

Abschlußbericht

Forschungsvorhaben Nr. 2808HS013

Tierstudie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von 3-MCPD-Estern

**Fraunhofer-Institut für Toxikologie
und Experimentelle Medizin**

Projektleiter: Dr. Otto Creutzenberg

Nikolai-Fuchs-Straße 1

30625 Hannover

Tel.: (0511) 5350-461

Fax.: (0511) 5350-155

Direktor: Prof. Dr. Dr. U. Heinrich

Laufzeit: 01.01.2009 – 31.10.2011

30. November 2011

Zusammenarbeit und Projektbeteiligte

Zuwendungsgeber

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Projektleiterin des Auftraggebers: Dr. Johanna Wider
Referat 514, Projektträger Agrarforschung
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), Bonn
Referat 322 - Rückstände und Kontaminanten in Lebensmitteln, Lebensmittel-
bedarfsgegenständen

Rochusstrasse 1
53123 Bonn

Wissenschaftliche Begleitung

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen
Leiter der Abteilung Lebensmittelsicherheit (Abt. 5)
Bundesinstitut für Risikobewertung
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Zuwendungsnehmer und Berichterstatter

Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
Nikolai-Fuchs-Straße 1
30625 Hannover

Projektleiter: Dr. Otto Creutzenberg

Tierhaus: Dr. Thomas Tillmann, Herr Volker Rehse

Chemische Analytik: Dr. Edith Berger-Preiß, Susanne Gerling, Elisabeth Apel

Toxikokinetik: Dr. Tanja Hansen

Inhaltsverzeichnis

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	4
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.2 Wissenschaftliche und technische Ausgangssituation	4
2 Material und Methoden	6
2.1 Durchführung der Tierversuche	6
2.1.1 Beschaffung der Prüfsubstanzen	6
2.1.2 Applikation der Prüfsubstanzen	6
2.1.3 Design und Durchführung	6
2.2 Chemisch-analytische Untersuchungen	9
2.2.1 Bestimmung von freiem 3-MCPD in Blut, Urin, Leber, Niere, Fett nach dem HFBA-Verfahren	9
2.2.2 Bestimmung von fettsäuregebundenem 3-MCPD (3-MCPD-ester nach Esterhydrolyse) in Blut, Leber, Niere, Fett und simultane Bestimmung von freiem 3-MCPD und 3-MCPD-ester (nach Esterhydrolyse) in Kot, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt, Dünndarmwand, Dickdarmwand nach dem PBA-Verfahren	10
3 Ergebnisse	11
3.1 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse	11
3.1.1 Blutuntersuchungen (Kinetikstudie)	11
3.1.2 Urin- und Kotausscheidungen (Exkretionsstudie)	15
3.1.3 Untersuchung von Blut, Organen und Darmtrakt (Verteilung im Organismus)	18
3.2 Diskussion der in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse und weiterer Forschungsbedarf	25
3.3 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	28
4 Zusammenfassung	29
5 Literaturverzeichnis	31
Anhänge	
Anhang A – Übersicht: Tiergewichte, Urinvolumina, Kotmengen, Organ- und Gewebegewichte, Gewichte der Darminhalte und -wände	33
Anhang B – Einzelergebnisse, Mittelwerte, Standardabweichungen Phase 1,2,3	39
Anhang C – Ausführliche Beschreibung der Analysenmethoden	61
Anhang D – Beschreibung der Tierversuche	71

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Neueste Untersuchungen der amtlichen Lebensmittelüberwachung im Jahre 2007 ergaben hohe Mengen an 3-Monochlorpropandiol (3-MCPD)-Fettsäureestern in raffinierten Speisefetten (Margarine, Öle, fetthaltige Lebensmittel inkl. Säuglingsnahrung) (BfR, 2007; CVUA, 2007). Insbesondere für Säuglinge sah das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) einen zu geringen Sicherheitsabstand zu den im Tierversuch beobachteten toxischen Wirkungen von freiem 3-MCPD, dem Hauptmetaboliten der 3-MCPD-Ester. Da für die 3-MCPD-Ester keine toxikologischen Daten vorlagen, ging das BfR in einem konservativen Ansatz von einem 100%igen Abbau der Ester zu 3-MCPD aus. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), die zu der Zeit ebenfalls die Festsetzung von 3-MCPD-Grenzwerten in säurehydrolysierten Pflanzenproteinen diskutierte, folgte diesem konservativen Ansatz des BfR, wies aber auf die Dringlichkeit von metabolischen Kinetikdaten für 3-MCPD-ester (zeitlicher Verlauf und Ort der Freisetzung im Organismus) hin, um das Problem adäquater bewerten zu können.

Ausgangspunkt des Vorhabens war also, den Metabolismus von 3-Monochlorpropandiol (3-MCPD)-Fettsäure-estern (ggf. später auch von 3-Monochlorpropandiol (3-MCPD)-Fettsäuremonoestern) nach oraler Applikation in der Ratte zu untersuchen. Die Ermittlung neuer Daten sollte eine Einschätzung der Gesamtexposition der Bevölkerung gegenüber 3-MCPD erlauben, in der Folge sollte eine belastbare Risikobewertung durch die EFSA/das BfR und ein Risikomanagement durch das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz (BMELV) möglich werden.

1.2 Wissenschaftliche und technische Ausgangssituation

Als Hauptmetabolit der 3-MCPD-Fettsäureester tritt 3-MCPD bzw. ggf. 3-MCPD-monoester auf. Es war bei Projektbeginn nicht bekannt, ob die Spaltung der 3-MCPD-ester im Organismus zu 3-MCPD nur teilweise oder vollständig (d.h. zu 100%) erfolgt; daher hatte das BfR in seiner Risikobewertung für Säuglingsnahrung einen konservativen Ansatz verfolgt (100%). In jedem Fall konnte erwartet werden, daß beim Verdauungsvorgang 3-MCPD freigesetzt wird. Dies ergab sich aus Modellversuchen *in vitro* von Robert et al. (2004), Stadler et al. (2007) und Zelinková et al. (2006).

Die neuen Erkenntnisse über relevante Vorkommen von 3-MCPD-Estern in raffinierten Pflanzenölen und den daraus hergestellten Produkten veranlassten das BMELV, die realistische Gesamtexposition der Bevölkerung an 3-MCPD abzuschätzen und eine belastbare Risikobewertung zu erarbeiten.

In einer damaligen aktuellen Arbeit von der Stadler-Gruppe (Seefelder et al., 2008) wurden im *in vitro* System 3-MCPD-mono- bzw. -diester als Substrate mit Darm lipasen inkubiert. 3-MCPD-monoester wurden zu 95% zu 3-MCPD hydrolysiert, während bei den 3-MCPD-diestern Raten von 45%, 65% und 95% nach 1, 5 und 90 min erreicht wurden. Für die Humansituation wiesen die Autoren aber darauf hin, daß eine Hydrolyserate von 100% zu 3-MCPD unwahrscheinlich sei, weil für Triglyceride und Phospholipide ein Abbau zu 2-Monoglyceriden bekannt war. Bei Annahme eines ähnlichen Mechanismus für 3-MCPD-ester, entstünden aus 3-MCPD-diester oder 3-MCPD-1-monoester als Metaboliten 3-MCPD-2-monoester oder 3-MCPD, respektive. Um die Bildung von dem für die Bewertung relevanten 3-MCPD vorhersagen zu können, müßte man also die Zusammensetzung der 3-MCPD-mono- und -diester in der Nahrung kennen. Eine analytische Methode zur Bestimmung des 3-MCPD-mono-/diester-Verhältnisses wurde etabliert (GC-MS mit isopenmarkierten 3-MCPD-Standards) und festgestellt, daß maximal etwa 15% der in der Nahrung vorkommenden 3-MCPD-ester in der Monoester-Variante vorkommen. Daher vermuteten die Autoren, daß die 3-MCPD-ester eher marginal zur Nahrungsexposition gegenüber 3-MCPD

beitragen sollten. Gleichzeitig wiesen sie aber darauf hin, dass nur Realdaten zur Bioverfügbarkeit, zum Metabolismus und zur Toxizität der 3-MCPD-ester die Situation klären könnten.

Ziel des Vorhabens sollte es daher sein, den Metabolismus der Fettsäureester und das Ausmaß der Entstehung von 3-MCPD zu ermitteln, weil die Risikobewertungen sich auf diesen Hauptmetaboliten beziehen, für den auch toxikologische Daten bekannt sind:

- Zielorgan Niere nach oraler Applikation bei der Ratte/Maus: erhöhte relative Nierengewichte; erhöhte Inzidenz von tubulären Hyperplasien
- Gentoxizität: *in vitro*: positiv; *in vivo* (MN, UDS): negativ; auch ein durchgeführter Comet-Assay *in vivo* war negativ (El Ramy et al., 2007) → Gesamtaussage: 3-MCPD ist nicht gentoxisch *in vivo*. Für die Tumoren, die in chronischen Studien beobachtet wurden, wird daher ein Schwellenwert angenommen.
- Es lagen 4 chronische Toxizitäts-/Kanzerogenitätsstudien vor (2 Ratte/2 Maus): 3 ohne Tumorzinzidenz; 1 Rattenstudie zeigte benigne Tumoren in einigen Organen
- Für die Risikobewertung wurde die Nierenhyperplasie als empfindlichster Endpunkt gewählt
- Provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI): 2 µg 3-MCPD/kg KG (BfR, 2007)

Weiterhin waren auch die sekundären Metaboliten von 3-MCPD von Interesse, da sich die Risikobewertung auf 3-MCPD bezog und ein Abbau des Hauptmetaboliten wesentlich die Risikobetrachtung beeinflussen würde. Als primärer Metabolit von 3-MCPD im Urin nach oraler oder intraperitonealer Gabe war β -Chlormilchsäure (3-Chlorpropioncarbonsäure) identifiziert worden (Jones, 1978). El Ramy et al. (2007) fanden folgende Ergebnisse: 3-MCPD im Comet-Assay *in vivo* negativ; β -Chlormilchsäure im Comet-Assay *in vitro* negativ, Glycidol (Zwischenprodukt) im Comet-Assay *in vitro* positiv. Diese Resultate bestätigten die obige Gesamtaussage, daß 3-MCPD inkl. des Hauptmetaboliten β -Chlormilchsäure *in vivo* nicht gentoxisch ist. Die in der BfR-Stellungnahme genannten Literaturquellen stellten den wissenschaftlichen Stand per Ende 2007 dar. Neuere relevante Arbeiten neben Seefelder et al. (2008) waren nach der Recherche des Fraunhofer ITEM nicht erschienen.

Die beiden möglichen experimentellen Versuchsansätze, d.h.

a) Chemisches Analyseverfahren: Aufbereitung der betreffenden Organe/Gewebe mit geeigneten Aufbereitungsverfahren und Analyse der Substanzen/Metaboliten; Methodik: Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie GC-MS(NCI), oder

b) Analyse mit Hilfe einer radioaktiven Markierung (^{14}C): Einsatz radioaktiv markierter Substanzen mit anschließender Analyse der biologischen Proben (Verbrennungsautomat; β -Szintillationszähler). Das ITEM verfügt für spezielle Problemstellungen auch über ein HPLC-Gerät mit integrierter Radioaktivitätsmessung (Radio-HPLC).

wurden zu Projektbeginn diskutiert. Es wurde dann entschieden, die chemisch-analytische Verfahrensweise zu bevorzugen, weil sie die Analyse definierter Analyten ermöglicht (freies 3-MCPD bzw. nach vorgeschalteter Esterhydrolyse auch das gebundene 3-MCPD), während die radioaktive Methode zwar eine prozentuale Gesamtverteilung im Körper darstellen kann, hierbei aber keinerlei Rückschlüsse auf molekulare Strukturen zulässt. Im Falle des 3-MCPD-diesters erwies sich eine Synthese mit ^3H , ^{14}C -Doppelmarkierung auch als ausgesprochen teuer (ca. 50.000 EUR) und daher schwer finanzierbar.

2 Material und Methoden

2.1 Durchführung der Tierversuche

2.1.1 Beschaffung der Prüfsubstanzen

3-MCPD

Aldrich, Cat.- Nr. 107271, Chargen-Nr. 1306133 34808210

1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol

TRC, Toronto, Kanada; Cat.-Nr. P163500, Chargen-Nr. 2-MDB-100-2

rac 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol

TRC, Toronto, Kanada; Cat.-Nr. B515200, Chargen-Nr. 7-BHW-191-1

Maisöl

Sigma, C-8267 (2,5 L), Chargen-Nr. MKBD2427

Analyse durch das chemische Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (freies 3-MCPD - n.n. (<0,01 mg/kg); estergebundenes 3-MCPD - 0,3 mg/kg (berechnet als 3-MCPD), estergebundenes Glycidol 0,5 mg/kg (berechnet als Glycidol))

2.1.2 Applikation der Prüfsubstanzen

Die Applikation der Testsubstanz 3-MCPD und 3-MCPD-ester (1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol bzw. 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol) erfolgte durch eine einmalige orale Gabe (Schlundsonde). Die Testsubstanzen wurden als Lösungen in Maisöl angesetzt und mit 8 mL Maisöl/kg KG verabreicht. Es wurde eine äquimolare 3-MCPD-Dosis von 0,5 mg/kg KG (entsprechend 2,78 mg 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol) verabreicht sowie eine 20fach höhere Dosis von 10 mg/kg KG (entsprechend 53,2 mg/kg KG 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol). Die Erhöhung der Dosis um den Faktor 20 wurde notwendig, um für die Analyse des estergebundenen 3-MCPD nach Esterhydrolyse ausreichend hohe 3-MCPD-Konzentrationen zu gewährleisten und eine Vergleichbarkeit mit der 90-Tage Toxizitätsstudie (EFSA-Studie) zu ermöglichen (Barocelli et al., 2011).

2.1.3 Design und Durchführung

Einzelheiten zu den Tierversuchen sind in Anhang D berichtet. Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an die OECD 417 Richtlinie nacheinander in einzelnen Versuchsphasen (Modul 1-3, siehe Tabelle 2.1) durchgeführt. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Modulen sind den Tabellen 2.2-2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Generelles Untersuchungskonzept

Versuchsphasen	Durchzuführende Untersuchungen
Modul 1 Kinetik-Studie	Serielle Blutentnahmen zwischen 0 - 48 h nach der Substanzgabe
Modul 2 Exkretionsstudie	Sammlung von Urin und Kot im Stoffwechsellkäfig zu engen Zeitintervallen nach der Substanzgabe
Modul 3 Verteilung im Organismus	Untersuchung von relevanten Organen zur Charakterisierung der maximalen Belastungsphase

Tabelle 2.2: Detaillierte Angaben zur Durchführung von Modul 1 (Hauptversuch 1)

Gruppe Tiere	Substanz (Dosis)	Untersuchungs-material	Zeitpunkte der Entnahme	Analyse auf
1 5 Tiere pro Zeitpunkt, 5+5 Tiere	1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (2,78 mg/kg KG)	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD
2 5 Tiere pro Zeitpunkt, 5+5 Tiere	3-MCPD (0,5 mg/kg KG)	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD
3 1+1 Tiere	Kontrolle Vehikel 8 mL/kg KG	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD

Tabelle 2.3: Detaillierte Angaben zur Durchführung von Modul 1 (Hauptversuch 2)

Gruppe Tiere	Substanz (Dosis)	Untersuchungs-material	Zeitpunkte der Entnahme	Analyse auf
1 5 Tiere pro Zeitpunkt, 5+5 Tiere	1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (53,3 mg/kg KG)	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD 3-MCPD- ester
2 5 Tiere pro Zeitpunkt, 5+5 Tiere	3-MCPD (10 mg/kg KG)	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD
3 1+1 Tiere	Kontrolle Vehikel 8 mL/kg KG	Vollblut	0,17 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 24 - 48 h Versetzte Blut-entnahme	freies 3-MCPD 3-MCPD- ester

Tabelle 2.4: Detaillierte Angaben zur Durchführung von Modul 2 (Pilotstudie)

Gruppe Tiere	Substanz (Dosis)	Untersuchungs-material	Zeitpunkte der Entnahme	Analyse auf
1 3+2 Tiere 5 Tiere	1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (53,3 mg/kg KG)	Urin	Sammelintervalle von 0-10 h; 10-12 h, 12-24 h, 24-48 h, 48-72 h	freies 3-MCPD
		Kot	0-10 h, 10-24 h 24-32 h, 32-48 h	freies 3-MCPD, 3-MCPD- ester
2 2 Tiere	3-MCPD (10 mg/kg KG)	Urin	Sammelintervalle von 0-10 h; 10-12 h, 12-24 h, 24-48 h, 48-72 h	freies 3-MCPD
		Kot	0-10 h, 10-24 h 24-32 h, 32-48 h	freies 3-MCPD, 3-MCPD- ester
3 1 Tier	Kontrolle Vehikel 8 mL/kg KG	Urin	Sammelintervalle von 0-10 h; 10-12 h, 12-24 h, 24-48 h, 48-72 h	freies 3-MCPD
		Kot	0-10 h, 10-24 h 24-32 h, 32-48 h	freies 3-MCPD 3-MCPD- ester

Tabelle 2.5: Detaillierte Angaben zur Durchführung von Modul 3 (Hauptversuch)

Gruppe Tiere	Substanz (Dosis)	Untersuchungs-material	Zeitpunkte der Entnahme	Analyse auf
1 3 Tiere pro Zeitpunkt Σ 15 Tiere	1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (53,3 mg/kg KG)	Vollbut, Leber, Niere, Fett, Dickdarm Dünndarm	1,5 - 3 - 6 - 12 -24 h	Freies 3-MCPD, 3-MCPD- ester
2 3 Tiere pro Zeitpunkt Σ 15 Tiere	3-MCPD (10 mg/kg KG)	Vollblut, Leber, Niere, Fett, Dickdarm Dünndarm	0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 h	freies 3-MCPD
3 1 Tier	Kontrolle Vehikel 8 mL/kg KG	Vollblut, Leber, Niere, Fett, Dickdarm Dünndarm	8 h	Freies 3-MCPD 3-MCPD- ester

2.2 Chemisch-analytische Untersuchungen

2.2.1 Bestimmung von freiem 3-MCPD in Blut, Urin, Leber, Niere, Fett nach dem HFBA-Verfahren

Die Blut-, Urin- und Organproben werden mit Silicagel 60 verrieben. Anschließend wird eine Säulenchromatographie durchgeführt, um Matrixbestandteile zu entfernen und 3-MCPD anzureichern. Nach Elution mit Ethylacetat erfolgt die Derivatisierung des Analyten mittels Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA). Zur Analyse des HFBA-Derivates von 3-MCPD wird die Kapillargaschromatographie mit massenselektivem Detektor im NCI-Modus verwendet. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix nach dem Internen-Standard-Verfahren (Interner Standard 3-MCPD-d₅).

