

**Human-Biomonitoring des oxidativen und
reduktiven Stoffwechsels von Acrylamid und
Acrylnitril – Merkaptursäuren und Hb-Addukte
als Parameter des biochemischen Effektes**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)
der Bergischen Universität Wuppertal
genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
- Doktor der Naturwissenschaften -
(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von

Julia M. Latzin

(staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin)

Wuppertal 2013

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20130920-120710-2

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20130920-120710-2>]

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig im Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA) - Institut der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 06.07.2013

(Julia Latzin)

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Prävention und Arbeitsmedizin (IPA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung - Institut der Ruhr-Universität Bochum (ehemals BGFA - Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) in Bochum in der Zeit von August 2009 bis Juli 2012.

Teile dieser Arbeit wurden finanziert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (AN 107/21-1).

Herrn Prof. Dr. J. Angerer danke ich für die Unterstützung und für die interessante Fragestellung.

Herrn Prof. Dr. O. Schmitz danke ich für die Betreuung der Dissertation seitens der naturwissenschaftlichen Fakultät, dem ernsthaften Interesse sowie den „ketzerischen“ Anmerkungen, die stets zum kritischen Nachdenken angeregt haben.

Herrn Prof. Dr. H. Hayen bin ich sehr dankbar für die Unterstützung insbesondere am Ende der Promotion (besonders natürlich beim Thema Statistik).

Herrn Dr. Holger Koch, Herrn Dr. Tobias Weiß, Frau Dr. Birgit Schindler und Herrn Dr. Heiko Udo Käfferlein danke ich für die hervorragende Betreuung am Institut.

Bei Herrn Dr. Thomas Schettgen, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin in Aachen, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Hb-Addukt-Analytik bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Kollegen des Biomonitoring Teams für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für den regen wissenschaftlichen Austausch in gemeinsamen Diskussionen und natürlich die zahllosen Butterwecken.

Insbesondere danke ich Frank Sondermann. Deine Unterstützung und dein Rat haben mich an so manchem Punkt weitermachen lassen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Danke für euren Rückhalt. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter. Auch wenn du viel zu früh gehen musstest, warst du doch auch in dieser Zeit immer für mich da. Danke.

Inhaltsverzeichnis		
Abkürzungsverzeichnis		
Abstract	Seite	
1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Möglichkeiten der Expositionsbestimmung	3
	<i>2.1.1 Ambient Monitoring</i>	<i>4</i>
	<i>2.1.2 Biomonitoring</i>	<i>6</i>
2.2	Acrylamid (AA)	11
	<i>2.2.1 Übersicht Acrylamid</i>	<i>11</i>
	<i>2.2.2 Produktion und Einsatz</i>	<i>12</i>
	<i>2.2.3 Toxikologie</i>	<i>12</i>
	<i>2.2.4 Grenzwerte zur Expositionsbewertung</i>	<i>14</i>
	<i>2.2.5 Acrylamid in Lebensmitteln</i>	<i>15</i>
	<i>2.2.6 Tabakrauch</i>	<i>20</i>
	<i>2.2.7 Metabolismus und Toxikokinetik</i>	<i>20</i>
2.3	Acrylnitril (AN)	35
	<i>2.3.1 Übersicht Acrylnitril</i>	<i>35</i>
	<i>2.3.2 Produktion und Einsatz</i>	<i>36</i>
	<i>2.3.3 Toxikologie</i>	<i>36</i>
	<i>2.2.4 Grenzwerte zur Expositionsbewertung</i>	<i>37</i>
	<i>2.3.5 Tabakrauch</i>	<i>38</i>
	<i>2.3.6 Metabolismus und Toxikokinetik</i>	<i>38</i>
2.4	HILIC – Hydrophilic interaction liquid chromatography	44
	<i>2.4.1 Trennmechanismus</i>	<i>44</i>
	<i>2.4.2 Stationäre Phasen</i>	<i>46</i>
	<i>2.4.3 Sonstige Details zur HILIC</i>	<i>47</i>
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	49
4	BESTIMMUNG DES OXDATIVEN ACRYLAMID-METABOLITEN 2,3-DIHYDROXYPROPIONAMID (OH-PA) IM URIN	51
4.1	Grundlage des Verfahrens	51
4.2	Geräte und Chemikalien	52
	<i>4.2.1 Geräte und Materialien</i>	<i>52</i>
	<i>4.2.2 Chemikalien</i>	<i>53</i>
4.3	Lösungen	54
	<i>4.3.1. Haltbarkeit der Lösungen und Vergleichsstandards</i>	<i>55</i>

4.4	Probenahme und Probenaufbereitung	55
	<i>4.4.1 Probenahme</i>	<i>55</i>
	<i>4.4.2 Aufarbeitung</i>	<i>55</i>
4.5	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Arbeitsbedingungen	57
4.6	Analytische Bestimmung	58
4.7	Kalibrierung	63
4.8	Berechnung der Analysenergebnisse	64
4.9	Qualitätssicherung	65
4.10	Störeinflüsse	67
4.11	Diskussion der Methode	68
5	BESTIMMUNG DER OXIDATIV UND REDUKTIV GEBILDETEN MERKAP- TURSÄUREN VON ACRYLAMID UND ACRYLNITRIL IM URIN	70
5.1	Grundlage des Verfahrens	70
5.2	Geräte und Chemikalien	71
	<i>5.2.1 Geräte und Materialien</i>	<i>71</i>
	<i>5.2.2 Chemikalien</i>	<i>73</i>
5.3	Lösungen	74
	<i>5.3.1 Haltbarkeit der Lösungen und Vergleichsstandards</i>	<i>77</i>
5.4	Probenahme und Probenaufbereitung	78
	<i>5.4.1 Probenahme</i>	<i>78</i>
	<i>5.4.2 Aufarbeitung</i>	<i>78</i>
5.5	Flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Arbeitsbedingungen	79
5.6	Analytische Bestimmung	80
5.7	Kalibrierung	84
5.8	Berechnung der Analysenergebnisse	87
5.9	Qualitätssicherung	89
5.10	Störeinflüsse	90
5.11	Diskussion der Methode	92
6	VERIFIZIERUNG DES NEUEN BIOMARKERS 2,3-DIHYDROXYPROPIONAMID (OH-PA)	95
6.1	Kollektivbeschreibung	95
	<i>6.1.1 Allgemeinbevölkerung</i>	<i>95</i>
	<i>6.1.2 Fastenkollektive</i>	<i>95</i>
6.2	OH-PA im Urin der Allgemeinbevölkerung	96
6.3	Verlauf der OH-PA Ausscheidung bei einem 48-stündigem Fasten	99

6.4	Verlauf der OH-PA Ausscheidung bei einem 10-tägigen Heilfasten	101
6.5	Beurteilung des neuen Biomarkers OH-PA	103
7	UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN UND REDUKTIVEN LANG- UND KURZZEITMARKER IN DER ALLGEMEINBEVÖLKERUNG	104
	Anmerkung zur statischen Auswertung	104
7.1	Merkaptursäuren	106
	<i>7.1.1 AA-Merkaptursäuren</i>	<i>106</i>
	<i>7.1.2 AN-Merkaptursäuren</i>	<i>112</i>
7.2	Hämoglobin (Hb)-Addukte	116
	<i>7.2.1 AA-Hämoglobin-Addukte</i>	<i>116</i>
	<i>7.2.2 AN- Hämoglobin -Addukte</i>	<i>119</i>
7.3	Oxidativer und reduktiver Metabolismus	121
	<i>7.3.1 Acrylamid</i>	<i>121</i>
	<i>7.3.1.1 Kurzzeitmarker</i>	<i>121</i>
	<i>7.3.1.2 Langzeitmarker</i>	<i>125</i>
	<i>7.3.2 Acrylnitril</i>	<i>127</i>
	<i>7.3.2.1 Kurzzeitmarker</i>	<i>127</i>
	<i>7.3.2.2 Langzeitmarker</i>	<i>130</i>
	<i>7.3.3 Zusammenfassung: Betrachtung oxidativer und reduktiver Metabolismus</i>	<i>132</i>
8	UNTERSUCHUNG DER ACRYLAMID-BELASTUNG VON LABORBESCHÄFTIGTEN	133
8.1	Kurzzeitmarker	134
8.2	Langzeitmarker	137
9	ZUSAMMENFASSUNG	139
10	LITERATUR	145
Anhang		
	Abbildungsverzeichnis	162
	Tabellenverzeichnis	165
	Übersicht Mercaptursäureenergebnisse	167
	Einzelne MRM-Spuren Mercaptursäuren (Fortsetzung Abb. 16)	168
	Kalibrierfunktionen	172
	Auswertungen Werte unterhalb der Nachweisgrenze	175
	Kumulative Verteilungen	178

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AAMA	Acrylamid-Merkaptursäure (MA) <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoylethyl)-cystein
AAMA-SO ₂	Acrylamid-MA-sulfoxyliert <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoylethyl)-cystein-sulfoxid
AAV	Acrylamid-Valin (Hb-Addukt von AA) <i>N</i> -(2-Carbamoyl-ethyl)-valin
Abb.	Abbildung
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
ACN	Acetonitril
AGW	Arbeitsplatz-Grenzwert
AN	Acrylnitril
BAR	Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert
BAT	Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BLW	Biologischer Leit-Wert
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Gesundheitsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika in Atlanta, Georgia)
1-CHEMA bzw. CHEMA	Cyanoethylenepoxid-MA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-Cyano-2-Hydroxyethyl)-cystein
2-CHEMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Cyano-2-Hydroxyethyl)-cystein
1-CHEV	<i>N</i> -(1-Cyano-2-Hydroxyethyl)-valin
2-CHEV	<i>N</i> -(2-Cyano-2-Hydroxyethyl)-valin

CEMA	Acrylnitril-MA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-cyanoethyl)-cystein
CEV	<i>N</i> -(2-Cyanoethyl)-valin (Hb-Addukt von AN)
CYP 2E1	Cytochrom P450 2E1 (Phase-1-Enzym)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: acid)
EA	Exponierter Arbeiter/-in
EI	Elektronenstoßionisation
EKA	Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe
EPA US	Environmental Protection Agency der USA
ERB	Expositions-Risiko Beziehung
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ² (Angabe für die Zentrifugationsgeschwindigkeiten)
GA	Glycidamid
GAMA	Glycidamid-MA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Hydroxy-2-Carbamoyl-ethyl)-cystein
GAV	Glycidamid-Valin (Hb-Addukt von GA) <i>N</i> -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion
Hb-Addukt	Hämoglobinaddukt
HBM	Humanbiomonitoring

HEMA	Hydroxyethyl-MA <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Hydroxyethyl)-cystein
HEV	Hydroxyethylvalin (Hb Addukt u.a. von Ethylenoxid) <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-valin
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPA	Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung – Institut der Ruhr-Universität Bochum
Iso-GAMA	Glycidamid-MA-Isomer <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein
ISTD	Interner Standard
LC	Flüssigchromatographie (engl.: Liquid Chromatography)
MA	Merkaptursäure (engl.: mercapturic acid)
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MS	Massenspektrometrie
MTBSTFA	<i>N</i> - <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoroacetamid
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey (Studien zur Erfassung der gesundheitlichen Lage der US-Bewohner)
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level
NR	Nichtraucher
NWG	Nachweisgrenze
OH-PA	2,3-Dihydroxypropionamid
PFPITC	Pentafluorphenylisothiocyanat
R	Raucher

SIM	Selected Ion Monitoring/ Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion (engl.: Solid-Phase-Extraction)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: world health organization)

ABSTRACT

In this study, the metabolism of acrylamide (AA) and acrylonitrile (AN) was analyzed regarding the ratio of the oxidative and reductive metabolites in urine and blood. In both metabolic pathways, the oxidative metabolites glycidamide (GA) of AA and cyanoethylenoxid (CEO) of AN are the ultimate genotoxic species.

In a collective of 126 volunteers of the general population, oxidative and reductive metabolites of both substances were analyzed in blood (n = 123) and urine (n = 126). These data were compared with animal data collected from rodents to estimate the carcinogenic potential of both chemicals in humans. Accordingly, the extent of the oxidative pathway was investigated by comparing different exposition levels in the general population.

Methods for the determination of the mercapturic acids and 2,3-dihydroxypropionamide (OH-PA) as the direct hydrolysis product of GA in human urine of the general population were developed and validated.

OH-PA and the mercapturic acids as short time exposure biomarkers were analyzed in urine and the established method for the determination of hemoglobin adducts as long time exposure biomarker in blood of both substances was also applied to this collective.

It is the first study analyzing OH-PA in human urine of the general population. OH-PA proved unsuitable as an AA biomarker because values were higher than expected from a metabolism study. In a fasting study, the OH-PA excretion decreased not as significant as expected from an analog fasting study of the mercapturic acids which was already published.

In contrast to the biomarkers already known, the OH-PA values in smokers and nonsmokers were not significantly different.

Comparing the data of this study with animal data it seems that the oxidative pathway in humans is not that much pronounced. However, data of rats could still be used for a risk assessment because of similarities in the metabolism.

Persons with a higher exposure of both substances have a diminished oxidative pathway. This correlation was shown by short and long time exposure biomarkers for AA and by the long time exposure biomarkers for AN.

Until now, we don't know if CYP2E1 is saturated and the oxidation is thus limited or if the organism regulates CYP2E1 when the exposition increases over a longer period to protect itself. More data about CYP2E1 activity and GST (glutathione-S-transferase) status in the same collective of 126 persons may shed light on this fact.

In an occupational collective AA-metabolites in urine and blood as short and long time exposure biomarker were analyzed to estimate the possible exposition of the laboratory employees. There are no indications for an additional occupational AA-exposure for these employees.

1 EINLEITUNG

Zu einer Exposition gegenüber den beiden untersuchten Substanzen Acrylamid (AA) und Acrylnitril (AN) kann es sowohl im häuslichen Bereich bzw. im täglichen Leben, als auch während der Ausübung einer beruflichen Tätigkeit kommen. AA- und AN-Expositionen sind somit sowohl von umwelt- wie auch von arbeitsmedizinischem Interesse.

Im arbeitsmedizinischen Bereich können viele Expositionswege klar abgegrenzt werden. Dies geschieht aufgrund eines aktiven, bewussten Einsatzes der Substanzen selbst oder von Produkten dieser Substanzen. Im umweltmedizinischen Bereich sind die Quelle dieser Gefahrstoffe ubiquitärer. Zu nennen sind dort insbesondere Lebensmittel und Tabakwaren. Weitere potentielle Quellen wie Kosmetika, Lebensmittelbedarfsgegenstände und Textilien sind für die beiden genannten Gefahrstoffe zu vernachlässigen. Raucher und passivrauchexponierte Personen nehmen AA und AN über den Tabakrauch auf (Haupt- und Nebenstromrauch). Auch kommt es zu einer Exposition der Allgemeinbevölkerung gegenüber AA durch den Verzehr erhitzter kohlenhydratreicher Lebensmittel wie Pommes Frites, Chips, Gebäck, Müsli, Knäckebrot aber auch Kaffee.

AA und AN sind beide kanzerogen, wobei jeweils der oxidative Metabolit als krebserzeugende Noxe angesehen wird. Für die Risikobewertung sind interspezies und interindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel zu berücksichtigen, die zu unterschiedlichen Anteilen an oxidativen Metaboliten führen.

Um nun das Ausmaß der Oxidation beurteilen zu können, müssen die einzelnen Metaboliten durch das Humanbiomonitoring (HBM) analysiert werden. Durch

das HBM kann somit zum einen die tatsächlich aufgenommene Dosis jedes Individuums ermittelt werden, zum anderen aber auch der jeweilige Anteil der oxidativen Metaboliten am Gesamtmetabolitspektrum. Dies ist ein großer Vorteil des HBM gegenüber dem *Ambient Monitoring*, welches nur die mögliche äußere Exposition ermitteln kann und nicht die real aufgenommene Gefahrstoffdosis.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den oxidativen und reduktiven Mercaptursäuren von AA und AN im Urin, den oxidativen und reduktiven Hämoglobin-Addukten im Blut und dem oxidativen Hydrolyseprodukt 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) von AA im Urin des Menschen. Der Anteil der oxidativen bzw. reduktiven Metaboliten wurde bestimmt. Diese Daten können mit den entsprechenden Ergebnissen aus Tierversuchen verglichen werden und ermöglichen so einen Beitrag zur Abschätzung des menschlichen Krebsrisikos.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Möglichkeiten der Expositionsermittlung

Für die Ermittlung der Exposition können zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden. Während beim *Ambient Monitoring* (siehe 2.1.1) die äußere Belastung ermittelt wird (wahrscheinliche Expositionsmenge außerhalb des Individuums), steht beim *Biological Monitoring* bzw. *Human Biomonitoring (HBM)* (siehe 2.1.2) die Messung im Menschen und somit die tatsächlich aufgenommene Dosis im Vordergrund. Einen Überblick über die Begrifflichkeiten gibt Abb. 1.

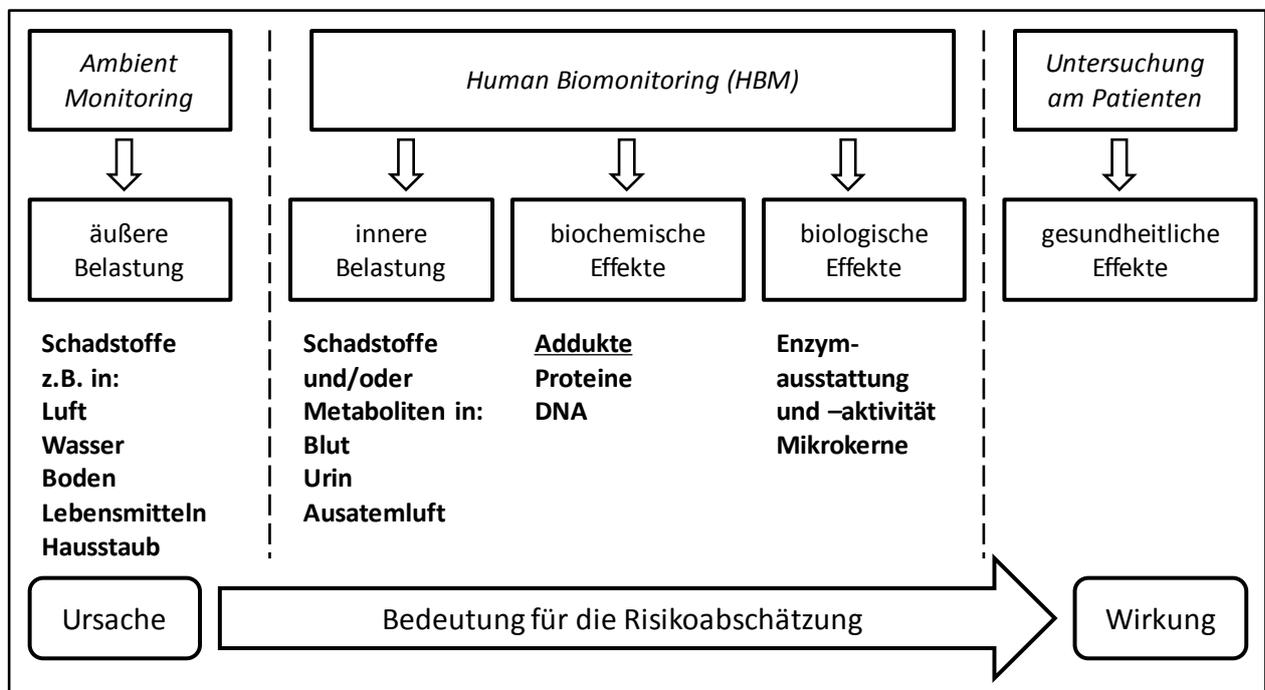


Abb. 1: Monitoring von Gefahrstoffen in der Arbeits- und Umweltmedizin (nach Angerer [1])

2.1.1 Ambient Monitoring

Beim *Ambient Monitoring* werden Gefahrstoffe in den Umgebungsmedien gemessen. Die äußere Belastung des Menschen durch Gefahrstoffe in Luft,

Wasser, Boden, Lebensmitteln oder Hausstaub wird direkt in der jeweiligen Matrix bestimmt. Für Trinkwasser und Lebensmittel gibt es für viele Gefahrstoffe rechtlich bindende Grenzwerte, welche in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) und in einzelnen lebensmittelrechtlichen Verordnungen unter dem Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) bzw. der EU-Basis-Verordnung (VO (EG) Nr. 178/2002) festgelegt sind [2-4].

Im arbeitsmedizinischen Bereich können Luftmessungen einen guten Anhaltspunkt für eine Exposition liefern, solange der inhalative Pfad der Hauptpfad der Exposition ist. Hierbei wird zwischen personenbezogenen und stationären Messungen unterschieden. Die personenbezogene Messung stellt je nach Anzahl der Beschäftigten einen höheren Aufwand dar, liefert jedoch auch genauere Daten zur Exposition. Diese Messwerte werden mit Luftgrenzwerten der Technische Richtlinie für Gefahrstoffe 900 (TRGS 900) als Ergänzung der Gefahrstoffverordnung vom Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) im Bundesministerium verglichen [5]. Diese gesundheitsbasierten Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW) stellen rechtlich verbindliche Grenzwerte dar und wurden aufgrund der maximalen Arbeitsplatzkonzentration (MAK) aufgestellt.

Die MAK-Werte werden von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) festgesetzt. Laut Definition handelt es sich um „die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft am Arbeitsplatz, die nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnis auch bei wiederholter und langfristiger, in der Regel 8-stündiger Exposition, jedoch bei Einhaltung einer durchschnittlichen Wochenarbeitszeit von 40 Stunden im

Allgemeinen die Gesundheit der Beschäftigten nicht beeinträchtigt und diese nicht unangemessen belästigt“ [6].

Aus dieser Definition wird ersichtlich, dass krebserregende Stoffe keinen MAK-Wert haben können, da auch bei sehr niedriger Exposition nicht gewährleistet werden kann, dass keine Gesundheitsschäden auftreten.

Um trotzdem eine Bewertung einer Exposition vornehmen zu können und das Minimierungskonzept gemäß GefStoffV durchzusetzen bzw. zu überprüfen, hat der AGS ein risikobasiertes Konzept zur Minimierung einer Exposition durch krebserzeugenden Stoffe entwickelt [7,8]. Die „Expositions-Risiko-Beziehung (ERB) eines krebserzeugenden Stoffes beschreibt die statistische Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Krebserkrankung bei der inhalativen Aufnahme dieses Stoffes in bestimmten Konzentrationen“ [8]. Es erfolgt eine Unterteilung in drei Risikobereiche: ein hohes Risiko (Messwert des *Ambient Monitorings* liegt oberhalb des Toleranzrisikos) zieht die aufwändigsten Maßnahmen nach sich, ein mittleres Risiko (Messwert zwischen Toleranz- und Akzeptanzrisiko) beinhaltet weniger aufwändige Maßnahmen und die am wenigsten aufwändigen Maßnahmen sind bei einem niedrigen Risiko zu treffen (Messwert unterhalb Akzeptanzrisiko). Dieses ERB-Konzept ist noch nicht Bestandteil der GefStoffV, wird aber voraussichtlich 2015 in diese integriert [8]. Auch eine Korrelation von inhalativer Exposition zum Biomonitoring soll wenn möglich erfolgen. Eine solche Korrelation erfolgte für einige krebserzeugende Stoffe bereits vor der Einführung einer ERB durch die Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA-Korrelation) [6].

Als Vorteil vom *Ambient Monitoring* ist zu nennen, dass Messdaten relativ schnell zur Verfügung stehen und einzelne Quellen direkt aufgezeigt werden können. Jedoch kann aufgrund dieser Werte keine Aussage über die innere

Belastung einzelner Individuen gewonnen werden, da nicht die tatsächlich aufgenommene Gefahrstoffmenge erfasst wird.

2.1.2 *Biomonitoring*

Ein klarer Vorteil des *Biological Monitoring* oder auch *Human Biomonitoring* (HBM) ist, dass Rückschlüsse auf die tatsächlich aus allen Quellen (berufliche Exposition, Lebensmittel, Kosmetika, Tabakwaren etc.) und über alle Wege (inhalativ, dermal, oral) aufgenommene Gefahrstoffmenge möglich sind. Definiert wird das Biomonitoring als „Untersuchung biologischen Materials [...] zur Bestimmung von Gefahrstoffen, deren Metaboliten oder deren biochemischen bzw. biologischen Effektparametern [...,um...] die Belastung und die Gesundheitsgefährdung [...] zu erfassen, die erhaltenen Analysenwerte mit [Referenz-] Werten zu vergleichen und geeignete Maßnahmen vorzuschlagen, um die Belastung und die Gesundheitsgefährdung zu reduzieren“ [9].

Unterschieden wird beim Biomonitoring in Dosismonitoring, biochemischem und biologischem Effektmonitoring. Die Bedeutung für die Risikoabschätzung in dieser Reihe nimmt von Dosismonitoring zum biologischen Effektmonitoring zu. Beim Dosismonitoring werden die Substanzen selbst oder deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten untersucht [10].

Viele Gefahrstoffe werden erst durch Einfügen einer polaren Gruppe wie –OH oder –SH (Phase 1) aktiviert, bevor sie in Phase 2 für eine Ausscheidung zu wasserlöslichen Konjugaten umgesetzt werden (siehe auch 2.2.7 und 2.3.6). Somit resultieren zeitlich verzögerte Ausscheidungskinetiken für die einzelnen Urinmetaboliten (Kurzzeitexpositionsmarker) (siehe Abb. 2).

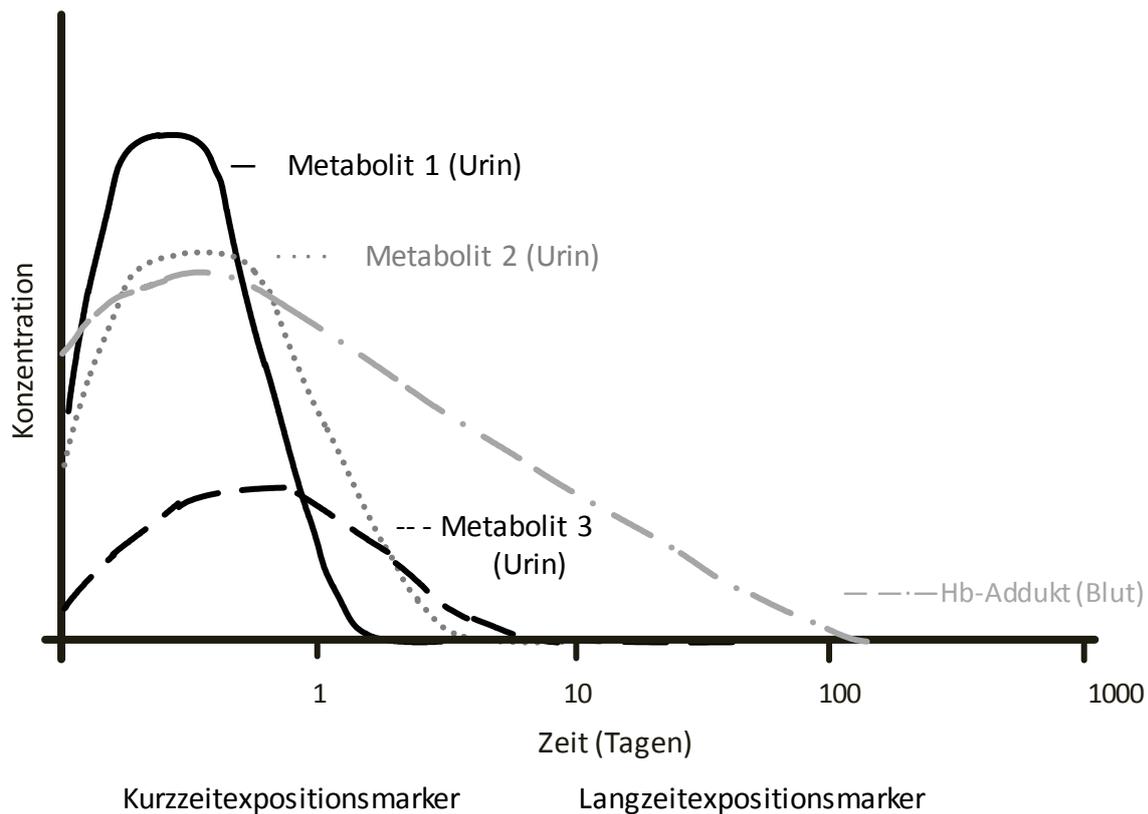


Abb. 2: Exemplarischer Vergleich der Ausscheidungskinetik für verschiedene Metaboliten eines Gefahrstoffes (nach Needham und Sexton [12])

Analog zu den Arbeitsplatzgrenzwerten (AGW), welche direkt rechtlich verbindliche Luftgrenzwerte sind, liegen für viele Gefahrstoffe bereits Biologische Grenzwerte (BGW) als rechtliche Grenzwerte im biologischen Material vor [11].

Ebenso stehen die MAK-Werte der DFG als Werte für die äußere Belastung im Verhältnis zu den BAT-Werten (Biologische Arbeitsstoff Toleranzwerte) für die innere Belastung zur Verfügung. Der BAT-Wert ist „die arbeitsmedizinisch-toxikologisch abgeleitete Konzentration eines Arbeitsstoffes, seiner Metaboliten oder eines Beanspruchungsindikators im entsprechenden biologischen Material, bei dem im Allgemeinen die Gesundheit eines

Beschäftigten auch bei wiederholter und langfristiger Exposition nicht beeinträchtigt wird“ [6]. Auch bei dieser Definition wird ersichtlich, dass analog zum MAK-Wert auch kein BAT-Wert für kanzerogene oder mutagene Stoffe festgelegt werden kann. Die Definition einer toxikologisch unbedenklichen Schwellenkonzentration ist hier ebenfalls nicht möglich. Für Substanzen, für die keine BAT-Werte vorliegen, können, soweit vorhanden, BAR-Wert (Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert) und/oder BLW (Biologischer Leitwert) für eine Beurteilung herangezogen werden. Der BAR beschreibt „die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Referenzpopulation aus nicht beruflich gegenüber dem Arbeitsstoff exponierten Personen im erwerbsfähigen Alter bestehende Hintergrundbelastung mit in der Umwelt vorkommenden Arbeitsstoffen“ [6]. Der BAR für einen Arbeitsstoff oder dessen Metaboliten im biologischen Material wird mit Hilfe der Messwerte einer Stichprobe aus einer definierten Bevölkerungsgruppe abgeleitet (95. Perzentil).

Der BLW ist „die Quantität eines Arbeitsstoffes bzw. Arbeitsstoffmetaboliten oder die dadurch ausgelöste Abweichung eines biologischen Indikators von seiner Norm beim Menschen, die als Anhalt für die zu treffenden Schutzmaßnahmen heranzuziehen ist“ [6]. Bei Einhaltung des BLW ist eine Beeinträchtigung der Gesundheit jedoch nicht auszuschließen.

Sowohl zur Beurteilung einer potentiellen beruflichen Exposition als auch zur Abschätzung einer individuellen Exposition einzelner Personen aus der Allgemeinbevölkerung kann auch ein Vergleich mit Daten aus der Allgemeinbevölkerung erfolgen. Für einige Substanzen bzw. Metaboliten wurden hierzu bereits von der Human Biomonitoring-Kommission (HBM Kommission) des Umweltbundesamtes HBM-Werte und/oder Referenzwerte definiert. Die HBM-Werte werden aufgrund einer toxikologischen Bewertung

festgelegt und dienen als Orientierungswerte für eine etwaige Intervention [13]. Gemäß § 69 (1) Nr. 7 und 8 GefStoffV bzw. § 6 (2) der ArbMedVV ist HBM Teil der arbeitsmedizinischen Vorsorge und die genannten Referenzwerte bzw. HBM-Werte dienen als Anhaltspunkt, ob Schutzmaßnahmen ergriffen werden müssen oder getroffene Schutzmaßnahmen ihre Wirksamkeit gezeigt haben [14,15]. Der Referenzwert hingegen ist ein statistischer Wert, der den IST-Zustand einer Belastung in einer Bevölkerungsgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegelt (analog BAR) [13]. Dieser kann verwendet werden, um eine individuelle Exposition einer einzelnen Person quantitativ zu beurteilen (ohne jedoch dabei Rückschlüsse auf ein mögliches Risiko ziehen zu können).

Die Bedeutung vom HBM hat in den letzten Jahren stark zugenommen, da durch stetige Weiterentwicklung der Analytik nahezu jeder Stoff und dessen Metaboliten in den Hauptmatrices Urin und Blut erfasst werden kann [16].

Deshalb werden von der europäischen Kommission zur europaweiten Harmonisierung von HBM-Methoden und zum Vergleich von Belastungen in verschiedenen EU-Staaten die Projekte „Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale“ (COPHES) und „Demonstration of a study to Coordinate and Perform Human Biomonitoring on a European Scale“ (DEMOCOPHES) gefördert, bei denen das IPA federführend beteiligt ist [17].

Beim biochemischen Effektmonitoring werden Reaktionen auf molekularer Ebene erfasst. Genotoxische Substanzen reagieren mit nukleophilen Zentren der DNA. Auch mit Proteinen finden nukleophile Additionen statt, wobei für viele Substanzen gute Korrelationen zwischen Hämoglobinaddukten (Hb-Addukte) und DNA-Addukten nachgewiesen wurden [18-22]. Da die Menge der gebildeten Hb-Addukte um einiges größer ist als die der DNA-Addukte und

Hämoglobin leicht nach einer Blutabnahme aus Vollblut isoliert werden kann, steht beim biochemischen Effektmonitoring die Bestimmung von Proteinaddukten im Vordergrund [1,23]. Des Weiteren wird Hämoglobin im Gegensatz zur DNA nicht repariert. Die Lebensdauer von Hämoglobin ist einzig definiert über die Lebensdauer von Erythrozyten, die im Mittel 120 Tage beträgt. Somit kann über die Bestimmung von Hb-Addukten eine mittlere Exposition der letzten 120 Tage nachgewiesen werden (Langzeitexpositionsmarker) (siehe Abb. 2).

Durch eine geschickte Wahl unterschiedlicher Kurzzeitmarker mit verschiedenen Halbwertszeiten und den Hb-Addukten als Langzeitmarkern können somit Abschätzungen über die Exposition der letzten Tage und der mittleren Exposition der letzten 4 Monate (120 Tage) erfolgen (Abb. 2).

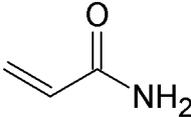
Unter anderem dienen die verschiedenen Marker als ideale Ergänzung für eine arbeitsmedizinische Beurteilung, da durch die Kombination aus Vor- und Nachschichtprobenahme von Urin sowie einer Blutentnahme sowohl Aussagen über eine Expositionen an bestimmten Arbeitstagen als auch eine Aussage über die mittlere Exposition der letzten 4 Monate getroffen werden kann.

Beim biologischen Effektmonitoring hingegen werden Reaktionen des Körpers auf die Exposition gemessen. Hierbei werden Enzymaktivitäten und genetische Parameter wie Mikrokern- und Chromosomenaberration, DNA-Strangbrüche oder auch Schwester-Chromatidaustausch untersucht. Diese Parameter sind jedoch unspezifischer als beim Dosismonitoring oder biochemischen Effektmonitoring, da nicht auf eine bestimmte Substanz zurückgefolgert werden kann. Zuverlässige Aussagen können nur mit Hilfe größerer Studien, kombiniert mit einem umfassenden Dosismonitoring, getroffen werden.

2.2 Acrylamid (AA)

2.2.1 Übersicht Acrylamid

Tabelle 1: Übersicht Acrylamid (AA) [24]

Name	Acrylamid
Synonyme	Acrylsäureamid, 2-Propenamid
IUPAC Name	Prop-2-enamid
Summenformel	C ₃ H ₅ NO
Strukturformel	
Molekulargewicht [g/mol]	71,0779
CAS-Nr.	79-06-1
EG-Nr.	201-173-7
Eigenschaft	Farbloser, kristalliner Feststoff bei RT
Schmelzpunkt [°C]	84 – 86
Siedepunkt [°C]	241
Dichte (20°C) [g/cm ³]	1,03
Wasserlöslichkeit (25°C) [g/L]	2040
Einstufung MAK Kommission [6,25]	Hautresorbierend (H) Hautsensibilisierend (Sh) Krebserzeugend Kat. 2 Keimzellenmutagen Kat. 2 BLW 550 pmol AAV/g Globin (NR) BAR 50 pmol AAV/g Globin (NR) BAR 100 µg AAMA/g Kreatinin (NR)

Abkürzungen: AAMA: N-Acetyl-S-(2-Carbamoylethyl)-cystein (Acrylamid-Merkaptursäure)

AAV = N-(2-Carbamoyl-ethyl)-valin (Acrylamid-Hämoglobin-Addukt)

NR = Nichtraucher

BLW = Biologischer Leitwert

BAR = Biologischer Arbeitsstoffreferenzwert

2.2.2 Produktion und Einsatz

Acrylamid (AA) wird durch katalytische Hydrierung von Acrylnitril hergestellt [26]. Der größte Teil der AA-Produktion in der Europäischen Union (EU) wird zur Herstellung von Polyacrylamiden und Acrylamidcopolymeren eingesetzt (99,9%) [27]. Polyacrylamide werden mit einem Anteil von ca. 80 % in der EU hauptsächlich zur Abwasser- und Trinkwasseraufbereitung, in der Papier- und Zellstoffindustrie, aber auch in der Mineralölindustrie verwendet. Des Weiteren werden sie als Kosmetikinhaltsstoff, in der Textilindustrie, in Farben oder zur Herstellung von Brandschutzglas benötigt, im Labormaßstab aber auch zur Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Hierbei findet auch monomeres Acrylamid, welches im Labor selbst polymerisiert wird, seinen Einsatz [26]. Die Jahresproduktion von Acrylamid wurde von der EU 2011 auf 150.000 – 200.000 t/Jahr geschätzt [28].

2.2.3 Toxikologie

Bereits 1994 wurde AA durch die International Agency for Research on Cancer (IARC) als Kanzerogen der Gruppe 2A („probably carcinogenic to humans“) eingestuft [29]. 2002 folgten die Einstufungen der MAK-Kommission der DFG als K2 Stoff („als krebserzeugend für den Menschen anzusehen“), als Keimzellenmutagen der Kategorie 2 („erhöhte Mutationsrate unter den Nachkommen exponierter Säugetiere wurde nachgewiesen“) und hautresorbierend (H) sowie hautsensibilisierend (Sh) [25]. Für Nichtraucher liegt der BAR bei 50 pmol Hb-Addukt/g Globin und der BLW bei 550 pmol Hb-Addukt/g Globin (BAR und BLW siehe 2.1.2; Hb-Addukt siehe 7.2) [6].

Ebenfalls 2002 veröffentlichte die EU einen finalen Bericht über Acrylamid und stufte AA analog als Cat. 2 Kanzerogen („May cause cancer“), Cat. 2 Mutagen („May cause heritable genetic damage“) und Cat. 3 der Reproduktionstoxizität („possible risk of impaired fertility“) ein [26].

In mehreren Tierversuchsstudien an Nagern wurde eine erbgutschädigende und auch krebserregende Wirkung festgestellt [30-33]. Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen einer AA-Exposition am Arbeitsplatz und verschiedenen Krebsarten zeigte keinen signifikanten Zusammenhang [34-37]. Auch ein ernährungsbedingter Zusammenhang für verschiedene Krebsarten wurde in vielen Kohortenstudien untersucht. Ein möglicher Zusammenhang wurde für postmenopausalen Gebärmutterschleimhautkrebs und Eierstockkrebs sowie für Nierenkrebs beschrieben. Jedoch konnte kein Zusammenhang für Brustkrebs, Blasenkrebs, Prostatakrebs, Krebsarten des Gastrointestinaltraktes (Dickdarm, Magen, Bauchspeicheldrüse und Speiseröhre) oder Hirntumore gefunden werden [38-45].

Es wird jedoch auch betont, dass die Erhebung der AA-Aufnahme über Fragebögen aufgrund des Erinnerungsvermögens der Personen und der Schwankungen in den AA-Gehalten der einzelnen Lebensmittel (siehe auch 2.2.5) mit Fehlern behaftet ist.

In einer Kohorte von 24.697 weiblichen Personen mit 420 Brustkrebsfällen und 110 Todesfällen beschrieben Olsen *et al.* einen Zusammenhang zwischen dem Glycidamid-Hämoglobin-Addukt (oxidatives Hämoglobin-Addukt im Acrylamid-Stoffwechsel) und dem Auftreten von Brustkrebs [46].

AA wirkt auch neurotoxisch. Von der WHO wurde ein „No-Observed-Adverse-Effect-Level“ (NOAEL) für Neurotoxizität von 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG)/Tag festgelegt [47]. Arbeiter, die hohen AA-Expositionen ausgesetzt waren,

beschrieben als Symptome insbesondere Taubheitsgefühle in den Extremitäten als reversible Wirkung [48,49]. Der Mechanismus der Neurotoxizität ist bis heute nicht zweifelsfrei identifiziert. Möglich ist die direkte Unterbrechung von neurotransmissions-vermittelnden Membranfusionsprozessen oder eine Inhibition des Kinesin-basierten Axonaltransports [50,51].

2.2.4 Grenzwerte zur Expositionsbeurteilung

Da AA als krebserzeugender Stoff eingeteilt ist, sind zur Beurteilung einer möglichen arbeitsplatzbedingten Exposition weder MAK-Wert noch BAT-Wert festgelegt worden (siehe auch 2.1.1 und 2.1.2).

Der BAR liegt bei 50 pmol *N*-(2-Carbamoyl-ethyl)-valin (AAV)/g Globin (für Nichtraucher) (siehe Tabelle 2 und 2.2.7) im Blut bzw. bei 100 µg *N*-Acetyl-S-(2-Carbamoylethyl)-cystein (AAMA)/g Kreatinin im Urin. Des Weiteren gilt ein BLW von 550 pmol AAV/g Globin, unterhalb dessen keine neurotoxischen Wirkungen zu erwarten sind (siehe auch 2.2.3) [6,52].

Der BAR gilt nur für Nichtraucher, bei denen Lebensmittel somit die Hauptquelle darstellen, für Raucher sind keine Werte festgelegt (siehe auch 2.2.5 bis 2.2.7).

Für AA als krebserzeugende Substanz wurde bereits eine ERB aufgestellt. Als Akzeptanzkonzentration ist ein Wert von 0,07 mg/m³ (ab spätestens 2018: 0,007 mg/m³) festgelegt. Eine Toleranzkonzentration ist nicht definiert (gemäß ERB-Konzept wäre 0,7 mg/m³ zu erwarten gewesen), da ein gesundheitlich begründeter Schwellenwert für die Neurotoxizität unterhalb dieses eigentlichen Toleranzwertes vorliegt. Somit sollen bei Werten oberhalb des

Neurotoxizitätsgrenzwertes von 0,15 mg/m³ Minimierungsmaßnahmen getroffen werden [7,53].

2.2.5 Acrylamid in Lebensmitteln

Im Jahr 2002 publizierten schwedische Wissenschaftler die Bildung von Acrylamid (AA) bei der Erhitzung von kohlenhydratreichen Lebensmitteln [54]. Bei der Erhitzung wasserarmer und kohlenhydratreicher Lebensmittel kommt es im Verlaufe der Maillard Reaktion durch die Reaktion von Asparagin mit reduzierenden Zuckern zur AA-Bildung (siehe Abbildung 3).

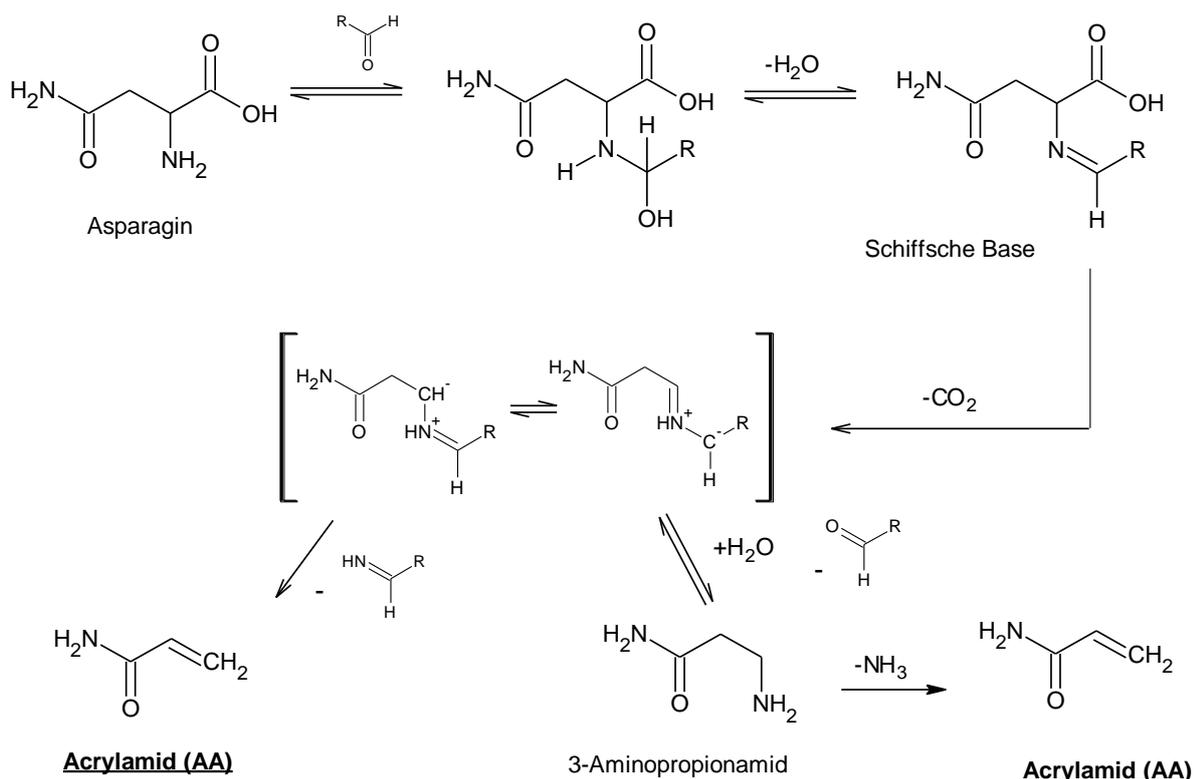


Abb. 3: Bildung von Acrylamid bei der Maillard Reaktion (nach Zyzak 2003 [55])

Im ersten Schritt kommt es zur Bildung einer Schiffschenschen Base durch Reaktion der alpha-Amino-Funktion des Asparagins mit der Carbonylfunktion eines reduzierenden Zuckers. Durch anschließende Decarboxylierung unter Temperatureinwirkung kommt es einerseits zur Imin-Elimination und somit zur AA-Bildung und andererseits zur Hydrolyse der decarboxylierten Schiffschenschen Base unter Freisetzung von 3-Aminopropionamid. Dieses wird wiederum beim Erhitzen in AA und Ammoniak gespalten [55].

Weitere beschriebene Bildungswege in Lebensmitteln für AA sind eine Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylen, einem Mechanismus ganz ohne Carbonylverbindung (enzymatische Decarboxylierung) oder auch die Reaktion anderer Aminosäuren wie Methionin und Glutamin mit reduzierenden Zuckern [56-58].

Besonders begünstigend für die AA-Bildung in der Maillard Reaktion wirken sich hohe Temperaturen und eine lange Erhitzungszeit aus. Die AA-Bildung steigt ab 120°C langsam und ab 170°C sprunghaft an [54,57,58]. Deshalb wird u.a. vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) empfohlen, die Zubereitungstemperatur < 170°C zu belassen („vergolden statt verkohlen“) [59].

Es wurde auch die Bildung von Glycidamid bei der Lebensmittelzubereitung nachgewiesen, jedoch um den Faktor 100 in der Konzentration geringer als es durch AA-Aufnahme und Oxidation im Menschen gebildet wird (siehe 2.2.7) [60]. Eine Bewertung dieser direkten GA-Bildung steht noch aus [61].

Aufgrund einer ubiquitären Anwesenheit von freien Aminosäuren wie Asparagin aber auch von freien Zuckermolekülen sind viele Lebensmittel mit AA belastet. Da sich ein niedriger Wassergehalt und ein hoher Kohlenhydratanteil

begünstigend auf die Maillard Reaktion auswirken, sind insbesondere Kartoffel- und Getreideprodukte von hohen AA-Gehalten betroffen.

Tabelle 2 zeigt AA-Konzentrationen verschiedener Lebensmittelgruppen in der Bundesrepublik Deutschland und den aktuellen Signalwerten des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) vom 18.11.2010. Zusätzlich sind die aktuellen Richtwerte der Europäischen Kommission von Januar 2011 basierend auf den europäischen Analysenwerten aus den Jahren 2007-2009 angegeben [62-64].

Die Signalwerte sind definiert als das 90. Perzentil der Analysenergebnisse in einer Warengruppe, d.h. 90 % aller untersuchten Proben liegen unterhalb des aktuellen Signalwertes. Er ist somit nicht risikobasiert, sondern dient allein als Orientierung, welche AA-Gehalte für eine Warengruppe nach dem gegenwärtigen Stand der Technik unvermeidbar sind.

Tabelle 2: Acrylamid-Konzentrationen sowie deutsche Signalwerte (2010) und europäische Richtwerte (2011) jeweils in µg/kg Lebensmittel [62,63]

Warengruppe	Probenanzahl	Median (Bereich) [µg/kg]	Signalwert 8. Berechnung BVL [µg/kg]	EU-Richtwert
Knäckebrot	144	250 (5-950)	480	500
Frühstückscerealien	69	68 (10-780)	260	400
Feine Backwaren aus Mürbeteig	292	90 (5-678)	260	500
Dauerbackwaren für Diabetiker	106	136 (10-1832)	450	500

Fortführung Tabelle 2: Acrylamid-Konzentrationen sowie deutsche Signalwerte (2010) und europäische Richtwerte (2011) jeweils in µg/kg Lebensmittel [62,63]

Warengruppe	Probenanzahl	Median (Bereich) [µg/kg]	Signalwert 8. Berechnung BVL [µg/kg]	EU-Richtwert
Zwieback oder Kekse für Säuglinge und Kleinkinder	84	35 (5-196)	160	250
Lebkuchen und lebkuchenhaltige Gebäcke	567	278 (5-4200)	1000	-
Spekulatius	176	134 (15-1042)	300	500
Kartoffelchips	363	275 (8-3453)	790	1000
Pommes frites, zubereitet	590	194 (5-2030)	530	600
Kartoffelpuffer	34	502 (111-3025)	870	-
Kaffee, geröstet	243	187 (19-861)	280	450
Kaffee, löslich	63	728 (200-1373)	900	900
Kaffeersatz	58	639 (77-1798)	1000	-
Weiches Brot	-	-	-	150
Babynahrung (nicht getreidebasierend)	-	-	-	80
Babynahrung (getreidebasierend)	-	-	-	100

- nicht festgelegt bzw. nicht analysiert

Wird bei einem Produkt der entsprechende Signalwert bzw. Richtwert überschritten, nimmt die Überwachungsbehörde Kontakt zum Hersteller auf, um über eine Minimierungsmöglichkeit zu beraten. Diese Signalwerte sind somit keine rechtlich verbindlichen Werte, sondern sind Teil einer dynamischen Minimierungsstrategie, um die AA-Belastung der Lebensmittel so gering wie möglich zu halten [65]. Tabelle 2 zeigt, dass zum Teil enorme Schwankungen in den AA-Gehalten in den einzelnen Lebensmittelgruppen vorliegen (z.B. 8 bis 3453 µg/kg in den Kartoffelchips).

Die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge von AA für die Allgemeinbevölkerung über die Ernährung liegt laut WHO bei 1 µg/kg KG [47,66]. Jedoch unterliegt diese Aufnahmemenge aufgrund des unterschiedlichen Konsumverhaltens und der bereits angesprochenen großen Spanne der AA-Konzentrationen in den Produkten starken Schwankungen. Für Konsumenten, die oft und größere Mengen der in Tabelle 2 genannten Lebensmittel konsumieren und ggf. ein geringeres Körpergewicht aufweisen (insbesondere Kinder und Jugendliche), werden Aufnahmemengen von bis zu 4 µg/kg KG/Tag angegeben [47,66].

Die „European Food Safety Authority“ (EFSA) gab 2011 aufgrund der Monitoring-Werte von Acrylamid in Lebensmitteln in der EU von 2007 – 2009 abgeschätzte Expositionsdaten für Personen in der EU heraus. Erwachsene Personen (≥ 18 Jahre) haben hierbei eine mittlere geschätzte Aufnahme von 0,3 – 1 µg/kg KG/Tag, Jugendliche (11-17 Jahre) 0,4 – 1,4 µg/kg KG/Tag und Kinder (3-10 Jahre) 0,7 – 2,1 µg/kg KG/Tag. Die Werte des 95. Perzentils für Erwachsene liegen bei bis zu 2,3 µg/kg KG/Tag, für Jugendliche bis zu 3,1 µg/kg KG/Tag und für Kinder bis zu 4,2 µg/kg KG/Tag [64]. Aus diesen aktuellen

Zahlen wird ersichtlich, dass Kinder und Jugendliche tendenziell einer höheren AA-Exposition ausgesetzt sind.

2.2.6 Tabakrauch

AA wird im Pyrolyseprozess von Tabak gebildet und ist somit auch in Zigarettenrauch enthalten [67]. Es kommt zu einer weiteren Exposition der Raucher von 1,1 – 2,3 µg/Zigarette [68]. Bei einer 70 kg schweren Person und einem Konsum von 20 Zigaretten täglich ergibt dies rechnerisch eine zusätzliche Exposition von 0,3 – 0,7 µg/kg KG. Bisherige Daten zeigen eine gute Korrelation zwischen Anzahl der gerauchten Zigaretten und den AA-Hb-Addukt AAV (siehe 2.2.7) [69,70]. Raucher weisen im Schnitt einen 2 bis 4 fach höheren AA-Hb-Addukt-Level auf als Nichtraucher (siehe auch 2.2.7 und Tabelle 3).

Es muss auch beachtet werden, dass eine Exposition von Nichtrauchern über Passivrauch erfolgen kann. Somit spielen bei einer Expositionsabschätzung auch immer das häusliche Umfeld (Zusammenwohnen mit Rauchern, die in der Wohnung rauchen), das Freizeitverhalten (ggf. mehrfach die Woche stundenlange Passivrauchexposition in Kneipen, Cafes, Bars, Diskotheken) sowie der Arbeitsplatz, wenn dort Tabakkonsum gestattet ist, eine Rolle.

2.2.7 Metabolismus und Toxikokinetik

Nach der Aufnahme (oral, inhalativ oder dermal) wird AA schnell im Körper resorbiert und verteilt [71]. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer oralen Aufnahme werden 70 % der aufgenommenen Dosis bei Ratten im Urin

ausgeschieden. 7 Tage nach oraler Applikation wurden 90 % der Dosis im Urin und weitere 6 % im Faeces nachgewiesen [32].

AA wird in Phase 1 (Giftung) durch das Enzym Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) oxidiert [72,73]. Durch diese Oxidation kommt es zur Bildung von Glycidamid (GA) (siehe Abb. 4) [72].

