99), so dass die Geradengleichung den mathematischen Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration des Analyten hinreichend beschreiben konnte. Die Kalibrierungen wurden in folgenden Bereichen durchgeführt:

AAMA	von 16,2 µg/l bis 162 µg/l
GAMA	von 20,2 µg/l bis 202 µg/l

## Validierung

Zur Methodenvalidierung wurden Eich- und Kontrollproben hergestellt. Diese wurden zur Qualitäts- und Präzisionskontrolle herangezogen, so dass der optimale Konzentrationsbereich für AAMA und GAMA festgelegt werden konnte.

Eine Validierungsmessung umfasste die Analyse von 8 Eichreihen. Die Messreihe für die Proben mit niedrigen Konzentrationen wurden an 6, jene mit hohen Konzentrationen an 10 verschiedenen Tagen durchgeführt. Um mögliche Matrixeffekte in den Urinproben auszuschalten und eine hohe Präzision und Richtigkeit der Messdaten zu gewährleisten, wurden außerdem acht verschiedene Urinproben mit einer Kreatininkonzentration von 0,15 bis 1,74 g/l analysiert.

Für die *Präzision* (%RSD, inter/intraday) ergaben sich die Wertebereiche:

AAMA	<i>von 3,8 % bis 4,9 % (interday)</i>	<i>162 µg/l / 16,2 µg/l</i>
	<i>von 2,2 % bis 2,9 % (intraday)</i>	<i>162 µg/l / 16,2 µg/l</i>
GAMA	<i>von 4,8 % bis 6,0 % (interday)</i>	<i>20,2 µg/l / 202 µg/l</i>
	<i>von 5,3 % bis 6,2 % (intraday)</i>	<i>202 µg/l / 20,2 µg/l</i>

Die Wiederfindungsraten (Recovery) lagen in folgenden Bereichen:

AAMA	<i>von 88 bis 113 % (interday)</i>	<i>96 % (Mittelwert)</i>
	<i>von 92 bis 109 % (intraday)</i>	<i>99 % (Mittelwert)</i>
GAMA	<i>von 93 bis 112 % (interday)</i>	<i>101 % (Mittelwert)</i>
	<i>von 89 bis 115 % (intraday)</i>	<i>101 % (Mittelwert)</i>

Die Richtigkeit der Messungen bei AAMA und GAMA ist gleich den Wiederfindungsraten gesetzt worden (*Boettcher et al., 2005b*).

## Quantitative Bestimmungsgrenze

Die quantitativen Bestimmungsgrenzen ergaben sich zu (vgl. Kapitel 2.3.5.1):

AAMA	<b>≥ 5 ng/ml</b>	<i>(System: API 2000)</i>
GAMA	<b>≥ 5 ng/ml</b>	<i>(System: API 2000)</i>

### LC-MS/MS-Analytik

Die Analyse der Proben erfolgte auch hier mittels LC-MS/MS unter *Reversed-Phase*-HPLC-Bedingungen. Die mobile Phase enthielt 95 % entionisiertes Wasser, 5% Ameisensäure (1% v/v) und 5% Acetonitril als mobile Phase. Die gewählten m/z-Verhältnisse für die massenspektrometische Fragmentierung der Analyten waren:

AAMA:  $m/z$  230  $\rightarrow$   $m/z$  104

d<sub>3</sub>-AAMA:  $m/z$  236  $\rightarrow$   $m/z$  107

GAMA:  $m/z$  249  $\rightarrow$   $m/z$  120

d<sub>3</sub>-GAMA:  $m/z$  252  $\rightarrow$   $m/z$  123

## 2.3.6 Auswertung

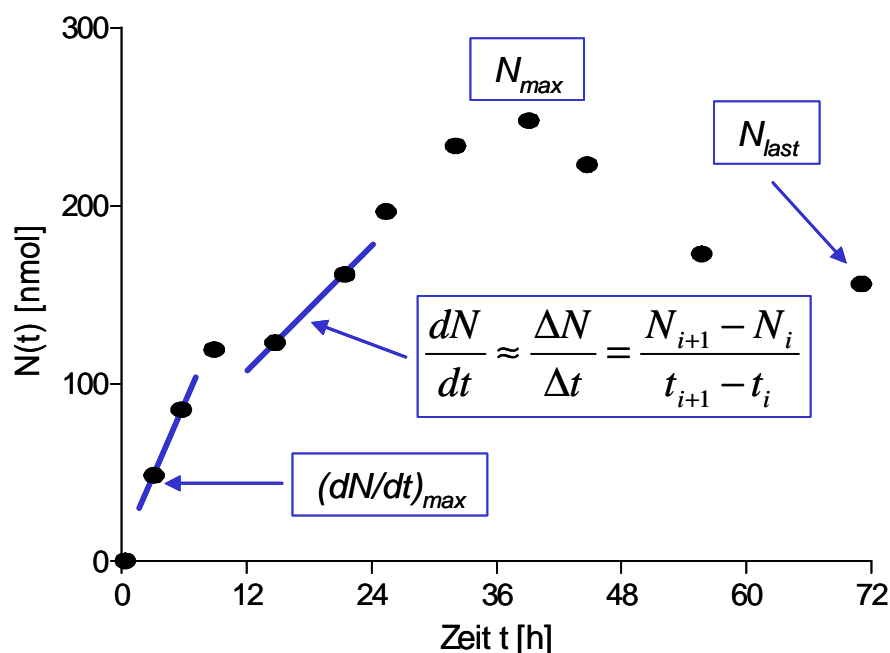
Die pharmakokinetische Analyse renaler Eliminationsprozesse benötigt die genaue Kenntnis über die zeitlichen Veränderungen der im Urin ausgeschiedenen Stoffmengen für jeden einzelnen Probanden. Die Auswertungen umfassen daher quantitative Beschreibungen der Stoffmengen-Zeitkurven, Funktionsanpassungen dieser Zeitverläufe sowie Vergleiche der bestimmten Parameter und Variablen zwischen den Probanden mittels statistischer Verfahren.

### 2.3.6.1 Pharmakokinetische Parameter und Kurvenanpassungen

#### Urinspiegelkurven

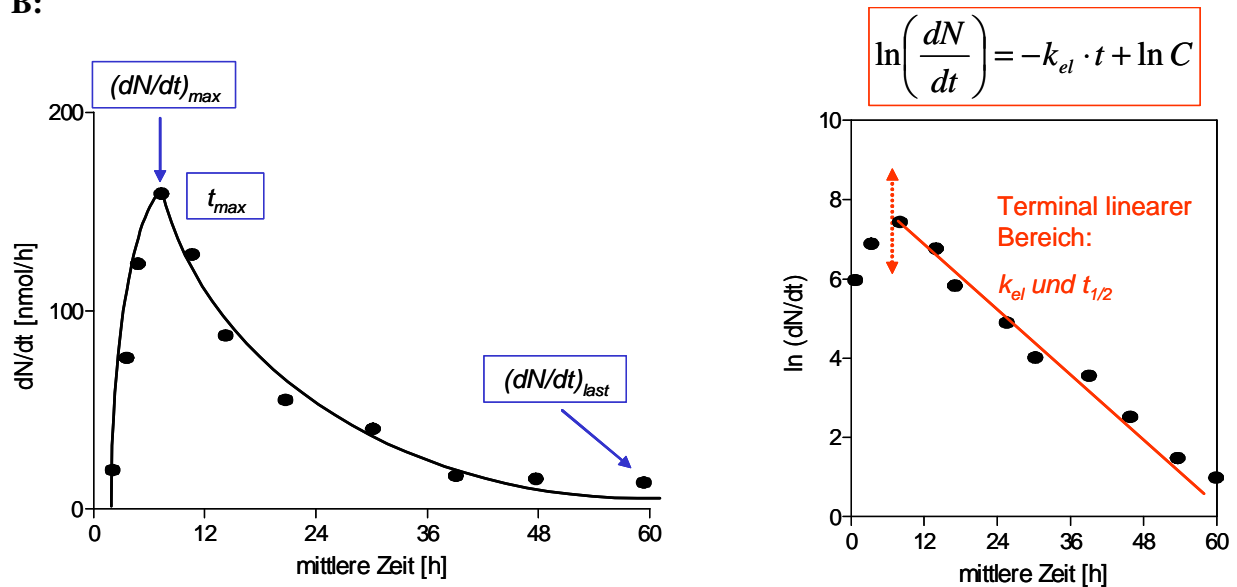
Urinspiegelkurven sind Mengen-Zeitkurven. Für die Erstellung der Urinspiegelkurven wurden die aus den Massensignalen bestimmten Substanz-Konzentrationen herangezogen. Die Umrechnung in eine Massengröße, molare Stoffmenge sowie in den prozentualen Anteil der Ausgangsdosis als Maße für die renale Ausscheidung erfolgten mittels der im Zeitgang der Ausscheidung gesammelten Urinvolumina und -gewichte (Gl. 1). Insgesamt teilte sich die Urinsammlung in 11 Zeitintervalle auf (Nullpunkt bei  $t=0$ ). Die pharmakokinetischen Parameter wurden aus den absoluten (Abb. 8) und kumulativen (Abb. 9) molaren Stoffmengen-Zeitkurven ermittelt.

A:





**B:**



**Abb. 8:** Bestimmung von Exkretionsraten und Geschwindigkeitskonstanten aus Urinspiegelkurven. **A:** Auftragung der molaren Stoffmengen gegen die Endzeitpunkte der Sammelintervalle. Die Exkretionsraten  $dN/dt$  sind als Tangentensteigungen exemplarisch eingezeichnet. **B:** Exkretionsraten-Zeit-Diagramm (**links**) und halblogarithmische Darstellung durch LOG-Transformation der Exkretionsraten (**rechts**). Aus der linearen Regression der fallenden Gerade (**rote Linie**) werden die Eliminationshalbwertskonstante  $k_{el}$  und die terminale Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  berechnet.

### Absolut und prozentual ausgeschiedene Stoffmenge N in [nmol] oder [%]

Die absolut ausgeschiedene Stoffmenge wird aus der im Urin bestimmten Konzentration  $C(t)$ , dem Urinvolumen ( $V_{URIN} = 24ml$ ) und dem Molekulargewicht der Zielsubstanz  $MW$  bestimmt. Die **absolute Ausscheidungsfunktion** liefert die absolute Urinspiegelkurve und lautet:

$$N(t) = \frac{C(t) \cdot V_{URIN}(t)}{MW} \quad (1)$$

$N(t)$  wird auch als **Amount excreted (Ae)** bezeichnet. Für den prozentualen Anteil der Ausgangsdosis folgt dann die **fraktionelle Ausscheidungsfunktion**:

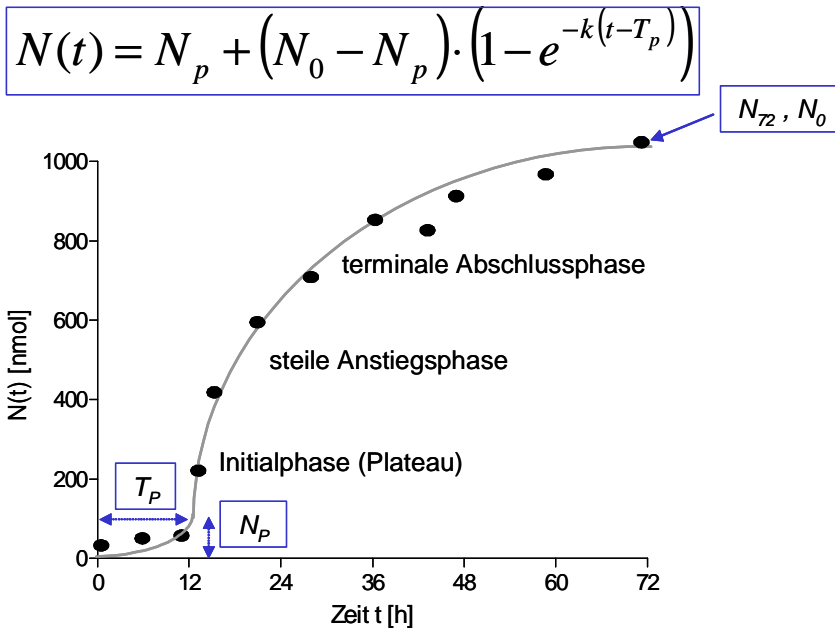
$$\% N(t) = \frac{N(t)}{\text{Ausgangsdosis}} \cdot 100 \quad (2)$$

Die Urinspiegelkurven  $N(t)$  (Gl. 1) und  $\%N(t)$  (Gl. 2) werden nicht nur **absolut** (Abb. 8), sondern auch **kumulativ** (Abb. 9) bis zum Ende der Urinsammlungen verfolgt. Dadurch können der Übergang in eine maximale Ausscheidungsphase aufgelöst und das kumulative Ausscheidungsmaximum berechnet werden.

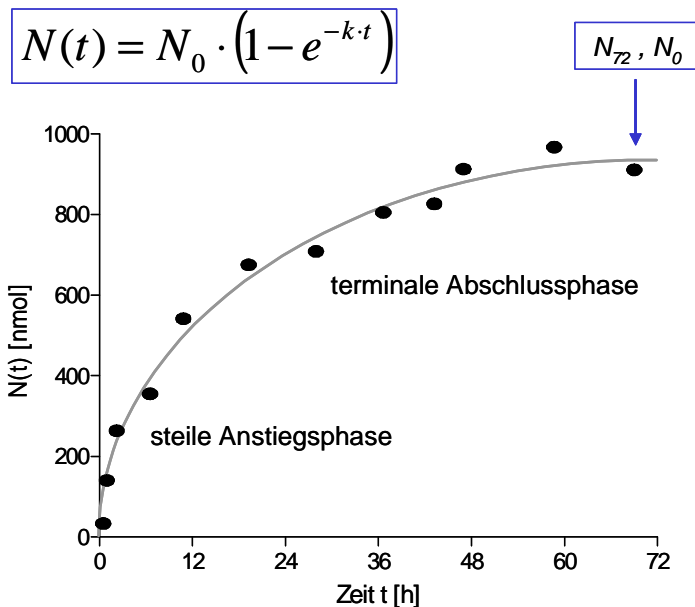
**Ausscheidungsmaximum  $N_{72}$  und letzte quantifizierbare Stoffmenge  $N_{last}$  in [nmol]**

Das Ausscheidungsmaximum  $N_{72}$  repräsentiert die am Ende der *kumulativen Urinspiegelkurven* gemessene und abgelesene Stoffmenge (Abb. 9). Dagegen wird die Stoffmenge, die der letzten *quantifizierbaren Konzentration* in der Messreihe entspricht, als  $N_{last}$  bezeichnet (Abb. 8A).

**A:**



**B:**



**Abb. 9:** Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten aus kumulativen Urinspiegelkurven. Durch Kurvenanpassungen mittels monoexponentieller Wachstumsfunktionen können die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  und die Ausscheidungsmaxima  $N_0$  approximiert werden.  $N_{72}$  ist das abgelesene Maximum am Ende der Messungen. **A:** Modell mit zwei Wachstumsphasen und zusätzlich initialer Ausscheidungsphase (Plateau), **B:** Modell mit nur zwei Ausscheidungsphasen und fehlendem Plateau.

### Exkretionsraten $dN/dt$ in [nmol/h]

Aus den *absoluten Urinspiegelkurven* werden die Tangentensteigungen (Differentialquotienten) bestimmt (Abb. 8A). Diese liefern dann die gesuchten Exkretionsraten nach der Vorschrift:

$$\frac{dN}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left( \frac{\Delta N}{\Delta t} \right) \approx \frac{N_{i+1} - N_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (3)$$

Die *maximale Exkretionsrate*  $(dN/dt)_{max}$  und der zugehörige *Zeitpunkt der maximalen Exkretionsrate*  $t_{max}$  werden aus der *absoluten Urinspiegelkurve* direkt abgelesen (Abb. 8A).

### Terminale Eliminationshalbwertszeit in [h] und Eliminationshalbwertskonstante in [h<sup>-1</sup>]

Zur Bestimmung dieser beiden Parameter werden die Exkretionsraten  $(dN/dt)$  gegen die mittleren Zeitpunkte der Sammelintervalle  $\frac{(t_i + t_{i+1})}{2}$  aufgetragen (Abb. 8B). Nach *halblogarithmischer Transformation* der Exkretionsraten  $\ln(dN/dt)$  wird für den linear abfallenden Bereich eine lineare Regression durchgeführt (Abb. 8B). Der daraus ermittelte Steigungsfaktor repräsentiert die *terminale Eliminationshalbwertskonstante*  $k_{el}$ , die nicht der *allgemeinen Geschwindigkeitskonstante*  $k$  entsprechen muß (vgl. Gln. 6 und 7). Für die *terminale Eliminationshalbwertszeit*  $t_{1/2}$  folgt unmittelbar:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}} \quad (4)$$

### $N_\infty$ in [nmol] oder [%]

Die gegen unendlich extrapolierte ausgeschiedene Stoffmenge  $N_\infty$  errechnet sich nach folgender Beziehung:

$$N_\infty = N_{72} + \frac{\left( \frac{dN}{dt} \right)_{last}}{k_{el}} \quad (5)$$

$\left( \frac{dN}{dt} \right)_{last}$  ist die letzte Exkretionsrate am Ende der Urinsammlung (Abb. 8B).

### Kumulative Kurvenanpassungen der Urinspiegelkurven („cumulative fitting“)

Die kumulativen molaren Urinspiegelkurven gehorchen einerseits einer mathematisch exponentiellen Wachstumsfunktion mit initialer Plateauphase. Diese Plateauphase kann als Verzögerung der renalen Exkretion interpretiert werden (**Modellfunktion 1, siehe Abb. 9A**):

$$N(t) = N_p + (N_0 - N_p) \cdot \left(1 - e^{-k(t-T_p)}\right) \quad (6)$$

Andererseits ist auch eine Approximation durch eine Exponentialfunktion mit fehlender Plateauphase möglich (**Modellfunktion 2, siehe Abb. 9B**):

$$N(t) = N_0 \cdot \left(1 - e^{-k \cdot t}\right) \quad (7)$$

Dabei sind die Parameter wie folgt definiert:

- $N(t)$  := kumulative Ausscheidungsfunktion (= kumulative Urinspiegelkurve)
- $N_0$  := Maximum der Ausscheidungsphase (Ende der Ausscheidung  $\approx N_\infty$ )
- $N_p$  := Plateau-Stoffmenge der initialen Ausscheidungsphase (Verzögerungsphase)
- $T_p$  := Plateau-Zeitdauer der initialen Ausscheidungsphase (Verzögerungsphase)
- $k$  := allgemeine Geschwindigkeitskonstante (Halbwertszeitkonstante  $\tau_{1/2} = \ln(2)/k$ )

Die Kurvenanpassung erfolgt über das **Non-Linear Least-Square Newton-Gauss Konvergenzverfahren (NLLSQ)**. Die **Güte** der Kurvenanpassung wird mittels der Summe der quadrierten Fehlerquadrate  $SSQ^{(E)}$  (*sum of squared errors*<sup>2</sup>) und  $R^2$  beurteilt. Ein weiteres Maß für die Qualität der Kurvenanpassung ist die **Exaktheit**  $S_{y,x}$  (*residual standard deviation*), welche sich durch die Standardabweichung der summierten Fehlerquadrate definiert.

$$R^2 = 1 - \frac{SSQ^{(E)}}{SSQ^{(Y)}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (F(i)_{obs} - F(i)_{calc})^2}{\sum_{i=1}^n (F(i)_{obs})^2} \quad (8)$$

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{SSQ^{(E)}}{n-p}} \quad (9)$$

mit  $n$  = Anzahl der Daten- bzw. Zeitpunkte,  $p$  = Anzahl der Funktionsparameter (Gln. 6-7).

---

<sup>2</sup> Die Summe der quadrierten Fehlerquadrate als auch die Summe der quadrierten Y-Datenwerte werden in der englischsprachigen Literatur als SSE (sum of squared errors) bzw. SS (sum of squares) bezeichnet.

### 2.3.6.2 Deskriptive Statistik

Mit Hilfe der Statistik können gemessene Daten ausgewertet, interpretiert und verglichen werden. Dazu bedient man sich deskriptiver und explorativer Verfahren.

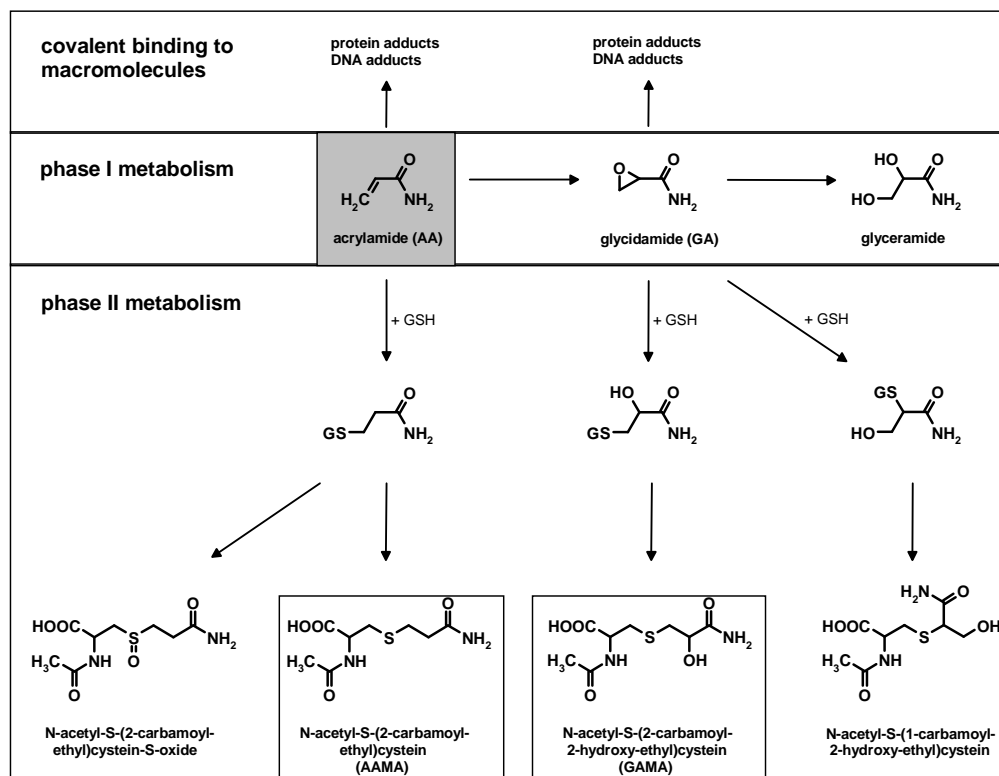
#### *Deskriptive Statistik*

Alle Parameter und Kennwerte wurden über das Probandenkollektiv einzeln und gepoolt als arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen  $\sigma_n$  (*SD*), Standardfehlern (*SEM*) und Variationskoeffizienten und als Mediane, Minima und Maxima tabelliert. Für statistische Vergleiche und Modellvorhersagen wurden Student t Tests sowie mehrfaktorielle Varianzanalysen (*ANOVA*) durchgeführt.

Für alle Arten von Kurvenanpassungen und statistischen Analysen wurden die Programme WinNonlin Professional pharmacokinetic software 4.01 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA), SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, CA, USA) sowie Microsoft EXCEL verwendet.

### 3. Ergebnisse

Die Aufklärung der toxischen Effekte von Acrylamid, seines Phase-I-Metaboliten Glycidamid und seiner beiden Phase-II-Metabolite AAMA und GAMA (Abb. 10) hängt zum einen davon ab, wieviel der eingenommenen Acrylamidmenge im Urin wiedergefunden wird. Zum anderen setzt die Beurteilung solcher toxischer Wirkungen von Acrylamid auch dessen Wechselwirkung mit den anderen Metaboliten voraus, so dass auch das renale Ausscheidungsverhalten von Glycidamid, AAMA und GAMA genauer überprüft werden muß. Daher ist die Messung dieser drei Derivate im Urin notwendig, damit sie mit Acrylamid im Rahmen einer pharmakokinetischen Analyse verglichen und voneinander abgegrenzt werden können. Der Nachweis des aus Acrylamid, vermutlich auch im Menschen über *CYP2E1* katalysierten Glycidamids ist jedoch nicht möglich gewesen, weil die Ausscheidungsmengen zu gering waren. Eine Beurteilung des Glycidamid-Stoffwechsels mit seinen möglichen toxischen Wirkungen (Abb. 10) ist deshalb nur eingeschränkt aus der Synopsis der Eliminationseigenschaften von Acrylamid, AAMA und GAMA möglich. Das Datenspektrum umfasste die Konzentrations- und Mengenbestimmungen von Acrylamid in den Nahrungsproben sowie die Messungen von Acrylamid und seiner Metabolite im Urin.



**Abb. 10:** Übersichtsschema des Metabolismus von Acrylamid (teilweise adaptiert aus *Boettcher et al. 2005*, *Dybing et al. 2005* und *Fennell et al. 2005*). In der vorliegenden Studie wurde die Urin-Exkretion von Acrylamid, Glycidamid, AAMA und GAMA untersucht. Glycidamid konnte wegen der unterhalb der Bestimmungsgrenze von 2,5 ng/ml liegenden Urinkonzentrationen nicht analysiert werden.

### 3.1 Bestimmung des Acrylamidgehaltes in Studienchips

Die entwickelte LC-MS/MS Analytik diente zunächst der Bestimmung der individuellen Acrylamid-Dosis. Die Acrylamid-Konzentrationen wurden direkt nach der vollständigen Herstellung der Studienchips (Kapitel 2.1.1) sowie nach Ende der Studie gemessen (Kapitel 2.3). Eine solche Nachbestimmung der Studienchips liefert einen geeigneten Vergleichsmaßstab für die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der vor der Studie ermittelten Acrylamid-Gehalte in den Studienchips und der dadurch oral aufgenommenen Mengen.

#### 3.1.1 Konzentrations- und Mengenbestimmungen

Die Doppelbestimmung der Studienchips bestätigt keine relevanten Verluste des Acrylamidgehaltes während der Lagerung der Studienchips aufgrund von Trocknungsverlusten, weil sich nur geringe Unterschiede zwischen den vor und nach der Studie gemessenen Acrylamidgehalte finden lassen (Tab. 6). Deshalb kann die angenommene Acrylamidmenge in der oral verabreichten Nahrungsprobe als zuverlässiger Ausgangspunkt für alle weiteren Analysen der Urinausscheidungen herangezogen werden. Für den mittleren Acrylamidgehalt in den Studienchips ergibt sich ein Referenzwert von  $6,3 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$  (Tab. 7).