In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der analytischen Methode zur Bestimmung von freiem 3-MCPD in biologischen Matrices schematisch dargestellt. Detaillierte Angaben zur Methodik sind in Anhang C aufgeführt und in der Literatur beschrieben (Berger-Preiss et al., 2010) beschrieben.

Die Methodik basiert auf Verfahren, die zur Analytik von 3-MCPD in Lebensmitteln eingesetzt wurden (Chung et al., 2002, Xu et al. 2006).

<u>Probenvorbereitung</u>		
<u>Blut (EDTA)</u>	<u>Urin</u>	<u>Organe/Fett</u>
Mischen mit Wasser	Zugabe von Essigsäure (einstellen des pHs auf 5.5) Mischen mit Wasser	Zerkleinern mit dem Skalpell Homogenisieren mit Ultra-Turrax & mischen mit Wasser
<u>Säulenaufreinigung</u>		
Vorbereitete Proben	Zugabe von Internem Standard (3-MCPD-d ₅) Zugabe von Silicagel (zerreiben im Mörser) Überführen in eine Glassäule Elution mit Ethylacetat Einengen auf 200 µL	
<u>Derivatisierung</u>		
Ethylacetat Extrakte	Zugabe von Isooctan, HFBA und TEA Mischen und Inkubieren (30 min, 60 °C) Waschen mit 0.5 M Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ Einengen auf 200-1000 µL	
<u>GC-MSD (NCI) Analyse</u>		
Isooctan Extrakte (HFBA-Derivate)	DB-5MS Säule Splitless injektion von 1 µL	
Quantifizierung	Matrixkalibrierung (Blut, Urin, Organe) in verschiedenen Konzentrationsbereichen mit 3-MCPD und 3-MCPD-d ₅ (Interne-Standard-Methode)	

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Bestimmung von 3-MCPD in biologischen Proben

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

3.1.1 Blutuntersuchungen (Kinetikstudie)

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen (Modul 1, Hauptversuch 1) nach oraler Applikation der Ratten mit 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 2,78 mg/kg KG) und 3-MCPD (0,5 mg/kg KG) in Maisöl sind in der Tabelle 3.1 (Anhang B, Tabelle 1/a) und in Abbildung 3.1 aufgeführt. Das Design der Studie ist in Tabelle 2.2 aufgezeigt. Nach der Gabe des 3-MCPD-esters steigt die Konzentration von freiem 3-MCPD im Blut innerhalb der ersten vier Stunden langsam auf maximal 38 ng/mL an. Nach 10-24 Stunden ist nur noch bei einzelnen Tieren freies 3-MCPD bestimmbar. Nach äquimolarer Dosierung von 3-MCPD in Maisöl wird die höchste Konzentration von 457 ng/mL im Blut 0,5 h nach der Substanzgabe beobachtet. Danach kommt es zu einem schnellen Abfall der 3-MCPD-Konzentration im Blut der Versuchstiere.

Bei einer 2. Tierstudie (Modul 1, Hauptversuch 2) wurde als 3-MCPD-ester das 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol in Maisöl mit einer Dosierung von 53,2 mg/kg KG verabreicht und das 3-MCPD mit 10 mg/kg KG. Das entspricht der 20-fach höheren Dosierung im Vergleich zum Hauptversuch 1. Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen über einen Zeitraum von 0,17-48 h sind in Tabelle 3.2 (Anhang B, Tabelle 1/b) und Abbildung 3.2 aufgezeigt. Auch bei dieser Studie steigt nach Gabe des 3-MCPD-esters die Konzentration von freiem 3-MCPD im Blut langsam an. Die höchsten 3-MCPD-Konzentrationen werden nach 2-4 h erreicht (1162-1015 ng/mL), danach kommt es zu einem langsamen Abfall. Nach 24 h ist bei 4 von 5 Tieren kein freies 3-MCPD mehr bestimmbar. Bei den Tieren der 3-MCPD-Gruppe wird die höchste Konzentration an freiem 3-MCPD unmittelbar nach der Applikation (nach 0,17 h) erreicht und liegt bei 4627 ng/mL, das ist ca. das 4-fache der Konzentration an freiem 3-MCPD im Vergleich zur maximalen Konzentration nach Gabe des 3-MCPD-esters. Die Konzentration von freiem 3-MCPD im Blut ist 2 Stunden nach der Verabreichung auf ca. $\frac{1}{4}$ abgefallen und liegt dann auf dem gleichen Level wie nach Gabe des Esters.

Tabelle 3.3 zeigt ausgewählte Parameter zur Charakterisierung des kinetischen Verhaltens von 3-MCPD im Rattenblut nach Applikation von 3-MCPD-ester und 3-MCPD. Wie bereits oben beschrieben, sind die maximale Konzentration c_{\max} und der Zeitpunkt der maximalen Konzentration t_{\max} nach Applikation von 3-MCPD-ester und 3-MCPD deutlich verschieden.

Der AUC-Wert (AUC^* = area under curve: Maß für die Bioverfügbarkeit) ist nach Gabe des 3-MCPD-esters nur geringfügig niedriger (ca. 13 %) als nach Gabe von 3-MCPD. Diese Erkenntnisse lassen die Annahme zu, dass der Freisetzungsgrad an 3-MCPD ähnlich ist, es aufgrund der intestinalen Hydrolyse eine zeitliche Verzögerung der Absorption gibt, was in der Folge zu einem geringeren Peaklevel an 3-MCPD im Blut führt.

Weiterhin wurde das Blut der Versuchstiere auf 3-MCPD-ester untersucht. Zu keinem Zeitpunkt konnte in einer Blutprobe 3-MCPD-ester oberhalb der Bestimmungsgrenze (2 $\mu\text{g/mL}$) bestimmt werden (Tabelle 1/c im Anhang B).

*Bioverfügbarkeit mithilfe von AUC-Berechnungen

In der Medizin und Pharmakologie bezeichnet **Area under the curve** (AUC) die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve eines Pharmakons im Blut. Sie ist die Größe, durch welche die Bioverfügbarkeit eines Pharmakons ausgedrückt wird.

Man misst dazu die Konzentration des Arzneimittels in bestimmten Zeitintervallen im Blut nach Verabreichung. Für ein oral verabreichtes Medikament hat die aus der Messung resultierende Konzentrations-Zeit-Kurve einen typischen Verlauf, der sich aus der Geschwindigkeit des Übergangs des Arzneistoffs in den systemischen Blutkreislauf und aus der Kinetik des Ausscheidens zusammensetzt. Bei intravenöser Verabreichung ergibt sich eine Konzentrations-Zeit-Kurve die praktisch nur durch die Ausscheidungskinetik bestimmt ist. Der Wert der AUC (Einheit: Masse / Volumen \times Zeit) ist proportional der bioverfügbaren Menge des Arzneimittels, d. h. des Anteils an der insgesamt verabreichten Menge, die in den Blutkreislauf kommt, unabhängig von der Applikationsart. Für einen intravenös verabreichten Stoff ist die Bioverfügbarkeit (F) per Definition 100%. Ist bei oraler Gabe eines Medikaments die AUC gleich groß wie bei intravenöser Gabe, beträgt die Bioverfügbarkeit auch 100%, ist sie geringer, ist auch die Bioverfügbarkeit entsprechend geringer.

Tabelle 3.1: Phase 1 - Statistische Kenngrößen zur Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 2,78 mg/kg KG, n=5), 3-MCPD (0,5 mg/kg KG, n=5), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.2.

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	3-MCPD-Konzentration im Blut nach				
		0,17 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
3-MCPD-ester (2,780 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	4 - 12	4 - 12	4 - 12	14,4 - 31,2	19,0 - 70,1
	Mittelwert [ng/mL]	k.A.	k.A.	k.A.	20,9	38,0
	SD [ng/mL]	k.A.	k.A.	k.A.	6,6	21,0
3-MCPD (0,5 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	190 - 391	343 - 675	148 - 285	103 - 165	< BG - 27,3
	Mittelwert [ng/mL]	254	457	214	135	16,6
	SD [ng/mL]	85,1	129	63,6	27,3	13,1

Substanz/Dosis	Kenngrößen	3-MCPD-Konzentration im Blut nach			
		6 h	10 h	24 h	48 h
3-MCPD-ester (2,780 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	16,9 - 46,4	< BG - 13,4	< BG - 31,3	< BG
	Mittelwert [ng/ml]	30,3	6,3	9,3	< BG
	SD [ng/mL]	11,8	5,5	14,7	k.A.
3-MCPD (0,5 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	4,2 - 16,5	< BG - 24,5	< BG	< BG
	Mittelwert [ng/mL]	7,7	10,5	< BG	< BG
	SD [ng/mL]	5,9	9,8	k.A.	k.A.

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze 4 ng/mL; Werte < BG mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A. Berechnung nicht sinnvoll

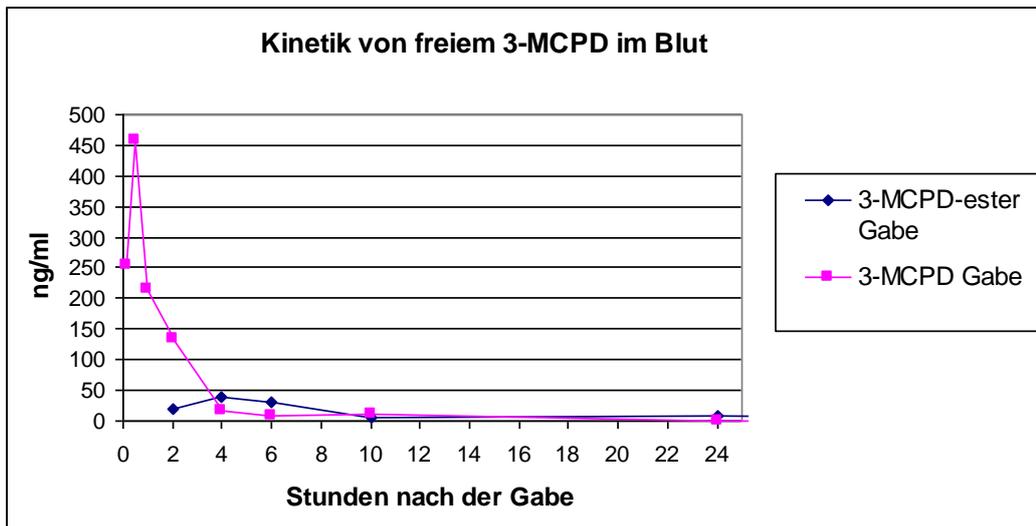


Abbildung 3.1: Konzentrationen von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 2,780 mg/kg KG, n=5), 3-MCPD (0,5 mg/kg KG, n=5), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.2.

Tabelle 3.2: Phase 1 - Statistische Kenngrößen zur Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG, n=5), 3-MCPD (10 mg/kg KG, n=5), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.3.

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	3-MCPD-Konzentration im Blut nach				
		0,17 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	45,0 - 75,1	280 - 375	379 - 593	546 - 1763	857 - 1258
	Mittelwert [ng/mL]	57,8	343	498	1162	1015
	SD [ng/mL]	11,8	38,9	89,1	508	172
3-MCPD (10 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	3600 - 6468	2861 - 4489	2366 - 6167	819 - 1544	202 - 617
	Mittelwert [ng/mL]	4627	3523	3734	1074	422
	SD [ng/mL]	1121	613	1496	277	171

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze 12 ng/mL;

Werte < BG mit 0,5 BG berücksichtigt

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	3-MCPD-Konzentration im Blut nach			
		6 h	10 h	24 h	48 h
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	438 - 1009	122 - 326	< BG - 20,4	< BG - 32,1
	Mittelwert [ng/mL]	668	223	8,9	11,2
	SD [ng/mL]	215	75,3	6,4	11,7
3-MCPD (10 mg/kg)	Min. - Max. [ng/mL]	34,6 - 245	95,7 - 268	< BG	< BG
	Mittelwert [ng/mL]	137	149	< BG	< BG
	SD [ng/mL]	94,4	70,2	k.A.	k.A.

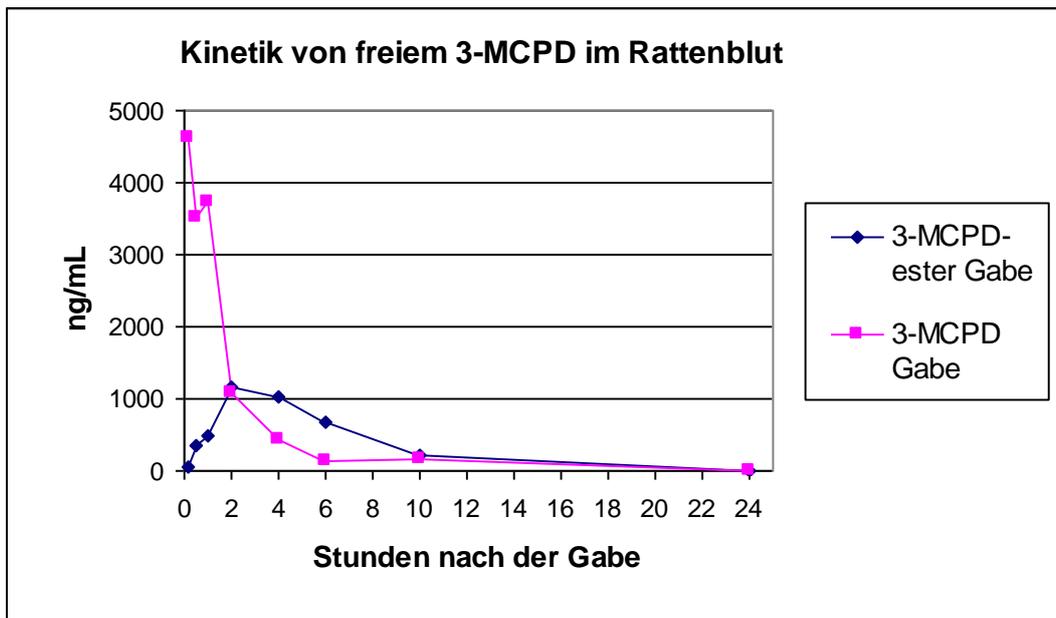


Abbildung 3.2: Konzentrationen von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG, n=5), 3-MCPD (10 mg/kg KG, n=5), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.3.

Tabelle 3.3: Kinetikparameter* im Rattenblut nach Applikation von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG, n=5) und 3-MCPD (10 mg/kg KG, n=5)

Parameter	Einheit	3-MCPD-ester	3-MCPD
C_{max}	ng/ml	1162	4627
t_{max}	h	2,0	0,17
AUC_{cum}	h*(ng/ml)	7599	8777
AUC_{tot}	h*(ng/ml)	7637	8807
k_e	1/h	0,24	0,2
$t_{1/2}$	h	2,9	3,5

*Die toxikokinetischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm Kinetica 4.4. Zur Datenauswertung wurden die Ergebnisse der Blutkonzentrationen von Phase 1 (0,17 - 24 h nach Gabe von 3-MCPD-ester und 3-MCPD, jeweils die Mittelwerte bei jedem Zeitpunkt) betrachtet. Werte < BG wurden mit 0,5 BG berücksichtigt.

3.1.2 Urin- und Kotausscheidungen (Exkretionsstudie)

Nach der Verabreichung von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol in Maisöl mit einer Dosierung von 53,2 mg/kg KG bzw. von 3-MCPD (Dosierung von 10 mg/kg KG) wurden von den Tieren in Stoffwechselläufigen zu bestimmten Zeitpunkten Urin- und Kotproben gesammelt. Das Design des Moduls 2 ist in Tabelle 2.4 aufgezeigt.

Das Modul 2 wurde im Rahmen einer Pilotstudie durchgeführt, eine nachfolgende optimierte Hauptstudie erfolgte nicht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen für freies 3-MCPD im Urin sind in Tabelle 3.4 und in Abbildung 3.3 zusammenfassend aufgeführt.

Die Einzelergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B gezeigt (Tabelle 2/a_1; Tabelle 2/a_2).