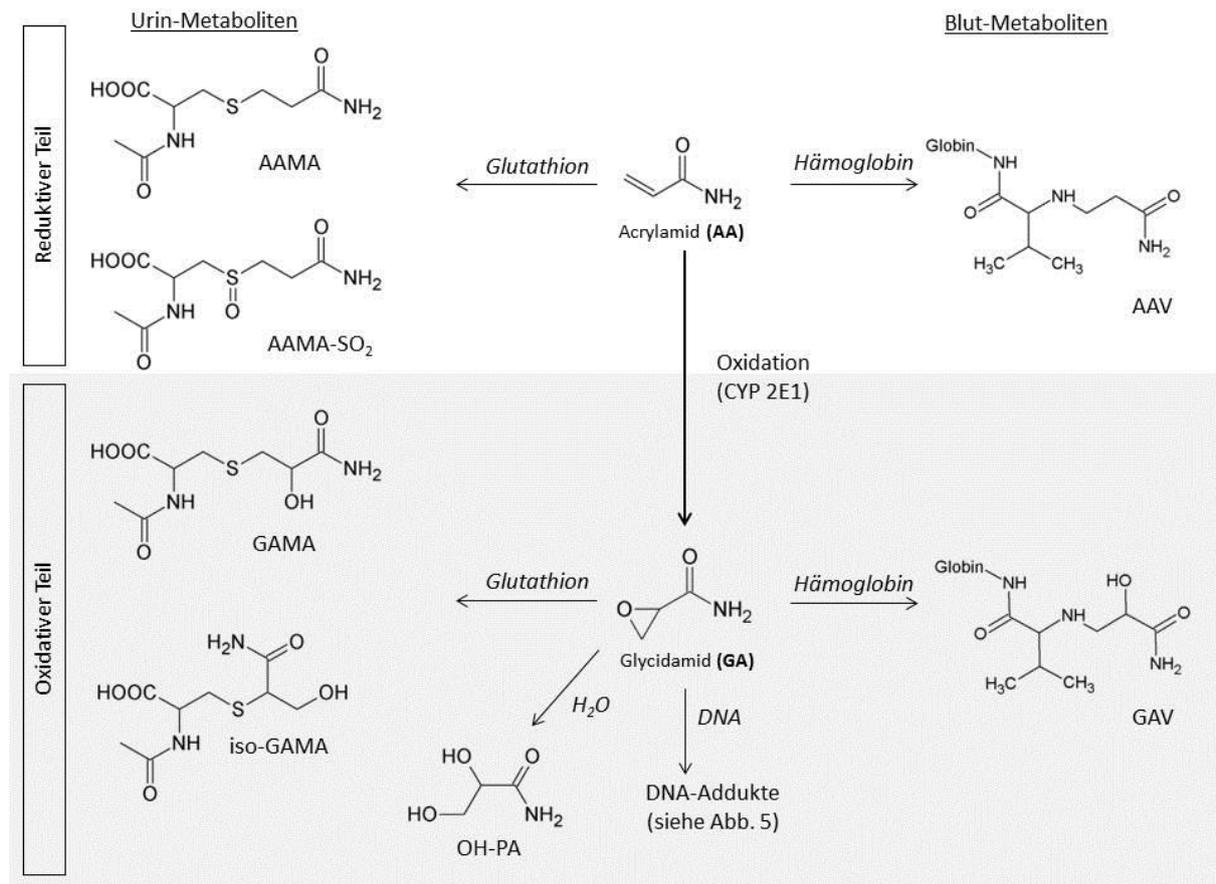


Abb. 4: Metabolismus von Acrylamid (AA) nach Fennell et al. [74,75]

(Abkürzungen: AA = Acrylamid; GA = Glycidamid; OH-PA: 2,3-Dihydroxypropionamid; AAMA: N-Acetyl-S-(2-Carbamoyl-ethyl)-cystein, AAMA-SO₂ = N-Acetyl-S-(2-Carbamoyl-ethyl)-cystein-sulfoxid; GAMA = N-Acetyl-S-(2-Hydroxy-2-Carbamoyl-ethyl)-cystein; iso-GAMA = N-Acetyl-S-(1-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein; AAV = N-(2-Carbamoyl-ethyl)-valin; GAV = N-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin)

Sowohl AA als auch GA können in Phase 2 (Konjugation/ Entgiftung) mit der Thiolgruppe des Glutathions zu Mercaptursäuren reagieren [71,76]. Im Falle des GA resultieren hierbei zwei isomere Mercaptursäuren GAMA (*N*-Acetyl-S-(2-Hydroxy-2-Carbamoyl-ethyl)-cystein) und iso-GAMA (*N*-Acetyl-S-(1-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein). AA bildet nach Konjugation an Glutathion in Nagern eine reduktive Mercaptursäure AAMA (*N*-Acetyl-S-(2-Carbamoyl-ethyl)-cystein) [77]. Im Menschen hingegen wurde auch die Oxidation von AAMA zu AAMA-SO₂ (*N*-Acetyl-S-(2-Carbamoyl-ethyl)-cystein-sulfoxid) beschrieben [74].

AA und GA können auch an Makromoleküle wie Hämoglobin binden. Aufgrund des pH-Wertes des Bluts und den pK_s-Werten der einzelnen Aminosäuren werden bevorzugt Addukte mit der *N*-terminalen Aminosäure Valin gebildet, es sind aber auch Reaktionen mit dem ringgebundenen Stickstoff-Atom des Histidins sowie mit der Thiol-Gruppe des Cysteins möglich [78]. Aufgrund der Zugänglichkeit der endständigen Aminosäure für den Edman-Abbau werden in der Praxis die Valin-Addukte von AA und GA bestimmt [79]. Die entsprechenden Addukte AAV (Acrylamid-Valin bzw. *N*-(2-Carbamoyl-ethyl)-valin) und GAV (Glycidamid-Valin bzw. *N*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin) wurden bereits in vielen Tierstudien und in Humankollektiven analysiert (siehe Tabelle 3).

Zudem kann GA auch durch Epoxidhydrolasen zu 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) hydrolysiert werden. Dieses wird – wie auch die Mercaptursäuren – im Urin ausgeschieden [75,80].

GA wird als ultimatives genotoxisches Agens angesehen, da es als Epoxid sehr reaktiv ist und kovalent an DNA bindet [32,81,82]. Diese GA-DNA Addukte wurden sowohl in Ratten als auch in Mäusen nachgewiesen [83-87]. Das

Hauptaddukt ist dabei *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (*N*-7-GA-Gua; siehe Abb. 5) [83]. Nachgewiesen in Nagern wurden auch *N*-3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin-addukte (*N*-3-GA-Ade) und *N*-1-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin (*N*-1-GA-dA); letzteres allerdings nur *in vitro* [85,88]. Die Konzentration von *N*-7-GA-Gua liegt dabei etwa um den Faktor 100 höher als von *N*-3-GA-Ade [84,87].

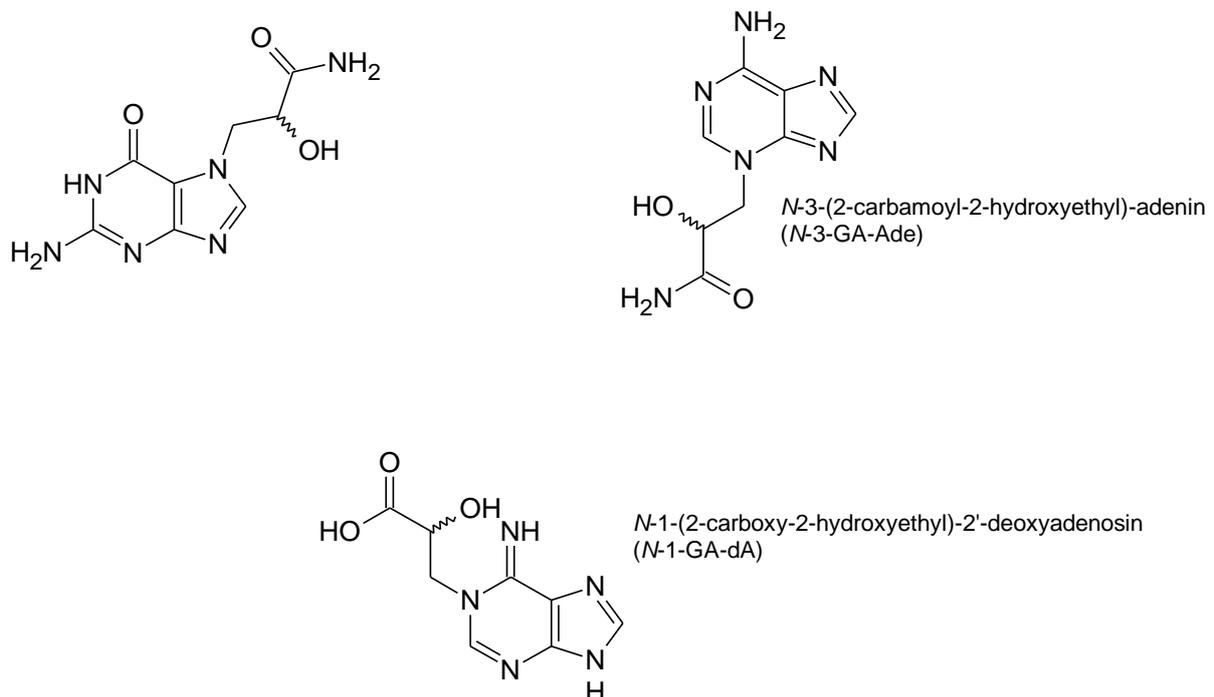


Abb. 5: Strukturen der Glycidamid-DNA-Addukte nach Doerge et al.[85]

In B6C3F₁-Mäusen wurde nach chronischer Gabe von AA über das Trinkwasser vier- bis fünfmal mehr *N*-7-GA-Gua nachgewiesen als in Fischer 344-Ratten [85]. Dies spiegelt auch wider, dass AA in Mäusen stärker kanzerogen wirkt als in Ratten [32,89-91]. Der Anteil der oxidativen Metaboliten kann somit einen Hinweis über die kanzerogene Wirkung von AA auf eine bestimmte Spezies geben. Aufgrund einer guten Korrelation zwischen der gebildeten GA-DNA-

Addukt- und GA-Hb-Addukt-(GAV)-Menge über einen weiten Bereich hinweg (Abbildung 6) kann die Menge an gebildetem GAV als Ersatz für GA-DNA-Addukte zur Risikoabschätzung herangezogen werden [85,92,93].

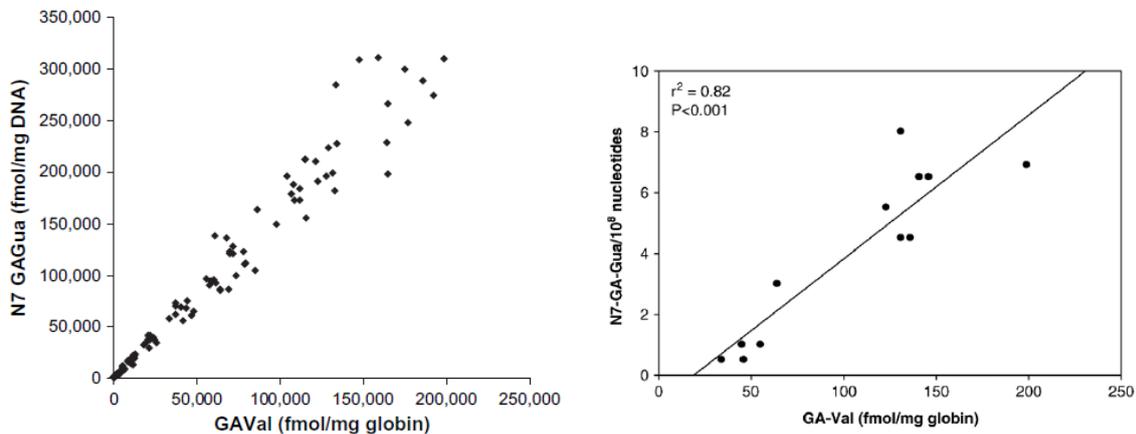


Abb. 6: Korrelation der gebildeten GA-Hb-Addukte im Blut und DNA-Addukt (N-7-GA-Gua) in der Leber nach 28 Tagen AA-Gabe in Mäusen bzw. Mäusen und Ratten, entnommen aus Zeiger et al. [92] bzw. Tareke et al. [93]

In den folgenden Tabellen sind die Daten, die bereits im Rahmen dieses DFG-Projektes gewonnen wurden, **gesondert hervorgehoben** (Schettgen, Boettcher und Hartmann).

Das Ausmaß der Oxidation von AA zu GA nimmt in folgender Reihe ab: Maus > Ratte > Mensch (Hb-Addukt Verhältnisse oxidativ zu reduktiv: 5,43 zu 1,75 zu 0,96) (siehe Tabelle 3) [94].

Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Sättigung dieser Oxidation in Nagern bei hohen Dosen [95]. Auch in Humandaten gibt es Hinweise, dass sich das Verhältnis von oxidativen zu reduktiven Metaboliten je nach Exposition verschiebt bzw. dass Raucher (somit Personen mit einer höheren Exposition)

relativ gesehen einen geringeren oxidativen Metabolismuspfad aufweisen (siehe Tabelle 3).

Schettgen *et al.* wiesen ein GAV/AAV-Verhältnis im Median von 0,96 für Nichtraucher und von 0,73 für Raucher nach [96]. Weitere Studien weisen auf einen höheren oxidativen Metabolismusanteil von Frauen im Gegensatz zu Männern hin [97,98]. Vesper *et al.* bestätigten diesen Zusammenhang bei der Untersuchung der 7166 NHANES-Proben (National Health and Nutrition Examination Survey) jedoch nicht [99] (weitere Einzelheiten über die NHANES Studie 2003-2004 findet man auf den Seiten des CDC = Centers of Disease Control and Prevention [100]).

Allgemein ist zu sagen, dass Raucher im Median (je nach Kollektiv) zwei- bis viermal höhere AAV- und GAV-Werte aufweisen als Nichtraucher (19 zu 80 pmol/g Globin). Diese Daten bestätigen die erhöhte AA-Exposition der Raucher durch den Tabakkonsum (siehe 2.2.6).

Tabelle 3: Vergleich der reduktiven und oxidativen Hb-Addukte

Studie	AAV	GAV	Verhältnis GAV/AAV
	Medianwerte [pmol/g Globin]		
Bergmark 1993 Mensch [101]	17100 (EA)	13600 (EA)	0,80
Perez 1999 Mensch [102]	534 (EA)	48 (EA)	0,09 (EA)
	81 (R)	7 (NR)	0,09 (NR)
	41 (NR)	3 (R)	0,07 (R)
Fennell 2003 Ratten [103]	20847 (50 mg/kg oral)	7876 (50 mg/kg oral)	0,38 (50 mg/kg oral)
	156 (Kontrolle)	117 (Kontrolle)	0,75 (Kontrolle)

EA: Exponierte Arbeiter; NR: Nichtraucher; R: Raucher

Fortsetzung Tabelle 3: Vergleich der reduktiven und oxidativen Hb-Addukte

Studie	AAV	GAV	Verhältnis GAV/AAV
	Medianwerte [pmol/g Globin]		
Paulsson 2003 Ratten [94]	8	14	1,75
Paulsson 2003 Maus [94]	7	38	5,43
Paulsson 2003 Mensch [94]	27 (NR)	26 (NR)	0,96 (NR)
Schettgen 2004	19 (NR)	17 (NR)	0,96 (NR)
Mensch [96]	80 (R)	53 (R)	0,73 (R)
Vesper 2006 Mensch [97]	84 (w) 133 (m)	128 (w) 92 (m)	1,16 (w) 0,83 (m)
Bjellaas 2007 Mensch [104]	37 (NR) 166 (R)	18 (NR) 83 (R)	0,49 (NR) 0,46 (R)
Vesper 2007 Mensch [105]	58 (w) 154 (m)	38 (w) 81 (m)	0,69 (w) 0,55 (m)
Chevolleau 2007* Mensch [98]	22 (w) 31 (m) (NR) 27 (w) 56 (m) (R)	23 (w) 21 (m) (NR) 28 (w) 30 (m) (R)	0,97 (NR) 0,78 (R)
Hartmann			
Mensch 2008 [106]	30 (NR)	34 (NR)	1,1 (NR)
Olesen 2008 Mensch [107]	35 (NR) 122 (R)	21 (NR) 60 (R)	n.b.
Vesper 2008 Mensch [108]	42 (NR) 121 (R)	40 (NR) 93 (R)	0,91 (NR) 0,77 (R)

NR: Nichtraucher; R: Raucher; w: weiblich; m: männlich

*Chevolleau et al. haben Raucher und Nichtraucher unterteilt in männliche und weibliche Personen [98]

Fortsetzung Tabelle 3: Vergleich der reduktiven und oxidativen Hb-Addukte

Studie	AAV	GAV	Verhältnis GAV/AAV
	Medianwerte [pmol/g Globin]		
	32 (Q1)	36 (Q1)	1,21 (Q1)
Wilson 2009	41 (Q2)	46 (Q2)	1,17 (Q2)
Mensch** [109]	50 (Q3)	55 (Q3)	1,13 (Q3)
	71 (Q4)	72 (Q4)	1,05 (Q4)
Vesper 2009	50 (NR)	51 (NR)	1,01 (NR)
Mensch*** [99]	113 (R)	94 (R)	0,82 (R)
<i>Mittelwerte</i>			

NR: Nichtraucher; R: Raucher

**Wilson et al. unterteilt das Kollektiv in 4 Subkollektive (Q1-Q4) aufgrund der AA-Exposition. Es wurden nur weibliche Personen untersucht. [109]

***Vesper et al. 2009 gibt Mittelwerte an (kein Unterschied zwischen männlich/weiblich in NHANES Daten; n = 7166) [99]

Tabelle 4 gibt einen Überblick über Metabolismusstudien bei Ratten, Mäusen und Menschen, in denen AA und/oder seine Urinmetaboliten bestimmt wurden.

Tabelle 4: Anteil der einzelnen AA-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe

Studie	AA	GA	AAMA	AAMA- SO ₂	GAMA	Iso- GAMA	OH- PA	Gesamt (Zeit)*
	Anteil der gegebenen Dosis [%]							
Sumner 1992								
Ratte	n.b.	2,8	33,9	n.n.	7,9	4,5	1,2	50,3
50 mg/kg KG								(24 h)
[76]								

Fortsetzung Tabelle 4: Anteil der einzelnen AA-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe

Studie	AA	GA	AAMA	AAMA- SO ₂	GAMA	Iso- GAMA	OH- PA	Gesamt (Zeit)*
Anteil der gegebenen Dosis [%]								
Sumner 1997								
Ratte	n.b.	4,0	23	n.n.	8,4	3,5	n.b.	38,9
21 mg/kg KG								(24 h)
[77]								
Fennell 2005								
Ratte	n.b.	0,8-	29	n.n.	13	8	<NWG	50,8 –
3 mg/kg KG		3,5						53,5
[75]								(24 h)
Doerge 2007								
Ratte	2	6	31	n.n.	28	n.b.	n.b.	67
0,1 mg/kg KG								(24 h)
[110]								
Sumner 1992								
Maus	n.b.	8,5	20,9	n.n.	10,8	5,9	2,7	48,8
50 mg/kg KG								(24 h)
[76]								
Sumner 1997								
Maus	n.b.	22	11	n.n.	14	5	2,5	54,5
21 mg/kg KG								(24 h)
[77]								
Doerge 2007								
Maus	0,65	16	7	n.n.	16	n.b.	n.b.	39,7
0,1 mg/kg KG								(24 h)
[110]								

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachgewiesen; < NWG: kleiner Nachweisgrenze

*Zeitraum in dem Urin nach der Exposition gesammelt wurde (in Stunden)

Fortsetzung Tabelle 4: Anteil der einzelnen AA-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe

Studie	AA	GA	AAMA	AAMA-SO ₂	GAMA	Iso-GAMA	OH-PA	Gesamt (Zeit)*
	Anteil der gegebenen Dosis [%]							
Fennell 2005								
Mensch 3 mg/kg KG [75]	n.b.	0,8	22	4,2	<NWG	<NWG	3,3	30,3 (24 h)
Fennell 2006								
Mensch 0,5 mg/kg KG [111]	4,7	0,4	31,2	8,3	0,7	0,2	n.b.	45,5 (24 h)
Fennell 2006								
Mensch 1 mg/kg KG [111]	5,0	0,6	34,4	8,7	0,7	0,2	n.b.	49,6 (24 h)
Fuhr 2006								
Mensch 12,4 µg/kg KG [112]	4,4	n.b.	50	n.b.	5,9	n.b.	n.b.	60,3 (72 h)
Doroshenko 2008								
Mensch 14,8 µg/kg KG [113]	2,9	n.b.	58	n.b.	1,4	n.b.	n.b.	62,3 (72 h)
Kopp 2009								
Mensch 0,5 µg/kg KG [114]	n.b.	n.b.	41,4	7,2	3,8	n.b.	n.b.	52,4 (22 h)

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachgewiesen; < NWG: kleiner Nachweisgrenze

*Zeitraum in dem Urin nach der Exposition gesammelt wurde (in Stunden)

Fortsetzung Tabelle 4: Anteil der einzelnen AA-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe

Studie	AA	GA	AAMA	AAMA-SO ₂	GAMA	Iso-GAMA	OH-PA	Gesamt (Zeit)*
Anteil an gegebener Dosis [%]								
Kopp 2009 Mensch 20 µg/kg KG [114]	n.b.	n.b.	37,4	6,3	3,2	n.b.	n.b.	46,9 (22 h)
Boettcher & Hartmann 2006-2011 Mensch 13 µg/kg KG [115-117]	n.b.	n.b.	51,7	n.b.	4,6	0,8	5,4	62,5 (46 h)

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachgewiesen; < NWG: kleiner Nachweisgrenze

*Zeitraum in dem Urin nach der Exposition gesammelt wurde (in Stunden)

In den bisherigen Studien lag der Fokus auf der Bestimmung von AAMA und GAMA. Bei der Allgemeinbevölkerung nahmen AAMA und GAMA einen Anteil von 51,7 % bzw. 4,6 % ein [115]. Somit ist AAMA als reduktive Merkaptoamino-Säure mit Abstand der Hauptmetabolit im AA-Metabolismus.

Iso-GAMA als Isomer von GAMA nimmt nach einer Anschlussstudie von Hartmann *et al.* einen Anteil von ca. 0,8 % am Gesamtmetabolismus ein [116]. AAMA-SO₂ ist mit 6-8 % am Gesamtmetabolismus ein weiterer Metabolit, der bisher nur im Menschen, nicht jedoch in Ratten oder Mäusen gefunden wurde [75].

OH-PA mit 5,4 % wurde von Hartmann *et al.* als der oder einer der oxidativen Hauptmetaboliten ermittelt [117]. Auch Fennell *et al.* quantifizierten OH-PA als Humanmetaboliten mit einem Anteil von 3,3 % an der Gesamtdosis [75]. Diese lag jedoch mit 3 mg/kg KG mehr als 200-fach über der Dosis von Hartmann *et al.* mit 13 µg/kg KG und auch für ein worst-case-Szenario weit oberhalb einer für die Allgemeinbevölkerung realistischen Dosis von 1 µg/kg KG/Tag (siehe 2.2.5).

Tabelle 5 gibt einen Überblick über bisherige Humandaten der Allgemeinbevölkerung. Auch bei den Mercaptursäuren als Kurzzeit-expositionsmarker weisen Raucher erneut um Faktor 2,5 bis 4 mal höhere AAMA- und auch GAMA-Werte als Nichtraucher auf.

Analog zur Bestimmung der Hämoglobin-Addukte wurde auch bei den Mercaptursäuren der Anteil der oxidativen zu den reduktiven Metaboliten bestimmt. Im Gegensatz zu dem GAV/AAV-Verhältnis (siehe Tabelle 3) konnte bei den Mercaptursäuren (GAMA/AAMA-Verhältnis) kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen werden. Boettcher *et al.* ermittelten für Nichtraucher ein GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,22 und für Raucher ein leicht niedrigeres Verhältnis von 0,15 [118]. Nur Bjellas *et al.* wiesen 2005 einen Unterschied analog zu den Hb-Addukten nach, nachdem der oxidative Metabolismus bei Nichtrauchern stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei Rauchern (0,25 im Vergleich zu 0,46 für Nichtraucher) [119]. Zwei Jahre später hingegen wurde dieser Unterschied in einer weiteren Studie von Bjellas *et al.* nicht bestätigt [120].

Tabelle 5: Urin-Metaboliten von AA und GA in der Allgemeinbevölkerung

Studie	AAMA	AAMA-SO ₂	GAMA	Iso-GAMA	OH-PA	Verhältnis GA-Metaboliten/AA-Metaboliten
	Medianwerte [µg/L Urin]					
Boettcher 2005 [118]	29 (NR) 127 (R)	n.b.	5 (NR) 19 (R)	n.b.	n.b.	0,22 (NR) 0,15 (R)
Bjellas 2005 [119]	29 (NR) 337 (R)	n.b.	17 (NR) 111 (R)	n.b.	n.b.	0,46 (NR) 0,25 (R)
Urban 2006 [121]	42 (NR) 107 (R)	n.b.	8 (NR) 15 (R)	n.b.	n.b.	0,18 (NR) 0,13 (R)
Kellert 2006 [122]	26 (NR) 283 (R)	n.b.	3 (NR) 20 (R)	n.b.	n.b.	0,12 (NR) 0,07 (R)
Bjellas 2007 [120]	32 (NR) 184 (R)	n.b.	3 (NR) 10 (R)	n.b.	n.b.	0,07 (NR) 0,06 (R)
Hartmann 2008 [106]	29 (NR)	n.b.	7 (NR)	n.b.	n.b.	0,3 (NR)
Kopp 2009 Dissertation [123]	39 (NR) 165 (R)	30 (NR) 121 (R)	9 (NR) 25 (R)	n.b.	n.b.	0,11 (NR) 0,09 (R)

n.b.: nicht bestimmt; NR: Nichtraucher; R: Raucher

Bisher wurde jedoch in nur einer Studie AAMA-SO₂ quantifiziert [123]. Hierbei liegt der Median der AAMA-SO₂-Konzentrationen bei ca. 75 % der AAMA-Konzentrationen (30 µg/L für Nichtraucher und 121 µg/L für Raucher). Diese Konzentrationen sind höher als bisherige Metabolismusstudien (6-8% am Gesamtmetabolismus und somit nur ca. 20-25 % der AAMA-Konzentrationen) vermuten lassen (Tabelle 4). Diese Diskrepanz zwischen Metabolismusdaten

und Allgemeinbevölkerungsdaten wurde von Kopp *et al.* nicht diskutiert [123]. Somit wurde jedoch ein großer Anteil am reduktiven Metabolismus in die Berechnungen der Metabolismusverhältnisse nicht einbezogen.

Des Weiteren fehlen Humandaten zu iso-GAMA und OH-PA, welche 0,8 % bzw. 5,4 % am Gesamtmetabolismus ausmachen. Somit wurde auch ein großer Anteil der oxidativen Metaboliten in den Studien nicht berücksichtigt.

Der Vergleich mit Tierdaten zeigt erneut ein höheres GAMA/AAMA-Verhältnisse von 0,52 bei Mäusen im Gegensatz zu einem Verhältnis von 0,23 bei Ratten [76].

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse einer Kinetikstudie (Vergleich auch mit Abb. 2) von Boettcher *et al.* und Hartmann *et al.* für die Haupturinmetaboliten von AA [115-117]. Ein männlicher Proband nahm hierbei 0,99 mg AA (entspricht 13 µg/kg KG) oral auf. Im weiteren Verlauf wurden 46 Stunden nach oraler Gabe die Urinproben gesammelt und auf AAMA, GAMA, iso-GAMA und OH-PA in mehreren Analysengängen analysiert.

Innerhalb von zwei bis drei Stunden kommt es zu einem starken Anstieg der AAMA-Ausscheidung, die nach 7 Stunden ein Plateau erreicht. Nach 20 Stunden sinkt die Ausscheidung. Die oxidativen Metaboliten weisen eine ähnliche Kinetik auf, die jedoch leicht zeitversetzt ist. Ca. 5 Stunden nach der AA-Gabe kommt es zu einem Anstieg der oxidativen Metaboliten. Diese zeitliche Verschiebung kann durch die Oxidation und die anschließende Hydrolyse bzw. Kopplung an Glutathion erklärt werden. Nach weiteren 20 Stunden sinkt die Ausscheidung der oxidativen Metaboliten. Nach 40 Stunden sinken alle Metaboliten in Bereich weniger µg Metabolit/L Urin (AAMA: 38 µg/L) ab und verbleiben auf diesem Niveau [115-117].

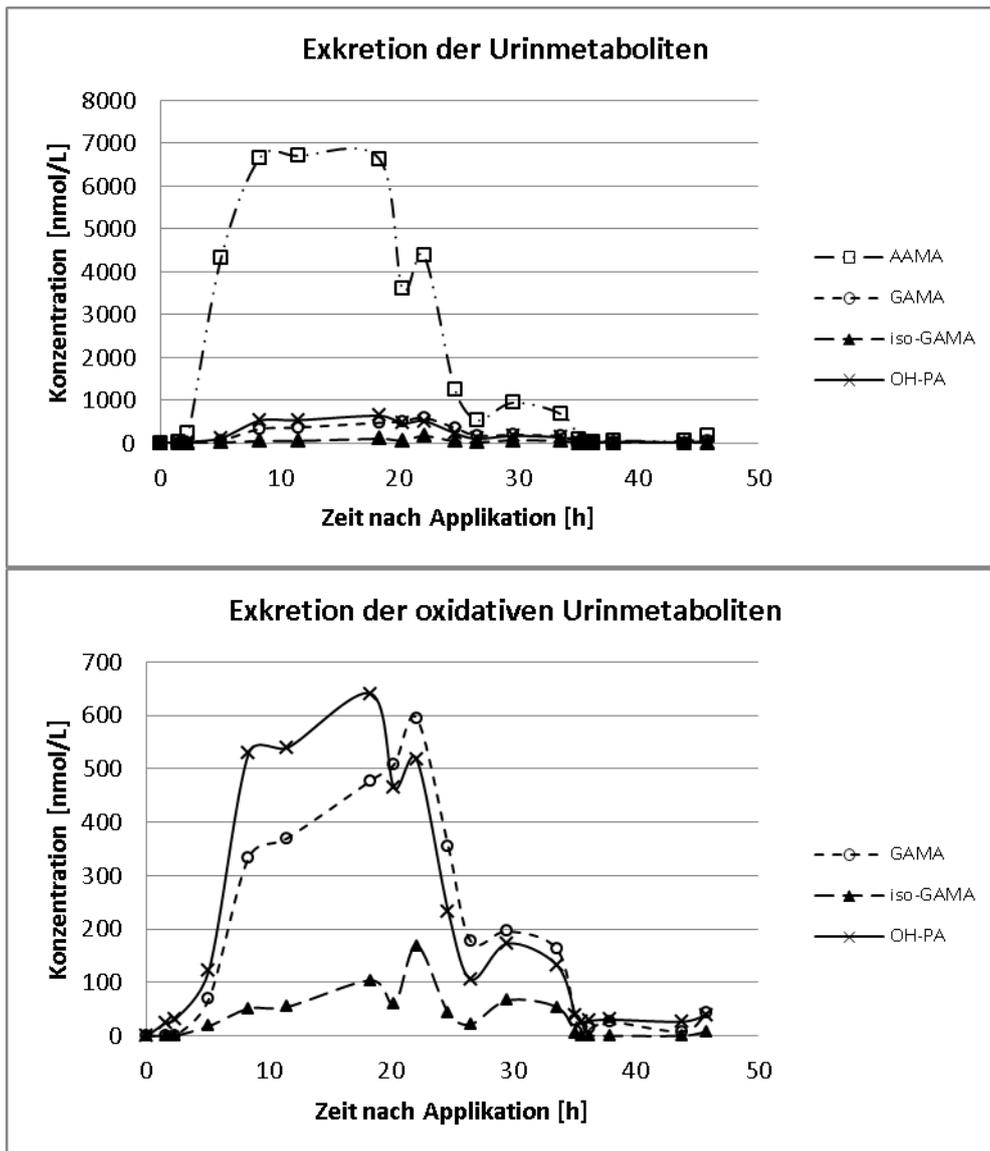


Abb. 7: Ergebnisse der Kinetikstudie aus Hartmann et al. [117]

Zur Beurteilung einer potentiellen beruflichen Exposition muss die Kinetik bekannt sein, um den Probenahmezeitpunkt aufgrund dieser Ausscheidungskinetik wählen zu können. Die Halbwertszeiten der vier obigen Metabolite betragen 11 Stunden (AAMA), 19 Stunden (GAMA und iso-GAMA) und 16 Stunden (OH-PA) [116,117].

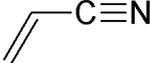
In Muttermilch wurden AA-Gehalte von bis zu 18,8 $\mu\text{g/L}$ nachgewiesen [124]. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit von AA wird es auch über die Plazenta-

schranke von Schwangeren zwischen 10 und 50 % auf das ungeborene Kind übertragen. Untersuchungen der Hämoglobinaddukte von Mutter-Kind-Paaren zeigten einen Übergang in den Fötus [125]. Dies ist insbesondere besorgniserregend, da der Fötus eine hohe Zell-Replikationsrate aufweist. Auch wurde nachgewiesen, dass Föten von schwangeren Raucherinnen höhere Adduktlevel vorweisen als von Nichtraucherinnen [125,126]. Die Werte der 3 Hb-Addukte AAV, GAV und HEV (Hydroxyethylvalin; aus Acrylnitril; siehe 2.3.6) vom Blut der Mutter und Nabelschnurblut (je n = 75) weisen eine starke Korrelation auf [127].

2.3. Acrylnitril

2.3.1 Acrylnitril Übersicht

Tabelle 6: Übersicht Acrylnitril (AN) [128]

Name	Acrylnitril
Synonyme	Acrylsäurenitril, Acrylon, Vinylcyanid, Acrylonitril, Propensäurenitril
IUPAC Name	Prop-2-enenitril
Summenformel	C ₃ H ₃ N
Strukturformel	
Molekulargewicht [g/mol]	53,0626
CAS-Nr.	107-13-1
EG-Nr.	203-466-5
Eigenschaft	Farblose Flüssigkeit bei RT
Schmelzpunkt [°C]	-82
Siedepunkt [°C]	77

Fortsetzung Tabelle 6: Übersicht Acrylnitril (AN) [128]

Dichte (20°C) [g/cm ³]	0,80
Wasserlöslichkeit (20°C) [g/L]	73
Einstufung MAK Kommission [6]	Hautresorbierend (H) Hautsensibilisierend (Sh) Krebserzeugend Kat. 2 BAR 0,3 µg CEV/L Vollblut (für NR)

Abkürzungen: CEV = N-(2-Cyanoethyl)-valin (Acrylnitril-Hämoglobin-Addukt)

NR = Nichtraucher

BAR = Biologischer Arbeitsstoffreferenzwert

2.3.2 Produktion und Einsatz

Acrylnitril (AN) wird im Sohio-Verfahren durch katalytische Oxidation von Propen mit Ammoniak hergestellt [129]. Die AN-Produktion lag 2003 bei 1,25 Millionen Tonnen allein in der EU [130]. Das produzierte AN wird fast ausschließlich zur Herstellung verschiedener Polymere eingesetzt. 59 % der produzierten AN-Menge werden zur Herstellung von Polyacrylnitrilfasern verwendet. Weitere 23 % finden Einsatz bei der Herstellung von Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) und Styrol-Acrylnitril-Copolymeren (SAN), beides für die Automobil- und Elektroindustrie [131]. Weitere 18 % werden für andere Polymere und 15 % zur AA-Herstellung und Adiponitril (Monomer für die Polyamidproduktion)-Herstellung benötigt [131].

2.3.3 Toxikologie

Acrylnitril (AN) ist von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Kanzerogen der Gruppe 2B („possibly carcinogenic to humans“) eingestuft

[132]. Von der MAK-Kommission der DFG erfolgte eine analoge Einstufung als K2 Stoff („als krebserzeugend für den Menschen anzusehen“) sowie hautresorbierend (H) und hautsensibilisierend (Sh). In Tierversuchen wurde für AN eine krebserzeugende sowie eine erbgutschädigende Wirkung nachgewiesen [133-140]. Im Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen einer AN-Exposition und verschiedenen Krebsarten bisher nicht bestätigt werden [141,142]. AN weist zudem eine akute Toxizität auf. Nach inhalativer Aufnahme wurden dabei Symptome wie Atemnot, Kopfschmerzen, Schwindel oder Erbrechen – ähnlich einer Blausäurevergiftung – beschrieben. Auch kann es bei hohen Dosen zu einem Atemstillstand kommen [129]. Der Grund hierfür ist die Freisetzung von Cyanid während der Metabolisierung (siehe 2.3.5).

2.3.4 Grenzwerte zur Expositionsbeurteilung

Analog zu AA sind auch für AN als krebserzeugender Stoff zur Beurteilung einer möglichen arbeitsplatzbedingten Exposition weder AGW noch BAT definiert (siehe auch 2.1.1 und 2.1.2).

Der BAR liegt bei 0,3 µg N-(2-Cyanoethyl)-valin (CEV)/L Vollblut (für NR; entspricht ca. 10 pmol CEV/g Globin) (siehe Tabelle 6 und 2.3.6) [6,143].

Ebenfalls wurde für AN als krebserzeugende Substanz bereits eine ERB aufgestellt. Als Akzeptanzkonzentration gilt ein Wert von 0,26 mg/m³ (Zielwert spätestens ab 2018: 0,026 mg/m³) festgelegt. Die Toleranzkonzentration liegt bei 2,6 mg/m³ [7,143].

2.3.5 Tabakrauch

Die einzig bisher bekannte Acrylnitrilquelle für Personen der Allgemeinbevölkerung ist der Tabakrauch. Es wird analog zu Acrylamid im Pyrolyseprozess gebildet und ist im Haupt- und Nebenstromrauch enthalten. Beim Konsum einer Zigarette kommt es zur Bildung von 3-19 µg AN [145,146]. Auch erfolgt analog zu AA ebenso eine Exposition über Passivrauch. Somit kann es zu einer AN-Exposition von Nichtrauchern im häuslichen Umfeld sowie im Freizeitbereich (Kneipe, Cafe, Bar, Diskothek) kommen.

2.3.6 Metabolismus und Toxikokinetik

Nach oraler, inhalativer oder dermaler Aufnahme wird AN schnell vom Körper resorbiert und verteilt [128]. Bei Ratten und Mäusen werden 72 Stunden nach oraler Aufnahme 73 bis 100 % der Dosis im Urin wiedergefunden. Weitere 2-8 % werden im Faeces ausgeschieden [147].

Der Metabolismus von Acrylamid und Acrylnitril (AN) läuft analog ab. Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation durch Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) zum entsprechenden Epoxid (Cyanoethylenoxid) [72].

Auch im AN-Metabolismus ist dies der zentrale Punkt, da analog das oxidative Primärprodukt Cyanoethylenoxid (CEO) die eigentlich genotoxische Spezies ist [148,149]. Abbildung 8 zeigt den Metabolismus anhand von Tierversuchsdaten. Analog zum AA Metabolismus können sowohl AN als auch CEO an Glutathion oder an Proteine binden und somit Mercaptursäuren bzw. Hämoglobinaddukte bilden. Bei der Bildung von *N*-Acetyl-S-(2-cyano-2-hydroxyethyl)-cystein (2-CHEMA) als Mercaptursäure bzw. *N*-(2-Cyano-2-Hydroxyethyl)-valin (2-CHEV)

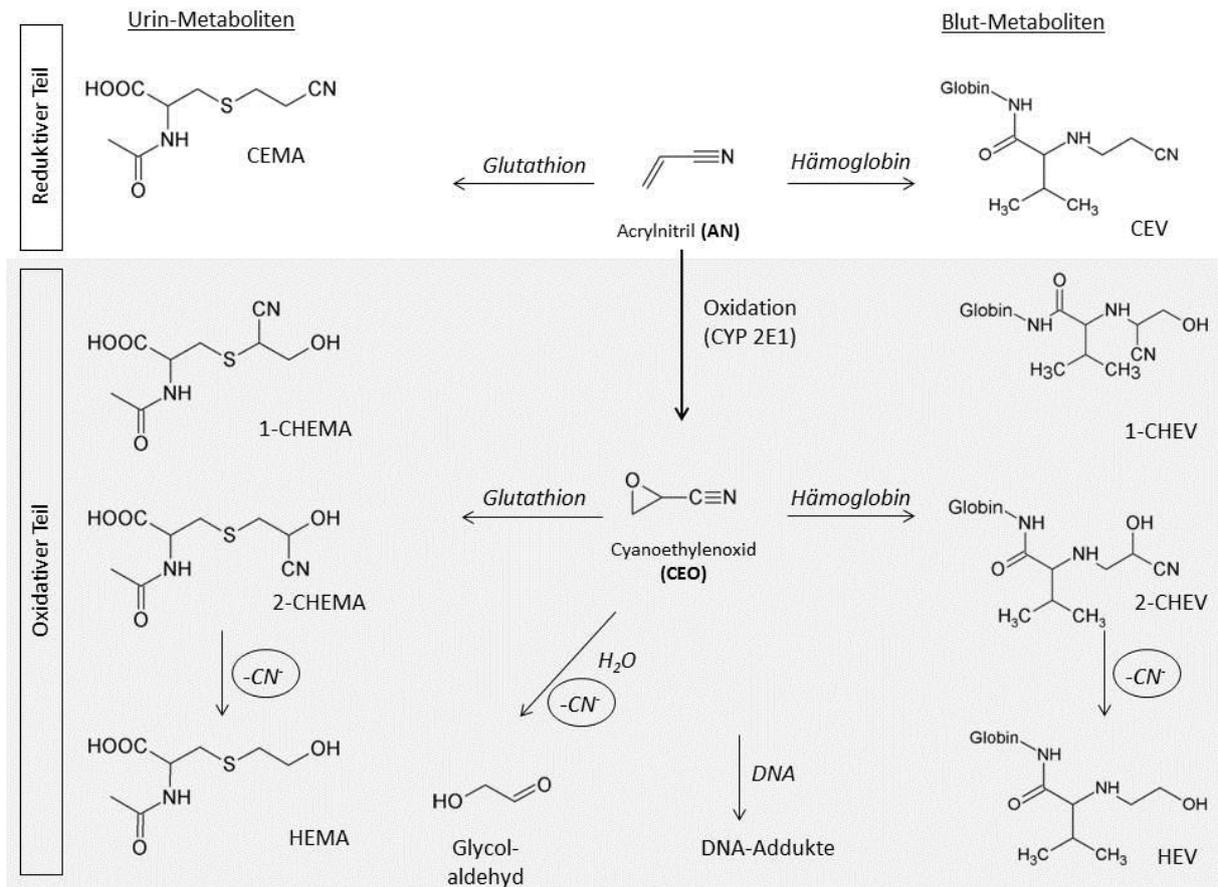


Abb. 8: Metabolismus von Acrylnitril (AN) nach Fennell et al. und Kedderis et al. [80,147]

(Abkürzungen: AN = Acrylnitril; CEO = Cyanoethylenoxid; CEMA: N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein; 1-CHEMA = N-Acetyl-S-(1-Cyano-2-hydroxyethyl)-cystein; 2-CHEMA = N-Acetyl-S-(2-Cyano-2-hydroxyethyl)-cystein; HEMA = N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-cystein; CEV = N-(2-Cyanoethyl)-valin; 1-CHEV = N-(1-Cyano-2-hydroxyethyl)-valin; 2-CHEV = N-(2-Cyano-2-hydroxyethyl)-valin; HEV = N-(2-Hydroxyethyl)-valin)

Die Cyanidfreisetzung wurde der Übersichtlichkeit halber durch Einkreisen hervorgehoben. Jede freigesetzte Cyanidgruppe wird durch das Enzym Rhodanase zu Thiocyanat umgesetzt und als solches im Urin ausgeschieden [129].

als Hb-Addukt kommt es aufgrund der Formierung eines instabilen Cyanhydrins zur Cyanidfreisetzung. Gleiches gilt für die Hydrolyse des CEO zum Glycolaldehyd [150]. Diese Cyanidfreisetzung verursacht typische Symptome einer Cyanidvergiftung und ist der Grund für die akute Toxizität von Acrylnitril.

Im Körper wird Cyanid durch das Enzym Rhodanase zu Thiocyanat umgesetzt und als solches im Urin ausgeschieden. Resultierend aus dieser Cyanidfreisetzung entstehen *N*-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-cystein (HEMA) bzw. *N*-(2-Hydroxyethyl)-valin (HEV), welche jedoch keine spezifischen Marker für eine AN-Exposition darstellen. HEMA wurde unter anderem auch nach einer Ethylenoxid- bzw. Vinylchlorid-Exposition nachgewiesen [151,152].

Auch im AN-Metabolismus – analog zum AA-Metabolismus – wurden verschiedene DNA-Addukte aus dem Epoxid CEO *in vitro* nachgewiesen [153,154].

Da auch CEO als ultimative genotoxische Spezies (analog zum GA im AA Metabolismus) gilt, ist der Fokus auch im AN-Metabolismus auf das Verhältnis der Oxidation von AN zu CEO gerichtet. Auch bei AN ist der oxidative Metabolismus analog zu AA in Mäusen stärker ausgeprägt als in Ratten. Urinmetaboliten aus CEO machen in Mäusen 80 % der wiedergefundenen Dosis aus, in Ratten hingegen nur ca. 60 % [80]. Mäuse scheiden nach einer AN-Gabe auch mehr Thiocyanat aus als Ratten [155]. Der Grund hierfür liegt in der bereits genannten Cyanidfreisetzung aus dem oxidativen Metabolismus und der Umwandlung zu Thiocyanat.

Tabelle 7 gibt einen Überblick über Metabolismusstudien bei Ratten bzw. Mäusen, in denen AN und/oder seine Urinmetaboliten bestimmt wurden.

Tabelle 7: Anteil der einzelnen AN-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe

Studie	CEMA	CHEMA (1-CHEMA)	HEMA	Weitere oxidat.*	Gesamt (Zeit)**
Anteil an gegebener Dosis [%]					
Fennell 1991					
Ratte	23,9	9,7	14,9	7,3	55,8
30 mg/kg KG					(24 h)
[80]					
Fennell 1991					
Maus	11,1	7,5	12,1	23,5	54,2
10 mg/kg KG					(24 h)
[80]					
Sumner 1997					
Ratte	20	6,3	14	8,3	48,6
16 mg/kg KG					(24 h)
[77]					
Sumner 1997					
Maus	12	4,2	7,8	24	48,0
16 mg/kg KG					(24 h)
[77]					

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachgewiesen; < NWG: kleiner Nachweisgrenze

**Weitere oxidat.: Weitere unspezifische oxidative Metaboliten, die aus 2-CHEMA gebildet werden (S-Carbamoylmethyl)-cystein; Thiodiglycolsäure; Thionyl-diessigsäure) [77,80]*

***Zeitraum in dem Urin nach der Exposition gesammelt wurde (in Stunden)*

In Tabelle 8 sind publizierte Humandaten zu AN-Metaboliten zusammengefasst. Hierbei handelt es sich meist um CEV und CEMA (bzw. HEV und HEMA) als rauchabhängige Parameter.

Schettgen *et al.* ermittelten CEV-Werte im Blut von Arbeitern von < NWG (NWG = 4 pmol/g Globin) für Nichtraucher und 131 pmol/g Globin für Raucher sowie

HEV von 77 pmol/g Globin für Nichtraucher und 175 pmol/g Globin für Raucher [70].

Für die Mercaptursäuren CEMA und HEMA ermittelten Schettgen *et al.* Medianwerte von jeweils 2 µg/L für Nichtraucher und 240 bzw. 5 µg/L für Raucher [156].

Tabelle 8: Urin-Metaboliten und Hb-Addukte von AN und CEO in der Allgemeinbevölkerung (Medianwerte; nur Humandaten)

Studie	CEV	HEV	CEMA	HEMA	CHEMA
	[pmol/g Globin]				
Schettgen 2002* [70]	<NWG (NR) 131 (R)	77 (NR) 175 (R)	n.b.	n.b.	n.b.
Scherer 2007**[157]	6,5 (NR) 112 (R)	21 (NR) 132 (R)	n.b.	n.b.	n.b.
Schettgen 2009 [156]	n.b.	n.b.	2 (NR) 240 (R)	2 (NR) 5 (R)	n.b.
Schettgen 2010**** [158]	<NGW (NR) 1 (PR)	18 (NR) 17 (PR)	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt; NR: Nichtraucher; R: Raucher; NWG: Nachweisgrenze; PR: Passivrauchexposition

*Schettgen *et al.* (2002) NWG (CEV) = 4 pmol/g Globin; NWG (HEV) = 9 pmol/g Globin

**Scherer *et al.* (2007) geben nur Mittelwerte an.

***Ding *et al.* (2010) geben nur Bereiche an; NWG (HEMA) = 0,03 µg/L

****Schettgen *et al.* (2010) NWG (CEV) = 0,5 pmol/g Globin

Fortsetzung Tabelle 8: Urin-Metaboliten und Hb-Addukte von AN und CEO in der Allgemeinbevölkerung (Medianwerte; nur Humandaten)

Studie	CEV	HEV	CEMA	HEMA	CHEMA
	[pmol/g Globin]		[µg/L]		
Minet 2011 [#] [159]	n.b.	n.b.	1,1 (NR) 75,4 (R1) 140,2 (R2) 186,6 (R3)	n.b.	n.b.
Eckert 2011 ^{###} [160]	n.b.	n.b.	n.b.	< NWG (NR) 4 (R)	n.b.
Wu 2012 ^{####} [161]	n.b.	n.b.	2,6	1,0	2,4
Schettgen 2012 ^{#####} [162]	n.b.	n.b.	1,9 (NR) 184 (R)	n.b.	< NWG (NR) 29,3 (R)

n.b.: nicht bestimmt; NR: Nichtraucher; R: Raucher; NWG: Nachweisgrenze; PR: Passivrauchexposition

[#]Minet et al. (2011) geben die Ausscheidungswerte in [µg/24 Stunden] an. R1: 15 Zigaretten pro Tag; R2: 18 Zigaretten pro Tag; R3: 20 Zigaretten pro Tag

^{###}Eckert et al. (2011) NWG (HEMA) = 2 µg/L

^{####}Wu et al. (2012) untersuchten 31 Nichtraucher und 2 Raucher und geben nur das geometrische Mittel aller Proben in µg/g Kreatinin an

^{#####}Schettgen et al. (2012) NWG je 1 µg/L

CHEMA wurde bisher in zwei Studien gemessen. Wu et al. geben jedoch mit 2,4 µg/g Kreatinin nur den Mittelwert aller 33 Werte (31 Nichtraucher und 2 Raucher) an [161]. Da CHEMA als AN-Merkaptursäure ein rauchabhängiger Parameter ist, besitzt dieser Mittelwert wenig Aussagekraft. Schettgen et al. publizierten 2012 die ersten CHEMA-Daten mit einer Unterscheidung von R und NR [162]. Die CHEMA-Werte lagen im Median bei 29,3 µg/L (Raucher) und < 1

µg/L (Nichtraucher). Insgesamt fällt auf, dass weit weniger Daten über AN als über AA vorliegen (Vergleich der Tabellen 3-5 mit Tabellen 7 und 8).

2.4 HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

2.4.1 Trennmechanismus

Die „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“ (HILIC) wird auch inverse Normalphasen- (NP) chromatographie oder auch erweiterte Reversed-Phase- (RP) Chromatographie genannt. Hierbei kommt eine polare NP-Phase mit Eluenten für die RP-Chromatographie zum Einsatz.

Das Grundprinzip von HILIC ist das Verwenden einer polaren stationären Phase (Normalphase) mit einem wassermischbaren Eluenten [163].

Die Elutionskraft der Eluenten ist entgegengesetzt zu der in der RP-Chromatographie, d.h. Wasser ist der Eluent mit der größeren Elutionskraft und wird bei einem Gradienten somit auch erhöht (meist Gradienten von 5% Wasser bis 50 % Wasser) [164]. Es gilt folgende elutrope Reihe: Aceton < Isopropanol ~ Propanol < Acetonitril (ACN) < Ethanol < Methanol < Wasser [165].

Der Trennmechanismus ist eine komplexe Mischung aus Verteilungs- und Ionenaustauschmechanismen und Wasserstoffbrückenbindungen, wobei das Hauptaugenmerk auf der Verteilungschromatographie liegt [166]. Es bildet sich eine Wasserschicht an der stationären Phase und die Analyten verteilen sich zwischen dieser Wasserschicht und dem Eluenten (meist Acetonitril als organischer Eluent; siehe Abbildung 9) [164].

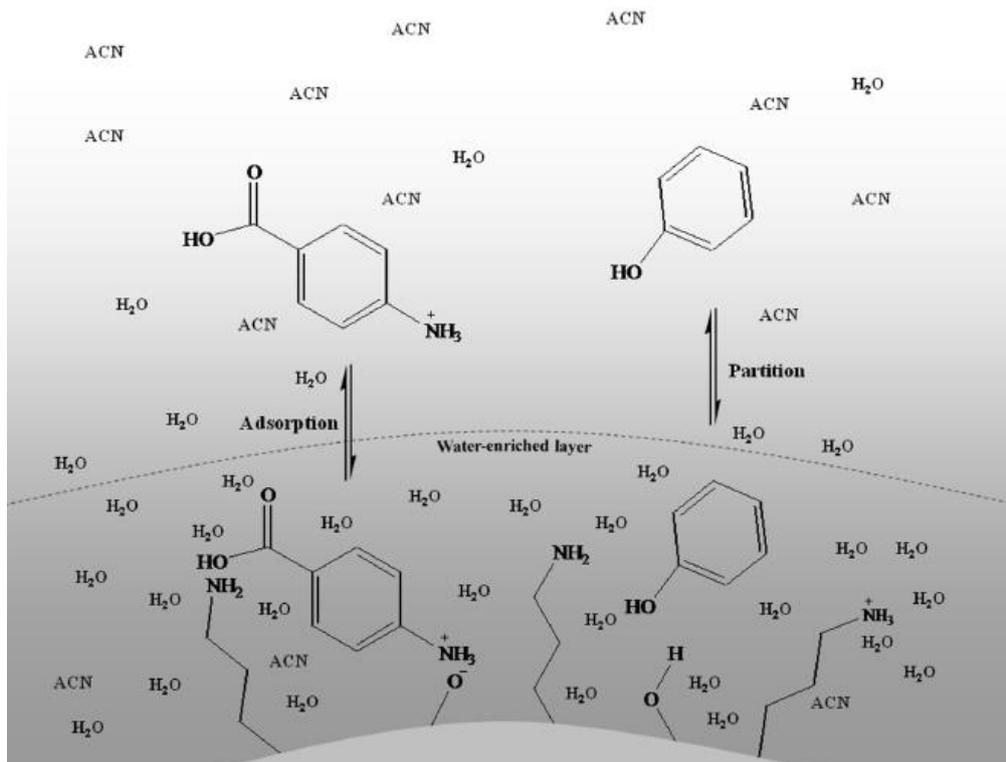


Abb. 9.: Mechanismus der Wechselwirkungen auf einer HILIC-Phase beispielhaft an einer modifizierten Aminophase (aus Nguyen et al.[167])

„Partition“: Verteilung

„Water-enriched layer“: wasserangereicherte Schicht

ACN: Acetonitril

Unpolare Substanzen werden nicht oder nur sehr schwach in die Wasserschicht eindringen und somit nicht retardiert.

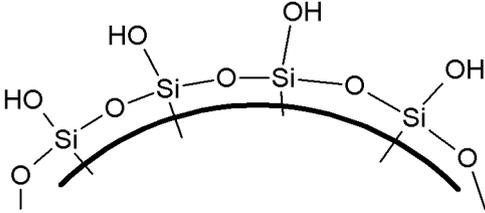
HILIC eignet sich somit insbesondere zur Trennung polarer Substanzen, die sich auch mit polar modifizierten RP-Phasen nicht oder erst nach einer Umsetzung zu einem unpolaren Derivat trennen lassen [165]. Für die Analytik polarer Metaboliten in der polaren Urinmatrix ist diese Technik ideal geeignet.