**Tab. 6:** Acrylamidgehalt in Studienchips vor und nach der Studie

Studienchips	Acrylamidkonzentration (vor der Studie) [ng/ml]	Acrylamidgehalt (vor der Studie) [ng/g]	Korrigierter Acrylamidgehalt (nach der Studie) [ng/g]
1A	298	5962	5914
1B	282	5644	5599
2A	250	5008	4968
2B	254	5075	5034
3A	348	6958	6902
3B	284	5685	5640
4A	386	7717	7655
4B	386	7728	7666
5A	344	6870	6815
5B	310	6198	6148
<b>Mittelwert</b>		<b>6284</b>	<b>6234</b>
<b>SD</b>		<b>995</b>	<b>987</b>
<b>Quadratsummenabweichung</b>		<b>8,9E+06</b>	<b>8,8E+06</b>

Der Acrylamidgehalt der Studienchips wurde vor Studienbeginn und unmittelbar nach der Studie gemessen. Bei der zweiten Bestimmung wurde der Trocknungsverlust durch die Kühlung bei +4 °C mit berücksichtigt. Daraus resultiert ein zweiter korrigierter Acrylamidgehalt. Die Abweichungen sind minimal und nicht signifikant.

**Tab. 7: Studienchips vor der Studie als Referenzproben**

Mittelwert [ng/g]	6284
SD [ng/g]	995
Variationskoeffizient [%]	15,8

Mittlerer Acrylamidgehalt in den Studienchips als Grundlage für die Bestimmung der individuellen Acrylamid-Dosis für jeden Probanden.

### 3.1.2 Individuelle Aufnahmedosis von Acrylamid

Aus dem mittleren Acrylamidgehalt der Referenzproben leitet sich direkt die Nahrungsportion für jeden Probanden von durchschnittlich 150 g ab, die einer mittleren Acrylamid-Dosis von 938  $\mu\text{g}$  (13,3  $\mu\text{mol}$ ) entspricht (Tab. 8A) und damit die Studienvorgabe von 1 mg erfüllt. Zur Bestimmung der individuellen Aufnahmedosis von Acrylamid werden die Körpergewichte der Probanden herangezogen. Die aufgenommene Acrylamid-Dosis beträgt im Durchschnitt 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht (Tab. 8B). Daraus ergibt sich eine tägliche Dosis von 4,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht, die im Bereich der von der Bevölkerung durchschnittlich mit der Nahrung aufgenommenen Acrylamidmenge von 0,5 bzw. 3,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  liegt (vgl. Tab. 2, Kapitel 1.3).

**Tab. 8 : Individuelle Aufnahmedosis von Acrylamid****A:**

Proband	Abgewogene Menge Studienchips [g] (Nahrungsproben)	Menge Acrylamid [ $\mu\text{g}$ ]
#1	150,3	937
#2	150,4	938
#3	150,6	939
#4	150,4	938
#5	150,5	938
#6	150,3	937

**B:**

Proband	Menge Acrylamid [ $\mu\text{g}$ ]	Körpergewicht [kg]	Individuelle Dosis Acrylamid [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
#1	937	64,6	14,50
#2	938	55,2	16,98
#3	939	80	11,73
#4	938	75,2	12,46
#5	938	97,2	9,65
#6	937	80,09	11,69
<b>Mittelwert</b>	<b>937,8</b>	<b>75,4</b>	<b>12,84</b>
<b>SD</b>	<b>0,75</b>	<b>14,4</b>	<b>2,56</b>

**A:** Einstellung einer konstanten mittleren Acrylamid-Dosis von 938 $\mu\text{g}$  in durchschnittlich 150g Studienchips, die von den Probanden im Laufe der Studie einmalig verzehrt wurden. **B:** individuelle Acrylamid-Dosis in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht. Die spezifischen Kenndaten der Probanden sind in Tab. 4 (Kapitel 2.2.2) aufgeführt.



### 3.2 Individuelle Ausscheidungen von Acrylamid und seiner Metabolite

Nur ein geringer Teil des oral aufgenommenen Acrylamids wurde in unveränderter Form, sondern vorwiegend als sein Metabolit AAMA im Urin ausgeschieden. Vor der oralen Einnahme sind weder Spuren von Acrylamid noch von Glycidamid im Urin als störende Hintergrundsignale gefunden worden, so dass keine Hintergrundkorrekturen erforderlich sind (alle Messwerte unterhalb der jeweiligen Detektionsgrenzen von *0,5 bis 2,5 ng/ml*). Zudem weist Glycidamid während der Sammlungsperiode durchgehend Urinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze von *2,5 ng/ml* jedoch überhalb von *0,5 ng/ml* auf und wird demzufolge nicht quantitativ dargestellt, so dass eine Charakterisierung der Glycidamid-Elimination mit diesen Konzentrationswerten nicht möglich ist.

#### 3.2.1 Nachweis von Acrylamid im Urin

Unmittelbar nach oraler Verabreichung der mittleren Acrylamidmenge von  $938 \pm 1 \mu\text{g}$  lassen sich in den ersten Stunden der Urinsammlungen steil anwachsende Acrylamidmengen und Konzentrationen im Urin der Probanden messen und gesteigerte Acrylamidausscheidungsraten beobachten.

##### 3.2.1.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung

Die höchsten Konzentrationen und Anstiege sind in den Zeitintervallen *0-2h*, *2-4h* und *4-6h* nach oraler Aufnahme erreicht (Tab. 9A-C). Nach *24h* ist bis zum Ende der Urinsammlungen (*72h*) keine Messung der Acrylamidkonzentrationen mehr möglich, weil alle Acrylamid-Peaks unterhalb der Detektionsschwelle von *0,5 ng/ml* liegen (Tab. 9A). Dieser Befund bedeutet, dass unverstoffwechseltes Acrylamid aus dem Körper sehr rasch, nämlich innerhalb eines Tages renal eliminiert wird.

Der Zeitgang der renalen Ausscheidung (Tab. 9B) zeigt drei Spitzenwerte in den ersten drei Sammelintervallen, *0-2h*:  $100\text{nmol}$ , *2-4h*:  $232\text{nmol}$  und *4-6h*:  $135\text{nmol}$  (Tab. 9B). Die daraus ermittelten Exkretionsraten betragen  $50$ ,  $116$  und  $68 \text{ nmol/h}$  für diese Zeiträume (siehe Abb. 8A, vgl. Gl. 3. in Kapitel 2.3.6.1). In den ersten *6h* resultiert damit eine *mittlere Peak-Exkretionsrate* von  $78 \pm 34 \text{ nmol/h}$  ( $n=3$ ), für den gesamten Erfassungszeitraum eine *mittlere Gesamt-Exkretionsrate* von  $36 \pm 40 \text{ nmol/h}$  ( $n=11$ ).

Diese hohe Streuung ( $SD \geq$  Mittelwert) für die Gesamt-Exkretionsrate weist bereits auf das schnelle Abklingen der Acrylamidmengen innerhalb eines Tages hin. Diese Werte werden zum weiteren Vergleich mit dem Ausscheidungsverhalten von AAMA und GAMA benutzt.

Aus den kumulativen zeitlichen Verläufen wird ebenfalls ersichtlich, dass nach 24h die Ausscheidung ihr Maximum erreicht hat und damit beendet ist (Tab. 9C). Insgesamt finden sich im Urin nur 4,4% des aufgenommenen und unverstoffwechselten Acrylamids am Ende wieder. Es ist festzuhalten, dass unverbrauchtes Acrylamid zwar sehr schnell und effektiv aber in nur sehr geringen Mengen – gemessen an der Ausgangsmenge – aus dem Körper entfernt wird.

**Tab. 9: Zeitlich registrierte individuelle Acrylamid-Ausscheidungen im Urin**

**A:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	*	41,6	38,6	28,4	21,4	14,1	7,92	4,26	0,961	*	*	*
2	*	37,2	47,7	27,8	20,3	16,5	8,72	4,22	0,978	*	*	*
3	*	33,8	48,6	23,2	13,3	8,35	4,81	2,13	0,634	*	*	*
4	*	29,4	29,4	17,5	16,1	11,1	7,56	3,44	1,64	*	*	*
5	*	29,7	25,6	23,8	10,7	10,7	6,94	4,88	0,992	*	*	*
6	*	53,8	37,5	23,5	19,4	14,0	7,53	4,73	1,65	*	*	*
N	*	6	6	6	6	6	6	6	6	*	*	*
Mittelwert [ng/ml]	*	37,58	37,87	24,0	16,9	12,46	7,25	3,94	1,14	*	*	*
SD [ng/ml]	*	9,19	9,32	3,92	4,24	2,94	1,33	1,02	0,411	*	*	*
Median [ng/ml]	*	35,5	38,05	23,65	17,75	12,55	7,55	4,24	0,985	*	*	*
Min [ng/ml]	*	29,4	25,6	17,5	10,7	8,35	4,81	2,13	0,634	*	*	*
Max [ng/ml]	*	53,8	48,6	28,4	21,4	16,5	8,72	4,88	1,65	*	*	*

**B:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	*	133,56	364,07	171,07	27,78	51,04	44,24	14,42	4,57	*	*	*
2	*	181,14	212,37	127,69	44,59	39,37	10,65	9,52	4,38	*	*	*
3	*	59,03	139,05	79,34	6,90	3,21	1,83	2,08	0,84	*	*	*
4	*	92,89	307,66	201,89	41,35	13,14	12,77	49,16	11,64	*	*	*
5	*	46,47	133,05	86,66	63,84	35,12	26,52	23,12	5,76	*	*	*
6	*	87,76	234,84	140,12	75,54	36,85	23,70	26,61	5,92	*	*	*
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	*	100,14	231,84	134,46	43,33	29,79	19,95	20,82	5,52	*	*	*
SD [nmol]	*	49,91	91,64	47,52	24,63	17,92	14,93	16,50	3,51	*	*	*
Median [nmol]	*	90,32	223,60	133,90	42,97	35,98	18,23	18,77	5,17	*	*	*
Min [nmol]	*	46,47	133,05	79,34	6,90	3,21	1,83	2,08	0,84	*	*	*
Max [nmol]	*	181,14	364,07	201,89	75,54	51,04	44,24	49,16	11,64	*	*	*

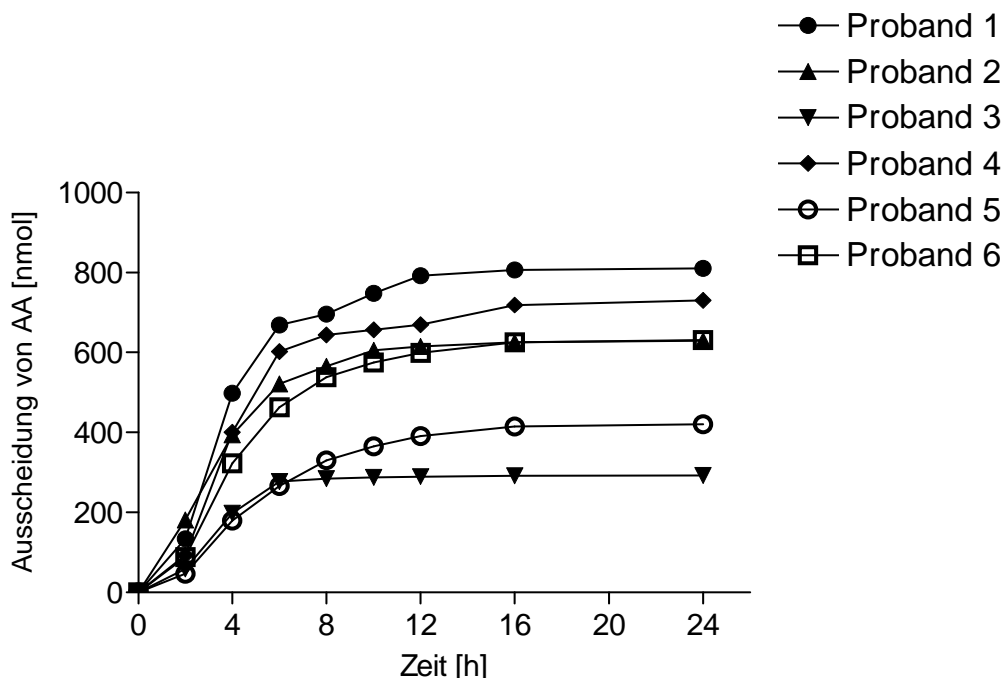
**C:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	*	133,56	497,64	668,71	696,48	747,52	791,76	806,18	810,76	810,76	810,76	810,76
2	*	181,14	393,51	521,19	565,78	605,15	615,80	625,32	629,70	629,70	629,70	629,70
3	*	59,03	198,08	277,42	284,33	287,53	289,36	291,44	292,29	292,29	292,29	292,29
4	*	92,89	400,55	602,44	643,78	656,93	669,69	718,85	730,49	730,49	730,49	730,49
5	*	46,47	179,52	266,17	330,01	365,13	391,66	414,77	420,53	420,53	420,53	420,53
6	*	87,76	322,60	462,72	538,25	575,10	598,80	625,41	631,33	631,33	631,33	631,33
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	*	100,14	331,98	466,44	509,77	539,56	559,51	580,33	585,85	585,85	585,85	585,85
SD [nmol]	*	49,91	124,25	166,28	167,28	176,93	185,44	192,42	194,42	194,42	194,42	194,42
Median [nmol]	*	90,32	358,05	491,95	552,02	590,12	607,30	625,36	630,51	630,51	630,51	630,51
Min [nmol]	*	46,47	179,52	266,17	284,33	287,53	289,36	291,44	292,29	292,29	292,29	292,29
Max [nmol]	*	181,14	497,64	668,71	696,48	747,52	791,76	806,18	810,76	810,76	810,76	810,76

**A:** Acrylamidkonzentrationen [ng/ml], **B:** Ausgeschiedene Acrylamidmenge im Urin [nmol], **C:** Kumulativ ausgeschiedene Acrylamidmenge [nmol]. Für den vollständigen Zeitgang von 0-72 h sind in den jeweiligen 11 Intervallen inklusive des absoluten Startpunktes die Einzelwerte als auch die Mittelwerte, SD, Mediane sowie Minima und Maxima der Ausscheidung angegeben. \* = nicht bestimmbar (unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/ml), N=Anzahl der quantitativ bestimmbar Daten. Molekulargewicht Acrylamid 71,1 g/mol.

### 3.2.1.2 Kinetik der Acrylamid-Elimination

Die kumulative Urinausscheidungsfunktion über den Zeitraum von 24h nach oraler Einnahme bestätigt den schnellen Verlauf der Acrylamid-Elimination (Abb. 11): das Plateau bildet sich deutlich nach 10h heraus, bis sich ein Maximum zwischen 12-24h einpendelt. Diese Ausscheidungskurven sind für jeden der untersuchten Probanden charakteristisch (#1-3: weiblich, #4-6: männlich). Die absoluten molaren Ausscheidungsmengen unterscheiden sich jedoch erwartungsgemäß zwischen den Probanden erheblich mit maximalen Plateauwerten in einem Bereich von 292 nmol (#3) bis 811 nmol (#1). Biologische Unterschiede zwischen den Probanden wie Alter, Geschlecht und Körpergewicht (vgl. Tab. 4, Kapitel 2.2.2) sowie die spezifische Acrylamid-Dosis spielen nach diesen Ausscheidungsprofilen offensichtlich keine Rolle. Die entscheidende Komponente mit messbarem Einfluss auf die renale Elimination ist daher die absolute orale Zufuhr von Acrylamid. Wegen der nicht auf die biologischen Eigenschaften zurückzuführenden interindividuellen Schwankungen in den ausgeschiedenen Mengen ist die Betrachtung von mittleren Acrylamidausscheidungsraten und der weiteren mittleren pharmakokinetischen Parameter gerechtfertigt.



**Abb. 11:** Kinetik der renalen kumulativen Acrylamid-Elimination innerhalb der ersten 24h nach oraler Einnahme einer Acrylamid-Dosis von 13,3  $\mu\text{mol}$ . Die höheren Mengen unveränderten Acrylamids finden sich in den Zeitintervallen 2-4, 6-8 und 12-16 h nach Aufnahme im Urin.

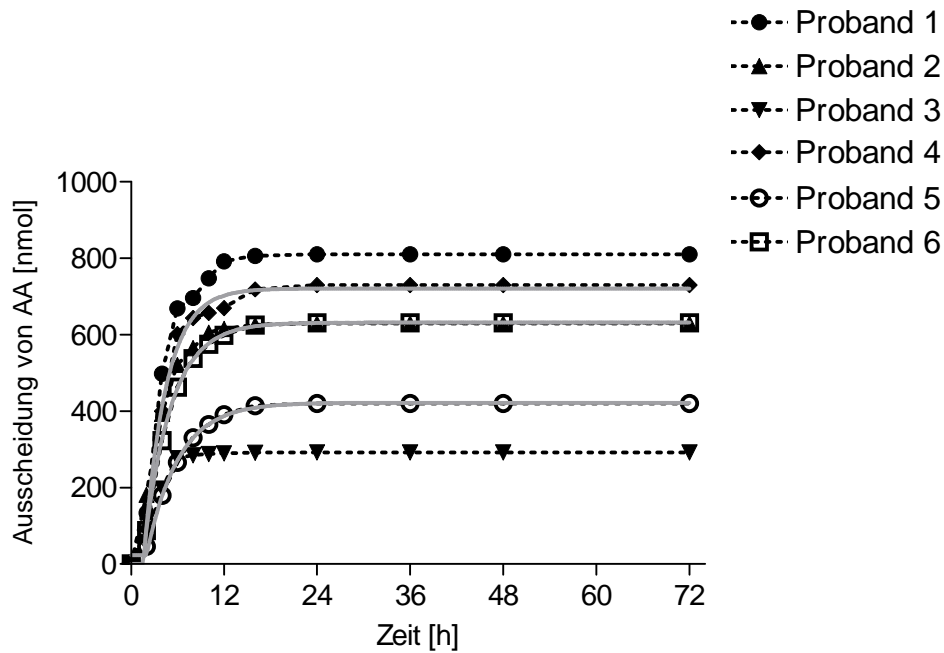
### 3.2.1.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung

Nach einer Anpassung der Modellfunktion 1 gemäß Gl. 6 (siehe Kapitel 2.3.6.1) auf die kumulativen Stoffmengenkurven zeigt sich zunächst, dass nur 3 von 6 Probandenkurven, (#4 bis #6) dem Modell einer *monoexponentiellen Sättigungs- bzw. Wachstumsfunktion*<sup>3</sup> mit Plateau genügen (Abb.12). Somit ist Modell 1 zwar auf alle männlichen Probanden anwendbar, jedoch liefert diese Funktion kein Ergebnis für die weiblichen Probanden (#1 bis #3). Für männliche Probanden liegt die initiale Komponente der Ausscheidung (Plateau) zwischen  $T_p = 1,5 \text{ h}$  und  $2,0 \text{ h}$  (Tab.10), die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Gesamtausscheidung nehmen Werte zwischen  $0,24 \text{ h}^{-1}$  und  $0,35 \text{ h}^{-1}$  an.

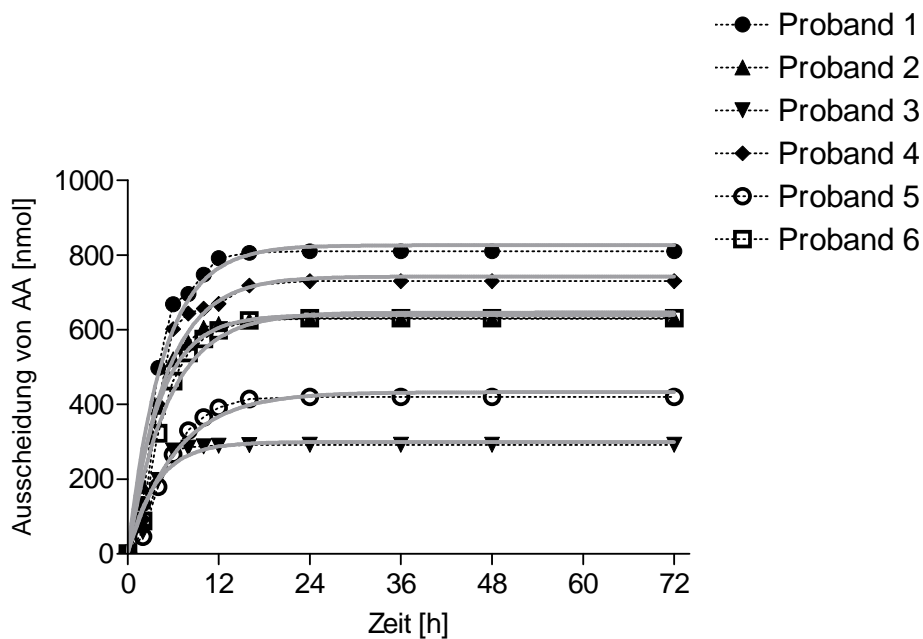
Um zu prüfen, ob die initiale Eliminationsphase mit ihren Werten  $T_p$  und  $N_p$  der Modellfunktion 1 ein charakteristisches Merkmal für das männliche Probandenkollektiv ist und nicht ein Artefakt der Kurvenanpassung darstellt, wurden alle Probandenkurven nochmals einer monexponentiellen Funktionsanpassung ohne initiale Plateauphase (Modellfunktion 2 gemäß Gl. 7) unterzogen (Abb. 13). In diesem Fall können alle Ausscheidungskurven gefittet werden (Tab. 10). Daraus folgt einerseits, dass weibliche und männliche Acrylamid-Ausscheider durch das einfache Modell 2 ohne Plateauphase beschrieben werden können (Tab. 11) und andererseits, dass nur männliche Acrylamid-Ausscheider eine offenbar initiale und verzögerte Anfangskinetik der Elimination in den ersten 2 h aufweisen (Tab. 10). Diese Verzögerung kann bei den weiblichen Probanden nicht nachgewiesen werden.

---

<sup>3</sup> Mit dem Begriff Sättigung ist hier lediglich das Ende der Ausscheidungsphase gemeint. Ein Sättigungsverhalten existiert für Urinmessungen nicht, weil die Substanz ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr vorhanden ist oder im Körper zurückgehalten wird und deshalb nicht mehr zur Verfügung steht. Es gibt bei dieser Art von Experiment keine Gleichgewichtskonzentrationen, weil kein zeitlich dynamischer Prozess vorliegt. Diese Erkenntnis schließt jedoch den Sättigungscharakter einer Funktionskurve nicht grundsätzlich aus.



**Abb. 12** Ausgeschiedene kumulative Stoffmenge von Acrylamid (gestrichelte Linien), betrachtet bis zum Zeitpunkt 72 h nach Aufnahme (wie für AAMA und GAMA), obwohl gemäß Tab. 9 und Abb. 11 in Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2 nach 24 h die Acrylamid-Ausscheidung beendet ist. Die Kurvenanpassung erfolgte mit einer monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau nach Modell 1 gemäß Gl. 6 aus Kapitel 2.3.6.1 (graue Linien).



**Abb. 13:** Erklärung siehe Abb. 12. Die Kurvenanpassung erfolgte mit einer monoexponentiellen Wachstumsfunktion ohne Plateau nach Modell 2 gemäß Gl. 7 aus Kapitel 2.3.6.1 (graue Linien).

**Tab. 10:** Parameter der kumulativen Ausscheidungskurven für Modell 1

Fit Parameter	Proband #1	Proband #2	Proband #3	Proband #4	Proband #5	Proband #6
<b>Mittelwert</b>						
$T_p$ [h]	-	-	-	1,6	2,0	1,5
$N_p$ [nmol]	-	-	-	0,02	23,2	1,0E-05
$N_0$ [nmol]	-	-	-	722	423	632
$k$ [ $h^{-1}$ ]	-	-	-	0,35	0,24	0,29
$\tau_{1/2}$ [h]	-	-	-	1,98	2,89	2,39
<b>Standardfehler</b>						
$T_p$ [h]	-	-	-	0,13	0,35	0,02
$N_p$ [nmol]	-	-	-	21	8,57	2,53
$N_0$ [nmol]	-	-	-	8,72	5,8	1,12
$k$ [ $h^{-1}$ ]	-	-	-	0,03	0,03	0,002
<b>Konfidenzintervall 95%</b>						
$T_p$ [h]	-	-	-	1,3- 1,9	1,2- 2,8	1,4- 1,5
$N_p$ [nmol]	-	-	-	-48- 48	3,5- 43	-5,8- 5,8
$N_0$ [nmol]	-	-	-	701- 742	409- 436	629- 634
$k$ [ $h^{-1}$ ]	-	-	-	0,29- 0,41	0,19 - 0,30	0,28- 0,30
<b>Güte des Fits</b>						
Freiheitsgrade df	-	-	-	8	8	8
$R^2$	-	-	-	<b>0,995</b>	<b>0,995</b>	<b>0,999</b>
Quadratsumme SS	-	-	-	3469	1175	51,31
$S_{y,x}$	-	-	-	<b>21</b>	<b>12</b>	<b>2,5</b>

Fit-Parameter aus der Kurvenanpassung der kumulativen Ausscheidungsdiagramme (Abb. 12) mittels der monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau (Gl. 6). Alle Funktionen und Parameter sind in Kapitel 2.3.6.1 definiert. Die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe aus den Fehlerquadraten (Quadratsumme) sind zur Vollständigkeit der Funktionsanpassung auf die Datensätze mit angegeben.