Nach der Gabe von 3-MCPD-ester enthält der nach 10-12 h gesammelte Urin der Versuchstiere die höchsten 3-MCPD Konzentrationen (14,5 µg/g), danach kommt es zu einem langsamen Abfall und nach 24 h ist die Urinbelastung nur noch sehr gering. Bei den Tieren der 3-MCPD Gruppe ist der Wert für die höchste Konzentration vergleichbar (13,2 µg/g), wird jedoch zeitlich gesehen schon früher erreicht. Die Konzentrationen an freiem 3-MCPD im Urin nehmen dann langsam ab. Betrachtet man die Wiederfindungen von freiem 3-MCPD im Gesamturin während der entsprechenden Sammelperioden, berechnet als % (in Bezug zur verabreichten Dosis), so liegt nach Applikation des 3-MCPD-esters der maximale Wert bei 0,86 % und die Gesamtausscheidung bei 2,4 %. Nach Gabe des 3-MCPD werden mit 0,85 % (Maximalwert) und 2,0 % (Gesamturinausscheidung) ähnliche Werte ermittelt, allerdings erfolgt die Ausscheidung zeitlich gesehen etwas schneller (siehe Abbildung 3.3).

Die Ergebnisse der Untersuchungen für freies 3-MCPD und 3-MCPD-ester im Kot sind in Tabelle 3.5 zusammenfassend aufgeführt.

Die Einzelergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B gezeigt (Tabelle 2/b_1; Tabelle 2/b_2).

Nach der Verabreichung des 3-MCPD-esters enthält der nach 10-24 h gesammelte Kot die höchste Konzentration an 3-MCPD. Nach der Applikation von 3-MCPD ist die Konzentration deutlich geringer, allerdings liegen in dieser Gruppe nur Werte von 2 Tieren vor. Bei Betrachtung der Wiederfindung von 3-MCPD im Gesamtkot der Tiere bis 48 nach der Applikation ergeben sich mit 1,4 % nach 3-MCPD-ester Applikation und 0,5 % nach 3-MCPD Gabe nicht stark unterschiedliche Werte.

Des Weiteren erfolgten bei den Tieren, denen der 3-MCPD-ester verabreicht wurde, Untersuchungen zu Bestimmung des 3-MCPD-esters im Kot. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.5. Die Einzelergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B aufgeführt (Tabelle 2/c_1; Tabelle 2/c_2).

Nach der Applikation des 3-MCPD-esters wurde mit 72,5 µg/g die höchste 3-MCPD-ester Konzentration im Zeitraum zwischen 10-24 h ermittelt, das entspricht einer Wiederfindung (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 1,1 % und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die Wiederfindung des freien 3-MCPD.

Tabelle 3.4: Phase 2 - Konzentrationen und Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n=5 bzw. 2 Einzeltiere) von freiem 3-MCPD im Urin 10 - 72 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Freies 3-MCPD im Urin nach							
Substanz (Dosis)		0-10 h	10-12 h	12-24 h	24-48 h	48-72 h	Gesamt
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	5,3	14,5	6,2	0,39	< BG	
	Mittelwert [Dosis %]	0,69	0,86*	0,74*	0,14	k.A.	2,4
3-MCPD (10 mg/kg)	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	13,2	9,2	2,2	1,3	< BG	
	Mittelwert [Dosis %]	0,85	0,50	0,32	0,33	k.A.	2,0

Tier 1104 und Tier 1105 (10-24 h-Wert bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt)

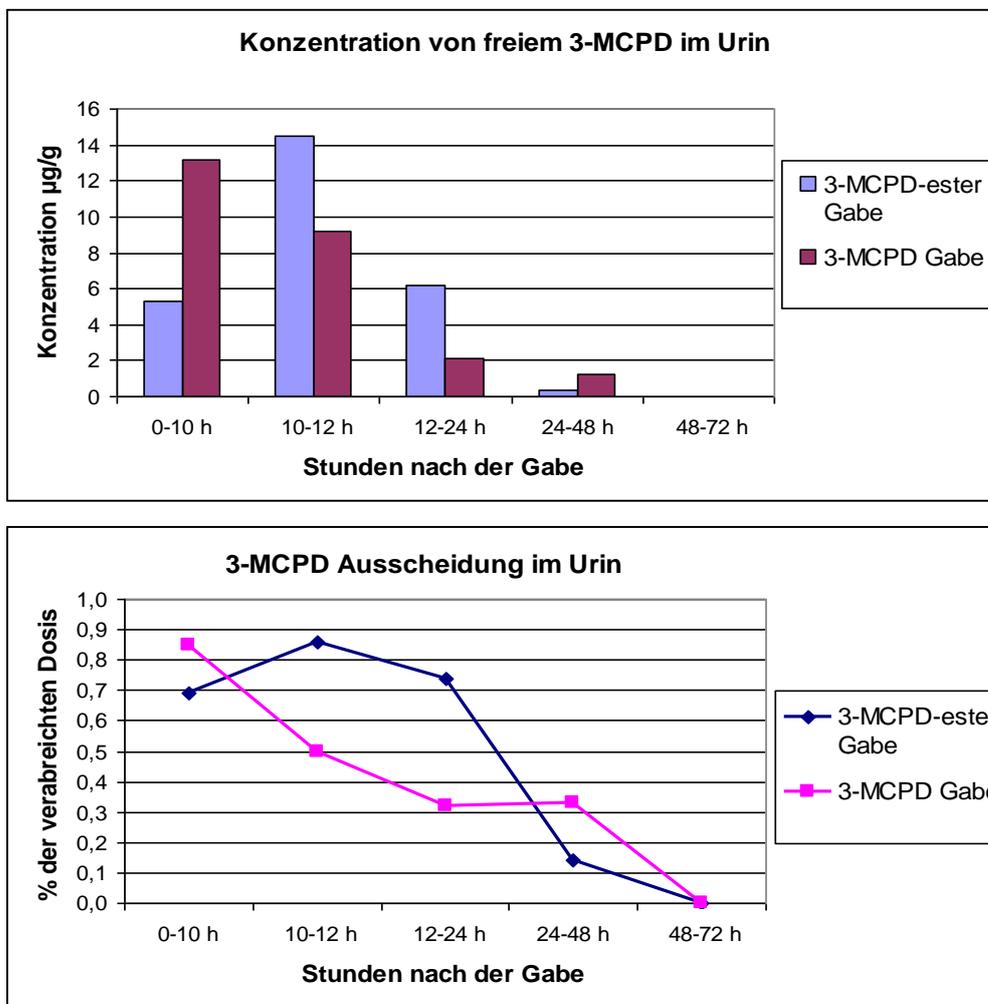


Abbildung 3.3: Phase 2 - Konzentrationen und Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n=5 bzw. 2 Einzeltiere) von freiem 3-MCPD im Urin 10 - 72 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Tabelle 3.5: Phase 2 - Konzentrationen und Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n=5 bzw. 2 Einzeltiere) von freiem 3-MCPD und 3-MCPD-ester im Kot 0 - 48 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), . 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

		Freies 3-MCPD und 3-MCPD-ester im Kot nach				
Substanz (Dosis)		0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h	Gesamt
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	Freies 3-MCPD					
	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	k.A.	16,4	0,17	< BG	
	Mittelwert [Dosis %]	k.A.	1,4	0,012	k.A.	1,4
	3-MCPD-ester					
	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	k.A.	72,5	2,6	< BG	
	Mittelwert [Dosis %]	k.A.	1,1	0,034	k.A.	1,1
3-MCPD (10 mg/kg)	Freies 3-MCPD					
	Mittelwert [$\mu\text{g/g}$]	1,8	2,0	0,60		
	Mittelwert [Dosis %]	0,12	0,18	0,20		0,50

3.1.3 Untersuchung von Blut, Organen und Darmtrakt (Verteilung im Organismus)

Das Design des Moduls 3 ist in Tabelle 2.5 aufgezeigt. Es wurden Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarminhalt, Dünndarmwand, Dickdarminhalt und Dickdarmwand der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Als Zeitpunkte wurden 1,5 h; 3 h; 6 h; 12 h und 24 h nach der Verabreichung von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol in Maisöl mit einer Dosierung von 53,2 mg/kg KG bzw. 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h und 8 h nach der Gabe von 3-MCPD (Dosierung von 10 mg/kg KG) gewählt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind für die Konzentrationen an freiem 3-MCPD in Tabelle 3.6 und 3.8 und in Abbildung 3.4 zusammenfassend aufgeführt.

Die Einzelergebnisse der Konzentrationen mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B gezeigt (Blut - Tabelle 3/a_1; Leber - 3/b_1; Niere - 3/c_1; Fett 3/d_1; Dünndarminhalt - 3/e_1; Dünndarmwand - 3/f_1; Dickdarminhalt - 3/h_1; Dickdarmwand - 3/i_1).

Nach der Gabe von 3-MCPD-ester werden in Blut und Organen nach 1,5-6 h die höchsten Konzentrationen an freiem 3-MCPD erreicht (0,6-0,8 µg/g), danach wird ein langsamer Abfall beobachtet. Die 3-MCPD Konzentrationen in den Dickdarm- und Dünndarminhalten sind deutlich höher als in Blut und den Organen (ca.15-35 fach). Das Maximum im Dünndarminhalt tritt nach 3 h auf, im Dickdarminhalt liegt es mit leichter Verschiebung bei 3-6 h. Die zeitliche Abnahme der 3-MCPD Konzentrationen ist in Abbildung 3.4 a) graphisch veranschaulicht.

Nach der Applikation von 3-MCPD treten die höchsten Konzentrationen in Blut, Leber und Niere (5-6 µg/g) bereits nach 0,5 h auf. Die 3-MCPD Konzentrationen im Dünndarminhalt sind ähnlich wie in den Organen (Dickdarminhalt leicht niedriger). Die zeitliche Abnahme der 3-MCPD Konzentrationen in den einzelnen Matrices verläuft ähnlich (Abbildung 3.4 b).

Nach 0,5 h sind die 3-MCPD Konzentrationen in Blut, Leber und Niere um ca. Faktor 8 höher als 1,5 h nach Verabreichung des 3-MCPD-esters. Nach 4 h erreichen die 3-MCPD Konzentrationen in den Organen ähnliche Werte wie 12 h nach Gabe des Esters.

In den Tabellen 3.9 und 3.11 sowie Abbildung 3.5 sind die Wiederfindungen an freiem 3-MCPD berechnet in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) nach der Gabe von 3-MCPD-ester bzw. 3 MCPD zusammengefasst aufgezeigt. Die Einzelergebnisse der prozentualen Wiederfindungen mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B aufgeführt. (Blut - Tabelle 3/a_2; Leber - 3/b_2; Niere - 3/c_2; Fett 3/d_2; Dünndarminhalt - 3/e_2; Dünndarmwand - 3/f_2; Dünndarminhalt + Dünndarmwand - 3/g; Dickdarminhalt - 3/h_2; Dickdarmwand - 3/i_2; Dickdarminhalt+Dickdarmwand – 3/j).

Nach der Gabe des 3-MCPD-esters (Tabelle 3.9 und Abbildung 3.5a) liegen die Wiederfindungen im Maximum bei 0,42 % für Blut (nach 1,5 h), 0,25 % für Leber (nach 3 h), 0,067 % für (Niere, 6 h), 0,014 % für Fett (nach 3 h), 4,1 % für Dünndarm (nach 3 h), 7,5 % für Dickdarm (nach 6 h). Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der intestinalen Hydrolyse des Esters die höchsten 3-MCPD Gehalte in den Darminhalten zu finden sind.

Bei der Gesamtbetrachtung ergibt sich, das im Zeitraum zwischen 1,5 und 6 Stunden nach der Gabe zwischen 6-10 % der verabreichten 3-MCPD-ester Dosis als freies 3-MCPD in den Tieren wieder gefunden wird.

Die Tabelle 3.11 und Abbildung 3.5c) zeigen die Wiederfindungen an freiem 3-MCPD nach Verabreichung der äquimolaren Dosis von 3-MCPD.

Die Wiederfindungen liegen im Maximum (in der Regel bei 0,5 h, Ausnahme Dünndarm bei 1 h) bei 3,7 % (Blut), 1,7 % (Leber), 0,44 % (Niere), 0,1 % (Fett), 3,1 % (Dünndarm), 1,2 % (Dickdarm). Die Wiederfindungen an freiem 3-MCPD sind ähnlich hoch im Blut, der Leber und in den Darminhalten, was für eine schnelle Absorption und Verteilung des 3-MCPDs im Organismus spricht. Bei der Gesamtbetrachtung zeigt sich, dass im Zeitraum zwischen 0,5 und 1 h nach der Gabe zwischen 8-10 % der verabreichten 3-MCPD Dosis als freies 3-MCPD im Tier gefunden wird.

Des Weiteren wurden bei den Tieren, denen der 3-MCPD-ester verabreicht wurde, Untersuchungen zu Bestimmung des 3-MCPD-esters durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.7 und Anhang B (Einzeldaten der Konzentrationen, Mittelwerte und Standardabweichungen von Blut - Tabelle 3/k; Leber - 3/l; Niere – 3/m; Fett 3/n; Dünndarminhalt - 3/o_1; Dünndarmwand - 3/p_1; Dickdarminhalt - 3/r_1; Dickdarmwand - 3/s_1).

Im Blut und den Organen konnte kein 3-MCPD-ester oberhalb der Bestimmungsgrenze gefunden werden.

Im Dünndarminhalt sind 1,5 h nach der Applikation die Esterkonzentrationen deutlich höher als im Dickdarminhalt, nach 3 h kommt es zu einer Angleichung und nach 6 Stunden ist die Esterkonzentration im Dünndarminhalt sehr gering, jedoch noch nicht im Dickdarminhalt.

Es lässt sich feststellen, dass die Esterkonzentrationen in den Darminhalten deutlich höher sind, als die Konzentrationen (Tabelle 3.6) von freiem 3-MCPD (Dünndarminhalt: Faktor 65-110 nach 1,5-3 h; Dickdarminhalt: Faktor 27 nach 3-6 h). Während im Dünndarminhalt nach 6 Stunden sowohl die Konzentrationen von freiem als auch von 3-MCPD-ester nahe bzw. unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen, sind im Dickdarminhalt zu diesem Zeitpunkt die höchsten Konzentrationen für beide Stoffe zu beobachten.

In der Tabelle 3.10 und Abbildung 3.5b) sind die Wiederfindungen an 3-MCPD-ester berechnet in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) aufgezeigt. Die Einzelergebnisse der prozentualen Wiederfindungen mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B aufgeführt (Dünndarminhalt - 3/o_2; Dünndarmwand - 3/p_2; Dünndarminhalt + Dünndarmwand - 3/q; Dickdarminhalt - 3/r_2; Dickdarmwand - 3/s_2; Dickdarminhalt + Dickdarmwand - 3/t).

Der 3-MCPD-ester wird 1,5 h nach der Applikation zu 61 % und nach 3 h zu 45 % im Dünndarm gefunden. Im Dickdarm treten die höchsten Werte (27-33 %) nach 3-6 Stunden auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass 1,5 - 3 h nach der Applikation des Esters dieser noch zu 60-70 % der verabreichten Dosis in den Darminhalten vorliegt, danach nimmt der Estergehalt deutlich ab.

Tabelle 3.6: Phase 3 - Konzentrationen (Mittelwerte, n=3, Einzeltiere) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Zeitpunkt	Freies 3-MCPD Konzentration					
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜD ¹⁾	DID ²⁾
h	µg/mL	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
1,5	0,69	0,68	0,61	0,10	10,5	6,9
3	0,66	0,72	0,85	0,12	13,3	19,1
6	0,66	0,56	0,81	0,08	< BG	20,8
12	0,39	0,32	0,44	0,09	1,4	7,1
24	0,01	0,01	0,03	0,03	< BG	< BG

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 12 ng/mL, Leber/Niere/Fett 12 ng/g, Dünndarminhalt (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt (²⁾ DID) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

Tabelle 3.7: Phase 3 - Konzentrationen (Mittelwerte, n=3, Einzeltiere) von 3-MCPD-ester in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Zeitpunkt	3-MCPD-ester Konzentration					
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜD ¹⁾	DID ²⁾
h	µg/mL	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
1,5	< BG	< BG	< BG	< BG	1158	26,0
3	< BG	< BG	< BG	< BG	854	540
6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,92	540
12	< BG	< BG	< BG	< BG	3,1	90,0
24	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,62

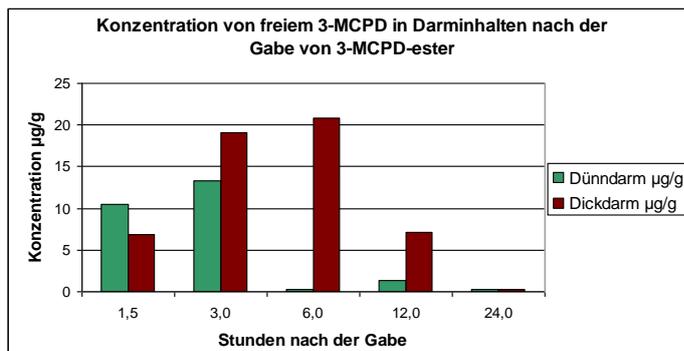
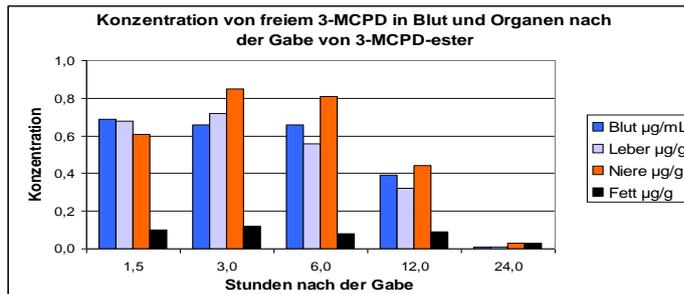
Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 0,25 µg/mL, Leber/Niere/Fett 0,25 µg/g, Dünndarminhalt (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt (²⁾ DID) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

Tabelle 3.8: Phase 3 - Konzentrationen (Mittelwerte, n=3, Einzeltiere) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt 0,5 - 8 h nach Substanzgabe. Dosierung: 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Zeitpunkt	Freies 3-MCPD Konzentration					
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜDI ¹⁾	DI ²⁾
h	µg/mL	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
0,5	6,1	5,4	5,4	1,8	6,6	2,6
1	4,7	4,0	4,0	0,84	6,3	3,0
2	2,4	2,1	2,8	0,37	2,2	2,0
4	0,49	0,44	0,59	0,08	0,63	0,83
8	0,24	0,21	0,30	0,05	0,52	0,51

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 12 ng/mL, Leber/Niere/Fett 12 ng/g, Dünndarminhalt (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt (²⁾ DI) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

a)



b)

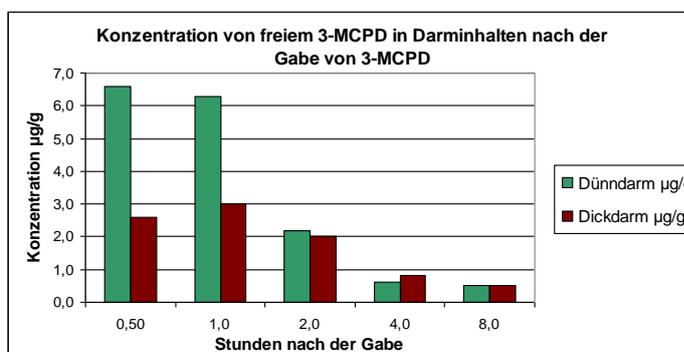
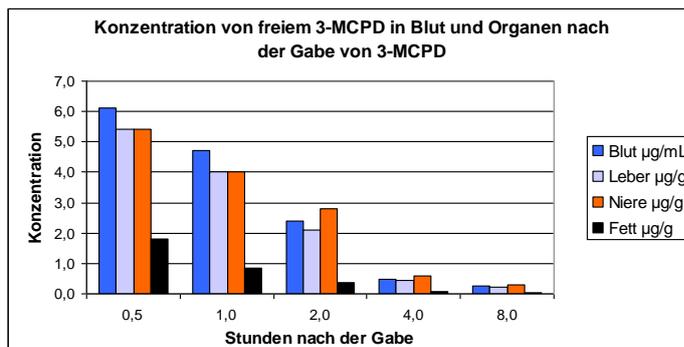


Abbildung 3.4: Phase 3 – Konzentrationen (Mittelwerte, n = 3) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarm, Dickdarm 1,5 - 24 h (a) bzw. 0,5 - 8 h (b) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG).