2.4.2 Stationäre Phasen

Es gibt eine Vielzahl an stationären Phasen, da theoretisch jede polare Phase eingesetzt werden kann. Während erster Versuche wurden insbesondere Kieselgelphasen (Normalphasen) verwendet, während mittlerweile von vielen Herstellern spezielle HILIC-Phasen auf den Markt gebracht worden sind. Zu nennen sind neben modifizierten Umkehrphasen mit Diol-, Cyano- oder Amidmodifikationen auch verschiedene Polymermaterialien mit ionischen oder zwitterionischen Strukturen.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über verschiedene Materialien, die heutzutage für HILIC Trennungen verwendet werden.

Tabelle 9.: Beispiele für HILIC-Phasen und Phasen, die im HILIC Modus betrieben werden können (Abbildungen entnommen aus den Produktkatalogen der entsprechenden Firma oder Buszewskiy et al. [165])

Material	Struktur der Phase	Beispiel/ Quelle
Kieselgel /Silika		Zorbax® HILIC, Agilent [168] Ascentis® Express HILIC, Supelco XBridge® und Atlantis® HILIC, Waters [169]

Fortsetzung Tabelle 9.: Beispiele für HILIC-Phasen und Phasen, die im HILIC Modus betrieben werden können (Abbildungen entnommen aus den Produktkatalogen der entsprechenden Firma oder Buszewskiy et al. [165])

Quervernetzte Diolphase		Luna® und Kinetex® HILIC, Phenomenex [170]
Diolphase		[165]
Cyano- phase		[165]
Amino- phase		[165]
Zwitter- ionische Sulfoalkyl- betain- struktur		ZIC®-HILIC, Sequant, Merck [170] Nucleodur® HILIC, Macherey und Nagel [172]

2.4.3 Sonstige Details zur HILIC

Da auch ionische Wechselwirkungen im HILIC Modus eine Rolle spielen, ist der Einsatz eines Puffers unerlässlich. Hierbei ist insbesondere bei Gradienten auf eine gleichbleibende Ionenkonzentration zu achten. Typische Eluenten sehen bei der Verwendung von binären Gradienten wie folgt aus:

Eluent A: 90 % Acetonitril / 5 % Wasser / 5 % wässriger Puffer

Eluent B: 50 % Acetonitril / 45 % Wasser / 5 % wässriger Puffer

Der Gradient kann dann von 100 % A auf 100 % B erhöht werden.

Als Vorteile des HILIC-Modus sind zu nennen, dass bei einer Bestimmung polarer Analyten, im Anschluss an eine SPE-Aufreinigung („solid-phase extraction“) die aufgearbeitete Probe oftmals im Lösemittel verbleiben kann und somit ein Aufarbeitungsschritt (Abdampfen des Lösemittels) mit eventuellen Verlusten eingespart wird. Aufgrund des höheren Acetonitril-Anteils (bzw. des niedrigeren Wasseranteils) ist zudem die Empfindlichkeit im Massenspektrometer im Vergleich zur RP-Chromatographie höher [173].

Als Nachteile sind zu nennen bzw. zu berücksichtigen, dass lange Equilibrierungszeiten zu wählen sind, um schwankenden Retentionszeiten vorzubeugen.

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der Arbeit ist die Bestimmung des Anteils der oxidativen Primärmetaboliten am Gesamtmetabolismus von Acrylamid (AA) bzw. Acrylnitril (AN) des Menschen, da diese entscheidend für die kanzerogene Wirkung beider Gefahrstoffe sind.

Diese Primärmetaboliten Glycidamid (GA) und Cyanoethylepoxid (CEO) sind sehr reaktiv und binden auch an DNA. Zur Abschätzung des kanzerogenen Potentials ist somit die Erfassung möglichst vieler Metaboliten wichtig, um den Anteil des oxidativen Stoffwechselfades zu ermitteln.

Neben der Bestimmung mancher schon in anderen Studien untersuchten Metaboliten lag der Fokus dieser Doktorarbeit somit auf einer möglichst kompletten Erfassung der bedeutendsten oxidativen Metaboliten im Urin.

Folgende Arbeitsschritte standen im Rahmen dieser Doktorarbeit an:

- Entwicklung einer sensitiven Analysenmethode, mit der der oxidative Metabolit 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) als direktes Hydrolyseprodukt von GA im Urin der Allgemeinbevölkerung erfasst werden kann.
- Entwicklung einer sensitiven Analysenmethode zur Bestimmung der oxidativen AA-Merkaptursäure iso-GAMA sowie der oxidativen AN-Merkaptursäure CHEMA. Integration der weiteren Merkaptursäuren in diese Methode .
- Beurteilung der Validität des Biomarkers OH-PA durch Untersuchung von zwei verschiedenen Kollektiven.

- Betrachtung der Korrelation mit den anderen AA- und GA-Metaboliten im Allgemeinbevölkerungskollektiv.

In zwei Fastenstudien wurde, wie bereits für andere AA- und GA-Metaboliten publiziert, der Einfluss der Ernährung auf die OH-PA-Ausscheidung ermittelt.

Die erste Fastenstudie untersuchte die OH-PA-Ausscheidung während eines 48-stündigen Fastens zweier Personen. Darauf aufbauend ermittelte die zweite Fastenstudie die OH-PA-Ausscheidung während eines 10-tägigen Heilfastens einer Person.

Mit der erarbeiteten Merkaptursäurenmultimethode und der bekannten, und hier am Institut neu etablierten Hb-Addukt Methode sollten sämtliche verfügbaren oxidativen und reduktiven Metaboliten bestimmt werden, um die Bedeutung des oxidativen Stoffwechselweges beurteilen zu können. Das Ausmaß der Oxidation (und somit das kanzerogene Potential) sollte hierfür mit Tierdaten verglichen werden. Hierzu sollten in einem Kollektiv aus 126 Personen der Allgemeinbevölkerung die oxidativen und reduktiven Lang- und Kurzzeitmarker im AA-Metabolismus sowie an dem Teilkollektiv aus 33 Rauchern die oxidativen und reduktiven Lang- und Kurzzeitmarker im AN-Metabolismus gemessen werden.

Zudem sollte ein berufliches Kollektiv von Labormitarbeitern, die mit Acrylamid bzw. Polyacrylamid arbeiten, auf die gleichen Metaboliten analysiert werden um eine mögliche arbeitsplatzbedingte AA-Exposition beurteilen zu können.

4 BESTIMMUNG DES OXIDATIVEN ACRYLAMID-METABOLITEN 2,3-DIHYDROXYPROPIONAMID (OH-PA) IM URIN

4.1 Grundlage des Verfahrens

Um den polaren Analyten von der relativ polaren Urinmatrix zu trennen, wird ein *Stripping*-Verfahren auf einer SPE-Kartusche angewendet. Dabei werden die Matrixbestandteile an der Festphase retardiert und der polare Analyt befindet sich im Eluat. Dieses wird im zweiten Schritt lyophilisiert, um den Analyten im Anschluss in einem organischen Lösemittel aufzunehmen bzw. zu extrahieren. Um OH-PA einer empfindlichen gaschromatographischen Analyse zugänglich zu machen, wird der Analyt mit einem Silylierungsmittel derivatisiert. Dieses reagiert sowohl an den zwei Hydroxy- als auch an der Amidfunktion und führt somit zu einem dreifach silylierten Derivat mit hoher Masse (siehe Abbildung 10), welches selektiv detektiert werden kann.

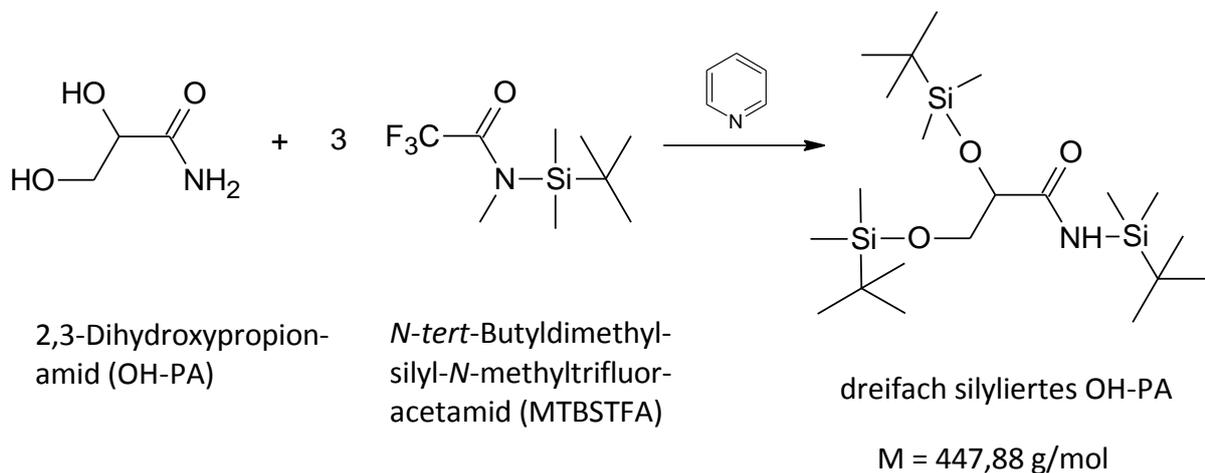


Abb. 10: Schema der Derivatisierung von 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) mit *N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) unter katalytischen Mengen Pyridin

Es handelt sich dabei um eine modifizierte Methode nach Hartmann *et al.*, welche in einer Metabolismusstudie verwendet wurde [117]. Diese Methode wurde bereits publiziert (Latzin *et al.*) [174].

4.2 Geräte, Chemikalien, Lösungen

4.2.1 Geräte und Materialien

- Gaschromatograph Agilent 7890 A GC (Agilent Technologies, Waldbronn, D)

Mit:

- 5975 C EI/CI massenspektrometrischer Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn, D)
- KAS 4 Kaltaufgabesysteminjektor (Gerstel, Mühlheim an der Ruhr, D)
- COMBI PAL System Autosampler (CTC Analytics, Zwingen, CH)
- Gaschromatographische Säule DB 35ms (60 m, 0,25 µm Filmdicke, 0,25 mm Durchmesser) (joint analytical systems, Moers, D)

- Laborlyophilisator VaCo 2 (Zirbus, Bad Grund, D)
- Vortexer, IKA MS 2 Minishaker (IKA, Staufen, D)
- Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3L-R) (Kendro Laboratory Products, Osterode, D)
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digital DK 255 P (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D)
- SPE Station Chromabond® mit 24 Steckplätzen und dazugehörigen Durchflusshähnen (Macherey Nagel, Düren, D)

- Beheizbare Abblasstation, Dri Block DB-3A und Sample Concentrator (TECHNE, Staffordshire, USA)
- Urinsammelflasche weiß mit schwarzem Schraubverschluss PE 250 mL (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen mit rotem Verschluss (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- SPE-Kartuschen Isolute ENV+ 100 mg Sorbens, 3 mL Volumen (Biotage, Uppsala, Schweden)
- 20 mL Schraubdeckelgläser mit dazugehörigen Septen und Schraubdeckeln (Ziemer Chromatographie, Langerwehe, D)
- Roll-/Schnapprandflasche 1,8 mL klar mit Schraubdeckel und zylindrischem Mikroinsert (CZT, Chromatographie Zubehör Trott, Kriftel, D)
- Diverse Pipetten und Multipetten (Eppendorff, Hamburg, D)

4.2.2 Chemikalien

- 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) und d_3 -2,3-Dihydroxypropionamid (d_3 -OH-PA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D); Reinheit >95%, Isotopenreinheit >98%
- Acetonitril getrocknet (<0,005% Wasser) SeccoSolv[®] (VWR, Darmstadt, D)
- Acetonitril SupraSolv[®] für die Gaschromatographie (VWR, Darmstadt, D)
- n-Hexan für die Gaschromatographie Suprasolv[®] (VWR, Darmstadt, D)
- Toluol für die Gaschromatographie SupraSolv[®] (VWR, Darmstadt, D)

- Methanol zur Analyse (VWR, Darmstadt, D)
- *N-tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyl-trifluoracetamid (MTBSTFA) purum \geq 97% (GC) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
- Pyridin wasserfrei 99,8 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
- VE-Wasser, Millipore Anlage Milli-Q Advantage A 10 (Millipore, Billerica, MA, USA)

4.3 Lösungen

Interner Standard (ISTD) Stammlösung und Arbeitslösungen: Zur Herstellung der Lösungen für den internen markierten Standard werden 14,05 mg d₃-OH-PA in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit Acetonitril SeccoSolv® (getrocknet) bis zum Eichstrich aufgefüllt (Stammlösung). Diese Stammlösung (1,405 g/L) wird mit Acetonitril verdünnt, indem 50 μ L in einen 5 mL Kolben überführt und bis zum Eichstrich aufgefüllt wird (Zwischenverdünnung). 1 mL dieser Zwischenverdünnung werden mit 3 mL Acetonitril verdünnt (Arbeitslösung AL ISTD c = 3,5 mg/L). 30 μ L dieser AL ISTD werden zu 1 mL Urinprobe pipettiert. Dies entspricht einer Konzentration von 101 μ g/L.

Stammlösung und Arbeitslösungen 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA): 6,72 mg OH-PA werden in einen 5 mL Messkolben genau eingewogen und mit Acetonitril SeccoSolv® (getrocknet) bis zum Eichstrich aufgefüllt (Stammlösung; 1,344 g/L). 200 μ L der Stammlösung werden in einen weiteren 25 mL Messkolben pipettiert und dieser ebenfalls mit Acetonitril bis zum Eichstrich aufgefüllt (Arbeitslösung 2 = AL 2; c = 10,75 mg/L). Aus dieser Arbeitslösung 2 werden 1000 μ L in einen 10 mL Messkolben pipettiert und dieser mit

Acetonitril bis zum Eichstrich aufgefüllt (Arbeitslösung 1 = AL 1; $c = 1,075 \text{ mg/L}$). Aus diesen Arbeitslösungen werden die Kalibrationsstandards hergestellt (siehe 4.7).

4.3.1 Haltbarkeit der Lösungen und Vergleichsstandards

Alle Lösungen sind bei -20°C mindestens 12 Monate haltbar.

4.4 Probenahme und Probenaufbereitung

4.4.1 Probenahme

Bei allen gesammelten Urinproben handelt es sich um Spontanurinproben. Diese wurden von den Probanden direkt in 250 mL PE-Urinsammelflaschen abgegeben und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

4.4.2 Probenaufarbeitungen

Die Urinproben wurden auf Raumtemperatur gebracht und homogenisiert. 1 mL der Urinproben wurde in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 2 mL VE-Wasser und 30 μL der ISTD-Arbeitslösung wurde die Probe auf dem Vortexer homogenisiert.

Eine ENV+ SPE Kartusche wurde mit 2 x 2 mL Methanol und 2 x 2 mL VE-Wasser konditioniert. Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von max. 1 mL/min aufgegeben (Tropfgeschwindigkeit über die Hähne eingestellt) und die SPE-Kartuschen wurden im Anschluss unter Vakuum getrocknet.

Das direkte Eluat wurde in 20 mL Gefäßen schräg (zur Erhöhung der Oberfläche) bei -20°C für mindestens 3 Stunden eingefroren und über Nacht

durch den vorgekühlten Lyophilisator gefriergetrocknet (-46 °C ; $0,01\text{ mbar}$). Dabei war darauf zu achten, dass die Proben zu Beginn des Lyophilisationsprozesses komplett durchgefroren sind, um ein Überkochen im Gefriertrockner zu vermeiden.

Am nächsten Tag wurden die Proben mit $1,5\text{ mL}$ ACN seccosolv versetzt und die farblosen, feinkörnigen Lyophilisate wurden durch 60 s intensives Durchmischen auf dem Vortexer und 3 min Ultraschallbad extrahiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (die Proben erwärmten sich im Ultraschallbad) wurden die Proben 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. $1,4\text{ mL}$ des Überstandes wurden vorsichtig ohne Aufwirbeln des feinen Bodensatzes in ein $1,8\text{ mL}$ GC-Vial überführt. Unter einem leichten Stickstoffstrom wurde das Acetonitril entfernt, der trockene Rückstand mit $50\text{ }\mu\text{L}$ Pyridin und $50\text{ }\mu\text{L}$ MTBSTFA versetzt, die Gefäße fest verschlossen und für 2 Stunden bei 65 °C in einem Ofen derivatisiert.

Nach Abkühlen der Proben wurden $500\text{ }\mu\text{L}$ deionisiertes Wasser zur Hydrolyse des überschüssigen Derivatisierungsmittels hinzu pipettiert. Die Derivate wurden mit $500\text{ }\mu\text{L}$ n-Hexan extrahiert, indem die Gefäße 10 Minuten auf dem Vortexer durchmischt und für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert wurden. Die Hexanphase wurde in ein weiteres $1,8\text{ mL}$ GC-Vial überführt und die Extraktionsprozedur wurde erneut mit $500\text{ }\mu\text{L}$ Hexan analog wiederholt. Beim Abnehmen der Hexanphase war darauf zu achten, den feinkristallinen Niederschlag an der Grenzschicht wässrige/Hexanphase nicht mit zu überführen.

Beide kombinierten Hexanextrakte wurden unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in $250\text{ }\mu\text{L}$ Toluol resuspendiert. Löste sich der Niederschlag nicht komplett, wurden die Proben

erneut für 10 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,8 mL GC-Vial mit einem Mikroinsert überführt.

4.5 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule DB 35ms	60 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke (J & W Scientific, Folsom, CA, USA)
Trägergas Helium 5.0	Flussgeschwindigkeit 1,2 mL/min (constant flow)
Injektion	0,5 µL; splitless
Inlet purge off time	2 min, dann mit 50 mL/min spülen

Gerätetemperaturen

Injektor	260 °C
Transferline	280 °C
Quellentemperatur	230 °C
Quadrupoltemperatur	150 °C

Säulenofen 100 °C, 1 min halten
20 °/min auf 130 °C, 1 min halten
12,5 °/min auf 220 °C, 10 min halten
25 °/min auf 280 °C, 10 min halten

Gesamtdauer: 33,1 min

Ionisierung	Elektronenstoßionisation (EI)
Ionisierungsenergie	70 eV

Detektion Selected Ion Monitoring (SIM)
 Messzeit pro Ion (dwell time) 100 ms

4.6 Analytische Bestimmung

0,5 µL der unter 4.4.2 aufgearbeiteten Probe wurden splitless in das GC-MS System injiziert. Die Analyten wurden anhand ihrer selektiven Zerfälle sowie ihrer Retentionszeit identifiziert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht über die Retentionszeiten und selektiven Zerfälle des derivatisierten Analyten (OH-PA) und des Internen Standards (d₃-OH-PA)

Analyt	Retentionszeit [min]	Fragment m/z
OH-PA	18,20	390*
		391
		432
d ₃ -OH-PA	18,15	393*
		435

**Quantifierspur*

Abbildung 11 zeigt ein Massenspektrum einer derivatisierten Standardlösung.

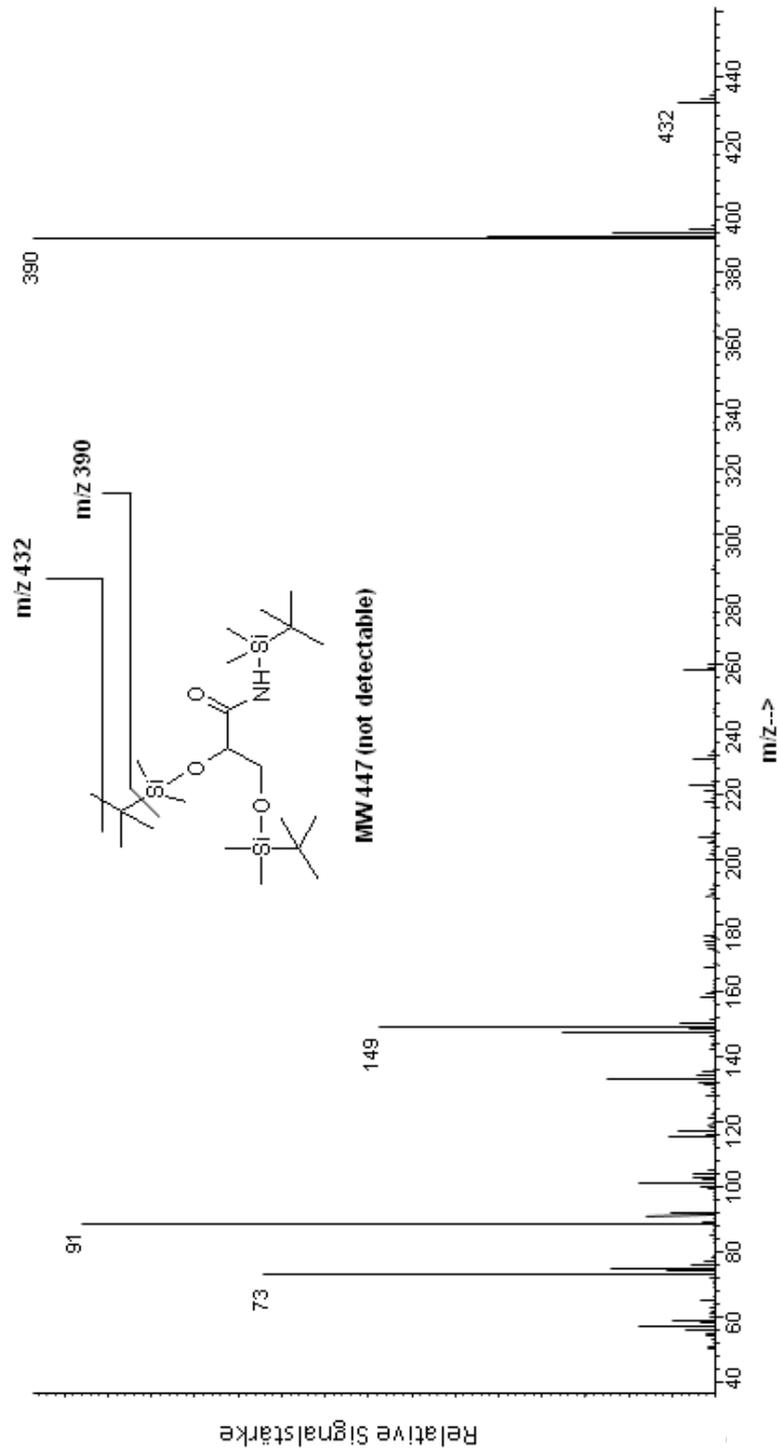


Abb. 11: Massenspektrum eines dreifach mit MTBSTFA derivatisierten 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA)-Standards, 100 µg/L, gemessen im TIC (Total Ionen Strom). Die Abspaltung der Methyl- sowie der tert-Butyl-Gruppe kann an jedem der drei Silylreste stattfinden.

Das Molekülion selbst ist nicht stabil und konnte nicht beobachtet werden (m/z 447 bzw. 450 für den isotoopenmarkierten Standard). Zur Quantifizierung herangezogen wurden die Masse-Ladungsverhältnisse m/z 390 bzw. als Qualifier m/z 391 und 432 (für MTBSTFA als Derivatisierungsmittel spezifischer Verlust einer Methyl- bzw. einer *tert*-Butyl-Gruppe [173,174]). Der Verlust dieser Methyl- bzw. *tert*-Butyl-Gruppe kann an jedem der drei MTBSTFA-Reste stattfinden, ist aber beispielhaft an nur einer Funktion in Abbildung 11 eingezeichnet.

Abbildungen 12 und 13 zeigen Chromatogramme zweier aufgearbeiteter Proben.

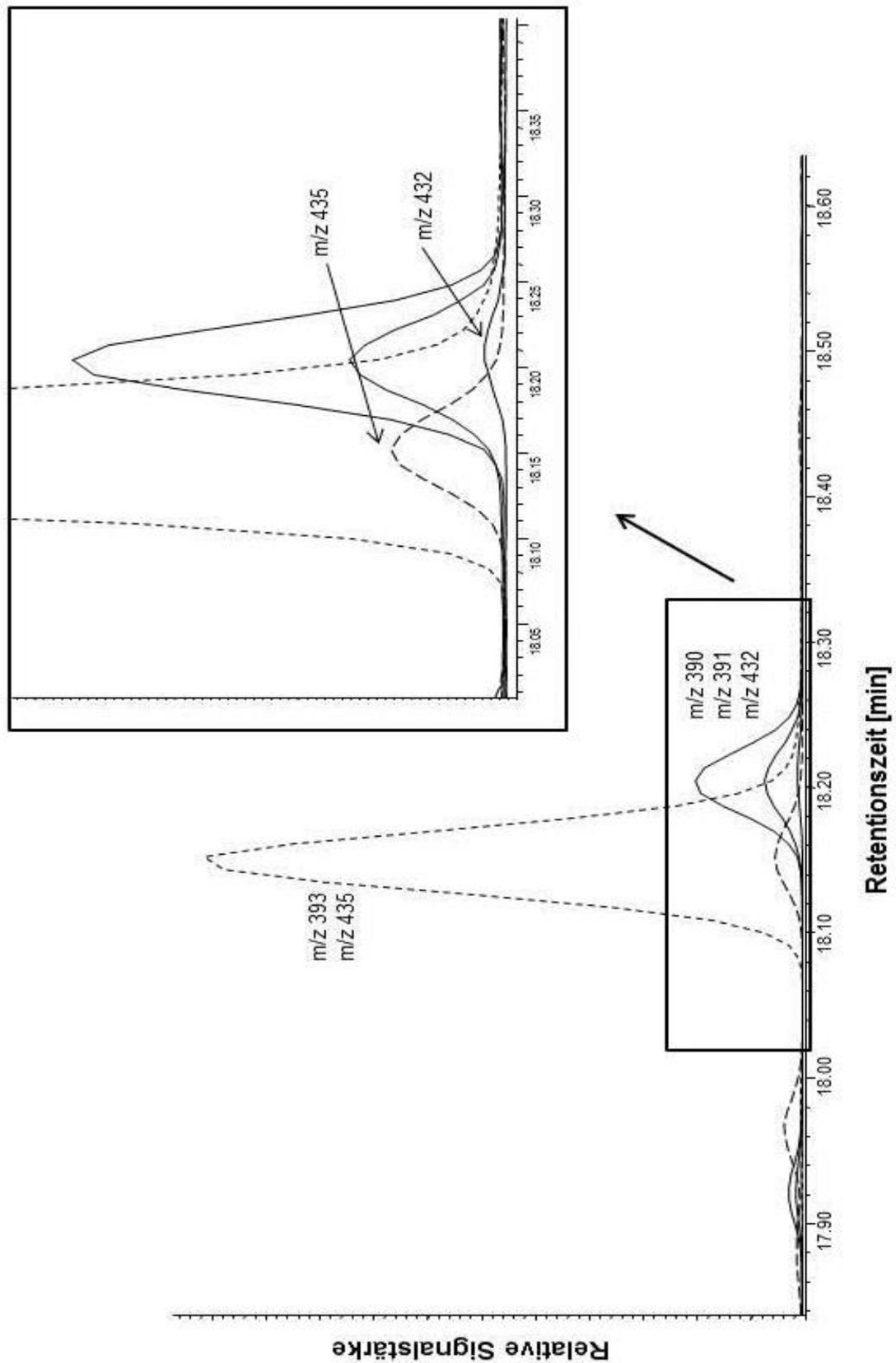


Abb. 12: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe (Kreatinin 0,63 g/L) dotiert mit d_3 -OH-PA (m/z 393 und 435) und einer Analytkonzentration von 18,3 $\mu\text{g/L}$ (m/z 390, 391 und 432).

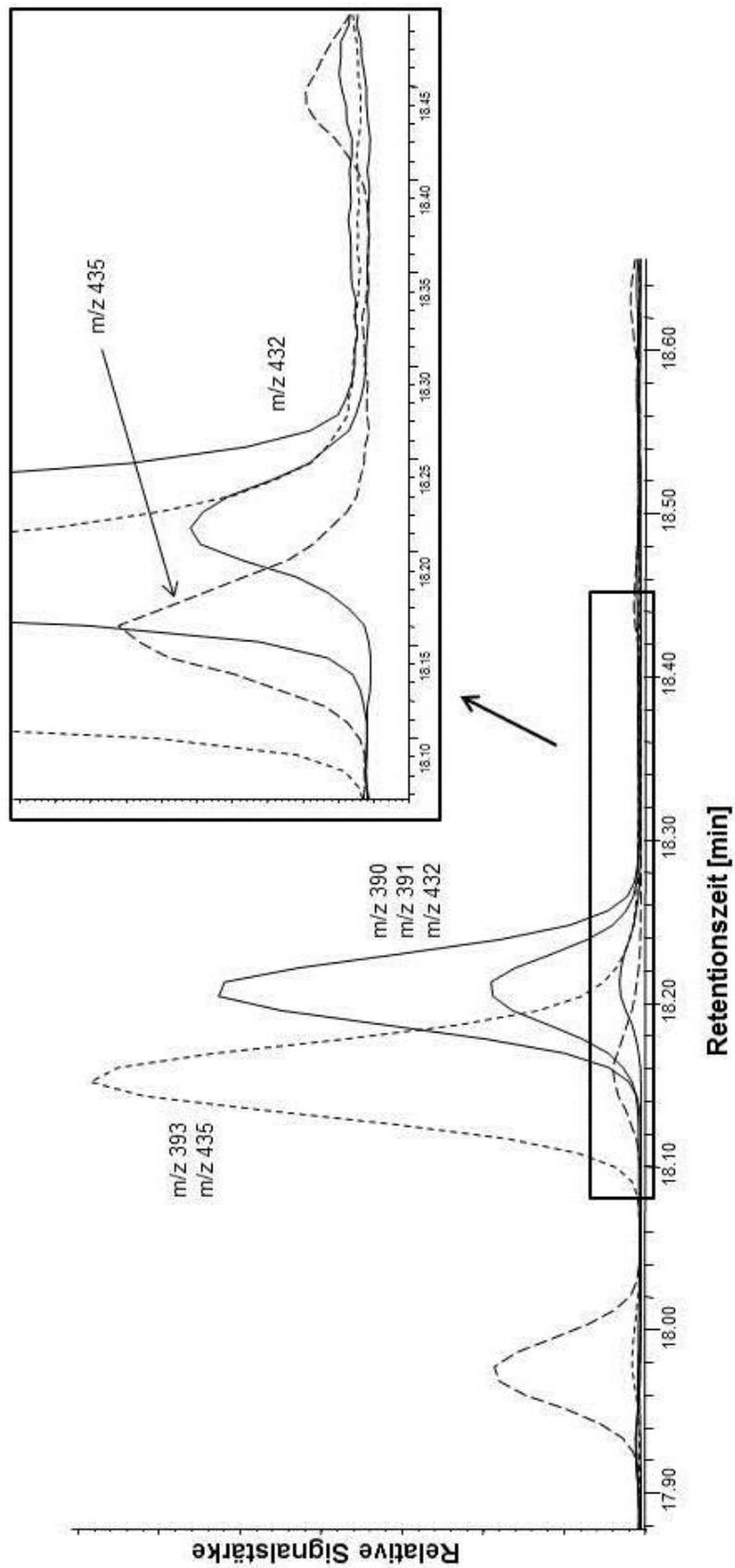


Abb. 13: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe (Kreatinin 1,74 g/L) dotiert mit d_3 -OH-PA (m/z 393 und 435) und einer Analytkonzentration von 77,8 $\mu\text{g/L}$ (m/z 390, 391 und 432).

4.7 Kalibrierung

Es wurden Kalibrationsstandards in Wasser und in Urin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins wurden verschiedene Spontanurinproben von mindestens 3 verschiedenen Nichtrauchern gesammelt und vereinigt.

Der Urin wurde homogenisiert, filtriert und über Nacht bei – 20 °C durchgefroren. Der Prozess (auftauen, filtrieren, einfrieren) wurde mindestens zweimal wiederholt, um Proteine auszufällen und somit eine homogene Matrix zu gewährleisten.

Die Kalibrationspunkte wurden durch Verdünnung der Arbeitslösungen mit Wasser bzw. Urin wie in Tabelle 11 angegeben hergestellt (jeweils in 25 mL Messkolben).

Tabelle 11: Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrationsstandards (OH-PA)

Kalibrationspunkt	Volumen des zugesetzten Standards (µl)		C _{dotiert} (OH-PA) [µg/L]
	AL 1	AL 2	
0	--	--	0
1	400	--	17,2
2	1000	--	43,0
3	--	250	107,5
4	--	400	172,0
5	--	700	301,0

Im Anschluss wurden die Kalibrationsproben analog zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Die Proben wurden in Aliquoten zu 1 mL in 15 mL-Zentrifugenröhrchen bei – 20°C eingefroren und für die einzelnen Aufarbeitungsserien entnommen und aufgetaut.

4.8 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung der OH-PA-Konzentrationen wurden die Konzentrationen der einzelnen Kalibrationsstandards gegen das Verhältnis der Peakflächen von Standard (Std.) zu internem Standard (ISTD) aufgetragen. Aufgrund der Tatsache, dass der eingesetzte Poolurin naturgemäß auch bereits OH-PA enthält, ist der Achsenabschnitt > 0 . Zur Auswertung wurde die erhaltene Kalibrationsgerade parallel durch den Nullpunkt verschoben (die Auswertung erfolgte somit nur über die Steigung der Geraden). Die Steigungen der Kalibrationsgeraden von Wasser und Urin unterschieden sich nicht (siehe Abbildung 14).

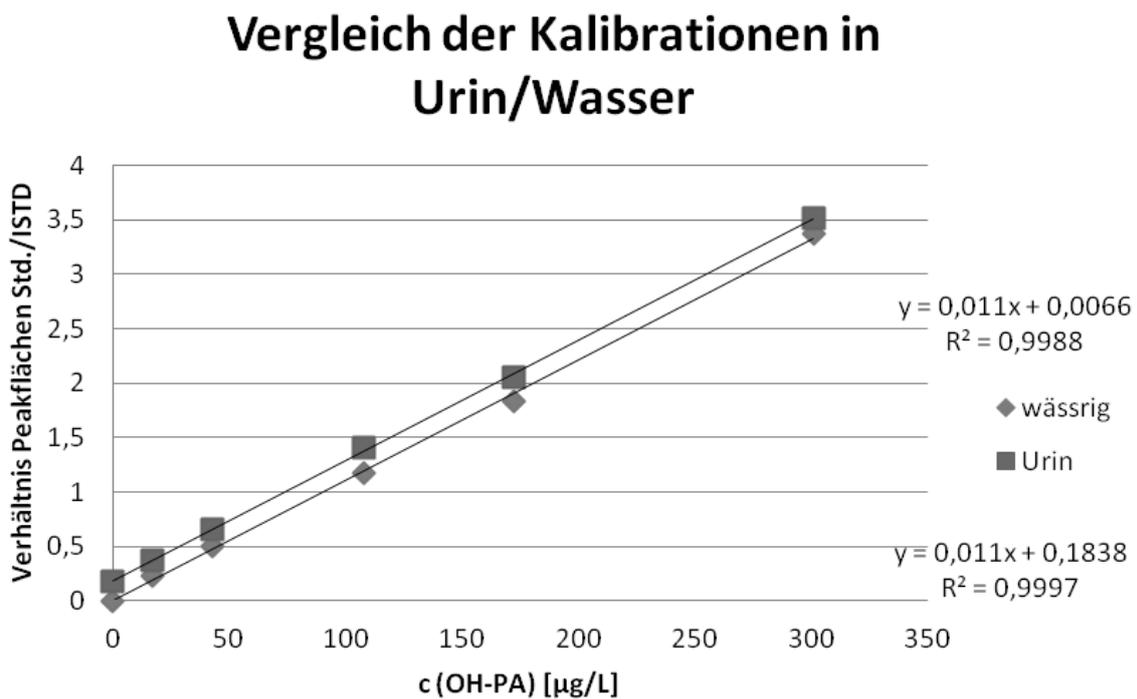


Abb. 14.: Vergleich der OH-PA-Kalibrationen in Wasser und Urin

Die Kalibration kann somit in Wasser wie auch in Urin erfolgen. Jedoch unterlagen die absoluten Peakflächen im Wasser sehr großen Schwankungen (Abweichung beim ISTD > 300 %), welche bei den Urin-Standards nicht auftraten. Eine Erklärung kann die stabilisierende Wirkung der Urinmatrix liefern. Kalibriert wurde aufgrund dieser Schwankungen in Urin statt in Wasser.

4.9 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung wurden zwei Poolurinproben angesetzt. Für die niedrige Q-Probe (Q_{low}) wurden Spontanurinproben dreier Nichtraucher gesammelt und vereinigt. Für die hohe Q-Probe (Q_{high}) wurden Spontanurinproben dreier Raucher gesammelt und vereinigt. Beide Proben wurden analog zum Poolurin zur Herstellung der Kalibrationspunkte dreimal filtriert und dazwischen jeweils eingefroren und aufgetaut, um eine Homogenität zu gewährleisten.

Es wurden folgende Ergebnisse für die Präzisionen in Serie und von Tag zu Tag erreicht:

Tabelle 12: Ergebnisse der Methodvalidierung (Präzision in Serie und von Tag zu Tag) der OH-PA-Bestimmung

Variations- koeffizient V_k	Konzentration c [$\mu\text{g/L}$]	Präzision in Serie [%] ($n = 6$)	Präzision von Tag zu Tag [%] ($n = 6$)
Q_{low}	40	2,66	8,15
Q_{high}	133	3,61	1,94

Angegeben sind die Variationskoeffizienten V_k [%]

Zudem wurden die relative Wiederfindung und die Robustheit der Methode bestimmt. Dazu wurden 8 verschiedene Spontanurine jeweils undotiert, niedrig dotiert (16,7 µg/L) und hoch dotiert (55,8 µg/L) analysiert. Diese Spontanurine wurden verteilt über den gesamten relevanten Kreatininbereich (0,3 – 3,0 g Kreatinin/L Urin) gewählt. Es wurden aufgrund der AA-Belastung 4 Raucher sowie 4 Nichtraucher ausgewählt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Methodvalidierung (relative Wiederfindungen) der OH-PA-Bestimmung

	Native Konzentrationen [µg/L] (8 verschiedene Spontanurine)	Dotierung [µg/L]	Gemessene Dotierung (Wiederfindung absolut) [µg/L] MW ± Standardabweichung (Bereich)	Relative Wiederfindung [%] MW ± Standardabweichung (Bereich)
C _{low}	18,2 – 109,4	16,7	16,3 ± 2,0 (13,9 – 18,9)	97,4 ± 12,0 (82,9 – 113,1)
C _{high}		55,8	56,7 ± 4,9 (50,2 – 62,5)	100,7 ± 8,7 (90,1 – 112,1)

4.10 Störeinflüsse

Bei der Bestimmung von 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) im menschlichen Urin ist die Methodenentwicklung aufgrund der hohen Polarität des Analyten in einer sehr polaren Matrix problematisch.

Insbesondere die Anreicherung bedarf einiger Aufmerksamkeit, da übliche SPE-Materialien, die für viele polare Urinmetaboliten eingesetzt werden (z.B. ENV+, Oasis HLB und andere), OH-PA nicht retardieren. Aus diesem Grund wurde die SPE in einem *Stripping*-Verfahren verwendet, bei dem andere Urinmetaboliten wie die Mercaptursäuren aber auch andere unpolarere Substanzen am Phasenmaterial verbleiben, OH-PA hingegen nicht. Ein Teil der Matrix wird somit durch dieses *Stripping*-Verfahren entfernt.

Die SPE Kartuschen können für das *Stripping*-Verfahren nach einer Reinigungsprozedur (Elution mit 3 mL Acetonitril, 3 mL Methanol und 3 mL Wasser, Trockensaugung und anschließende Trocknung für 5 Stunden bei 65°C im Trockenschrank) aus wirtschaftlichen Gründen mindestens dreimal wieder verwendet werden. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass sich die Struktur des SPE-Phasenmaterials durch den Trocknungsprozess nicht verändert (insbesondere „Klumpen“bildung).

Für den Lyophilisationsprozess sind die Gefäßgröße sowie die Oberfläche der gefrorenen Probe relevant, um ein „Überkochen“ und somit eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Bewährt hat sich hierbei das schräge Einfrieren (ca. 70°) des Eluats (ca. 3 mL) in einem 20 mL Gefäß.

Bei der Derivatisierung ist zu beachten, dass kleinste Rückstände Wasser im Ansatz die Ausbeute stark minimieren, da MTBSTFA mit Wasser hydrolysiert wird. Aus diesem Grund ist vor der Derivatisierungsmittelzugabe bis zur Trockene einzudampfen.

Pyridin hat sich als effizienterer Katalysator als *tert*-Butyl-Dimethylchlorsilan (TBMCS) erwiesen, welcher zu 1 % in einem fertigen Derivatisierungsmittelgemisch (MTBSTFA/TBMCS) enthalten ist. Hierbei sind 10 µL Pyridin ausreichend. Aufgrund der besseren Löslichkeit und einem homogeneren

Reaktionsgemisch, wurden jedoch 50 µL Pyridin hinzugegeben. Eine Stunde Derivatisierungszeit erwies sich in mehreren Vorversuchen als ausreichend; eine weitere Stunde wurde als Sicherheitsfaktor für die Derivatisierung in vielen verschiedenen Urinmatrices gewählt.

Die Aufreinigungsschritte (Hydrolyse des MTBSTFA-Überschusses und Extrahieren der Derivate) nach der Derivatisierung reduzieren gerätetechnische Wartungs- und Reinigungsarbeiten und erhöhen die Robustheit der Methode.

Bei allen Überführungsschritten ist darauf zu achten, dass kein Niederschlag mit überführt wird, da dieser in einem Niederschlag in der Injektionslösung resultieren würde.

4.11 Diskussion der Methode

Es wurde eine robuste, valide Methode zur Bestimmung von 2,3-Dihydroxypropionamid in Urin sowohl für den umwelt- als auch den arbeitsmedizinischen Bereich entwickelt.

Die Probenaufarbeitung dauert 1 ½ Arbeitstage und ist somit noch relativ aufwendig. Aufgrund der Anzahl der SPE-Kartuschen-Plätze und auch der Plätze im Gefriertrockner können maximal 20 Proben inkl. Standards und Qualitätskontrollproben in einer Serie aufgearbeitet werden. Somit verbleiben bei 6 Kalibrationsstandards und 2 Q-Proben 12 Plätze für Proben. In einer Woche können von einer Laborkraft (ganztägig) dementsprechend maximal 36 Proben aufgearbeitet werden (bei Verringerung auf drei Kalibrationspunkte nach der Validierung erhöht sich die Anzahl auf 45 Proben).

Die Nachweisgrenze, definiert als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis – bestimmt in einer sehr niedrig belasteten Fastenprobe (Realurinprobe) – beträgt 1 µg/L. Somit ist die Nachweisgrenze ausreichend, um Urine der Allgemeinbevölkerung zu analysieren (siehe 6.2). Erreicht wurde diese niedrige Nachweisgrenze neben der Aufreinigung über SPE und Flüssig-Extraktion der Lyophilisate durch eine dreifache Silylierung des Analyten. Somit wurden viele potentielle Störsubstanzen, welche sich durch die Aufreinigungsschritte nicht abtrennen lassen und auch mit dem Silylierungsmittel reagieren, ausgeblendet, da sich Masse (bzw. Masse-/Ladungsverhältnis) sowie Siedepunkt der Störderivate von denen der Analyten unterscheiden.

Die Präzisionen in Serie und von Tag zu Tag (je n = 6) sind für zwei verschiedene Konzentrationsbereiche < 10 % (zwischen 2 und 8 %).

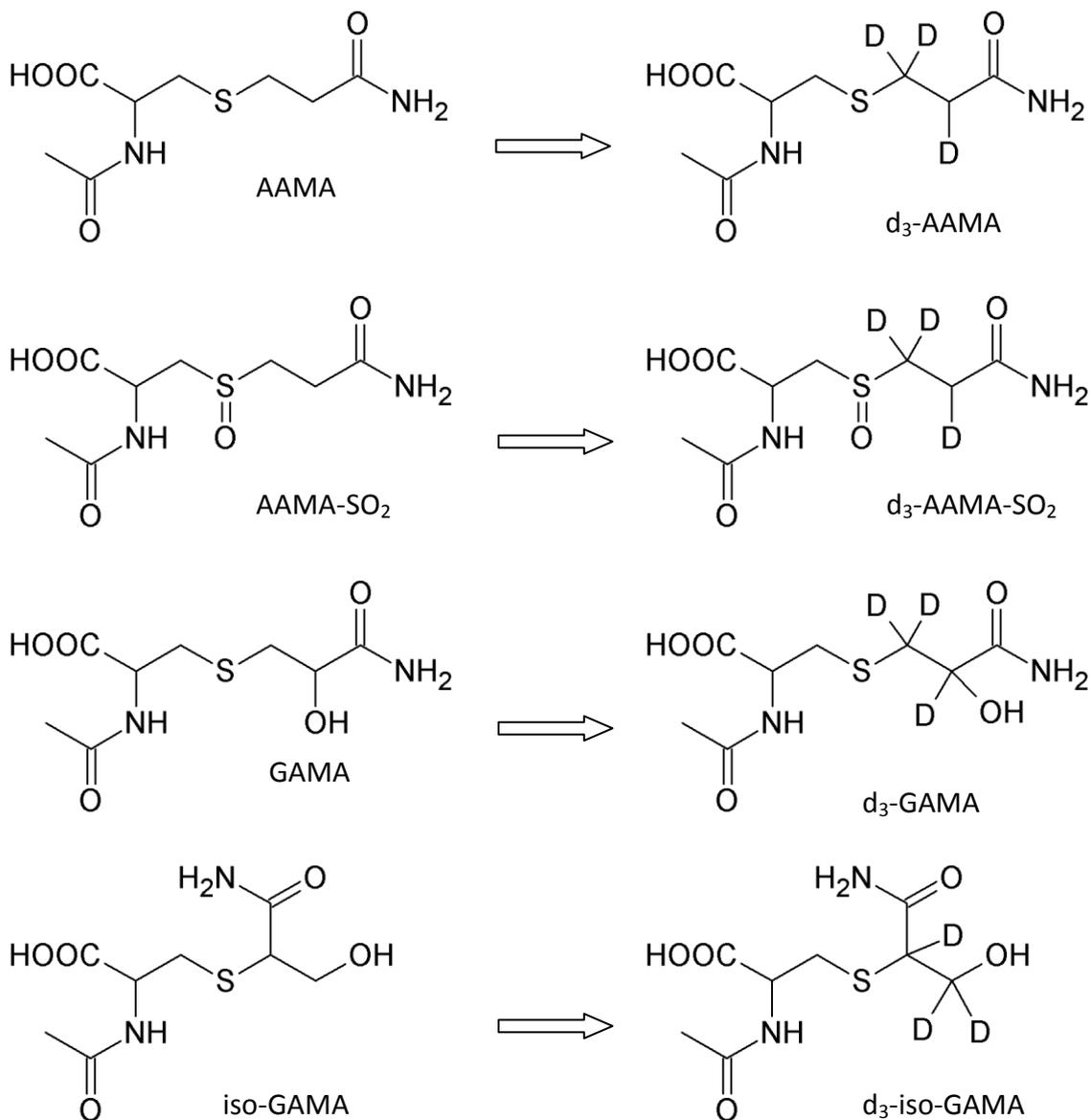
Zur Prüfung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche in Urinen mit unterschiedlichen Kreatiningehalten durchgeführt. 8 Proben (4 Raucher und 4 Nichtraucher mit Kreatiningehalten von 0,3 – 3,0 g/L) wurden ohne und mit Zugabe von OH-PA in zwei verschiedenen Konzentrationen analysiert. Die relative Wiederfindung liegt im Mittel bei 97,4 % für die hohe und bei 100,7 % für die niedrige Dotierung. Die Richtigkeit der Methode ist somit sehr gut.

Die hier präsentierte Methode ist somit eine robuste Analysenmethode mit einer niedrigen Nachweisgrenze und guter Präzision und Richtigkeit.

5 BESTIMMUNG DER OXIDATIV UND REDUKTIV GEBILDETEN MERCAPTURSÄUREN VON ACRYLAMID UND ACRYLNITRIL IM URIN

5.1 Grundlage des Verfahrens

Nach einer Festphasenextraktion wurden die Mercaptursäuren von Acrylamid und Acrylnitril flüssigchromatographisch im HILIC-Modus (siehe Abschnitt 2.4) getrennt und massenspektrometrisch detektiert. Folgende Analyten mit den dazugehörigen internen Standards wurden in dieser Methode eingesetzt:



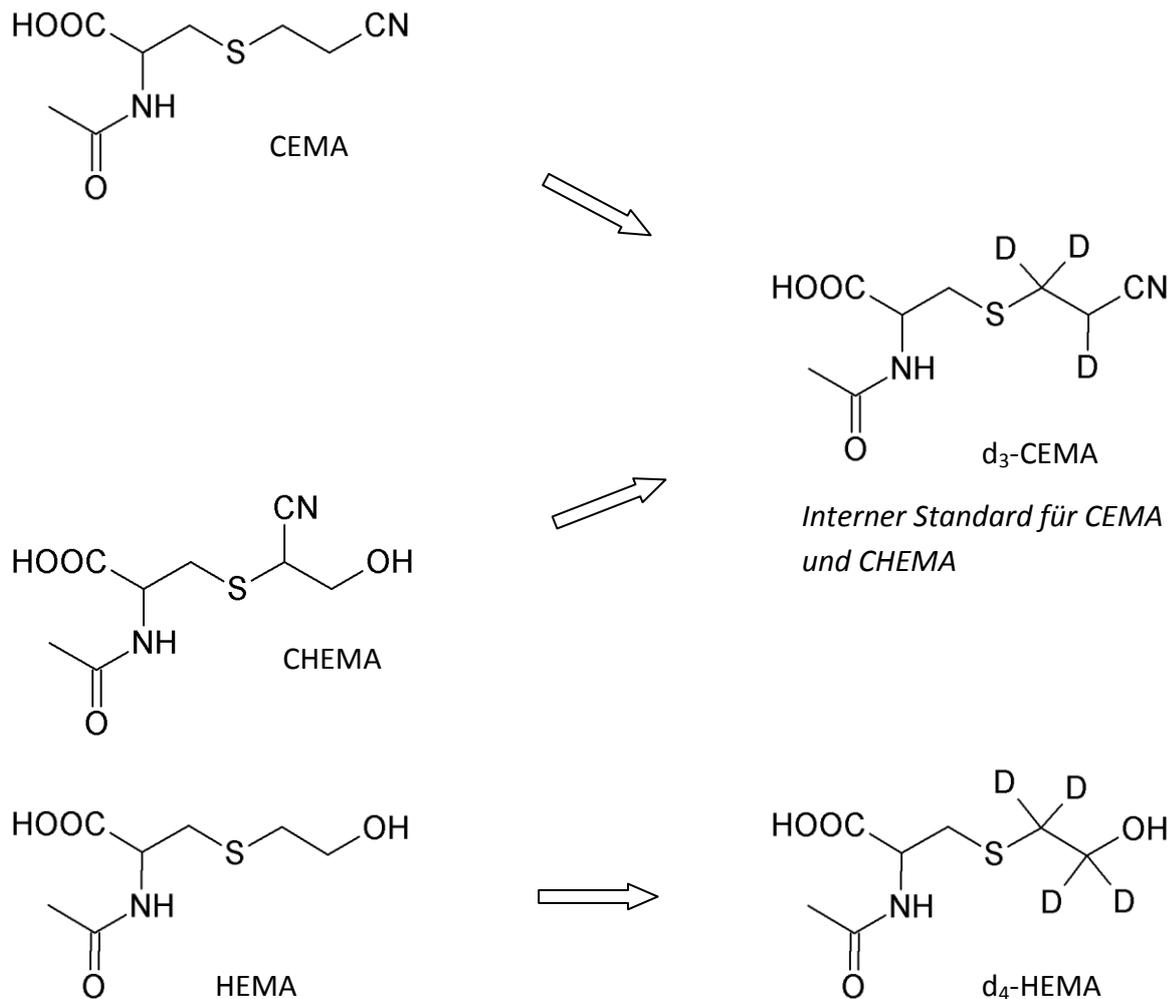


Abb. 15: Strukturen der Analyten und der dazugehörigen isotopenmarkierten internen Standards (ISTD) für die Mercaptursäurenbestimmung (für CHEMA liegt kein eigener ISTD vor)

5.2 Geräte, Chemikalien, Lösungen

5.2.1 Geräte

- 1525 μ binäre Pumpe (Waters, Milford, USA)
- Massenspektrometer Quattro Premier XE (Waters, Milford, USA)
- COMBI PAL System Autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz)
- Inline Filter 0,5 μ Porosity x 3,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, D)

- Kinetex HILIC, 2,6 µm; 150 x 3,00 mm mit HILIC Security Guard Cartridge 2,0 x 4 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, D)
- SPE-Kartuschen Isolute ENV+ 100 mg Sorbens, 3 mL Volumen (Biotage, Uppsala, Schweden)
- SPE Station Chromabond® mit 24 Steckplätzen und dazugehörigen Durchflusshähnen (Macherey Nagel, Düren, D)
- Vakuumzentrifuge RC 10.22. (Jouan, Unterhaching, D)
- Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3L-R) (Kendro Laboratory Products, Osterode, D)
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digital DK 255 P (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D)
- Urinsammelflasche weiß mit schwarzem Schraubverschluss PE 250 mL (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen mit rotem Verschluss (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- Diverse Pipetten und Multipetten (Eppendorff, Hamburg, D)
- 4 mL Schraubdeckelgläser mit dazugehörigem Deckel (VWR, Darmstadt, D)
- 1,8 mL Schraubdeckelgläser N9 mit farblosen Schraubdeckeln (Macherey Nagel, Düren, D)
- Verschiedene pH-Wert-Stäbchen, für pH Bereiche 2,5 und 3,2 (Macherey Nagel, Düren, D)

5.2.2 Chemikalien

- *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein (AAMA) Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein- d_3 (d_3 -AAMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein-sulfoxid (AAMA-SO₂): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein-sulfoxid- d_3 (d_3 -AAMA-SO₂): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Hydroxy-2-Carbamoylethyl)-cystein (GAMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Hydroxy-2-Carbamoylethyl)-cystein- d_3 (d_3 -GAMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(1-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein (Iso-GAMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(1-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein- d_3 (d_3 -iso-GAMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-*S*-(2-Hydroxyethyl)-cystein (HEMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)

- *N*-Acetyl-S-(2-Hydroxyethyl)-cystein-d₄ (d₄-HEMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein (CEMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- *N*-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-cystein-d₃ (d₃-CEMA): TRC Chemicals (North York, Ontario, Canada)
- *N*-Acetyl-S-(1-Cyano-2-Hydroxyethyl)-cystein (CHEMA): Synthese durch Dr. Belov (Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, D)
- Acetonitril getrocknet (<0,005% Wasser) SeccoSolv® (VWR, Darmstadt, D)
- Acetonitril LC-MS grade (VWR, Darmstadt, D)
- Methanol zur Analyse (VWR, Darmstadt, D)
- Millipore Wasser (Millipore Anlage) VE-Wasser, Millipore Anlage Milli-Q Advantage A 10 (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Ameisensäure 98-100 % zur Analyse (VWR, Darmstadt, D)
- Ammoniumformiat zur Analyse (VWR, Darmstadt, D)

5.3 Lösungen

50 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 2,5 (Probenpuffer): In einen 1 L Messkolben wurden mit Hilfe eines Wägeschiffchens 3,15 g Ammoniumformiat eingewogen. Nach Zugabe von 300 mL deionisiertem Wasser wurde das Ammoniumformiat gelöst und der Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt. Nach Umfüllen der Lösung in eine Schott-Duran-Schraubflasche wurde mit Hilfe der Ameisensäure der pH-Wert auf pH 2,5 eingestellt (ca. 2,5 mL Ameisensäure nötig). Die Ameisensäure wurde

tropfenweise hinzugegeben und nach dem Durchmischen der pH-Wert mit Hilfe von verschiedenen pH-Stäbchen überprüft.