**Tab. 11:** Parameter der kumulativen Acrylamid-Ausscheidungskurven für Modell 2

Fit Parameter	Proband #1	Proband #2	Proband #3	Proband #4	Proband #5	Proband #6
<b>Mittelwert</b>						
$N_0$ [nmol]	827	640	300	743	433	647
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,22	0,24	0,27	0,20	0,16	0,19
$\tau_{1/2}$ [h]	3,15	2,89	2,57	3,47	4,33	3,65
<b>Standardfehler</b>						
$N_0$ [nmol]	25,5	11,1	10,8	26,8	13,9	19,9
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,026	0,012	0,04	0,02	0,02	0,02
<b>Konfidenzintervall 95%</b>						
$N_0$ [nmol]	770- 884	615- 665	276- 324	683- 803	402- 464	602- 691
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,16- 0,27	0,20- 0,28	0,17- 0,36	0,14- 0,26	0,12- 0,20	0,14- 0,23
<b>Güte des Fits</b>						
Freiheitsgrade df	10	10	10	10	10	10
$R^2$	<b>0,964</b>	<b>0,986</b>	<b>0,944</b>	<b>0,954</b>	<b>0,970</b>	<b>0,968</b>
Quadratsumme SS	31669	6441	6380	33429	7654	17449
$S_{y,x}$	<b>56</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>58</b>	<b>28</b>	<b>42</b>

Fit-Parameter aus der Kurvenanpassung der kumulativen Ausscheidungsdiagramme (Abb. 13) mittels der monoexponentiellen Wachstumsfunktion ohne Plateau (Gl. 7). Alle Funktionen und Parameter sind in Kapitel 2.3.6.1 definiert. Die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe aus den Fehlerquadraten (Quadratsumme) sind zur Vollständigkeit der Funktionsanpassung auf die Datensätze mit angegeben.

Sowohl die Güte  $R^2$  als auch die Exaktheit  $S_y/S_x$  der Kurvenanpassung für Modell 1 (Abb. 12) weisen daraufhin, dass die initiale Ausscheidungsphase kein Artefakt darstellt. Für Modell 1 liegt  $R^2$  deutlich über 0,99 und  $S_y/S_x$  zwischen 2,5 und 20,8 für die drei männlichen Probandenkurven. Die Güte und Exaktheit für Modell 2 (Tab. 11) stellen keine Verbesserung im Vergleich zu Modell 1 dar (Tab. 10), sondern es fallen sogar beide schlechter aus ( $R^2$  zwischen 0,94 und 0,99 und  $S_y/S_x$  zwischen 25,2 und 57,8). Bei Frauen ist diese Verzögerungsphase entweder infolge der Detektionsgrenzen nicht messbar oder dieser Ausscheidungsschritt läuft so schnell ab, dass eine Erfassung wegen der zu geringen Zeitauflösung nicht möglich ist.



Das Maximum der Ausscheidung  $N_0$  (Stoffmenge am Ende der schnellen Ausscheidungsphase zwischen 0 bis 24h) verändert sich zwischen Modell 1 und Modell 2 nicht wesentlich, wenn man die Probanden #4 bis #6 vergleicht. Hingegen sind die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  für Modell 1 im Bereich zwischen 0,24 und 0,35  $h^{-1}$  wegen der initialen Ausscheidungsphase deutlich höher als für Modell 2 im Bereich von 0,16 bis 0,20  $h^{-1}$  (vgl. Tab. 11 vs. Tab. 10:  $N_0$  und vor allem  $k$ ). Die Initialphase beeinflusst also nicht primär das Ende der Acrylamid-Ausscheidung, sondern die Geschwindigkeit des Eliminationsprozesses, die sich zwischen Frauen und Männern nach Modell 2 *signifikant* unterscheidet (mittlere Geschwindigkeitskonstanten weiblich:  $k_w (0,24 \pm 0,02)$  vs. männlich:  $k_m (0,18 \pm 0,02)$  Student *t* Test  $p < 0,05$ ), so dass Frauen schnellere Ausscheider als Männer sein können. Nach Ablauf der Urinsammlungen (72h) sind die ausgeschiedenen Mengen zwischen weiblichen und männlichen Probandenkollektiven nicht signifikant unterschiedlich (mittleres Maximum der gesamten Ausscheidung nach 72h weibliche Probanden:  $578 \pm 263$  nmol vs. männliche Probanden:  $594 \pm 158$  nmol, Student *t* Test  $p > 0,05$ ), so dass am Ende der Urinsammlungen alle Probanden vergleichbare Ausscheidungsmengen aufweisen (Abb. 13).

### 3.2.2 Nachweis von AAMA im Urin

Die Tatsache, dass nur geringe Mengen des aufgenommenen und nicht veränderten Acrylamids im Urin bei gleichzeitig sehr hoher Ausscheidungsgeschwindigkeit (= sehr frühes Maximum der Ausscheidung) wiedergefunden werden, könnte zunächst auf einen sehr früh einsetzenden und schnellen Umsatz in einen seiner Sekundärmetabolite AAMA hindeuten. Die hohen AAMA-Konzentrationen deutlich überhalb der Bestimmungsgrenze von  $5 \text{ ng/ml}$  während der gesamten Sammlungsperiode und nicht nur in den ersten  $24\text{h}$ , wie es bei Acrylamid der Fall ist, sowie hohe AAMA-Exkretionsraten über einen langen Zeitraum hinweg, sind erste Anhaltspunkte für solche funktionellen Zusammenhänge, die hier nun im Weiteren nachgewiesen und überprüft werden müssen.

#### 3.2.2.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung

In den Proben vor Acrylamidgabe beträgt die Hintergrund-Konzentration  $252 \pm 142 \text{ nmol/l}$  ( $59,02 \text{ ng/ml}$ ) (Tab. 12A). Eine Korrektur ist nicht notwendig, weil die Werte um mehr als das *6fache* geringer sind als am Ende der Urinsammelungsperiode ( $72\text{h}$ ). Der Zeitreihenanalyse der AAMA-Ausscheidung (Tab. 12A-C) zeigt sieben Spitzenwerte deutlich über  $600 \text{ nmol}$ , von denen die höchsten drei Werte zwischen  $708 \text{ nmol}$  und  $1028 \text{ nmol}$  in den Sammelintervallen  $12\text{-}16\text{h}$ :  $814 \text{ nmol}$ ,  $16\text{-}24\text{h}$ :  $1028 \text{ nmol}$  und  $24\text{-}36\text{h}$ :  $708 \text{ nmol}$  annehmen (Tab. 12B). Die Registrierung von AAMA ist nach dem Intervall  $48\text{-}72\text{h}$  nicht mehr möglich (*alle Werte*  $< 5 \text{ ng/ml}$ ). Die höchsten Exkretionsraten ergeben sich für die Sammelintervalle  $4\text{-}6\text{h}$ ,  $6\text{-}8\text{h}$ ,  $8\text{-}10\text{h}$  und  $10\text{-}12\text{h}$  in Höhe von jeweils  $312$ ,  $351$ ,  $317$  und  $256 \text{ nmol/h}$ . Für den Zeitraum von  $4$  bis  $12\text{h}$  resultiert daraus eine *mittlere Peak-Exkretionsrate* von  $309 \pm 39 \text{ nmol/h}$  ( $n=4$ ), für den gesamten Zeitraum eine *mittlere Gesamt-Exkretionsrate* von  $174 \pm 125 \text{ nmol/h}$  ( $n=11$ ).

Die kumulativen zeitlichen Verläufe verdeutlichen, dass nach  $36\text{h}$  Spitzenwerte zwischen  $5487 \text{ nmol}$  und  $6341 \text{ nmol}$  erreicht werden und die Ausscheidung in ihre finale Phase übergeht und das Maximum erreicht (Tab. 12C). Die niedrigsten AAMA-Mengen werden in den ersten  $2\text{h}$  nach oraler Aufnahme verzeichnet (Tab. 12B). Die kumulative AAMA-Menge liegt innerhalb der ersten  $2\text{h}$  deutlich unterhalb der gleichzeitig ausgeschiedenen Acrylamid-Menge und nähert sich nach  $4\text{h}$  dem Acrylamid-Niveau vollständig an (*Schwellenwert*:  $466 \text{ nmol}$ ), damit es dann in der verbleibenden Zeit die Acrylamid-Ausscheidung deutlich und kontinuierlich übertrifft (Tab. 9B). Innerhalb der ersten  $2\text{h}$  ist jedoch die Exkretionsrate für Acrylamid ( $50 \text{ nmol/h}$ ) größer als für AAMA ( $39 \text{ nmol/h}$ ).

**Tab. 12: Zeitlich registrierte individuelle AAMA-Ausscheidungen im Urin****A:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	24,15	78,42	134,5	352,5	1543,5	663,9	356,8	898,12	701,9	183,01	130,47	48,63
2	50,44	36,49	200,6	343,4	765,11	870	1247,16	983,75	836,13	237,89	170,4	149,7
3	22,11	158,45	563,3	664,8	4031	3600,2	2209,4	1508,13	1624,8	601,19	268,44	84,95
4	63,67	68,22	106,65	158,47	837,9	1578,6	979,6	195,6	511,13	324,49	340,51	152,2
5	98	239,54	278,28	854,7	544	807,36	541,34	695,07	589,7	189,4	172,23	102,3
6	95,75	150	217,59	237,7	692,45	818,8	648,3	583,98	1121,48	215,8	225	75,69
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [ng/ml]	59,02	121,85	250,15	435,26	1402,32	1389,81	997,1	810,77	897,52	291,96	217,84	102,24
SD [ng/ml]	33,29	74,87	165,12	268,15	1333,8	1129,94	674,07	439,79	415,97	159,87	76,97	41,53
Median [ng/ml]	57,05	114,21	209,09	347,95	801,5	844,4	813,95	796,59	769,01	226,84	198,61	93,62
Min [ng/ml]	22,11	36,49	106,65	158,47	544	663,9	356,8	195,6	511,13	183,01	130,47	48,63
Max [ng/ml]	98	239,54	563,3	854,7	4031	3600,2	2209,4	1508,13	1624,8	601,19	340,51	152,2

**B:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	25,39	76,36	384,72	643,15	607,38	729,11	604,61	921,90	1012,85	640,50	377,34	368,42
2	57,96	53,91	270,93	477,89	510,41	627,96	462,01	672,64	1135,89	1008,15	479,13	507,30
3	12,42	83,99	488,56	690,35	636,58	419,50	254,63	446,69	656,72	128,04	281,39	134,36
4	68,33	65,47	338,50	556,04	652,33	565,98	501,75	848,57	1098,85	975,84	628,25	578,40
5	178,3	113,57	438,97	943,36	980,71	801,84	627,74	999,74	1038,20	498,12	329,41	380,50
6	75,54	74,18	413,06	429,15	818,35	654,89	618,95	995,73	1223,43	999,49	495,77	559,92
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	69,65	77,93	389,12	623,30	700,98	633,21	511,61	814,21	1027,66	708,37	431,88	421,47
SD [nmol]	58,69	20,27	76,82	184,76	169,48	132,91	143,02	216,90	196,50	355,44	127,27	166,20
Median [nmol]	63,17	75,29	398,89	599,62	644,43	641,40	553,18	885,23	1068,54	808,19	428,25	443,88
Min [nmol]	12,42	53,91	270,93	429,15	510,41	419,50	254,63	446,69	656,72	128,04	281,39	134,36
Max [nmol]	178,3	113,57	488,56	943,36	980,71	801,84	627,74	999,74	1223,43	1008,15	628,25	578,40

**C:**

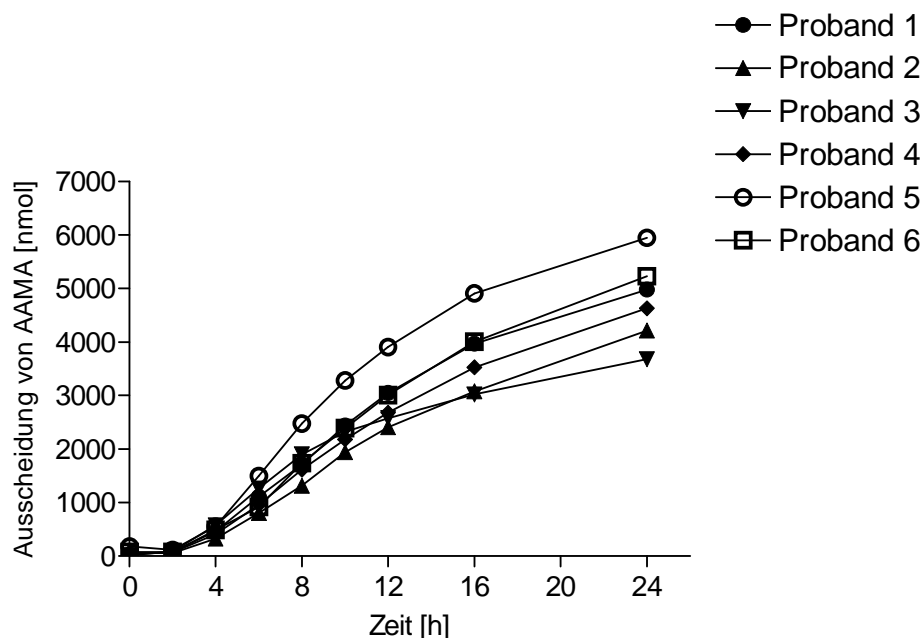
Proband/ Sammel- periode [h]	0-00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	25,39	76,36	461,10	1104,35	1711,82	2441,01	3045,68	3967,69	4980,68	5621,26	5998,63	6367,11
2	57,96	53,92	324,88	802,82	1313,29	1941,30	2403,39	3076,11	4212,15	5220,42	5699,63	6207,00
3	12,42	84,01	572,61	1263,06	1899,70	2319,25	2573,89	3020,66	3677,48	3805,54	4086,96	4221,33
4	68,33	65,49	404,02	960,15	1612,56	2178,60	2680,40	3529,09	4628,08	5604,05	6232,40	6810,88
5	178,3	113,60	552,64	1496,10	2476,95	3278,91	3906,74	4906,61	5944,95	6443,12	6772,56	7153,09
6	75,54	74,21	487,34	916,54	1735,00	2389,98	3009,03	4004,90	5228,49	6228,11	6723,97	7283,96
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	69,65	77,93	467,09	1090,5	1791,55	2424,84	2936,52	3750,84	4778,63	5487,08	5919,02	6340,56
SD [nmol]	58,69	20,28	92,84	254,75	387,76	455,3	536,62	704,97	794,93	937,39	988,49	1120,81
Median [nmol]	63,17	75,28	474,22	1032,25	1723,41	2354,61	2844,71	3748,39	4804,38	5612,65	6115,51	6588,99
Min [nmol]	12,42	53,92	324,88	802,82	1313,29	1941,3	2403,39	3020,66	3677,48	3805,54	4086,96	4221,33
Max [nmol]	178,3	113,60	572,61	1496,10	2476,95	3278,91	3906,74	4906,61	5944,95	6443,12	6772,56	7283,96

**A:** AAMA-Konzentrationen [ng/ml], **B:** Ausgeschiedene AAMA-Menge [nmol], **C:** Kumulativ ausgeschiedene AAMA-Menge [nmol]. Für den vollständigen Zeitgang von 0-72 h sind in den jeweiligen 11 Intervallen inklusive des absoluten Startpunktes die Einzelwerte als auch die Mittelwerte, SD, Mediane sowie Minima und Maxima der Ausscheidung angegeben. \* = nicht bestimmbar (unterhalb der Bestimmungsgrenze von 5 ng/ml), N=Anzahl der quantitativ bestimmbaren Daten. Molekulargewicht AAMA 234,3 g/mol.

Damit stellt sich heraus, dass AAMA innerhalb eines Tages viel langsamer als Acrylamid aus dem Körper eliminiert wird. Gleichzeitig kommt AAMA jedoch in erheblich größeren Mengen als Acrylamid im Urin vor und weist dabei *signifikant* höhere mittlere Peak- und Gesamtexkretionsraten auf.

### 3.2.2.2 Kinetik der AAMA-Elimination

Analog zur Betrachtung der Acrylamid-Ausscheidungskurve aus Kapitel 3.2.1.2 (Abb. 11) wird auch AAMA über den Zeitraum von 24h mittels der kumulativen Urinausscheidungsfunktion  $N(t)$  dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Ausscheidungsmaximum im Gegensatz zu Acrylamid nicht nach 12h einstellt, sondern ein steiler, fast linearer Anstieg von AAMA nach 4h beginnt, der bis zum Zeitpunkt 24h andauert (Abb. 14). Diese Kurveneigenschaften sind für jeden der untersuchten Probanden ein charakteristisches Merkmal. Die absoluten molaren Ausscheidungsmengen unterscheiden sich jedoch erwartungsgemäß zwischen den Probanden nach 24h in einem Bereich von 3677 nmol (#3) bis 5944 nmol (#5). Die Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probandenkollektiven sind nicht signifikant (mittlere Ausscheidungsmengen nach 24h weibliche Probanden:  $4290 \pm 656$  nmol vs. männliche Probanden:  $5267 \pm 659$  nmol, Student *t* Test  $p > 0,05$ ), so dass auch hier biologische Eigenschaften wie das Geschlecht offenbar keine Rolle spielen.

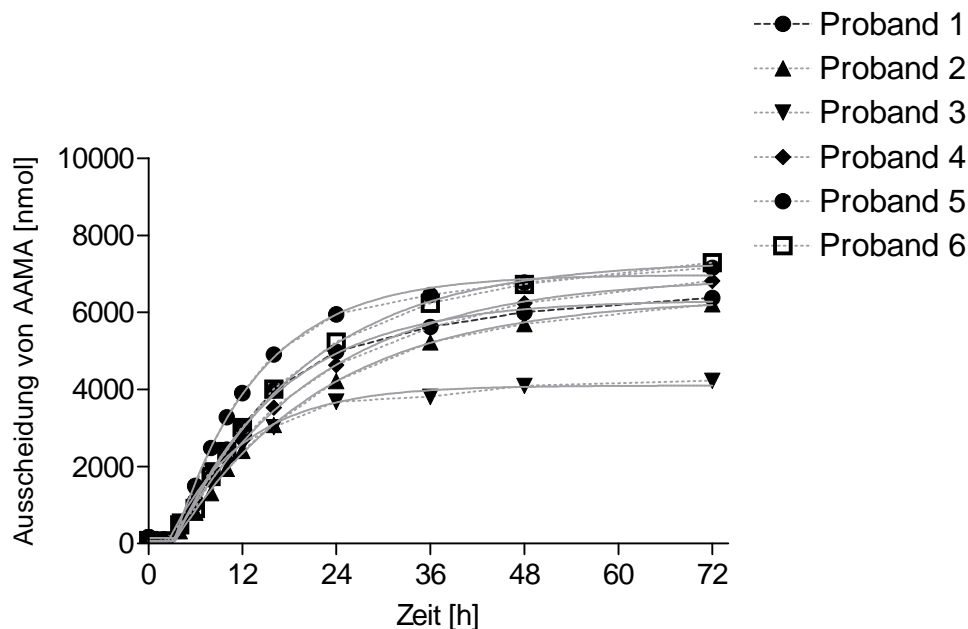


**Abb. 14:** Kinetik der AAMA-Elimination innerhalb der ersten 24 Stunden, dargestellt als kumulative Urinausscheidung nach oraler Einmal-Gabe von Acrylamid. Die höheren Mengen werden ab dem Zeitintervall 6-8 h nach Aufnahme im Urin nachgewiesen.

Zeitlich betrachtet setzt die Ausscheidung von AAMA genau dann ein, sobald die Acrylamidausscheidung sich ihrem Maximum annähert (4-8h) und nahezu beendet ist (10h). In dieser Phase steigt AAMA erst nach 4h um das 5-8fache der noch nach 2h gemessenen Stoffmenge an. Die Exkretionsraten überschreiten erst nach 4h deutlich die für Acrylamid gefundenen Werte (AAMA vs. Acrylamid; 2-4h: 195 vs. 116 nmol/h, 8-10h: 317 vs. 15 nmol/h). Bereits an dieser Stelle lassen sich daher aus den unterschiedlichen 24h-Stoffmengenprofilen anhand der initialen Exkretionsraten – also jene, die jeweils eine rasche und steigende Eliminationsphase kennzeichnen – die Wechselwirkungen zwischen Acrylamid und AAMA ableiten: innerhalb der ersten 2h nach Acrylamid-Aufnahme scheint die Phase-II-Reaktion zur Bildung von AAMA aus Acrylamid abzulaufen. Während dieser Prozess noch andauert, wird Acrylamid bereits schnell unverändert renal ausgeschieden und entzieht sich dadurch in geringen Mengen der Umwandlungsreaktion (siehe Kapitel 3.3.3).

### 3.2.2.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung

Im Vergleich zu Acrylamid konnten die kumulativen AAMA-Zeitreihen für alle 6 Probanden durch die monoexponentielle Wachstumsfunktion nach Modell 1 mit Anfangsplateau einer verzögerten Ausscheidung angenähert werden (Abb. 15).



**Abb. 15:** Ausgeschiedene kumulative Stoffmenge von AAMA betrachtet bis zum Zeitpunkt von 72 h nach oraler Aufnahme (gestrichelte Linien). Die Kurvenanpassung erfolgte mit einer monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau nach Modell 1 gemäß Gl. 6 aus Kapitel 2.3.6.1 (graue durchgezogene Linien).

Auffällig ist nur die weibliche *Probandin #3*, die ab dem Zeitpunkt *24h* bis zum Ende der Messungen eine unterdurchschnittliche Ausscheidungsmenge von AAMA aufzeigt und damit tendenziell aus dem Rahmen fällt. Die Zeitdauer der verzögerten Elimination erstreckt sich über einen Bereich von  $T_p = 2,5h$  bis  $3,4h$ , so dass die Probanden mit diesem Parameter voneinander abgegrenzt werden können (Tab. 13).

**Tab. 13:** Parameter der kumulativen AAMA-Ausscheidungskurven für Modell 1

Fit Parameter	Proband #1	Proband #2	Proband #3	Proband #4	Proband #5	Proband #6
<b>Mittelwert</b>						
$T_p$ [h]	3,3	3,4	2,5	3,1	3,4	3,4
$N_p$ [nmol]	51	56	48	67	146	75
$N_0$ [nmol]	6312	6364	4098	6918	6971	7337
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,07	0,05	0,10	0,05	0,09	0,06
$\tau_{1/2}$ [h]	9,90	13,86	6,93	13,86	7,70	11,55
<b>Standardfehler</b>						
$T_p$ [h]	0,27	0,18	0,32	0,20	0,21	0,28
$N_p$ [nmol]	76	40	67	47	80	80
$N_0$ [nmol]	85	62	61	71	77	107
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,003	0,002	0,007	0,002	0,004	0,003
<b>Konfidenzintervall 95%</b>						
$T_p$ [h]	2,7- 3,9	2,9- 3,8	1,8- 3,3	2,6- 3,5	2,9- 3,9	2,8- 4,1
$N_p$ [nmol]	-124- 226	-37- 149	-107- 203	-40- 174	-39- 331	-109- 259
$N_0$ [nmol]	6116- 6508	6221- 6506	3958- 4237	6755- 7081	6793- 7148	7089- 7584
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,07- 0,08	0,05- 0,06	0,09- 0,12	0,05- 0,06	0,08- 0,10	0,05- 0,07
<b>Güte des Fits</b>						
Freiheitsgrade df	8	8	8	8	8	8
$R^2$	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,997</b>	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>
Quadratsumme SS	92131	25832	72360	34596	102464	101645
$S_{y,x}$	<b>107</b>	<b>57</b>	<b>95</b>	<b>66</b>	<b>113</b>	<b>113</b>

Fit-Parameter aus der Kurvenanpassung der kumulativen Ausscheidungsdiagramme (Abb. 15) mittels der monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau (Gl. 6). Alle Funktionen und Parameter sind in Kapitel 2.3.6.1 definiert. Die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe aus den Fehlerquadraten (Quadratsumme) sind zur Vollständigkeit der Funktionsanpassung auf die Datensätze mit angegeben.

Interessant ist der Befund für die unterdurchschnittlich ausscheidende Probandin #3 hinsichtlich der terminalen Ausscheidungsmenge. Diese Versuchsperson erreicht die höchste Geschwindigkeit von  $k=0,10 \text{ h}^{-1}$ , wodurch sich die relativ niedrigen  $N_0$  und  $N_p$  und der Wert von  $T_p=2,5 \text{ h}$  erklären (Tab. 13). Probandin #3 stellt sich außerdem als die schnellste Ausscheiderin heraus, wie es auch bei Acrylamid nach Modell 2 der Fall ist (Acrylamid:  $k=0,27 \text{ h}^{-1}$ )

Die Qualität der Funktionsanpassungen mit Werten für die Güte  $R^2$  von nahe 1 (alle  $>0,997$ ) und eine Exaktheit  $S_y/S_x$  von 56,8 bis 113,2 bestätigen ein Ausscheidungsmodell mit initialer Zeitkomponente für alle Probanden (größere Werte im Vergleich zu Acrylamid, weil höhere absolute molare Mengen vorliegen). Eine Aufspaltung in zwei unterschiedliche Ausscheidungsmodelle wie bei Acrylamid findet man nicht.

Nach Ablauf der Urinsammlungen (72h) sind die Unterschiede der ausgeschiedenen Mengen zwischen weiblichen und männlichen Probandenkollektiven nicht signifikant (mittlere Sättigungsmenge nach 72h weibliche Probanden:  $5598 \pm 1196 \text{ nmol}$  vs. männliche Probanden:  $7082 \pm 244 \text{ nmol}$ , Student *t* Test  $p > 0,05$ ), so dass am Ende der Messungen alle Probanden vergleichbare Stoffmengen aufweisen (Abb. 15).



### 3.2.3 Nachweis von GAMA im Urin

Die schnellen Ausscheidungen von Acrylamid und AAMA sind zwei koinzident ablaufende Prozesse. Diese Überlagerung beider Phasen und der deutliche Abfall der Exkretionsrate für Acrylamid innerhalb der ersten 2h führt dazu, dass nur wenig Acrylamid selbst aber sehr große Mengen metabolisiertes Acrylamid in Form von AAMA am Ende der Sammelperiode im Urin registriert werden. Deshalb müssen Acrylamid und AAMA dem dritten Metaboliten GAMA gegenübergestellt werden, um die Mengenverhältnisse im Urin vollständig aufzuklären. Aus diesen Mengenverhältnissen ist es dann nicht nur möglich, die renalen und weiteren möglichen Ausscheidungsvorgänge zu beurteilen, sondern auch die Stoffwechselwege im Körper genauer zu verstehen.