Tabelle 3.9: Phase 3 - Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n = 3) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarm, Dickdarm 1,5 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Zeitpunkt	Freies 3-MCPD				Dosis		Gesamt
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜD ¹⁾	DID ²⁾	
h	%	%	%	%	%	%	%
1,5	0,42	0,22	0,051	0,008	3,7	1,7	6,1
3	0,39	0,25	0,065	0,014	4,1	5,4	10,2
6	0,40	0,21	0,067	0,011	0,16	7,5	8,3
12	0,24	0,12	0,037	0,006	0,43	2,3	3,1
24	0,008	0,006	0,002	0,003	0,11	0,13	0,26

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 12 ng/mL, Leber/Niere/Fett 12 ng/g, Dünndarminhalt+Dünndarmwand (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt+Dickdarmwand (²⁾ DID) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

Tabelle 3.10: Phase 3 - Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n = 3) von 3-MCPD-ester in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarm Dickdarm 1,5 - 24 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Zeitpunkt	3-MCPD-ester				Dosis		Gesamt
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜD ¹⁾	DID ²⁾	
h	%	%	%	%	%	%	%
1,5	< BG	< BG	< BG	< BG	61,0	1,2	62,2
3	< BG	< BG	< BG	< BG	45,1	26,8	71,9
6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,041	32,8	32,8
12	< BG	< BG	< BG	< BG	0,14	5,1	5,24
24	< BG	< BG	< BG	< BG	0,015	0,05	0,065

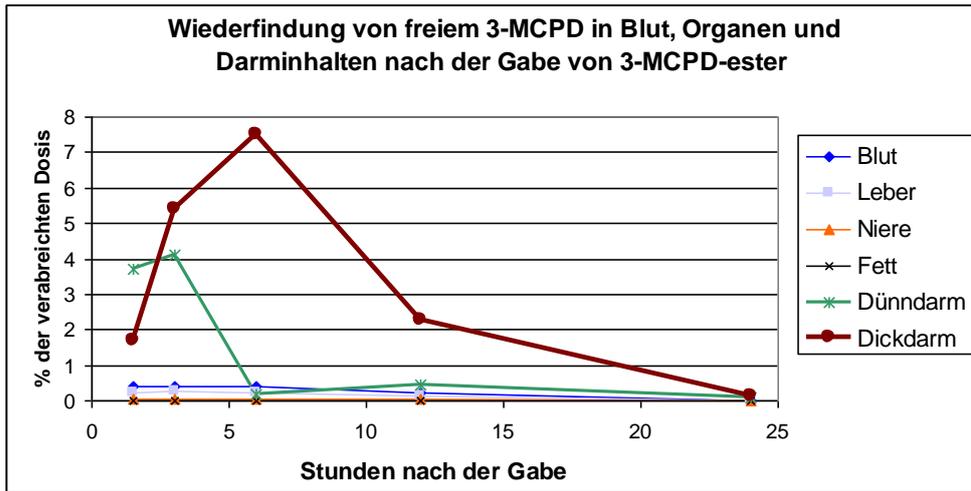
Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 0,25 µg/mL, Leber/Niere/Fett 0,25 µg/g, Dünndarminhalt+Dünndarmwand (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt+Dickdarmwand (²⁾ DID) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

Tabelle 3.11: Phase 3 - Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n = 3) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarm, Dickdarm 0,5 - 8 h nach Substanzgabe. Dosierung: 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

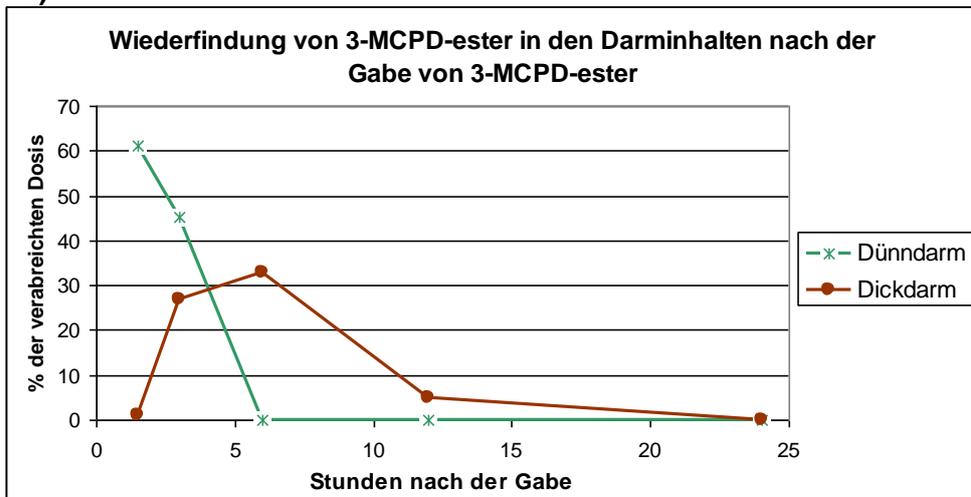
Zeitpunkt	Freies 3-MCPD				Dosis		Gesamt
	Blut	Leber	Niere	Fett	DÜD ¹⁾	DID ²⁾	
h	%	%	%	%	%	%	%
0,5	3,7	1,7	0,44	0,10	2,9	1,2	10,0
1	2,8	1,4	0,35	0,069	3,1	0,94	8,7
2	1,4	0,66	0,22	0,029	0,84	0,72	3,9
4	0,30	0,15	0,052	0,007	0,19	0,33	1,0
8	0,15	0,077	0,027	0,003	0,14	0,19	0,59

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze (Blut 12 ng/mL, Leber/Niere/Fett 12 ng/g Dünndarminhalt+Dünndarmwand (¹⁾ DÜD) Dickdarminhalt+Dickdarmwand (²⁾ DID) 0,5 µg/g)
Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt

a)



b)



c)

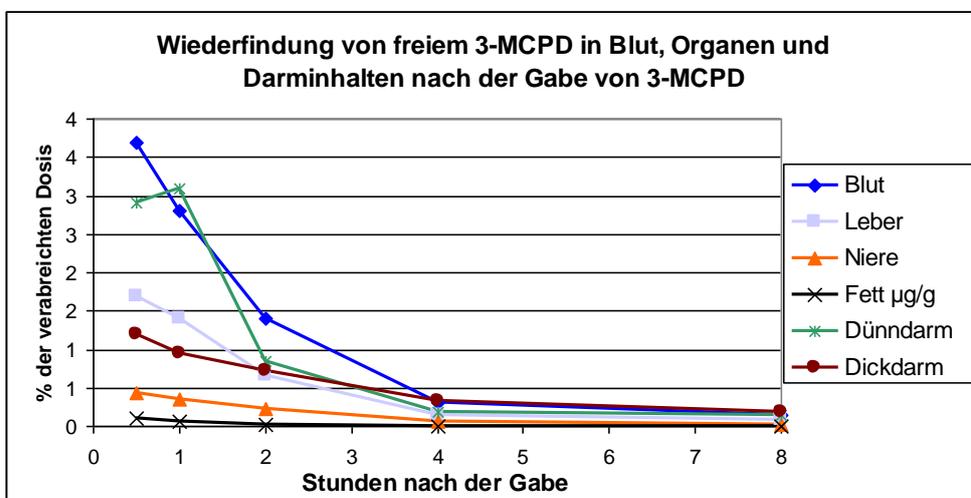


Abbildung 3.5: Phase 3 - Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n = 3) von freiem 3-MCPD in Blut, Leber, Niere, Fett, Dünndarm, Dickdarm 1,5 – 24 h (a) bzw. 0,5 - 8 h (c) nach Substanzgabe sowie von 3-MCPD-ester (b). Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG).

Tabelle 3.12: Phase 3 - Wiederfindungen in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwerte, n = 3) von freiem 3-MCPD und 3-MCPD-ester im Organismus 1,5 - 24 h bzw. 0,5 - 8 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD und 3-MCPD-ester Wiederfindung in % nach						
		1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	3-MCPD	6,1	10,2	8,3	3,1	0,3
	3-MCPD-ester	62,2	71,9	32,8	5,2	0,1
	Gesamt	68,3	82,1	41,1	8,3	0,4
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
3-MCPD (10 mg/kg)	3-MCPD	10,0	8,7	3,9	1,0	0,6

Tabelle 3.13: Kinetikparameter* im Rattenblut nach Applikation von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG) und 3-MCPD (10 mg/kg KG)

Parameter	Einheit	3-MCPD-ester	3-MCPD
c_{max}	ng/ml	1162	4627
t_{max}	h	2,0	0,17
AUC_{cum}	$h^*(ng/ml)$	7927	10367
AUC_{tot}	$h^*(ng/ml)$	7976	10393
k_e	1/h	0,22	0,23
$t_{1/2}$	h	3,1	3,0

*Die toxikokinetischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm Kinetica 4.4. Zur Datenauswertung wurden die Ergebnisse der Blutkonzentrationen von Phase 1 (0,17 - 24 h nach Gabe von 3-MCPD-ester und 3-MCPD, jeweils die Mittelwerte bei jedem Zeitpunkt) und von Phase 3 (1,5 - 24 h nach Gabe von 3-MCPD-ester bzw. 0,5 - 8 h nach 3-MCPD Gabe, jeweils die Mittelwerte bei jedem Zeitpunkt) gemeinsam betrachtet. Werte < BG wurden mit 0,5 BG berücksichtigt.

Die Tabelle 3.12 gibt einen Überblick über die in der Ratte ermittelten Gesamtgehalte an freiem 3-MCPD und 3-MCPD-ester zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach oraler Gabe und äquimolarer Dosierung der Testsubstanzen. Sowohl nach Applikation des 3-MCPD-esters als auch nach 3-MCPD-Gabe liegen die höchsten Gehalte an freiem 3-MCPD bei 8-10 %. Nach 3-MCPD Anwendung liegt das Maximum zwischen 0,5-1 h, bei Ester Gabe nach 3-6 h, aufgrund verzögerter Freisetzung nach Esterspaltung im Darmtrakt.

In der Tabelle 3.13 sind ausgewählte Parameter zur Charakterisierung des kinetischen Verhaltens von 3-MCPD im Rattenblut nach Applikation der beiden Testsubstanzen aufgeführt. Für die Beurteilung werden die Daten aus Phase 3 mit den Daten aus Phase 1 zusammen betrachtet. Der AUC-Wert ($AUC = \text{area under curve}$: Maß für die Bioverfügbarkeit) nach Gabe des 3-MCPD-esters liegt mit ca. 80 % nur geringfügig unter dem AUC-Wert, der nach Gabe von 3-MCPD erhalten wird. Die maximale 3-MCPD Konzentration c_{max} ist allerdings bei der 3-MCPD-ester Anwendung um ca. Faktor 4 niedriger.

Diese Erkenntnisse und die Daten aus Tabelle 3.13 lassen die Annahme zu, dass der Freisetzungsgrad an 3-MCPD ähnlich ist, dass es jedoch aufgrund der intestinalen Hydrolyse eine zeitliche Verzögerung der Absorption gibt, was in der Folge zu einem geringeren Peaklevel an 3-MCPD im Blut führt.

3.2 Diskussion der in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse und weiterer Forschungsbedarf

Bisher gibt es kaum Informationen zum Biomonitoring von 3-MCPD und insbesondere 3-MCPD-estern. Als Basis für eine wissenschaftlich begründete Risikobewertung durch das Bundesinstitut für Risikobewertung ergab sich damit die dringende Notwendigkeit, Daten zu generieren, die Aussagen über den zeitlichen Verlauf und die Verteilung von 3-MCPD-estern und 3-MCPD im Organismus ermöglichen. Im Mittelpunkt des vorliegenden Forschungsvorhabens stand die Frage, ob die Spaltung der 3-MCPD-ester im Organismus vollständig (zu 100 %) oder nur teilweise verläuft.

In der vorliegenden Studie wurden im Rahmen einer Tierstudie (Ratten) bei Applikation von 3-MCPD-estern (1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol; 2,780 mg/kg KG bzw. 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol; 53,2 mg/kg) sowie bei äquimolarer Dosierung von 3-MCPD (0,5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG) Daten erhalten, die es ermöglichen, das Verhalten von 3-MCPD-estern und 3-MCPD im Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu vergleichen.

Im ersten Teil der Studie erfolgten Untersuchungen zum kinetischen Verhalten der Testsubstanzen im Blut. Im Ergebnis zeigt sich, dass der Freisetzungsgrad von 3-MCPD ins Blut (AUC-Wert) bei Gabe von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester) und von 3-MCPD ähnlich ist. Unterschiede treten auf beim Konzentrationsmaximum (c_{\max} - 1,2 µg/mL bzw. 4,6 µg/mL) und dem Zeitpunkt der maximalen Konzentration (t_{\max} - 2,0 h bzw. 0,17 h). Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass es bei Applikation des 3-MCPD-esters aufgrund der erforderlichen intestinalen Hydrolyse zu einer zeitlichen Verzögerung der Absorption kommt, was in der Folge zu einem späteren und geringeren Peaklevel an 3-MCPD im Blut führt.

Angaben zur Konzentration von 3-MCPD im Blut findet man in der Literatur im Rahmen einer Reprotox Studie mit Ratten, denen 3-MCPD oral verabreicht wurde (Magensonde) mit einer Dosierung von 25 mg/kg KG (El Ramy et al., 2006, 2007). Das c_{\max} von 3-MCPD im Blut der Muttertiere ($16,5 \pm 0,6$ µg/mL) wurde nach 30-60 Minuten beobachtet, nach 2 h war die 3-MCPD Konzentration auf ca. die Hälfte reduziert, nach 5 h konnte kein 3-MCPD mehr bestimmt werden (Bestimmungsgrenze: 2 µg/mL). In der vorliegenden Studie wird bei Gabe von 10 mg 3-MCPD/kg KG ein c_{\max} -Wert von 4,6 µg/mL gefunden und nach 30-60 Minuten werden Konzentrationen von 3,5-3,7 µg/mL beobachtet. Nach weiteren 2 Stunden ist die Konzentration auf ca. 1/3 reduziert und nach 4 Stunden bewegt sich die 3-MCPD Konzentration im ng/mL-Bereich. Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse der beiden Studien gut vergleichbar sind, das betrifft sowohl das Konzentrationsmaximum im Blut als auch den Zeitverlauf der Abnahme der 3-MCPD Konzentration im Blut. Untersuchungen zur Blutkinetik von 3-MCPD nach Applikation von 3-MCPD-estern liegen in der Literatur nicht vor.

Im zweiten Teil der Studie wurde die Exkretion von 3-MCPD und 3-MCPD-ester im Urin und Kot der Tiere untersucht. Die höchsten 3-MCPD Konzentrationen im Rattenurin liegen zwischen 13-14,5 µg/g und sind ähnlich bei 3-MCPD-ester und 3-MCPD Gabe. Die maximale Konzentration tritt bei der 3-MCPD-ester Applikation leicht verzögert nach 10-12 h auf (0-10 h nach 3-MCPD Gabe). Das im Gesamturin ausgeschiedene 3-MCPD liegt bei 2,4 % bzw. 2,0 % (in Bezug zur verabreichten Dosis von 3-MCPD-ester bzw. 3-MCPD). Im Kot der Tiere werden 1,4 % bzw. 0,5 % der verabreichten Dosis als 3-MCPD ausgeschieden und 1,1 % als 3-MCPD-ester. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verabreichten Prüfsubstanzen nur zu einem geringen Anteil, aber in gleichem Maße mit dem Urin und Kot der Tiere ausgeschieden werden. Das bedeutet, dass der 3-MCPD-ester im Darmtrakt weitestgehend gespalten wird und 3-MCPD im Stoffwechsel einer weiteren und schnellen Metabolisierung unterliegt.