0,1 % Ameisensäure: In einen 200 mL Messkolben wurden ca. 100 mL deionisiertes Wasser vorgelegt. Nach Zugabe von 0,2 mL 98%-iger Ameisensäure wurde der Kolben mit deionisiertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

1% Ameisensäure in Methanol: In einen 100 mL Messkolben wurden 50 mL Methanol vorgelegt. Es wurde 1 mL 98%-ige Ameisensäure hinzu pipettiert und der Messkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.

100 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 3,2 (Eluentpuffer): In einen 1 L Messkolben wurden mit Hilfe eines Wägeschiffchens 6,3 g Ammoniumformiat eingewogen. Nach Zugabe von 300 mL deionisiertem Wasser wurde das Ammoniumformiat gelöst und der Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt. Nach Umfüllen der Lösung in eine Schott-Duran-Schraubflasche wurde mit Hilfe der Ameisensäure der pH-Wert auf pH 3,2 eingestellt (ca. 1 mL Ameisensäure nötig). Die Ameisensäure wurde tropfenweise hinzugegeben und nach dem Durchmischen der pH-Wert mit Hilfe von verschiedenen pH-Stäbchen überprüft.

Stammlösungen Standards und Interne Standards: Ca. 10 mg der jeweiligen Merkaptursäure wurden je in einen 10 mL Messkolben genau eingewogen (siehe Tabellen 14 und 15). Die Kolben wurden mit Acetonitril Seccosolv aufgefüllt. Da sich die Merkaptursäuren in reinem Acetonitril schlecht lösten,

wurde ein kleiner Anteil Methanol (ca. 30 µL) hinzugefügt. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen beträgt jeweils 1 g/L.

Arbeitslösungen: Die Stammlösungen wurden 1:10 und 1:100 verdünnt. Somit wurden zwei Arbeitslösungen mit allen Analyten mit Konzentrationen von 100 mg/L und 10 mg/L hergestellt. Dafür wurden 1 mL bzw. 100 µL der entsprechenden Stammlösungen in einen 10 mL Messkolben pipettiert und mit Acetonitril Seccosolv bis zum Eichstrich aufgefüllt. Die genauen Konzentrationen sind in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen für die Mercaptursäuren-Bestimmung

Analyt	Einwaage [mg]	Konzentration Stammlsg. [mg/L]	Konzentration Arbeitslösung 1 (AL 1) [mg/L]	Konzentration Arbeitslösung 2 (AL 2) [mg/L]
AAMA	10,55	1055	105,5	10,55
AAMA-SO ₂	10,11	1011	101,1	10,11
GAMA	13,79	1379	137,9	13,79
Iso-GAMA	9,34	934	93,4	9,34
CEMA	10,28	1028	102,8	10,28
CHEMA	9,66	966	96,6	9,96
HEMA	7,78	778	77,8	7,78

Arbeitslösungen Interner Standard: Analog zu den Standardlösungen wurden je 10 mg des jeweiligen internen Standards in je einen 10 mL Messkolben eingewogen. Tabelle 15 zeigt die weiteren Verdünnungsschritte. Für die Arbeitslösung des internen Standards (AL ISTD) wurden je 200 µL der 10 mg/L

Lösungen in einen 20 mL Kolben pipettiert und dieser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung der Internen Standardlösung (ISTD) für die Merkaptursäuren-Bestimmung

Analyt	Einwaage [mg]	Konzentration Stammlsg. [mg/L]	Volumen der Stammlösung für die Arbeitslösung ISTD in einem 20 mL Messkolben [μ L]	Konzentration Arbeitslösung ISTD (AL ISTD) [mg/L]
d ₃ -AAMA	10,16	1016	200	10,16
d ₃ -AAMA-SO ₂	10,71	1071	200	10,71
d ₃ -GAMA	7,90	790	200	7,90
d ₃ -Iso-GAMA	9,34	934	200	9,34
d ₃ -CEMA	10,00	1000	200	10,00
d ₄ -HEMA	16,35	1635	200	16,35

20 μ L dieser AL ISTD wurden zu 2 mL der Urinprobe pipettiert. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 50 μ g ISTD/L Urin.

5.3.1 Haltbarkeit der Lösungen und Vergleichsstandards

Die Vergleichsstandards sowie die Lösungen für die Festphasenextraktion sind bei – 20 °C mindestens 12 Monate lagerfähig. Die beiden Puffer (Probenpuffer und Eluentpuffer) sind bei +4°C mindestens eine Woche haltbar.

5.4 Probenahme und Probenaufbereitung

5.4.1 Probenahme

Bei allen gesammelten Urinproben handelt es sich um Spontanurinproben. Diese wurden von den Probanden direkt in 250 mL PE- Urinsammelflaschen abgegeben und bis zur Analyse bei – 20°C gelagert.

5.4.2 Aufarbeitungen

Die Urinproben wurden auf Raumtemperatur gebracht und homogenisiert. 2 mL der Urinproben wurden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 2 mL Probenpuffer, 40 µL Ameisensäure und 40 µL der ISTD-Arbeitslösung (10 mg/L) wurde die Probe auf dem Vortexer homogenisiert.

Die ENV+ SPE Kartusche wurde mit 2 x 2 mL Methanol und 2 mL 0,1 %-iger Ameisensäure konditioniert. Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von max. 1 mL/min aufgegeben (Tropfgeschwindigkeit über die Hähne eingestellt).

Es wurde mit 2 x 500 µL 0,1 %-iger Ameisensäure gewaschen und die SPE-Kartuschen mittels Vakuum getrocknet (ca. 2 min).

Eluiert wurde mit 4 x 450 µL 1 % Ameisensäure in Methanol in ein 1,8 mL LC Vial. Zur Entfernung des Methanols wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge auf ca. 10 – 20 µL eingeeengt. Der Rückstand wurde in 250 µL Acetonitril gelöst. Hierzu wurden die Proben wenige Sekunden im Ultraschallbad homogenisiert. Die trüben Lösungen wurden zentrifugiert (10 min bei 2000 g), der Überstand in ein neues LC-Vial überführt und die Extrakte mittels LC-MS/MS vermessen.

5.5 Flüssigchromatographisch-massenspektrometrische Arbeitsbedingungen

Inline-Filter: 0,5 µm x 3,0mm (Phenomenex)

Vorsäule: HILIC Security Guard Cartridge 2,0 x 4 mm (Phenomenex)

Analytische Säule: Kinetex HILIC 150 x 3,0 mm; 2,6 µm (Phenomenex)

Eluent A: ACN/Wasser/Eluentpuffer 90/5/5

Eluent B: ACN/Wasser/Eluentpuffer 50/45/5

Tabelle 16: Gradient der HILIC-Methode zur Mercaptursäurenbestimmung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	ACN [%]
0,0	85	15	84
10,0	85	15	84
10,1	0	100	50
14,0	0	100	50
14,5	85	15	84
20,0	85	15	84

Gesamtdauer: 20 min

Injektion: 30 µL

Ionisierung: Elektrosprayionisation (ESI)

Detektion: Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Aufnahme: Scheduled MRM

Desolvationsgasfluss: 700 L/h

'Cone gas'-Fluss: 100 L/h

Quelltemperatur: 120 °C
 Desolvationstemperatur : 300 °C
 Dwell time: 250 ms (je Quantifizierübergang)
 100 ms (je Qualifizierübergang)

5.6 Analytische Bestimmung

30 µL der aufgearbeiteten Probe wurden in das LC-MS/MS System injiziert. Die Analyten wurden anhand ihrer selektiven Fragmentierungen sowie ihrer Retentionszeit identifiziert (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über die Retentionszeiten und selektiven Massenübergänge der Analyten und der Kollisionsenergien sowie Cone-Spannung (Merkaptursäuren)

Analyt	Reten- tionszeit [min]	Übergang <i>m/z</i>	Cone Spannung [V]	Kollisionsenergie CE [V]
AAMA	9,4	233 → 104*	-30	-14
		233 → 162		-10
d ₃ -AAMA	9,4	236 → 107*	-30	-14
		236 → 162		-10
AAMA- SO ₂	14,3	249 → 116*	-30	-14
		249 → 178		-10
		249 → 120		-12
d ₃ -AAMA- SO ₂	14,3	252 → 116*	-30	-14
		252 → 178		-10
		252 → 123		-12
GAMA	8,8	249 → 120*	-30	-14
		249 → 128		-10
d ₃ -GAMA	8,8	252 → 123*	-30	-14
		252 → 128		-10

Fortsetzung Tabelle 17: Übersicht über die Retentionszeiten und selektiven Massenübergänge der Analyten und der Kollisionsenergien sowie Cone-Spannung (Merkaptursäuren)

Analyt	Retentionszeit [min]	Übergang m/z	Cone Spannung [V]	Kollisionsenergie CE [V]
Iso-GAMA	9,4	249 → 90*	-28	-24
		249 → 73		-34
		249 → 120		-16
d ₃ -Iso-GAMA	9,4	252 → 91*	-28	-24
		252 → 74		-34
		252 → 123		-16
CEMA	5,4	215 → 86*	-22	-12
		215 → 162		-10
d ₃ -CEMA	5,4	218 → 86*	-22	-12
		218 → 165		-10
CHEMA	5,4	231 → 84*	-20	-10
		231 → 102		-14
HEMA	7,4	206 → 77*	-26	-12
		206 → 128		-10
d ₄ -HEMA	7,5	210 → 81*	-28	-12
		210 → 84		-20

*Quantifierspur

Abbildung 16 zeigt exemplarisch für AAMA die Quantifier- und Qualifierübergänge eines aufgearbeiteten Standards in Poolurin (die restlichen MRM-Übergänge befinden sich im Anhang). Abbildung 17 zeigt ein Chromatogramm einer aufgearbeiteten Raucherurinprobe (nur Quantifierspuren der Analyten) mit den jeweiligen Analytkonzentrationen.

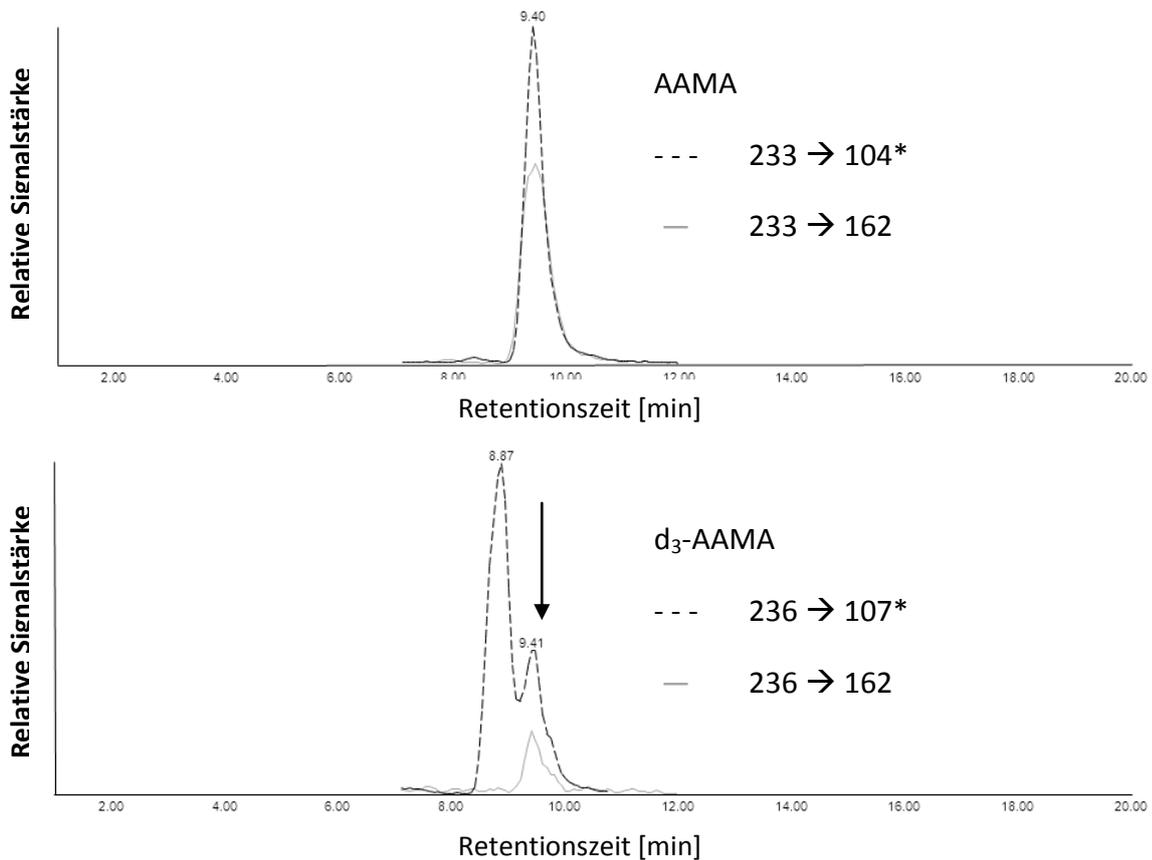


Abb. 16: Einzelne MRM-Spuren einer aufgearbeiteten Standardlösung beispielhaft gezeigt für AAMA ($c = 100 \mu\text{g/L}$) in Poolurin für die Mercaptursäureanalytik (restliche MRM-Spuren im Anhang Seite 169).

Bei dem Peak bei $t = 8,87 \text{ min}$ handelt es sich um einen Störpeak, welcher unter den chromatographischen Bedingungen nicht weiter vom Analytpeak abzutrennen war. Bei der Validierung jedoch zeigte dieser Peak keinen Einfluss auf die Validität der Methode (die Validierung wurde sowohl über die Quantifier- als auch die schwächere Qualifierspur ausgewertet. Zudem wurde in allen Analysen das Peakflächenverhältnis von Quantifier zu Qualifier gebildet um einen störenden Untergrund auszuschließen.).

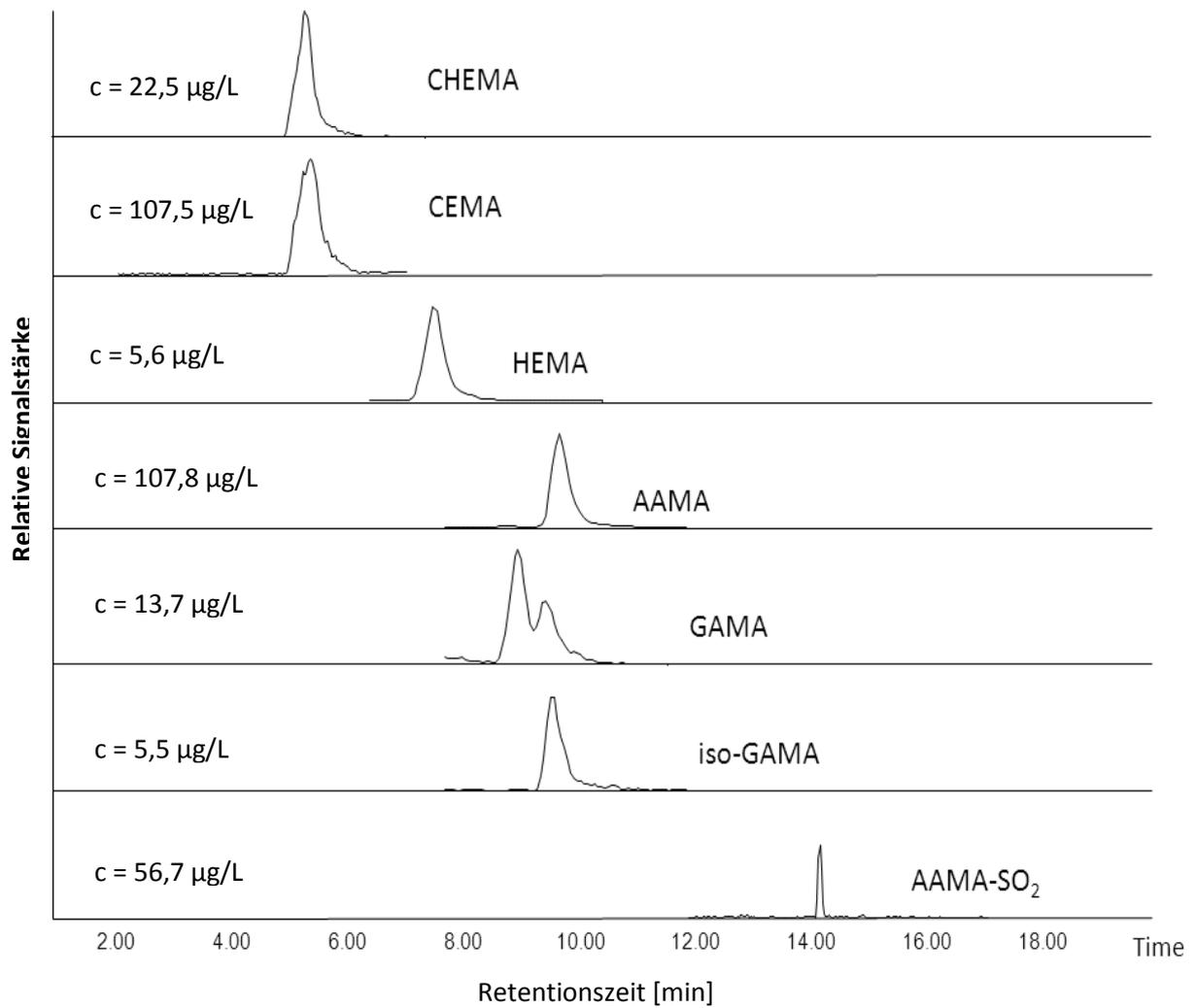


Abb. 17: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe (Kreatinin 0,85 g/L) mit den eingetragenen Analytkonzentrationen, der vordere der beide Peaks in der GAMA-Spur ist GAMA, der hintere Peak ist iso-GAMA

5.7 Kalibrierung

Es wurden Kalibrationsstandards in Wasser und in Urin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins wurden verschiedene Spontanurinproben von mindestens 3 verschiedenen Nichtrauchern gesammelt und vereinigt.

Der Urin wurde homogenisiert, filtriert und über Nacht bei -20 °C durchgefroren. Der Prozess (auftauen, filtrieren, einfrieren) wurde mindestens zweimal wiederholt, um Proteine auszufällen und somit eine homogene Matrix zu gewährleisten.

Die Kalibrationsproben wurden durch Verdünnung der Arbeitslösungen mit Wasser bzw. Urin wie in Tabelle 18 angegeben hergestellt (jeweils in 25 mL Messkolben). Hierfür wurden zwei Mixlösungen angesetzt (je 100 μL der AL 1 (100 mg/L) in einen 10 mL Messkolben (Mix I = 1 mg/L) und je 1 mL der AL 1 (100 mg/L) ebenfalls in einen 10 mL Messkolben (Mix II = 10 mg/L) und beide Messkolben wurden mit Acetonitril bis zum Eichstrich aufgefüllt).

Es wurden folgende Kalibrationsstandards hergestellt:

Tabelle 18: Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrationsstandards für die Mercaptursäurenbestimmung

Kalibrations- punkt	Volumen des zugesetzten Standards (µL) in 50 mL Wasser bzw. Urin		Konzentration des Kalibrierstandards (µg Mercaptursäure/L Urin bzw. Wasser)
	Mix I (1 mg/L)	Mix II (10 mg/L)	
0	--	--	0
1*	12,5	--	0,25
2*	25	--	0,5
3	50	--	1
4	125	--	2,5
5	250	--	5
6	500	--	10
7	--	125	25
8	--	250	50
9	--	500	100
10	--	1250	250
11	--	2500	500

**die Standards wurden nur zur Bestimmung der Nachweisgrenzen benötigt*

Daraus resultierten folgende Konzentrationen der einzelnen Analyten in den einzelnen Standardlösungen:

Tabelle 19: Übersicht über die realen bzw. dotierten Konzentrationen der Mercaptursäurenstandards in Wasser und in Urin

[µg/L]	0,25	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100	250	500
AAMA	0,26	0,53	1,06	2,64	5,28	10,55	26,375	52,75	105,5	263,75	527,50
AAMA- SO ₂	0,25	0,51	1,01	2,53	5,06	10,11	25,275	50,55	101,1	252,75	505,50
GAMA	0,35	0,69	1,38	3,45	6,90	13,79	34,475	68,95	137,9	344,75	689,50
ISO- GAMA	0,23	0,47	0,93	2,34	4,67	9,34	23,35	46,7	93,4	233,50	467,00
CEMA	0,26	0,51	1,03	2,57	5,14	10,28	25,7	51,4	102,8	257,00	514,00
CHEMA	0,24	0,48	0,97	2,42	4,83	9,66	24,15	48,3	96,6	241,50	483,00
HEMA	0,20	0,39	0,78	1,95	3,89	7,78	19,45	38,9	77,8	194,50	389,00

Im Anschluss wurden die Kalibrationsstandards analog zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Die Proben wurden in Aliquoten zu je 2 mL in 15 mL-Zentrifugenröhrchen bei – 20° C eingefroren und für die einzelnen Aufarbeitungsserien entnommen und aufgetaut.

5.8 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Berechnung der Merkaptursäuren-Konzentrationen wurden die Konzentrationen der einzelnen Kalibrationsstandards gegen das Verhältnis der Peakflächen von Standard (Std.) zu internem Standard (ISTD) aufgetragen. Aufgrund der Tatsache, dass der eingesetzte Poolurin naturgemäß auch bereits einige der Merkaptursäuren (im eingesetzten Nichtraucherpoolurin AAMA und AAMA-SO₂; siehe Anlage Kalibrationsgeraden) enthält, ist der Achsenabschnitt teilweise > 0. Zur Auswertung wurde die erhaltene Kalibrationsgerade parallel durch den Nullpunkt verschoben (die Auswertung erfolgt somit nur über die Steigung der Geraden).

Die Steigungen der Kalibrationsgeraden in Wasser und Urin unterschieden sich nicht, außer im Falle von CHEMA (für das kein eigener isotopenmarkierter ISTD vorliegt) (Abb. 18). Dies deutet auf eine Ionensuppression hin. D₃-CEMA eignet sich als interner Standard für CHEMA, aufgrund ähnlicher Struktur und ähnlicher Retentionszeit. Die Auswertung für CHEMA erfolgte somit über d₃-CEMA als ISTD und in Urin (siehe Abb. 19).

Die anderen Kalibrierfunktionen sehen analog zu Abbildung 19 aus (siehe Anlage). Es konnte kein Unterschied zwischen Kalibration in Wasser und in Urin festgestellt werden.

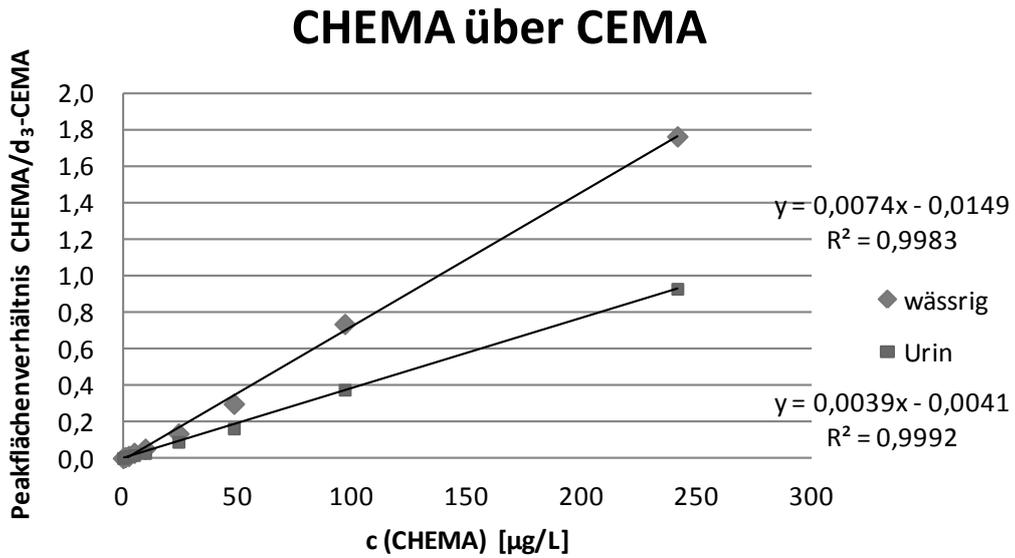


Abb. 18: Vergleich der Kalibrationen in Wasser und Urin für CHEMA (ausgewertet über d₃-CEMA als internen Standard)

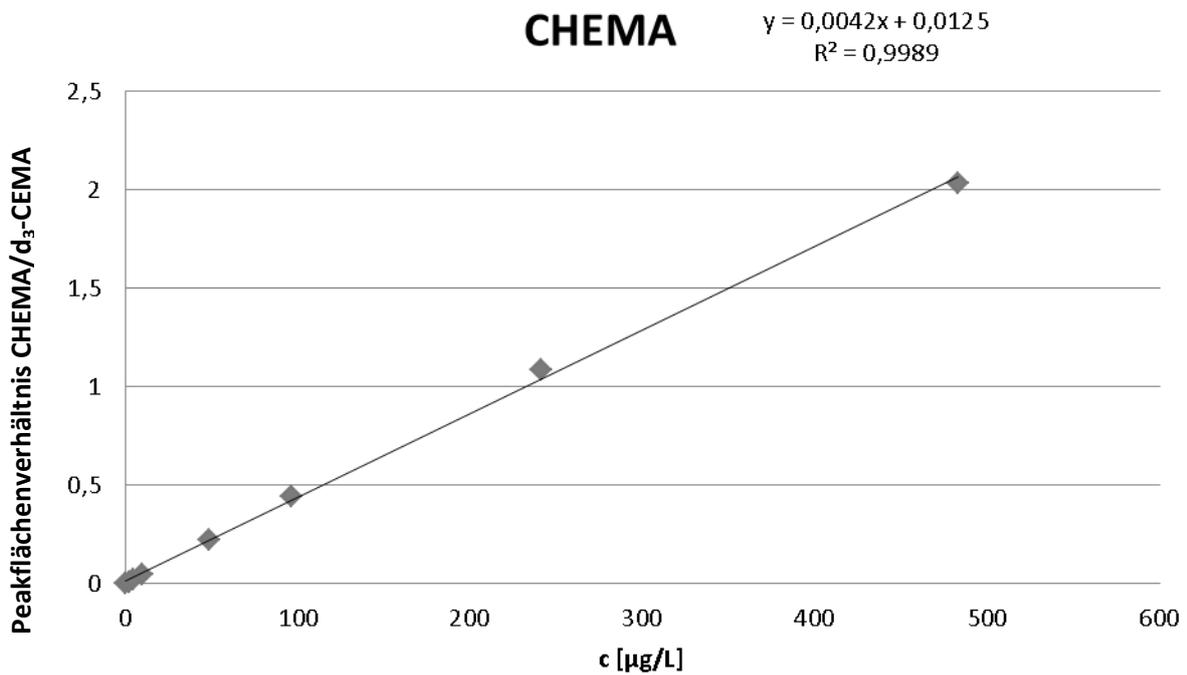


Abb. 19: Kalibrierfunktion von CHEMA (Kalibrationsstandards in Poolurin; Auswertung über d₃-CEMA als ISTD)

5.9 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung wurden zwei Poolurinproben angesetzt. Für die niedrige Q-Probe (Q_{low}) wurden Spontanurinproben dreier Nichtraucher gesammelt und vereinigt. Für die hohe Q-Probe (Q_{high}) wurden Spontanurinproben dreier Raucher gesammelt und vereinigt. Beide Q-Proben wurden analog zum Poolurin zur Herstellung der Kalibrationspunkte dreimal filtriert und dazwischen jeweils eingefroren und aufgetaut, um eine Homogenität zu gewährleisten. Um realistische Qualitätssicherungsproben für die Validierung auch in dem hohen Konzentrationsbereich starker Raucher oder beruflich belasteter Personen zu erhalten, wurden die Proben (nach Vermessung) mit den Acrylnitrilmerkaptursäuren CEMA, CHEMA und HEMA dotiert.

Zur Bestimmung der Präzision in Serie wurden beide Proben 8 mal in Serie analysiert. Für die Präzision von Tag zu Tag wurden an 8 verschiedenen Tagen beide Proben aufgearbeitet und analysiert.

Zudem wurden die relative Wiederfindung und die Robustheit der Methode bestimmt. Dazu wurden 8 verschiedene Spontanurine, jeweils undotiert, niedrig dotiert (ca. 20 $\mu\text{g/L}$) und hoch dotiert (ca. 100 $\mu\text{g/L}$) analysiert. Diese Spontanurine wurden verteilt über den gesamten relevanten Kreatininbereich (0,3 – 3,0 g Kreatinin/L Urin) – analog zur Validierung der OH-PA-Methode – gewählt.

Die Validierungsdaten sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Zudem sind in Tabelle 20 die Nachweisgrenzen, definiert als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis in Urinproben, angegeben.

Tabelle 20: Ergebnisse der Methodvalidierung (Präzision in Serie und von Tag zu Tag und relative Wiederfindungen) der Merkaptursäuren-Bestimmung

	NWG [µg/L]	Präzision in Serie [%] (n = 8)		Präzision von Tag zu Tag [%] (n = 8)		Mittlere relative Wiederfindung ± Standardabweichung [%] (Bereich der mittleren relativen Wiederfindungen)	
		Q _{high}	Q _{low}	Q _{high}	Q _{low}	C _{high} ca. 100 µg/L	C _{low} ca. 20 µg/L
AAMA	1,0	1,9	3,1	6,9	7,0	99 ± 12 (89-116)	100 ± 7 (89-110)
AAMA- SO ₂	5,0	9,3	9,6	4,4	12,4	95 ± 12 (82-118)	106 ± 9 (89-119)
GAMA	5,0	11,0	7,6	7,2	8,1	95 ± 9 (88-107)	105 ± 9 (90-120)
Iso- GAMA	2,5	4,0	2,7	6,0	11,8	86 ± 8 (80-97)	106 ± 7 (96-119)
CEMA	1,0	1,9	2,3	2,3	2,7	100 ± 3 (95-106)	98 ± 5 (91-107)
CHEMA	1,0	4,6	2,8	6,6	4,3	94 ± 9 (84-109)	120 ± 13 (102-136)
HEMA	1,0	3,6	8,5	8,7	8,6	92 ± 5 (84-102)	98 ± 10 (86-115)

NWG = Nachweisgrenze

5.10 Störeinflüsse

Im ersten Schritt erfolgte eine Aufreinigung der Merkaptursäuren durch eine Festphasenextraktion. Andere Verfahren wie Lyophilisation und anschließende Extraktion, sowie eine Online-Anreicherung mit verschiedenen Phasenmaterialien haben keine oder keine hinreichende Aufreinigung gezeigt.

Die Isomere GAMA und iso-GAMA (und AAMA-SO₂) teilen sich die Übergänge von m/z 249 \rightarrow 128 und m/z 249 \rightarrow 120 (die deuterierten Standards dementsprechend analog). Iso-GAMA weist zwei selektive Massenübergänge auf, GAMA jedoch hat keinen selektiven Zerfall. Somit mussten beide Isomere in der chromatographischen Methode getrennt werden. Auf verschiedenen RP-Phasen (C8, C18, Phenyl-Hexyl) konnte keine hinreichende Trennung erreicht werden. Zudem war die Sensitivität im RP-Modus im Vergleich zum HILIC-Modus geringer.

AAMA-SO₂ weist zum einen selektive Zerfälle auf und ist im HILIC Modus auf der gewählten Phase mit 14,3 min hinreichend weit entfernt von den beiden Isomeren mit 8,8 und 9,3 min. Eine unbeabsichtigte Bestimmung der drei Mercaptursäuren in Summe ist somit ausgeschlossen.

Von Nutzern, die bereits Versuche mit HILIC-Phasen durchgeführt haben, wurde über Retentionszeitschwankungen insbesondere bei Läufen an verschiedenen Arbeitstagen berichtet. Dies konnte in dem hiesigen System nicht beobachtet werden. Der Ammoniumformiatpuffer wurde wöchentlich neu angesetzt und die Eluenten wöchentlich neu vorgemischt.

Beschreibungen für Aufarbeitungen, nach denen nach einer SPE direkt im organischen Modifier im HILIC Modus injiziert und gemessen werden kann, konnten für diese Analyten nicht umgesetzt werden [171,173]. Vergleicht man die Chromatogramme von Injektionen einer Standardlösung in Wasser, ACN und MeOH (Abb. 20) wird ersichtlich, dass die Injektion der aufgearbeiteten Probe in ACN erfolgen muss, da mit Methanol als organischem Modifier Doppelpeaks bei allen Analyten beobachtet wurden (in Abb. 20 exemplarisch für AAMA und GAMA gezeigt).

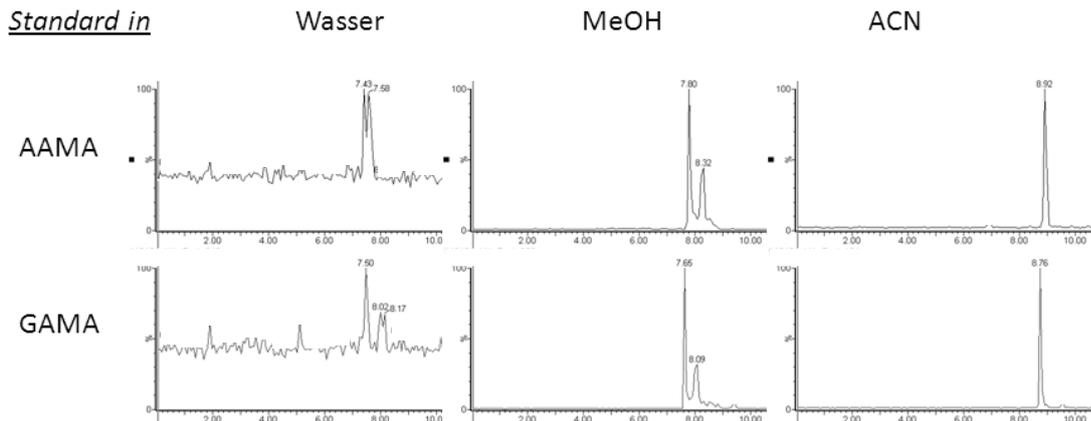


Abb. 20: Vergleichschromatogramme von Standardlösungen (100 µg/L) von AAMA und GAMA in Wasser, Methanol und Acetonitril

Die SPE hingegen konnte nicht mit ACN als organischem Modifier durchgeführt werden, da mehr Matrix von der SPE eluiert wurde. Dies wurde durch ein erhöhtes Grundrauschen im Chromatogramm sichtbar.

5.11 Diskussion der Methode

Es wurde eine valide und robuste Methode zur Bestimmung polarer Mercaptursäuren von Acrylamid und Acrylnitril im menschlichen Urin entwickelt.

Aufgrund der Anzahl der SPE-Kartuschen-Plätze können maximal 20 Proben inkl. Standards und Qualitätskontrollproben in einer Serie aufgearbeitet werden. Somit verbleiben bei 6 Kalibrationsstandards und 2 Q-Proben 12 Plätze für Proben. In einer Woche können von einer Laborkraft (ganztägig) dementsprechend maximal 36 Proben aufgearbeitet werden (bei Verringerung auf drei Kalibrationspunkte nach der Validierung erhöht sich die Anzahl auf 45 Proben).

Die Nachweisgrenzen (NWG) für die Merkaptursäuren liegen zwischen 1,0 und 5,0 µg/L. Somit sind die Nachweisgrenzen ausreichend, um Urine der Allgemeinbevölkerung zu analysieren (siehe 6.2). Die Präzisionen in Serie und von Tag zu Tag liegen größtenteils bei < 10%. Bei der GAMA-, iso-GAMA- und AAMA-SO₂-Bestimmung sind einzelne Werte >10 %. Jedoch ist für GAMA auch kein eigener selektiver Zerfall und die Retentionszeit sehr nah an iso-GAMA. Iso-GAMA selbst hat zwei selektive Zerfälle, jedoch gibt es Matrixstörungen auf der Quantifierspur (m/z 249 → 90), die insbesondere im niedrigeren Konzentrationsbereich mehr ins Gewicht fallen. AAMA-SO₂ selbst hat allgemein einen niedrigeren *Response* als die anderen Merkaptursäuren. Zum einen eluiert diese Merkaptursäure zuletzt und im HILIC Modus liegt hierbei der größte Wasseranteil vor (schlechtere Ionisation). Des Weiteren scheint die Sulfoxidgruppe schlechter ionisierbar zu sein (niedrigeres Signal bereits beim Bestimmen der selektiven Zerfälle in Acetonitril-Lösung). Somit können auch diese Präzisionen von 11,0 – 12,4 % als akzeptabel angesehen werden.

Zur Prüfung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche in Urinen mit unterschiedlichen Kreatiningehalten durchgeführt. 8 Proben (4 Raucher und 4 Nichtraucher mit Kreatiningehalten von 0,3 – 3,0 g/L) wurden ohne und mit Zugabe der verschiedenen Merkaptursäuren in zwei verschiedenen Konzentrationen analysiert. Die relative Wiederfindung liegt im Mittel zwischen 86 und 100 % für die hohe und zwischen 98 und 120 % für die niedrige Dotierung. Die Wiederfindung von 120 % wurde für die niedrige Dotierung von CHEMA ermittelt. CHEMA selbst hat jedoch keinen eigenen isotopenmarkierten Standard, sondern wird über d₃-CEMA quantifiziert. Die restlichen relativen Wiederfindungen liegen für die niedrige Dotierung bei 98 bis 106 %. Die Richtigkeit der Methode ist somit ausreichend.

Die hier presentierete Methode ist somit eine robuste Analysenmethode mit ausreichender Nachweisgrenze, Prazision und Richtigkeit fur den arbeits- und umweltmedizinischen Bereich.

6 VERIFIZIERUNG DES NEUEN URIN-BIOMARKERS OH-PA

OH-PA wurde bisher nur in zwei Metabolismusstudien gemessen. Es hat einen Anteil von 5,4 % am Gesamtmetabolismus und ist somit der oder einer der oxidativen Hauptmetaboliten im AA-Metabolismus (siehe auch 2.2.7). Des Weiteren ist OH-PA als direktes Hydrolyseprodukt von GA nahe am kanzerogenen Potential, welches von GA ausgeht. Es war somit wichtig, OH-PA im Bereich einer Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung zu erfassen.

6.1 Kollektivbeschreibung

6.1.1 Allgemeinbevölkerung

Untersucht wurden 126 Personen der beruflich nicht Acrylamid- bzw. Acrylnitril-belasteten Allgemeinbevölkerung. Die Personen waren zum Probenahmezeitpunkt im Median 33 Jahre alt. 67 Personen sind weiblich und 59 Personen männlich. Es waren 33 Raucher und 93 Nichtraucher in diesem Kollektiv enthalten. Die Probenahme fand über mehrere Monate im Jahr 2009 statt. Von jeder Person wurde eine Spontanurinprobe abgegeben.

Durch Fragebögen wurde die ernährungs- bzw. tabakrauchbedingte AA- bzw. AN-Aufnahme erfasst. Zusätzlich wurde der Raucherstatus durch Messung von Nikotin und den beiden Metaboliten Cotinin und 3-Hydroxycotinin im Urin nach Tuomi *et al.* verifiziert [177]. Ebenfalls von jeder Urinprobe wurde der Kreatiningehalt nach Jaffé bestimmt [178].

6.1.2 Fastenkollektive

Zwei Personen (eine männliche und eine weibliche Person, 29 bzw. 28 Jahre alt, beides Nichtraucher) nahmen 48 Stunden nur Mineralwasser (1,5 L PET Flasche

einer Marke) zu sich. Vor dem Beginn des Fastens wurde AA-haltige Nahrung konsumiert. Auch als erste Nahrung nach 48 Stunden Fasten (Fastenbrechen) wurde AA-haltige Nahrung zu sich genommen.

Urinproben wurden vor Fastenbeginn, regelmäßig während der Fastenzeit sowie nach dem Fastenbrechen genommen (Kurzzeitfasten).

Während der Fastenstudie kam es zu keiner bekannten Passivrauchexposition.

Eine Person (weiblich, 48 Jahre, Nichtraucherin) hat 10 Tage ein Heilfasten durchgeführt. Während dieser 10 Tage wurde einmal täglich ein Glas Obstsaft (200 mL) sowie ein Glas Gemüsesaft (200 mL) für den Elektrolythaushalt konsumiert. In beliebiger Menge wurde Wasser sowie ungesüßter Kräutertee (sog. Fastentee) getrunken. Analog zur Kurzzeitfastenstudie wurden vor, während und nach dem Fasten Urinproben genommen. Fastenbrechen fand hierbei durch einen Apfel und später durch Knäckebrot (AA-haltig) statt (Langzeitfasten).

Auch während dieser Fastenstudien kam es zu keiner bekannten Passivrauchexposition. Für die Langzeitfastenstudie wurde eine Probe eines Fastentages (Probenahmezeitpunkt je ca. 08:00 Uhr) analysiert.

6.2 OH-PA im Urin der Allgemeinbevölkerung

In allen Urinproben (n = 126) konnte 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) nachgewiesen werden. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der OH-PA-Bestimmung in Form von Boxplots und stellt Raucher (n = 33) und Nichtraucher (n = 93) gegenüber.

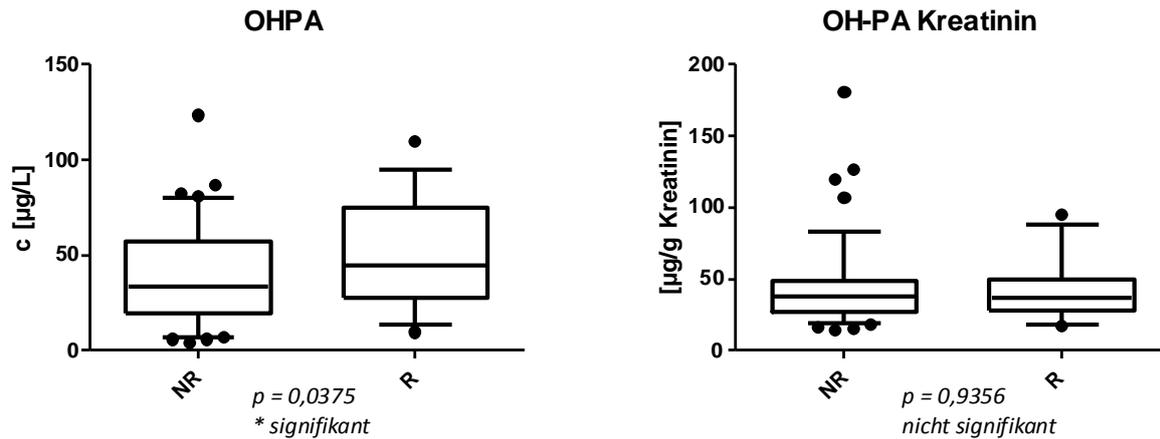


Abb. 21: Ergebnisse der OH-PA-Bestimmung (Boxplot)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. bzw. 5. Perzentils

Der Vergleich der volumenbezogenen Werte von Rauchern und Nichtrauchern im Mann-Whitney-U-Test (Software: GraphPad Prism, nicht parametrischer t-Test; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) ergibt, dass sich die zentrale Tendenz im untersuchten Kollektiv signifikant ($p = 0,0375$) unterscheidet.

Nach Kreatininanpassung jedoch sind beide Mediane mit $37,4 \mu\text{g/g}$ Kreatinin (Nichtraucher) und $36,4 \mu\text{g/g}$ Kreatinin (Raucher) fast identisch und es liegt kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,9356$) (siehe Abb. 21 und Tabelle 21). Zu erwarten gewesen wäre, dass sich Raucher und Nichtraucher signifikant in ihren OH-PA-Leveln unterscheiden, da Raucher höhere AA-Exposition aufweisen und auch die bisher gemessenen AA-Metaboliten diesen Unterschied zeigten (siehe Tabelle 3 und 5).

Tabelle 21: Ergebnisse der OH-PA-Bestimmung in Urin

	NWG	Proben > NWG [%]	Nichtraucher (NR) n = 93	Raucher (R) n = 33
			Median ± Standard- abweichung (Bereich)	Median ± Standard- abweichung (Bereich)
OH-PA [$\mu\text{g/L}$]	1,0	100	33,5 ± 24,9 (4,1 – 123,0)	44,7 ± 25,3 (9,6 – 109,4)
OH-PA [$\mu\text{g/g Kreatinin}$]	-	100	37,4 ± 33,7 (14,5 – 180,4)	36,4 ± 23,2 (16,9 – 95,0)

Auffällig ist auch, dass die OH-PA-Konzentrationen im Urin mit 34 bzw. 45 $\mu\text{g/L}$ um den Faktor zwei bis fünf höher sind als durch Metabolismusdaten erwartet wurde (siehe Tabelle 22).

OH-PA hat einen Anteil am Gesamtmetabolismus von 5,4 % und in etwa den gleichen Anteil wie der ebenfalls oxidative Metabolit GAMA mit 4,6 % (Tabelle 22). Somit wären etwa gleiche Gehalte im Urin von 6 $\mu\text{g/L}$ für Nichtraucher bzw. 22 $\mu\text{g/L}$ für Raucher zu erwarten gewesen. Die Werte von im Median 34 (Nichtraucher) bzw. 45 $\mu\text{g/L}$ (Raucher) liegen um das Doppelte bis 5-fache höher als erwartet.

Auch eine weitere Studie von Fennell *et al.* zeigte einen OH-PA-Anteil von 3,3 % im Metabolismus und somit einen vergleichbaren Anteil am Gesamtmetabolismus wie Hartmann *et al.* mit 5,4 % (allerdings bei einer 200-fach höheren AA-Dosis) [74].

Tabelle 22: Diskrepanz der erwarteten und erhaltenen OH-PA-Gehalte

Literaturwerte	Metabolismus- studie [Hartmann <i>et al.</i> , 2011]		
Metabolit	Anteil am Metabolismus	Nichtraucher (Median)	Raucher (Median)
GAMA	4,6 %	5 µg/L [179]	19 µg/L [179]
OH-PA	5,4 %	-	-
<i>Erwartete Werte aufgrund der Metabolismusdaten:</i>			
OH-PA (<i>erwartet</i>)	-	6 µg/L	22 µg/L
<i>Analytisch ermittelte Werte dieser Studie:</i>			
OH-PA (analytisch bestimmt)	-	34 µg/L	45 µg/L

Aufgrund dieser nicht erwarteten Diskrepanz zwischen Metabolismusdaten und Allgemeinbevölkerungsdaten sowie der Tatsache, dass Raucher keine signifikant höhere OH-PA-Ausscheidung aufweisen als Nichtraucher, wurden zwei Fastenstudien durchgeführt. Analoge Fastenstudien mit Fokussierung auf die Mercaptursäuren AAMA und GAMA waren bereits bekannt [180]. Hierbei nahmen die Konzentrationen der Mercaptursäuren im Urin innerhalb von 48 Stunden nach Fastenbeginn (keine Nahrung, keine Zigaretten) signifikant ab.

6.3 Verlauf der OH-PA-Ausscheidung bei einem 48-stündigem Fasten

Untersucht werden sollte die Abnahme der OH-PA-Konzentrationen im Urin während eines 48-stündigen Fastens. In dieser Zeit wurde weder Nahrung zu

sich genommen, noch Tabakprodukte konsumiert. Als Getränk wurde lediglich Wasser getrunken.

Andere OH-PA-Quellen (somit ein Untergrund von OH-PA im Urin) als die Ernährung sollten ausgeschlossen werden. Wird also die Nahrung als potentiell einzige OH-PA-Quelle ausgesetzt, wäre aufgrund der bereits bekannten Kinetik (siehe 2.2.7) zu erwarten, dass sich die OH-PA-Konzentrationen der Nachweisgrenze nähern. Die Werte der Fastenstudie wurden kreatininangepasst angegeben, um unterschiedlich stark verdünnten Urin (z.B. durch erhöhte Wasseraufnahme) auszugleichen. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse dieser ersten Fastenstudie (2 Personen, Kurzzeitfasten, 48 h, nur Wasseraufnahme).

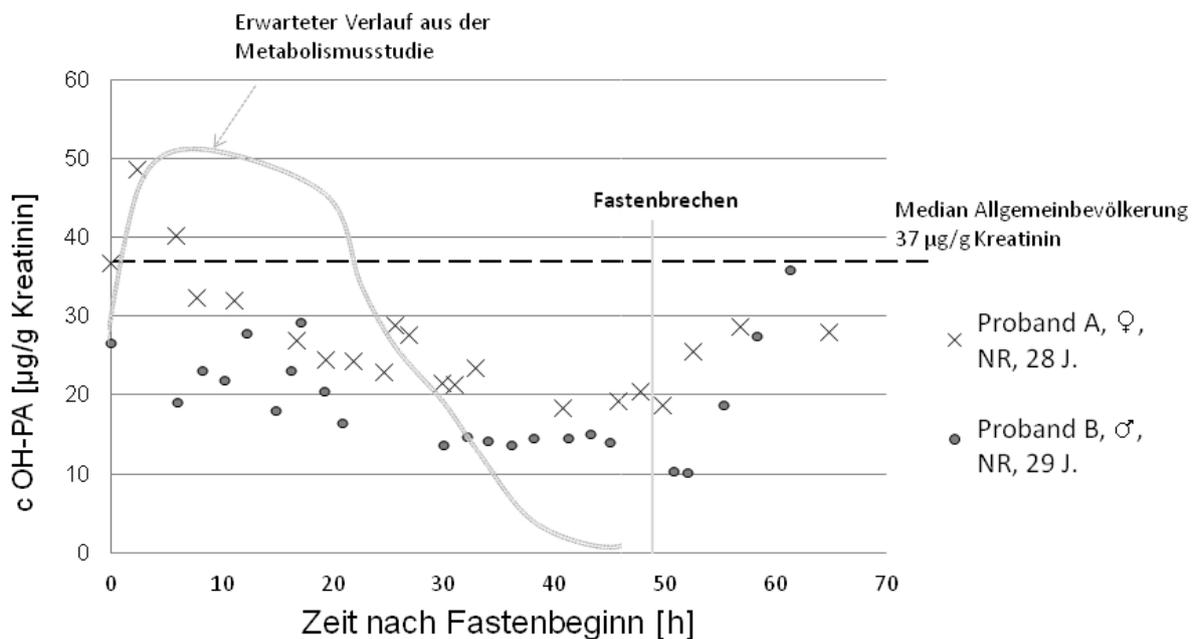


Abb. 22: Ergebnisse der Kurzzeitfastenstudie (48 Stunden)

Es kommt innerhalb der ersten zwanzig Stunden nach Fastenbeginn zu einer schwachen Abnahme der OH-PA Konzentrationen im Urin. Diese stagniert jedoch bei Werten $> 10 \mu\text{g/g}$ Kreatinin (Proband B) und $> 17 \mu\text{g/g}$ Kreatinin (Proband A) bis zum Fastenende. Zu erwarten gewesen (aus der gemeinsam durchgeführten Metabolismusstudie mit deuteriertem Acrylamid von Hartmann *et al.* [117]) wäre jedoch eine Abnahme bis in die Nähe der Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/L}$ (siehe graue Kurve, Abb. 22). Diese signifikante Abnahme konnte nicht nachgewiesen werden. Nach erneuter Nahrungsaufnahme (es wurde AA-haltige Nahrung konsumiert) kommt es erwarteterweise zu einem Anstieg der OH-PA-Ausscheidung bis zu $30\text{-}35 \mu\text{g/g}$ Kreatinin. Bei beiden Personen liegen die Ausscheidungswerte der meisten Urinproben unterhalb des Medians aus der Allgemeinbevölkerung (Abb. 22, kreatininkorrigiert).

Um die nur leichte Abnahme des neuen Biomarkers OH-PA innerhalb der 48 Stunden genauer zu untersuchen, wurde eine weitere Fastenstudie über einen längeren Zeitraum (10 Tage) begleitet.

6.4 Verlauf der OH-PA-Ausscheidung bei einem 10-tägigen Heilfasten

Durch die Untersuchung des Verlaufes der OH-PA-Ausscheidung über einen längeren Zeitraum sollte untersucht werden, ob nach einer AA-Exposition über Jahre eventuell eine längere Ausscheidungskinetik eine Rolle spielt als nach einer einmaligen oralen Gabe. Auch hierbei ist eine Abnahme bis in die Nähe der Nachweisgrenze zu erwarten.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Langzeitfastenstudie (10 Tage Heil- bzw. Reinigungsfasten).

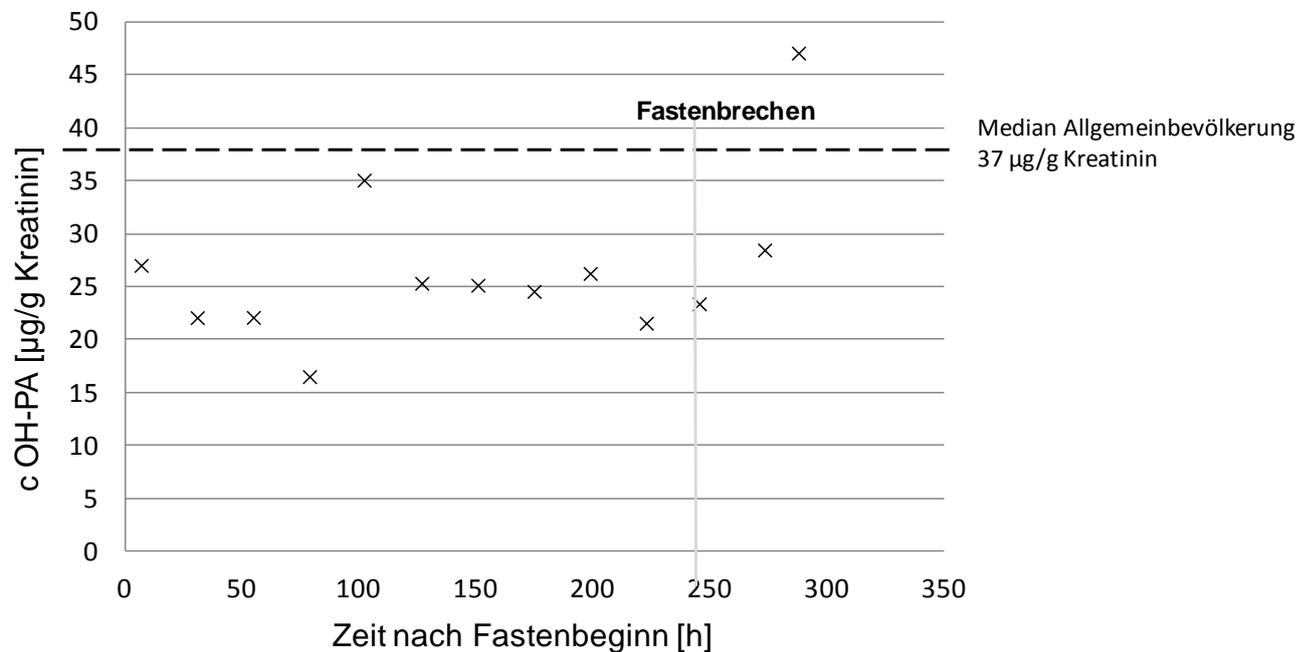


Abb. 23: Ergebnisse der Langzeitfastenstudie (10 Tage)

Eine weitere Abnahme innerhalb der zehn Tage Fasten konnte nicht beobachtet werden. Die Ausscheidungswerte schwanken alle um einen Median von 23 µg/g Kreatinin (Minimalwert nach 3 Tagen 16,5 µg/g Kreatinin). Nach Fastenbrechen mit Apfel und Knäckebrot kommt es zu einem Anstieg der OH-PA Ausscheidung.