#### 3.2.3.1 Quantifizierung und Mengenbestimmung

Auch hier liegt die mittlere Hintergrund-Konzentration mit  $42 \pm 40 \text{ nmol/l}$  ( $10,38 \text{ ng/ml}$ ) überhalb der Bestimmungsgrenze, jedoch ist sie um mehr als das 6fache geringer als am Ende der Urinsammelungsperiode, so dass keine Korrekturen erfolgen müssen (Tab. 14A). Die Ausscheidungszeitreihe zeigt fünf Spitzenwerte deutlich über  $50 \text{ nmol}$ , von denen die höchsten drei Werte zwischen  $98 \text{ nmol}$  und  $145 \text{ nmol}$  liegen und in den Sammelintervallen folgende Werte annehmen, 16-24h:  $145 \text{ nmol}$ , 24-36h:  $123 \text{ nmol}$  und 48-72h:  $98 \text{ nmol}$  (Tab. 14B). Die Ausscheidung von GAMA ist wie bei AAMA ebenfalls nach dem Intervall 48-72h abgeschlossen, weil danach keine Konzentrationen mehr überhalb der Bestimmungsgrenze von  $5 \text{ ng/ml}$  gemessen werden können. Für die Sammelintervalle 8-10h, 10-12h, 12-16h und 16-24h nehmen die Exkretionsraten mit jeweils 15, 16, 18 und  $20 \text{ nmol/h}$  die höchsten Werte an. Für den Zeitraum von 8 bis 24h resultiert daraus eine *mittlere Peak-Exkretionsrate* von  $17 \pm 2 \text{ nmol/h}$  ( $n=4$ ), für den gesamten Zeitraum eine *mittlere Gesamt-Exkretionsrate* von  $11 \pm 6 \text{ nmol/h}$  ( $n=11$ ). Die kumulativen Verläufe verdeutlichen, dass nach 24h die Ausscheidung ihre Maxima zwischen  $344 \text{ nmol}$  und  $649 \text{ nmol}$  erreicht und dann in die langsame Abschlussphase übergeht (Tab. 14C). Die niedrigsten GAMA-Konzentrationen werden in den ersten 12h gemessen und steigen danach stärker an (Tab. 14B). Die kumulative GAMA-Menge liegt innerhalb der ersten 36h deutlich unterhalb der gleichzeitig ausgeschiedenen Acrylamid-Menge und nähert sich nach 36h dem Acrylamid-Niveau an (*Schwellenwert*:  $466 \text{ nmol}$ ). Erst danach wird die Acrylamid-Exkretion leicht und kontinuierlich bis zum Ende der Messungen übertroffen (Tab. 9C). GAMA wird im Vergleich

zu Acrylamid und AAMA sehr langsam aus dem Körper eliminiert. Der Sammelurin nach 72h enthält GAMA aber insgesamt in ähnlich geringen Mengen wie Acrylamid, da nur 5,9% der Acrylamid-Ausgangsdosis von 13,3  $\mu\text{mol}$  als GAMA vorliegen. Sowohl GAMA als auch unverstoffwechseltes Acrylamid tragen somit nur einen geringen Anteil – zusammen nur 9,5% – zur renalen Entgiftung des oral eingenommenen Acrylamids bei.

**Tab. 14: Zeitlich registrierte individuelle GAMA-Ausscheidungen im Urin**

**A:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	5,18	5,03	4,023	9,97	75,55	39,53	28,59	102,27	126,56	36,80	27,26	13,52
2	7,34	7,10	8,80	13,24	43,69	57,16	110,75	134,76	133,84	48	35,99	48,28
3	6,05	15,67	13,70	12,27	52,88	66,96	133,67	208,9	281,22	171,89	98,12	0,00
4	0,00	8,49	4,80	4,97	24,62	61,55	49,14	14,92	54,78	38,31	38,91	33,58
5	15,57	23,18	9,98	19,79	16,28	38,06	29,34	64,62	85,84	41,91	41,43	26,85
6	28,17	20,39	6,24	7,45	28,82	45,60	38,09	51,85	165,80	42,32	45,45	18,31
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [ng/ml]	10,38	13,31	7,92	11,28	40,30	51,47	64,93	96,22	141,34	63,2	47,86	23,42
SD [ng/ml]	10,06	7,52	3,63	5,16	21,75	12,08	45,56	68,98	78,75	53,38	25,37	16,76
Median [ng/ml]	6,69	12,08	7,52	11,12	36,25	51,38	43,61	83,44	130,2	42,11	40,17	22,58
Min [ng/ml]	0,00	5,03	4,02	4,97	16,28	38,06	28,59	14,92	54,78	36,80	27,26	0,00
Max [ng/ml]	28,17	23,18	13,70	19,79	75,55	66,96	133,67	208,90	281,22	171,89	98,12	48,28

**B:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	5,10	4,59	10,79	17,02	27,85	40,63	45,35	98,28	170,95	120,58	73,79	95,88
2	7,90	9,83	11,11	17,26	27,29	38,63	38,39	86,26	170,20	190,45	94,73	153,06
3	3,19	7,79	11,11	11,95	7,83	7,31	14,42	57,93	106,39	34,28	96,28	0,00
4	0,00	7,63	14,26	16,34	17,94	20,66	23,57	60,61	110,23	107,87	67,20	119,46
5	26,52	10,31	14,74	20,46	27,49	35,40	31,84	87,02	141,47	103,16	74,19	93,45
6	20,81	9,43	11,11	12,58	31,88	34,16	34,04	82,78	169,32	183,46	93,73	126,81
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	10,58	8,27	12,19	15,94	23,37	29,44	31,28	78,83	144,79	123,29	83,34	98,12
SD [nmol]	10,60	2,12	1,80	3,20	8,91	12,90	10,95	16,02	30,36	57,81	12,98	52,82
Median [nmol]	6,50	8,63	11,11	16,70	27,37	34,76	32,96	84,50	155,41	114,22	83,94	107,67
Min [nmol]	0,00	4,59	10,79	11,95	7,83	7,31	14,42	57,93	106,39	34,28	67,20	0,00
Max [nmol]	26,52	10,31	14,74	20,46	31,88	40,63	45,35	98,28	170,95	190,45	94,73	153,06

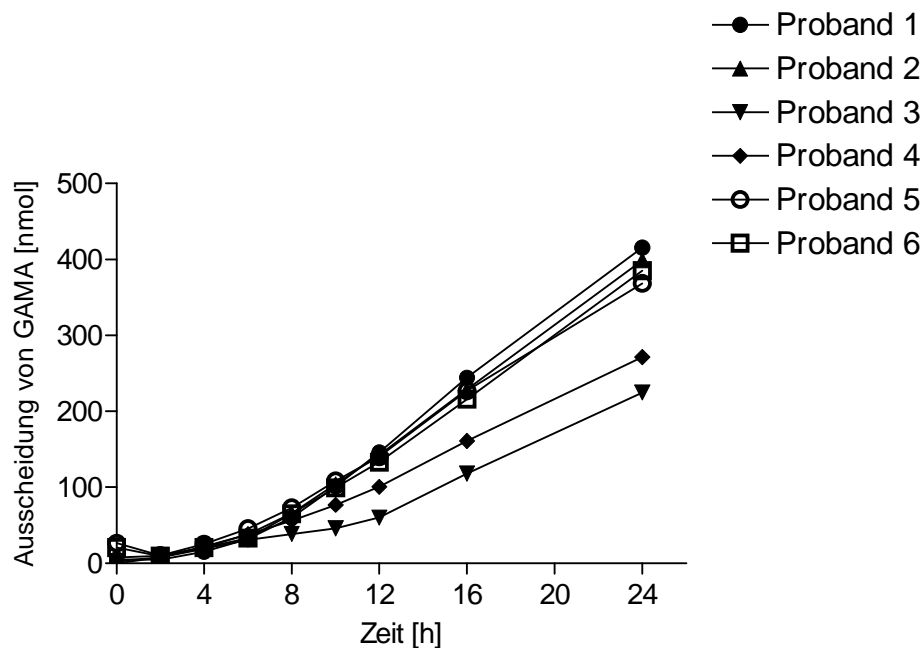
**C:**

Proband/ Sammel- periode [h]	0.00	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-16	16-24	24-36	36-48	48-72
1	5,10	4,59	15,36	32,40	60,23	100,88	146,23	244,51	415,49	536,09	609,91	705,81
2	7,90	9,82	20,95	38,20	65,49	104,11	142,52	228,78	399,02	589,48	684,23	837,33
3	3,19	7,78	18,90	30,84	38,66	45,96	60,38	118,31	224,73	259,00	355,30	355,30
4	0,00	7,63	21,90	38,25	56,19	76,85	100,42	161,05	271,30	379,17	446,40	565,88
5	26,52	10,29	25,04	45,49	72,97	108,36	140,22	227,25	368,74	471,92	546,10	639,58
6	20,81	9,45	20,55	33,15	65,04	99,19	133,24	216,01	385,35	568,84	662,59	789,40
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert [nmol]	10,58	8,26	20,45	36,38	59,76	89,22	120,50	199,31	344,10	467,41	550,75	648,88
SD [nmol]	10,60	2,10	3,21	5,41	11,77	23,86	33,81	48,98	77,42	127,39	128,79	174,16
Median [nmol]	6,50	8,61	20,75	35,67	62,63	100,03	136,73	221,63	377,04	504	578	672,69
Min [nmol]	0,00	4,59	15,36	30,84	38,66	45,96	60,38	118,31	224,73	259,00	355,30	355,30
Max [nmol]	26,52	10,29	25,04	45,49	72,97	108,36	146,23	244,51	415,49	589,48	684,23	837,33

**A:** GAMA-Konzentrationen [ng/ml], **B:** Ausgeschiedene GAMA-Menge [nmol], **C:** Kumulativ ausgeschiedene GAMA-Menge [nmol]. Für den vollständigen Zeitgang von 0-72 h sind in den jeweiligen 11 Intervallen inklusive des absoluten Startpunktes die Einzelwerte als auch die Mittelwerte, SD, Mediane sowie Minima und Maxima der Ausscheidung angegeben. \* = nicht bestimmbar (unterhalb der Bestimmungsgrenze von 5 ng/ml), N=Anzahl der quantitativ bestimmbar Daten. Molekulargewicht GAMA 250,3 g/mol.

### 3.2.3.2 Kinetik der GAMA-Elimination

Aus der GAMA-Ausscheidungskurve läßt sich im Zeitfenster von 24h im Gegensatz zu Acrylamid kein Übergang in eine Plateauphase erkennen (Abb. 16). Es zeichnet sich vielmehr ein reiner Anstieg mit exponentieller Anfangsphase und anschließendem Übergang in einen linearen kontinuierlichen Anstieg der kumulativen Elimination von GAMA ab. Für alle 6 Probanden liegt ab dem Zeitpunkt 10h ein linearer Verlauf vor.

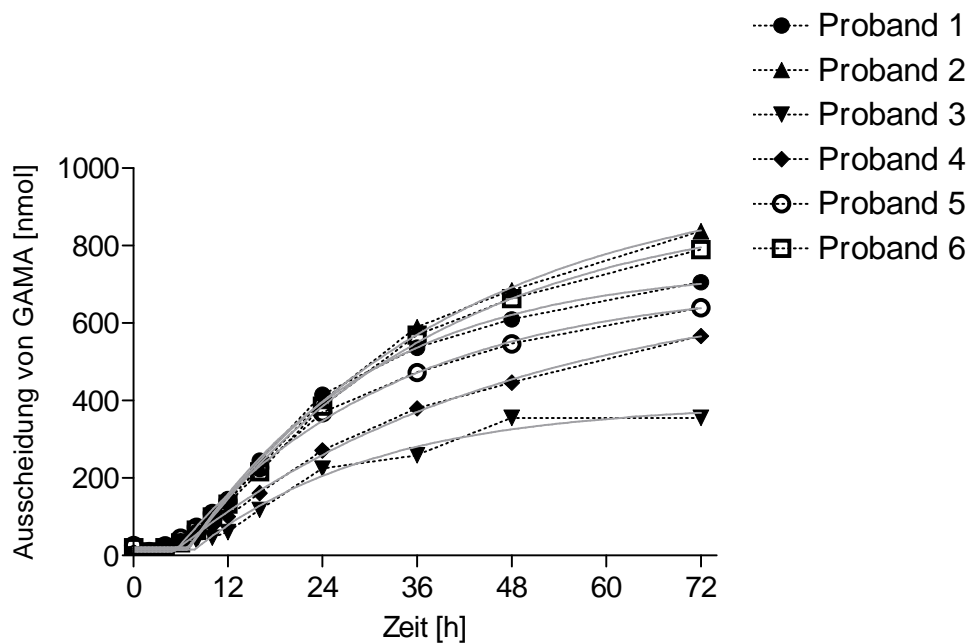


**Abb. 16:** Kinetik der GAMA-Elimination innerhalb der ersten 24 Stunden, dargestellt als kumulative Urinausscheidung nach oraler Einmal-Gabe von Acrylamid. Die höheren Konzentrationen von GAMA werden ab dem Zeitintervall 12-16 h nach Aufnahme im Urin nachgewiesen.

Die kumulierten Ausscheidungsverläufe kennzeichnen auch hier jeden Probanden. Die molaren Ausscheidungsmengen nach 24h unterscheiden sich zwischen den Probanden in einem Bereich von 225 nmol (Probandin #3) bis 416 nmol (Probandin #1). Nach 24h lassen sich keine signifikanten und relevanten Unterschiede der ausgeschiedenen Mengen zwischen weiblichen und männlichen Probandenkollektiven feststellen (mittlere Ausscheidungsmenge nach 24h weibliche Probanden:  $346 \pm 106$  nmol vs. männliche Probanden:  $342 \pm 62$  nmol, Student t Test  $p > 0,05$ ), so dass nach einem Tag alle Probanden vergleichbare Ausscheidungen aufweisen (Abb. 16).

### 3.2.3.3 Kurvenanpassungen der kumulativen Ausscheidung

Die kumulativen GAMA-Ausscheidungskurven aller 6 Probanden können durch die monoexponentielle Wachstumsfunktion nach Modell 1 mit Anfangsplateau einer verzögerten Ausscheidung (vgl. Gl. 6, Kapitel 2.3.6.1) mathematisch beschrieben werden (Abb. 17). Durch den reinen Kurvenverlauf verfestigt sich hier erneut die Besonderheit der weiblichen *Probandin* #3, die sich nach 24h von allen anderen Probanden durch ihre unterdurchschnittlichen Ausscheidungsmengen auszeichnet. Die Zeitdauer der verzögerten Elimination erstreckt sich über einen Bereich von  $T_p = 5,1h$  bis  $7,7h$ , so dass sich die Probanden in dieser Phase voneinander unterscheiden (Tab. 15). Die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  erstrecken sich über den Bereich von  $0,02 h^{-1}$  bis  $0,04 h^{-1}$ .



**Abb. 17:** Ausgeschiedene kumulative Stoffmenge von GAMA betrachtet bis zum Zeitpunkt von 72 h nach oraler Aufnahme (gestrichelte Linien). Die Kurvenanpassung erfolgte mit einer monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau nach Modell 1 gemäß Gl. 6 in Kapitel 2.3.6.1 (graue durchgezogene Linien).

**Tab. 15:** Parameter der kumulativen GAMA-Ausscheidungskurven für Modell 1

Fit Parameter	Proband #1	Proband #2	Proband #3	Proband #4	Proband #5	Proband #6
<b>Mittelwert</b>						
$T_p$ [h]	6,9	6,9	7,7	5,1	5,7	7,1
$N_p$ [nmol]	14,4	19,2	15,2	9,8	20,6	21,0
$N_0$ [nmol]	745,3	985	392	715	703	915
$k$ [h <sup>-1</sup> ]	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>
$\tau_{1/2}$ [h]	17,33	23,10	17,33	34,66	17,33	23,10
<b>Standardfehler</b>						
$T_p$ [h]	0,41	0,46	1,08	0,62	0,48	0,47
$N_p$ [nmol]	6,7	7,0	10,0	6,5	7,5	7,2
$N_0$ [nmol]	20,4	38,6	30,3	41,8	24,5	35,8
$k$ [h <sup>-1</sup> ]	0,003	0,003	0,009	0,002	0,003	0,003
<b>Konfidenzintervall 95%</b>						
$T_p$ [h]	6,0- 7,8	5,8- 7,9	5,2- 10,23	3,7- 6,6	4,6- 6,8	6,0- 8,2
$N_p$ [nmol]	-1,0- 29,7	3,0- 35,4	-7,8- 38,1	-5,1- 24,8	3,3- 38,0	4,4- 37,6
$N_0$ [nmol]	698- 792	895- 1074	322- 462	618- 811	647- 760	833- 998
$k$ [h <sup>-1</sup> ]	0,04- 0,05	0,02- 0,04	0,02- 0,06	0,02- 0,03	0,03- 0,04	0,03- 0,04
<b>Güte des Fits</b>						
Freiheitsgrade df	8	8	8	8	8	8
$R^2$	<b>0,998</b>	<b>0,998</b>	<b>0,984</b>	<b>0,998</b>	<b>0,998</b>	<b>0,998</b>
Quadratsumme SS	1422	1584	3173	1003	1360	1662
$S_{y,x}$	<b>13,3</b>	<b>14,1</b>	<b>19,9</b>	<b>11,2</b>	<b>13,0</b>	<b>14,4</b>

Fit-Parameter aus der Kurvenanpassung der kumulativen Ausscheidungsdiagramme (Abb. 17) mittels der monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Plateau (Gl. 6). Alle Funktionen und Parameter sind in Kapitel 2.3.6.1 definiert. Die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe aus den Fehlerquadraten (Quadratsumme) sind zur Vollständigkeit der Funktionsanpassung auf die Datensätze mit angegeben.

Die GAMA-Kurvenanpassung bestätigt auch den bereits aus den AAMA-Zeitreihenanalysen gewonnenen Trend eines Ausreißers (Probandin #3). Diese erreicht den Maximalwert der Geschwindigkeit von  $k=0,04 \text{ h}^{-1}$ . Der hohen Ausscheidungsgeschwindigkeit stehen die *niedrigste aller Ausscheidungsmaxima*  $N_0$  und die gleichzeitig *lange Anfangsphase*  $T_p$  gegenüber (Tab. 15). Mit sehr niedrigen Werten von  $N_p$ ,  $T_p$  und  $k$  hebt sich besonders Proband #4 hervor.

Nicht nur die optische Übereinstimmung der Messdatenpunkte und der gefitteten Funktionskurve (Abb. 17) sondern auch die numerische Qualität der Funktionsanpassungen mit Werten für die Güte  $R^2$  von *0,984 bis 0,998* und für die Exaktheit  $S_y/S_x$  von *11,2 bis 19,9* belegen das Ausscheidungsmodell mit Initial-, schneller Anstiegs- und langsamer Abschlussphase (Tab. 15). Nach den aufgelegten Kriterien könnte man, im Rahmen einer aber durchaus akzeptablen Abweichung (niedrigster  $R^2 = 0,984$  und *höchster*  $S_y/S_x = 19,9$ ) nur bei Probandin #3 von einer nicht optimalen Funktionsanpassung im Quervergleich mit allen anderen Probanden ausgehen. Bei allen Probanden existiert sowohl für AAMA als auch für GAMA zu Beginn eine verzögerte Ausscheidung. Bei Acrylamid trifft diese Beobachtung ausschließlich für die weiblichen Studienteilnehmer zu. Die Dauer der Urinausscheidung von GAMA scheint im Vergleich zu Acrylamid und AAMA durch die Dauer bis zum Erreichen des Maximums (und damit nicht mehr nachweisbaren GAMA-Konzentrationen) verlängert zu sein (vgl. Abb. 17 mit Abb. 12 in Kapitel 3.2.1.3 und Abb. 15 in Kapitel 3.2.2.3).

Nach Ablauf der Urinsammlungen (72h) sind die Unterschiede der ausgeschiedenen Mengen zwischen weiblichen und männlichen Probandenkollektiven nicht signifikant (mittlere Sättigungsmenge *nach 72h* für weibliche Probanden:  $633 \pm 249 \text{ nmol}$  vs. männliche Probanden:  $665 \pm 114 \text{ nmol}$ , *Student t Test*  $p > 0,05$ ), so dass am Ende der Messungen alle Probanden vergleichbare Stoffmengen aufweisen (Abb. 17). Diese Befunde deuten daraufhin, dass die Eliminationsprofile der Probanden keinen *primären* interindividuellen Schwankungen unterliegen, weil ein Probandenensemble mit wenig Variabilität vorliegt, das den Vorgaben der Studienvorbereitung im Zuge der Probandenauswahl letztlich entspricht.

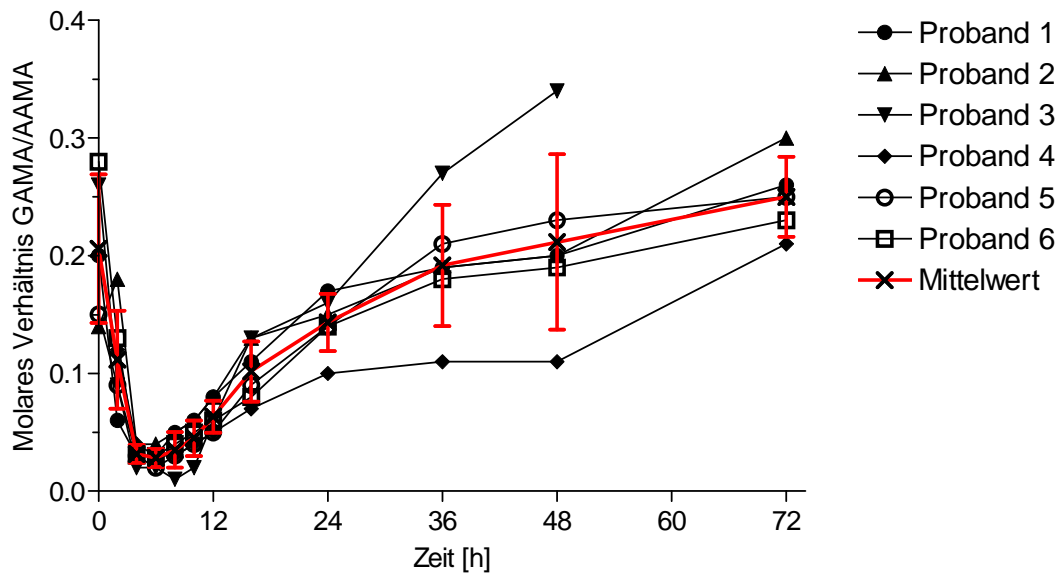
### 3.3 Vergleichende Analyse zwischen Acrylamid, AAMA und GAMA

Nach den bisher erfolgten pharmakokinetischen Einzelbetrachtungen der drei messbaren Substanzen Acrylamid, AAMA und GAMA für jeden Studienteilnehmer liegen keine bedeutsamen Abweichungen zwischen den Individuen vor. Dies bedeutet aber keinesfalls, dass interindividuelle Effekte und spezifische Unterschiede vollständig ausgeschlossen oder sogar vernachlässigt werden dürfen, nur weil die Stichprobenzahl mit  $n=6$  Probanden relativ gering ist. Trotzdem ist eine homogene Verteilung der gemessenen und berechneten Parameter in der hier ausgewählten Probandengruppe nicht nur erwünscht, sondern sie ist genau dann zwingend notwendig, wenn Unterschiede und Wechselwirkungen im Ausscheidungsverhalten zwischen den Substanzen entdeckt werden sollen. Ausreißer, die den Verlauf der Stoffmengenkurven der jeweiligen Substanz verändern, sind nicht gefunden worden. Dies zeigt sich deutlich an den beiden Ausscheidungsmodellen, welche auf alle Probanden angewendet werden können. Aus diesen Gründen bietet eine *gemittelte Analyse* den Vorteil, dass Individualeffekte, wie z.B. in den Exkretionsraten, Ausscheidungsgeschwindigkeiten oder terminalen Ausscheidungsmengen (siehe vor allem Probanden #3 und #5) untergehen und damit keine unmittelbare Relevanz mehr haben.

#### 3.3.1 Individuelles Ausscheidungsverhältnis zwischen AAMA und GAMA

AAMA kommt im Urin aller Studienteilnehmer zu jedem Zeitpunkt in höheren Mengen als GAMA vor, so dass eine Einzelwertuntersuchung der Stoffmengenunterschiede zwischen GAMA und AAMA diesen Befund im gesamten Zeitverlauf weiter aufklären kann (Abb. 18). Für die Abschätzung der Bildungsfähigkeit von Glycidamid aus dem im Urin wiedergefundenen Acrylamid ist der *molare Ausscheidungsquotient*  $GAMA/AAMA$  eine nützliche Kenngröße. Dieser Quotient wird dabei aus den absoluten Stoffmengen bestimmt und beträgt im zeitlichen Durchschnitt  $0,118 \pm 0,017$  (Median:  $0,115$ ; Wertebereich:  $0,100$  bis  $0,150$ ). Ferner ergibt sich vor der Acrylamidverabreichung ein Verhältnis von  $0,204 \pm 0,062$  (*predose value*). Im Sammelintervall  $4-6h$  liegt der Wert mit  $0,027 \pm 0,007$  deutlich darunter (*postdose values*). Danach steigen die Werte bis zum Zeitpunkt  $72h$  wieder bis auf  $0,248 \pm 0,036$  an, so dass sich hier die unterschiedlichen Ausscheidungszeitprofile der beiden Mercaptursäuren in der erhöhten zeitlichen Variabilität der molaren Stoffmengenquotienten  $GAMA/AAMA$  widerspiegeln (Abb. 18).

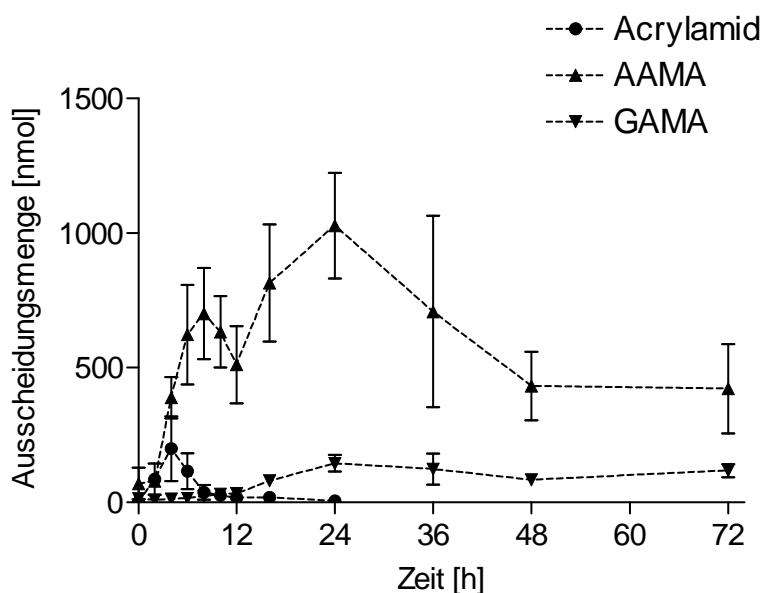




**Abb. 18:** Individuelles molares Verhältnis zwischen GAMA und AAMA im Zeitverlauf nach Acrylamid-Aufnahme (*post-dose values*). Die Zeiten entsprechen den Endwerten der Sammelintervalle. Der molare Ausscheidungsquotient beträgt  $0,118 \pm 0,017$  (Median: 0,115; mittlerer Wertebereich: 0,100-0,150). Das gleiche Verhältnis gemessen vor Acrylamid-Applikation weist einen höheren Wert auf und beträgt  $0,204 \pm 0,062$  (*predose value*). Mittelwertskurve (rote durchgezogene Kurve mit Fehlerbalken): der molare Ausscheidungsquotient nimmt in den ersten Stunden stark exponentiell ab und zeigt anschließend einen steilen exponentiellen Anstieg zwischen 12 und 72h (biexponentieller Funktionsverlauf).