In der Literatur gibt es im Rahmen einer 90-Tage Studie zur Toxikologie nach Verabreichung von 3-MCPD-ester und 3-MCPD (Barocelli et al., 2011) Ergebnisse, die mit den Daten der vorliegenden Studie verglichen werden können. Nach der Applikation von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (39,19 mg/kg KG) und 3-MCPD (7,37 mg/kg KG) wird im Urin der männlichen

Wistar-Ratten 2,3 % bzw. 3,4 % der verabreichten Dosis als 3-MCPD wieder gefunden. Weiterhin wurde in dieser Studie der Urinmetabolit N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein bestimmt. Es wurden 8,7 % bzw. 11,5 % der verabreichten Dosis in Form dieses Metaboliten im Urin wiedergefunden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei Applikation beider Prüfsubstanzen ähnliche metabolische Vorgänge ablaufen, nachdem eine Freisetzung von 3-MCPD nach Esterspaltung im Darmtrakt stattgefunden hat.

Der Vergleich beider Studien zeigt, dass die Ergebnisse bzgl. der Exkretion von 3-MCPD im Urin sehr gut übereinstimmen. Untersuchungen zur Ausscheidung der Prüfsubstanzen im Kot wurden in der Toxizitätsstudie nicht berichtet.

Weitere Untersuchungen zum Metabolismus von 3-MCPD in Wistar-Ratten und Mäusen gibt es aus den 70 iger Jahren (Jones, 1975, 1978). In diesen Studien wurde ¹⁴C-markiertes 3-MCPD intraperitoneal verabreicht (Ratte 100 mg/kg KG, Maus 200 mg/kg KG). Die Autoren identifizierten im Urin das S-(2,3dihydroxypropyl)cystein und die entsprechende Mercaptursäure N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein als Metaboliten, sowie 3-MCPD (ca. 10 % der verabreichten Dosis).

Weiterhin wurden in einer Studie Urinproben der Bevölkerung auf das Vorkommen von Mercaptursäuren, als Metabolite von alkylierenden Reagenzien untersucht (Eckert et al., 2011). Im Urin von Nichtrauchern wurden das N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein mit einer Konzentration von 206 µg/g Kreatinin bestimmt, was einem relativ hohem Backgroundlevel entspricht.

Im dritten Teil der hier vorgestellten Studie wurde die Verteilung von 3-MCPD-ester und 3-MCPD im Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation untersucht. Nach der Gabe von 3-MCPD-ester werden im Blut sowie der Leber und Niere die höchsten Konzentrationen an freiem 3-MCPD (0,6-0,8 µg/g) nach 1,5-6 h gefunden. In dieser Zeitspanne treten auch im Darmtrakt (Dünndarm, Dickdarm) die höchsten Konzentrationen an freigesetztem 3-MCPD auf (13 µg/g bzw. 21 µg/g) auf.

Während die Wiederfindung von 3-MCPD in den Organen mit maximal 0,4 % relativ niedrig ist, gibt das intermediäre Auftreten von 3-MCPD in den Darminhalten (maximal 4-8 % der applizierten Dosis) Hinweise auf den zeitlichen Verlauf der Hydrolysereaktion. Gleichzeitig wird in den Darminhalten während diesen Zeitraumes eine Abnahme des 3-MCPD-ester Gehaltes von ca. 72 % auf 33 % und nach 12 h auf 5 % beobachtet. Das heißt, der 3-MCPD-ester wird im Darmtrakt nahezu vollständig gespalten und das 3-MCPD wird relativ schnell absorbiert und weiter metabolisiert.

Nach 3-MCPD Applikation treten nach 0,5 h die höchsten 3-MCPD Konzentrationen (5-6 µg/g) in den Organen auf. Die Konzentrationen in den Darminhalten sind im gleichen Bereich. Die Wiederfindungen an 3-MCPD berechnet in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) sind am höchsten im Blut (3,7 %) und dem Dünndarminhalt (3,1 %). Insgesamt werden nach 0,5-1 h zwischen 8-10 % der applizierten Dosis als freies 3-MCPD im Organismus wieder gefunden.

Vergleicht man das Verhalten beider Prüfsubstanzen, so ist zu erkennen, dass in beiden Fällen insgesamt im Tier maximal 10 % der jeweils applizierten Dosis als 3-MCPD vorliegen. Das bedeutet, dass das 3-MCPD vergleichbar schnell absorbiert und weiter metabolisiert wird, allerdings mit leichter zeitlicher Verschiebung, aufgrund der verzögerten Freisetzung nach Esterspaltung.

Untersuchungen zur Esterspaltung wurden von der Stadler-Gruppe (Seefelder et al., 2008) im in vitro System durchgeführt. Dazu wurden in einem Lipolyse-Modell (mit Pankreaslipase und Gallenextrakt des Schweines) 3-MCPD-mono- und -diester als Substrate mit Darm lipasen inkubiert. Bei den 3-MCPD-diestern wurden nach 1, 5 und 90 Minuten 45%, 65 % und 95 % 3-MCPD freigesetzt, d.h. 3-MCPD-ester sind Substrate für Darm lipasen aufgrund ihrer Struktur-ähnlichkeiten mit Acylglycerolen. Für die Humansituation wiesen die Autoren allerdings darauf hin, dass eine Hydrolyserate von 100 % eher unwahrscheinlich sei, weil für Triglyceride und Phospholipide ein Abbau zu 2-Monoglyceriden bekannt ist. Bei Annahme eines ähnlichen Mechanismus für 3-MCPD-ester entstehen dann aus 3-MCPD-diester oder 3-MCPD-1-monoester als Metaboliten 3-MCPD-2-monoester bzw. 3-MCPD.

Weitere *in vitro* Untersuchungen zur Absorption und dem Metabolismus von 3-MCPD-Fettsäureestern und 3-MCPD wurden an humanen intestinalen Caco-2-Zellen durchgeführt (Buhrke et al., 2011). Die Autoren zeigten, dass 3-MCPD-monoester gespalten werden, 3-MCPD akkumulierte im Zellüberstand, aber nicht in den Zelllysaten. Im Gegensatz dazu wurde aus dem 3-MCPD-diester (1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol) unter den gegebenen Bedingungen kein 3-MCPD freigesetzt. Im Zeitverlauf verschwand der 3-MCPD-diester im Zellüberstand, konnte jedoch auch nicht in den Zelllysaten gefunden werden. Ebenso konnte freies 3-MCPD weder im Überstand noch in den Zelllysaten detektiert werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass der 3-MCPD-diester durch die Zellen absorbiert und metabolisiert wird. Freies 3-MCPD hingegen wurde nicht absorbiert und nicht metabolisiert, aber migrierte durch parazelluläre Diffusion.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens wurden umfangreiche Daten zur Toxikokinetik (Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion) von 3-MCPD und 3-MCPD-estern im Tierversuch nach oraler Applikation von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester) und 3-MCPD generiert. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Hydrolyse des 3-MCPD-esters im Darmtrakt nahezu vollständig verläuft und es zum intermediären Auftreten von 3-MCPD kommt. Des Weiteren ermöglicht die Studie aufgrund der äquimolaren Dosierung von 3-MCPD-ester und 3-MCPD vergleichende Betrachtungen zum Verhalten des freien 3-MCPD im Organismus. Es wird deutlich, dass sich die AUC-Werte für 3-MCPD im Blut (Maß für die Bioverfügbarkeit) nach Verabreichung von 3-MCPD-ester und 3-MCPD ähnlich sind, bei gleichzeitig unterschiedlichem Konzentrationsmaximum und Zeitpunkt. Die Wiederfindung von 3-MCPD im Organismus der Ratte ist sowohl nach 3-MCPD-ester als auch nach 3-MCPD Applikation sehr gering (ca. 10 %). Auch die Ausscheidung von 3-MCPD im Urin und Kot der Tiere ist bei beiden Prüfsubstanzen ähnlich und liegt zwischen 2,0-2,4 % bzw. 0,5-1,4 % der verabreichten Dosis.

Die Daten der Studie erlauben die Schlussfolgerung, dass das im Darmtrakt verfügbare 3-MCPD sehr schnell metabolisiert und absorbiert wird, sich dann im Organismus verteilt und dann fast vollständig im Stoffwechsel abgebaut wird.

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie liefern neue Erkenntnisse zum Verhalten von 3-MCPD-estern und 3-MCPD im Organismus nach oraler Applikation von MCPD-Fettsäurediestern und 3-MCPD in einer Tierstudie. Sie ergänzen und bestätigen die bereits aus *in-vitro* Studien und Toxizitätsstudien gewonnenen Erkenntnisse und ermöglichen eine wissenschaftlich basierte Risikobewertung von 3-MCPD-diestern, die in Lebensmitteln vorkommen, insbesondere Palmölen und daraus hergestellten Produkten (Hamlet et al., 2011; Weißhaar et al., 2011)..

Klärung noch offener Fragen und weiterer Forschungsbedarf

- Die Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen (Seefelder et al., 2008, Buhrke et al. 2011) haben gezeigt, dass sich die 3-MCPD-Fettsäure-monoester in Hydrolysestudien anders verhalten als die 3-MCPD-Fettsäure-diester. Daraus lässt sich vermuten, dass auch das Freisetzungsverhalten von 3-MCPD im Organismus bei Applikation von 3-MCPD-Fettsäure-monoestern abweichend verläuft, insbesondere die Konzentrationsmaxima und die Zeitpunkte sollten verschieden sein. Die Durchführung einer ADME-Studie mit einem 3-MCPD-Fettsäure-monoester ist aus diesem Grund empfehlenswert.
- In der Literatur wird diskutiert, dass es während der Detoxifizierung von 3-MCPD zur intermediären Bildung des Epoxides (Glycidol) kommen kann (Lynch et al., 1998, Bakhiya et al., 2011). Glycidol ist eine alkylierende Verbindung und wurde als genotoxisches Karzinogen eingestuft (IARC, 2000; DFG,2000). Bekannt ist, dass mikrobielle Enzyme eine Dehalogenierung durchführen können, wobei es in Folge zur Bildung von Glycidol kommt (Van den Wijngaard et al., 1989). Auch im Rahmen von *in-vivo*-Studien an der Ratte und

Maus (Jones, 1975) wurde das intermediäre Auftreten eines Epoxides diskutiert, aber nicht untersucht. Weiterhin wurde berichtet (Barocelli et al., 2011), dass es nach oraler Applikation von 3-MCPD und 3-MCPD-ester zur Ausscheidung der Mercaptursäure N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein kommt. Die Bildung dieses Metaboliten könnte ein Hinweis für das intermediäre Auftreten von Glycidol sein.

Um diesen wichtigen Aspekt zu klären, sollte eine Studie durchgeführt werden, bei welcher neben der Bestimmung der Mercaptursäure im Urin und des Hämoglobin-Adduktes N-(2,3-dihydroxypropyl)valin, gezielte Untersuchungen erfolgen, die das intermediäre Auftreten von Glycidol (z.B. im Magen-Darmtrakt) aufzeigen. Gleichzeitig sollten weitere Metabolite in relevanten Körperflüssigkeiten identifiziert werden.

- Die Ergebnisse der 90-Tage Toxizitätsstudie (Barocelli et al., 2011) haben gezeigt, dass geschlechterspezifische Unterschiede (männliche/weibliche Ratten) auftreten, wenn 3-MCPD und 3-MCPD-diester oral verabreicht werden.

Zur Klärung dieser Frage ist eine Kinetikstudie erforderlich, mit der die metabolischen Unterschiede aufgezeigt werden können (Konzentrationsmaxima, Verteilung im Organismus).

3.3 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie erweitern den Wissensstand zur Bioverfügbarkeit von 3-MCPD-Fettsäure-diestern im Organismus. Sie stellen eine breite Datenbasis für Entscheidungen im Bereich der Lebensmittelsicherheit zur Verfügung und dienen zur fundierten Risikobewertung von 3-MCPD-estern durch die nationalen Behörden, wie das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) und das BMELV (Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz) sowie durch die europäische Behörde, European Food Safety Authority (EFSA).

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorgelegten Studie wurden Daten zur Hydrolyse von 3-MCPD-estern im Magen-Darmtrakt und zur Absorption und Verteilung von 3-MCPD nach oraler Verabreichung von 3-MCPD-estern und 3-MCPD in einer Tierstudie generiert.

Bis vor kurzem gab es keine toxikologischen Daten zu 3-MCPD-estern. Ebenso liegen nur unzureichende Erkenntnisse zur Absorption dieser Stoffgruppe im Organismus vor (Habermeyer et al., 2011).

Aufgrund fehlender Daten stützt sich das BfR bei der gesundheitlichen Bewertung zu 3-MCPD-estern z. Z. auf die Ergebnisse zur Toxikologie und Risikobewertung von 3-MCPD (Bakhiya et al., 2011; Habermeyer et al., 2011) und geht von einer 100 %igen Freisetzung im Magen-Darmtrakt aus (worst case).

3-MCPD wird vom „European Scientific Committee on Food Additives“ als nicht genotoxisches, threshold carcinogen“ eingestuft. Für diesen Stoff wurde eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (TDI) von 2 µg/kg Körpergewicht abgeleitet (SCF, European Commission, 2001). 2002 wurde durch das „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ (JECFA) eine maximal tolerierbare tägliche Aufnahme (PMTDI) von 2 µg/kg Körpergewicht festgelegt (Schlatter et al., 2002). Neuste Erkenntnisse zum Vorkommen und der Bildung von 3-MCPD-estern und 3-MCPD in Lebensmitteln sowie zur Consumer-Exposition sind in jüngster Zeit publiziert wurden (Hamlet et al., 2011; Weißhaar et al., 2011).

In einer Tierstudie mit Wistar-Ratten wurde nach oraler Applikation von 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester, 2,78 mg/kg KG) und 3-MCPD (0,5 mg/kg KG) in Maisöl sowie von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG) und 3-MCPD (10 mg/kg KG) nach jeweils äquimolarer Dosierung das Verhalten von 3-MCPD im Blut über einen Zeitraum von 0,17-48 h untersucht.

Die toxikokinetischen Parameter für 3-MCPD im Blut zeigen, dass die maximalen Konzentrationen c_{max} mit 1,2 µg/mL bzw. 4,6 µg/mL und die Zeitpunkte der maximalen Konzentrationen t_{max} mit 2,0 h und 0,17 h deutlich verschieden sind, wenn 2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol bzw. 3-MCPD verabreicht werden. Dies spricht für eine sehr schnelle Absorption von 3-MCPD ins Blut nach Verabreichung von 3-MCPD. Nach 3-MCPD-ester Gabe kommt es aufgrund der intestinalen Hydrolyse zu einer Verzögerung der Absorption, was in der Folge zu einem geringeren Peaklevel im Blut führt. Der AUC-Wert (Maß für die Bioverfügbarkeit) ist nach 3-MCPD-ester Gabe nur geringfügig (13 %) kleiner.

Die Ausscheidung von freiem 3-MCPD im Urin, der von 0-72 h gesammelt wurde, liegt sowohl bei Verabreichung des 3-MCPD-esters als auch bei 3-MCPD bei ca. 2 % (in Bezug zur verabreichten Dosis). Im Kot werden 1,4 % bzw. 0,5 % wieder gefunden.

Nach der Verabreichung des 3-MCPD-esters treten die höchsten Konzentrationen an 3-MCPD im Blut (0,7 µg/mL) und Organen (Leber, Niere – 0,6-0,8 µg/g), Fett (0,1 µg/g) nach 1,5-6 h auf. Die Wiederfindungen an freiem 3-MCPD berechnet in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) bewegen sich zwischen maximal 0,01 % (Fett) und 0,4 % (Blut).

Das Maximum an freiem 3-MCPD im Dünndarminhalt wird nach 3 h (13,3 µg/g) und im Dickdarminhalt im Zeitraum zwischen 3-6 h (20,8 µg/g) ermittelt. Das bedeutet, dass nach 3-MCPD-ester Applikation maximal 4,1 % bzw. 7,5 % freies 3-MCPD im Darm vorliegen. Insgesamt werden beim Maximum 8-10 % der applizierten 3-MCPD-ester Dosis als freies 3-MCPD im Tier wieder gefunden.

Im Blut und in den untersuchten Organen konnte zu keinem Zeitpunkt 3-MCPD-ester oberhalb der Bestimmungsgrenze (0,25 µg/g) ermittelt werden. Im Dünndarm liegt die maximale 3-MCPD-ester Konzentration bei 1158 µg/g und die Wiederfindung bei 61 % (1,5 h nach Applikation) und im Dickdarm bei 540 µg/g bzw. 33% nach 3-6 h.

Insgesamt werden maximal 62-72 % der applizierten 3-MCPD-ester Dosis als 3-MCPD-ester im Tier wieder gefunden.

Nach der Applikation von 3-MCPD sind die höchsten Konzentrationen in Blut, Leber, Niere (5-6 µg/g) sowie Fett (1,8 µg/g) schon nach 0,5 h zu beobachten. Auch im Dünndarm findet man zu diesem Zeitpunkt die höchste 3-MCPD Konzentration (6,6 µg/g) und im Dickdarm mit leichter Verzögerung nach 1 h (3,0 µg/g). Die Wiederfindungen an freiem 3-MCPD berechnet in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) bewegen sich im Maximum zwischen 0,1 % (Fett) und 3,7 % (Blut). Die Wiederfindungen in den Darminhalten liegen im gleichen Bereich.