Zu erwarten gewesen wäre eine signifikante OH-PA-Abnahme innerhalb von 48-72 Stunden und einer Stagnation in diesem niedrigen Bereich nahe der Nachweisgrenze von 1 µg/L.

6.5 Beurteilung des neuen Biomarkers OH-PA

Die OH-PA-Gehalte im Urin der Allgemeinbevölkerung liegen zwei- bis fünfmal höher als es nach der Untersuchung des menschlichen Metabolismus zu erwarten gewesen wäre. Die im Vergleich zur Erwartung erhöhten OH-PA Werte können mit bisherigen Daten nicht erklärt werden. Um diese Diskrepanz näher zu betrachten, wurden zwei Fastenstudien unterschiedlicher Dauer durchgeführt.

Auch durch die Auswertung der beiden Fastenstudien kann die Bedeutung von OH-PA als neuer Biomarker nicht hinreichend verifiziert werden. Weder nach 48 Stunden noch nach 10 Tagen kam es zu einer signifikanten Abnahme der OH-PA-Ausscheidung in den Bereich der Nachweisgrenze von 1 µg/L.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen unspezifischen chromatographischen Untergrund handelt, sollte vor einer endgültigen Beurteilung des Biomarkers eine zweite unabhängige Methode (z.B. Derivatisierung mit einem anderen Derivatisierungsmittel und anschließender flüssigchromatographischer Trennung) angewendet werden. Sollte diese Methode die hiesigen Ergebnisse bestätigen, müssen weitere OH-PA Quellen, die insbesondere auch während der beiden Fastenstudien dazu beigetragen haben könnten, dass es zu keiner signifikanten Abnahme kommt (z. B. endogene Bildung, Körperpflegemittel) weiter untersucht werden. Erst dann kann beurteilt werden, ob OH-PA trotz der oben erläuterten Diskrepanz für AA ein toxikologisch relevanter Biomarker ist.

7 UNTERSUCHUNG DER OXIDATIVEN UND REDUKTIVEN LANG- UND KURZZEITMARKER IN DER ALLGEMEINBEVÖLKERUNG

Untersucht wurden 126 Personen der beruflich nicht Acrylamid- bzw. Acrylnitril-belasteten Allgemeinbevölkerung (siehe auch 6.1). Es waren 33 Raucher und 93 Nichtraucher in diesem Kollektiv enthalten. Durch Fragebögen wurde die ernährungs- bzw. tabakrauchbedingte AA- bzw. AN-Aufnahme erfasst. Zusätzlich wurde der Raucherstatus durch Messung von Nikotin und den beiden Metaboliten Cotinin und 3-Hydroxycotinin nach Tuomi *et al.* verifiziert [177]. Von jeder Person wurden eine Spontanurinprobe (n = 126), sowie eine Vollblutprobe (n = 123) entnommen. Drei Personen gaben keine Blutprobe ab.

Von den Urinproben wurde zusätzlich jeweils der Kreatiningehalt nach Jaffé bestimmt, um Verdünnungseffekte aufgrund unterschiedlicher Wasseraufnahme berücksichtigen zu können [178].

Anmerkung zur statischen Auswertung

Wenn Werte unterhalb einer Nachweisgrenze (NWG) ermittelt werden, müssen diese für eine vergleichende Statistik substituier werden, da mit Werte „kleiner als“ nicht gerechnet werden kann. Je nach Verteilung dieser Werte „< NWG“ und der Anzahl der Werte „< NWG“ kommen unterschiedliche vereinfachte Substitutionsmethoden in Betracht.

Die „European Food Safety Authority“ (EFSA) und die „World Health Organisation“ (WHO) gaben 2010 bzw. 2013 Empfehlungen heraus, um solche Substitutionen im Bereich von Lebensmittelkontaminanten vorzunehmen [181,182]. Diese Empfehlungen können analog auf die Beschreibung einer

Belastung durch Gefahrstoffe im Menschen angewendet werden. Die EFSA gibt einen ausführlicheren Leitfaden und empfiehlt [182]:

1. Vollständige Beschreibung der erhaltenen Daten, insbesondere: Anzahl der Daten, Anzahl der Daten $<$ NWG bzw. zwischen NWG und BG, graphische Darstellung der Daten (kumulative Verteilung oder Histogramm)
2. Die Daten werden mit zwei Substitutions-Szenarien ausgewertet. Beim „lower-bound-scenario“ werden Werte $<$ NWG durch Null ersetzt und die Auswertung durchgeführt, beim „upper-bound-scenario“ werden Werte $<$ NWG durch den Zahlenwert der NWG ersetzt. Beide Auswertungen werden verglichen. Ist der Unterschied zwischen beiden Auswertungen vernachlässigbar, wird die „upper-bound-scenario“-Methode verwendet um die Daten zu beschreiben.

Wenn der Unterschied zwischen beiden Szenarien nicht vernachlässigbar ist, müssen weitere Auswertungen folgen. Da sich dies im Rahmen dieser Doktorarbeit als nicht nötig erwies, wird auf eine weitere Beschreibung verzichtet.

Die oben genannten Daten (Anzahl der Werte $<$ NWG und Vergleich beider Substitutionsverfahren sowie eine kumulative Verteilung der Daten) befinden sich für die betreffenden Datensätze mit Werten $<$ NWG im Anhang. Sofern eine Substitution für die Ergebnisbeschreibung nötig war, wurde nach der „upper-bound“-Methode verfahren, d.h. für Werte $<$ NWG wurde die NWG eingesetzt. Dies ist bei den einzelnen Analyten angegeben.

Es ist nochmals zu betonen, dass dies eine statistische Vereinfachung darstellt, um eine Belastung zu beschreiben bzw. zu vergleichen.

7.1 Mercaptursäuren

7.1.1 AA-Mercaptursäuren

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Analytik der reduktiven Mercaptursäuren AAMA und AAMA-SO₂ sowie der oxidativen Mercaptursäuren GAMA und iso-GAMA in den 126 Urinproben aus der Allgemeinbevölkerung.

Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots dargestellt und Raucher (n = 33) und Nichtraucher (n = 93) sind gesondert dargestellt.

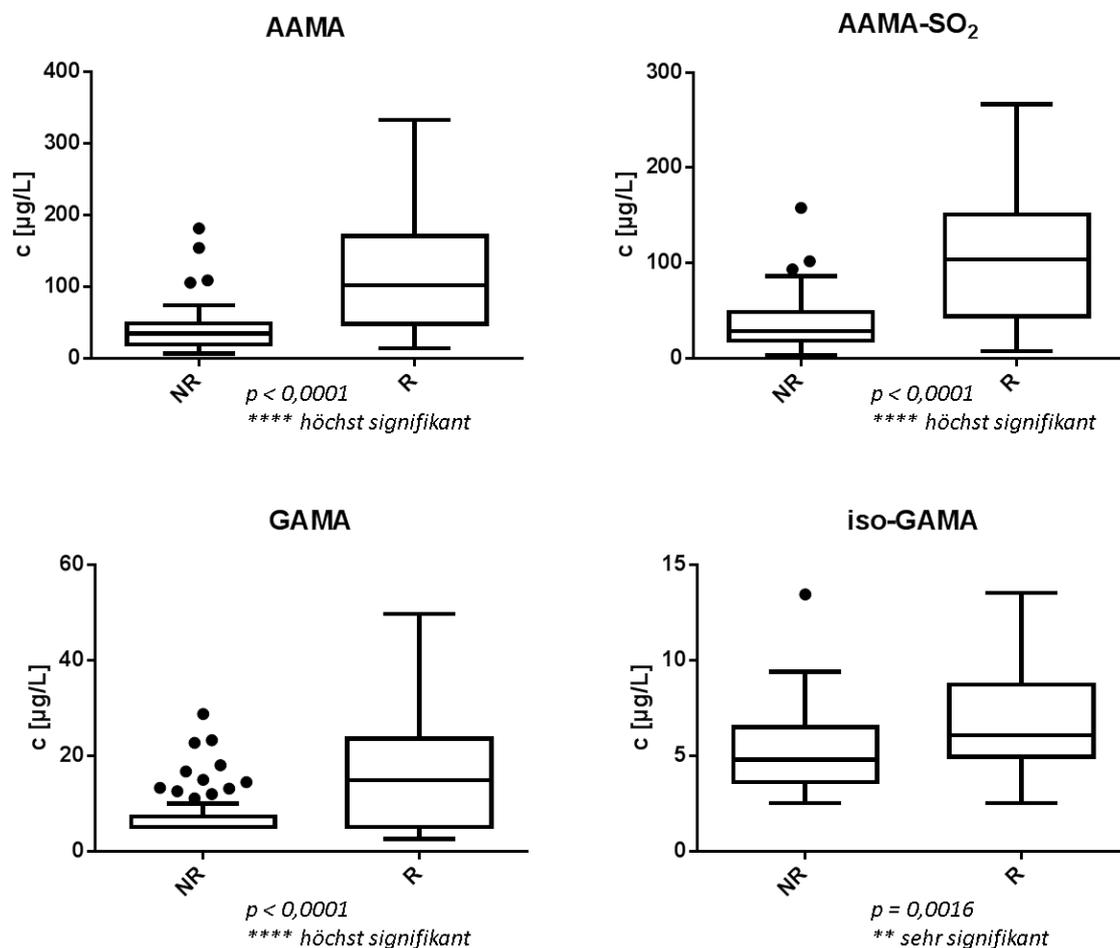


Abb. 24: Ergebnisse der Mercaptursäurenbestimmung für die AA-Mercaptursäuren AAMA, AAMA-SO₂, GAMA und iso-GAMA (Boxplots)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. Bzw. 5. Perzentils

Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Der Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern im Mann-Whitney-U-Test (Software: GraphPad Prism, nicht parametrischer t-Test; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) ergibt, dass sich die zentrale Tendenz im untersuchten Kollektiv für die vier AA-Merkaptursäuren sehr ($p < 0,01$) bzw. höchst signifikant ($p \leq 0,0001$) unterscheidet. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Untersuchungen, nach denen Raucher eine höhere AA- Belastung aufweisen als Nichtraucher (siehe Tabelle 5).

Tabelle 23 fasst die oben in graphischer Form präsentierten Ergebnisse in Tabellenform wieder.

Tabelle 23: Tabellarische Übersicht über die AA-Merkaptursäureergebnisse im Allgemeinbevölkerungskollektiv

	NWG [µg/L]	Proben > NWG [%]	Nichtraucher (NR) n = 93		Raucher (R) n = 33	
			> NWG [%]	Median ± Standard- abweichung (Bereich) [µg/L]	> NWG [%]	Median ± Standard- abweichung (Bereich) [µg/L]
AAMA	1,0	100	100	33,7 ± 27,6 (6,5 – 181,5)	100	107,1 ± 87,4 (14,0 – 333,3)
AAMA- SO ₂	5,0	98	97	28,7 ± 26,3 (< NWG – 157,8)	100	103,8 ± 66,3 (7,0 – 267,0)
GAMA	5,0	47	39	< NWG (< NWG – 28,8)	69	14,9 ± 10,4 (< NWG – 49,8)
Iso- GAMA	2,5	94	93	4,8 ± 1,9 (< NWG – 13,5)	94	6,1 ± 3,0 (< NWG – 13,5)

AAMA, AAMA-SO₂ und iso-GAMA konnten in allen bzw. fast allen der 126 Proben nachgewiesen werden (100 %, 98 % bzw. 94 % der Proben größer NWG). GAMA konnte in 39 % der Nichtraucher- und in 69 % der Raucherproben quantifiziert werden.

Die Daten für die bereits bestimmten Mercaptursäuren AAMA, AAMA-SO₂ und GAMA für Nichtraucher und Raucher stimmen mit den Daten dieser Studie überein (siehe auch Tabelle 5).

Die AAMA-Werte liegen in diesem Kollektiv im Median bei 33,7 µg/L (Nichtraucher) bzw. 107,1 µg/L (Raucher). Boettcher *et al.* fanden vergleichbare Werte in einem Allgemeinbevölkerungskollektiv von 29 µg/L (Nichtraucher) bzw. 127 µg/L (Raucher) ebenso wie Kopp *et al.* mit Werten von 39 µg/L (Nichtraucher) bzw. 165 µg/L (Raucher) [118,123].

Der BAR für den Kurzzeitexpositionsmarker AAMA liegt bei 100 µg AAMA/g Kreatinin. Der Median dieses Kollektives liegt bei 35,0 µg/g Kreatinin (95. Perzentil: 89,9 µg/g Kreatinin) und somit weit unterhalb des BAR von 100 µg AAMA/g Kreatinin. Nur 2 der 91 Nichtraucher-Proben liegen oberhalb des BAR (kreatininangepasste Übersicht über die Ergebnisse siehe Anhang).

Für AAMA-SO₂ ermittelten Kopp *et al.* Medianwerte von 30 µg/L (Nichtraucher) bzw. 121 µg/L (Raucher) und auch diese Werte passen zu den hiesigen Ergebnissen von 28,7 µg/L (Nichtraucher) und 103,8 µg/L (Raucher).

GAMA wurde von Boettcher *et al.* im Median mit 5 µg/L (Nichtraucher) und 19 µg/L (Raucher) und von Kopp *et al.* 9 µg/L (Nichtraucher) bzw. 25 µg/L (Raucher) nachgewiesen [118,123]. Auch diese Werte korrelieren sehr gut mit den Daten dieser Studie von < 5 µg/L (Nichtraucher) und 14,9 µg/L (Raucher).

Iso-GAMA wurde bisher nicht in der Allgemeinbevölkerung analysiert.

Da bei der OH-PA-Bestimmung ein Vergleich der Daten volumenbezogen und kreatininbezogen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Signifikanz zeigte, wurde der Mann-Whitney-U-Test mit den kreatininbezogenen Werten wiederholt.

Für AAMA, AAMA-SO₂ und GAMA bestätigte sich der höchst signifikante ($p < 0,0001$) Unterschied der Metabolitenkonzentration von Rauchern und Nichtrauchern (siehe Anhang). Bei iso-GAMA jedoch konnte kreatininbezogen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,9392$) (siehe Abb. 25).

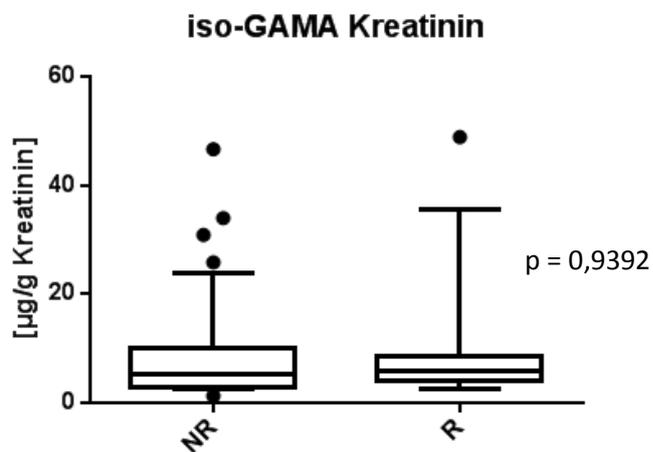


Abb. 25: Ergebnisse der iso-GAMA-bestimmung nach Kreatininanpassung (Boxplot)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. bzw. 5. Perzentils

94 % der iso-GAMA-Werte liegen oberhalb der Nachweisgrenze von 2,5 µg/L. Jedoch liegen ein Großteil der Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze (definiert als dreifache NWG) von 7,5 µg/L (genaue Aufschlüsselung siehe Anhang). Dies könnte ein Grund sein, dass der für alle AA-Metaboliten

festgestellte signifikante Unterschied kreatininbezogen für iso-GAMA nicht bestätigt werden kann.

Um den Zusammenhang beider AA-Metaboliten AAMA und GAMA zu untersuchen, wurden die AAMA- gegen die GAMA-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 26).

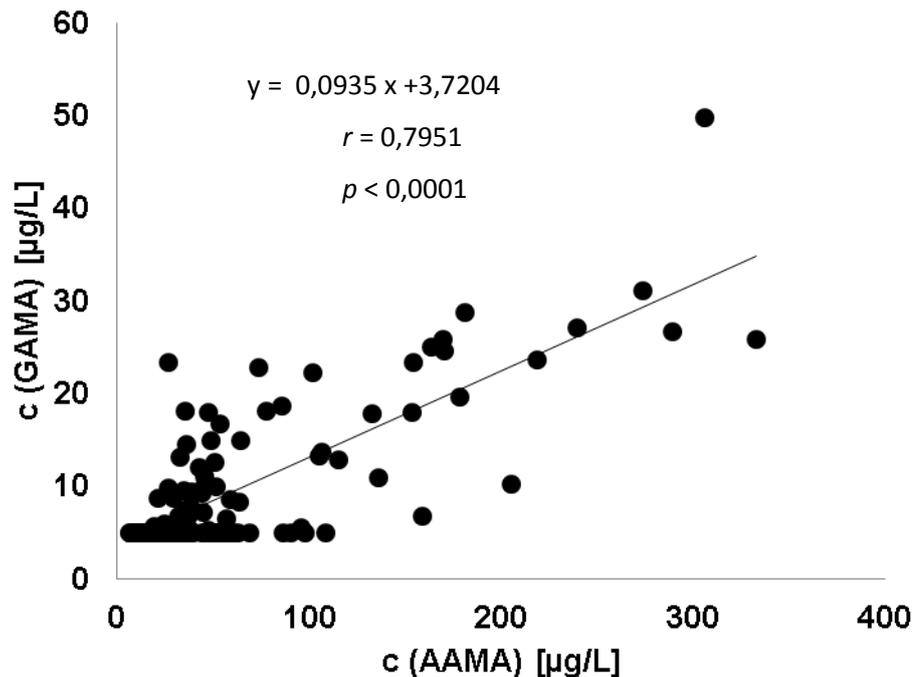


Abb. 26: Verhältnis der AAMA- zu GAMA-Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung ($n = 126$)

Für die statistische Auswertung, sind Werte $< \text{NWG}$ sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Die aufgetragenen Konzentrationen korrelieren gut auf einem höchst signifikanten Niveau ($p < 0,0001$, $r = 0,7951$; Software: GraphPad Prism, Pearson-Korrelation; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test). Dieser deutliche lineare Zusammenhang bestätigt die publizierten Daten eines Allgemeinbevölkerungskollektivs von Hartmann *et al.* ($n = 91$), in dem AAMA,

GAMA, AAV und GAV untersucht wurden [106]. AAMA und GAMA korrelieren mit $r = 0,467$ ein wenig schlechter als im diesem Kollektiv und haben mit $m = 0,15$ eine ähnliche Steigung. Sie weisen somit ein ähnliches Ausscheidungsverhältnis in beiden Kollektiven auf.

Abbildung 27 zeigt die analoge Auftragung der beiden reduktiven Mercaptursäuren AAMA und AAMA-SO₂.

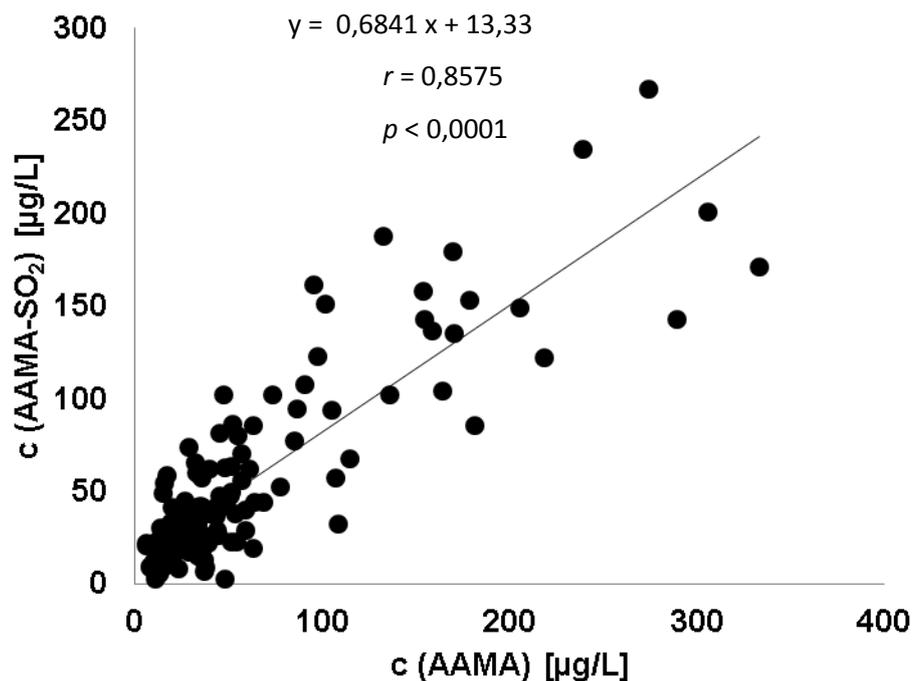


Abb. 27: Verhältnis der AAMA- zu AAMA-SO₂-Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung (n=126) Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Die aufgetragenen Konzentrationen korrelieren gut auf einem höchst signifikanten Niveau ($p < 0,0001$; $r = 0,8575$; Software: GraphPad Prism, Pearson-Korrelation; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test). Ein sehr deutlicher linearen Zusammenhang ist höchst wahrscheinlich.

AAMA-SO₂ macht etwa 68 % (Steigung $m = 0,68$) der AAMA-Konzentration aus. Diese Werte korrelieren gut mit den Ergebnissen von Kopp [123]. Aus

Metabolismusstudien ist bekannt, dass AAMA-SO₂ einen Anteil von 6 – 8 % der gefundenen Dosis im Menschen ausmacht. AAMA hingegen ist mit 37 – 58 % der gefundenen Dosis der Hauptmetabolit (siehe Tabelle 4).

Somit wären geringere AAMA-SO₂ Ausscheidungen zu erwarten gewesen (ca. 10 bis 22 % der AAMA-Konzentrationen). Ein Grund für diese Diskrepanz kann die verzögerte Ausscheidungskinetik von AAMA-SO₂ zu AAMA sein.

AAMA weist eine Halbwertszeit von 14 bzw. 11 Stunden auf [114,116]. Für AAMA-SO₂ hingegen wurde eine Halbwertszeit von 21,5 Stunden ermittelt [114]. Bei einer chronischen AA-Aufnahme kann es somit zu einer stärkeren Anreicherung von AAMA-SO₂ kommen.

Fennell *et al.* diskutierten die Möglichkeit einer unbeabsichtigten Summenbestimmung von GAMA, iso-GAMA und AAMA-SO₂, da alle drei sich den Übergang m/z 249 → 120 teilen [111]. Die bis dahin publizierten Methoden verwendeten RP-Phasen, die die drei Mercaptursäuren unter den jeweiligen Bedingungen nicht ausreichend trennen (bzw. wurde AAMA-SO₂ bis dahin nicht bestimmt). In der verwendet HILIC-Methode eluiert AAMA-SO₂ (t = 14,3 min) jedoch weit nach GAMA und iso-GAMA (t = 8-9 min). Zudem haben AAMA-SO₂ und iso-GAMA jeweils zwei selektive Zerfälle (siehe Tabelle 17). Eine Interferenz durch die anderen Mercaptursäuren kann unter diesen Bedingungen somit ausgeschlossen werden.

7.1.2 AN-Mercaptursäuren

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der Analytik der reduktiven Mercaptursäure CEMA sowie der oxidativen Mercaptursäuren HEMA und CHEMA in den 126 Urinproben aus der Allgemeinbevölkerung.

Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots dargestellt und Raucher (n = 33) und Nichtraucher (n = 93) sind gesondert dargestellt.

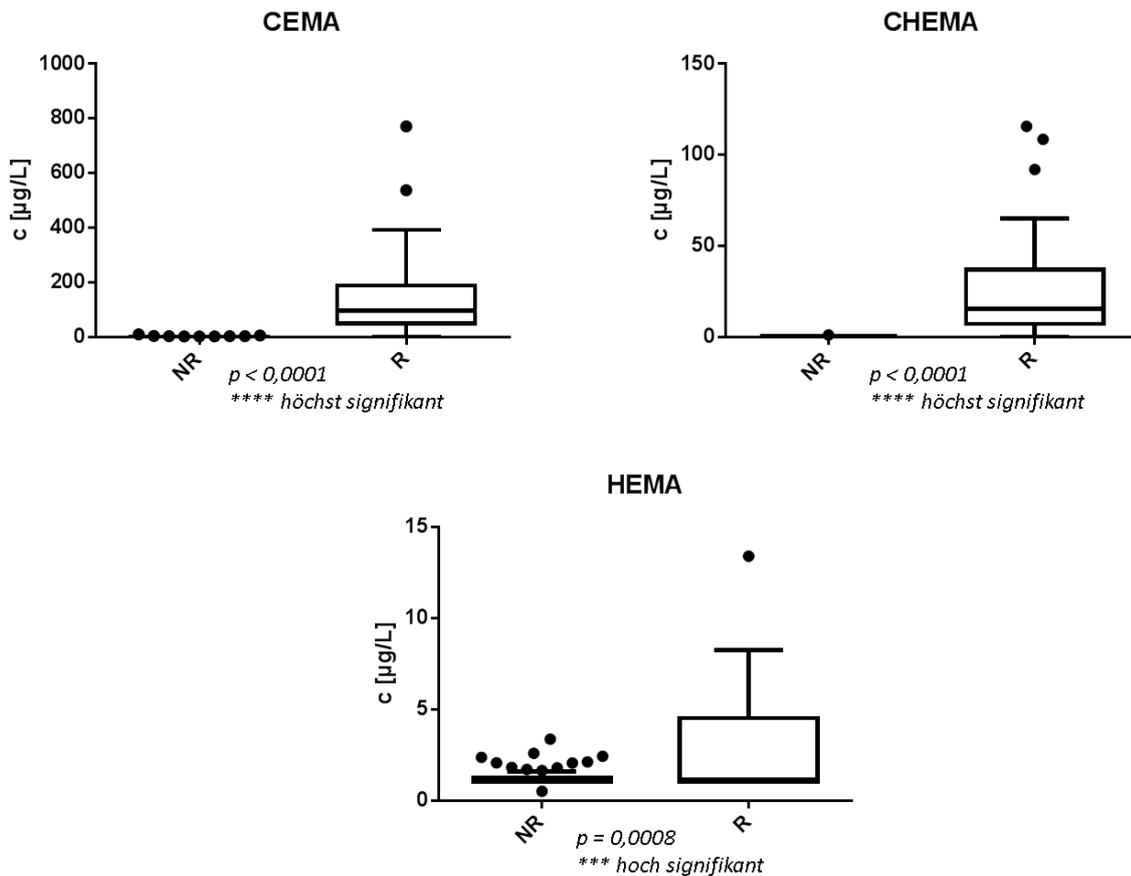


Abb. 28: Ergebnisse der Merkaptursäurenbestimmung für die AN-Merkaptursäuren HEMA, CEMA und CHEMA (Boxplots)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. bzw. 5. Perzentils

Für die statistische Auswertung, sind Werte $< \text{NWG}$ sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Der Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern im Mann-Whitney-U-Test (Software: GraphPad Prism, nicht parametrischer t-Test; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) ergibt, dass sich die zentrale Tendenz im untersuchten Kollektiv hoch ($p < 0,001$) bzw. höchst signifikant ($p \leq 0,0001$) unterscheidet.

Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Untersuchungen, nach denen Raucher eine höhere AN-Belastung und somit auch höhere CEMA-Ausscheidung aufweisen als Nichtraucher (siehe Tabelle 8).

Tabelle 24 gibt die oben in graphischer Form präsentierten Ergebnisse in Tabellenform wieder.

Tabelle 24: Tabellarische Übersicht über die AN-Merkaptursäureenergebnisse im Allgemeinbevölkerungskollektiv

	NWG [µg/L]	Proben > NWG [%]	Nichtraucher (NR) n = 93		Raucher (R) n = 33	
			> NWG [%]	Median (Range) [µg/L]	> NWG [%]	Median (Range) [µg/L]
CEMA	1,0	56	42	< NWG (< NWG – 12,0)	97	99,0 ± 163,9 (< NWG – 772,1)
CHEMA	1,0	22	1	< NWG (< NWG – 1,4)	83	15,9 ± 30,7 (< NWG – 115,8)
HEMA	1,0	35	29	< NWG (< NWG – 3,4)	51	1,1 ± 3,0 (< NWG – 13,4)

Für die rauchabhängigen AN-Merkaptursäuren ist ein klarer Unterschied in der Häufigkeit des positiven Befundes in Nichtrauchern und Rauchern erkennbar. CEMA wird in 56 % der Proben oberhalb der Nachweisgrenze nachgewiesen, wobei es in nur 42 % der Nichtraucher aber in 97 % der Raucher > NWG nachgewiesen wurde. CHEMA wurde in 22 % der Proben nachgewiesen (nur 1 % Nichtraucher, aber in 83 % der Raucher). HEMA konnte in 35 % der Proben quantifiziert werden (29 % Nichtraucher, 51 % Raucher).

CHEMA wurde bisher in zwei Studien gemessen. Wu *et al.* jedoch geben mit 2,4 µg/g Kreatinin nur den Mittelwert von 31 Nichtraucher und 2 Raucher aller

33 Werte an [161]. Schettgen *et al.* publizierten ebenfalls 2012 die ersten CHEMA-Daten mit einer Unterscheidung von Raucher und Nichtraucher [162]. Die CHEMA-Werte lagen im Median < 1 µg/L (Nichtraucher) und 29,3 µg/L (Raucher) und somit vergleichbar mit den Werten dieser Studie von < 1 µg/L (Nichtraucher) und 15,9 µg/L (Raucher).

Die CEMA und CHEMA Konzentrationen der 33 Raucher wurden analog zu den AA-Merkaptursäuren zur Überprüfung des neuen Biomarkers CHEMA korreliert (Abb. 29).

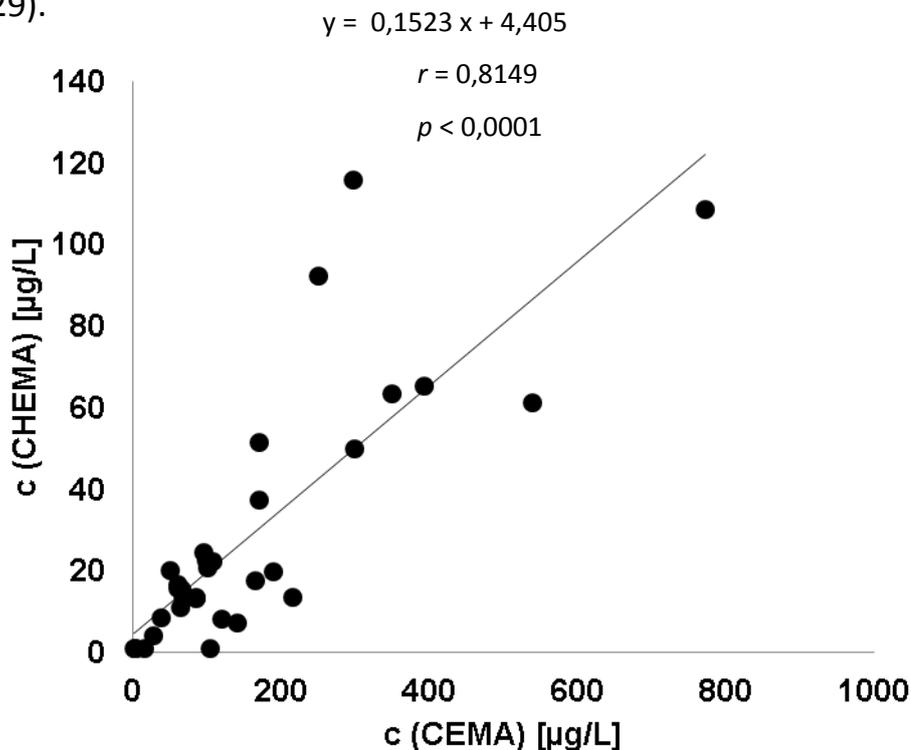


Abb. 29: Korrelation der CEMA- und CHEMA-Konzentrationen im Allgemeinbevölkerungskollektiv (33 Raucher)

Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Die aufgetragenen Konzentrationen korrelieren gut auf einem höchst signifikanten Niveau ($r = 0,8149$; Software: GraphPad Prism, Pearson-

Korrelation; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) und weisen auf einen sehr deutlichen linearen Zusammenhang hin.

CHEMA macht etwa 15 % (Steigung $m = 0,152$) der CEMA-Konzentration aus. Auch dieser Wert ist mit dem von Schettgen *et al.* vergleichbar, wo CHEMA etwa 13 % (Steigung $m = 0,13$) der CEMA-Werte ausmacht [162].

7.2 Hämoglobin (Hb)-Addukte

Die Bestimmung der Hämoglobin (Hb)-Addukte erfolgte durch eine bereits beschriebene Methode, welche am IPA neu etabliert wurde. Diese Methode wurde von Schettgen *et al.* im Rahmen dieses gemeinsamen DFG-Antrages bereits entwickelt und publiziert [96].

Das Grundprinzip dieser Methode ist der modifizierte Edman-Abbau mit Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPICTC), anschließender Acetonisierung und Analyse der Hydantoine mittels GC-MS/MS.

7.2.1 AA-Hämoglobin-Addukte

In allen 123 Blutproben konnten die Hb-Addukte AAV und GAV nachgewiesen werden.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der AA-Hb-Addukt-Bestimmung in Form von Boxplots und stellt Raucher ($n = 32$) und Nichtraucher ($n = 91$) gegenüber.

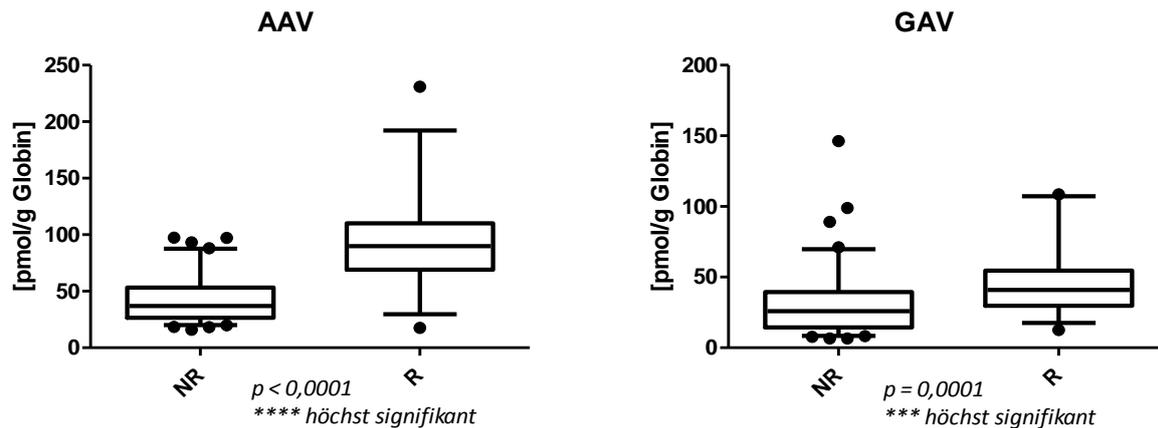


Abb. 30: Ergebnisse der AA-Hb-Addukt-Bestimmung (Boxplots)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. Bzw. 5. Perzentils

Der Vergleich der Hb-Addukt-Werte von Rauchern und Nichtrauchern im Mann-Whitney-U-Test (Software: GraphPad Prism, nicht parametrischer t-Test; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) ergibt, dass sich die zentrale Tendenz im untersuchten Kollektiv höchst signifikant ($p \leq 0,0001$) unterscheidet. Dies bestätigt bereits publizierte Daten [96,99,104,107].

Tabelle 25 gibt die Zahlenwerte der oben in graphischer Form präsentierten Ergebnisse wieder und die Nachweisgrenzen definiert als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis in $\mu\text{g N-Alkylvalin/L Formamid}$ und umgerechnet in pmol/g Globin .

Tabelle 25: Tabellarische Übersicht über die Hb-Adduktwerte im Allgemeinbevölkerungskollektiv

	NWG		Proben > NWG [%]	Nichtraucher (NR) n = 91	Raucher (R) n = 32
	[µg N- Alkylval in/L Forma mid]	~ [pmol/g Globin]		Median (Range) [pmol/g Globin]	Median (Range) [pmol/g Globin]
AAV	0,01	2	100	33,1 ± 20,2 (16,0 – 97,4)	89,9 ± 42,8 (17,6 – 230,8)
GAV	0,01	2	100	26,0 ± 22,8 (6,6 – 146,3)	40,9 ± 22,0 (12,6 – 108,7)

Diese Daten bestätigen bisherige Daten für Raucher und Nichtraucher aus der Allgemeinbevölkerung (siehe auch Tabelle 3).

Schettgen *et al.* ermittelten für Nichtraucher bzw. Raucher Median AAV-Werte von 18 pmol/g Globin (Nichtraucher) und 83 pmol/g Globin (Raucher) und GAV-Werte für Nichtraucher bzw. Raucher von 18 pmol/g Globin (Nichtraucher) bzw. 44 pmol/g Globin (Raucher) [96]. Olesen *et al.* gaben für Nichtraucher bzw. Raucher Median AAV-Werte von 35 pmol/g Globin (Nichtraucher) und 122 pmol/g Globin (Raucher) und GAV-Werte für Nichtraucher bzw. Raucher von 21 pmol/g Globin (Nichtraucher) bzw. 60 pmol/g Globin (Raucher) an [107]. Der BLW (Neurotoxizität) mit 550 pmol AAV/g Globin wurde in keiner Probe überschritten. Der BAR von 50 pmol/g Globin für Nichtraucher wurde von 26 der 91 Nichtraucher-Proben überschritten (das 95. Perzentil liegt in diesem Kollektiv auch mit 85,1 pmol/g Globin höher).

7.2.2 AN-Hämoglobin-Addukte

In fast allen 123 Blutproben konnten die AN-Hb-Addukte nachgewiesen werden. Lediglich in 3 Nichtraucherproben lagen HEV bzw. CEV unterhalb der entsprechenden Nachweisgrenzen (siehe Tabelle 26).

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der CEV- und HEV-Bestimmung in Form von Boxplots und stellt Raucher (n = 32) und Nichtraucher (n = 91) gegenüber.

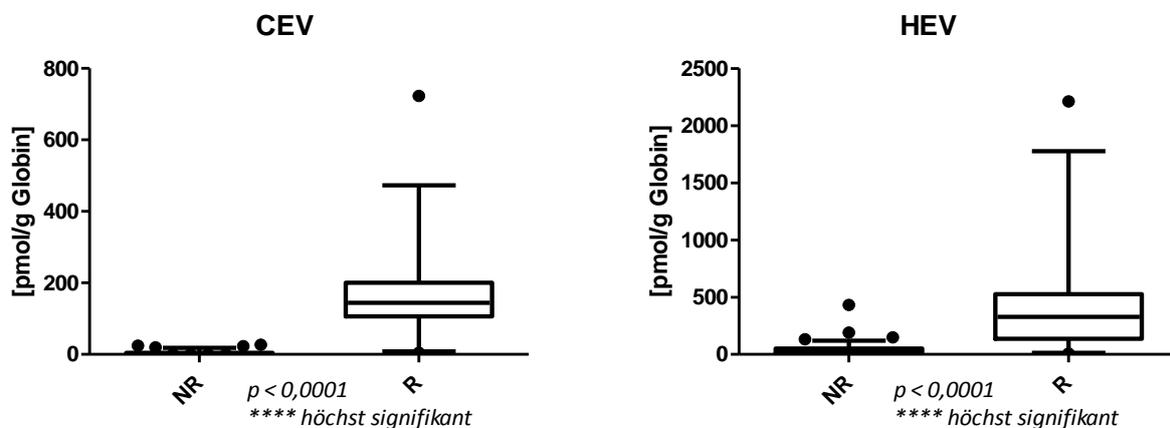


Abb. 31: Ergebnisse der AN-Hb-Addukt-Bestimmung (Boxplots)

NR = Nichtraucher; R = Raucher

Obere Balken: 95. Perzentil, Unterer Balken: 5. Perzentil, Box: 25. – 75. Perzentil, Balken in der Box: Median, evt. Punkte: Werte oberhalb bzw. unterhalb des 95. bzw. 5. Perzentils

Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Der Vergleich der CEV- und HEV-Werte von Rauchern und Nichtrauchern im Mann-Whitney-U-Test (Software: GraphPad Prism, nicht parametrischer t-Test; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test) ergibt, dass sich die zentrale Tendenz im untersuchten Kollektiv höchst signifikant ($p \leq 0,0001$) unterscheidet. Dies bestätigt ebenfalls bereits publizierte Daten [70,157].

Tabelle 26 gibt die Zahlenwerte der oben in graphischer Form präsentierten Ergebnisse wieder und die Nachweisgrenzen definiert als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis in μg N-Alkylvalin/L Formamid und umgerechnet in pmol/g Globin.

Tabelle 26: Tabellarische Übersicht über die Hb-Adduktwerte im Allgemeinbevölkerungskollektiv

	NWG		Proben > NWG [%]	Nichtraucher (NR) n = 91	Raucher (R) n = 32
	[μg N- Alkylval in/L Forma mid]	~ [pmol/g Globin]		Median (Range) [pmol/g Globin]	Median (Range) [pmol/g Globin]
CEV	0,01	0,5	99	3,2 \pm 5,0 (<NWG – 27)	144,0 \pm 127,7 (4,3 – 723,0)
HEV	0,05	2	98	31,5 \pm 52,1 (< NWG – 432,1)	327,9 \pm 431,9 (6,7 – 2211,5)

Diese Daten bestätigen bisherige Daten für Raucher und Nichtraucher aus der Allgemeinbevölkerung (siehe auch Tabelle 8). Unter anderem ermittelten Schettgen *et al.* für Nichtraucher CEV-Werte von < 4 pmol/g Globin und für Raucher 131 pmol/g Globin und HEV-Werte von 77 pmol/g Globin (Nichtraucher) und 175 pmol/g Globin (Raucher) [70]. Der BAR für AN liegt bei 10 pmol/g Globin (das 95. Perzentil liegt in der Begründung des BAR bei < 4 pmol/g Globin) [143]. Die Werte dieser Studie stimmen mit denen aus der BAR-Begründung überein.

7.3 Oxidativer und reduktiver Metabolismus

7.3.1 Acrylamid

Relevant bei der Bewertung des AA-Metabolismus sind die reduktiven Kurzzeitexpositionsmarker AAMA und AAMA-SO₂ sowie die oxidativen Kurzzeitexpositionsmarker GAMA und iso-GAMA. OH-PA als ebenfalls oxidativer Urinmetabolit wird in dieser Betrachtung außer Acht gelassen, da der Biomarker nicht abschließend beurteilt werden kann.

Diese Daten werden mit den Hb-Addukt-Ergebnissen verglichen. Hierbei wird für die Langzeitexpositionsmarker das Verhältnis des oxidativen Hb-Addukts AAV zum reduktiven Hb-Addukt GAV untersucht.

7.3.1.1 Kurzzeitmarker

Abbildung 32 zeigt die Auftragung der oxidativen (Σ GA-Merkaptursäuren = GAMA + iso-GAMA) gegen die reduktiven (Σ AA-Merkaptursäuren = AAMA + AAMA-SO₂) Merkaptursäuren.

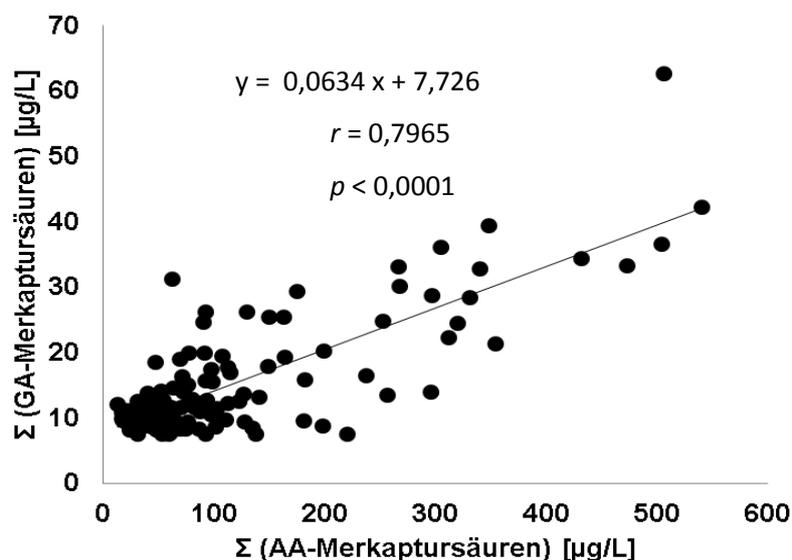


Abb. 32: Korrelation der Summe der GA-Merkaptursäuren (GAMA und iso-GAMA) und AA-Merkaptursäuren (AAMA und AAMA-SO₂)

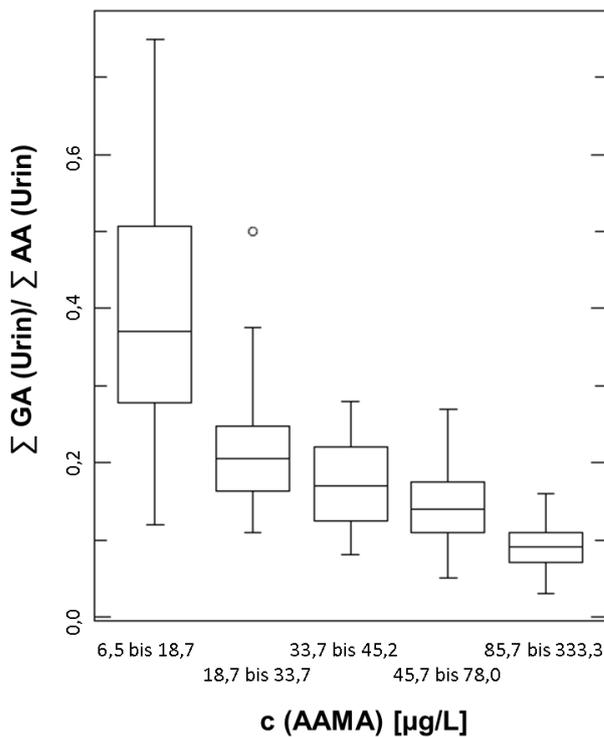
Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Die aufgetragenen Konzentrationen korrelieren gut auf einem höchst signifikanten Niveau ($r = 0,7824$; Software: GraphPad Prism, Pearson-Korrelation; Konfidenzintervall 95 %; zweiseitiger Test). Die GA-Merkaptursäuren nehmen ca. 7 % der AA-Merkaptursäuren ein (Steigung $m = 0,073$).

Das Kollektiv aus 126 Personen wurde aufgrund der AA-Exposition in 5 Gruppen mit jeweils 24 bzw. 25 Personen unterteilt. Das Verhältnis der oxidativen zu den reduktiven Metaboliten im Urin für AA wurde bestimmt. Hiermit sollte bestimmt werden, ob sich das Verhältnis der oxidativen zu reduktiven Metaboliten bei unterschiedlicher Exposition verschiebt.

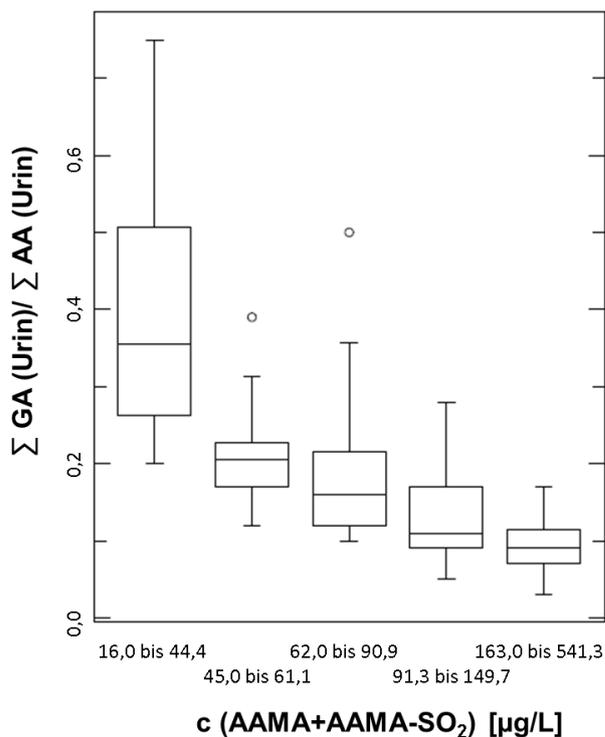
Diese Betrachtung erfolgt für die Kurzzeitexpositionsmarker durch AAMA (Abb. 33) und die Summe der beiden reduktiven Merkaptursäuren AAMA und AAMA-SO₂ (Abb. 35) als Größe für die zurückliegende AA-Exposition der letzten Tage.

Die Mediane der einzelnen Gruppen sinken mit steigender AA-Exposition und unterschieden sich signifikant für beide Szenarien voneinander ($p < 0,0001$) (Software: GraphPad Prism, Kruskal-Wallis-Test).



Bereich AAMA [µg/L Urin]	$\frac{\Sigma(\text{GAMA}+\text{iso-GAMA})}{\Sigma(\text{AAMA}+\text{AAMA-SO}_2)}$ (Median)
6,5 – 18,7	0,37
18,7 – 33,7	0,21
33,7 – 45,2	0,17
45,7 – 78,0	0,14
85,7 – 333,3	0,09

Abb. 33: Vergleich der 5 Expositionsguppen AA (sortiert nach Kurzzeitexpositionsmarker AAMA) in Boxplotform und tabellarisch



Bereich $\Sigma(\text{AAMA}+\text{AAMA-SO}_2)$ [µg/L Urin]	$\frac{\Sigma(\text{GAMA}+\text{iso-GAMA})}{\Sigma(\text{AAMA}+\text{AAMA-SO}_2)}$ (Median)
16,0 – 44,4	0,35
45,0 – 61,1	0,21
62,0 – 90,9	0,16
91,3 – 149,7	0,11
163,0 – 541,3	0,09

Abb. 34: Vergleich der 5 Expositionsguppen AA (sortiert nach der Summe der Kurzzeitexpositionsmarker AAMA und AAMA-SO₂) in Boxplotform und tabellarisch

Werte kleiner Nachweisgrenze sind in beiden Fällen als Wert der Nachweisgrenze eingesetzt worden (siehe Anhang).

Ergänzend hierzu zeigt Abbildung 35 die Auftragung der Summe der GA-Merkaptursäuren im Verhältnis zu den AA-Merkaptursäuren (oxidativer zu reduktiver Metabolismus) gegen die AA-Exposition der letzten 2 – 5 Tage (repräsentiert durch die Summe der reduktiven Merkapto-säuren AAMA und AAMA-SO₂).

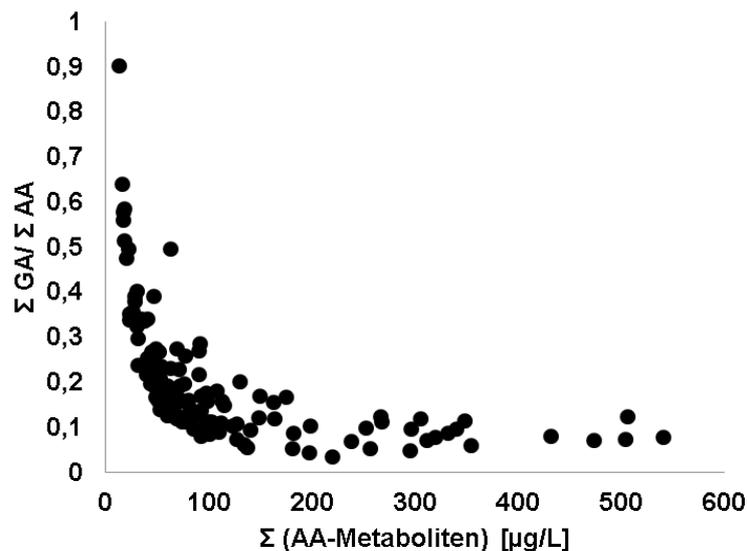
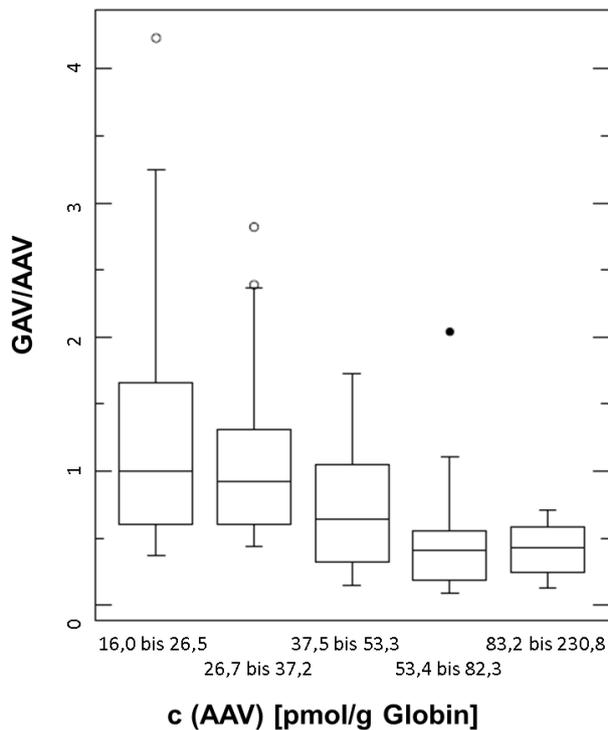


Abb. 35: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Merkapto-säuren gegen die AA-Exposition (repräsentiert durch die Summe der Merkapto-säuren AAMA und AAMA-SO₂)

Die Daten aller drei Abbildungen zeigen deutlich, dass mit steigender AA-Exposition das Ausmaß der Oxidation von AA zu GA relativ gesehen sinkt. Als möglicher Grund kann die Sättigung des oxidierenden Enzyms CYP2E1 genannt werden. Ob eine Anpassung (Regulation von CYP2E1) des Menschen für die Kurzzeitmarker in Betracht gezogen werden kann ist fraglich. Diskutiert werden kann auch, dass viele Menschen aufgrund des Lebenswandels eine relativ gleichbleibende AA-Exposition aufweisen (Tabakrauch oder allgemein hoher Konsum AA-haltiger Lebensmittel).

7.3.1.2 Langzeitmarker

Das Kollektiv aus 126 Personen wurde ebenfalls aufgrund der AA-Exposition (gemessen an AAV) in 5 Gruppen mit jeweils 24 bzw. 25 Personen unterteilt. Das Verhältnis der oxidativen zu den reduktiven Langzeitexpositionsmarker (GAV zu AAV) wurde ermittelt (Abbildung 36).



Bereich AAV [pmol/g Globin]	GAV/AAV (Median)
16,0 – 26,5	1,01
26,7 – 37,2	0,93
37,5 – 53,3	0,64
53,4 – 82,3	0,41
83,2 – 230,8	0,43

Abb. 36: Vergleich der 5 Expositionsgruppen AA (sortiert nach Langzeitexpositionsmarker AAV) in Boxplotform und tabellarisch

Die Mediane der einzelnen Gruppen sinken mit steigender AA-Exposition und unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,0001$) (Software: GraphPad Prism, Kruskal-Wallis-Test).

In den letzten beiden Expositionsgruppen liegen die GAV/AAV-Mediane bei 0,41 bzw. 0,43 scheinen somit in diesem Bereich zu stagnieren.