### 3.3.2 Zeitgang der mittleren Stoffmengenveränderungen

Die absoluten Stoffmengen-Zeitprofile für Acrylamid, AAMA und GAMA teilen sich in zwei Phasen auf. Zunächst läßt sich eine initial schnelle lineare Ausscheidungsphase erkennen. Danach nehmen die Substanzmengen exponentiell ab. Diese Abnahme charakterisiert den langsameren Bereich der Elimination (Abb. 19). Das Ausmaß der Steilheit ist für Acrylamid und AAMA in der ersten Phase vergleichbar, GAMA ist jedoch im Gegensatz dazu durch einen sehr flachen Verlauf geprägt. Die zweite Phase zeigt nur für AAMA eine steile Abnahme, bei Acrylamid und GAMA ergibt sich ein flacher Verlauf. Die Ausscheidungen von AAMA und GAMA sind im Gegensatz zu Acrylamid in den ersten 2h nach Nahrungsaufnahme verzögert und haben ihren größten Anstieg nach 4h. Die Ausscheidungen von AAMA und GAMA steigen danach an. Insgesamt weisen Acrylamid, AAMA und GAMA nach 4, 6 bzw. 24h ihre Höchstmengen im Urin auf (Abb. 19). Die Reihenfolge für das zeitliche Auftreten der höchsten Stoffmengen ist *Acrylamid* → *AAMA* → *GAMA*, obwohl sich die Reihenfolge für die Spitzenwerte ganz anders verhält: *GAMA* < *Acrylamid* << *AAMA*.



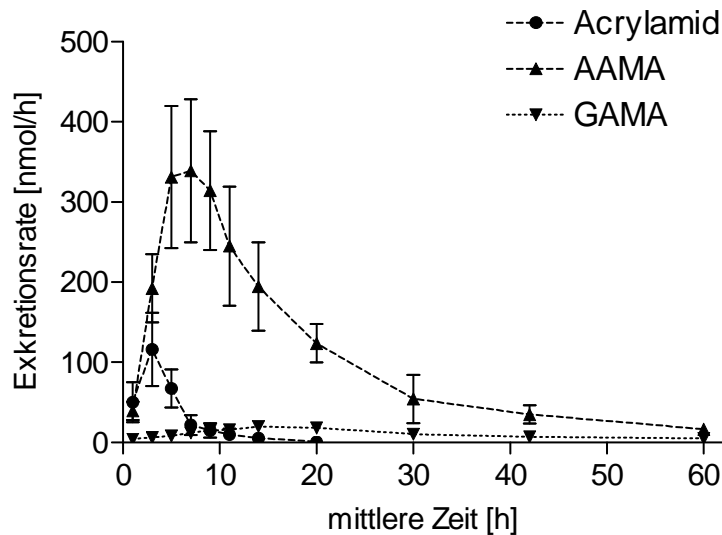
**Abb. 19:** Zeitverlauf der mittleren molaren Ausscheidungsmenge von Acrylamid und seiner Metabolite AAMA und GAMA im Urin. Die Mengen sind über die jeweiligen Urinkonzentrationen ermittelt worden. Die AAMA-Ausscheidungen sind signifikant höher als diejenigen von Acrylamid und GAMA, die beide jeweils in einem Bereich von 0 bis 145 nmol bzw. 0 bis 232 nmol liegen, während sich die Werte von AAMA im Messbereich von 0 bis 1028 nmol befinden. Die Ausscheidungen von AAMA und GAMA sind im Gegensatz zur rapiden Ausscheidung von Acrylamid in den ersten 2 h nach Nahrungsaufnahme verzögert und haben ihre Spitzenwerte beim Zeitpunkt 4h (AAMA) oder 24h (GAMA) nach Applikation.

### 3.3.3 Bestimmung der mittleren Exkretionsraten

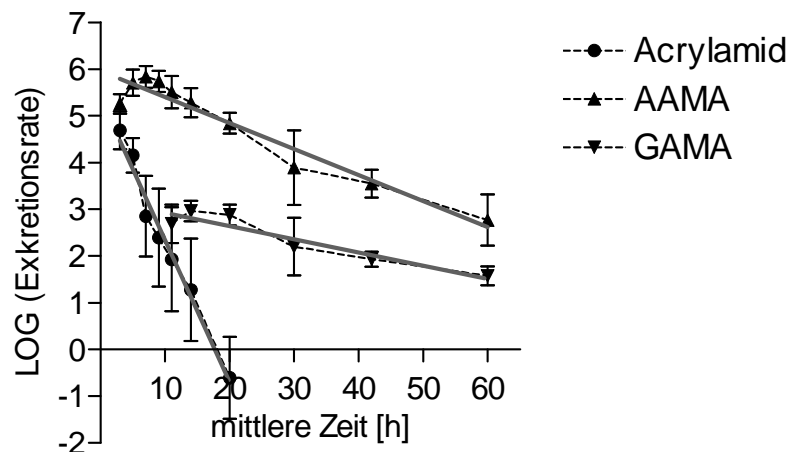
Die Bestimmung der Exkretionsraten ( $dN/dt$  oder "Ae/h") erfolgt anhand mittleren Stoffmengen-Zeitkurven (Abb. 18 in Kapitel 3.3.2), so dass keine Einzelwert-Bestimmung, wie bei den kumulierten Ausscheidungskurven vorgenommen wird. Die Berechnung der Tangentensteigungen für jedes Zeitintervall der Stoffmengenkurve gemäß Gl. 3 in Kapitel 2.3.6.1 liefert die Exkretionsraten. Das Exkretionsraten-Zeitdiagramm (letztlich im mathematischen Sinne vereinfacht die *zweite Ableitung* der Stoffmengen-Zeitkurve  $d^2N/dt^2$ ) weist zwei Komponenten auf: einen initial schnellen und sehr steilen Anstieg und dann einen deutlich langsameren exponentiellen Abfall (Abb. 20A). Nach halblogarithmischer Transformation der Exkretionsraten erhält man die terminale Eliminationshalbwertskonstante aus der linearen Regression der fallenden Gerade (Abb. 20B). Die langsame exponentielle Phase (Abb. 20A) entspricht dabei dem linear-fallenden Bereich (Abb. 20B). Der schnell steigende Anteil wird für die lineare Kurvenanpassung vernachlässigt, denn sonst würde die

kontinuierliche langsame terminale Elimination von der schnellen Komponente überlagert werden. Die Mischung dieser beiden kinetischen Komponenten würde sich dann auch in der Geschwindigkeitskonstante niederschlagen. Die linearen Anpassungen passen exakt auf die halblogarithmischen Daten ( $p < 0,006$ ,  $S_{y,x} < 1$  für Acrylamid, AAMA und GAMA).

A.



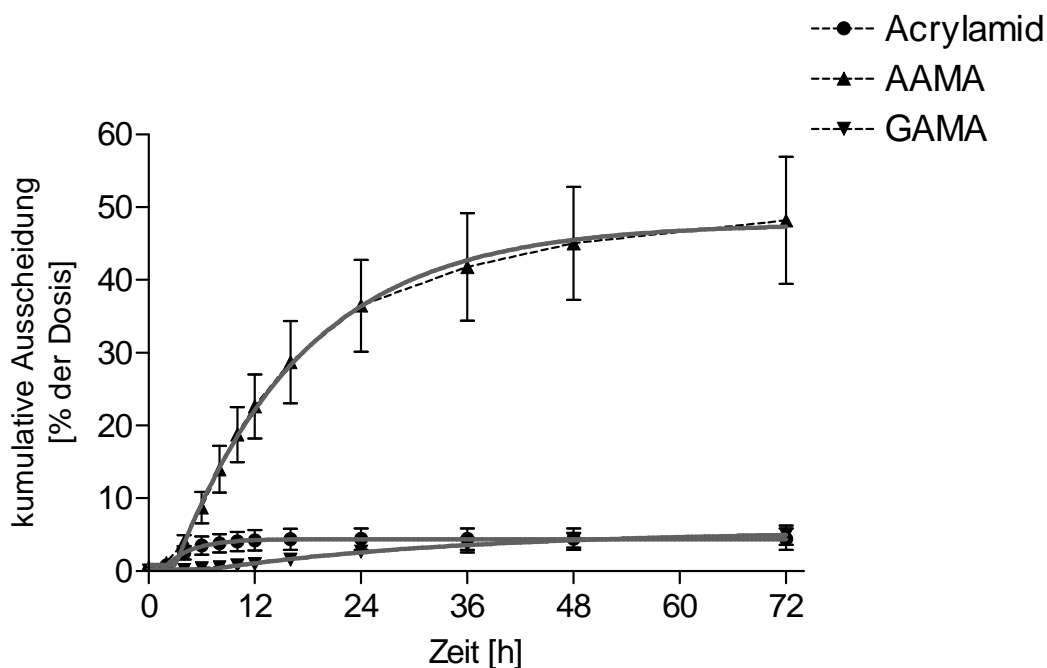
B.



**Abb. 20:** Exkretionsraten-Zeitdiagramme für Acrylamid, AAMA und GAMA. **A:** Der Verlauf der mittleren Exkretionsraten über die mittleren Zeitpunkte zeichnet sich zunächst durch einen schnellen Anstieg aus. Danach erfolgt eine langsame exponentielle Abnahme. Es besteht eine klare Trennung zwischen rascher initialer Ausscheidung und dann langsamer terminaler Elimination. **B:** Halblogarithmische Darstellung der mittleren Exkretionsraten über die mittleren Zeitpunkte. Aus dem langsamen exponentiellen Abfall werden die terminalen Eliminationshalbwertskonstanten  $k_{el}$  und dadurch die Eliminationshalbwertszeiten  $t_{1/2}$  durch lineare Regression errechnet (graue durchgezogene Linien; vgl. halblogarithmische lineare Regression in Kapitel 2.3.6.1).

### 3.3.4 Kurvenanpassungen der mittleren kumulativen fraktionellen Ausscheidung

Aus den kumulativen Ausscheidungsprofilen, bei denen die Exkretion als prozentuale Fraktion der oral eingenommenen Acrylamid-Dosis auf der Zeitskala von 0-72 h verfolgt wird (Abb. 21), resultieren zunächst terminale prozentuale Ausscheidungsmengen unveränderten Acrylamids in Höhe von  $N_{72}$ :  $4,4 \pm 1,4\%$ , gefolgt von AAMA:  $47,4 \pm 8,4\%$  und GAMA:  $4,9 \pm 1,3\%$  nach Ablauf von 72h. AAMA und GAMA dienen der Entgiftung der toxisch wirksamen Substanzen Acrylamid und Glycidamid. Insgesamt wird  $60,3\%$  der ursprünglichen Gesamtmenge von  $13,3 \mu\text{mol}$  Acrylamid im Urin wiedergefunden, so dass eine effiziente Detoxifizierung im Zusammenspiel mit der renalen Elimination stattfindet. Nach Anpassung einer monoexponentiellen Funktion mit initialer Ausscheidungsphase nach Modell 1 lassen sich die prozentualen maximalen Ausscheidungswerte, Geschwindigkeiten und initialen Verzögerungszeiten der Eliminationsvorgänge annähern (Abb. 21).



**Abb. 21:** Ausgeschiedene kumulative Menge von Acrylamid und seiner Metabolite AAMA und GAMA bezogen auf die Ausgangsdosis (gestrichelte Linien). Die ausgeschiedenen Mengen von AAMA übertreffen GAMA und Acrylamid und nehmen ausgehend von 4h kontinuierlich zu und enden nach 72h kumulativ bei  $47,7 \pm 8,4\%$  der Ausgangsdosis. Die ausgeschiedenen Stoffmengen von GAMA bzw. Acrylamid sind im Gegensatz dazu sehr gering und betragen nach 72h kumulativ  $4,9 \pm 1,3\%$  bzw.  $4,4 \pm 1,4\%$ . Dazu zeigen sie einen moderaten Anstieg, der bei Acrylamid den ersten Zeitperioden zwischen 4-6, 12-16 und 16-24h und bei GAMA den Zeitintervallen 16-24, 24-36, 36-48 und 48-72h entspricht. Die Kurvenanpassung erfolgt mit einer monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Anfangsplateau nach Modell 1 gemäß Gl. 6 aus Kapitel 2.3.6.1 (graue durchgezogene Linien). Gefittete Werte siehe Tab. 16.

Die prozentualen maximalen Ausscheidungsmengen  $N_0$  (Tab. 16) entsprechen fast genau den abgelesenen statistischen prozentualen Werten  $N_{72}$  (Abb. 23) trotz der hohen Unterschiede der Standardabweichungen als Anzeichen einer inhomogenen Verteilung:  $4,4 \pm 0,01\%$  vs.  $4,4 \pm 1,4\%$  (Acrylamid, alternativer Welch t Test n.s.,  $p > 0,05$ ),  $47,8 \pm 0,2\%$  vs.  $47,7 \pm 8,4\%$  (AAMA, alternativer Welch t Test n.s.,  $p > 0,05$ ) und  $5,5 \pm 0,07\%$  vs.  $4,9 \pm 1,3\%$  (GAMA, alternativer Welch t Test n.s.,  $p > 0,05$ ). Die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  verteilen sich auf  $0,33h^{-1}$  (Acrylamid),  $0,07h^{-1}$  (AAMA) und  $0,03h^{-1}$  (GAMA) und reflektieren somit die Ausscheidungspotenz in der Reihenfolge: *Acrylamid* >> *AAMA* > *GAMA*, wobei Acrylamid eine *11fach* höhere Eliminationsrate als GAMA aufweist. Die Verzögerungszeiten (Dauer der Initialphasen) verdeutlichen diesen Zusammenhang in inverser Reihenfolge  $T_p$  (h):  $1,4 < 3,0 < 6,7$  (ANOVA:  $N_0$ ,  $k$ ,  $T_p$ , alle  $p < 0,0001$ ; Bonferroni post-hoc t Tests *Acrylamid* vs. *AAMA*, *Acrylamid* vs. *GAMA*, *AAMA* vs. *GAMA*, alle  $p < 0,001$ ). Diese Ausscheidungsverzögerungen stellen sich auch hier als geeignete Parameter heraus, um das unterschiedliche Resorptionsverhalten zu beschreiben. Diese Verteilung der Parameter belegt eindrucksvoll den physiologischen Prozess, dass Acrylamid in seiner toxischen Ausgangsform schneller als seine Metabolite aus dem Körper eliminiert wird.

**Tab. 16:** Parameter der mittleren kumulativen fraktionellen Ausscheidungskurven

Fit Parameter	Acrylamid	AAMA	GAMA
<b>Mittelwert</b>			
$T_p$ [h]	<b>1,4</b>	<b>3,0</b>	<b>6,7</b>
$N_p$ [%]	$\leq 0$	0,8	0,2
$N_0$ [%]	<b>4,4</b>	<b>47,8</b>	<b>5,5</b>
$k$ [ $h^{-1}$ ]	<b>0,33</b>	<b>0,07</b>	<b>0,03</b>
$\tau_{1/2}$ [h]	<b>2,4</b>	<b>10,3</b>	<b>21,6</b>
<b>Standardfehler</b>			
$T_p$ [h]	0,02	0,01	0,17
$N_p$ [%]	0,02	0,15	0,012
$N_0$ [%]	0,01	0,18	0,07
$k$ [ $h^{-1}$ ]	0,003	0,001	0,001
<b>Güte des Fits</b>			
Freiheitsgrade df	68	68	68
$R^2$	0,999	0,999	0,998
Quadratsumme SS	0,12	18,5	0,45
$S_{y,x}$	0,04	0,52	0,08

Fit-Parameter aus der Kurvenanpassung der kumulativen Ausscheidungsdiagramme (Abb. 21) mittels der monoexponentiellen Wachstumsfunktion mit Anfangsplateau (Gl. 6). Alle Funktionen und Parameter sind in Kapitel 2.3.6.1 definiert. Die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe aus den Fehlerquadraten (Quadratsumme) sind zur Vollständigkeit der Funktionsanpassung auf die Datensätze mit angegeben.

### 3.3.5 Gesamtstatistik

Nach oraler Aufnahme der mittleren Acrylamid-Dosis wurden die renalen Ausscheidungen von Acrylamid, Glycidamid, AAMA und GAMA gemessen. Die zurückgebliebene Menge von Acrylamid erklärt den eigentlichen Verlust während des Phase-I- und II-Metabolismus im Sinne einer Biotransformation zur Detoxifizierung der Substanzen, an deren Ende die renale Elimination steht. Verluste über andere Organe, Gewebe oder Ausscheidungsmechanismen können primär durch die Messdaten in dieser Arbeit nicht beziffert werden. Die Differenz zwischen der Anfangsdosis von Acrylamid und der renal eliminierten Mengen von Acrylamid, AAMA und GAMA lässt nicht direkt auf die im Körper verbliebene Menge schließen. Der Startwert der Anfangsmenge von Acrylamid nimmt nach Ausscheidung von AAMA, GAMA und Acrylamid selbst ab (Tab. 17). Nach 24h bleiben 12,7  $\mu\text{mol}$  Acrylamid zurück. Falls alle anderen möglichen Ausscheidungswege ausgeschlossen werden, kann nach 72h die Retention von Acrylamid im Körper 5,6  $\mu\text{mol}$  betragen. Der prozentuale Anteil berechnet sich aus der Menge des Metaboliten und der Differenz zwischen aufgenommener Anfangsdosis und der ausgeschiedenen Menge von Acrylamid.

**Tab. 17: Renale Gesamtausscheidungsbilanz von Acrylamid und seiner Derivate**

Substanz Phase	Acrylamid [nmol]	mittlere fraktionelle Ausscheidung nach 72h <sup>2</sup> N <sub>0</sub> [%] <sup>4</sup>	zurückgebliebene Acrylamid-Menge <sup>3</sup> [nmol]
Acrylamid Phase I	13.300 (initiale Menge) <sup>1</sup>	4,4 (= 599 nmol)	12.702
AAMA Phase II via Acrylamid	12.702	47,8 (= 6.397 nmol)	6.304
GAMA Phase II via Glycidamid	6.304	5,5 (= 760 nmol)	<b>5.545</b>

<sup>1</sup>) der Startwert ist die oral verabreichte Anfangsdosis von 0,94 mg (13,3  $\mu\text{mol}$ ). Dieser nimmt nach Ausscheidung von AAMA, GAMA und von Acrylamid ab. <sup>2</sup>) für Acrylamid ist dieser Endwert bereits nach 24h erreicht. <sup>3</sup>) Retention von Acrylamid im Körper nach 72h. <sup>4</sup>) prozentualer Anteil berechnet aus der Menge des Metaboliten und der Differenz zwischen aufgenommener Anfangsdosis und der ausgeschiedenen Menge von Acrylamid. <sup>4</sup>) Die prozentualen Ausscheidungsmengen entsprechen dem Fit-Parameter N<sub>0</sub> (in % der Ausgangsdosis) aus den mittleren kumulativen fraktionellen Ausscheidungskurven (vgl. Tab. 16 in Kapitel 3.3.4).

### 3.3.5.1 Vergleich der toxikokinetischen Parameter

Die ausgeschiedenen extrapolierten Mengen an unverändertem Acrylamid sowie an den beiden Mercaptursäure-Derivaten AAMA und GAMA nach Ende der Urinsammlungen nehmen Werte zwischen  $4,4 \pm 1,5\%$ ,  $50,0 \pm 9,4\%$  und  $5,9 \pm 1,2\%$  an (Tab. 18). Die Ausscheidung des unveränderten Acrylamids ist innerhalb der ersten 24h beendet und gleichzeitig beläuft sich die Abweichung zwischen der gegen unendlich extrapolierten ausgeschiedenen Ausscheidungsmenge  $N_\infty$  und der maximalen terminalen Gesamtmenge  $N_{72}$  (abgelesene absolute Werte) für Acrylamid im Durchschnitt auf weniger als 0,2% (Tab. 18), so dass für Acrylamid gilt:  $N_{72} \rightarrow N_\infty$  (*student t Test*  $N_{72}$  vs.  $N_\infty$ , *n.s.*). Im Gegensatz dazu werden zwar nur 96,2 % AAMA bzw. 88,7 % GAMA der jeweils insgesamt ausgeschiedenen Menge  $N_\infty$  wiedergefunden, trotzdem bleibt die Annäherung zwischen  $N_{72}$  und  $N_\infty$  hinreichend erfüllt. Die aus den kumulativen Ausscheidungskurven für jeden Probanden gefitteten terminalen Stoffmengen  $N_0$  in Höhe von  $0,59 \pm 0,15 \mu\text{mol}$  (*Modell 1*) und  $0,60 \pm 0,20 \mu\text{mol}$  (*Modell 2*) für Acrylamid,  $6,3 \pm 1,12 \mu\text{mol}$  für AAMA und  $0,74 \pm 0,21 \mu\text{mol}$  für GAMA erweitern den Zusammenhang zwischen abgelesenen, gefitteten und gegen unendlich extrapolierten terminalen Ausscheidungsmengen:  $N_{72} \rightarrow N_0 \rightarrow N_\infty$  (*ANOVA*  $N_{72}, N_0, N_\infty$ , *n.s.*).

Die Mittelwertsbetrachtung der Ausscheidungsmengen  $N_{72}$ ,  $N_0$  und  $N_\infty$  aller Substanzen unterstreicht außerdem, dass es sich bei *Probandin #3* um einen statistischen Ausreißer handelt: im Vergleich mit den anderen *fünf* Probanden liegen die Ausscheidungen  $N_0$  mit  $0,30 \mu\text{mol}$  (*Acrylamid*),  $4,1 \mu\text{mol}$  (*AAMA*) und  $0,39 \mu\text{mol}$  (*GAMA*) jeweils deutlich niedriger (Tab. 18). Dies deutet auf eine verminderte Absorption hin und darf nicht als eine metabolische Störung interpretiert werden.

Die zum Ende der Ausscheidung festgestellten Stoffmengen von AAMA übertreffen GAMA und Acrylamid deutlich und erklären die hohe mittlere Exkretionsrate für AAMA ( $378 \pm 69 \text{ nmol/h}$ ) im Vergleich zu Acrylamid ( $113 \pm 45 \text{ nmol/h}$ ) und GAMA ( $20 \pm 4 \text{ nmol/h}$ ). Die Zeit der maximalen Ausscheidungsrate  $t_{max}$  liegt dagegen für Acrylamid bei 3,3h und ist trotz der höchsten mittleren Exkretionsrate für AAMA am kürzesten, weil die größten Stoffmengenanstiege für AAMA erst nach 4 bis 6h beginnen. Bei GAMA ergeben sich sowohl die niedrigsten Exkretionsraten und der späteste Zeitpunkt der maximalen Ausscheidungsrate. Die Zeiten der maximalen Ausscheidungsrate  $t_{max}$  (Maß für die steilen exponentiellen Anstiegsphasen) verhalten sich ähnlich wie die aus den kumulativen Stoffmengenkurven bestimmten Verzögerungszeiten  $T_p$  (Maß für die langsame Resorption),

$T_p$ : Acrylamid ( $1,7 \pm 0,3h$ ) < AAMA ( $3,2 \pm 0,4h$ ) < GAMA ( $6,6 \pm 1,0h$ ) und  $t_{max}$ : Acrylamid ( $3,0 \pm 0,0h$ ) < AAMA ( $6,9 \pm 1,8h$ ) < GAMA ( $14,9 \pm 2,5h$ ) (ANOVA  $T_p$ ,  $t_{max}$ : beide  $p < 0,0001$ ; Bonferroni post-hoc  $t$  Tests: Acrylamid vs. AAMA, Acrylamid vs. GAMA und AAMA vs. GAMA, alle  $p < 0,001$ ). Aus den  $t_{max}$ -Werten leiten sich direkt die Übergänge in die terminal exponentiell-abfallenden Eliminationsphasen der absoluten Ausscheidungskurven ab, so dass der Beginn der linearen Bereiche für die halblogarithmischen Regressionen der Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten anhand dieser Grenzwerte festgelegt werden kann. Bei einer gleichzeitig nur sehr geringen Ausscheidungsmenge von  $4,4 \pm 1,5\%$  beträgt die terminale Eliminationshalbwertszeit nur  $2,4 \pm 0,4h$ . Diese Werte deuten auf eine möglicherweise unvollständige intestinale Resorption und die Bildung von Hämoglobinaddukten sowie die Metabolisierung des Acrylamids über Glutathion-Konjugate zu AAMA und GAMA hin, wodurch die Detoxifizierung über den Phase-II-Metabolismus und die anschließende renale Ausscheidung vorangetrieben wird. Im Vergleich zu AAMA und GAMA ist die terminale Eliminationshalbwertszeit für Acrylamid am kürzesten (Tab. 18), womit sich die Dauer der Elimination in der Abfolge *Acrylamid* < *AAMA* < *GAMA* bestätigt.