Insgesamt werden beim Maximum zwischen 8-10 % der applizierten 3-MCPD Dosis als 3-MCPD im Organismus wieder gefunden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es aufgrund der hydrolytischen Spaltung des 3-MCPD-esters zur Freisetzung von 3-MCPD im Organismus kommt. Das 3-MCPD wird sehr schnell metabolisiert und absorbiert, im Organismus verteilt und weiter metabolisiert.

Nach äquimolarer Dosierung von 3-MCPD-ester (53,2 mg/kg KG) und 3-MCPD (10 mg/kg) ist bei der Ratte das im Organismus wieder gefundene 3-MCPD ähnlich gering (ca. 10 % maximal). Der AUC-Wert für Blut (AUC-Maß für die Bioverfügbarkeit) nach Gabe des 3-MCPD-esters liegt mit ca. 80 % nur geringfügig unter dem AUC-Wert, der nach Gabe von 3-MCPD erhalten wird. Die maximale 3-MCPD Konzentration ist bei der 3-MCPD Anwendung um ca. Faktor 4 höher und der Zeitpunkt, bei dem diese auftritt, ist deutlich früher als nach 3-MCPD-ester Anwendung, d.h. aufgrund der Esterspaltung kommt es zu einer zeitlich verzögerten und länger andauernden 3-MCPD Freisetzung im Darmtrakt.

5 Literaturverzeichnis

Bakhiya, N., Abraham, K., Gurtler, R., Appel, K.E. and Lampen, A.: Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol. Nut. Food Res.*, 2011, 55 (4), 509-521.

Barocelli, E., Corradi, A., Mutti, A., Petronini, P.G.: Scientific Report submitted to EFSA "Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study", University Parma, Italy, 2011, CFP/EFSA/CONTAM/2009/01.
<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/187e.pdf>.

Berger-Preiss, E., Gerling, S., Apel, E., Lampen, A. and Creutzenberg, O.: Development and validation of an analytical method for determination of 3-chloropropane-1,2-diol in rat blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical ionization mode. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 398, 313-318.

BfR: Säuglingsanfangs- und Folgenahrung kann gesundheitlich bedenkliche 3-MCPD-Fettsäureester enthalten, Stellungnahme Nr. 047/2007 des BfR vom 11.12.07 – Internet.

Buhrke, T., Weisshaar, R. and Lampen, A.: Absorption and metabolism of the food contaminant 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its fatty acid esters by human intestinal Caco-2 cells. *Arch. Toxicol.*, 2011, 85 (10):1201-1208.

Chung, W., Hui, K., Cheng, S.: Sensitive method for the determination of 1,3-dichloropropane-2-ol and 3-chloropropane-1,2-diol in soy sauce by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. of Chromatography A*, 2002, 952, 185-192.

CVUA: 3-MCPD-Ester in raffinierten Speisefetten und Speiseölen - ein neu erkanntes, weltweites Problem, 2007, Internet: http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=717

DFG: Senatskommission zur Prüfung Gesundheitlicher Arbeitsstoffe: "MAK- und BAT-Liste: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte", 2000, Wiley-VCH, Weinheim.

Eckert, E., Schmid, K., Schaller, B., Hiddemann-Koca, K., Drexler, H. and Goen, T.: Mercapturic acids as metabolites of alkylating substances in urine samples of German inhabitants. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2011, 214 (3):196-204.

El Ramy, R., Elhkim Ould, M., Poul, M., Forest, M.G., Leduque, P., and Le Magueresse-Battistoni, B.: Lack of effect on rat testicular organogenesis after in utero exposure to 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD). *Reprod.Toxicol.*, 2006, 22 (3):485-492.

El Ramy, R., Elhkim Ould, M., Lezmi, S. and Poul, J.M.: Evaluation of the genotoxic potential of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and its metabolites, glycidol and beta-chlorolactic acid, using the single cell gel/comet assay. *Food Chem Toxicol.*, 2007, 45 (1):41-48.

Habermeyer, M., Guth, S. and Eisenbrand, G.: Identification of gaps in knowledge concerning toxicology of 3-MCPD and glycidol esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113 (3), 314-318.

Hamlet, C.G., Asuncion, L., Velisek, J., Dolezal, M., Zelinkova, Z., Crews, C.: Formation and occurrence of esters of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) on foods: What we know and what we assume. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011.

IARC: Some industrial chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to humans, 2000, Vol. 77, S. 469-486.

Jones, A. R.: The metabolism of 3-chloro-, 3-bromo- and 3-iodopropan-1,2-diol in rats and mice. *Xenobiotica*, 1975, 5 (3):155-165.

Jones, A. R., Milton, D. H. and Murcott, C.: The oxidative metabolism of alpha-chlorohydrin in the male rat and the formation of spermatocoeles. *Xenobiotica*, 1978, 8 (9):573-582.

Küsters, M., Bimber, U., Ossenbrüggen, A., Reeser, S., Gallitzendorfer, R., and Gerhartz, M.: Rapid and simple micromethod for the simultaneous determination of 3-MCPD and 3-MCPD esters in different foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (11), 6570-6577.

Lynch, B.S. Bryant, D.B., Hook, G.J., Nestmann, E.R., Munro, L.C.: Carcinogenicity of monochloro-1,2-propanediol (alpha-chlorohydrin, 3-MCPD). *Int. J. Toxicol.*, 1998, 17, 947-76.

Robert, M. C., Oberson, J. M., Stadler R.H: Model studies on the formation of monochloropropanediols in the presence of lipase. *J. Agric, Food Chem.*, 2004, 52(16): 5102-5108.

SCF (Scientific Committee on Food): Opinion on 3-mono-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD). Updating the SFC opinion of 1994 adopted on 30 May 2001. European Commission, Brussels.

Schlatter, J., Baars, A.J., DiNovi, M., Lawrie, S., Lorentzen, R., in: Proceedings of the Fifty-seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) of the Safety Evaluation of Certain Food Additives Contaminants (2001, Rom, Italy) WHO Food Additives Series, 2002, Vol. 48, 401-432.

Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, F.P., Stadler, R.H.: Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives and Contaminants*, 2008, 25 (4), 391-400.

Stadler R.H., Theurillat, V., Studer, A., Scanlan, F. P., Seefelder, W.: The formation of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food and potential measures of control. In: DFG/SKLM, Thermal processing of food: potential health benefits and risks. Wiley-VCH, 2007, 141-154.

Van den Wijngaard, A.J., Janssen, D., Witholt, B.: Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediments. *J. Gen. Microbiol.*, 1989, 135, 2199-2208.

Weißhaar, R.: Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur. J. Lipid. Technol.*, 2008, 110, 183-186.

Weißhaar, R.; Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113 (3), 304-308.

Xu, X., Ren, Y., Wu, P., Han, J., Shen, X.: The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavoring with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionization mode. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23 (2) 110-119.

Zelinkova, Z., Svejtkovska, B., Velisek, J., Dolezal, M.: Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2 diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23 (12), 1290-1298.

Anhang A

Übersicht: Tiergewichte, Urinvolumina, Kotmengen, Organ- und Gewebegewichte, Gewichte der Darminhalte und -wände

Tabelle Ia: Phase 1 – Tiergewichte, Dosierung: 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester, 2,780 mg/kg KG), 3-MCPD (0,5 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.2.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Körpergewicht in g			
3-MCPD-ester (2,78 mg/kg)	1101/1104/1107/1110	298,4	295,4	294,5	292,0
	1102/1105/1108	298,2	299,2	302,4	
	1103/1106/1109	298,3	304,2	295,7	
3-MCPD (0,5 mg/kg)	2101/2104/2107/2110	284,3	291,4	305,9	286,1
	2102/2105/2108	281,6	299,7	302,3	
	2103/2106/2109	287,6	300,2	280,5	
Kontrolle	3101/3102	309,8	301,50		

Tabelle Ib: Phase 1 – Tiergewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.3.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Körpergewicht in g			
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110	258,3	238,7	261,0	258,6
	1102/1105/1108	247,3	252,9	256,6	
	1103/1106/1109	223,6	258,6	255,0	
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110	252,1	242,7	256,1	252,0
	2102/2105/2108	260,9	256,0	264,0	
	2103/2106/2109	244,6	241,3	256,1	
Kontrolle	3101/3102	232,3	252,10		

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Körpergewicht in g			
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1111/1114/1117/1120	241,0	235,9	261,0	263,5
	1112/1115/1118	235,6	263,0	256,1	
	1113/1116/1119	244,8	252,1	242,2	

Tabelle IIa: Phase 2 – Tiergewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Körpergewicht in g	
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104	462,2	470,9
	1102/1105	481,5	431,7
	1103	483,0	
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	456,6	
	2102	553,9	
Kontrolle	3101	527,8	

Tabelle IIb: Phase 2 – Urinvolumina und Kotmengen nach Substanzgabe, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

	Tier-Nr.	Urinmasse [g] nach					Kotmasse [g] nach			
		0-10 h	10-12 h	12-24 h	24-48 h	48-72 h	0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104	10,8/4,0	4,3/1,6*	11,6	21,5/k.A.	22,9/k.A.	0/2,14	3,43/1,43	3,91/k.A.	8,80/k.A.
	1102/1105	0/5,6	1,9/9,5*	3,6	12,2/k.A.	15,0/k.A.	0/0	5,45/5,30	4,74/k.A.	8,40/k.A.
	1103	4,3	2,4	6,2	19,7	21,9	0	7,39	1,67	9,30
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	2,9	2,9	10,8	13,2	15,9	3,03	4,20		13,1
	2102	3,5	2,8	5,3	14,3	14,6	0	5,00		7,30
Kontrolle	3101	2,5		4,7	13,0	16,6	0	2,60		9,70

* Tier 1104: 10-24 h

* Tier 1105: 10-24 h

Tabelle III/a: Phase 3 – Tiergewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Körpergewicht in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	297,4	306,9	313,3	316,8	321,6
	1102/1105/1108/1111/1114	313,0	324,4	342,9	334,8	348,3
	1103/1106/1109/1112/1115	344,1	356,9	355,0	358,8	370,1
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	299,0	313,4	316,6	316,1	379,0
	2102/2105/2108/2111/2114	320,8	334,8	341,0	350,7	351,7
	2103/2106/2109/2112/2115	347,7	367,1	369,0	369,2	370,2
Kontrolle	3101	340,0				

Tabelle III/b: Phase 3 – Lebergewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Lebergewicht in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	9,65	9,23	11,91	10,45	14,68
	1102/1105/1108/1111/1114	10,12	11,75	13,36	12,05	17,40
	1103/1106/1109/1112/1115	11,07	12,94	13,13	14,17	18,00
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	9,55	12,18	9,57	11,10	11,33
	2102/2105/2108/2111/2114	10,50	11,48	10,72	11,97	14,91
	2103/2106/2109/2112/2115	10,93	12,50	12,30	12,53	14,19
Kontrolle	3101	12,90				

Tabelle III/c: Phase 3 – Nierengewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Nierengewicht in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	2,45	2,17	2,72	2,64	2,52
	1102/1105/1108/1111/1114	2,78	2,69	2,85	2,62	2,87
	1103/1106/1109/1112/1115	2,74	2,74	2,84	3,13	3,34
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,50	3,09	2,59	2,70	2,74
	2102/2105/2108/2111/2114	2,76	3,09	2,93	2,82	1,51*
	2103/2106/2109/2112/2115	2,53	2,61	2,80	3,34	3,08
Kontrolle	3101	3,13				

* nur 1 Niere

Tabelle III/d: Phase 3 – Fettgewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Fettgewicht in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	2,89	3,21	2,21	1,68	2,87
	1102/1105/1108/1111/1114	2,30	3,58	6,21	1,94	3,03
	1103/1106/1109/1112/1115	2,96	4,78	5,25	2,58	2,25
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	1,29	1,65	1,47	1,98	3,27
	2102/2105/2108/2111/2114	1,89	2,83	3,00	2,24	1,30
	2103/2106/2109/2112/2115	2,58	4,53	4,69	3,51	2,92
Kontrolle	3101	4,43				

Tabelle III/e: Phase 3 – Dünndarminhaltgewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Dünndarminhalt in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	6,9	6,5	6,0	6,2	8,1
	1102/1105/1108/1111/1114	9,0	8,8	7,2	6,9	8,1
	1103/1106/1109/1112/1115	11,2	9,7	6,8	8,7	10,8
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	8,5	11,1	8,5	6,7	5,4
	2102/2105/2108/2111/2114	9,7	8,2	8,4	8,4	6,7
	2103/2106/2109/2112/2115	9,0	9,8	8,3	6,2	6,4
Kontrolle	3101	5,2				

Tabelle III/f: Phase 3 – Dünndarmwandgewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Dünndarmwand in g				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	4,5	4,2	4,2	4,2	5,8
	1102/1105/1108/1111/1114	4,6	5,5	5,5	5,4	6,6
	1103/1106/1109/1112/1115	4,0	4,7	5,1	5,1	6,5
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	4,2	4,8	4,7	4,8	6,2
	2102/2105/2108/2111/2114	4,4	4,8	5,0	5,5	6,1
	2103/2106/2109/2112/2115	5,4	5,3	5,5	5,4	6,9
Kontrolle	3101	6,6				

Tabelle III/g: Phase 3 – Dickdarminhaltgewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Dickdarminhalt				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	7,4	7,1	9,4	9,2	13,6
	1102/1105/1108/1111/1114	6,1	9,3	10,4	9,3	12,5
	1103/1106/1109/1112/1115	4,9	8,6	12,1	12,9	16,0
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	9,4	7,2	8,9	9,2	12,8
	2102/2105/2108/2111/2114	11,0	8,5	8,2	13,1	11,2
	2103/2106/2109/2112/2115	10,4	4,5	9,9	12,1	12,3
Kontrolle	3101	9,3				

Tabelle III/h: Phase 3 – Dickdarmwandgewichte, Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Dickdarmwand				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	1,9	2,1	2,4	2,5	3,8
	1102/1105/1108/1111/1114	2,6	2,6	3,2	3,5	4,3
	1103/1106/1109/1112/1115	2,8	2,9	3,5	3,7	4,9
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,8	3,1	3,8	2,8	2,7
	2102/2105/2108/2111/2114	2,8	3,5	3,2	3,3	3,0
	2103/2106/2109/2112/2115	3,4	3,1	4,0	3,8	3,8
Kontrolle	3101	3,0				

Anhang B

Einzelergebnisse, Mittelwerte, Standardabweichungen Phase 1,2,3

Tabelle 1/a: Ergebnisse Phase 1 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1-Palmitoyl-2-stearoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester, 2,780 mg/kg KG), 3-MCPD (0,5 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.2.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0,17	0,5 h	1 h	2 h	4 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (2,780 mg/kg)	1101/1106	n.a.	4 - 12	n.a.	14,4	29,1
	1102/1107	4 - 12	4 - 12	4 - 12	22,6	19,0
	1103/1108	4 - 12	4 - 12	4 - 12	20,4	47,8
	1104/1109	4 - 12	n.a.	4 - 12	31,2	23,8
	1105/1110	n.a.	4 - 12	n.a.	16,0	70,1
	MW [ng/mL]	k.A.	k.A.	k.A.	20,9	38,0
	SD [ng/mL]	k.A.	k.A.	k.A.	6,6	21,0
3-MCPD (0,5 mg/kg)	2101/2106	212	343	285	n.a.	27,3
	2102/2107	190	415	148	149	n.a.
	2103/2108	391	465	280	165	20,6
	2104/2109	281	675	180	124	n.a.
	2105/2110	194	389	178	103	< BG
	MW [ng/mL]	254	457	214	135	16,6
	SD [ng/mL]	85,1	129	63,6	27,3	13,1
Kontrolle	3001/3002	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	6 h	10 h	24 h	48 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (2,780 mg/kg)	1101/1106	46,4	n.a.	n.a.	< BG
	1102/1107	35,2	< BG	< BG	< BG
	1103/1108	32,0	7,8	< BG	< BG
	1104/1109	16,9	< BG	31,3	< BG
	1105/1110	21,0	13,4	< BG	< BG
	MW [ng/mL]	30,3	6,3	9,3	< BG
	SD [ng/mL]	11,8	5,5	14,7	k.A.
3-MCPD (0,5 mg/kg)	2101/2106	16,5	7,7	< BG	< BG
	2102/2107	4,7	24,5	< BG	< BG
	2103/2108	n.a.	16,3	< BG	< BG
	2104/2109	5,2	< BG	< BG	< BG
	2105/2110	4,2	< BG	< BG	< BG
	MW [ng/mL]	7,7	10,5	< BG	< BG
	SD [ng/mL]	5,9	9,8	k.A.	k.A.
Kontrolle	3001/3002	< BG	< BG	< BG	< BG

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 4 ng/mL; n.a.: nicht analysierbar (zu geringes Probevolumen oder Probe verunreinigt), Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG bzw. Wertebereiche

Tabelle 1/b: Ergebnisse Phase 1 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenblut 0,17 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.3.