Ergänzend hierzu zeigt Abbildung 37 die Auftragung des GAV/AAV-Verhältnisses (sprich: oxidativer zu reduktiver Metabolismus;

Langzeitexpositionsmarker) gegen die AA-Exposition der letzten 120 Tage (repräsentiert durch die AAV-Level im Blut).

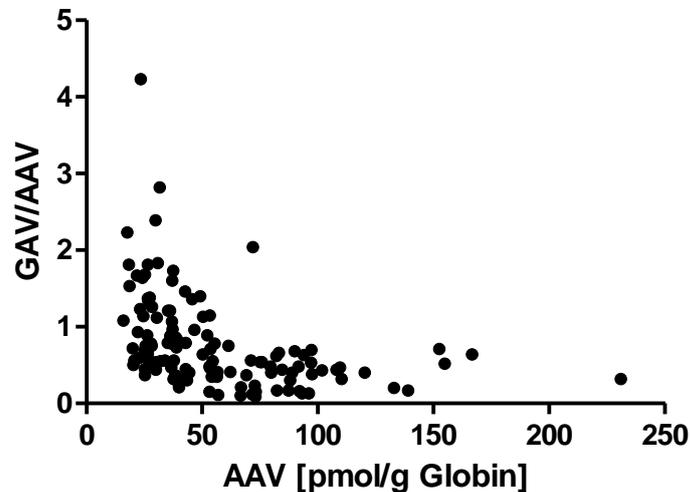


Abb. 37: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Hb-Addukte gegen die AA-Exposition (repräsentiert durch AAV)

Die Daten beider Abbildungen zeigen deutlich, dass mit steigender AA-Exposition das Ausmaß der Oxidation von AA zu GA relativ gesehen sinkt.

Als möglicher Grund kann zum einen die Sättigung des oxidierenden Enzyms CYP2E1 genannt werden. Denkbar ist auch eine Gewöhnung bzw. Anpassung des Menschen. Bei höherer langfristiger AA-Exposition könnte eine Regulation von CYP2E1 erfolgen, um die GA-Bildung zu reduzieren.

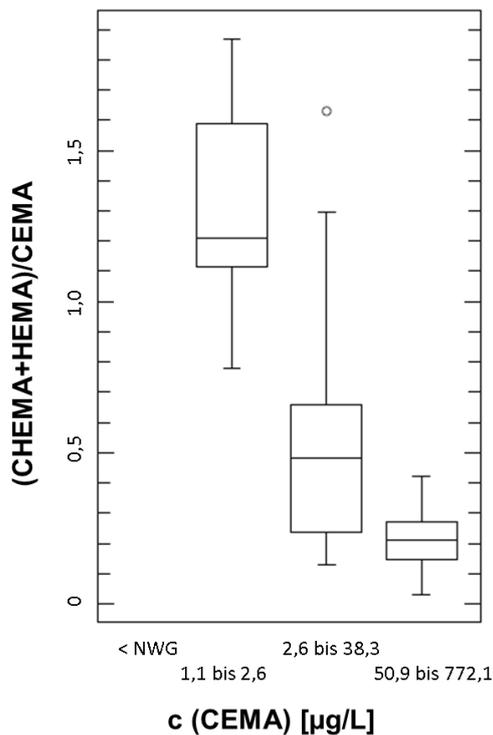
7.3.2 Acrylnitril

Analog zur Bewertung des AA-Metabolismus' werden für den AN-Metabolismus der reduktiven Kurzzeitexpositionsmarker CEMA sowie die oxidativen Kurzzeitexpositionsmarker CHEMA und HEMA gegenübergestellt.

Diese Daten werden erneut mit den Hb-Addukt-Ergebnissen verglichen. Hierbei wird für die Langzeitexpositionsmarker das Verhältnis des oxidativen Hb-Addukts HEV zum reduktiven Hb-Addukt CEV untersucht. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass erstens viele unspezifische Metaboliten entstehen, die nicht erfasst werden und zweitens, dass HEMA und HEV auch weitere Quellen aufweisen (Ethylen, Ethylenoxid) und somit ebenfalls keine spezifischen Biomarker darstellen.

7.3.2.1 Kurzzeitmarker

Für die Urinmetaboliten CEMA, CHEMA und HEMA wurden nur drei bzw. vier Gruppen aufgrund der Exposition gebildet (Abb. 38). Die erste Gruppe beinhaltet dabei alle Werte < NWG für CEMA von 1 µg/L und wurde somit nicht ausgewertet. Die weiteren Gruppen beinhalten erneut 25 Personen. Das Verhältnis der oxidativen (CHEMA + HEMA) zu reduktiven (CEMA) Mercaptursäuren wurde gebildet.



Bereich CEMA [µg/L Urin]	$\Sigma(\text{CHEMA}+\text{HEMA})/\text{CEMA}$ (Median)
< NWG (n = 51)	-
1,1 – 2,6	1,21
2,6 – 38	0,46
51 – 772	0,20

Abb. 38: Vergleich der 2 Expositionsgruppen AN (sortiert nach Kurzzeitexpositionsmarker CEMA) in Boxplotform und tabellarisch

Für die statistische Auswertung, sind Werte < NWG sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

Die Mediane der einzelnen Gruppen sinken mit steigender AN-Exposition und unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,0001$) (Software: GraphPad Prism, Kruskal-Wallis-Test).

Ergänzend hierzu zeigt Abbildung 39 die Auftragung des (CHEMA+HEMA)/CEMA-Verhältnisses (sprich: oxidativer zu reduktiver Metabolismus) gegen die AN-Exposition der Raucher der letzten 2 – 5 Tage.

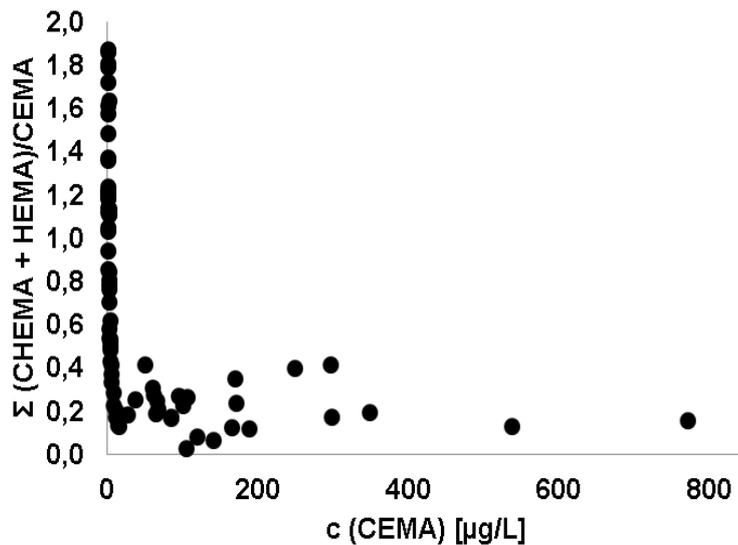


Abb. 39: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Mercaptursäuren gegen die AN-Exposition (repräsentiert durch CEMA)

Für die statistische Auswertung, sind Werte $< \text{NWG}$ sind als Wert der entsprechenden NWG eingesetzt worden (siehe Anhang).

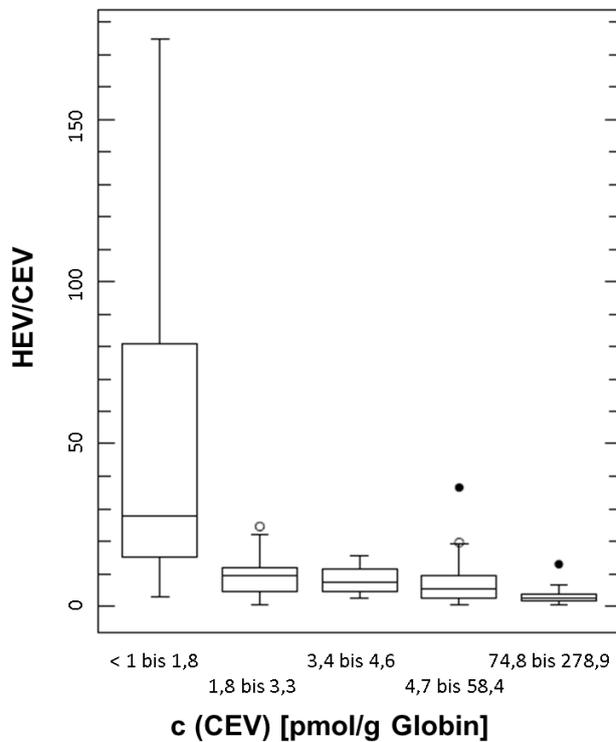
Auch hierbei ist eine Tendenz zu erkennen, dass sich bei steigender Exposition das Ausmaß des oxidativen Metabolismus verschiebt. Bei den Rauchern bzw. höheren Expositionen ab ca. $20 \mu\text{g CEMA/L}$ Urin ist dieser Trend jedoch nicht so ausgeprägt, wie die obigen Daten (Abb. 38) vermuten lassen.

Erklärt werden kann das insbesondere, dass im AN-Metabolismus viele weitere unspezifische Metaboliten aus 2-CHEMA entstehen, die im Tierversuch 8 % (Mäuse) bzw. 24 % (Ratten) ausmachen (siehe Tabelle 7). Somit wird ein großer Teil des oxidativen Metabolismuspfad durch diese Betrachtung nicht erfasst. Allgemein ist der Stichprobenumfang für die AN-Kurzzeitmarkern oberhalb der Nachweisgrenze um einiges kleiner als aus den analogen Betrachtungen für AA.

7.3.2.2 Langzeitmarker

Für die Langzeitexpositionsmarker wurden analog zur Betrachtung der AA-Biomarker 5 Gruppen aufgrund der Exposition der letzten 120 Tage (repräsentiert durch CEV) gebildet.

Das Verhältnis der oxidativen zu den reduktiven Langzeitexpositionsmarker (HEV zu CEV) wurde ermittelt (Abbildung 40). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass HEV kein spezifischer AN-Biomarker ist, da es auch nach einer Ethylen- und Ethylenoxidexposition gebildet wird.



Bereich CEV [pmol/g Globin]	HEV/CEV (Median)
< NWG – 1,8	27,8
1,8 – 3,3	9,5
3,4 – 4,6	7,3
4,7 – 58,4	5,5
74,8 – 278,9	2,3

Abb. 40: Vergleich der 5 Expositionsguppen AN (sortiert nach Langzeitexpositionsmarker CEV) in Boxplotform und tabellarisch

*Die höchsten Raucherproben mit CEV = 306 bzw. 723 pmol/g Globin und HEV = 2211 bzw. 1486 pmol/g Globin wurden in dieser Grafik verworfen, da eine Ethylenoxidexposition bei beiden Personen aufgrund stark erhöhter HEV-Werte nicht ausgeschlossen werden kann (Beruf: Bauarbeiter).

Die Mediane der einzelnen Gruppen sinken mit steigender AN-Exposition und unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,0001$) (Software: GraphPad Prism, Kruskal-Wallis-Test).

Ergänzend hierzu zeigt Abbildung 41 die Auftragung des HEV/CEV-Verhältnisses (sprich: oxidativer zu reduktiver Metabolismus) gegen die AN-Exposition der letzten 120 Tage (repräsentiert durch die CEV-Level im Blut).

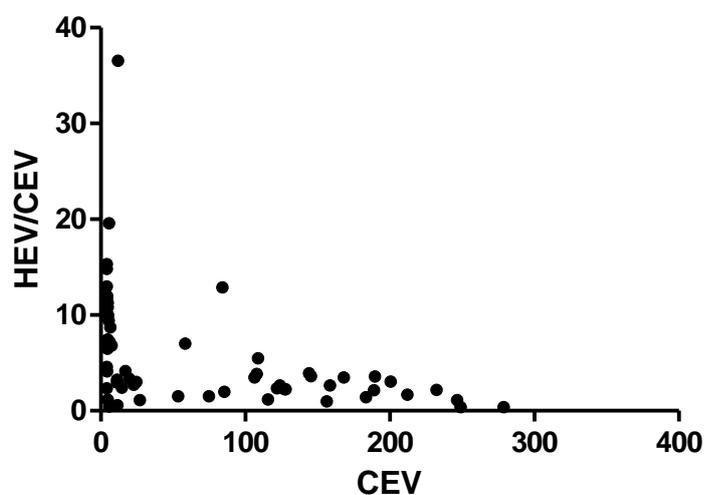


Abb. 41: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Hb-Addukte gegen die AN-Exposition (repräsentiert durch CEV)

**Die höchsten Raucherproben mit CEV = 306 bzw. 723 pmol/g Globin und HEV = 2211 bzw. 1486 pmol/g Globin wurden in dieser Grafik verworfen, da eine Ethylenoxidexposition bei beiden Personen aufgrund stark erhöhter HEV-Werte nicht ausgeschlossen werden kann (Beruf: Bauarbeiter).*

Auch beim Vergleich des Ausmaßes der Oxidation von Acrylnitril sieht man, dass sich das Verhältnis bei hoher Exposition zugunsten des reduktiven Hb-Adduktes (CEV) verschiebt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass HEV (oxidatives unspezifisches Hb-Addukt) auch durch Ethylenoxid im Zigarettenrauch gebildet wird.

7.3.3 Zusammenfassung: Betrachtung oxidativer und reduktiver Metabolismus

AA

Allgemein fällt auf, dass die GA/AA-Verhältnisse für die Langzeitexpositionsmarker (Mediane 0,4 – 1,0; einzelne Werte bis 4) höher sind als die der Kurzzeitexpositionsmarker (Mediane 0,09 bis 0,4; einzelne Werte bis 0,6). Aufgrund der hohen Reaktivität von GA wird eventuell die nucleophile Addition an Protein bevorzugt stattfinden, sodass sich schneller GAV bildet bevor es zu einer Kopplung und somit Entgiftung über Glutathion kommen kann.

Für Kurz- und Langzeitexpositionsmarker jedoch zeigt sich, dass mit steigender AA-Exposition das Ausmaß der Oxidation relativ gesehen sinkt.

Als eventuelle Gründe können hierbei eine Sättigung des oxidierenden Enzyms CYP2E1 oder eine Anpassung des Menschen aufgrund der erhöhten Exposition genannt werden.

AN

Analoge Tendenzen findet man bei der Betrachtung des AN-Metabolismus. Für die Langzeitexpositionsmarker liegt das CEO/AN-Verhältnis im Median zwischen 27,8 und 2,3. Auch hierbei sinkt das Verhältnis bei höherer Exposition. Für die Kurzzeitexpositionsmarker im AN-Metabolismus findet man eine analoge Tendenz. Jedoch entstehen insbesondere bei den Kurzzeitexpositionsmarkern aus 2-CHEMA weitere unspezifische Metaboliten, die im Tierversuch bis zu 24 % ausmachen. Humandaten zu diesen weiteren Metaboliten liegen nicht vor. Auch im AN-Metabolismus liegen die CEO/AN-Verhältnisse der Langzeitexpositionsmarkern (2,3 bis 27,8) höher als die der Kurzzeitexpositionsmarker (0,2 – 1,2).

8 UNTERSUCHUNG DER ACRYLAMID-BELASTUNG VON LABORBESCHÄFTIGTEN

Ein berufliches Kollektiv aus Labormitarbeitern wurde analog untersucht (n = 15) und aufgrund der unterschiedlichen potentiellen Belastung in vier Gruppen unterteilt.

Zwei dieser Personen arbeiten bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen mit monomerem Acrylamid und polymerisieren im Labormaßstab selbst (Gruppe 1). Weitere drei Personen arbeiten mit fertigen Polyacrylamiden, welche Restmonomergehalte < 0,1 % aufweisen (Herstellerangaben) (Gruppe 2). Die restlichen Personen arbeiten im Labor, in denen mit fertigen Polyacrylamidgelen und monomeren Acrylamid gearbeitet wird (Gruppe 3; n = 6) oder im Büro (Gruppe 4; n = 4) als direktes Vergleichskollektiv. Die Arbeitsschutzmaßnahmen wurden bei einer ersten Besichtigung eingehalten. Bei der Verwendung von AA wurde unter einem Abzug gearbeitet, welcher regelmäßig überprüft und von einer Firma gewartet wurde. Die persönliche Schutzausrüstung bestehend aus Kittel, Schutzbrille und Handschuhen wurde bei den Arbeiten nach eigenen Angaben angelegt.

Von den Personen wurden jeweils drei Urinproben genommen (Vorschicht Tag 1, Nachschicht Tag 1, Vorschicht Tag 2), um einen eventuellen Effekt des Anstiegs zu beobachten und die Kinetik bzw. die unterschiedlichen Halbwertszeiten für die verschiedenen Kurzzeitexpositionsmarker abdecken zu können (von 4 Personen liegt nur eine Urinprobe vor, weitere Probenahme aufgrund von Arbeitsstellenwechsel waren nicht möglich, eine Person gab nur 2 Urinproben ab). Hierbei wurde darauf geachtet, dass diese Probenahme an einem Aufarbeitungstag (d.h. potentieller Kontakt mit dem Gefahrstoff am Arbeitsplatz) erfolgte.

Durch Fragebögen wurde analog zum Allgemeinbevölkerungskollektiv die ernährungs- bzw. tabakrauchbedingte AA- bzw. AN-Aufnahme erfasst. Zusätzlich wurde auch der Raucherstatus durch Messung von Nikotin und den beiden Metaboliten Cotinin und 3-Hydroxycotinin sowie den AN-Merkaptursäuren verifiziert.

Für eine etwaige Langzeitexposition wurden die Hb-Addukte im Blut (n = 13) untersucht.

8.1 Kurzzeitmarker

Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der Merkaptursäurenbestimmung im beruflichen Kollektiv. Untersucht wurden alle 32 Urinproben der 15 Beschäftigten.

Tabelle 27: Übersicht der Merkaptursäureenergebnisse im beruflichen Kollektiv

	NWG [µg/L]	Nichtraucher (NR) n = 10 (21 Proben)	Raucher (R) n = 5 (11 Proben)	NR Allgemeinbevölkerung (diese Studie)
		Median ± Standard- abweichung (Bereich) [µg/L]	Median ± Standard- abweichung (Bereich) [µg/L]	Median ± Standard- abweichung [µg/L]
AAMA	1,0	19,9 ± 19,6 (6,9 – 84,2)	66,9 ± 42,6 (21,5 – 171,1)	33,7 ± 27,6
AAMA- SO ₂	5,0	15,4 ± 18,1 (< NWG – 72,1)	42,5 ± 43,6 (23,1 – 159,6)	28,7 ± 26,3
GAMA	5,0	< NWG (< NWG – 10,5)	8,8 ± 7,1 (< NWG – 26,1)	< NWG
Iso- GAMA	2,5	4,5 ± 0,7 (< NWG – 5,6)	4,3 ± 2,0 (< NWG – 10,1)	4,8 ± 1,9

Die Mercaptursäurekonzentrationen der AA-Mercaptursäuren in den Urinproben der potentiell beruflich belasteten Personen liegen mit Medianwerten von 19,9 µg/L (AAMA), 15,4 µg/L (AAMA-SO₂), < 5,0 µg/L (GAMA) und 4,5 µg/L (iso-GAMA) der Nichtraucher eher niedriger als in den Proben der Allgemeinbevölkerung (siehe letzte Spalte).

In den untersuchten Kurzzeitmarkern gibt es somit keinen Hinweis auf eine erhöhte AA-Belastung aufgrund des Arbeitens mit monomerem AA oder mit Polyacrylamid. Auch bei Betrachtung der einzelnen Werte der Personen, die mit AA arbeiten, liegt kein signifikanter Unterschied zu den Daten aus der Allgemeinbevölkerung vor.

Exemplarisch sind in Abbildung 42 die kompletten Vor- und Nachschichtergebnisse von fünf Personen (3 potentiell belastet und 2 Kontrollen) der AAMA-Bestimmung dargestellt. Bei Person 1, 2 und 4 sieht man einen leichten Anstieg von der Vorschicht zur Nachschichtprobe und einen Abfall zur Vorschichtprobe Tag 2. Jedoch sind alle einzelnen Werte im Bereich der Allgemeinbevölkerung. Es gibt keinen Hinweis auf eine erhöhte AA-Exposition am Arbeitsplatz. Person 2 weist den stärksten Anstieg auf, jedoch handelt es sich dabei um einen Raucher. Somit kann zum Einen der Tabakkonsum eine Erklärung für den stärkeren Anstieg sein. Auch andere AA-Quellen wie die Aufnahme stark AA-haltiger Nahrung (Müsli zum Frühstück etc.) können zu diesem leichten Anstieg geführt haben.

Hinweis: die Daten in Abb. 42 sind zum Ausgleich des unterschiedlichen bzw. ungleichmäßigen Trinkverhaltens über den Tag hinweg kreatininangepasst dargestellt.

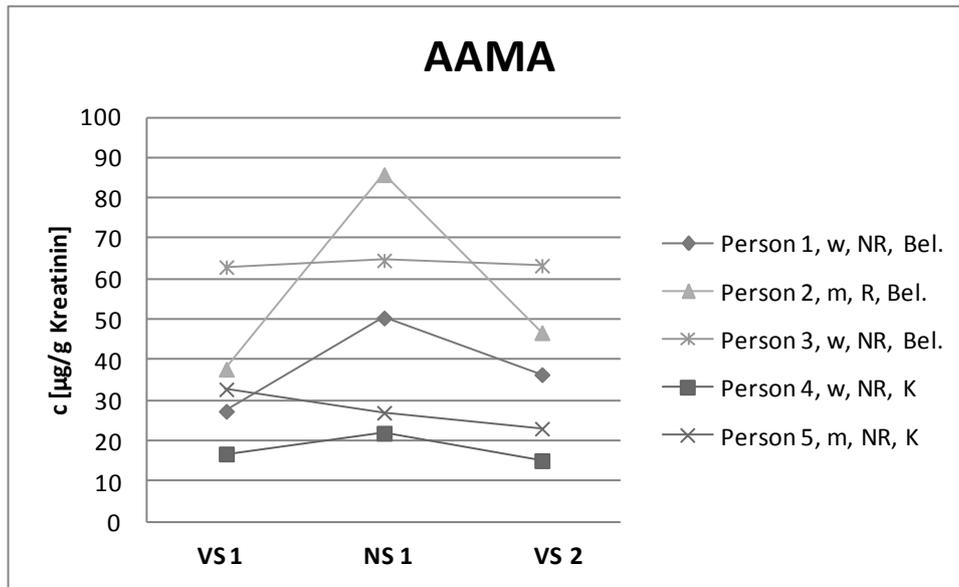


Abb. 42: Verlauf der AAMA-Ausscheidung von fünf Personen des beruflichen Kollektivs (VS 1: Vorschicht Tag 1; NS 1: Nachschicht Tag 1, VS 2: Vorschicht Tag 2)

Bel. = potentiell belastet, d.h. Arbeit mit AA und/oder PAGE

K = Kontrolle (Arbeit im Labor, aber nicht mit AA und/oder PAGE)

NR = Nichtraucher

R = Raucher

Der BAR von 100 µg AAMA/g Kreatinin wurde in einer der Nichtraucher-Proben des beruflichen Kollektivs überschritten (129 µg/g Kreatinin). Diese Person hat nur eine Urinprobe abgegeben, so dass kein Abgleich mit anderen Vor- oder Nachschichtwerten erfolgen kann. Der/die Arbeiternehmer/in geht allgemeinen Laborarbeiten nach und arbeitet nicht mit AA oder PAGE. Der Wert des Langzeitexpositionsmarkers AAV dieser Person liegt mit 33 pmol/g Globin unterhalb des BAR (Blut) von 50 pmol/g Globin (siehe 8.2). Da jedoch der Wert nur leicht oberhalb des BAR (Urin) (und somit dem 95. Perzentil aus der Allgemeinbevölkerung) liegt, ist auch eine Exposition durch die Nahrung realistisch (Verzehr von Pommes Frites oder ähnliche Szenarien).

Eine Exposition durch Rauchen von Tabakerzeugnissen wurde durch die Messung von Nikotin, Cotinin und 3-OH-Cotinin ausgeschlossen.

8.2 Langzeitmarker

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der Hb-Adduktbestimmung in den 13 Blutproben des beruflichen Kollektivs.

Tabelle 28: Tabellarische Übersicht über die Hb-Adduktwerte im beruflichen Kollektiv

NWG [pmol/ g Globin]		Nichtraucher (NR) n = 9	Raucher (R) n = 4	NR Allgemeinbevölkerung (diese Studie)
		Median ± Standard- abweichung (Bereich) [pmol/g Globin]	Median ± Standard- abweichung (Bereich) [pmol/g Globin]	Median ± Standard- abweichung [pmol/g Globin]
AAV	2	35,5 ± 10,6 (25,1 – 56,1)	130,3 ± 31,3 (75,7 – 143,3)	33,1 ± 20,2
GAV	2	18,3 ± 4,4 (10,8 – 24,5)	41,2 ± 17,6 (22,5 – 65,4)	26,0 ± 22,8

Auch die Werte der Langzeitexpositionsmarker der potentiell beruflich AA-belasteten Personen liegen im Bereich der Werte der Allgemeinbevölkerung. Beim Betrachten einzelner Werte der Personen, die mit AA arbeiten, gibt es ebenfalls keinen Hinweis auf eine erhöhte AA-Belastung.

Die Werte liegen alle weit unterhalb des BLWs (Neurotoxizität) von 550 pmol/g Globin. Zwei Nichtraucher-Werte liegen mit 51 bzw. 56 pmol/g Globin leicht oberhalb des BAR von 50 pmol/g Globin. Der BAR (als 95. Perzentil der

Allgemeinbevölkerung) wird auch von einzelnen Nichtraucher-Proben aus der beruflich nicht AA-belasteten Allgemeinbevölkerung überschritten.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 126 Proben (123 Blutproben) aus der Allgemeinbevölkerung auf die Metabolitenkonzentrationen von Acrylamid (AA) und Acrylnitril (AN) in Blut (Langzeitexpositionsmarker) und Urin (Kurzzeitexpositionsmarker) zur Beurteilung des Ausmaßes der Oxidation beider Gefahrstoffe analysiert.

Dazu wurden zwei Methoden für die Bestimmung der Merkaptursäuren und von OH-PA entwickelt und validiert und eine bereits etablierte Methode für die Bestimmung der Hb-Addukte auf das gleiche Kollektiv angewendet.

Dies ist die erste Studie, in der OH-PA in der Allgemeinbevölkerung gemessen wurde. OH-PA erwies sich als ungeeigneter Marker für eine AA- bzw. GA-Exposition, da die Werte im Vergleich zu Metabolismusdaten höher sind als erwartet. Zudem sanken die Werte im Verlauf zweier Fastenstudien mit drei Personen nicht so weit ab, wie die entsprechenden Merkaptursäuren. Auch der für andere AA und AN Metaboliten bekannte signifikante Unterschied für Raucher und Nichtraucher konnte für OH-PA nicht bestätigt werden. OH-PA wurde somit in die Auswertung nicht einbezogen, da es aufgrund der bisherigen Datenlage nicht abschließend beurteilt werden kann.

Die Merkaptursäurenmethode ist die erste Methode, zur simultanen Quantifizierung der AA- und AN-Merkaptursäuren AAMA, AAMA-SO₂, GAMA, iso-GAMA, CEMA, CHEMA und HEMA.

In der Literatur beschriebene signifikante Unterschiede in den Metabolitenausscheidungen von Rauchern und Nichtrauchern wurden für AAV, GAV, CEV, HEV und AAMA, GAMA und CEMA bestätigt.

Tabellen 29 und 30 zeigen in einer Übersicht die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Daten im Vergleich zu bisher publizierten Literaturdaten der Allgemeinbevölkerung (Auszug aus Tabellen 3, 5 und 8).

Tabelle 29: Vergleich der erhaltenen Daten für Acrylamid mit Literaturdaten

Studie	AAV	GAV	AAMA	AAMA-SO ₂	GAMA	Iso-GAMA	OH-PA
	Median [pmol/g Globin]		Median [µg/L]				
<i>Diese Studie</i>	33,1 (NR) 89,9 (R)	26,0 (NR) 40,9 (R)	33,7 (NR) 107,1 (R)	28,7 (NR) 103,8 (R)	< 5 (NR) 14,9 (R)	4,8 (NR) 6,1 (R)	33,5 (NR) 44,7 (R)
Bjellaas 2007 [104,120]	37 (NR) 166 (R)	18 (NR) 83 (R)	32 (NR) 184 (R)	-	3 (NR) 10 (R)	-	-
Olesen 2008 [108]	35 (NR) 122 (R)	21 (NR) 60 (R)	-	-	-	-	-
Boettcher 2005 [118]	-	-	29 (NR) 127 (R)	-	5 (NR) 19 (R)	-	-
Hartmann 2008 [106]	30 (NR)	34 (NR)	29 (NR)	-	7 (NR)	-	-
Kopp 2009 Dissertation [119]	-	-	39 (NR) 165 (R)	30 (NR) 121 (R)	9 (NR) 25 (R)	-	-

Tabelle 30: Vergleich der erhaltenen Daten für Acrylnitril mit Literaturdaten

Studie	CEV	HEV	CEMA	CHEMA	HEMA
	Median [pmol/g Globin]		Median [$\mu\text{g/L}$]		
<i>Diese Studie</i>	3,2 (NR) 144,0 (R)	31,5 (NR) 327,9 (R)	< 1 (NR) 99,0 (R)	< 1 (NR) 15,9 (R)	< 1 (NR) 1,1 (R)
Schettgen 2002 [70]	< 4 (NR) 131 (R)	77 (NR) 175 (R)	-	-	-
Scherer 2007 [157]	6,5* (NR) 112* (R)	21* (NR) 132* (R)	-	-	-
Schettgen 2009 [156]	-	-	2 (NR) 240 (R)	-	2 (NR) 5 (R)
Wu 2012** [161]	-	-	2,6**	1,0**	2,4**
Schettgen 2012 [162]	-	-	1,9 (NR) 184 (R)	< 1 (NR) 29,3 (R)	-

* Mittelwert

**Wu et al. (2012) untersuchten 31 NR und 2 R und geben nur den Mittelwert aller Daten an in [$\mu\text{g/g}$ Kreatinin]

Es handelt sich hierbei um die bisher einzige Studie zur Untersuchung der oxidativen und reduktiven Langzeit- und Kurzzeitexpositionsmarker beider Substanzen in einem Kollektiv mit allen in Tabellen 29 und 30 aufgezeigten Metaboliten.

Der Vergleich mit Tierdaten zeigt, dass der oxidative Metabolismuspfad im Menschen weniger stark ausgeprägt zu sein scheint als in Nagern. Bei Mäusen ist die Kanzerogenität höher als bei Ratten, was sich auch in dem GAV/AAV Verhältnis widerspiegelt (Maus 5,4 vs. Ratte 1,75) [32,89-91,94]. Beim Menschen hingegen liegt das Verhältnis der Langzeitexpositionsmarker in dieser Studie mit 0,4 bis 1,0 (je nach Exposition) niedriger.

Auch bei den Kurzzeitexpositionsmarkern zeigen Tierversuche, dass bei Mäusen mit 21 % AAMA und 17 % GAMA das Verhältnis oxidative/reduktive Urinmetaboliten bei ca. 0,81 liegt, bei Ratten hingegen bei 0,37 [76]. In dieser Studie liegt das Verhältnis beim Menschen bei 0,09 bis 0,24 (je nach Exposition) und somit erneut niedriger.

Allgemein ist jedoch der Metabolismus beider Gefahrstoffe von Mensch und Ratte ähnlich und die Ergebnisse der Tierversuche mit Ratten können somit weiterhin für eine Risikoabschätzung herangezogen werden.

Bei höherer AA- bzw. AN-Exposition kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von oxidativen zum reduktiven Metabolismus zugunsten der reduktiven Metaboliten. Ob es hierbei zu einer Sättigung des oxidierenden Enzyms CYP2E1 kommt oder aber eine Regulation bzw. Anpassung aufgrund der erhöhten Exposition stattfindet, konnte bisher nicht geklärt werden.

Hierfür könnten als Ausblick ergänzende Betrachtungen über die individuelle CYP2E1-Aktivität und den GST-Status (Glutathion-S-Transferasen) im gleichen Kollektiv von 126 Personen Aufschluss geben. Mit Hilfe dieser Daten könnte

dann eine detailliertere Beurteilung bezüglich des Krebsrisikos des Menschen erfolgen.

10 LITERATUR

1. Angerer J. (2001) Das Biological Monitoring in der Arbeits- und Umweltmedizin - derzeitiger Stand und künftige Entwicklungen. In Biological Monitoring; Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin, DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), ed. (Weinheim: Wiley-VCH)
2. Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. November 2011 (BGBl. I S. 2370), die durch Artikel 2 Absatz 19 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 3044) geändert worden ist.
3. Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2011 (BGBl. I S. 1770), das durch Artikel 2 Absatz 17 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 3044) geändert worden ist.
4. Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.
5. Technische Regel für Gefahrstoffe (TRGS); Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/TRGS-900.pdf?blob=publicationFile&v=11, abgerufen am: 06.07.2013
6. DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2012) MAK- und BAT-Werte-Liste 2012, <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527666027>, abgerufen am: 20.12.2012
7. Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), Bekanntmachung zu Gefahrstoffen (BekGS) 910 "Risikowerte und Expositions-Risiko-Beziehungen für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen"; zuletzt geändert GMBI 2011 S. 194 [Nr. 10]
8. Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), Bekanntmachung zu Gefahrstoffen (BekGS) 911 "Fragen und Antworten zum Risikokonzept gemäß BekGS 910"
9. Technische Regel für Gefahrstoffe (TRGS) 710 "Biomonitoring" (aufgehoben)
10. Angerer J., Ewers U., and Wilhelm M. (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210: 201-228.

11. Technische Regel für Gefahrstoffe (TRGS) 903; Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), [http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/TRGS-903.pdf? blob=publicationFile&v=5](http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/TRGS-903.pdf?blob=publicationFile&v=5), abgerufen am: 06.07.2013
12. Needham L.L. and Sexton K.E.N. (2000) Introduction and overview: Assessing children's exposure to hazardous environmental chemicals: an overview of selected research challenges and complexities *10*: 611-629.
13. Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes (1996) Konzept der Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte (HBM) in der Umweltmedizin. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz *39*: 221-224.
14. Gefahrstoffverordnung vom 26. November 2010 (BGBl. I S. 1643, 1644), die durch Artikel 2 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S. 1622) geändert worden ist.
15. Verordnung zur Arbeitsmedizinischen Vorsorge vom 18. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2768), die zuletzt durch Artikel 5 Absatz 8 der Verordnung vom 26. November 2010 (BGBl. I S. 1643) geändert worden ist
16. Angerer J. (2012) Strengths and limitations of HBM--yes we can! *Int. J. Hyg. Environ. Health* *215*: 96-97.
17. COPHES (2012) Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale, www.cophes.eu, abgerufen am: 06.07.2013
18. Eide I., Hagemann R., Zahlsen K., Tareke E., Tornqvist M., Kumar R., Vodicka P., and Hemminki K. (1995) Uptake, distribution, and formation of hemoglobin and DNA adducts after inhalation of C2-C8 1-alkenes (olefins) in the rat. *Carcinogenesis* *16*: 1603-1609.
19. Kautiainen A., Vaca C.E., and Granath F. (1993) Studies on the relationship between hemoglobin and DNA adducts of malonaldehyde and their stability in vivo. *Carcinogenesis* *14*: 705-708.
20. Walker V.E., Fennell T.R., Upton P.B., MacNeela J.P., and Swenberg J.A. (1993) Molecular dosimetry of DNA and hemoglobin adducts in mice and rats exposed to ethylene oxide. *Environ. Health Perspect.* *99*: 11-17.
21. Osterman-Golkar S., Ehrenberg L., Segerback D., and Hallstrom I. (1976) Evaluation of genetic risks of alkylating agents. II. Haemoglobin as a dose monitor. *Mutat. Res.* *34*: 1-10.
22. Osterman-Golkar S., Czene K., Lee M.S., Faller T.H., Csanady G.A., Kessler W., Perez H.L., Filser J.G., and Segerback D. (2003) Dosimetry by means of DNA and hemoglobin adducts in propylene oxide-exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *191*: 245-254.

23. Ehrenberg L., Moustacchi E., and Osterman-Golkar S. (1983) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Dosimetry of genotoxic agents and dose-response relationships of their effects. *Mutat. Res.* 123: 121-182.
24. Eintrag GESTIS-Stoffdatenbank des IFAs zu Acrylamid; Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/014330.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/014330.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), abgerufen am: 06.07.2013
25. Substance Overview for Acrylamide. (2002) In The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA)
26. European Chemicals Bureau (2002) European Union Risk Assessment Report Acrylamide (CAS No. 79-06-1)
27. Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes (2008) Acrylamid und Human-Biomonitoring. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 51: 98-108.
28. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) (2011) Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Acrylamide. SCOEL/SUM/139, <http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=7421&langId=en>, abgerufen am: 29.05.2013
29. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1994) Summary of Data Reported and Evaluation: Acrylamide. *IARC-Summeries & Evaluations* 60: 389-434; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf> abgerufen am: 06.07.2013
30. Sega G.A., Generoso E.E., and Brimer P.A. (1990) Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ. Mol. Mutagen.* 16: 137-142.
31. Holland N., Ahlborn T., Turteltaub K., Markee C., Moore D., Wyrobek A.J., and Smith M.T. (1999) Acrylamide causes preimplantation abnormalities in embryos and induces chromatin-adducts in male germ cells of mice. *Reprod. Toxicol.* 13: 167-178.
32. Calleman C.J. (1996) The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. *Drug Metab Rev.* 28: 527-590.

33. EPA US (2010) Assessment of health risks from exposure to acrylamide
34. Sobel W., Bond G.G., Parsons T.W., and Brenner F.E. (1986) Acrylamide cohort mortality study. *Br. J. Ind. Med.* 43: 785-788.
35. Collins J.J., Swaen G.M., Marsh G.M., Utidjian H.M., Caporossi J.C., and Lucas L.J. (1989) Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J. Occup. Med.* 31: 614-617.
36. Marsh G.M., Lucas L.J., Youk A.O., and Schall L.C. (1999) Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 56: 181-190.
37. Marsh G.M., Youk A.O., Buchanich J.M., Kant I.J., and Swaen G. (2007) Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: updated follow up. *J. Occup. Environ. Med.* 49: 82-95.
38. Hogervorst J.G., Schouten L.J., Konings E.J., Goldbohm R.A., and van den Brandt P.A. (2007) A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 2304-2313.
39. Hogervorst J.G., Schouten L.J., Konings E.J., Goldbohm R.A., and van den Brandt P.A. (2008) Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 1428-1438.
40. Hogervorst J.G., Schouten L.J., Konings E.J., Goldbohm R.A., and van den Brandt P.A. (2008) Dietary acrylamide intake is not associated with gastrointestinal cancer risk. *J. Nutr.* 138: 2229-2236.
41. Hogervorst J.G., Schouten L.J., Konings E.J., Goldbohm R.A., and van den Brandt P.A. (2009) Dietary acrylamide intake and brain cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18: 1663-1666.
42. Mucci L.A., Dickman P.W., Steineck G., Adami H.O., and Augustsson K. (2003) Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer* 88: 84-89.
43. Mucci L.A., Adami H.O., and Wolk A. (2006) Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer* 118: 169-173.
44. Mucci L.A. and Wilson K.M. (2008) Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6013-6019.
45. Pelucchi C., La V.C., Bosetti C., Boyle P., and Boffetta P. (2011) Exposure to acrylamide and human cancer--a review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Ann. Oncol.*

46. Olsen A., Christensen J., Outzen M., Olesen P.T., Frandsen H., Overvad K., and Halkjaer J. (2012) Pre-diagnostic acrylamide exposure and survival after breast cancer among postmenopausal Danish women. *Toxicology*.
47. WHO (2002) Health implications of acrylamide in food-report of a Joint FAO/WHO consultation. Geneva, Switzerland.
http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_full.pdf, abgerufen am: 06.07.2013
48. Calleman C.J., Wu Y., He F., Tian G., Bergmark E., Zhang S., Deng H., Wang Y., Crofton K.M., Fennell T. et al. (1994) Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126: 361-371.
49. Hagmar L., Tornqvist M., Nordander C., Rosen I., Bruze M., Kautiainen A., Magnusson A.L., Malmberg B., Aprea P., Granath F. et al. (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 27: 219-226.
50. Lopachin R.M. (2004) The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* 25: 617-630.
51. Sickles D.W., Stone J.D., and Friedman M.A. (2002) Fast axonal transport: a site of acrylamide neurotoxicity? *Neurotoxicology* 23: 223-251.
52. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2009) Grenzwerte in biologischem Material: Addendum zu Acrylamid, Wiley-VCH, Weinheim, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.bb7906d0015/full>, abgerufen am: 06.07.2013
53. Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), Begründung zu Expositions-Risiko-Beziehung für Acrylamid in BekGS 910. <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/910/910-acrylamid.pdf?blob=publicationFile&v=1>, abgerufen am: 06.07.2013
54. Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., and Törnqvist M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4998-5006.
55. Zyzak D.V., Sanders R.A., Stojanovic M., Tallmadge D.H., Eberhart B.L., Ewald D.K., Gruber D.C., Morsch T.R., Strothers M.A., Rizzi G.P. et al. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4782-4787.
56. Yaylayan V.A., Wnorowski A., and Perez L.C. (2003) Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1753-1757.

57. Mottram D.S., Wedzicha B.L., and Dodson A.T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419: 448-449.
58. Stadler R.H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P.A., Robert M.C., and Riediker S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419: 449-450.
59. Stellungnahme des BfR vom 19. März 2004 "Zwei Jahre Acrylamid - Eine Bilanz aus der Sicht der Risikobewertung"; Bundesinstitut für Risikobewertung BfR,
http://www.bfr.bund.de/cm/343/zwei_jahre_acrylamid_eine_bilanz_aus_sicht_der_risikobewertung.pdf, abgerufen am: 06.07.2013
60. Granvogl M., Koehler P., Latzer L., and Schieberle P. (2008) Development of a stable isotope dilution assay for the quantitation of glycidamide and its application to foods and model systems. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6087-6092.
61. Stellungnahme Nr. 005/2009 des BfR vom 23. Oktober 2008 "Besteht ein gesundheitliches Risiko durch Glycidamid in Lebensmitteln?"; Bundesinstitut für Risikobewertung BfR,
http://www.bfr.bund.de/cm/343/besteht_ein_gesundheitliches_risiko_durch_glycidamid_in_lebensmitteln.pdf, abgerufen am: 06.07.2013
62. Signalwerte, 8. Berechnung; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit,
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/acrylamid/8te_SW_Berechnung/8te_SWB_Ergebnisse.pdf?blob=publicationFile&v=3, abgerufen am: 06.07.2013
63. Empfehlung der Kommission vom 10.1.2011 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln; Europäische Kommission,
www.ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/recommendation_10012011_acrylamide_food_de.pdf, abgerufen am: 06.07.2013
64. European Food Safety Authority (EFSA) (2011) Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and Exposure assessment. *EFSA Journal* 9: 2133 [48 pp.].
65. Minimierungskonzept Acrylamid; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit,
http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/02_UnerwunschteStoffeOrganismen/04_Acrylamid/02_Minimierungskonzept/Im_acrylamid_minimierungskonzept_node.html, abgerufen am: 06.07.2013
66. JECFA (2005) Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

67. Schumacher J.N., Green C.R., Best F.W., and Newell M.P. (1977) Smoke composition. An extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. *J. Agric. Food Chem.* 25: 310-320.
68. Smith C.J., Perfetti T.A., Rumble M.A., Rodgman A., and Doolittle D.J. (2000) "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 38: 371-383.
69. Bergmark E. (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 78-84.
70. Schettgen T., Broding H.C., Angerer J., and Drexler H. (2002) Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide-biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicol. Lett.* 134: 65-70.
71. Miller M.J., Carter D.E., and Sipes I.G. (1982) Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63: 36-44.
72. Sumner S.C., Fennell T.R., Moore T.A., Chanas B., Gonzalez F., and Ghanayem B.I. (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 1110-1116.
73. Calleman C.J., Bergmark E., and Costa L.G. (1990) Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 406-412.
74. Fennell T.R., Sumner S.C., Snyder R.W., Burgess J., Spicer R., Bridson W.E., and Friedman M.A. (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 85: 447-459.
75. Fennell T.R. and Friedman M.A. (2005) Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 561: 109-116.
76. Sumner S.C., MacNeela J.P., and Fennell T.R. (1992) Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 81-89.
77. Sumner S.C., Selvaraj L., Nauhaus S.K., and Fennell T.R. (1997) Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 1152-1160.
78. Tornqvist M., Fred C., Haglund J., Helleberg H., Paulsson B., and Rydberg P. (2002) Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 778: 279-308.

79. Tornqvist M., Mowrer J., Jensen S., and Ehrenberg L. (1986) Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Anal. Biochem.* *154*: 255-266.
80. Fennell T.R., Kedderis G.L., and Sumner S.C. (1991) Urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylonitrile in rats and mice detected by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* *4*: 678-687.
81. Ghanayem B.I. and Hoffler U. (2007) Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1(-/-) mice. *Curr. Drug Metab* *8*: 728-749.
82. Carere A. (2006) Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann. Ist. Super. Sanita* *42*: 144-155.
83. Segerbäck D., Calleman C.J., Schroeder J.L., Costa L.G., and Faustman E.M. (1995) Formation of *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis* *16*: 1161-1165.
84. Gamboa da C.G., Churchwell M.I., Hamilton L.P., Von Tungeln L.S., Beland F.A., Marques M.M., and Doerge D.R. (2003) DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* *16*: 1328-1337.
85. Doerge D.R., da Costa G.G., McDaniel L.P., Churchwell M.I., Twaddle N.C., and Beland F.A. (2005) DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat. Res.* *580*: 131-141.
86. Ghanayem B.I., McDaniel L.P., Churchwell M.I., Twaddle N.C., Snyder R., Fennell T.R., and Doerge D.R. (2005) Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.* *88*: 311-318.
87. Von Tungeln L.S., Churchwell M.I., Doerge D.R., Shaddock J.G., McGarrity L.J., Heflich R.H., da Costa G.G., Marques M.M., and Beland F.A. (2009) DNA adduct formation and induction of micronuclei and mutations in B6C3F1/Tk mice treated neonatally with acrylamide or glycidamide. *Int. J. Cancer* *124*: 2006-2015.
88. Kotova N., Jurén T., Myöhänen K., Cornelius M., Abramsson-Zetterberg L., Backman J., Menzel U., Rydberg P., Kronberg L., Vähäkangas K. et al. (2011) 32P-HPLC analysis of *N*1-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)deoxyadenosine: A DNA adduct of the acrylamide-derived epoxide glycidamide. *Toxicology Letters* *207*: 18-24.

89. Bull R.J., Robinson M., and Stober J.A. (1984) Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett.* 24: 209-212.
90. Bull R.J., Robinson M., Laurie R.D., Stoner G.D., Greisiger E., Meier J.R., and Stober J. (1984) Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 44: 107-111.
91. Friedman M.A., Dulak L.H., and Stedham M.A. (1995) A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27: 95-105.
92. Zeiger E., Recio L., Fennell T.R., Haseman J.K., Snyder R.W., and Friedman M. (2009) Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicol. Sci.* 107: 247-257.
93. Tareke E., Twaddle N.C., McDaniel L.P., Churchwell M.I., Young J.F., and Doerge D.R. (2006) Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217: 63-75.
94. Paulsson B., Athanassiadis I., Rydberg P., and Tornqvist M. (2003) Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 1859-1865.
95. Calleman C.J., Bergmark E., Stern L.G., and Costa L.G. (1993) A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ. Health Perspect.* 99: 221-223.
96. Schettgen T., Rossbach B., Kutting B., Letzel S., Drexler H., and Angerer J. (2004) Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207: 531-539.
97. Vesper H.W., Ospina M., Meyers T., Ingham L., Smith A., Gray J.G., and Myers G.L. (2006) Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 959-964.
98. Chevolleau S., Jacques C., Canlet C., Tulliez J., and Debrauwer L. (2007) Analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, as exposure biomarkers in French population. *J. Chromatogr. A* 1167: 125-134.

99. Vesper H.W., Caudill S.P., Osterloh J.D., Meyers T., Scott D., and Myers G.L. (2009) Exposure of the U.S. Population to Acrylamide in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ Health Perspect* 118.
100. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>, abgerufen am: 06.07.2013
101. Bergmark E., Calleman C.J., He F., and Costa L.G. (1993) Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120: 45-54.
102. Perez H.L., Cheong H.K., Yang J.S., and Osterman-Golkar S. (1999) Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 274: 59-68.
103. Fennell T.R., Snyder R.W., Krol W.L., and Sumner S.C. (2003) Comparison of the hemoglobin adducts formed by administration of N-methylolacrylamide and acrylamide to rats. *Toxicol. Sci.* 71: 164-175.
104. Bjellaas T., Olesen P.T., Frandsen H., Haugen M., Stolen L.H., Paulsen J.E., Alexander J., Lundanes E., and Becher G. (2007) Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicol. Sci.* 98: 110-117.
105. Vesper H.W., Bernert J.T., Ospina M., Meyers T., Ingham L., Smith A., and Myers G.L. (2007) Assessment of the relation between biomarkers for smoking and biomarkers for acrylamide exposure in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 2471-2478.
106. Hartmann E.C., Boettcher M.I., Schettgen T., Fromme H., Drexler H., and Angerer J. (2008) Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6061-6068.
107. Olesen P.T., Olsen A., Frandsen H., Frederiksen K., Overvad K., and Tjonneland A. (2008) Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int. J. Cancer* 122: 2094-2100.
108. Vesper H.W., Slimani N., Hallmans G., Tjonneland A., Agudo A., Benetou V., Bingham S., Boeing H., Boutron-Ruault M.C., Bueno-de-Mesquita H.B. et al. (2008) Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6046-6053.

109. Wilson K.M., Vesper H.W., Tocco P., Sampson L., Rosen J., Hellenas K.E., Tornqvist M., and Willett W.C. (2009) Validation of a food frequency questionnaire measurement of dietary acrylamide intake using hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Cancer Causes Control* 20: 269-278.
110. Doerge D.R., Twaddle N.C., Boettcher M.I., McDaniel L.P., and Angerer J. (2007) Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicol. Lett.* 169: 34-42.
111. Fennell T.R., Sumner S.C., Snyder R.W., Burgess J., and Friedman M.A. (2006) Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 93: 256-267.
112. Fuhr U., Boettcher M.I., Kinzig-Schippers M., Weyer A., Jetter A., Lazar A., Taubert D., Tomalik-Scharte D., Pournara P., Jakob V. et al. (2006) Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 266-271.
113. Doroshenko O., Fuhr U., Kunz D., Frank D., Kinzig M., Jetter A., Reith Y., Lazar A., Taubert D., Kirchheiner J. et al. (2009) In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18: 433-443.
114. Kopp E.K. and Dekant W. (2009) Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235: 135-142.
115. Boettcher M.I., Bolt H.M., Drexler H., and Angerer J. (2006) Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch. Toxicol.* 80: 55-61.
116. Hartmann E.C., Boettcher M.I., Bolt H.M., Drexler H., and Angerer J. (2009) N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-L-cysteine (iso-GAMA) a further product of human metabolism of acrylamide: comparison with the simultaneously excreted other mercapturic acids. *Arch. Toxicol.* 83: 731-734.
117. Hartmann E.C., Latzin J.M., Schindler B.K., Koch H.M., and Angerer J. (2011) Excretion of 2,3-dihydroxy-propionamide (OH-PA), the hydrolysis product of glycidamide, in human urine after single oral dose of deuterium-labeled acrylamide. *Arch. Toxicol.* 85: 601-606.

118. Boettcher M.I., Schettgen T., Kutting B., Pischetsrieder M., and Angerer J. (2005) Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutat. Res.* 580: 167-176.
119. Bjellaas T., Janak K., Lundanes E., Kronberg L., and Becher G. (2005) Determination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide. *Xenobiotica* 35: 1003-1018.
120. Bjellaas T., Stolen L.H., Haugen M., Paulsen J.E., Alexander J., Lundanes E., and Becher G. (2007) Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1020-1026.
121. Urban M., Kavvadias D., Riedel K., Scherer G., and Tricker A.R. (2006) Urinary mercapturic acids and a hemoglobin adduct for the dosimetry of acrylamide exposure in smokers and nonsmokers. *Inhal. Toxicol.* 18: 831-839.
122. Kellert M., Scholz K., Wagner S., Dekant W., and Volkel W. (2006) Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1131: 58-66.
123. Kopp, E. K. (2009) Biotransformation and Toxicokinetics of Acrylamide in Humans (Dissertation)
124. Sorgel F., Weissenbacher R., Kinzig-Schippers M., Hofmann A., Illauer M., Skott A., and Landersdorfer C. (2002) Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 48: 267-274.
125. Käfferlein H, Kopp R, Latzin J, Koslitz S, and Kumbartski M (2011) Poster ISEE Tagung Seoul 2011: Hemoglobin adducts of alkylating substance - Long term parameters of smoking during pregnancy. *Epidemiology* 22: S235.
126. Schettgen T., Kutting B., Hornig M., Beckmann M.W., Weiss T., Drexler H., and Angerer J. (2004) Trans-placental exposure of neonates to acrylamide - a pilot study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77: 213-216.
127. von Stedingk H., Vikström A.C., Rydberg P., Pedersen M., Nielsen J.K.S., Segerbäck D., Knudsen L.E., and Törnqvist M. (2011) Analysis of Hemoglobin Adducts from Acrylamide, Glycidamide, and Ethylene Oxide in Paired Mother/Cord Blood Samples from Denmark. *Chemical Research in Toxicology* 24: 1957-1965.

128. Eintrag GESTIS-Stoffdatenbank des IFAs zu Acrylnitril; Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/011410.xml?f=templates&fn=default.htm, abgerufen am: 06.07.2013
129. Leonard A., Gerber G.B., Stecca C., Rueff J., Borba H., Farmer P.B., Sram R.J., Czeizel A.E., and Kalina I. (1999) Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of acrylonitrile. *Mutat. Res.* 436: 263-283.
130. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) (2003) Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for acrylonitrile. SCOEL/SUM/104, <http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=6699&langId=en>, abgerufen am 29.05.2013
131. European Chemicals Bureau (2004) European Union Risk Assessment Report Acrylonitrile (CAS No. 107-13-1)
132. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1999) Summary of Data Reported and Evaluation: Acrylonitrile. *IARC-Summaries & Evaluations* 71: 43-44; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/volume71.pdf>, abgerufen am: 06.07.2013
133. Maltoni C., Ciliberti A., and Di M., V (1977) Carcinogenicity bioassays on rats of acrylonitrile administered by inhalation and by ingestion. *Med. Lav.* 68: 401-411.
134. Maltoni C., Ciliberti A., Cotti G., and Perino G. (1988) Long-term carcinogenicity bioassays on acrylonitrile administered by inhalation and by ingestion to Sprague-Dawley rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 534: 179-202.
135. Bigner D.D., Bigner S.H., Burger P.C., Shelburne J.D., and Friedman H.S. (1986) Primary brain tumours in Fischer 344 rats chronically exposed to acrylonitrile in their drinking-water. *Food Chem. Toxicol.* 24: 129-137.
136. Quast J.F. (2002) Two-year toxicity and oncogenicity study with acrylonitrile incorporated in the drinking water of rats. *Toxicol. Lett.* 132: 153-196.
137. Milvy P. and Wolff M. (1977) Mutagenic studies with acrylonitrile. *Mutat. Res.* 48: 271-278.
138. de Meester C., Poncelet F., Roberfroid M., and Mercier M. (1978) Mutagenicity of acrylonitrile. *Toxicology* 11: 19-27.
139. de Meester C., Duverger-Van B.M., Lambotte-Vandepaer M., Roberfroid M., Poncelet F., and Mercier M. (1979) Liver extract mediated mutagenicity of acrylonitrile. *Toxicology* 13: 7-15.