**Tab. 18:** Toxikokinetische Parameter – Vergleich zwischen Acrylamid, AAMA und GAMA

Parameter	Zeit der max. Ausscheidungsrate [h]	Max. Ausscheidungsrate [nmol/h]	Terminale Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	Ausgeschiedene Menge innerhalb von 72 h ( $N_{72}$ ) [ $\mu$ mol]	Ausgeschiedene Menge extrapoliert gegen unendlich ( $N_{\infty}$ )	
					[ $\mu$ mol]	[% der Dosis]
<b>AA</b>						
Mittelwert	3,0	113	2,4	0,59	0,59	4,4
SD	0,0	45	0,4	0,19	0,19	1,5
Median	3,0	109	2,3	0,63	0,63	4,8
Min	2,9	66	2,1	0,29	0,29	2,2
Max	3,0	179	3,1	0,81	0,81	6,1
<b>AAMA</b>						
Mittelwert	6,9	378	17,4	6,34	6,60	50,0
SD	1,8	69	3,9	1,12	1,24	9,4
Median	7,0	368	16,8	6,59	6,88	52,1
Min	4,9	314	11,4	4,22	4,26	32,3
Max	9,0	502	22,9	7,28	7,61	57,6
<b>GAMA</b>						
Mittelwert	14,9	20	25,1	0,65	0,77	5,9
SD	2,5	4	6,4	0,17	0,16	1,2
Median	13,9	21	22,3	0,67	0,78	5,9
Min	13,8	14	20,2	0,36	0,48	3,7
Max	20,0	24	37,2	0,84	0,96	7,3

Die interindividuellen Variationskoeffizienten zwischen den toxikokinetischen Variablen liegen bei 20 bis 30%, so dass keine Ausreißer vorliegen. Das Verfahren zur Berechnung der einzelnen Parameter und deren Bedeutung ist in Kapitel 2.3.6.1 aufgeführt. Die Bestimmung der einzelnen Variablen ist in den Kapiteln 3.3.2, 3.3.3, 3.2.1.3, 3.2.2.3 und 3.2.3.3 beschrieben.



### 3.3.5.2 Abhängigkeit der Ausscheidungsraten vom Uringewicht

Das unterschiedliche Eliminationsverhalten und vor allem die erheblichen Abweichungen in den Ausscheidungsmengen von Acrylamid, AAMA und GAMA führt zur Frage, welche intrarenalen Prozesse ablaufen und wie sich damit die einzelnen Substanzen in glomerulärer Filtration sowie tubulärer Sekretion und Absorption unterscheiden können. Solche intrarenalen Ursachen bedürfen zunächst einer Betrachtung der *Clearance* einer Substanz und können mittels einer Analyse der Wechselwirkung zwischen den gemessenen Uringewichten während der Sammlungsperiode und den Exkretionsraten sowie den Wechselbeziehungen zwischen den drei Substanzen in einer multiplen linearen Regressionsanalyse aufgeklärt werden. Die Beschreibung der *Clearance* setzt einerseits die Kenntnis der Exkretionsraten und andererseits die Plasmakonzentrationen der betreffenden Substanz voraus, die in dieser Studie nicht bestimmt worden sind. Das Verhältnis von Exkretionsrate zu Plasmakonzentration definiert die *renale Clearance*:

$$\frac{dV_P}{dt} = \frac{dN}{C_P} = \frac{dV_U}{dt} \cdot C_U \quad (10)$$

$\frac{dV_P}{dt}$  := Clearance [ml/min]

$\frac{dN}{dt}$  := Exkretionsrate [nmol/h]

$C_P$  := Plasmakonzentration [mmol/l] (hier nicht gemessen)

$V_U$  := Urinvolumen [ml]

$\frac{dV_U}{dt}$  := Harnzeitvolumen [ml/min]

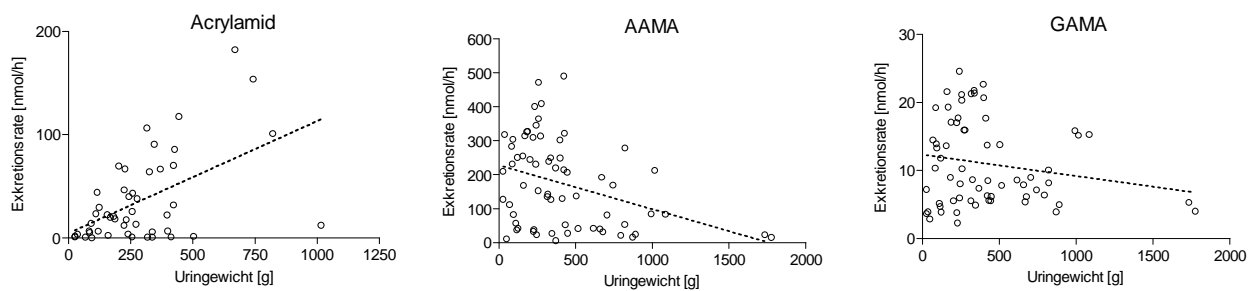
$C_U$  := Urinkonzentration [nmol/l]

Außerdem soll für alle drei Substanzen gelten: *Clearancequotient*  $\frac{C_X}{C_{Inulin}} < 1$  (Substanz *X* wird

bei ungehinderter Filtration im Nettoeffekt teilweise oder ganz reabsorbiert), so dass eine aktive Sekretion und Reabsorption in Gegenwart und Wechselwirkung mit allen anderen harnpflichtigen Substanzen neben Acrylamid, AAMA und GAMA im proximalen Tubulus gewährleistet ist. Ein *Clearancequotient* größer oder gleich 1 ist ausgeschlossen, da

Acrylamid, AAMA und GAMA keine GFR-Bestimmungsmarker sind (Nettoeffekt: Absorption und Sekretion würden sich in einer solchen Konstellation aufheben,  $Clearancequotient = 1$ ) und keine höheren Exkretionsraten als z.B. endogene oder exogene Substanzen wie Kreatinin oder Inulin aufweisen können.

Die nachgewiesenen Ausscheidungsmengen und daraus bestimmten Exkretionsraten decken nur den Zeitbereich von 72h nach oraler Aufnahme ab. Der weitere Verlauf kann nicht untersucht werden, weil nach 72h die Bestimmungsgrenzen erreicht wurden. Aus Gründen der Entgiftungsphysiologie stellt sich deshalb die Frage, ob eine zunehmende Urindichte (höheres Uringewicht) zu gesteigerten Exkretionsraten führen kann, und wie sich dann die verschiedenen Substanzen zueinander verhalten.



**Abb. 23:** Streudiagramme (Punkte) mit einfachen linearen Regressionen (gestrichelte Linien) zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen den Exkretionsraten und den Uringewichten über den Gesamtzeitraum der Urinsammlung von 24h (Acrylamid) und 72h (AAMA und GAMA).

Die Wechselbeziehungen in den ersten 24h betragen im linearen Regressionsmodell für die Exkretionsraten zwischen AAMA und GAMA  $R=0,30$  (signifikant,  $p=0,02$ , Acrylamid und AAMA  $R=-0,08$  (n.s.,  $p=0,29$ ) und Acrylamid und GAMA  $R=-0,56$  (signifikant,  $p<0,0001$ ). Die Werte für die Einzelkorrelationen zwischen Uringewicht und der Exkretionsrate von jeweils Acrylamid ( $R=0,53$ ;  $p<0,0001$ ), AAMA ( $R=0,06$ ;  $p=0,35$ ) und GAMA ( $R=0,02$ ;  $p=0,44$ ) bestätigen die größte Abhängigkeit zwischen Acrylamid und der Urinmenge (Abb. 23). Dies belegt die Befunde einer raschen Acrylamid-Ausscheidung in den ersten 2-4h und der zunächst langsamen Exkretion seiner Metabolite (vgl. kurze Eliminationshalbwertszeit in Tab. 18, Kapitel 3.3.5.1).

Mittels der multiplen linearen Regressionsanalyse ergibt sich ein gleichwohl erwarteter als auch überraschender Befund (Tab. 20): mit höheren Urinmengen nehmen einerseits die Ausscheidungsraten von Acrylamid ( $P < 0,001$ ) und GAMA ( $P = 0,003$ ) signifikant zu (*beide*  $\beta^* \geq 0,5$ ), andererseits ist für AAMA kein Anstieg, sondern eine gleichbleibende Exkretionsrate festzustellen ( $\beta^* = -0,01; P = 0,91$ ). Die Modellkoeffizienten  $\beta^*$  als Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen Exkretionsrate einer Substanz und Uringewicht verteilen sich nach ihrer Größe in der Reihenfolge: *Acrylamid* > *GAMA* > *AAMA*. Aus dem Uringewicht können also insofern Rückschlüsse auf die Exkretionsraten gezogen werden, als dass hohe Uringewichte einen großen Einfluß auf die Exkretionsraten von Acrylamid und GAMA haben, während die Ausscheidungsraten für AAMA davon völlig unabhängig sind und überhaupt nicht beeinflusst werden. Eine höhere Harnausscheidung mit höheren Uringewichten würde zwar zu einer insgesamt *gesteigerten Exkretion* von AAMA jedoch *nicht zu verstärkten Exkretionsraten* führen.

**Tab. 19: Urin-abhängige Elimination von Acrylamid, AAMA und GAMA über die Sammelperiode von 24h (molare Exkretionsraten)**

Multiple lineare Regression	Gesamt		
R	0,65 (0,46)		
R <sup>2</sup>	0,42 (0,21)		
korrigiertes R <sup>2</sup>	0,38 (0,16)		
Standardfehler des Schätzers	161,3 (188,1)		
ANOVA	Gesamt		
P <sub>A</sub>	<0,001* (<0,014*)		
Modell-Koeffizienten	Gesamt		
$\beta_0$ [nmol/h]	-19,4 (-10,4)		
SD [nmol/h]	78,8 (203,4)		
P <sub>R</sub>	<0,001* (<0,014*)		
	Acrylamid	AAMA	GAMA
$\beta$	3,8 (62,4)	0,02 (-29,2)	14,5 (124,4)
SD	0,67 (18,8)	0,22 (47,5)	4,5 (62,2)
$\beta^*$	<b>0,8 (0,6)</b>	<b>-0,01 (-0,1)</b>	<b>0,5 (0,4)</b>
P	<0,001* (0,002*)	0,91 (0,54)	0,003* (0,05*)

Multiple lineare Regression über die Sammelperiode von 24h. Einflussvariablen: molare Exkretionsraten von Acrylamid, AAMA und GAMA ( $X$ ), Zielvariable: Uringewicht ( $Y$ ). Die Regressionsfunktion lautet:  $Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i^{(1)} + \beta_2 x_i^{(2)} + \dots + \beta_m x_i^{(m)}$  mit  $m=3$ . Dabei repräsentieren die  $\beta$ -Werte die Regressionskoeffizienten und  $x_i$  die Ausscheidungsraten der Zufallsvariable  $X$  eines jeden Probanden zu jedem Zeitintervall  $i$ .  $\beta^*$  sind die standardisierten Regressionskoeffizienten: sie messen die Stärke der Einflussvariable auf die Zielvariable und umgekehrt, unabhängig von Maßeinheiten und Streuungen aller Variablen. **R**: Multipler Korrelationsquotient für das Modell. Die Korrelationen zwischen den drei Einzelvariablen sind separat angegeben. **P<sub>R</sub>**: Wahrscheinlichkeit für den multiplen Korrelationsquotienten. **P<sub>A</sub>**: Wahrscheinlichkeit für die ANOVA zwischen den Einflussvariablen. **P**: Testwahrscheinlichkeit; sie prüft, ob die Einflussvariable  $X$  in das Modell aufgenommen oder auch weggelassen werden kann. Für  $P < 0,05$  (\*) ist die Einflussstärke der Variable signifikant. **Werte in Klammern**: Regressionsergebnisse für die LOG-transformierten Exkretionsraten.

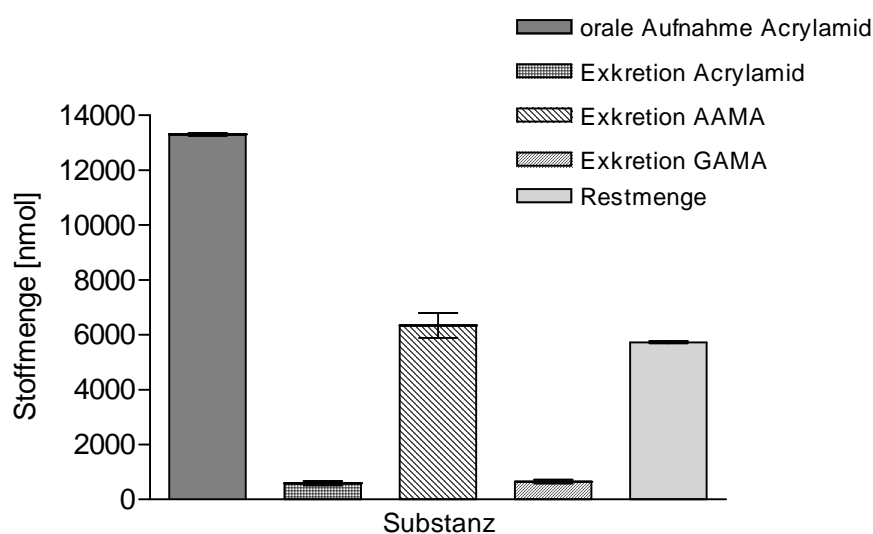
Betrachtet man die Ausscheidungsverhältnisse nur für AAMA und GAMA über den Zeitraum von 72h, so fällt für beide Substanzen ein inverser Zusammenhang zwischen Uringewicht und Exkretionsrate mit  $R=-0,37$ ;  $p=0,001$  (AAMA) und  $R=-0,18$ ; *n.s.*,  $p=0,07$  (GAMA) auf (Abb. 26), wobei die Exkretionsraten positiv miteinander korrelieren (AAMA vs. GAMA:  $R=0,44$ ; *signifikant*,  $p<0,0001$ ). Die stärkste inverse Wechselwirkung mit der Uringmenge weist AAMA ( $\beta^*=-0,36$ ;  $P=0,009$ ) auf, während für GAMA ( $\beta^*=-0,03$ ; *n.s.*,  $P=0,85$ ) kein Einfluß mehr existiert.

## 4. Diskussion

Das für den Menschen vermutlich toxisch, kanzerogen und mutagen eingestufte Acrylamid bildet den nicht nur in der Phase-I-Reaktion hauptsächlich über Cytochrom P450 2E1 katalysierten Epoxid-Metaboliten Glycidamid (*Doroshenko et al., 2009*) sondern führt auch in der Phase-II-Konjugationsreaktion als Hauptweg des Acrylamid-Abbaus zur Entstehung verschiedener inaktivierter Glutathion-Derivate wie Cystein-Addukten. Ob dieser Inaktivierungsschritt durch die Bindung von Acrylamid oder auch Glycidamid an L-Glutathion allein über Glutathion-S-Transferasen vermittelt wird, bleibt für den Menschen weiterhin ungeklärt, weil keine modulierenden Einflüsse auf die Hämoglobin-Adduktspiegel gemessen werden konnten (*Kjuus et al., 2005; Doroshenko et al., 2009*) und eine nichtenzymatische Bildung von Glutathion-Konjugaten durchaus möglich ist (*Kjuus et al., 2005; Hasegawa et al., 2008*). Zu diesen Cystein-Addukten gehören das aus Acrylamid direkt umgesetzte N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein (AAMA) und das aus Glycidamid gebildete N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)cystein (GAMA). Diese beiden Mercaptursäuren sind sowohl im Urin von Ratten (*Sumner et al., 1992; 2003*) als auch im menschlichen Urin identifiziert worden (*Boettcher et al., 2005a; 2006b*). Urban et al. konnten durch Anwendung der atmosphärischen druckchemischen Ionisation (ACPI) einige andere Mercaptursäuren nachweisen (*Urban et al., 2003*). In unserem Falle wurde deshalb für die Bestimmung der Acrylamidkonzentrationen in den Studienchips eine ACPI-Quelle getestet und mit der Elektrosprayionisation (ESI<sup>+</sup>) verglichen. Aus der Analyse beider Signale zeigte das ESI<sup>+</sup>-Verfahren bessere Ergebnisse, weil sowohl weniger Störungen und Überlagerungen von Koelutionsfaktoren als auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) erzielt wurden. Damit die Acrylamid-Konzentrationen in den Studienchips mit den Mengen von Acrylamid und seiner Metabolite in den Urinproben vergleichbar sind, wurde für die Konzentrationsmessungen in den Urinproben durchweg das ESI<sup>+</sup>-Verfahren eingesetzt, womit die Urinausscheidungen von Acrylamid (für die Dauer von 24h), AAMA und GAMA (beide über 72h lang) deutlich überhalb der Bestimmungsgrenzen gemessen werden konnten. Trotz einer geringen Bestimmungsgrenze von 2,5 ng/ml konnte am API 3000 LC-MS/MS-Detektionssystem kein Glycidamid im Urin wiedergefunden werden. Zwar lagen die Konzentrationen für Glycidamid während der Sammlungsintervalle überhalb einer Nachweisgrenze von 1 ng/ml (LOD), jedoch können solche Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) nicht für eine sichere Bewertung der Exkretion von Glycidamid im Urin herangezogen werden. Die Bildung des toxisch reaktiven Glycidamids kann daher

nur indirekt durch das Ausscheidungsverhalten des nicht verstoffwechselten Acrylamids und der beiden Mercaptursäuren AAMA und GAMA beurteilt werden.

Bei der Inkorporation von Acrylamid sind unerwünschte Ereignisse im Sinne akuter und chronischer Toxizität beschrieben worden. Das Gefahrenpotential durch eine Acrylamidexposition äußert sich in einer dauerhaften toxischen Symptomatik, die sowohl von der Einwirkungsdauer als auch von der Acrylamidkonzentration abhängt (Tilson, 1981). Die Ingestion kontaminierten Wassers oder die transdermale Absorption in Dosierungen von mehreren 100mg Acrylamid hat beim Menschen ernste neurologische Symptome wie Ataxie, Tremor, Krämpfe und Halluzinationen hervorgerufen. Die Verabreichung einer täglichen Acrylamid-Dosis von 0,5mg/kg (minimale Tagesdosis pro Körpergewicht für das Auftreten von berichteten Symptomen) über einen Zeitraum von 2 Jahren führte bei Ratten zu einer Erhöhung der Inzidenz von Malignomen (Tyla et al., 2000; Johnson et al., 1986; Dearfield et al., 1995). Die Probanden nahmen im Zuge unserer Studie 0,94 mg Acrylamid in Form einer acrylamidreichen Mahlzeit zu sich. Die applizierte Dosis liegt mehr als zwei Größenordnungen unter dem Wert, für den akute toxische Reaktionen beim Menschen berichtet worden sind. Aus diesen Gründen sind die toxischen Belastungen während der Studie und auch das verbleibende Restrisiko für die Probanden durch die aufgenommene Acrylamidmenge auf ein Minimum reduziert worden.



**Abb. 24:** Wiederfindungsmengen des oral aufgenommenen Acrylamids im Urin in Form der Ausgangssubstanz Acrylamid und der beiden Mercaptursäuren AAMA und GAMA.

Durch die technischen Voraussetzungen und Entwicklungen der LC-MS/MS-Methodik konnte in der vorliegenden Studie das metabolische Schicksal einer in Form von Kartoffelchips verabreichten Acrylamid-Dosis von  $0,94 \text{ mg}$  ( $13,3 \text{ } \mu\text{mol}$ ) untersucht und im Zeitgang von  $3 \text{ Tagen}$  verfolgt werden. Da der größte Teil in Höhe von  $60,3\%$  des aufgenommenen Acrylamids im Körper absorbiert wird (Abb. 24), verläuft die Entgiftung viel effizienter als die Bildung seines reaktiven Epoxy-Derivates Glycidamid. Jedoch wird nur ein geringer Anteil von  $4,4 \pm 1,5\%$  als unverstoffwechseltes Acrylamid im Urin ausgeschieden. Eine Erklärung für diesen Befund ist, dass Acrylamid einem vielfältigen Metabolismus unterliegt, der zu weiteren Metaboliten, wie der oxidativen Bildung von Glycidamid am Anfang der Umsetzungsreaktion (hier im Urin nicht quantifizierbar) und vor allem zu den anderen im Urin detektierbaren Konjugaten AAMA ( $50,0 \pm 9,4\%$ ) und GAMA ( $5,9 \pm 1,2\%$ ) in der erweiterten Adduktionskette führt (Abb. 24).

Zur Beurteilung der Absorption und Wiederfindung von Acrylamid sind nur zwei tierexperimentelle Studien zu benennen, in denen Labortieren eine relativ niedrige Acrylamid-Dosis zur Abschätzung toxikokinetischer Daten verabreicht wurde. Die niedrigste Dosis betrug bei Ratten  $0,1 \text{ mg/kg}$  (Doerge et al., 2005b; Doerge et al., 2005c), wobei die gewöhnlich zu Testzwecken verabreichte Acrylamidmenge jedoch in einem Bereich von  $1$  bis zu  $50 \text{ mg/kg}$  lag (Dybing et al., 2005). Die vorliegende Studie zeigt, dass der Anteil von Acrylamid, AAMA und GAMA zusammen  $60,3\%$  der aufgenommenen Dosis im Urin ausmacht. Dieser Wert steht im Einklang mit tierexperimentellen Daten, obwohl bei den Versuchstieren die relativen Aufnahmedosen sehr weit höher als beim Menschen lagen. Miller et al. konnten in ihrer Studie nach Sondenfütterung von F344 Ratten  $71\%$  der applizierten Dosis im Urin wiedergewinnen (Miller et al., 1982). In einer ähnlich angelegten Studie mit männlichen Ratten fanden sich  $53\%$  einer Acrylamid-Dosis von  $50 \text{ mg/kg}$  im Urin wieder. In B6C3F1-Mäusen betrug die Absorption einer aufgenommenen Dosis von  $0,1$  bis  $0,26 \text{ mg/kg}$  ungefähr  $100\%$  bei reiner Aufnahme in wässriger Lösung, während nach Aufnahme mit der Nahrung nur ein Wert von  $40\%$  erreicht wurde (Doerge et al., 2005b). In einer ähnlichen Studie mit Fischer 344 Ratten lag die intestinale Absorption nach Verabreichung einer Acrylamidlösung von  $0,09$ - $0,14 \text{ mg/kg}$  zwischen  $80\%$  bis zu  $>100\%$ . Nach Acrylamidaufnahme mit der Nahrung reduzierte sich dieser absorbierte Anteil auf ungefähr  $60\%$  bis  $80\%$  (Doerge et al., 2005c). Aufgrund der kleinen Anzahl von Stichproben in diesen Studien handelt es sich lediglich um einen vorläufigen Schätzwert, so dass die

toxikokinetischen Parameter von Acrylamid beim Menschen aus diesen Daten nicht extrapoliert werden dürfen.

Toxikokinetische Daten über Acrylamid sind beim Menschen kaum vorhanden. Der erste direkte Beleg, dass Acrylamid aus Nahrungsmitteln unter standardisierten Bedingungen im Menschen absorbiert wird, gelang Sörgel et al. (Sörgel et al., 2002). Nach experimenteller Verabreichung einer definierten Acrylamid-Dosis in drei nachfolgenden humanen Studien wurde die erhebliche Absorption von Acrylamid bestätigt: nach oraler Aufnahme von Acrylamid aus dem Trinkwasser konnten Fennell et al zeigen, dass im Durchschnitt 34% (Fennell et al., 2005) bzw. 46% (Fennell et al., 2006) einer Dosis von 3 mg/kg (<sup>13</sup>C-Acrylamid) innerhalb eines Tages ausgeschieden wurden, während in der Studie von Boettcher et al. Wiederfindungsraten (Aufnahmedosis 13 µg/kg) von ca. 50% nach einem Tag und insgesamt 57% nach zwei Tagen für einen Probanden gemessen wurden (Boettcher et al., 2005b). Diese Werte passen näherungsweise zu der in dieser Arbeit gemessenen Gesamt-Urinexkretion von 60,3% der eingenommenen Acrylamid-Dosis, obwohl hier im Gegensatz zu den beiden genannten humanen Studien Acrylamid nicht mit dem Trinkwasser, sondern gezielt mit der Nahrung in einer geringeren Dosis von 12,8 µg/kg oral zugeführt worden ist. Betrachtet man die andauernde Ausscheidung von AAMA und GAMA nach 24h und/oder 48h, sind die im Vergleich zu den beiden humanen Studien korrespondierenden Werte 43,3% bzw. 53,5% der Dosis nach 24h bzw. 48h (jeweils AAMA+GAMA zusammen). Weitere Studien mit radioaktiv-markiertem Acrylamid in Hunden und Miniatur-Schweinen stützen den Befund, dass die intestinale Acrylamid-Absorption in allen Säugetier-Spezies und auch im Menschen unabhängig von der relativen oralen Dosis nahezu vollständig abläuft (Dybing et al., 2005).

Ausgehend von einer vollständigen Acrylamid-Absorption im menschlichen Körper kann durchaus darüber spekuliert werden, was mit dem im Urin nicht wiedergefundenen Anteil von 39,7% der Ausgangsdosis (siehe Restmenge in Abb. 23) passiert ist. Dieser Anteil könnte in weitere im Urin nicht quantifizierbare Metaboliten transformiert (mittels der LC-MS/MS-Analytik nicht nachweisbar) oder in der Niere selbst absorbiert worden sein (nephrotoxisches Potential durch glomeruläre oder tubuläre Ablagerungen) oder über enterohepatische Eliminationsprozesse (Leber und Gallenblase) in den Fäzes gelangen (entzieht sich der renalen Elimination und damit den Urinmessungen) sowie im Körper durch Bildung von z.B. DNA-oder Hämoglobin-Addukten (oder auch andere Adduktbildung mit Makromolekülen) verbleiben (Plasmabestimmungen wurden nicht durchgeführt). Alle diese möglichen



Ausscheidungs- und Reaktionswege können hier nicht erfasst und dadurch auch nicht weiterführend eingeschätzt werden, obwohl dem enterohepatischen Ausscheidungsweg neben der renalen Elimination die größte Bedeutung zukommen kann, weil viele Pharmaka und Toxine, die im Urin in hohen aber nicht vollständigen Mengen ausgeschieden werden, im Fäzes gefunden werden, so dass sich die Stoffmengenlücke zwischen den im Urin gemessenen Metaboliten und der oral aufgenommenen Acrylamid-Dosis teilweise erklären ließe: im Fäzes von Ratten wurden nach 7 Tagen nur 6% der Dosis detektiert, während ein Anteil von 15% der Gesamtradioaktivität über die Galle ausgeschieden wurde (*Miller et al., 1982*). Außerdem wäre auch denkbar, dass ein Teil des nicht im Urin detektierten Acrylamids und Glycidamids in den Skelettknochen gelangt und dann im Knochenmark gespeichert bleibt, um dort dann beispielsweise durch DNA-Adduktion myeloproliferative Erkrankungen oder Erythrozytenbildungsstörungen auszulösen oder zu begünstigen. Natürlich wäre eine solche Möglichkeit der Toxikodynamik nur dann nachweisbar, wenn Knochengewebe auf den Gehalt dieser Metabolite getestet werden.