Freies 3 MCPD im Blut nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0,17 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1106	57,9	362	379	996	1258
	1102/1107	45,0	280	534	546	900
	1103/1108	75,1	331	593	901	857
	1104/1109	49,0	375	553	1763	928
	1105/1110	62,1	367	433	1604	1134
	MW [ng/mL]	57,8	343	498	1162	1015
	SD [ng/mL]	11,8	38,9	89,1	508	172
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2106	6468	4489	6167	1544	617
	2102/2107	4698	3250	3467	1055	561
	2103/2108	3877	3679	2366	1000	202
	2104/2109	3600	2861	2715	953	316
	2105/2110	4493	3338	3955	819	416
	MW [ng/mL]	4627	3523	3734	1074	422
	SD [ng/mL]	1121	613	1496	277	171
Kontrolle	3001	< BG		< BG		< BG

Freies 3 MCPD im Blut nach					
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	6 h	10 h	24 h	48 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1106	438	122	20,4	< BG
	1102/1107	596	258	< BG	< BG
	1103/1108	720	208	< BG	< BG
	1104/1109	1009	203	< BG	< BG
	1105/1110	579	326	< BG	32,1
	MW [ng/mL]	668	223	8,9	11,2
	SD [ng/mL]	215	75,3	6,4	11,7
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2106	245	113	< BG	< BG
	2102/2107	41,4	268	< BG	< BG
	2103/2108	197	95,7	< BG	< BG
	2104/2109	34,6	112	< BG	n.a.
	2105/2110	165	156	< BG	< BG
	MW [ng/mL]	137	149	< BG	< BG
	SD [ng/mL]	94,4	70,2	k.A.	k.A.
Kontrolle	3001		< BG		< BG

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 12 ng/mL; n.a.: nicht analysierbar (zu geringes Probevolumen oder Probe verunreinigt), Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

**Tabelle 1/c: Ergebnisse Phase 1 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattenblut
0,17 - 48 h nach Substanzgabe.**

**Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design
der Tierstudie siehe Tabelle 2.3.**

3 MCPD-ester im Blut nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0,17 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1111/1116	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1112/1117	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1113/1118	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1114/1119	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1115/1120	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	Tier-Nr.	6 h	10 h	24 h	48 h	
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1111/1116	< BG	< BG	< BG	< BG	
	1112/1117	< BG	< BG	< BG	< BG	
	1113/1118	< BG	< BG	< BG	< BG	
	1114/1119	< BG	< BG	< BG	< BG	
	1115/1120	< BG	< BG	< BG	< BG	
Kontrolle	3102	< BG		< BG		

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 2 µg/mL bei Verwendung von 0,250 mL Blut

Tabelle 2/a_1: Ergebnisse Phase 2 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenurin 0- 72 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Freies 3-MCPD im Urin nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0-10 h	10-12 h	12-24 h	24-48 h	48-72 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	4,6	12,6	3,4	0,38	< BG
	1102	k.A.	13,6	10,4	0,60	< BG
	1103	2,6	17,2	4,7	0,20	< BG
	1104	8,7	16,1*		k.A.	k.A.
	1105	5,2	3,6*		k.A.	k.A.
	MW [µg/g]	5,3	14,5	6,2	0,39	< BG
	SD [µg/g]	2,5	2,4	3,7	0,21	k.A.
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	9,3	5,6	1,6	0,90	< BG
	2102	17,1	12,7	2,7	1,6	< BG
	MW [µg/g]	13,2	9,2	2,2	1,3	< BG
	SD [µg/g]	5,5	5,0	0,78	0,49	k.A.
Kontrolle	3101	< BG		< BG	< BG	< BG

* Tier 1104 und 1105 - 10-24 h Wert bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt

Tabelle 2/a_2: Ergebnisse Phase 2 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattenurin 0 - 72 h nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Freies 3-MCPD im Urin nach						
		0-10 h	10-12 h	12-24 h	24-48 h	48-72 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	1,1	1,2	0,85	0,180	k.A.
	1102	k.A.	0,54	0,78	0,150	k.A.
	1103	0,23	0,85	0,60	0,080	k.A.
	1104	0,74	0,55*		k.A.	k.A.
	1105	0,67	0,71*		k.A.	k.A.
	MW [% Dosis]	0,69	0,86	0,74	0,14	k.A.
	SD % Dosis]	0,36	0,33	0,13	0,05	k.A.
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	0,59	0,35	0,38	0,25	< BG
	2102	1,1	0,64	0,26	0,41	< BG
	MW [% Dosis]	0,85	0,50	0,32	0,33	< BG
	SD % Dosis]	0,36	0,21	0,08	0,11	k.A.

* Tier 1104 und 1105 - 10-24 h Wert bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,08 µg/g , Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.:keine Angabe, wenn alle Werte < BG oder kein biologisches Material vorhanden.

Tabelle 2/b_1: Ergebnisse Phase 2 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenkot von 0-48 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Freies 3-MCPD im Kot nach					
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	k.A.	8,0	0,30	< BG
	1102	k.A.	29,7	0,10	< BG
	1103	k.A.	5,9	0,10	< BG
	1104	0,80	27,3	k.A.	k.A.
	1105	k.A.	10,9	k.A.	k.A.
	MW [µg/g]	k.A.	16,4	0,17	< BG
	SD [µg/g]	k.A.	11,3	0,12	k.A.
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	1,8	2,2	0,60	
	2102	k.A.	1,7	< BG	
	MW [µg/g]	1,8	2,0	0,60	
	SD [µg/g]	k.A.	k.A.	k.A.	
Kontrolle	3101		0,3	< BG	

Tabelle 2/b_2: Ergebnisse Phase 2 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattenkot 0 - 48 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

Freies 3-MCPD im Kot nach					
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	k.A.	0,60	0,020	k.A.
	1102	k.A.	3,3	0,010	k.A.
	1103	k.A.	0,89	0,005	k.A.
	1104	0,04	0,82	k.A.	k.A.
	1105	k.A.	1,3	k.A.	k.A.
	MW [% Dosis]	k.A.	1,4	0,012	k.A.
	SD % Dosis]	k.A.	1,10	0,008	k.A.
3-MCPD (10 mg/kg)	2101	0,12	0,20	0,2	
	2102	k.A.	0,16	k.A.	
	MW [% Dosis]	0,12	0,18	0,2	
	SD % Dosis]	k.A.	k.A.	k.A.	

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,05 µg/g Kot, Werte < BG bei Berechnungen nicht berücksichtigt, k.A.: keine Angabe, wenn alle Werte < BG oder kein biologisches Material vorhanden.

Tabelle 2/c_1: Ergebnisse Phase 2 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattenkot 0 - 48 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

3-MCPD-ester im Kot nach					
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	k.A.	43,3	4,0	< BG
	1102	k.A.	93,6	1,7	< BG
	1103	k.A.	31,7	2,1	< BG
	1104	< BG	139	k.A.	k.A.
	1105	k.A.	54,8	k.A.	k.A.
	MW [µg/g]	k.A.	72,5	2,6	< BG
	SD [µg/g]	k.A.	43,9	1,2	k.A.
Kontrolle	3101		< BG	< BG	

Tabelle 2/c_2: Ergebnisse Phase 2 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester im Rattenkot 0 - 48 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.4.

3-MCPD-ester im Kot nach					
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	0-10 h	10-24 h	24-32 h	32-48 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101	k.A.	0,61	0,060	k.A.
	1102	k.A.	2,0	0,030	k.A.
	1103	k.A.	0,91	0,014	k.A.
	1104	k.A.	0,79	k.A.	k.A.
	1105	k.A.	1,3	k.A.	k.A.
	MW [% Dosis]	k.A.	1,1	0,034	k.A.
	SD [% Dosis]	k.A.	0,55	0,023	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g , Werte < BG bei Berechnungen nicht berücksichtigt, k.A.: keine Angabe, wenn alle Werte < BG oder kein biologisches Material vorhanden.

Tabelle 3/a_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenblut 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD im Blut nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	729	763	541	281	21,6
	1102/1105/1108/1111/1114	769	522	830	316	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	582	680	608	577	11,9
	MW [ng/mL]	693	655	660	391	13,2
	SD [ng/mL]	98,5	122	151	162	7,9
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	4796	5190	2691	380	198
	2102/2105/2108/2111/2114	6426	3914	2852	344	182
	2103/2106/2109/2112/2115	7105	5033	1541	753	348
	MW [ng/mL]	6109	4712	2361	492	243
	SD [ng/mL]	1187	696	715	226	91,6
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/a_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattenblut 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD im Blut nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,44	0,46	0,32	0,17	0,013
	1102/1105/1108/1111/1114	0,46	0,31	0,50	0,19	0,004
	1103/1106/1109/1112/1115	0,35	0,41	0,36	0,35	0,007
	MW [% Dosis]	0,42	0,39	0,40	0,24	0,008
	SD [% Dosis]	0,059	0,076	0,095	0,10	0,005
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,9	3,1	1,6	0,23	0,12
	2102/2105/2108/2111/2114	3,9	2,3	1,7	0,21	0,11
	2103/2106/2109/2112/2115	4,3	3,0	0,92	0,45	0,21
	MW [% Dosis]	3,7	2,8	1,4	0,30	0,15
	SD [% Dosis]	0,72	0,44	0,42	0,14	0,055

Annahme 60 mL Blut/kg Körpergewicht

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 12 ng/mL; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/b_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD in der Rattenleber 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

		Freies 3-MCPD in der Leber nach				
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	666	665	370	195	20,0
	1102/1105/1108/1111/1114	796	684	737	262	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	581	812	559	508	13,0
	MW [ng/g]	681	720	555	322	13,0
	SD [ng/g]	108	80	184	165	7,0
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	4522	3681	2611	378	163
	2102/2105/2108/2111/2114	5748	3523	2196	300	159
	2103/2106/2109/2112/2115	5829	4761	1499	648	299
	MW [ng/g]	5366	3988	2102	442	207
	SD [ng/g]	732	674	562	183	80
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/b_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD in der Rattenleber 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

		Freies 3-MCPD in der Leber nach				
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,22	0,20	0,14	0,064	0,009
	1102/1105/1108/1111/1114	0,26	0,25	0,29	0,094	0,003
	1103/1106/1109/1112/1115	0,19	0,29	0,21	0,20	0,006
	MW [% Dosis]	0,22	0,25	0,21	0,12	0,006
	SD [% Dosis]	0,035	0,045	0,075	0,071	0,003
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	1,4	1,4	0,79	0,13	0,049
	2102/2105/2108/2111/2114	1,9	1,2	0,69	0,10	0,067
	2103/2106/2109/2112/2115	1,8	1,6	0,50	0,22	0,11
	MW [% Dosis]	1,7	1,4	0,66	0,15	0,077
	SD [% Dosis]	0,26	0,20	0,15	0,062	0,034

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 12 ng/g Leber; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/c_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD in der Rattenniere 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Niere nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	605	835	749	377	33,0
	1102/1105/1108/1111/1114	664	696	1008	326	26,0
	1103/1106/1109/1112/1115	547	1011	670	607	17,0
	MW [ng/g]	605	847	809	437	25,3
	SD [ng/g]	58,5	158	177	150	8,0
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	4059	3972	2494	350	219
	2102/2105/2108/2111/2114	6310	4211	3331	342	223
	2103/2106/2109/2112/2115	5950	3852	2427	1091	444
	MW [ng/g]	5440	4012	2751	594	295
	SD [ng/g]	1209	183	504	430	129
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/c_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD in der Rattenniere 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Niere nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,050	0,059	0,065	0,031	0,003
	1102/1105/1108/1111/1114	0,059	0,058	0,084	0,025	0,002
	1103/1106/1109/1112/1115	0,044	0,078	0,054	0,053	0,002
	MW [% Dosis]	0,051	0,065	0,067	0,037	0,002
	SD [% Dosis]	0,008	0,011	0,015	0,015	0,001
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,34	0,39	0,20	0,030	0,016
	2102/2105/2108/2111/2114	0,54	0,39	0,29	0,028	k.A.*
	2103/2106/2109/2112/2115	0,43	0,27	0,18	0,099	0,037
	MW [% Dosis]	0,44	0,35	0,22	0,052	0,027
	SD [% Dosis]	0,10	0,069	0,059	0,040	0,015

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 12 ng/g Niere; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG, k.A.*: keine Angabe fehlerhaftes Nierengewicht.

Tabelle 3/d_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattenfett 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD im Fett nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	88,3	126	94,7	77,6	31,2
	1102/1105/1108/1111/1114	109	109	96,3	43,7	46,9
	1103/1106/1109/1112/1115	92,4	133	57,1	146	10,7
	MW [ng/g]	96,6	123	82,7	89,1	29,6
	SD [ng/g]	11,0	12,3	22,2	52,1	18,1
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2372	1119	430	52,7	33,1
	2102/2105/2108/2111/2114	1873	685	481	59,0	60,0
	2103/2106/2109/2112/2115	1104	720	203	136	53,9
	MW [ng/g]	1783	841	371	82,6	49,0
	SD [ng/g]	639	241	148	46,4	14,1

Tabelle 3/d_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattenfett 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD im Fett nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,009	0,013	0,007	0,004	0,003
	1102/1105/1108/1111/1114	0,008	0,012	0,017	0,003	0,004
	1103/1106/1109/1112/1115	0,008	0,018	0,008	0,010	0,001
	MW [% Dosis]	0,008	0,014	0,011	0,006	0,003
	SD [% Dosis]	0,001	0,003	0,005	0,004	0,002
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis				
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,10	0,059	0,020	0,003	0,003
	2102/2105/2108/2111/2114	0,11	0,058	0,042	0,004	0,002
	2103/2106/2109/2112/2115	0,082	0,089	0,026	0,013	0,004
	MW [% Dosis]	0,10	0,069	0,029	0,007	0,003
	SD [% Dosis]	0,014	0,018	0,011	0,006	0,001

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 12 ng/g Fett; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/e_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattendünndarminhalt 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

		Freies 3-MCPD im Dünndarminhalt nach				
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	13,2	9,8	< BG	0,63	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	8,4	12,9	< BG	0,83	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	9,8	17,2	< BG	2,80	< BG
	MW [µg/g]	10,5	13,3	< BG	1,4	< BG
	SD [µg/g]	2,5	3,7	k.A.	1,2	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	5,0	7,8	2,5	0,55	< BG
	2102/2105/2108/2111/2114	7,2	3,5	2,6	< BG	0,51
	2103/2106/2109/2112/2115	7,7	7,6	1,5	1,1	0,79
	MW [µg/g]	6,6	6,3	2,2	0,63	0,52
	SD [µg/g]	1,4	2,4	0,61	0,43	0,27
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/e_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattendünndarminhalt 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

		Freies 3-MCPD im Dünndarminhalt nach				
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	3,1	2,1	0,048	0,12	0,063
	1102/1105/1108/1111/1114	2,4	3,5	0,052	0,17	0,058
	1103/1106/1109/1112/1115	3,2	4,7	0,048	0,68	0,073
	MW [% Dosis]	2,9	3,4	0,049	0,32	0,065
	SD [% Dosis]	0,44	1,3	k.A.	0,31	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	1,4	2,8	0,68	0,12	0,040
	2102/2105/2108/2111/2114	2,2	0,86	0,64	0,060	0,10
	2103/2106/2109/2112/2115	2,0	2,0	0,34	0,18	0,14
	MW [% Dosis]	1,9	1,9	0,55	0,12	0,093
	SD [% Dosis]	0,42	0,97	0,19	0,060	0,050

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dünndarminhalt, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/f_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD in der Rattendünndarmwand 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Dünndarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	5,0	3,6	0,60	0,58	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	5,6	4,0	0,95	0,62	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	6,7	5,5	0,74	1,1	< BG
	MW [µg/g]	5,8	4,4	0,76	0,77	< BG
	SD [µg/g]	0,86	1,0	0,18	0,29	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	4,5	13,3	2,3	< BG	< BG
	2102/2105/2108/2111/2114	7,4	3,6	2,2	< BG	< BG
	2103/2106/2109/2112/2115	8,4	7,8	1,4	0,95	< BG
	MW [µg/g]	6,8	8,2	2,0	0,48	< BG
	SD [µg/g]	2,0	4,9	0,49	0,40	k.A.
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/f_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD in der Rattendünndarmwand 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Dünndarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,76	0,49	0,08	0,08	0,045
	1102/1105/1108/1111/1114	0,82	0,68	0,15	0,10	0,047
	1103/1106/1109/1112/1115	0,78	0,72	0,11	0,16	0,044
	MW [% Dosis]	0,79	0,63	0,11	0,11	0,045
	SD [% Dosis]	0,031	0,12	0,035	0,042	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,63	2,0	0,34	0,038	0,041
	2102/2105/2108/2111/2114	1,0	0,52	0,32	0,039	0,043
	2103/2106/2109/2112/2115	1,3	1,1	0,21	0,14	0,047
	MW [% Dosis]	0,98	1,2	0,29	0,072	0,044
	SD [% Dosis]	0,34	0,75	0,070	0,058	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dünndarmwand, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG. Darmwand ausgequetscht, nicht gespült.