140. Lambotte-Vandepaer M., Duverger-Van B.M., de M.C., Poncelet F., and Mercier M. (1980) Mutagenicity of urine from rats and mice treated with acrylonitrile. *Toxicology* 16: 67-71.
141. Cole P., Mandel J.S., and Collins J.J. (2008) Acrylonitrile and cancer: a review of the epidemiology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 52: 342-351.
142. Blair A., Stewart P.A., Zaebst D.D., Pottern L., Zey J.N., Bloom T.F., Miller B., Ward E., and Lubin J. (1998) Mortality of industrial workers exposed to acrylonitrile. *Scand. J. Work Environ. Health* 24 *Suppl* 2: 25-41.
143. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (2009) Grenzwerte in biologischem Material: Addendum zu Acrylnitril, Wiley-VCH, Weinheim, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.bb10713e0005/full>, abgerufen am: 06.07.2013
144. Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS), Begründung zu Expositions-Risiko-Beziehung für Acrylnitril in BekGS 910. <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/910/910-acrylnitril.pdf?blob=publicationFile&v=1>, abgerufen am: 06.07.2013
145. Hoffmann D., Hoffmann I., and El-Bayoumy K. (2001) The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology* 14: 767-790.
146. Smith C.J., Perfetti T.A., Mullens M.A., Rodgman A., and Doolittle D.J. (2000) "IARC Group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 38: 825-848.
147. Kedderis G.L., Sumner S.C., Held S.D., Batra R., Turner M.J., Jr., Roberts A.E., and Fennell T.R. (1993) Dose-dependent urinary excretion of acrylonitrile metabolites by rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120: 288-297.
148. Recio L. and Skopek T.R. (1988) Mutagenicity of acrylonitrile and its metabolite 2-cyanoethylene oxide in human lymphoblasts in vitro. *Mutat. Res.* 206: 297-305.
149. Guengerich F.P., Geiger L.E., Hogy L.L., and Wright P.L. (1981) In vitro metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide, reaction with glutathione, and irreversible binding to proteins and nucleic acids. *Cancer Res.* 41: 4925-4933.
150. Wang H., Chanas B., and Ghanayem B.I. (2002) Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is essential for acrylonitrile metabolism to cyanide: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. *Drug Metab Dispos.* 30: 911-917.

151. Schettgen T., Musiol A., and Kraus T. (2008) Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethylene oxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N,N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 2629-2638.
152. Ding Y.S., Blount B.C., Valentin-Blasini L., Applewhite H.S., Xia Y., Watson C.H., and Ashley D.L. (2009) Simultaneous determination of six mercapturic acid metabolites of volatile organic compounds in human urine. *Chem. Res. Toxicol.* 22: 1018-1025.
153. Solomon J.J. and Segal A. (1985) Direct alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile. Isolation of cyanoethyl adducts of guanine and thymine and carboxyethyl adducts of adenine and cytosine. *Environ. Health Perspect.* 62: 227-230.
154. Solomon J.J. and Segal A. (1989) DNA adducts of propylene oxide and acrylonitrile epoxide: hydrolytic deamination of 3-alkyl-dCyd to 3-alkyl-dUrd. *Environ. Health Perspect.* 81: 19-22.
155. Gut I., Nerudova J., Kopecky J., and Holecek V. (1975) Acrylonitrile biotransformation in rats, mice, and chinese hamsters as influenced by the route of administration and by phenobarbital, SKF 525-A, cysteine, dimercaprol, or thiosulfate. *Arch. Toxicol.* 33: 151-161.
156. Schettgen T., Musiol A., Alt A., Ochsmann E., and Kraus T. (2009) A method for the quantification of biomarkers of exposure to acrylonitrile and 1,3-butadiene in human urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 969-981.
157. Scherer G., Engl J., Urban M., Gilch G., Janket D., and Riedel K. (2007) Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47: 171-183.
158. Schettgen T., Müller J., Fromme H., and Angerer J. (2010) Simultaneous quantification of haemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile, acrylamide and glycidamide in human blood by isotope-dilution GC/NCI-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 878: 2467-2473.
159. Minet E., Cheung F., Errington G., Sterz K., and Scherer G. (2011) Urinary excretion of the acrylonitrile metabolite 2-cyanoethylmercapturic acid is correlated with a variety of biomarkers of tobacco smoke exposure and consumption. *Biomarkers* 16: 89-96.

160. Eckert E., Schmid K., Schaller B., Hiddemann-Koca K., Drexler H., and Göen T. (2011) Mercapturic acids as metabolites of alkylating substances in urine samples of German inhabitants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214: 196-204.
161. Wu C.F., Uang S.N., Chiang S.Y., Shih W.C., Huang Y.F., and Wu K.Y. (2012) Simultaneous quantitation of urinary cotinine and acrylonitrile-derived mercapturic acids with ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402: 2113-2120.
162. Schettgen T., Bertram J., and Kraus T. (2012) Accurate quantification of the mercapturic acids of acrylonitrile and its genotoxic metabolite cyanoethylene-epoxide in human urine by isotope-dilution LC-ESI/MS/MS. *Talanta*.
163. Boersema P.J., Mohammed S., and Heck A.J. (2008) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 151-159.
164. Alpert A.J. (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* 499: 177-196.
165. Buszewski B. and Noga S. (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 231-247.
166. Hemstrom P. and Irgum K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 29: 1784-1821.
167. Nguyen H.P. and Schug K.A. (2008) The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.* 31: 1465-1480.
168. Produktinformation der Firma Agilent zur Zorbax HILIC
169. Produktinformationen der Firma Waters zu Atlantis und XBridge HILIC
170. Produktinformationen der Firma Phenomenex zur Luna HILIC und Kinetex HILIC
171. Produktinformationen der Firma Merck zur ZIC HILIC und pZIC HILIC
172. Produktinformationen der Firma Macherey und Nagel zur Nucleodur HILIC
173. Method Development Guide HILIC der Firma Phenomenex
174. Latzin J.M., Schindler B.K., Weiss T., Angerer J., and Koch H.M. (2012) Determination of 2,3-dihydroxypropionamide, an oxidative metabolite of acrylamide, in human urine by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*

175. Schoene K., Bruckert H.J., Steinhanses J., and König A. (1994) Two stage derivatization with N-(tert.-butyldimethylsilyl)- N-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) and N-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (MBTFA) for the gas-chromatographic analysis of OH-, SH- and NH-compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 348: 364-370.
176. Schummer C., Delhomme O., Appenzeller B.M., Wennig R., and Millet M. (2009) Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* 77: 1473-1482.
177. Tuomi T., Johnsson T., and Reijula K. (1999) Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 45: 2164-2172.
178. Jaffe M (1886) Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsaeure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins [in German]. *Z. Physiol. Chem.* 10: 391-400.
179. Boettcher M.I. and Angerer J. (2005) 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.
180. Boettcher M.I., Bolt H.M., and Angerer J. (2006) Acrylamide exposure via the diet: influence of fasting on urinary mercapturic acid metabolite excretion in humans. *Arch. Toxicol.* 80: 817-819.
181. European Food Safety Authority (EFSA) (2010) Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal* 8: 1557 [96 pp.].
182. WHO (2013) Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food - Addendum January 2013. Geneva, Switzerland.
http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/lowlevel_january2013.pdf, abgerufen am: 06.06.2013

Anhang

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abbildung 1: Monitoring von Gefahrstoffen in der Arbeits- und Umweltmedizin	3
Abbildung 2: Exemplarischer Vergleich der Ausscheidungskinetik für verschiedene Metaboliten eines Gefahrstoffes	7
Abbildung 3: Bildung von Acrylamid in der Maillard Reaktion	15
Abbildung 4: Metabolismus von Acrylamid (AA)	21
Abbildung 5: Strukturen der Glycidamid-DNA-Addukte	23
Abbildung 6: Korrelation der gebildeten GA-Hb-Addukte im Blut und DNA-Addukt (N-7-GA-Gua) in der Leber nach 28 Tagen AA-Gabe in Mäusen	24
Abbildung 7: Ergebnisse der Kinetikstudie aus Hartmann <i>et al.</i>	34
Abbildung 8: Metabolismus von Acrylnitril (AN)	39
Abbildung 9: Mechanismus der Wechselwirkungen auf einer HILIC Phase beispielhaft an einer modifizierten Aminophase	45
Abbildung 10: Schema der Derivatisierung von 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA) mit <i>N</i> -tert-Butyl-dimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) unter katalytischen Mengen Pyridin	51
Abbildung 11: Massenspektrum eines dreifach mit MTBSTFA derivatisierten 2,3-Dihydroxypropionamid (OH-PA)-Standards, 100 µg/L, gemessen im TIC (Total Ionen Strom).	59
Abbildung 12: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe (Kreatinin 0,63 g/L) dotiert mit d ₃ -OH-PA (m/z 393 und 435) und einer Analytkonzentration von 18,2 µg/L (m/z 390, 391 und 432).	61
Abbildung 13: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe (Kreatinin 1,74 g/L) dotiert mit d ₃ -OH-PA (m/z 393 und 435) und einer Analytkonzentration von 77,8 µg/L (m/z 390, 391 und 432)	62
Abbildung 14: Vergleich der OH-PA-Kalibrationen in Wasser und Urin	64
Abbildung 15: Strukturen der Analyten bzw. der dazugehörigen isotopenmarkierten	70

internen Standards (ISTD) für die Mercaptursäurenbestimmung	
Abbildung 16: Einzelne MRM-Spuren einer aufgearbeiteten Standardlösung (c = 100 µg/L) in Poolurin für die Mercaptursäurenanalytik	82
Abbildung 17: Chromatogramm einer aufgearbeiteten Realurinprobe Mercaptursäuren	83
Abbildung 18: Vergleich der Kalibrationen in Wasser und Urin für CHEMA (ausgewertet über d ₃ -CEMA als internen Standard)	88
Abbildung 19: Kalibrierfunktion von CHEMA (Kalibrationsstandards in Poolurin; Auswertung über d ₃ -CEMA als ISTD)	88
Abbildung 20: Vergleichschromatogramme von Standardlösungen von AAMA und GAMA in Wasser, Methanol und Acetonitril	92
Abbildung 21: Ergebnisse der OH-PA-Bestimmung (Boxplot)	97
Abbildung 22: Ergebnisse der Kurzzeitfastenstudie (48 Stunden)	100
Abbildung 23: Ergebnisse der Langzeitfastenstudie (10 Tage)	102
Abbildung 24: Ergebnisse der Mercaptursäurenbestimmung für die AA-Mercaptursäuren AAMA, AAMA-SO ₂ , GAMA und iso-GAMA (Boxplots)	106
Abbildung 25: Ergebnisse der iso-GAMA-bestimmung nach Kreatininkorrektur (Boxplot)	109
Abbildung 26: Verhältnis der AAMA- zu GAMA-Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung (n = 126)	110
Abbildung 27: Verhältnis der AAMA- zu AAMA-SO ₂ -Konzentrationen im Urin der Allgemeinbevölkerung (n= 126)	111
Abbildung 28: Ergebnisse der Mercaptursäurenbestimmung für die AN-Mercaptursäuren HEMA, CEMA und CHEMA (Boxplots)	113
Abbildung 29: Korrelation der CEMA- und CHEMA-Konzentrationen im Allgemeinbevölkerungskollektiv (33 Raucher)	115
Abbildung 30: Ergebnisse der AA-Hb-Addukt-Bestimmung (Boxplots)	117
Abbildung 31: Ergebnisse der AN-Hb-Addukt-Bestimmung (Boxplots)	119
Abbildung 32: Korrelation der Summe der GA-Mercaptursäuren (GAMA und iso-GAMA) und AA- Mercaptursäuren (AAMA und AAMA-SO ₂)	121

Abbildung 33: Vergleich der 5 Expositionsgruppen AA (sortiert nach Langzeitexpositionsmarker AAV) in Boxplotform und tabellarisch	123
Abbildung 34: Vergleich der 5 Expositionsgruppen AA (sortiert nach der Summe der Kurzzeitexpositionsmarker AAMA und AAMA-SO ₂) in Boxplotform und tabellarisch	123
Abbildung 35: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Mercaptursäuren gegen die AA-Exposition (repräsentiert durch die Summe der Mercaptursäuren AAMA und AAMA-SO ₂)	124
Abbildung 36: Vergleich der 5 Expositionsgruppen AA (sortiert nach Langzeitexpositionsmarker AAV) in Boxplotform und tabellarisch	125
Abbildung 37: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Hb-Addukte gegen die AA-Exposition (repräsentiert durch AAV)	126
Abbildung 38: Vergleich der 4 Expositionsgruppen AN (sortiert nach Kurzzeitexpositionsmarker CEMA) in Boxplotform und tabellarisch	128
Abbildung 39: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Mercaptursäuren gegen die AN-Exposition (repräsentiert durch CEMA)	129
Abbildung 40: Vergleich der 5 Expositionsgruppen AN (sortiert nach Langzeitexpositionsmarker CEV) in Boxplotform und tabellarisch	130
Abbildung 41: Auftragung des Verhältnisses oxidativer zu reduktiver Hb-Addukte gegen die AN-Exposition (repräsentiert durch CEV)	131
Abbildung 42: Verlauf der AAMA-Ausscheidung von fünf Personen des beruflichen Kollektives	136

Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1:	Übersicht Acrylamid (AA)	11
Tabelle 2:	Acrylamid-Konzentrationen sowie deutsche Signalwerte (2010) und europäische Richtwerte (2011) jeweils in µg/kg Lebensmittel	17
Tabelle 3:	Vergleich der reduktiven und oxidativen Hb-Addukte	25
Tabelle 4:	Anteil der einzelnen Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe	27
Tabelle 5:	Urin-Metaboliten von AA und GA in der Allgemeinbevölkerung	32
Tabelle 6:	Übersicht Acrylnitril (AN)	35
Tabelle 7:	Anteil der einzelnen AN-Urin-Metaboliten im Metabolismus nach einmaliger Gabe	41
Tabelle 8:	Urin-Metaboliten und Hb-Addukte von AN und CEO in der Allgemeinbevölkerung	42
Tabelle 9:	Beispiele für bekannte HILIC-Phasen und Phasen, die im HILIC Modus betrieben werden können	46
Tabelle 10:	Übersicht über die Retentionszeiten und selektiven Zerfälle des derivatisierten Analyten und des Internen Standards (d ₃ -OH-PA)	58
Tabelle 11:	Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrationsstandards (OH-PA)	63
Tabelle 12:	Ergebnisse der Methodvalidierung (Präzision in Serie und von Tag zu Tag) der OH-PA-Bestimmung	65
Tabelle 13:	Ergebnisse der Methodvalidierung (Relative Wiederfindungen) der OH-PA-Bestimmung	66
Tabelle 14:	Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen für die Merkaptursäuren-Bestimmung	76
Tabelle 15:	Pipettierschema zur Herstellung der Internen Standardlösung (ISTD) für die Merkaptursäuren -Bestimmung	77
Tabelle 16:	Gradient der HILIC-Methode zur Merkaptursäurenbestimmung	79

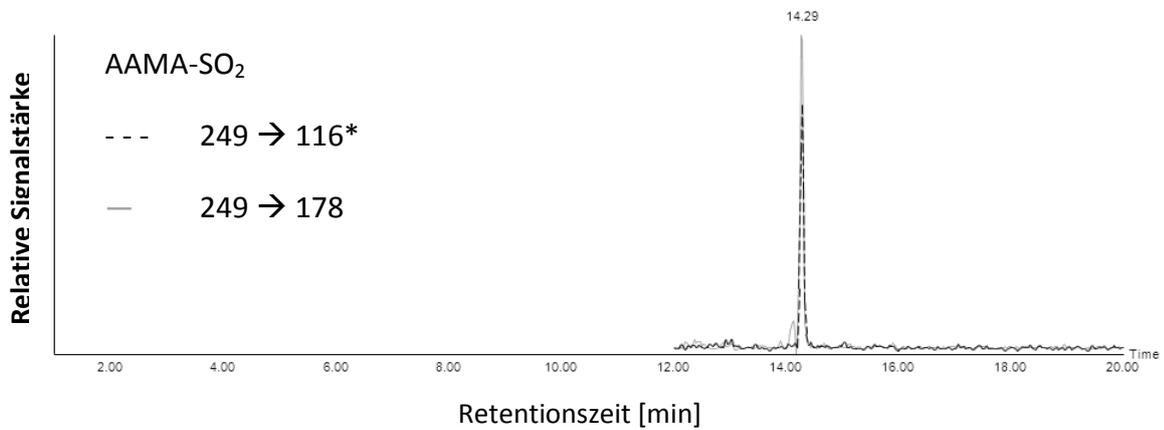
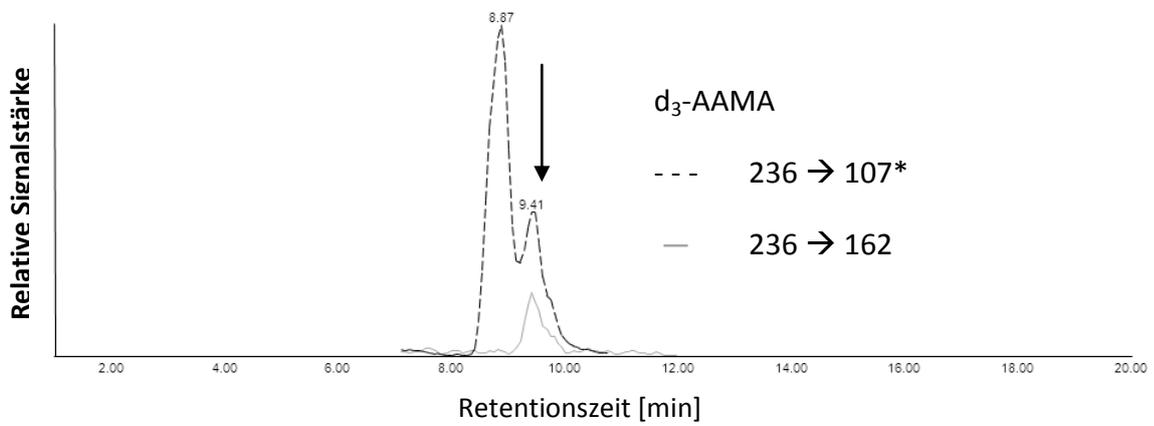
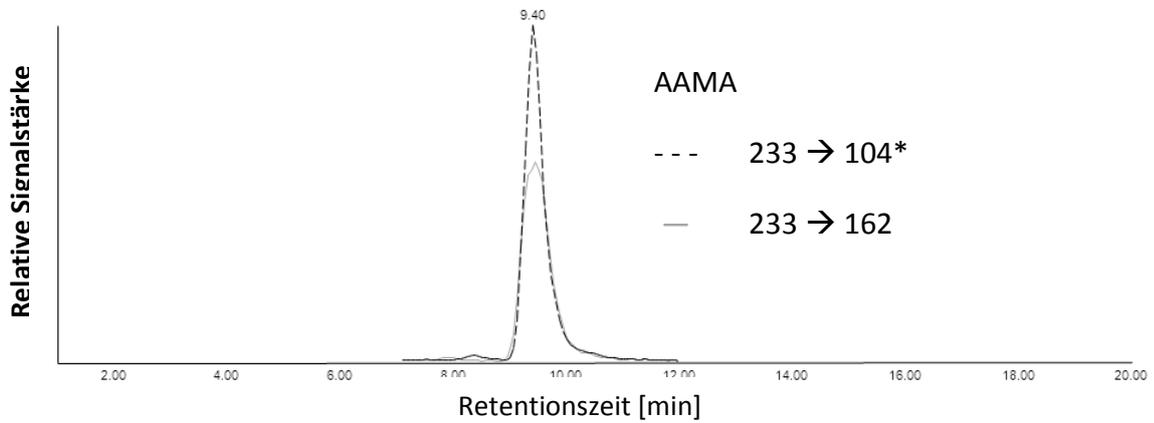
Tabelle 17:	Übersicht über die Retentionszeiten und selektiven Zerfälle der Analyten und der Kollisionsenergien sowie Cone-Spannung (Merkaptursäuren)	80
Tabelle 18:	Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrationsstandards für die Merkaptursäurenbestimmung	85
Tabelle 19:	Übersicht über die realen bzw. dotierten Konzentrationen der Merkaptursäurenstandards in Wasser und in Urin	86
Tabelle 20:	Ergebnisse der Methodvalidierung (Präzision in Serie und von Tag zu Tag und relative Wiederfindungen) der Merkaptursäuren-Bestimmung	90
Tabelle 21:	Ergebnisse der OH-PA-Bestimmung in Urin	98
Tabelle 22:	Diskrepanz der erwarteten und erhaltenen OH-PA-Gehalte	99
Tabelle 23:	Tabellarische Übersicht über die AA-Merkaptursäureenergebnisse im Allgemeinbevölkerungskollektiv	107
Tabelle 24:	Tabellarische Übersicht über die AN-Merkaptursäureenergebnisse im Allgemeinbevölkerungskollektiv	114
Tabelle 25:	Tabellarische Übersicht über die AA-Hb-Adduktwerte im Allgemeinbevölkerungskollektiv	118
Tabelle 26:	Tabellarische Übersicht über die AN-Hb-Adduktwerte im Allgemeinbevölkerungskollektiv	120
Tabelle 27:	Übersicht der Merkaptursäureenergebnisse im beruflichen Kollektiv	134
Tabelle 28:	Tabellarische Übersicht über die Hb-Adduktwerte im beruflichen Kollektiv	137
Tabelle 29:	Vergleich der erhaltenen Daten für Acrylamid mit Literaturdaten	141
Tabelle 30:	Vergleich der erhaltenen Daten für Acrylnitril mit Literaturdaten	142

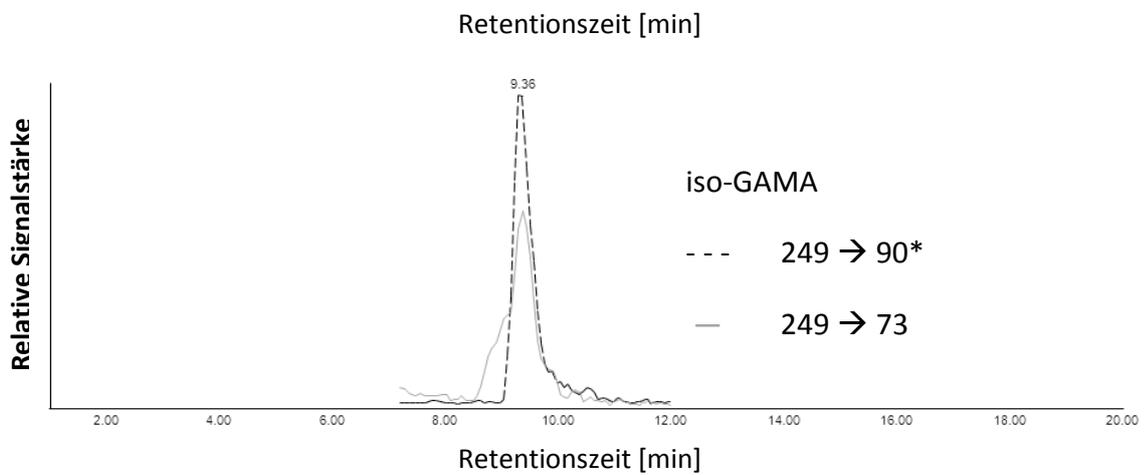
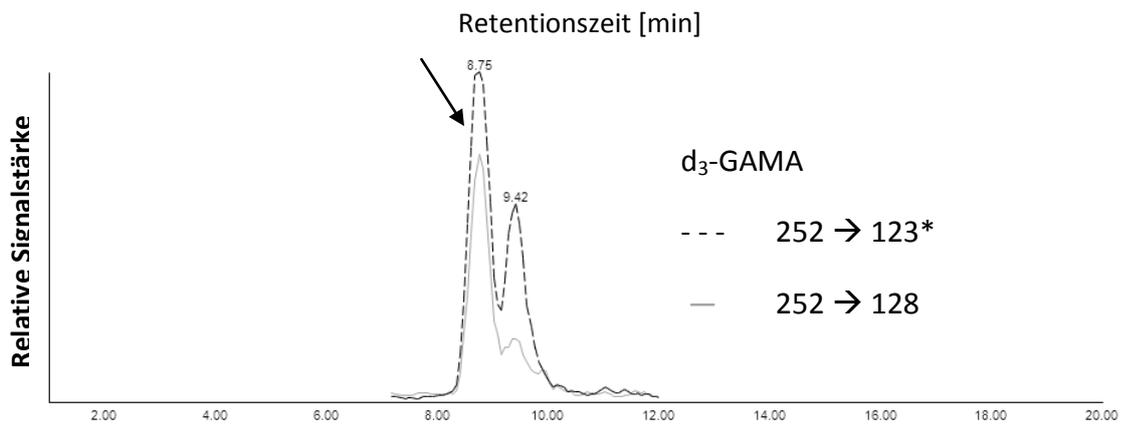
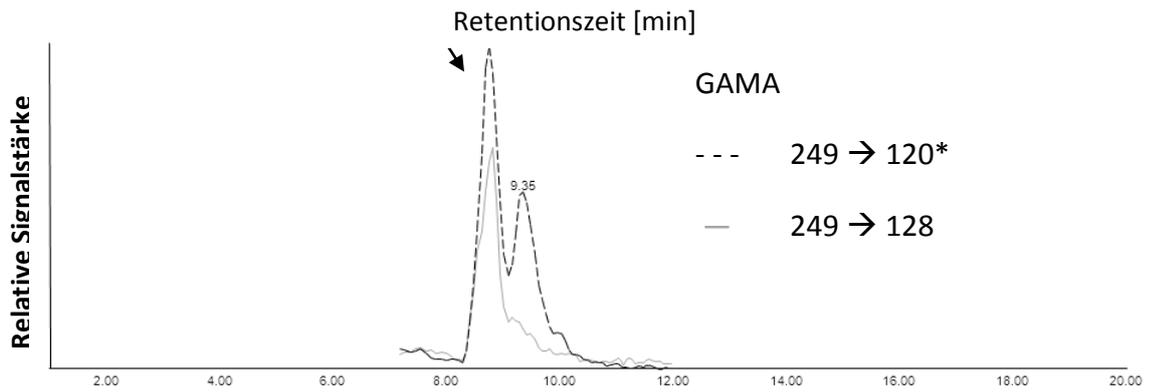
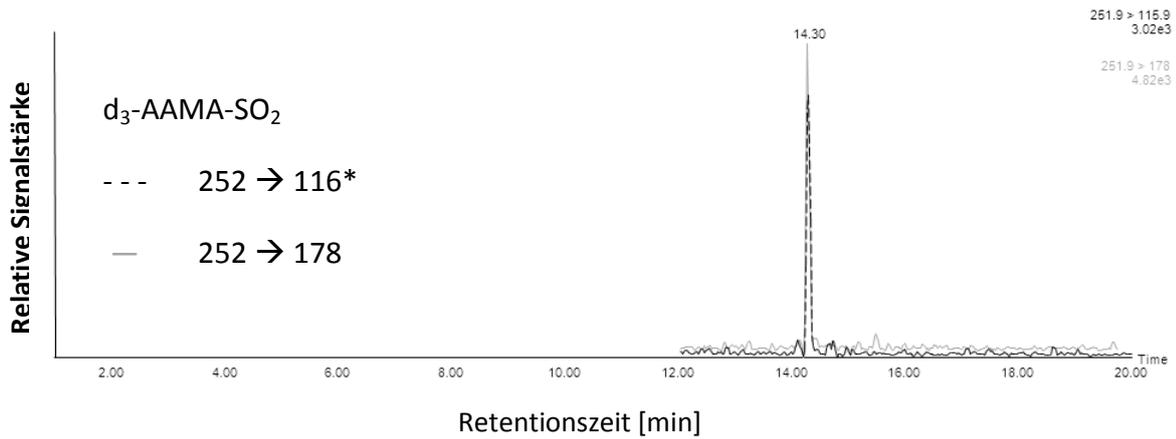
Merkaptursäureenergebnisse

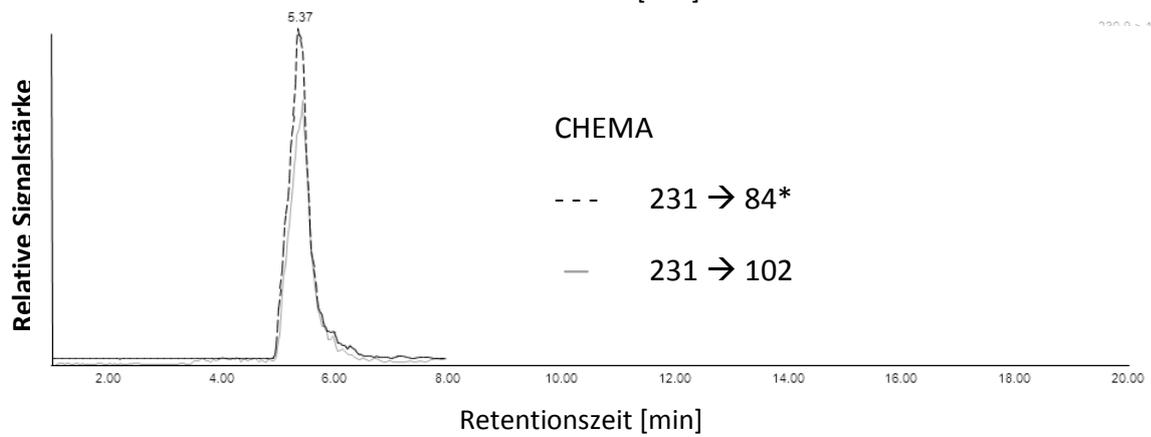
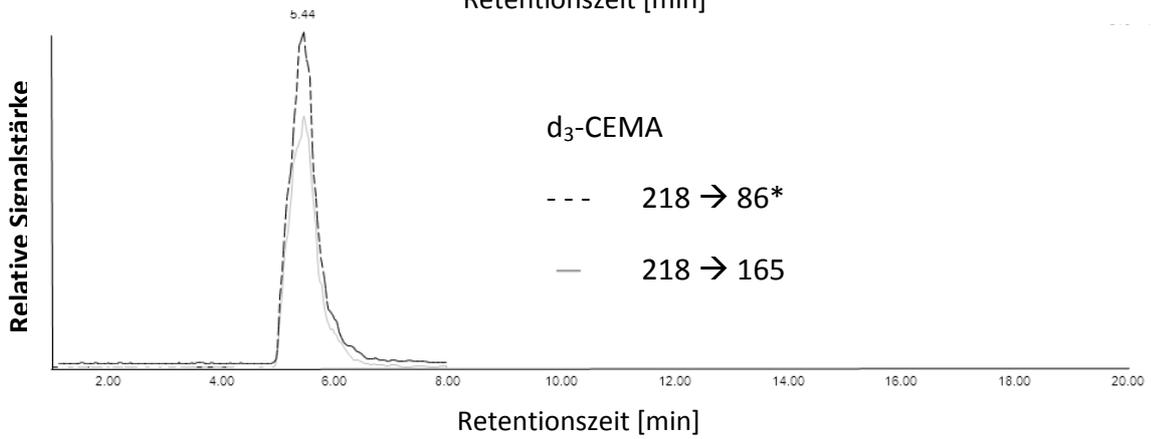
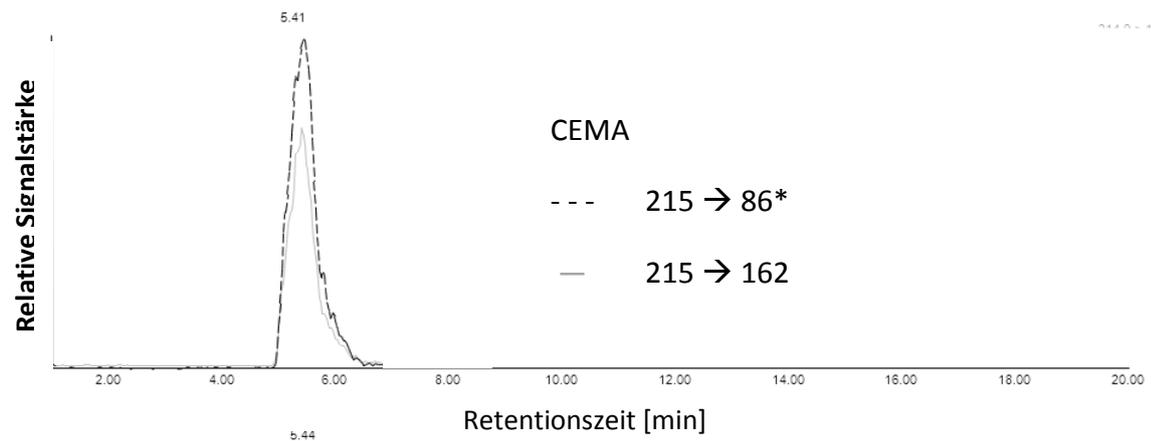
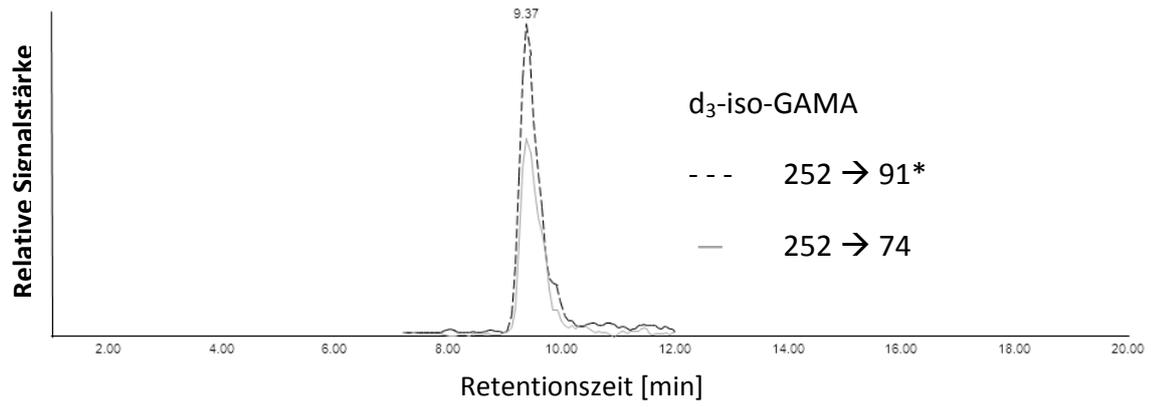
Merkaptursäureenergebnisse im Allgemeinbevölkerungskollektiv kreatinin-angepasst

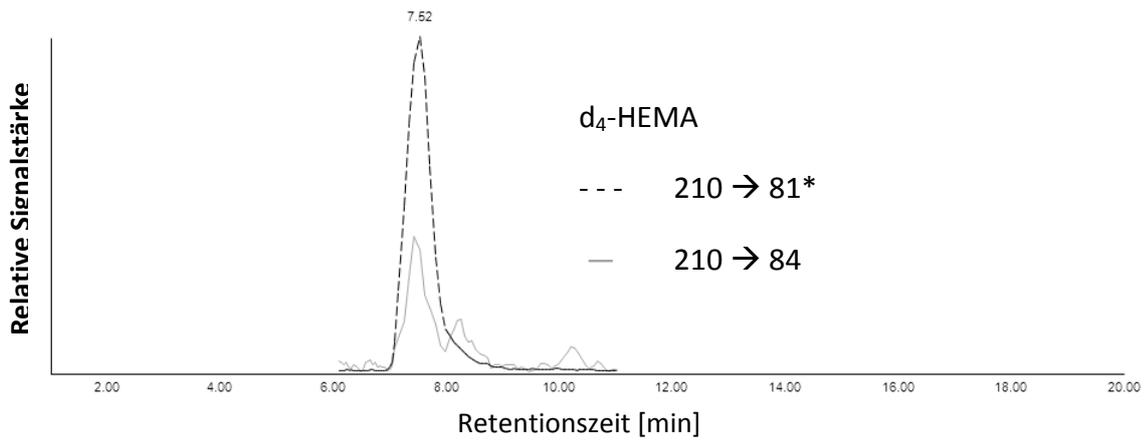
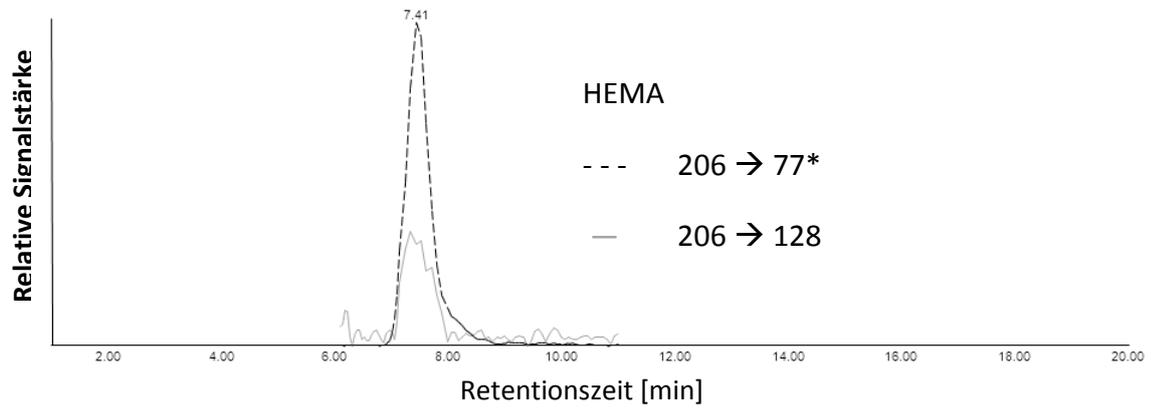
	Nichtraucher (NR) n = 93	Raucher (R) n = 33
	Median (Range) [µg/g Kreatinin]	Median (Range) [µg/g Kreatinin]
AAMA	35,0 (14,1 – 113,4)	100,7 (25,5 – 213,0)
AAMA- SO ₂	34,2 (< NWG – 208,0)	74,8 (14,6 – 187,32)
GAMA	< NWG (< NWG – 24,5)	11,2 (< NWG – 48,8)
Iso- GAMA	5,4 (< NWG – 46,6)	5,9 (< NWG – 48,9)
CEMA	< NWG (<NWG – 20,1)	92,0 (< NWG – 494,0)
CHEMA	< NWG (< NWG – 1,0)	16,8 (< NWG – 74,7)
HEMA	< NWG (< NWG – 3,2)	1,4 (< NWG – 8,6)

Einzelne MRM-Spuren der Mercaptursäurenanalytik in Urin (Fortsetzung von Abb. 16)

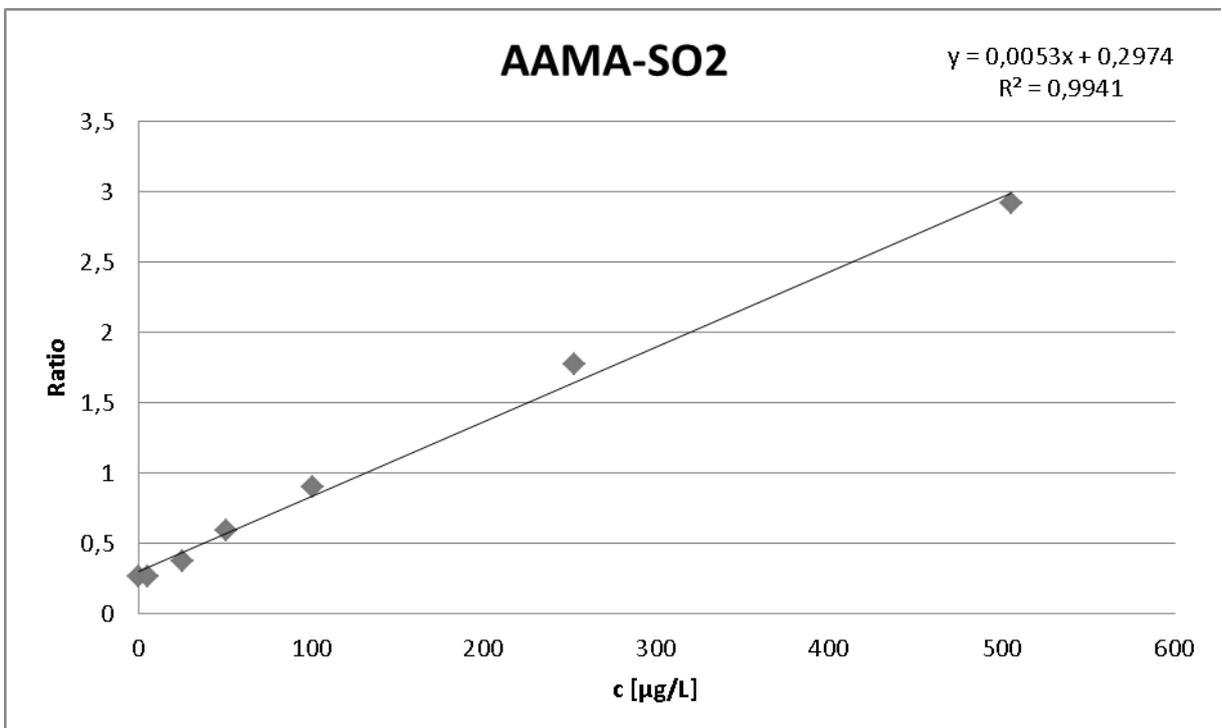
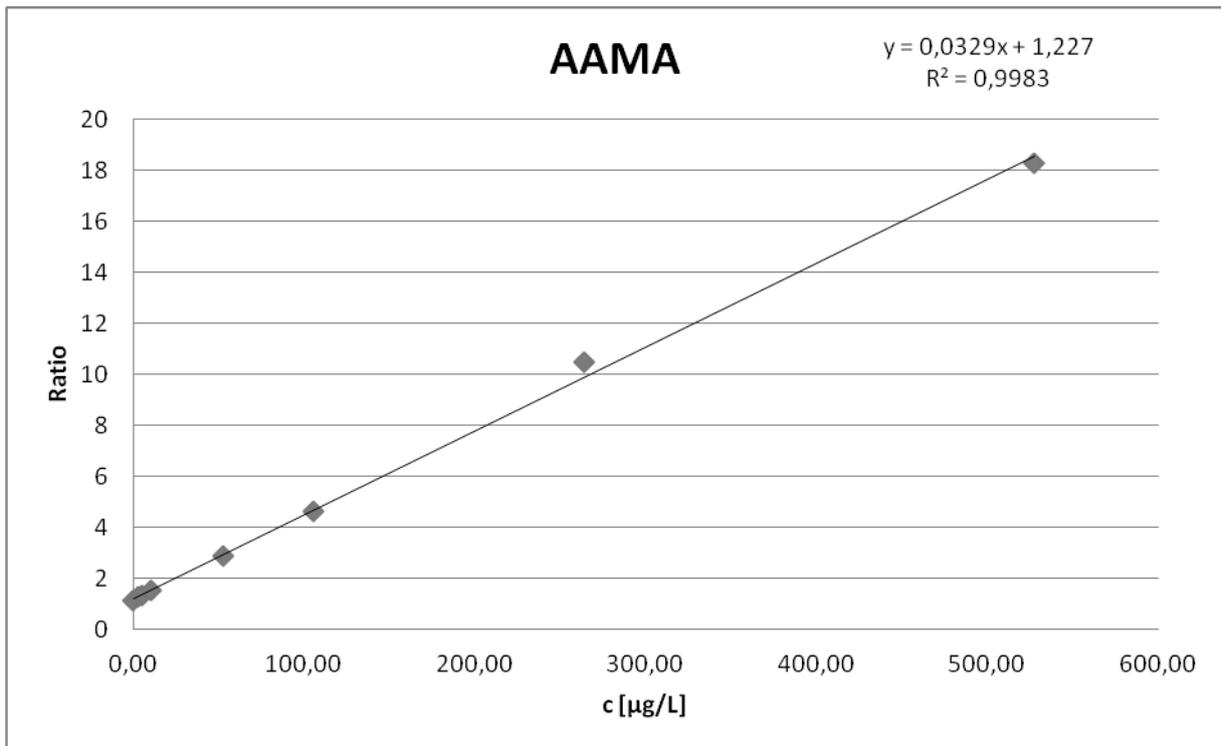


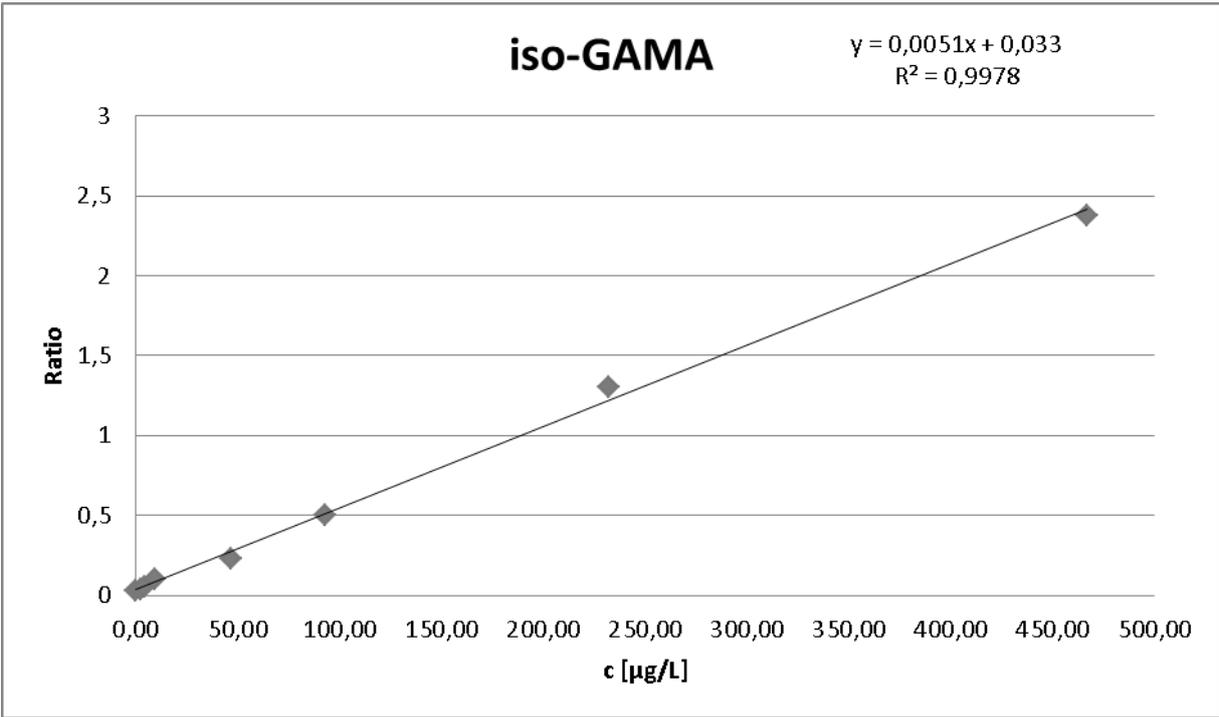
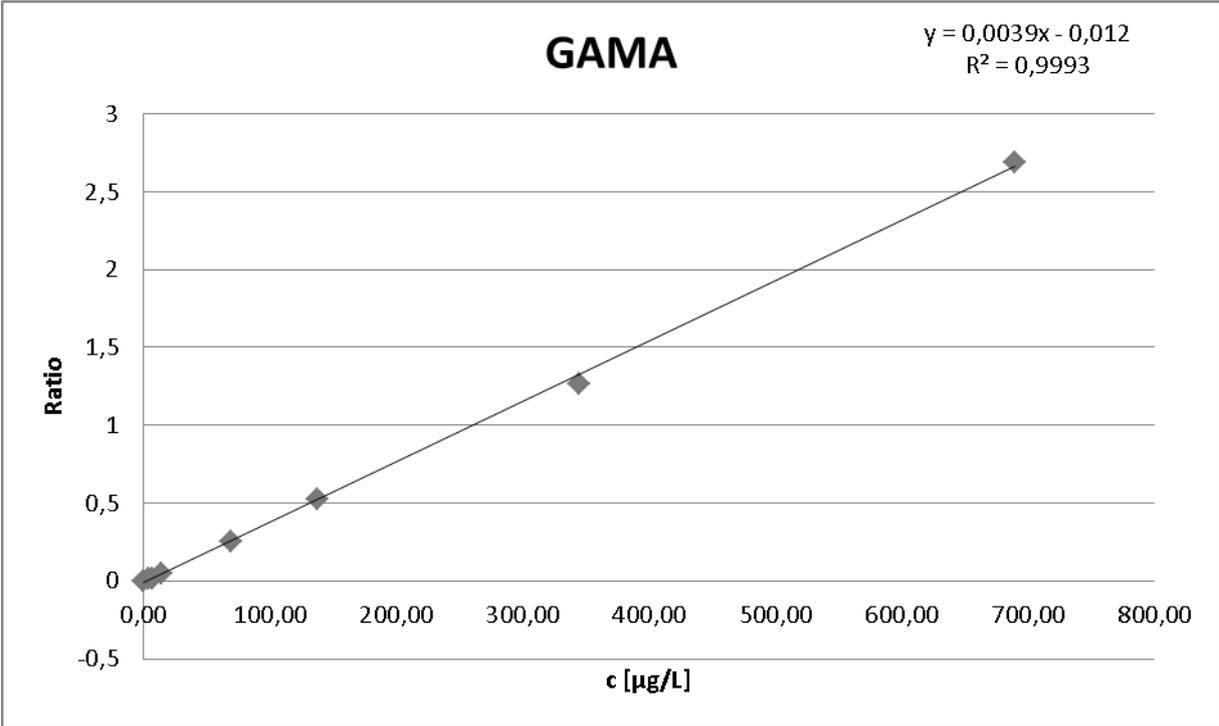


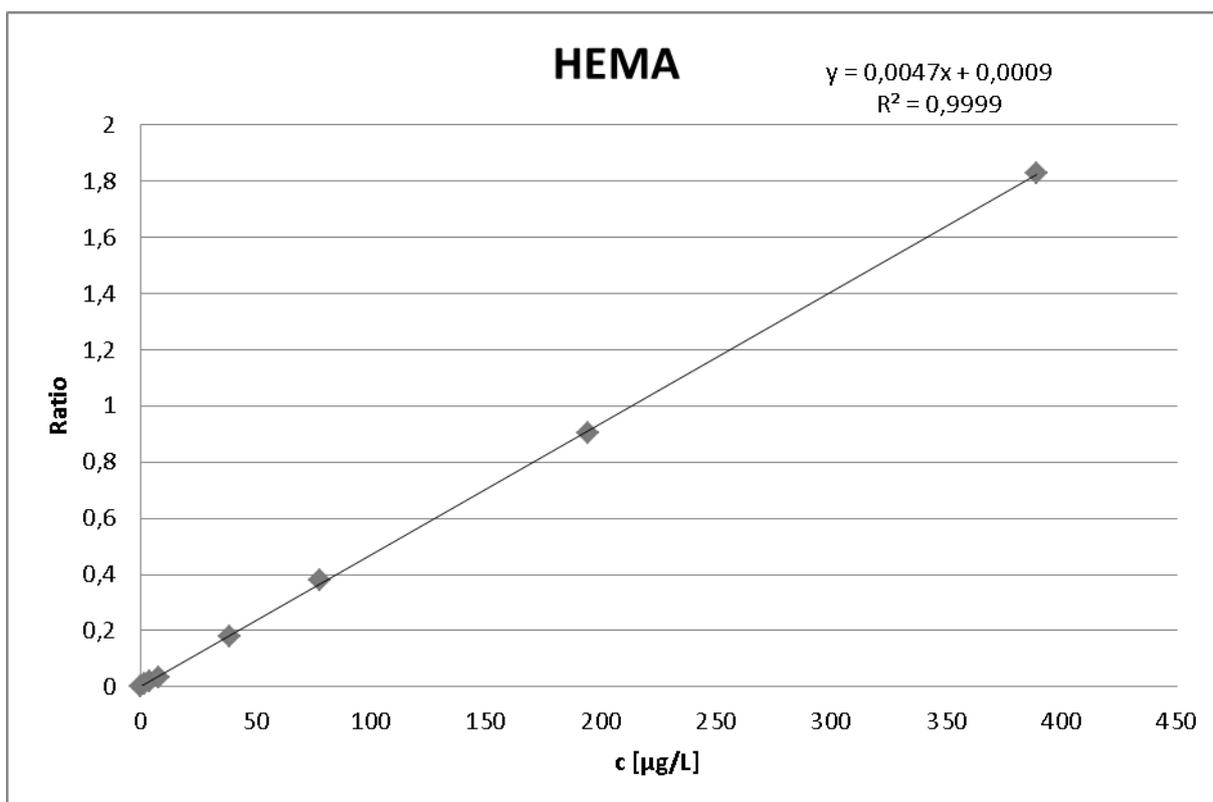
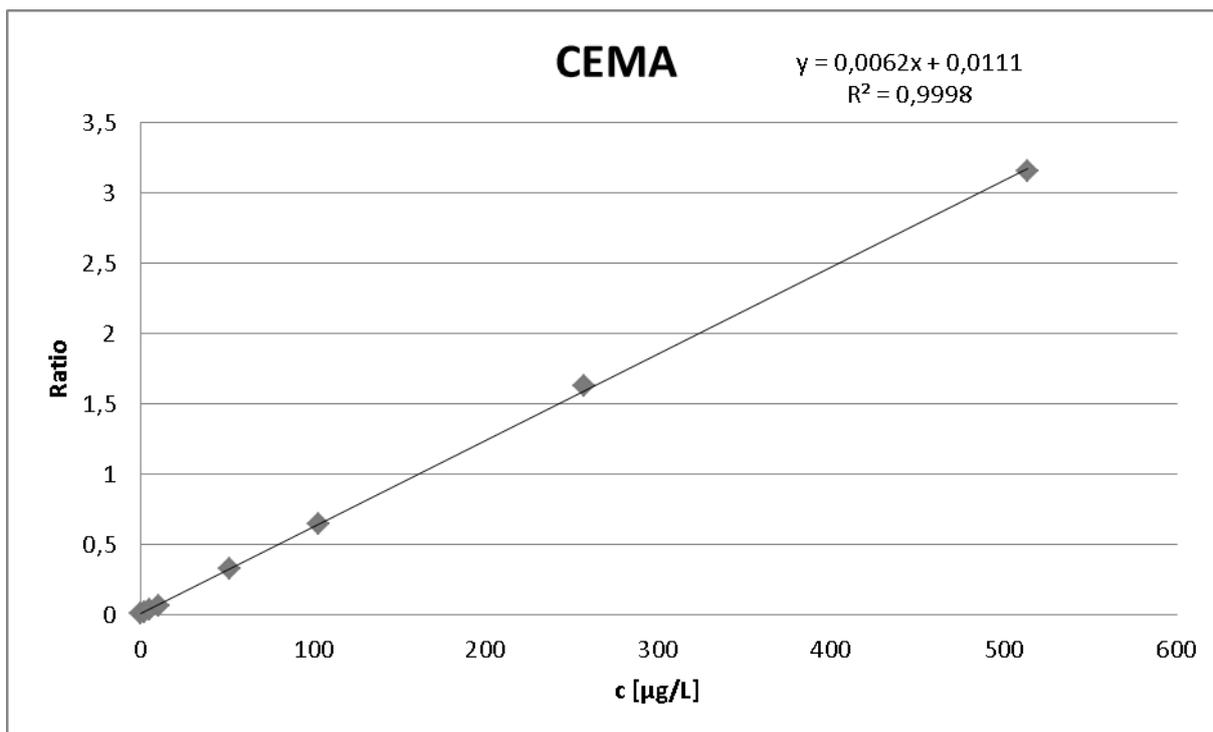