Die toxikokinetische Analyse der drei Substanzen Acrylamid, AAMA und GAMA weist darauf hin, dass AAMA zwar in den höchsten Konzentrationen und Mengen im Urin gefunden wird, jedoch nicht am schnellsten aus dem Körper renal eliminiert wird. Es ergeben sich deutliche Unterschiede in den zeitlichen Ausscheidungsverläufen zwischen Acrylamid und den beiden Mercaptursäuren. Während sich für die terminalen Eliminationshalbwertszeiten die Reihenfolge: Acrylamid (*2,4h versus Fennell et al., 2006: 3,1 bis 3,5h*)  $\ll$  AAMA (*17,4h*)  $<$  GAMA (*25,1h*) ergibt, folgt für das Maximum der Exkretionsraten GAMA (*20 nmol/h*)  $\ll$  Acrylamid (*113 nmol/h*)  $\ll$  AAMA (*378 nmol/h*) und den Zeitpunkt der maximalen Exkretionsrate Acrylamid (*3,0h*)  $<$  AAMA (*nach 6,9h*)  $\ll$  GAMA (*14,9h*). Damit gilt für die Substanz mit der höchsten Ausscheidungsrate nicht gleichzeitig, dass sie auch am schnellsten in den Urin gelangt und der Verlauf der Ausscheidung rasch abgeschlossen ist. Dieser Befund könnte durch eine schnelle Wirkung von Acrylamid durch seine Adduktionsfähigkeit erklärt werden, so dass erst danach, stark zeitverzögert, die Umwandlungsreaktion zu AAMA stattfindet. Erst nach diesem ersten Schritt der Entgiftung (Acrylamid  $\rightarrow$  AAMA) beginnt dann die Umwandlung von Acrylamid in Glycidamid mit abschließender Entgiftungsreaktion (Glycidamid  $\rightarrow$  GAMA). Natürlich ist die hohe Exkretionsrate von AAMA ein deutlicher Indikator für die stattfindende effektive Detoxifizierung von Acrylamid aus dem Körper. Die geringen Exkretionsraten von GAMA in Verbindung mit dem späten Zeitpunkt der maximalen Ausscheidungsrate und des im Urin

nicht detektierbaren Epoxy-Metaboliten Glycidamids weisen auf reduzierte Umwandlung von Acrylamid in Glycidamid hin, denn sonst wären höhere Exkretionsraten und auch eine schnellere Ausscheidung von GAMA zu erwarten gewesen. Diese Interpretation setzt voraus, dass Glycidamid nur vor oder nach Adduktion mit verschiedenen Makromolekülen (DNA, Hämoglobin) in die entgiftete Form GAMA biotransformiert werden kann. Adduziertes Glycidamid wird wahrscheinlich wie auch adduziertes Acrylamid nicht renal ausgeschieden oder ist als solches im Urin nicht als Glycidamid-Hämoglobin-Komplex nachweisbar. Diese Annahme würde wiederum bedeuten, dass Acrylamid kaum Adduktionsprozesse - wie angenommen, weil es ein u.a. viel geringeres genotoxisches Potential als Glycidamid trägt - durchläuft, so dass viel freies, ungebundenes Acrylamid für die Konversion in AAMA zur Verfügung steht und daher auch in hohen Mengen im Urin ausgeschieden wird. Auch ist bisher noch nicht geklärt, wie gut Acrylamid und Glycidamid aufgrund ihrer chemischen Struktur den glomerulären Filter passieren können und ob tubuläre Reabsorptions- oder Sekretionsprozesse durch Transporter oder Carriersysteme existieren. Die Epoxid-Funktionsgruppe von Glycidamid berechtigt durchaus zur Spekulation über solche möglichen Mechanismen und Vorgänge innerhalb der Niere. Daraus würde dann wegen des nicht im Urin detektierten Glycidamids folgen, dass Acrylamid die Niere besser als Glycidamid passieren könnte, weil z.B. auch toxische Ablagerungen von Glycidamid im Glomerulum oder Tubulus denkbar wären.

Die effektive renale Entgiftung bestätigt sich außerdem durch den Vergleich der renalen kumulativen Substanzausscheidungen im Zeitgang der Urinsammlungen. Aus einer Erhöhung der Acrylamidmenge im Urin folgt erwartungsgemäß eine Zunahme von AAMA, jedoch nicht für die kumulativen GAMA-Ausscheidungsmengen, die davon unbeeinflusst bleiben. Falls eine erhöhte orale Zufuhr von Acrylamid auch zu erhöhten kumulativen Ausscheidungsmengen von Acrylamid im Urin führen sollte, wäre davon auszugehen, dass dann AAMA weiterhin der vorherrschende Ausscheidungsmetabolit wäre und die Detoxifizierung weiterhin gewährleistet bliebe, während die Bildung von GAMA kaum eine Rolle spielen würde. Aus niedrigen kumulativen Ausscheidungsmengen von GAMA im Urin kann auf eine geringe Umwandlung von Acrylamid in Glycidamid zurück geschlossen werden. Eine geringe im Urin gefundene Menge von GAMA kann aber auch bedeuten, dass viel freies Glycidamid für Adduktionreaktionen zur Verfügung stehen könnte, so dass dieses primär nicht mehr in GAMA transformiert wird. Das Ausmaß der Inaktivierung von Acrylamid ist auch durch die Beeinflussung der Ausscheidungsgeschwindigkeiten durch die Uringewichte der Sammelurinvolumina bestimmt (in dieser Studie lagen die Urinvolumina

bei konstant **24 ml**, so dass die Urindichten betrachtet werden können). Steigende Urindichten gehen nach den vorliegenden linearen Regressionsdaten mit steigenden Exkretionsraten für GAMA und Acrylamid einher, während sich für AAMA die Exkretionsrate nicht verändert und nach 72h sogar im Einzelvergleich mit GAMA absinkt. Hochkonzentrierte Urinproben können auf eine sinkende Inaktivierungsrate durch den Hauptmetaboliten AAMA hinweisen, wobei mit steigenden Ausscheidungsraten von GAMA und auch Acrylamid selbst versucht wird, diesen Prozess zu kompensieren und die Elimination toxischer Metabolite weiter voranzutreiben.

Ein weiterer Erklärungsansatz besteht in der glomerulären Filtrations- und tubulären Sekretionsleistung der Niere selbst. Da eine Absorption und Sekretion wie für andere schwefelhaltige Säuren auch in den proximalen Tubuli stattfindet und die Clearance beeinflusst, ist dieser Vorgang ein wichtiger Faktor für das Ausmaß des Uringewichtes. In den ersten *4 bis 12 h* nach oraler Applikation von Acrylamid ergeben sich für AAMA sowohl die höchsten Exkretionsraten als auch Ausscheidungsmengen. Davor und danach sinken diese beiden Parameter und werden nach den Ergebnissen der linearen Regressionsanalyse nicht mehr beeinflusst. Gleichzeitig sind die Uringewichte in dem Intervall *4 bis 12 h* geringer als in dem Zeitraum danach. Eine Zunahme des Uringewichtes hängt von allen harnpflichtigen Substanzen ab, so dass die tubuläre Sekretion aber auch Absorption von AAMA durch das vermehrte Vorliegen (hohe Konzentrationen) anderer Moleküle limitiert sein kann. Die tubuläre Transportfunktion beschreibt mittels der Clearance quantitativ diesen Prozess. Sowohl die tubuläre Sekretion als auch die Reabsorption sind durch Transportmaxima begrenzt. Ab einer bestimmten Konzentration des Substrats an ist der Transportmechanismus gesättigt und das Transportmaximum erreicht. Bei den Mercaptursäuren AAMA und GAMA ist von einer Konkurrenz mit anderen ähnlichen Substraten auszugehen.

Die Ausscheidungsmaxima und die erhöhten Exkretionsraten von AAMA bei niedrigen Urindichten und der ausbleibende Anstieg der Exkretionsraten bei höheren Werten deuten darauf hin, dass die tubuläre Transportfunktion mit ihrer Sekretionskomponente gesättigt sein kann. Daraus folgt, dass weniger AAMA tubulär sezerniert und daher im Urin ausgeschieden wird. Dabei erniedrigt sich die Clearance (*vgl. Gl. 10 in Kapitel 3.3.5.2*) und damit die Exkretionsrate. Der Anstieg der Plasmakonzentration ergibt sich aus der nun verstärkten Reabsorption und verminderten Sekretion von AAMA in den proximalen Tubuli. Eine Zunahme der Urinkonzentration wird durch das Vorliegen vieler anderer Substanzen neben AAMA sowie GAMA und Acrylamid im Primärharn verursacht, die eine Sekretion von AAMA blockieren und damit die Exkretionsrate infolge verstärkter Reabsorption bei

steigendem Uringewicht in den ersten 24h nicht erhöhen und bis zum Abschluss der Sammlungsperiode nach 72h sogar verringern.

Ein ähnlicher Effekt lässt sich auch bei GAMA beobachten, jedoch tritt eine Abnahme der Exkretionsraten bei steigendem Uringewicht erst in der Betrachtung des Zeitrahmens von 24 bis 72h auf. Da es sich bei GAMA ebenfalls um eine Mercaptursäure handelt, sind Interaktionen während des Transportes im proximalen Tubulus zu erwarten, so dass auch hier die tubuläre Sekretion abnimmt und die Reabsorptionsmechanismen überwiegen. Eine derartige Reduktion der tubulären Sekretion und verlangsamende Absorptionseffekte scheinen für Acrylamid nicht vorzuliegen, da sehr schnell und vermutlich vollständig ausgeschieden wird. Kompetitive Vorgänge im tubulären Transportmechanismus wie es für die AAMA und GAMA der Fall ist, sind für Acrylamid deshalb weniger wahrscheinlich. Aus diesen Unterschieden im renalen Entgiftungsmechanismus ist es möglich, dass die nicht wiedergefundene Menge von 39,7% des oral aufgenommenen Acrylamids als vorwiegend AAMA und GAMA in der Niere reabsorbiert und anderen Geweben oder Organen zugeführt wird.

Die Hauptschritte im Metabolismus von Acrylamid bestehen in allen getesteten Spezies aus der Umwandlung von Acrylamid in den potentiellen kanzerogenen und hochreaktiven Phase-I-Metaboliten Glycidamid und aus der nachfolgenden Konjugation mit Glutathion zur Bildung der Phase-II-Metabolite (*Dybing et al., 2005*). Die Urinmengen von unverändertem Acrylamid und Glycidamid blieben in allen humanen Studien in einem sehr niedrigen oder in einem Bereich unterhalb der Bestimmungsgrenzen. Die sehr geringen Mengen von Glycidamid unterhalb der Bestimmungsgrenze in der vorliegenden Studie deuten auf eine rasche Umwandlung in das Konjugationsprodukt GAMA hin, welches in nicht unerheblichen Mengen im Vergleich zur Ausgangssubstanz Acrylamid in den Urinproben gefunden worden ist. Die Bildung und Exkretion von Glycidamid kann in unserer Studie nur hinsichtlich des Phase II Metabolismus von Acrylamid bewertet werden, so dass das Ausmaß der Glycidamidentstehung aus Acrylamid nur unter Berücksichtigung des Quotienten zwischen den beiden im Urin ausgeschiedenen Mercaptursäuren AAMA und GAMA abgeschätzt werden kann (molares Verhältnis GAMA/AAMA), wobei das mittlere Verhältnis in der vorliegenden Studie einen Wert von 0,12 aufwies. Die Konjugationsprodukte von Glycidamid ließen sich in der Studie von Fennell et al. im Urin nicht nachweisen und lagen unterhalb der Nachweisgrenze, während die Ausscheidung der Acrylamidkonjugate 26,2% der aufgenommenen Dosis ausmachte (*Fennell et al., 2005*). Bei einer angenommenen

Detektionsgrenze von 0,06 mmol/l für beide Glycidamid-Derivate ergibt sich ein mittleres Verhältnis Glycidamid/Acrylamid  $<0,3$ . Im Vergleich dazu haben Boettcher et al. bei der Exposition mit der Nahrung ein medianes Verhältnis von 0,16 ermittelt (Boettcher et al., 2005a), wobei der korrespondierende Wert für einen Teilnehmer in einer weiteren Studie lediglich 0,09 betrug (Boettcher et al., 2006b). Zusammenfassend läßt sich aus dem Vergleich der erhobenen Quotienten GAMA/AAMA mit den Verhältniszahlen Glycidamid/Acrylamid schließen, dass die Umsetzung von Acrylamid über Glutathion-Konjugation zu Mercaptursäuren nachweislich schneller erfolgt als die Epoxidation von Acrylamid zum reaktiven Glycidamid und dass die Expositionsdosis von Acrylamid keinen Einfluß auf den in Glycidamid umgewandelten Anteil hat.

Da Glycidamid mit seiner Epoxid-Funktionsgruppe den eindeutig reaktiveren Metaboliten darstellt (Doerge et al., 2005) und über diese Funktionsgruppe mit DNA interkalieren kann und dadurch seine potenziell genotoxische Wirkung entfaltet, ist es für eine Extrapolation des Krebsrisikos notwendig, die Bildung von Glycidamid im Menschen mit den tierexperimentellen Daten in Ratten und Mäusen zu vergleichen. Dabei werden nach dem jetzigen Publikationsstand durchaus Speziesunterschiede zwischen Ratte und Maus im oxidativen Acrylamidstoffwechsel berichtet: in Mäusen ergibt sich aus der Urinausscheidung von Glycidamid und seiner Metabolite nach oraler Verabreichung von 50 mg/kg Acrylamid als wässrige Lösung, dass ca. 50-70% der Aufnahmedosis von Acrylamid in Glycidamid umgewandelt werden (Sumner et al., 1992, 2003).

Bei der gleichen Aufnahmedosis wurden in Ratten nur ca. 30-40% des aufgenommenen Acrylamids in Form von Glycidamid oder seiner Metabolite im Urin identifiziert; die Art der Applikation i.p. versus p.o. der Substanz schien keine Rolle zu spielen (Sumner et al., 1992, 2003). Aus den Urinausscheidungen läßt sich daher folgern, dass die Bildungskapazität von Glycidamid im Menschen um das ca. 2-fache geringer als bei Ratten und um das ca. 4-fache geringer als in Mäusen ist. Der molare Quotient GAMA/AAMA als Urinmessgröße reflektiert durchaus das im Blut bestimmte Verhältnis zwischen den Hämoglobin-Addukten von Glycidamid und Acrylamid (GAVal-Hb/AAVal-Hb). Beide Parameter sind Biomarker für die interne Acrylamidbelastung (Boettcher et al., 2005a; Schettgen et al., 2004; Urban et al., 2006), obwohl sich eine Bildung von DNA-Addukten daraus nicht direkt ableiten läßt. In Nagetieren besteht ein gesicherter linearer Zusammenhang zwischen der Glycidamid-Adduktion an Hämoglobin und der DNA-Adduktion in der Leber (Tareke et al., 2006) und

der Acrylamid-Adduktion an Hämoglobin und der DNA-Adduktion im Sperma (*Xie et al., 2006*). Die Aussagekraft des Verhältnisses GAMA zu AAMA kann so interpretiert werden: je größer dieser Quotient ist, desto empfindlicher ist die Reaktion des Organismus auf die kanzerogene Wirkung des Acrylamids. Das molare Verhältnis AAMA/GAMA (Mittelwert) liegt in Ratten bei 5:1 ( $GAMA/AAMA=0,2$ ), in Mäusen bei 2:1 ( $GAMA/AAMA=0,5$ ) (*Paulsson et al., 2001; 2002*) und in dieser Studie für den Menschen bei *ca. 8:1* ( $GAMA/AAMA=0,12$ ). Daraus ergeben sich die abgeleiteten 2- bis 4-fach erniedrigten Bildungsraten von Glycidamid und die geringeren toxischen Wirkungen für den Menschen. Eine Erklärung hierfür liefern die viel niedrigere verabreichte Acrylamid-Dosis (12,8 µg/kg versus 50 mg/kg) sowie die Art der Applikation beim Menschen. Beide scheinen einen erheblichen Einfluss auf das metabolische und toxikokinetische Verhalten von Acrylamid zu besitzen. Die in zahlreichen Studien bestätigte Eigenschaft von Glycidamid zur Adduktion mit Hämoglobin und DNA liefert somit einen Erklärungsansatz für die geringen im Urin gemessenen Glycidamidkonzentrationen, obwohl gleichzeitig ein direkter Vergleich zwischen der Bildung von solchen Glycidamid-Addukten (kovalent gebundenes Glycidamid an Hämoglobin oder DNA) und den Urinausscheidungen („freies“ Glycidamid) nicht möglich ist. Nach i.v. Verabreichung von verschiedenen Acrylamidmengen in Ratten konnten Hämoglobinaddukte von Glycidamid im Plasma identifiziert werden, welche als Maß für die Umsetzung von Acrylamid in Glycidamid dienten. Die niedrige Dosis (5 mg/kg) führte zu einer Umsetzung von rund 51% in Glycidamid-Addukte, während für die höchste Dosis (100 mg/kg) nur noch lediglich 13% in Glycidamid-Addukte umgewandelt wurden. Diese Dosisabhängigkeit erklärte sich durch eine Sättigung der Bildung von Glycidamid-Addukten in Nagetieren (*Bergmark et al., 1991*).

Doerge et al. haben ebenfalls Plasmakonzentrationen von Acrylamid und Glycidamid gemessen, nachdem die beiden Substanzen im Rahmen einer klinischen Studie Ratten und Mäusen verabreicht wurden. Die niedrigste Dosis war dabei 0,1 mg/kg (Acrylamid oder Glycidamid). Die pharmakokinetische Analyse ergab bei Ratten ein Glycidamid/Acrylamid AUC-Verhältnis von 0,76 (i.v. Verabreichung), 2,7 (orale Zufuhr der Substanz als Lösung) und schließlich 2,2 (nach Aufnahme mit der Nahrung), bei Mäusen errechneten sich die korrespondierenden Werte zu 0,14, 0,77 und 1,0 (*Doerge et al., 2005*). Diese Daten erlauben folgende Schlussfolgerungen: i) eine niedrig verabreichte Acrylamid-Dosis resultiert nicht in einer verminderten Bildungsrate von Glycidamid (wahrscheinlicher ist sogar eine Erhöhung der Glycidamid-Bildung), ii) die Umsetzung von Acrylamid in Glycidamid verläuft in Ratten

viel ausgeprägter als in Mäusen und iii) die Produktion von Glycidamid liegt bei oraler Zufuhr von Acrylamid wegen des First-Pass-Metabolismus weitaus höher als bei i.v. Verabreichung.

Die Messungen in unserer Studie ergeben minimale Glycidamidkonzentrationen im Urin, die weit unterhalb der festgelegten Beobachtungsgrenze von *2,5 ng/ml* liegen. Dieser Befund steht zwar im Einklang mit der Tatsache, dass Glycidamid beim Menschen eine 2-fach bzw. 4-fach niedrigere Bildungsrate als bei Ratten bzw. Mäusen aufweist, jedoch ist durch die Applikation von Acrylamid in einer standardisierten und definierten Nahrungsprobe davon auszugehen, dass eine maximale Umsetzung von Acrylamid in Glycidamid in den Probanden erreicht wird. Diese Maximierung führt offenbar nicht zu einer Erhöhung der Exkretion von freiem Glycidamid im Urin oder einer erhöhten internen Belastung mit Glycidamid, weil die Urinausscheidung von AAMA die von GAMA deutlich übertrifft (geringe molare GAMA/AAMA-Urinausscheidungsquotienten).

Die interindividuelle Variation in der Acrylamid-Toxikokinetik in der vorliegenden Studie weist auf ein homogenes Patientenensemble ohne statistisch auffällige Ausreißer hin, weil zunächst der interindividuelle Variationskoeffizient in einem Bereich zwischen **20 und 30%** liegt und keine Werte außerhalb dieses Bereiches vorkommen (vgl. Tab. 18 in Kapitel 3.3.5.1). Der molare Ausscheidungsquotient GAMA/AAMA verhält sich mit einem Medianwert von **0,115** und einer Variationsbreite zwischen **0,100 bis 0,150** sehr einheitlich. Im Gegensatz dazu lag die Variationsbreite für Spot-Urinproben in Probanden ohne Verabreichung von experimentellen Acrylamid-Dosen zwischen **0,03 und 0,53** mit einem Medianwert von **0,16** (Boettcher et al., 2005a). Diese Diskrepanz der GAMA/AAMA-Quotienten läßt sich durch die geringere Belastung der untersuchten Personen mit Acrylamid und vor allem durch die standardisierten Studienbedingungen in unserer Studie erklären. Dieses optimierte Studiendesign schließt den Verzicht auf jegliche acrylamidhaltige Nahrung, Alkohol und Nikotin (Zigarettenrauch) sowie eine 11-stündige Nahrungskarenz unmittelbar vor der Studie ein. Diese Bedingungen waren in der Studie von Boettcher et al. nicht gegeben, was mit den höheren GAMA und AAMA Konzentrationen im Urin korreliert (Boettcher et al., 2005a). In unserer Studie weisen die durchschnittlichen GAMA/AAMA-Quotienten in Abhängigkeit von den jeweiligen Urinsammelperioden (Sammelzeiten) unterschiedliche Werte mit Änderungen von bis zu **>20** auf. Diese Änderungen deuten stark darauf hin, dass die undefinierte Zeitlücke zwischen Aufnahme von Acrylamid und Spot-Urinmessungen in der Studie von Boettcher et al. für die Variabilität der GAMA/AAMA-Quotienten

hauptsächlich verantwortlich ist (Boettcher et al., 2005a). Ob die Unterschiede in den Enzymaktivitäten von CYP2E1 (Sumner et al., 1999; Thier et al., 2003) und Glutathion-S-Transferasen (Calleman, 1996; Kirman et al. 2003) einen relevanten Einfluss auf den Acrylamid-Metabolismus im Menschen haben und damit ein erhöhtes Kanzerogenitätsrisiko für den Menschen darstellen, bleibt weiterhin ungeklärt und kann von dieser Stelle aus nicht beurteilt werden. Durch Blockade von CYP2E1 werden jedoch die Adduktspiegel von Acrylamid im Blut (AAVal) deutlich erhöht (Doroshenko et al., 2009), so dass eine Veränderung der CYP2E1-Enzymaktivität durch Induktion oder Inhibition einen Indikator für eine höhere bzw. niedrigere Bildung von Glycidamid als die eigentliche krebserzeugende Noxe von Acrylamid darstellen kann.

Aus den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit läßt sich insgesamt schliessen, dass der Hauptanteil der Aufnahmedosis von 0,94 mg Acrylamid mit der Nahrung im menschlichen Körper absorbiert wird. Da der hauptsächlich ausgeschiedene Metabolit AAMA ist, zeichnet sich zusammen mit der Ausscheidung von unverändertem Acrylamid eine effektive Entgiftung ab, weil die Reaktion mit Glutathion hierbei die reaktiven C-C-Doppelbindungen blockiert. Dieser Entgiftungsweg läuft deutlich effizienter ab als die Bildung des hochreaktiven Epoxy-Metaboliten Glycidamid, welche sich letztlich in den im Vergleich zu AAMA geringen Urinausscheidungen von GAMA manifestiert. Diejenige Acrylamidmenge, die nicht in Form von Acrylamid, AAMA oder GAMA im Urin ausgeschieden wird, wird wahrscheinlich an nukleophile Strukturen des Körpers gebunden bleiben (Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2008). Erwähnenswert bleibt jedoch, dass eine erwartete Steigerung der Glycidamid-Bildung gemessen an der Exkretion von Glycidamid und GAMA im Urin trotz einer durch die Art der Nahrungszubereitung und Applikation mit der Nahrung in Form von acrylamidhaltigen Studienchips offensichtlich nicht aufgetreten ist. Das metabolische Ausscheidungsschema verhält sich ähnlich wie die Eliminationsverläufe für höhere und gleiche Aufnahmedosen (3 mg/kg und 13 µg/kg). Außerdem ist die Bildung von Glycidamid wahrscheinlich um das 2-fache geringer als in Ratten und um das 4-fache geringer als in Mäusen bei gleichen Aufnahmedosen in den beiden tierexperimentellen Studien. Daraus folgt, dass Hochrechnungen für das Krebsrisiko beim Menschen anhand der oralen Acrylamidbelastungen in Nagetieren um diese Faktoren korrigiert werden sollten.



## 5. Zusammenfassung

*Acrylamid* stellt chemisch eine ungesättigte Carbonylverbindung dar, die vorwiegend für die Synthese von Polyacrylamiden verwendet wird. Sein Gefahrenpotenzial ist primär aus der Kunststoffherstellung bekannt. Seit schwedische Forscher im Jahr 2002 nach einem schweren Unfall im schwedischen Hallandsås-Tunnel im Jahr 1997, bei dem durch unvollständige Polymerisierung einer acrylamidhaltigen Dichtungsmasse große Mengen des Monomers in die Umwelt gelangten, nachweisen konnten, dass die Substanz auch beim Erhitzen von Lebensmitteln entstehen kann, rückte die Bildung von Acrylamid und sein Metabolismus in den Fokus des öffentlichen Interesses und wird seitdem intensiv beforscht. Acrylamid ist im Tierversuch krebserregend und kann in hohen Dosen Nervenschädigungen auslösen. Die Gefährlichkeit von Acrylamid für den Menschen läßt sich nicht zuverlässig beziffern, weil eindeutige Untersuchungen aufgrund einer geringen Anzahl humaner Studien fehlen. Zudem können tierexperimentelle Daten nur begrenzt für den Menschen extrapoliert werden. Das Ziel unserer klinischen Pilotstudie war die Beschreibung der *Toxikokinetik von Acrylamid* und seiner Metabolite *Glycidamid* und den beiden *Mercaptursäuren AAMA und GAMA* nach der Aufnahme acrylamidhaltiger Nahrung im Menschen. Die 6 *Probanden* erhielten jeweils eine *Acrylamid-Dosis von 0,94 mg* in Form frittiertes Kartoffelchips, deren Acrylamidgehalt vor und nach Ablauf der Studie bestimmt wurde. Kurz vor Einnahme der acrylamidreichen Nahrung und danach wurden Urinproben von je 24 ml zu verschiedenen zeitlichen Zeitpunkten über eine Zeitdauer von 72h gesammelt. Die Konzentrationen von unverändertem Acrylamid, AAMA und GAMA wurden im Sammelurin mittels LC-MS/MS bestimmt und quantifiziert. Aus den Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die *Urinspiegelkurven* hergeleitet, so dass die pharmakokinetischen Parameter ermittelt werden konnten. Insgesamt werden 60,3% des oral aufgenommenen Acrylamids im Urin wiedergefunden, wobei nur ein geringer Teil in unveränderter Form als reines Acrylamid (4,4%) ausgeschieden wird. Der größte Anteil von 50,0% gelangt in Form des direkten Acrylamid-Entgiftungsproduktes AAMA in den Urin. Glycidamid kann trotz der geringen Bestimmungsgrenze von 2,5ng/ml (LOQ) und der dadurch hohen Sensitivität der Messungen im Urin quantitativ nicht analysiert werden, obwohl der qualitative Nachweis überhalb von 1,0 ng/ml (LOD) gelungen ist und sein inaktivierter Phase-II-Metabolit GAMA einen Anteil von 5,9% ausmacht. Die sehr geringen Mengen von Glycidamid deuten auf eine rasche Reaktion mit Glutathion hin, so dass das Konjugationsprodukt GAMA überwiegend entsteht. Ferner scheint die verabreichte Acrylamid-Dosis maßgebend für den oxidativen Stoffwechsel

von Acrylamid in Glycidamid zu sein. Unmittelbar nach Nahrungsaufnahme können gesteigerte Ausscheidungsraten für Acrylamid beobachtet werden. Die maximale Exkretionsrate von  $113 \text{ nmol/h}$  findet sich bereits nach  $3,0\text{h}$ , wobei die terminale Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}=2,4\text{h}$  beträgt. Für AAMA ergibt sich nach  $6,9\text{h}$  ( $t_{1/2}=17,4\text{h}$ ) die höchste Exkretionsrate aller drei Substanzen in Höhe von  $378 \text{ nmol/h}$ , während GAMA mit  $20 \text{ nmol/h}$  nach  $14,9\text{h}$  ( $t_{1/2}=25,1\text{h}$ ) die geringste Ausscheidungsgeschwindigkeit darstellt. Daher werden die Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Vergleich zu Acrylamid viel langsamer aus dem Körper eliminiert. AAMA und GAMA zeigen deutlich veränderte Ausscheidungs-Zeitprofile als Acrylamid auf. Erhöhte Exkretionsraten gehen mit einer gleichzeitigen Steigerung der Ausscheidungsmengen der Substanz einher, jedoch sind Beginn und Dauer der maximalen Ausscheidung nicht von der Größe der Exkretionsrate abhängig. Die Ausscheidungsreihenfolge ergibt sich nach den terminalen Eliminationshalbwertszeiten und den Zeitpunkten der maximalen Exkretionsraten zu: *Acrylamid*  $\ll$  *AAMA*  $<$  *GAMA*, beurteilt nach den Ausscheidungsmengen gilt die Reihenfolge: *AAMA*  $\gg$  *GAMA*  $>$  *Acrylamid*. Das am schnellsten renal eliminierte Acrylamid wird in den geringsten Mengen im Urin ausgeschieden. Der Umkehrschluß, dass sehr langsam in den Urin ausgeschiedene Substanzen wie GAMA in hohen Mengen vorkommen, gilt nicht, obwohl das langsamer als Acrylamid ausgeschiedene AAMA den größten Anteil der oral aufgenommenen Dosis darstellt. Zwischen den *6 Probanden (Nichtraucher)* existieren kaum interindividuelle Abweichungen (Variationskoeffizienten für alle toxikokinetischen Variablen zwischen ca. *20% bis 30%*), so dass keine apparenten Ausreißer vorliegen und damit die Gesamtbeurteilung anhand der durchschnittlichen toxikokinetischen Parameter zulässig und aussagekräftig ist. Die Berechnungen der toxikokinetischen Parameter aus den Funktionsanpassungen von kumulativen und absoluten Urinspiegelkurven sind miteinander vergleichbar und liefern nahezu identische Werte. Das sowohl von den Ausscheidungsmengen als auch von den Stoffmengen-Zeitprofilen abgeleitete metabolische Schema verhält sich ähnlich zu den beobachteten Ergebnissen aus humanen Studien mit gleicher Expositionsdosis von  $13 \mu\text{g/kg}$  Körpergewicht und höherer Dosis von  $3 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht. Weiterhin führen die Ergebnisse in der vorliegenden Studie zu der Annahme, dass die Bildung des aktiveren und eigentlich genotoxischen und mutagenen Acrylamid-Metaboliten Glycidamid bei vergleichbaren relativen Dosen wahrscheinlich um das *2fache* niedriger als in Ratten und um das *4fache* geringer als in Mäusen ist. Daraus folgt, dass anhand der oralen Acrylamidbelastungen bei Nagern die Extrapolation für das Krebsrisiko beim Menschen um diese Faktoren korrigiert werden sollte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adler, I.D.; Ingwersen, I.; Kliesch, U.; el Tarras, A.: Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 206, 379-385 (1988).
2. Ahn, J.S.; Castle, L.; Clarke, D.B.; Lloyd, A.S.; Philo, M.R.; Speck, D.R.: Verification of the findings of acrylamide in heated foods. *Food Addit Contam* 19, 1116-1124 (2002).
3. Wayne, N.J., American Cyanamid Company: A proportional mortality ratio analysis of workers exposed to acrylamide at the Warners Plant, Company Report (1984).
4. BAG (Swiss Federal Office of Public Health): Assessment of acrylamide intake by duplicate diet study, preliminary communication:  
[http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/2001\\_2002.htm](http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/2001_2002.htm); (2002)
5. Barber, D.S.; Hunt, J.R.; Ehrich, M.F.; Lehning, E.J.; LoPachin, R.M.: Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology* 22, 341-353 (2001).
6. Baum, M.; Fauth, E.; Fritzen, S.; Herrmann, A.; Mertes, P.; Merz, K.; Rudolphi, M.; Zankl, H.; Eisenbrand, G.: Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat Res* 580, 61-69 (2005).
7. Becalski, A.; Lau, B.P.; Lewis, D.; Seaman, S.W.: Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J Agric Food Chem* 51, 802-808 (2003).
8. Bergmark, E.; Calleman, C.J.; Costa, L.G.: Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 111, 352-363 (1991).
9. Bergmark, E.; Calleman, C.J.; He, F.; Costa, L.G.: Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 120, 45-54 (1993).

10. Bjellaas, T.; Stolen, L.H.; Haugen, M.; Paulsen, J.E.; Alexander, J.; Lundanes, E.; Becher, G.: Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. *Food Chem Toxicol* 45, 1020-1026 (2007).
11. Boettcher, M.I.; Schettgen, T.; Kutting, B.; Pischetsrieder, M.; Angerer, J.: Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutat Res* 580, 167-176 (2005a).
12. Boettcher, M.I.; Angerer, J.: Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 824, 283-294 (2005b).
13. Boettcher, M.I.; Bolt, H.M.; Drexler, H.; Angerer, J.: 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 (2006a).
14. Boettcher, M.I.; Bolt, H.M.; Angerer, J.: Acrylamide exposure via the diet: influence of fasting on urinary mercapturic acid metabolite excretion in humans. *Arch Toxicol* 80(12): 817-819 (2006b).
15. Bull, R.J.; Robinson, M.; Laurie, R.D.; Stoner, G.D.; Greisiger, E.; Meier, J.R.; Stober, J.: Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res* 44, 107-111 (1984a).
16. Bull, R.J.; Robinson, M.; Stober, J.A.: Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett* 24, 209-212 (1984b).
17. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Protokoll einer Sitzung im BgVV vom 02. Juli 2002.
18. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz 2008-51; 98-108. Springer Medizin Verlag 2008.

19. Burek, J.D.; Albee, R.R.; Beyer, J.E.; Bell, T.J.; Carreon, R.M.; Morden, D.C.; Wade, C.E.; Hermann, E.A.; Gorzinski, S.J.: Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *J Environ Pathol Toxicol* 4, 157-182 (1980).
20. Calleman, C.J.; Bergmark, E.; Costa, L.G.: Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol* 3, 406-412 (1990).
21. Calleman, C.J.; Stern, L.G.; Bergmark, E.; Costa, L.G.: Linear versus nonlinear models for hemoglobin adduct formation by acrylamide and its metabolite glycidamide: implications for risk estimation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1, 361-368 (1992).
22. Calleman, C.J.; Bergmark, E.; Stern, L.G.; Costa, L.G.: A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ Health Perspect* 99, 221-223 (1993).
23. Calleman, C.J.: The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. *Drug Metab Rev* 28, 527-590 (1996).
24. Castle, L.; Campos, M-J.; Gilbert, J.: Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 549-555 (1991).
25. Castle, L.: Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1261-1263 (1993).
26. Dearfield, K.L.; Abernathy, C.O.; Ottley, M.S.; Brantner, J.H.; Hayes, P.F.: Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res* 195, 45-77 (1988).

27. Dearfield, K.L.; Douglas, G.R.; Ehling, U.H.; Moore, M.M.; Sega, G.A.; Brusick, D.J.: Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res* 330, 71-99 (1995).
28. Doerge, D.R.; da Costa, G.G.; McDaniel, L.P.; Churchwell, M.I.; Twaddle, N.C.; Beland, F.A.: DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat Res* 580, 131-141 (2005a).
29. Doerge, D.R.; Young, J.F.; McDaniel, L.P.; Twaddle, N.C.; Churchwell, M.I.: Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 202, 258-267 (2005b).
30. Doerge, D.R.; Young, J.F.; McDaniel, L.P.; Twaddle, N.C.; Churchwell, M.I.: Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 208, 199-209 (2005c).
31. 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.; Sorgel, F.; Schomig, E.; Tomalik-Scharte, D.: In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 433-443 (2009).
32. Dybing, E.; Sanner, T.: Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol Sci* 75, 7-15 (2003).
33. Dybing, E.; Farmer, P.B.; Andersen, M.; Fennell, T.R.; Lalljie, S.P.; Muller, D.J.; Olin, S.; Petersen, B.J.; Schlatter, J.; Scholz, G.; Scimeca, J.A.; Slimani, N.; Tornqvist, M.; Tuijtelaars, S.; Verger, P.: Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* 43, 365-410 (2005).
34. Edwards, P.M.: The distribution and metabolism of acrylamide and its neurotoxic analogues in rats. *Biochem Pharmacol* 24, 1277-1282 (1975).

35. Ehling, U.H.; Neuhauser-Klaus, A.: Reevaluation of the induction of specific-locus mutations in spermatogonia of the mouse by acrylamide. *Mutat Res* 283, 185-191 (1992).
36. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second ed. (2000).
37. Fennell, T.R.; Sumner, S.C.; Snyder, R.W.; Burgess, J.; Spicer, R.; Bridson, W.E.; Friedman, M.A.: Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci* 85, 447-459 (2005).
38. Forschungszentrum Jülich, URL: <http://www.fz-juelich.de/zch/> (5. Februar, 2004).
39. Friedman, M.: Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 51, 4504-4526 (2003).
40. Ghanayem, B.I.; McDaniel, L.P.; Churchwell, M.I.; Twaddle, N.C.; Snyder, R.; Fennell, T.R.; Doerge, D.R.: Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci* 88, 311-318 (2005).
41. Hagmar, L.; Tornqvist, M.; Nordander, C.; Rosen, I.; Bruze, M.; Kautiainen, A.; Magnusson, A.L.; Malmberg, B.; Aprea, P.; Granath, F.; Axmon, A.: Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand J Work Environ Health* 27, 219-226 (2001).
42. Hagmar, L.; Wirfalt, E.; Paulsson, B.; Tornqvist, M.: Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. *Mutat Res* 580, 157-165 (2005).
43. Hasegawa, K.; Miwa, S.; Isomura, K.; Tsutsumiuchi, K.; Taniguchi, H.; Miwa, J.: Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Sci* 101, 215-225 (2008).

44. Hashimoto, K.; Aldridge, W.N.: Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmacol* 19, 2591-2604 (1970).
45. Hilbig, A.; Freidank, N.; Kersting, M.; Wilhelm, M.; Wittsiepe, J.: Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups. *Int J Hyg Environ Health* 207, 463-471 (2004).
46. IARC Monographs. Acrylamide. Lyon: International Agency for Research on Cancer (1993).
47. Ikeda, G.J.; Miller, E.; Sapienza, P.P.; Michel, T.C.; King, M.T.; Turner, V.A.; Blumenthal, H.; Jackson, W.E., 3rd; Levin, S.: Distribution of <sup>14</sup>C-labelled acrylamide and betaine in foetuses of rats, rabbits, beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem Toxicol* 21, 49-58 (1983).
48. ISO/IEC 17025: 1999. General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories; ISO: Geneva (1999).
49. Jetter, A.; Kinzig-Schippers, M.; Walchner-Bonjean, M.; Hering, U.; Bulitta, J.; Schreiner, P.; Sorgel, F.; Fuhr, U.: Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of sildenafil. *Clin Pharmacol Ther* 71, 21-29 (2002).
50. Johnson, K.A.; Gorzinski, S.J.; Bodner, K.M.; Campbell, R.A.; Wolf, C.H.; Friedman, M.A.; Mast, R.W.: Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 85, 154-168 (1986).
51. Kirman, C.R.; Gargas, M.L.; Deskin, R.; Tonner-Navarro, L.; Andersen, M.E.: A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *J Toxicol Environ Health A* 66, 253-274 (2003).



52. Kjuus, H.; Hansteen, I.L.; Ryberg, D.; Goffeng, L.O.; Ovrebo, S.; Skaug, V.: Chromosome aberrations in tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide. *Scand J Work Environ Health* 31, 300-306 (2005).
53. Livsmedelsverket, National Food Administration, Sweden, Acrylamide in Foodstuffs, Consumption and Intake: <http://www.slv.se>; (26. April, 2002).
54. Marlowe, C.; Clark, M.J.; Mast, R.W.; Friedman, M.A.; Waddell, W.J.: The distribution of [<sup>14</sup>C]acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicol Appl Pharmacol* 86, 457-465 (1986).
55. Marsh, G.M.; Lucas, L.J.; Youk, A.O.; Schall, L.C.: Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup Environ Med* 56, 181-190 (1999).
56. Miller, M.J.; Carter, D.E.; Sipes, I.G.: Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 63, 36-44 (1982).
57. Miller, M.S.; Spencer, P.S.: The mechanisms of acrylamide axonopathy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25, 643-666 (1985).
58. Moore, M.M.; Amtower, A.; Doerr, C.; Brock, K.H.; Dearfield, K.L.: Mutagenicity and clastogenicity of acrylamide in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ Mutagen* 9, 261-267 (1987).
59. Mottram, D.S.; Wedzicha, B.L.; Dodson, A.T.: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448-449 (2002).
60. Mucci, L.A.; Dickman, P.W.; Steineck, G.; Adami, H.O.; Augustsson, K.: Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br J Cancer* 88, 84-89 (2003).

61. Mucci, L.A.; Dickman, P.W.; Steineck, G.; Adami, H.O.; Augustsson, K.: Reply: Dietary acrylamide and cancer risk: additional data on coffee. *Br J Cancer* **89**, 775-776 (2003).
62. Mucci, L.A.; Lindblad, P.; Steineck, G.; Adami, H.O.: Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer* **109**, 774-776 (2004).
63. Mucci, L.A.; Sandin, S.; Balter, K.; Adami, H.O.; Magnusson, C.; Weiderpass, E.: Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *Jama* **293**, 1326-1327 (2005).
64. Mucci, L.A.; Wilson, K.M.: Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J Agric Food Chem* **56**, 6013-6019 (2008).
65. NRC, Nestlé Research Center: Mechanism(s) of formation of acrylamide in foods: [www.jifsan.umd.edu/presentations/acrylamide2002/WG1\\_Stadler\\_R.pdf](http://www.jifsan.umd.edu/presentations/acrylamide2002/WG1_Stadler_R.pdf); (6. Dezember, 2002)
66. Norwegian Food Agency: <http://www.snt.no/nytt/tema/Akrylamid/analyseresultater.htm>; (Juni, 2002).
67. Olesen, P.T.; Olsen, A.; Frandsen, H.; Frederiksen, K.; Overvad, K.; Tjønneland, A.: Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer* **122**(9): 2094-100 (2008).
68. Ono, H.; Chuda, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Yada, H.; Ishizaka, M.; Kobayashi, H.; Yoshida, M.: Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Addit Contam* **20**, 215-220 (2003).
69. Paulsson, B.; Athanassiadis, I.; Rydberg, P.; Tornqvist, M.: Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 1859-1865 (2003).

70. Paulsson, B.; Kotova, N.; Grawe, J.; Henderson, A.; Granath, F.; Golding, B.; Tornqvist, M.: Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat Res* 535, 15-24 (2003).
71. Paulsson, B.; Rannug, A.; Henderson, A.P.; Golding, B.T.; Tornqvist, M.; Warholm, M.: In vitro studies of the influence of glutathione transferases and epoxide hydrolase on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. *Mutat Res* 580, 53-59 (2005).
72. Pelucchi, C.; Franceschi, S.; Levi, F.; Trichopoulos, D.; Bosetti, C.; Negri, E.; La Vecchia, C.: Fried potatoes and human cancer. *Int J Cancer* 105, 558-560 (2003).
73. Ramsey, J.C.; Young, J.D.; Gorzinski, S.J.: Acrylamide: Toxicodynamics in rats. Unpublished report, Dow Chemical Company, Midland, MI (1984).
74. Renwick, A.G.; Barlow, S.M.; Hertz-Picciotto, I.; Boobis, A.R.; Dybing, E.; Edler, L.; Eisenbrand, G.; Greig, J.B.; Kleiner, J.; Lambe, J.; Muller, D.J.; Smith, M.R.; Tritscher, A.; Tuijtelaars, S.; van den Brandt, P.A.; Walker, R.; Kroes, R.: Risk characterisation of chemicals in food and diet. *Food Chem Toxicol* 41, 1211-1271 (2003).
75. Rice, J.M.: The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res* 580, 3-20 (2005).
76. Rosen, J.; Hellenas, K.E.: Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst* 127, 880-882 (2002).
77. Russell, L.B.; Hunsicker, P.R.; Cacheiro, N.L.; Generoso, W.M.: Induction of specific-locus mutations in male germ cells of the mouse by acrylamide monomer. *Mutat Res* 262, 101-107 (1991).
78. Russo, A.; Gabbani, G.; Simoncini, B.: Weak genotoxicity of acrylamide on premeiotic and somatic cells of the mouse. *Mutat Res* 309, 263-272 (1994).

79. Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.; Ehrenberg, L.; Tornqvist, M.: Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 51, 7012-7018 (2003).
80. Schettgen, T.; Rossbach, B.; Kutting, B.; Letzel, S.; Drexler, H.; Angerer, J.: Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *Int J Hyg Environ Health* 207, 531-539 (2004).
81. Schlatter, J.: Wie gefährlich ist Acrylamid?. Bundesamt für Gesundheit, Zürich (2002).
82. Sega, G.A.; Alcota, R.P.; Tancongco, C.P.; Brimer, P.A.: Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat Res* 216, 221-230 (1989).
83. Sega, G.A.; Generoso, E.E.: Measurement of DNA breakage in specific germ-cell stages of male mice exposed to acrylamide, using an alkaline-elution procedure. *Mutat Res* 242, 79-87 (1990).
84. Sega, G.A.; Generoso, E.E.; Brimer, P.A.: Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ Mol Mutagen* 16, 137-142 (1990).
85. Settels, E.; Bernauer, U.; Palavinskas, R.; Klaffke, H.S.; Gundert-Remy, U.; Appel, K.E.: Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Arch Toxicol* 82, 717-727 (2008).
86. Shelby, M.D.; Cain, K.T.; Hughes, L.A.; Braden, P.W.; Generoso, W.M.: Dominant lethal effects of acrylamide in male mice. *Mutat Res* 173, 35-40 (1986).
87. Shelby, M.D.; Cain, K.T.; Cornett, C.V.; Generoso, W.M.: Acrylamide: induction of heritable translocation in male mice. *Environ Mutagen* 9, 363-368 (1987).

88. Smith, M.K.; Zenick, H.; Preston, R.J.; George, E.L.; Long, R.E.: Dominant lethal effects of subchronic acrylamide administration in the male Long-Evans rat. *Mutat Res* 173, 273-277 (1986).
89. Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen, SN ENV 13005, Ausgabe 2000-05 (2000).
90. Sobel, W.; Bond, G.G.; Parsons, T.W.; Brenner, F.E.: Acrylamide cohort mortality study. *Br J Ind Med* 43, 785-788 (1986).
91. Solomon, J.J.; Fedyk, J.; Mukai, F.; Segal, A.: Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res* 45, 3465-3470 (1985).
92. Sorgel, F.; Weissenbacher, R.; Kinzig-Schippers, M.; Hofmann, A.; Illauer, M.; Skott, A.; Landersdorfer, C.: Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 48, 267-274 (2002).
93. Stadler, R.H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P.A.; Robert, M.C.; Riediker, S.: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419, 449-450 (2002).
94. Sumner, S.C.; MacNeela, J.P.; Fennell, T.R.: Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-<sup>13</sup>C]acrylamide in rats and mice using <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 5, 81-89 (1992).
95. Sumner, S.C.; Selvaraj, L.; Nauhaus, S.K.; Fennell, T.R.: Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem Res Toxicol* 10, 1152-1160 (1997).

96. Sumner, S.C.; Fennell, T.R.; Moore, T.A.; Chanas, B.; Gonzalez, F.; Ghanayem, B.I.: Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol* 12, 1110-1116 (1999).
97. Sumner, S.C.; Williams, C.C.; Snyder, R.W.; Krol, W.L.; Asgharian, B.; Fennell, T.R.: Acrylamide: A Comparison of Metabolism and Hemoglobin Adducts in Rodents following Dermal, Intraperitoneal, Oral, or Inhalation Exposure. *Toxicol Sci* 75, 260-270 (2003).
98. Svensson, K.; Abramsson, L.; Becker, W.; Glynn, A.; Hellenas, K.; Lind, Y.; Rosen, J.: Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol* 41, 1581-1586 (2003).
99. Swedish National Food Administration, Information about Acrylamide in Foodable: <http://www.slp.se/engdefault.asp>; (24. April, 2002).
100. SWEDAC Accreditation SWEDAC Dnr. 01-4262-51.1125; Swedish Board for Accreditation and Conformity Assessment; Stockholm, Sweden (15. Mai, 2002).
101. Taeymans, D.; Wood, J.; Ashby, P.; Blank, I.; Studer, A.; Stadler, R.H.; Gonde, P.; Van Eijck, P.; Lalljie, S.; Lingnert, H.; Lindblom, M.; Matissek, R.; Muller, D.; Tallmadge, D.; O'Brien, J.; Thompson, S.; Silvani, D.; Whitmore, T.: A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44, 323-347 (2004).
102. Tanaka, E.; Terada, M.; Misawa, S.: Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 25, 165-175 (2000).
103. Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Tornqvist, M.: Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem Res Toxicol* 13, 517-522 (2000).
104. Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Tornqvist, M.: Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 50, 4998-5006 (2002).

105. Tareke, E.; Twaddle, N.C.; McDaniel L.P.; Churchwell M.I.; Young J.F.; Doerge D.R.: Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(1): 63-75 (2006).
106. Taubert, D.; Harlfinger, S.; Henkes, L.; Berkels, R.; Schomig, E.: Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *J Agric Food Chem* 52, 2735-2739 (2004).
107. Thier, R.; Bruning, T.; Roos, P.H.; Rihs, H.P.; Golka, K.; Ko, Y.; Bolt, H.M.: Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health* 206, 149-171 (2003).
108. Tilson, H.A.: The neurotoxicity of acrylamide: an overview. *Neurobehav Toxicol Teratol* 3, 445-461 (1981).
109. Tyla, R.W.; Friedman, M.A.; Losco, P.E.; Fisher, L.C.; Johnson, K.A.; Strother, D.E.; Wolf, C.H.: Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reprod Toxicol* 14, 385-401 (2000).
110. Twaddle, N.C.; McDaniel, L.P.; Gamboa da Costa, G.; Churchwell, M.I.; Beland, F.A.; Doerge, D.R.: Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F1 mice using LC-ES/MS/MS. *Cancer Lett* 207, 9-17 (2004).
111. Urban, M.; Gilch, G.; Schepers, G.; van Miert, E.; Scherer, G.: Determination of the major mercapturic acids of 1,3-butadiene in human and rat urine using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 796(1): 131-40 (2003).
112. Urban, M.; Kavvadias, D.; Riedel, K.; Scherer, G.; Tricker, A.R.: Urinary mercapturic acids and a hemoglobin adduct for the dosimetry of acrylamide exposure in smokers and nonsmokers. *Inhal Toxicol* 18, 831-839 (2006).

113. WHO, World Health Organisation: Health applications of acrylamide in food. Report of a Joint WHO/FAO Consultation, Geneva (2002).
114. Xie, Q.; Sun, H.; Liu, Y.; Ding, X.; Fu, D.; Liu, K.: Adduction of biomacromolecules with acrylamide (AA) in mice at environmental dose levels studied by accelerator mass spectrometry. *Toxicol Lett* 163, 101-108 (2006).
115. Yaylayan, V.A.; Wnorowski, A.; Perez Locas, C.: Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J Agric Food Chem* 51, 1753-1757 (2003).



## **7. Veröffentlichungen**

### **Jahreskongress für Klinische Pharmakologie 2003 (Postervortrag):**

P. Pournara, A. Lazar, D. Taubert, D. Tomalik-Scharte, M. Kinzig-Schippers, F. Sörgel, E. Schömig, U. Fuhr: Eine Einzeldosis-Studie zur Beurteilung der Toxikokinetik von Acrylamid nach Aufnahme acrylamidhaltiger Nahrung (2003).

### **Publikation 2006 (Peer-Review):**

U. Fuhr, M. I. Boettcher, M. Kinzig-Schippers, A. Weyer, A. Jetter, A. Lazar, D. Taubert, D. Tomalik-Scharte, P. Pournara, V. Jakob, S. Harlfinger, T. Klaassen, A. Berkessel, J. Angerer, F. Sörgel, E. Schömig: Toxikokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(2) 266-71 (2006).