Kalibrierfunktionen der Merkaptursäurenanalytik in Urin







Auswertung Werte unterhalb der NWG

AAMA, AAV, GAV und OH-PA: alle Werte sind > NWG. Keine Substitution erforderlich. CEV und HEV nur 1 bzw. 2 von 91 Werten < NWG. Kein Unterschied in Kollektivbeschreibung → „upper-bound-scenario“

AAMA-SO₂: NWG = 5 µg/L

	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	3	-	
< BG aber > NWG	15	1	
> BG	75	32	
Median lower-bound	28,66 ± 26,45 µg/L	103,8 ± 66,28 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied
Median upper-bound	28,66 ± 26,34 µg/L	103,8 ± 66,28 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied

Der Effekt der Auswertung nach „lower-“ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

GAMA: NWG = 5 µg/L

	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	58	9	
< BG aber > NWG	30	7	
> BG	5	17	
Median lower-bound	0,0 ± 6,22 µg/L	14,90 ± 11,81 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied
Median upper-bound	5,0 ± 4,40 µg/L	14,90 ± 10,38 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied

Der Effekt der Auswertung nach „lower-“ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

Iso-GAMA: NWG = 2,5 µg/L

	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	9	2	
< BG aber > NWG	76	18	
> BG	8	13	
Median	4,81 ± 2,33 µg/L	6,07 ± 3,29 µg/L	** , p = 0,0014
lower-bound			Hoch signifikanter Unterschied
Median	4,81 ± 1,94 µg/L	6,07 ± 3,03 µg/L	** , p = 0,0016
upper-bound			Hoch signifikanter Unterschied

Der Effekt der Auswertung nach „lower-„ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

CEMA: NWG = 1,0 µg/L

	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	50	1	
< BG aber > NWG	30	-	
> BG	13	32	
Median	0,0 ± 2,07 µg/L	99,0 ± 163,85 µg/L	**** , p < 0,0001
lower-bound			Höchst signifikanter Unterschied
Median	1,0 ± 1,76 µg/L	99,0 ± 163,88 µg/L	**** , p < 0,0001
upper-bound			Höchst signifikanter Unterschied

Der Effekt der Auswertung nach „lower-„ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

CHEMA: NWG = 1 µg/L

	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	92	6	
< BG aber > NWG	1	1	
> BG	-	26	
Median lower-bound	0,0 ± 0,15 µg/L	15,85 ± 30,80 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied
Median upper-bound	1,0 ± 0,04 µg/L	15,85 ± 30,66 µg/L	****, p < 0,0001 Höchst signifikanter Unterschied

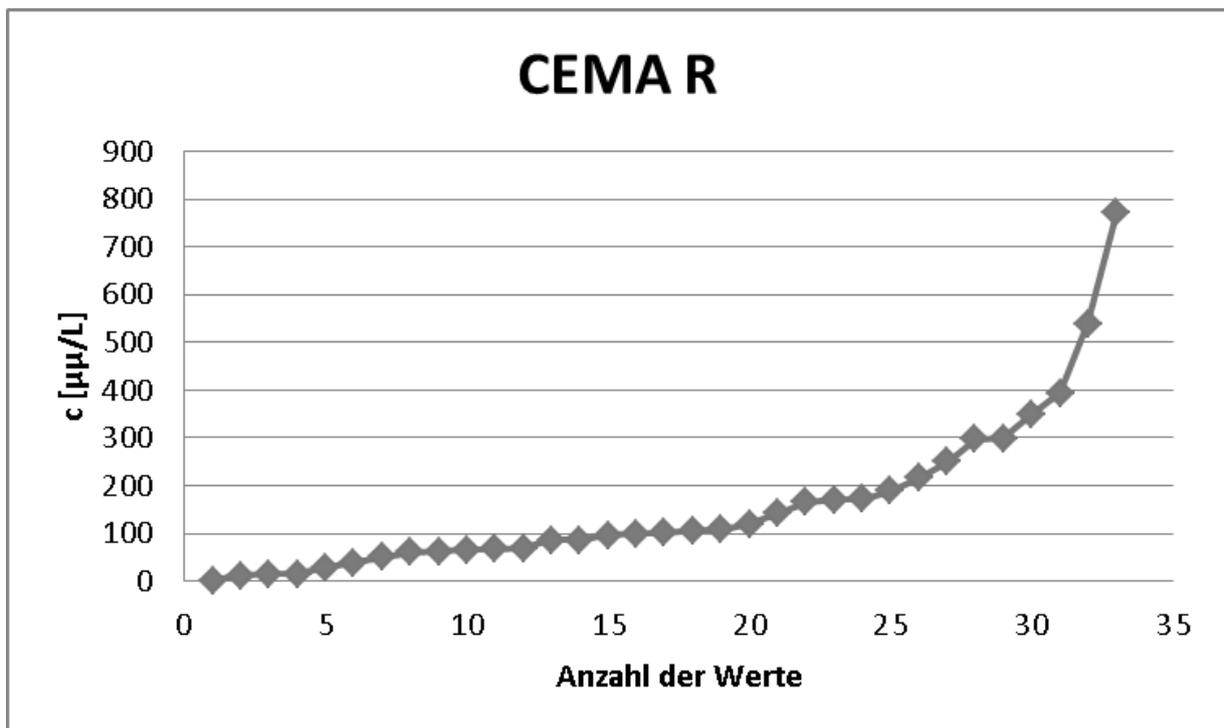
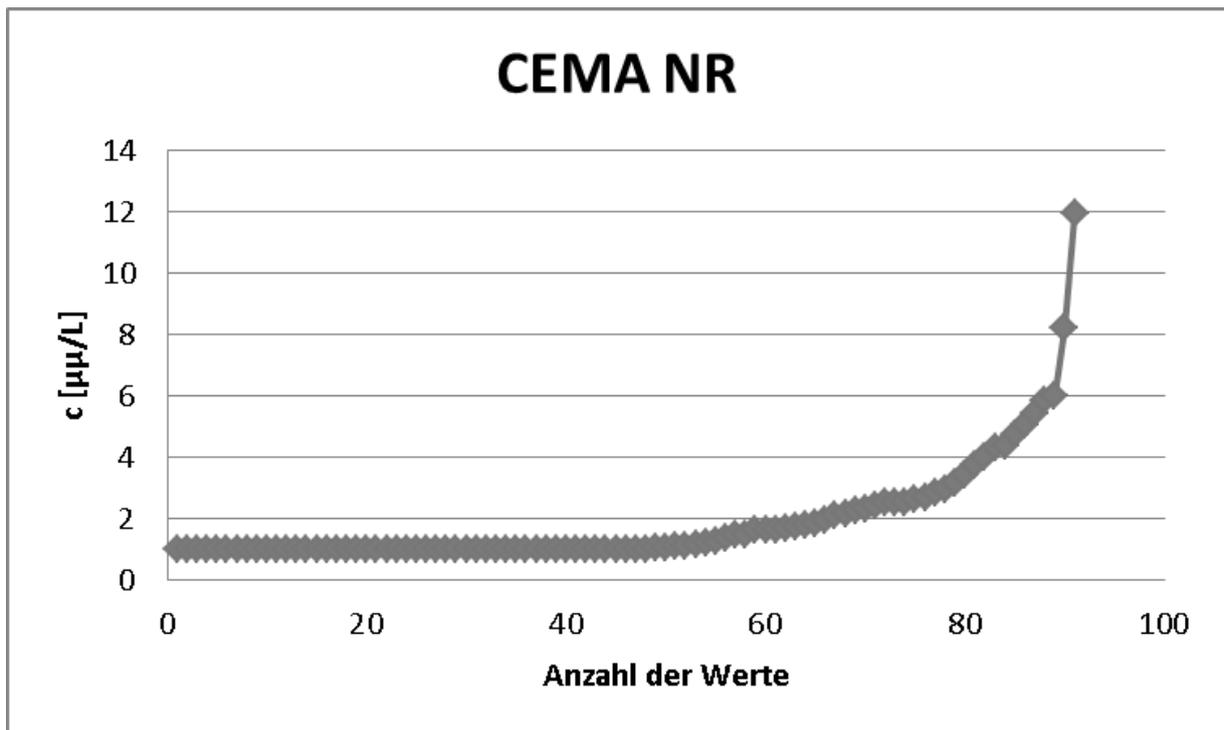
Der Effekt der Auswertung nach „lower-„ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

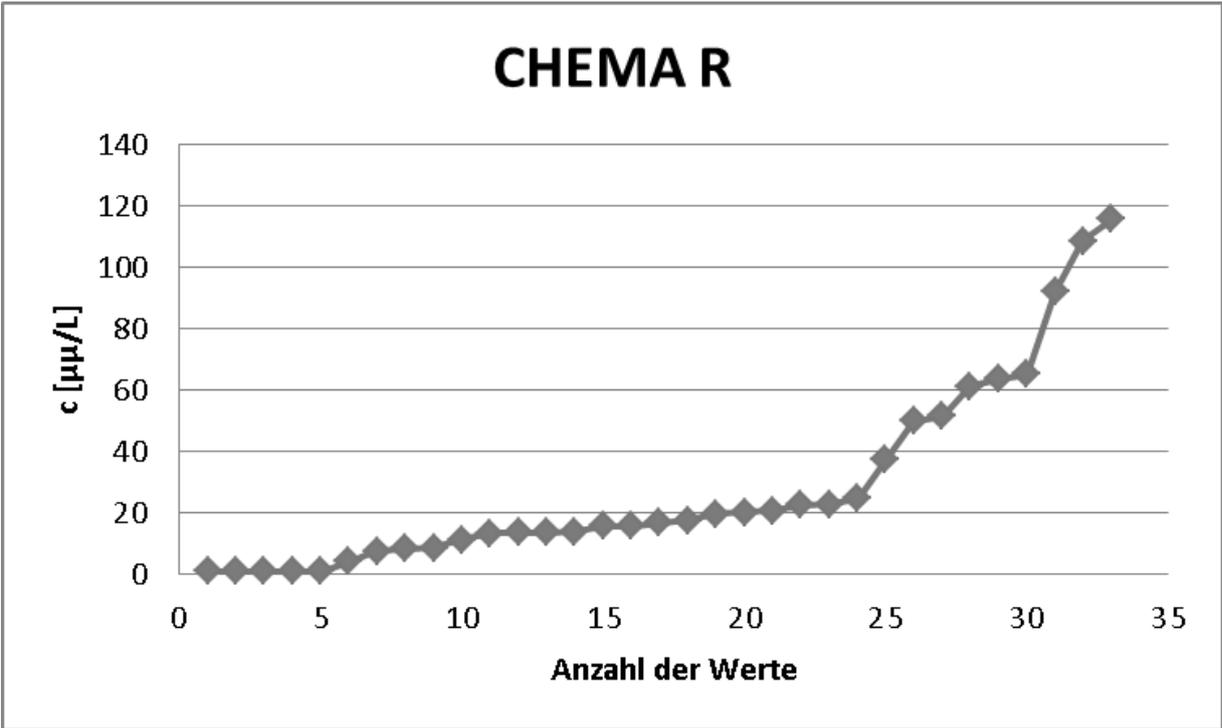
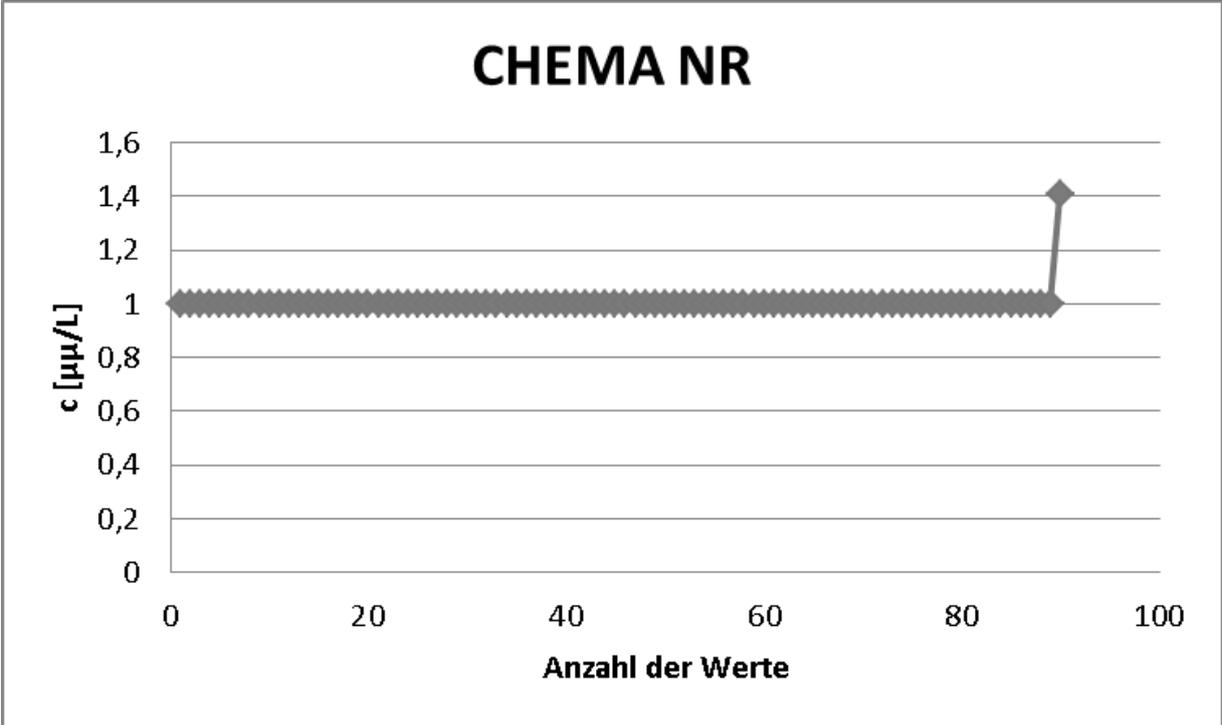
HEMA: NWG = 1 µg/L

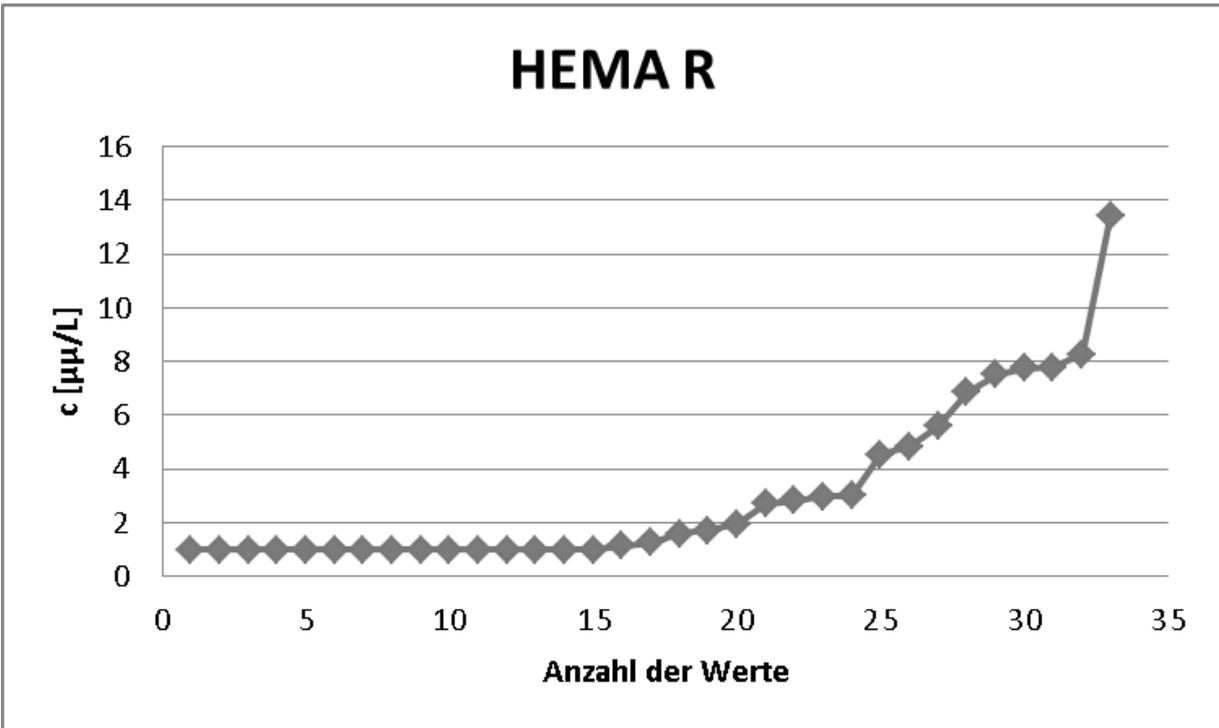
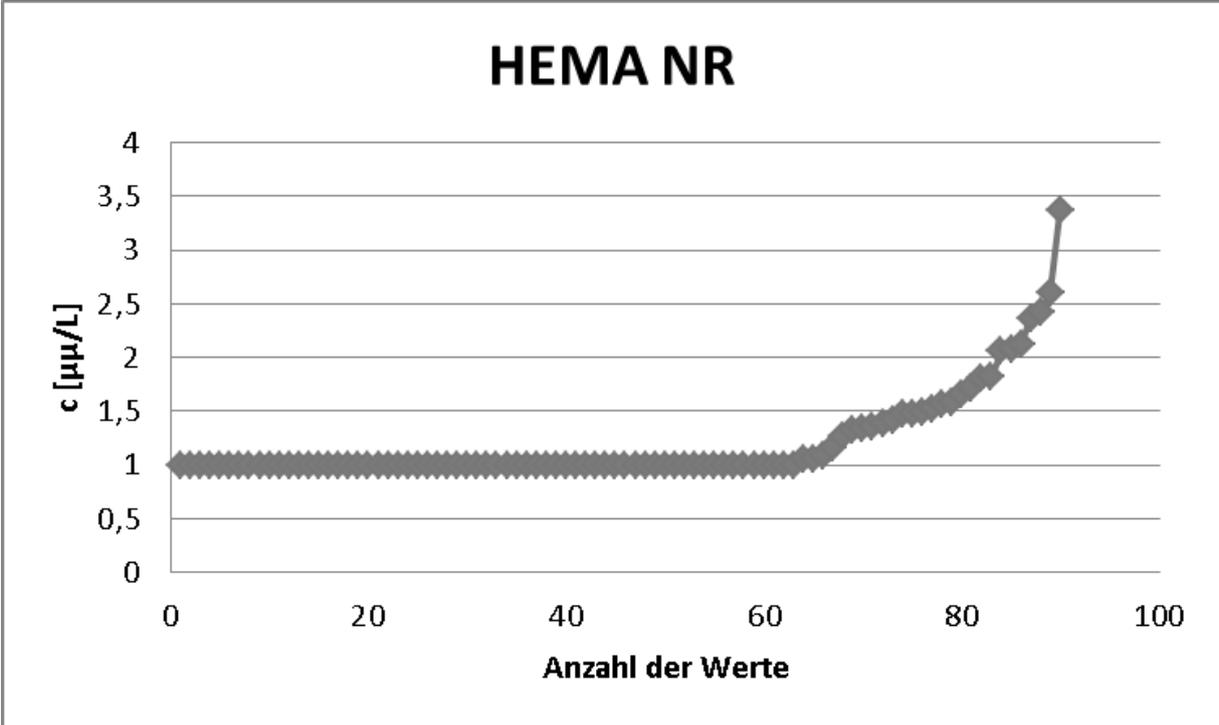
	NR (n = 93)	R (n = 33)	Signifikanz zwischen R und NR
Werte < NWG	66	16	
< BG aber > NWG	26	9	
> BG	1	8	
Median lower-bound	0,0 ± 0,82 µg/L	1,14 ± 3,34 µg/L	***, p = 0,0004 Höchst signifikanter Unterschied
Median upper-bound	1,0 ± 0,43 µg/L	1,14 ± 3,01 µg/L	***, p = 0,0008 Höchst signifikanter Unterschied

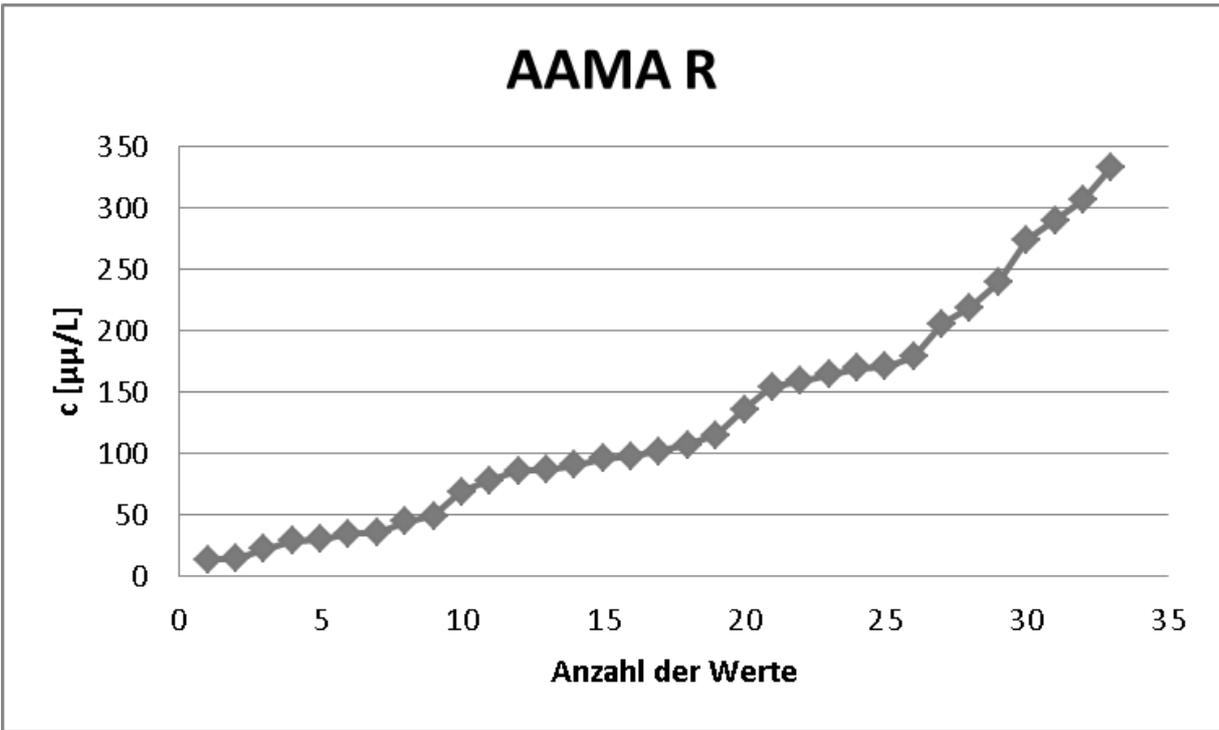
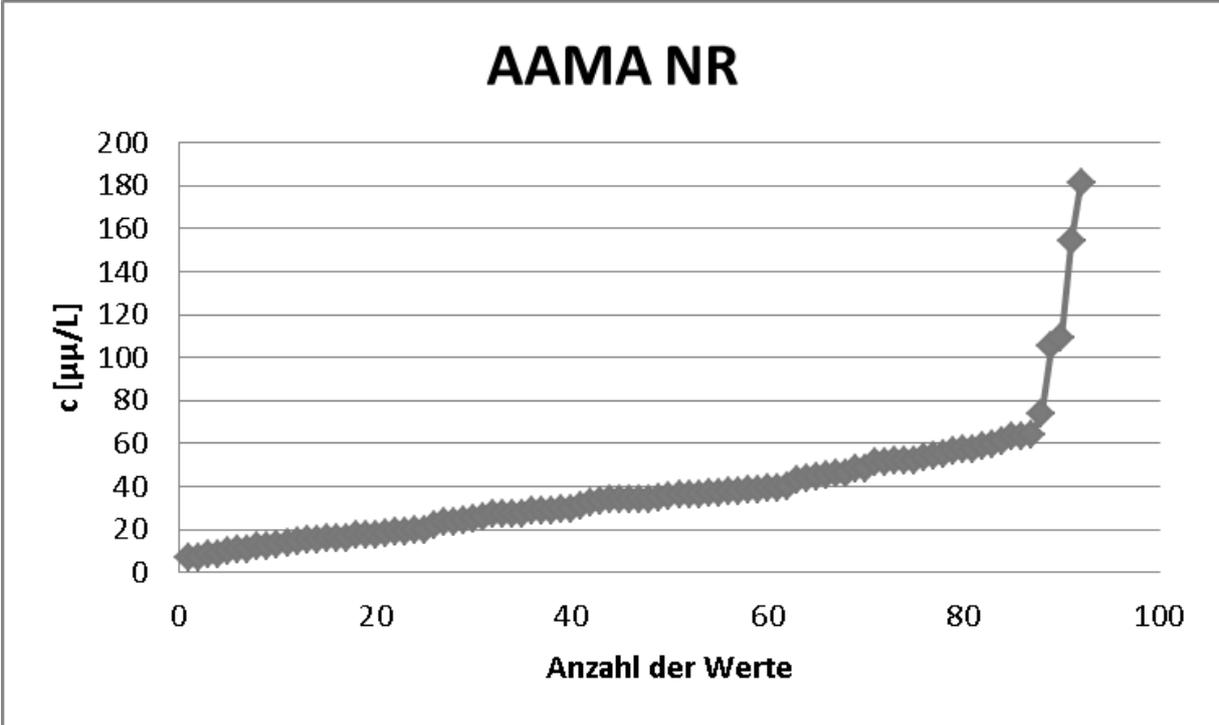
Der Effekt der Auswertung nach „lower-„ und „upper-bound-scenario“ ist vernachlässigbar. Die Auswertung erfolgt somit gemäß EFSA-Report nach dem „upper-bound-scenario“ und Werte < NWG werden durch den Zahlenwert der NWG ersetzt.

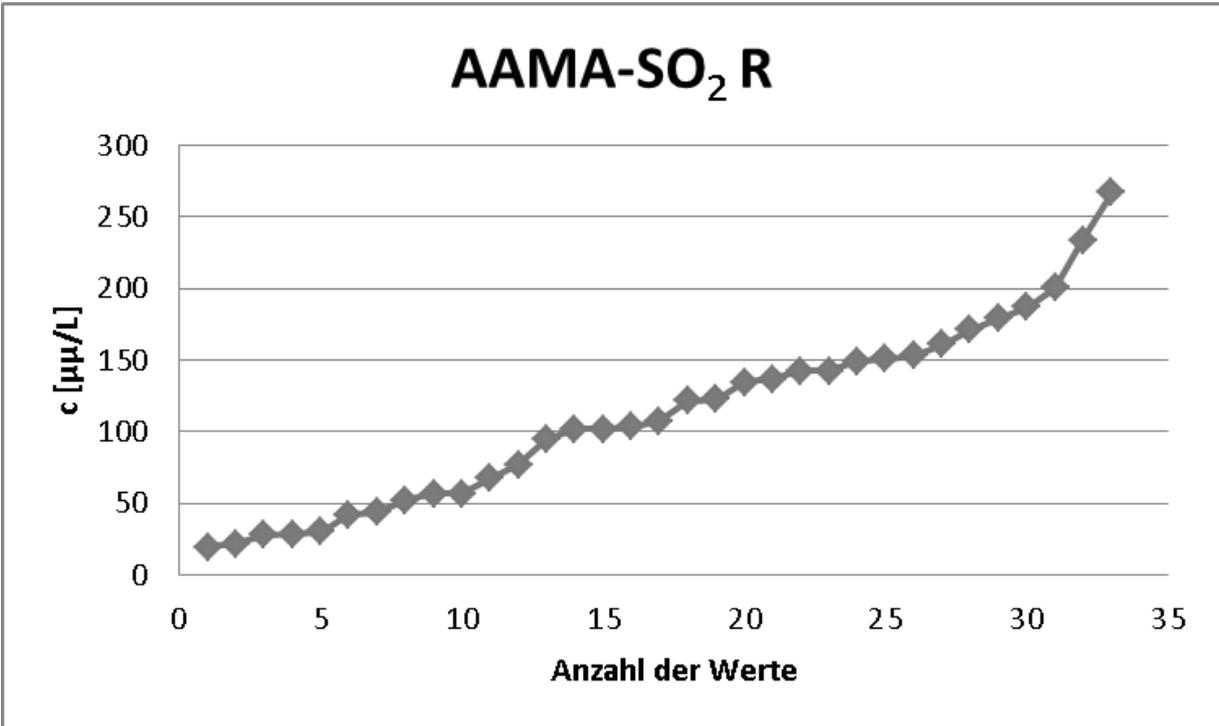
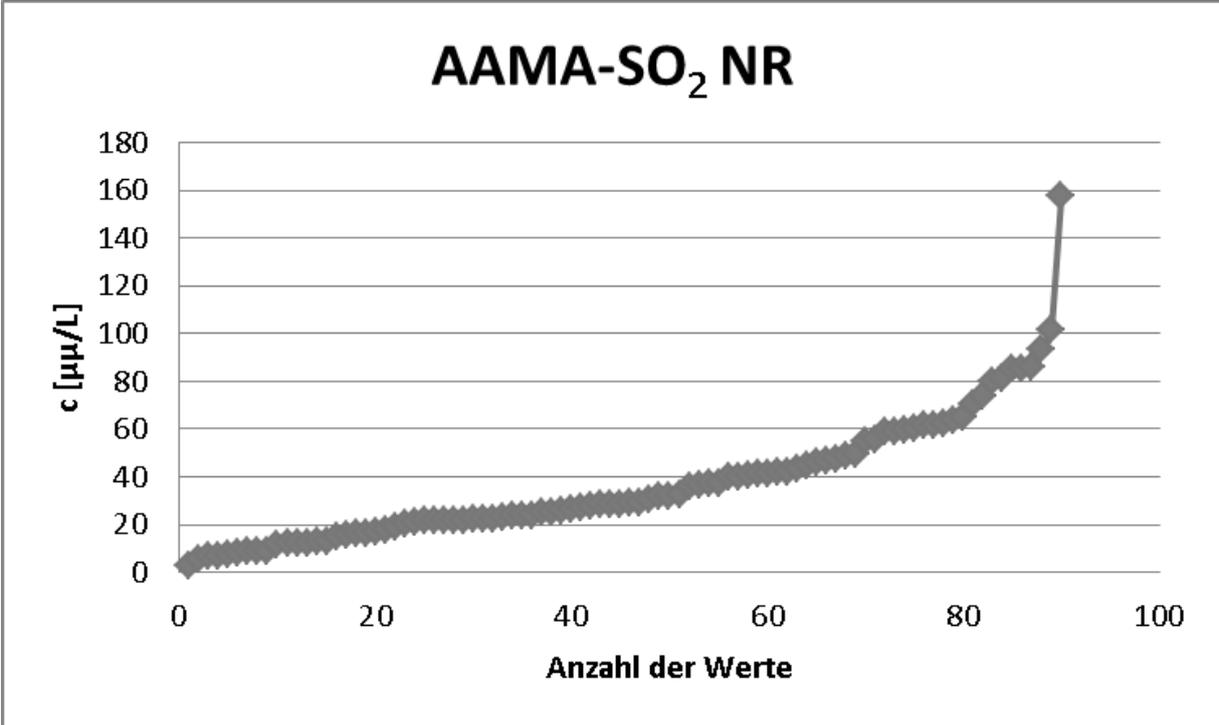
Kumulative Verteilungen

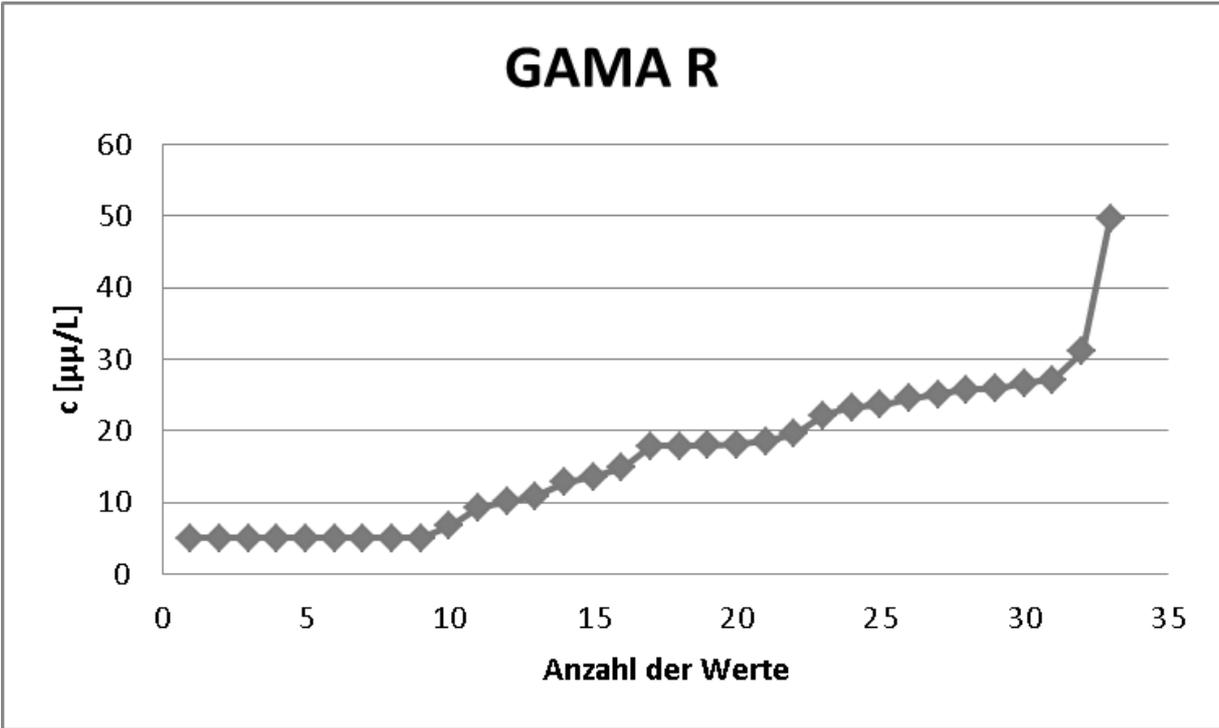
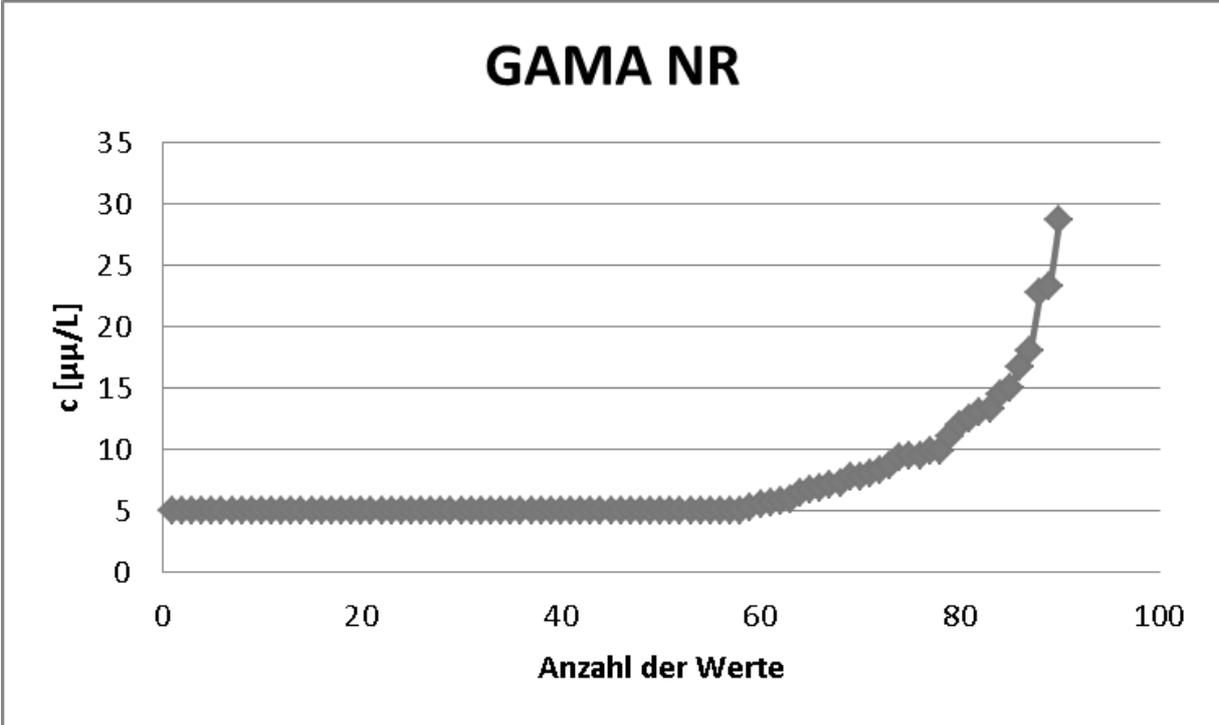


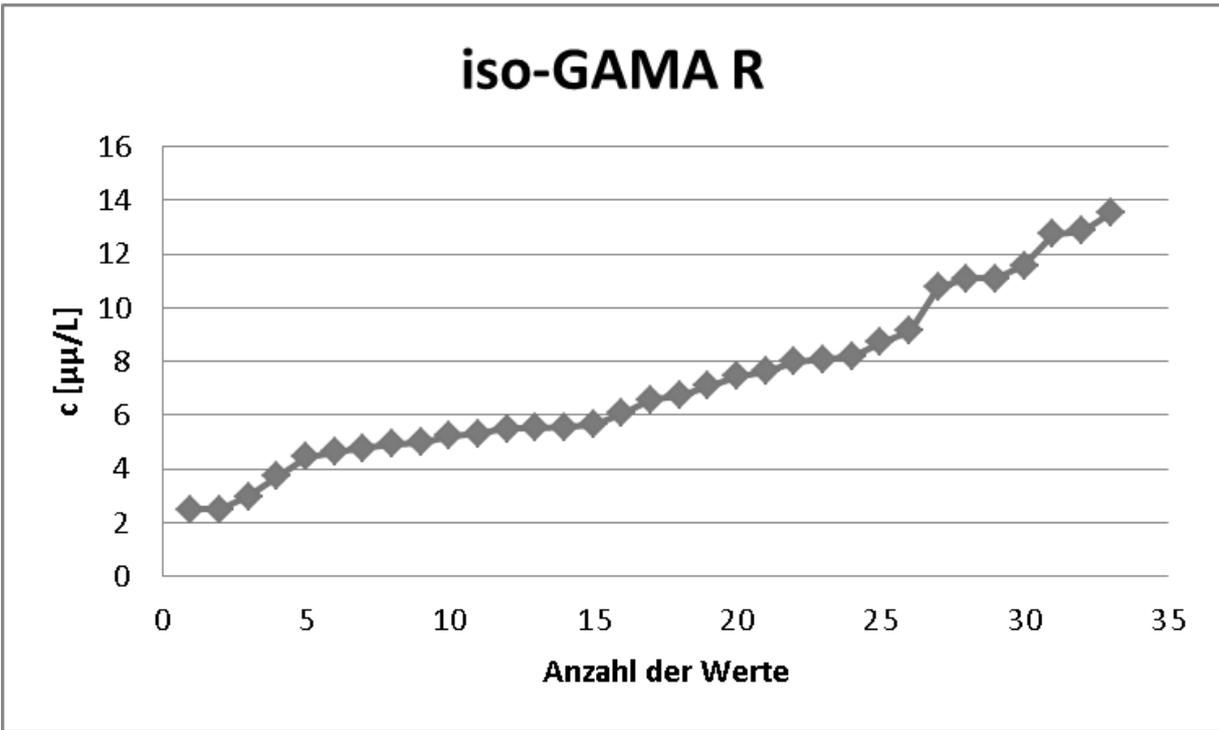
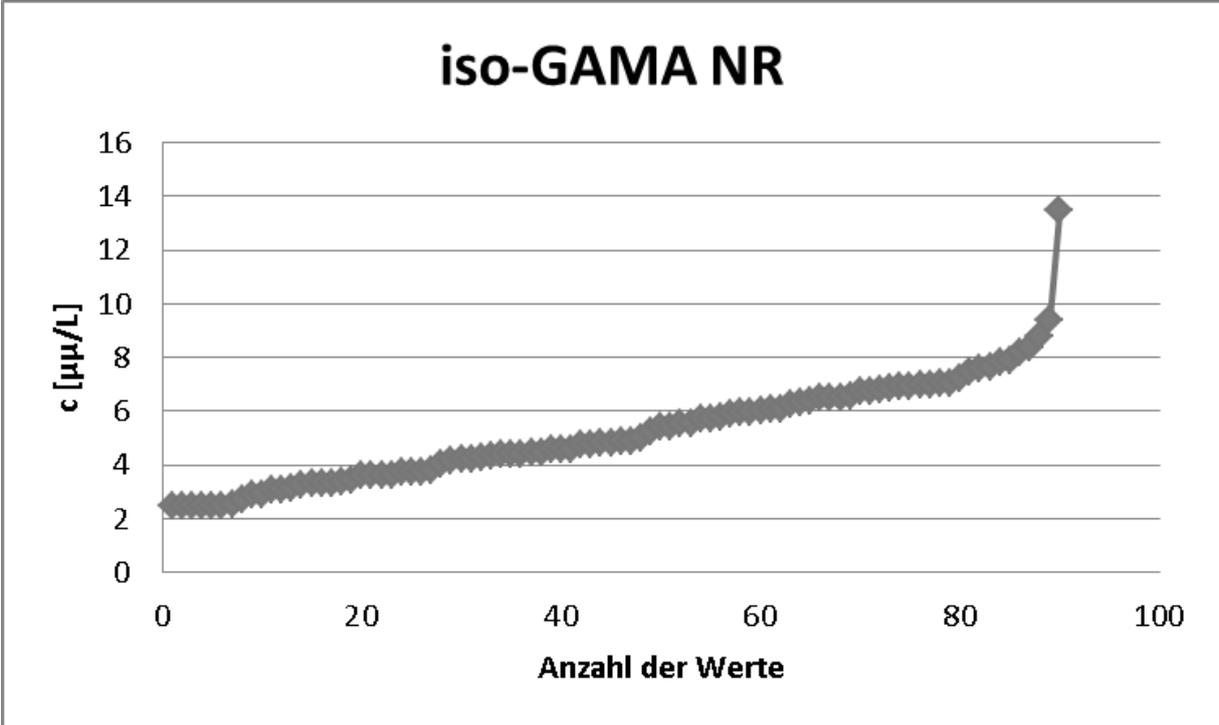


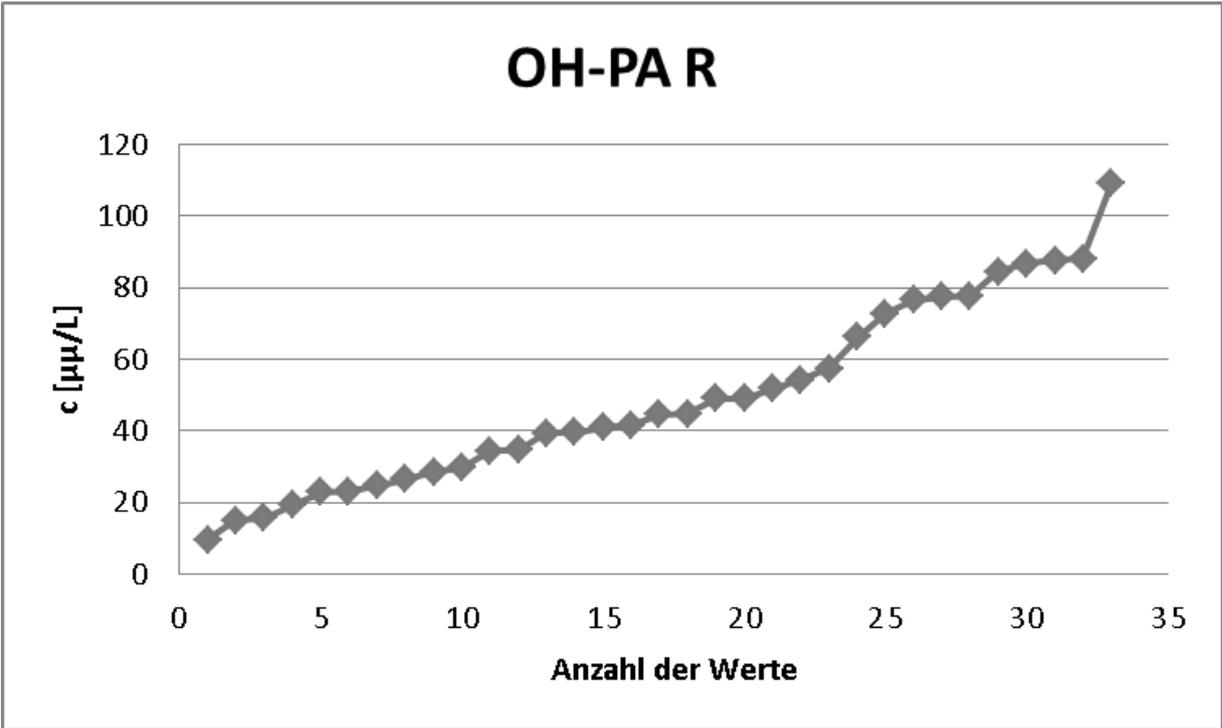
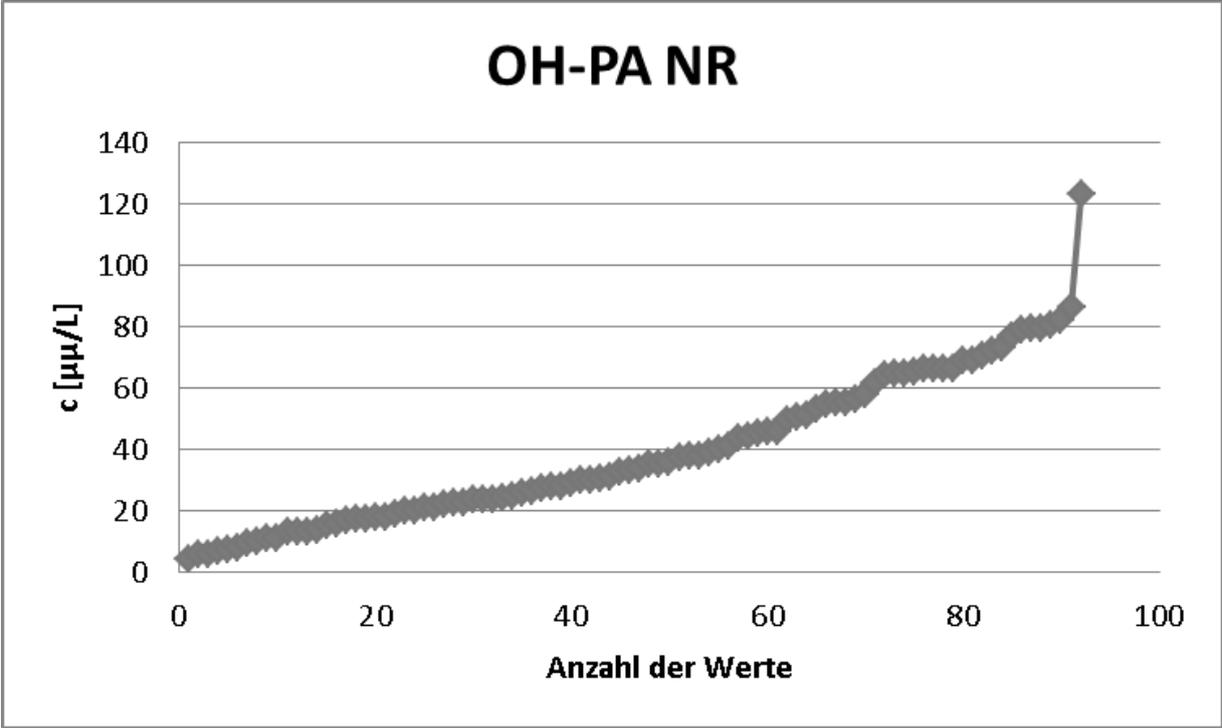


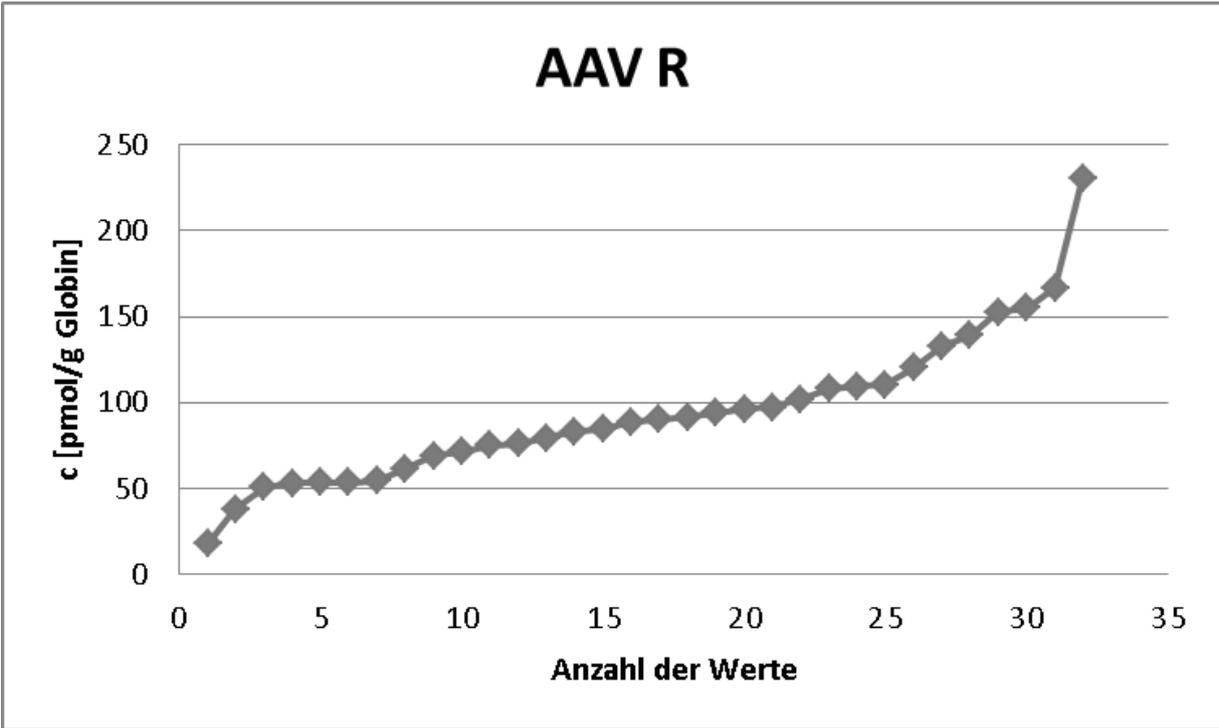
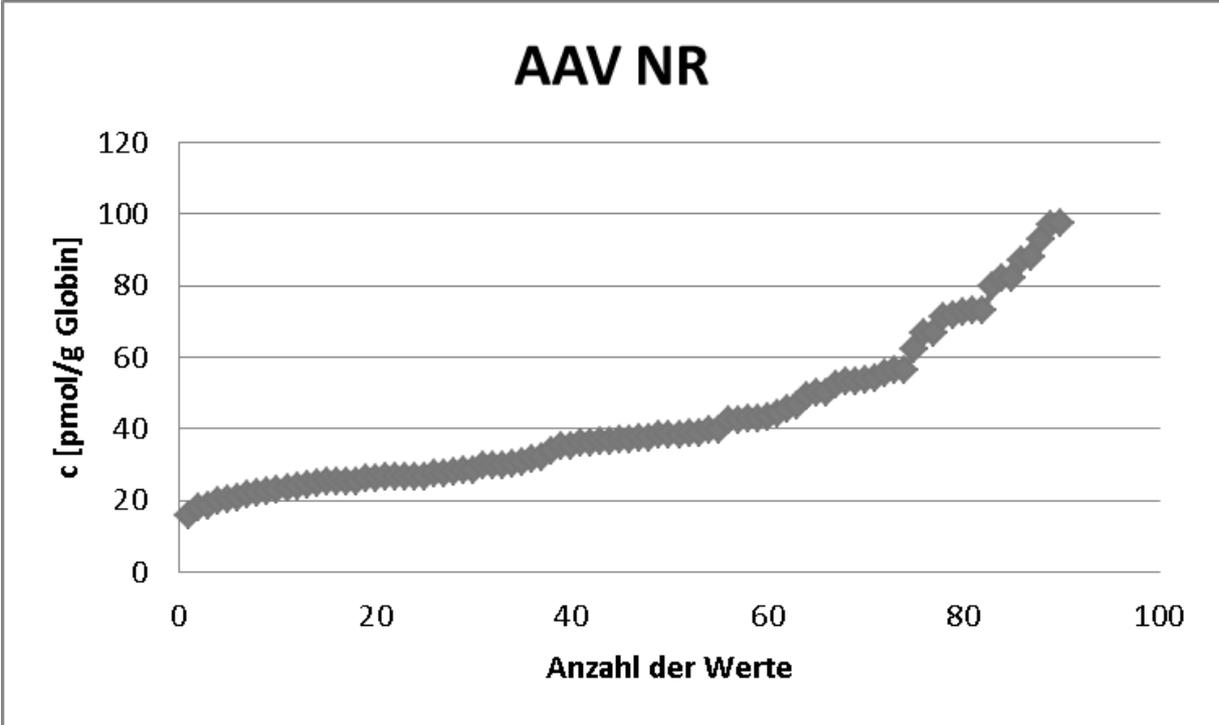




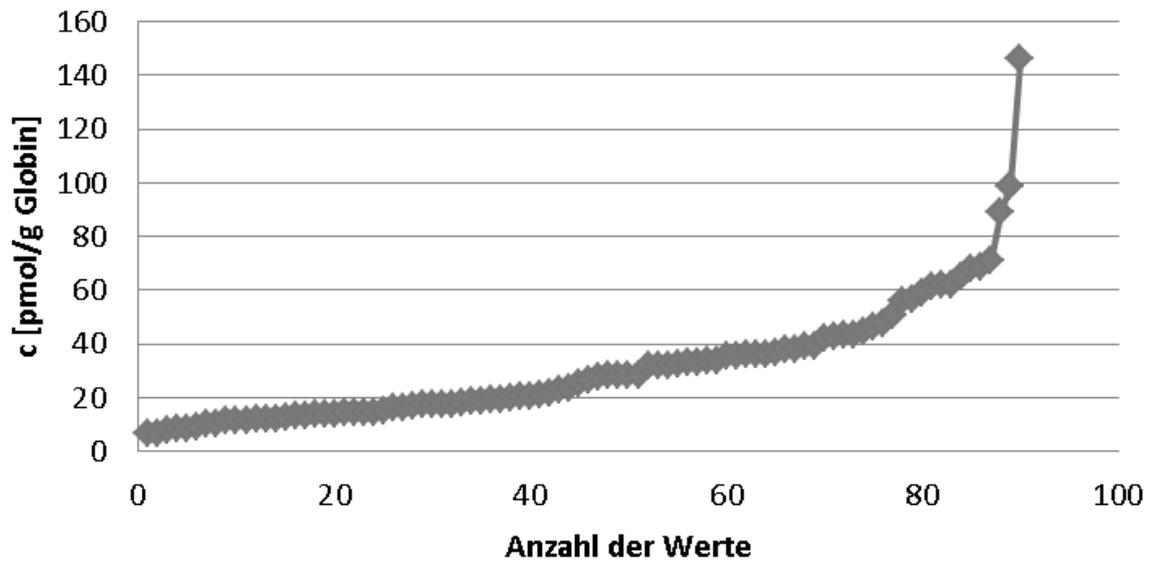








GAV NR



GAV R