Tabelle 3/g: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattendünndarm (Inhalt + Wand) 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD Dünndarminhalt + Dünndarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	3,9	2,6	0,13	0,20	0,11
	1102/1105/1108/1111/1114	3,2	4,2	0,20	0,27	0,11
	1103/1106/1109/1112/1115	4,0	5,4	0,16	0,84	0,12
	MW [% Dosis]	3,7	4,1	0,16	0,43	0,11
	SD [% Dosis]	0,44	1,4	0,035	0,35	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,0	4,8	1,0	0,16	0,081
	2102/2105/2108/2111/2114	3,2	1,4	1,0	0,099	0,14
	2103/2106/2109/2112/2115	3,3	3,1	0,55	0,32	0,19
	MW [% Dosis]	2,9	3,1	0,84	0,19	0,14
	SD [% Dosis]	0,72	1,7	0,26	0,11	0,055

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dünndarmwand/ -inhalt, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/h_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD im Rattendickdarminhalt 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Freies 3-MCPD im Dickdarminhalt nach				
		1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	12,1	25,7	19,4	7,8	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	8,0	20,0	23,4	9,3	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	0,51	11,5	19,7	4,3	< BG
	MW [µg/g]	6,9	19,1	20,8	7,1	< BG
	SD [µg/g]	5,9	7,1	2,2	2,6	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,1	3,5	2,4	0,82	0,48
	2102/2105/2108/2111/2114	2,7	2,5	2,6	0,83	0,54
	2103/2106/2109/2112/2115	3,0	3,0	1,1	0,85	0,50
	MW [µg/g]	2,6	3,0	2,0	0,83	0,51
	SD [µg/g]	0,46	0,50	0,81	0,015	0,031
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/h_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattendickdarminhalt 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	Freies 3-MCPD im Dickdarminhalt nach				
		1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	3,0	5,9	5,8	2,3	0,11
	1102/1105/1108/1111/1114	1,6	5,7	7,1	2,6	0,090
	1103/1106/1109/1112/1115	0,073	2,8	6,7	1,5	0,11
	MW [% Dosis]	1,6	4,8	6,5	2,1	0,10
	SD [% Dosis]	1,5	1,7	0,66	0,57	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,66	0,80	0,67	0,24	0,16
	2102/2105/2108/2111/2114	0,93	0,63	0,63	0,31	0,17
	2103/2106/2109/2112/2115	0,90	0,37	0,30	0,28	0,17
	MW [% Dosis]	0,83	0,60	0,53	0,28	0,17
	SD [% Dosis]	0,15	0,22	0,20	0,035	0,006

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dickdarminhalt, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/i_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von freiem 3-MCPD in der Rattendickdarmwand 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Dickdarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	2,1	12,6	8,3	1,7	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	2,0	6,7	13,1	2,0	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	0,43	4,1	10,0	1,2	< BG
	MW [µg/g]	1,5	7,8	10,5	1,6	< BG
	SD [µg/g]	0,94	4,4	2,4	0,40	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	2,5	3,6	2,0	0,50	< BG
	2102/2105/2108/2111/2114	4,2	2,9	2,2	0,55	< BG
	2103/2106/2109/2112/2115	4,1	3,7	1,1	0,75	< BG
	MW [µg/g]	3,6	3,4	1,8	0,60	< BG
	SD [µg/g]	0,95	0,44	0,59	0,13	k.A.
Kontrolle	3101					< BG

Tabelle 3/i_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD in der Rattendickdarmwand 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe. Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in der Dickdarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,13	0,86	0,64	0,13	0,030
	1102/1105/1108/1111/1114	0,17	0,54	1,2	0,21	0,030
	1103/1106/1109/1112/1115	0,035	0,33	0,98	0,12	0,030
	MW [% Dosis]	0,11	0,58	0,94	0,15	0,030
	SD [% Dosis]	0,069	0,27	0,28	0,049	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,23	0,36	0,24	0,044	0,020
	2102/2105/2108/2111/2114	0,37	0,30	0,21	0,052	0,020
	2103/2106/2109/2112/2115	0,40	0,31	0,12	0,077	0,020
	MW [% Dosis]	0,33	0,32	0,19	0,058	0,020
	SD [% Dosis]	0,091	0,032	0,062	0,017	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dickdarmwand, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG. Darmwand ausgequetscht, nicht gespült.

Tabelle 3/j: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von freiem 3-MCPD im Rattendickdarm (Inhalt + Wand) 1,5 - 24 h (3-MCPD-ester) bzw. 0,5 - 8 h (3-MCPD) nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), 3-MCPD (10 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

Freies 3-MCPD in Dickdarminhalt+Dickdarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	3,1	6,8	6,4	2,4	0,14
	1102/1105/1108/1111/1114	1,8	6,2	8,3	2,8	0,12
	1103/1106/1109/1112/1115	0,11	3,1	7,7	1,6	0,14
	MW [% Dosis]	1,7	5,4	7,5	2,3	0,13
	SD [% Dosis]	1,5	2,0	0,97	0,61	k.A.
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
		% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis	% Dosis
3-MCPD (10 mg/kg)	2101/2104/2107/2110/2113	0,89	1,2	0,91	0,28	0,18
	2102/2105/2108/2111/2114	1,3	0,93	0,84	0,36	0,19
	2103/2106/2109/2112/2115	1,3	0,68	0,42	0,36	0,19
	MW [% Dosis]	1,2	0,94	0,72	0,33	0,19
	SD [% Dosis]	0,24	0,26	0,27	0,046	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g Dickdarmwand/ -inhalt, Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/k: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattenblut 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Blut nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	< BG				
	1102/1105/1108/1111/1114	< BG				
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG				
	MW [µg/mL]	< BG				
	SD [µg/mL]	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,25 µg/mL Blut; k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/l: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester in der Rattenleber 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Leber nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,22	< BG	< BG	< BG	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	< BG	1,96	< BG	< BG	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	MW [µg/g]	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	SD [µg/g]	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Tabelle 3/m: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester in der Rattenniere 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Niere nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	MW [µg/g]	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	SD [µg/g]	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,25 µg/g; k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/n: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattenfett 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Fett nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	< BG	3,46	< BG	< BG	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG	< BG (0,14)	< BG	< BG	< BG
	MW [µg/g]	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	SD [µg/g]	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,25 µg/g, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/o_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattendünndarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Dünndarminhalt nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	1562	284	< BG	0,65	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	668	960	1,5	1,5	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	1244	1319	1,0	7,2	< BG
	MW [µg/g]	1158	854	0,92	3,1	< BG
	SD [µg/g]	453	525	0,63	3,6	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Tabelle 3/o_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester im Rattendünndarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Dünndarminhalt nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	66,5	11,7	0,009	0,024	0,012
	1102/1105/1108/1111/1114	36,1	50,7	0,059	0,058	0,011
	1103/1106/1109/1112/1115	76,1	69,8	0,036	0,33	0,014
	MW [% Dosis]	59,6	44,0	0,035	0,14	0,012
	SD [% Dosis]	20,9	29,6	0,025	0,17	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/p_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester in der Rattendünndarmwand 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Dünndarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	58,6	5,7	0,55	< BG	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	52,7	31,1	< BG	< BG	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	48,9	68,1	< BG	< BG	< BG
	MW [µg/g]	53,4	35,0	0,35	< BG	< BG
	SD [µg/g]	4,9	31,4	0,17	k.A.	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Tabelle 3/p_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester in der Rattendünndarmwand 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Dünndarmwand nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	1,7	0,15	0,014	0,002	0,002
	1102/1105/1108/1111/1114	1,5	1,0	0,002	0,002	0,003
	1103/1106/1109/1112/1115	1,1	1,8	0,002	0,002	0,003
	MW [% Dosis]	1,4	1,0	0,006	0,002	0,003
	SD [% Dosis]	0,31	0,83	0,007	k.A.	k.A.

Tabelle 3/q: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester im Rattendünndarm (Inhalt + Wand) 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in Dünndarminhalt + im Dünndarmwand nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	68,2	11,9	0,023	0,026	0,014
	1102/1105/1108/1111/1114	37,6	51,7	0,061	0,060	0,014
	1103/1106/1109/1112/1115	77,2	71,6	0,038	0,332	0,017
	MW [% Dosis]	61,0	45,1	0,041	0,14	0,015
	SD [% Dosis]	20,8	30,4	0,019	0,17	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/r_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester im Rattendickdarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Dickdarminhalt nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	54,7	926	477	109	0,94
	1102/1105/1108/1111/1114	23,1	608	567	124	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG	87,1	575	37,0	0,67
	MW [µg/g]	26,0	540	540	90,0	0,62
	SD [µg/g]	27,3	424	54,4	46,5	0,35
Kontrolle	3101			< BG		

Tabelle 3/r_2:: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester im Rattendickdarminhalt 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester im Dickdarminhalt nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	2,6	41,7	27,8	6,0	0,075
	1102/1105/1108/1111/1114	0,85	33,9	32,3	6,5	0,020
	1103/1106/1109/1112/1115	0,010	4,1	36,8	2,5	0,054
	MW [% Dosis]	1,2	26,6	32,3	5,0	0,050
	SD [% Dosis]	1,3	19,8	4,5	2,2	0,028

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Tabelle 3/s_1: Ergebnisse Phase 3 - Konzentration von 3-MCPD-ester in der Rattendickdarmwand 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Dickdarmwand nach						
Substanz (Dosis)	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	10,7	36,2	26,6	6,2	< BG
	1102/1105/1108/1111/1114	0,84	11,8	22,8	12,1	< BG
	1103/1106/1109/1112/1115	< BG	2,6	34,5	2,4	< BG
	MW [µg/g]	3,9	16,9	28,0	6,9	< BG
	SD [µg/g]	5,9	17,4	6,0	4,9	k.A.
Kontrolle	3101			< BG		

Tabelle 3/s_2: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester in der Rattendickdarmwand 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in der Dickdarmwand nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	0,13	0,48	0,40	0,09	0,006
	1102/1105/1108/1111/1114	0,010	0,18	0,40	0,24	0,006
	1103/1106/1109/1112/1115	0,004	0,04	0,64	0,05	0,006
	MW [% Dosis]	0,048	0,23	0,48	0,13	0,006
	SD [% Dosis]	0,071	0,22	0,14	0,10	k.A.

Tabelle 3/t: Ergebnisse Phase 3 - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von 3-MCPD-ester im Rattendickdarm (Inhalt + Wand) 1,5 - 24 h nach Substanzgabe.

Dosierung: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (3-MCPD-ester; 53,2 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.5.

3-MCPD-ester in Dickdarminhalt + Dickdarmwand nach						
Substanz/Dosis	Tier-Nr.	1,5 h	3 h	6 h	12 h	24 h
		% Dosis				
3-MCPD-ester (53,2 mg/kg)	1101/1104/1107/1110/1113	2,7	42,2	28,2	6,1	0,081
	1102/1105/1108/1111/1114	0,86	34,1	32,7	6,7	0,026
	1103/1106/1109/1112/1115	0,014	4,1	37,4	2,6	0,060
	MW [% Dosis]	1,2	26,8	32,8	5,1	0,056
	SD [% Dosis]	1,4	20,1	4,6	2,2	k.A.

Abkürzungen: BG: Bestimmungsgrenze 0,5 µg/g; Werte < BG bei Berechnungen mit 0,5 BG berücksichtigt, k.A.: keine Angabe für SD (Standardabweichung), wenn alle Werte < BG.

Anhang C

Ausführliche Beschreibung der Analysemethoden

2.2 Chemisch-analytische Untersuchungen

2.2.1 Bestimmung von freiem 3-MCPD in Blut, Urin, Leber, Niere, Fett nach dem HFBA Verfahren

2.2.1.1 Prinzip der Methode

Die Blut-, Urin- und Organproben werden mit Silicagel 60 verrieben. Anschließend wird eine Säulenchromatographie durchgeführt, um Matrixbestandteilen zu entfernen und 3-MCPD anzureichern. Nach Elution mit Ethylacetat erfolgt die Derivatisierung des Analyten mittels Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA). Zur Analyse des HFBA-Derivates von 3-MCPD wird die Kapillargaschromatographie mit massenselektivem Detektor im NCI-Modus verwendet. Die Quantitative Bestimmung erfolgt über eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix nach dem Internen-Standard-Verfahren (Interner Standard 3-MCPD-d₅).

2.2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

3-MCPD (98%) - Sigma-Aldrich (Germany); 3-MCPD-d₅ (d₅: 98 %) - Cambridge Isotope Laboratories, CIL(USA) bzw. Promochem (Germany); Acetonitril - Acros Organics (Belgium); Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) und Triethylamin - Sigma-Aldrich (Germany); Essigsäure, Ethylacetat, Isooctan, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumsulfat, Natriumacetat Trihydrat, Silicagel 60 (40-63 µm) - Merck (Deutschland).

Natriumsulfat und Silicagel wurden vor der Anwendung bei 600 °C für 4 h ausgeheizt, Silica- gel wurde mit 12,5 % dest. Wasser aktiviert.

2.2.1.3 Herstellung der Standardlösungen und von Kalibrierstandards

Die Stammlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ (interner Standard) wurden in Essigsäureethylester hergestellt. Die zum Spiken der unterschiedlichen Matrices eingesetzten Standardlösungen (0,1 - 10 µg/mL) wurden durch weitere Verdünnung mit Acetonitril erhalten.

Kalibrierstandards für Blut

Rattenblut von unbehandelten Tieren (Poolblut, EDTA Blut) wurde zur Herstellung von Matrixkalibrierstandards verwendet. Es wurden 0,2; 0,25 oder 1 g Blut mit 0,2-0,5 mL dest. H₂O verdünnt. Anschließend wurden die Standardlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ hinzu dotiert, um 3-MCPD-Konzentrationen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zu erhalten. Die Konzentrationen des internen Standards wurden für Mehrbereichskalibrierungen entsprechend angepasst. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiter-verarbeitet wie die Blutproben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

Kalibrierstandards für Urin

Rattenurin von unbehandelten Tieren wurde zur Herstellung von Matrixkalibrierstandards verwendet. Mit Essigsäure wurde ein pH-Wert von 5,5 eingestellt. Zur Herstellung der Standards wurde 1 mL Urin mit den Standardlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ gespikt. Die Konzentrationen des internen Standards wurden für Mehrbereichskalibrierungen entsprechend angepasst. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiter verarbeitet wie die Urinproben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

Kalibrierstandards für Organe (Leber, Niere, Fett)

Die bei -80 °C von unbehandelten Tieren eingefrorene Leber bzw. Niere wurde mit einer Schere/Skalpell zerkleinert und unter kühlen im Eisbad mit dem Ultra-Turrax im Zentrifugenglas homogenisiert.

0,5 oder 1 g des Homogenats von Leber bzw. Niere wurden mit 0,5 mL dest. H₂O versetzt und zur Herstellung von Matrixkalibrierstandards verwendet. Die Organe wurden mit den

Standardlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ gespikt. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiterverarbeitet wie die Leber- /Nieren-proben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

Das bei -80 °C von unbehandelten Tieren eingefrorene Fett wurde mit einem Skalpell zerkleinert und dabei langsam aufgetaut.

0,5 g Fett wurde zur Herstellung von Matrixkalibrierstandards verwendet. Das Fett wurde mit den Standardlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ gespikt. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiterverarbeitet wie die Fettproben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

2.2.1.4 Probenaufbereitung und Derivatisierung

Blutproben

Ca. 0,2; 0,25 oder 1 g Blut (EDTA-Blut) wurden mit 0,2 - 0,5 mL dest. H₂O in ein Zentrifugenglas gegeben und es wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung hinzugefügt und gut gemischt. Die Probe wurde in einen Mörser überführt, es wurden ca. 2 - 4 g Silicagel 60 hinzugefügt und es wurde mit einem Pistel kräftig miteinander verrieben. Das Silicagel 60 wurde in eine Chromatographiesäule (Länge: 25 cm, Durchmesser: 2 cm, am Boden befüllt mit einer Schicht 0,5 - 1 cm Na₂SO₄) überführt. Die Säule wurde mit etwas Na₂SO₄ abgedeckt. Die Analyten wurden mit ca. 20 mL Ethylacetat eluiert. Das Ethylacetat wurde in einem Becherglas aufgefangen. Die Lösung wurde für ca. 10 Minuten mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Ethylacetat wurde in ein Turbovap-Glas überführt und es wurde auf ca. 1 mL am Turbovap (40°C) eingengt. Nach Filtration (Eppendorfpipettenspitze mit silanisierter Glaswatte) in ein 10 mL Zentrifugenglas wurde im N₂-Strom bis auf ca. 200 µL eingengt (Einengen bis zur Trockne ist zu vermeiden).

Zu dem Extrakt wurden 1 mL Isooctan, 100 µL Triethylamin (2 mg/mL) und 100 µL HFBA hinzugefügt. Nach dem Verschließen des Zentrifugenglases wurde das Gemisch 30 Sekunden gevortext und dann 30 Minuten bei 60 °C derivatisiert.

Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 3 mL einer 0,5 M Lösung von Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9) hinzugefügt. Es wurde 30 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten mit 2500 U/min zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und es wurden 2 mL dest. H₂O hinzugefügt. Danach wurde nochmals 30 Sekunden gevortext und für 5 Minuten mit 2500 U/min zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der organische Phase wurde diese auf ein Endvolumen zwischen 200 µL und 1 mL eingestellt und in ein GC-Vial überführt.

Urinproben

1 mL Rattenurin wurde mit ca. 10 µl verdünnter Essigsäure in einem 10 mL-Zentrifugenglas auf pH 5,5 eingestellt und es wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung hinzugefügt und gut gemischt (Vortexer). Die Probe wurde in eine Mörserschale überführt, das Zentrifugenglas mit 500 µL dest. H₂O nachgespült und dieses mit der Probe vereinigt. Dann wurden ca. 4 g Silicagel 60 in den Mörser gegeben und es wurde mit dem Pistel gut vermischt. Das Silicagel 60 wurde in eine, mit etwas Na₂SO₄ befüllte, Chromatographiesäule überführt. Anschließend wurde wie unter Blutproben beschrieben weiter verfahren. Ein Endvolumen von kleiner 0,5 mL ist nicht empfehlenswert.

Organproben

Die bei -80 °C eingefrorene Leber/Nieren wurde mittels Schere/Skalpell zerkleinert und unter kühlen im Eisbad mit dem Ultra-Turrax im Zentrifugenglas homogenisiert. Zu einem Teil der homogenisierten Probe wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung hinzugefügt und es wurde gut gemischt. Die Probe wurde in eine Mörserschale überführt, das Zentrifugenglas mit 500 µL dest. H₂O nachgespült und dieses mit der Probe vereinigt. Dann wurde das Silicagel 60 in den Mörser gegeben und es wurde kräftig verrieben. Das Silicagel 60 wurde in eine, mit etwas

Na₂SO₄ befüllte, Chromatographiesäule überführt. Die weitere Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte wie unter Blutproben beschrieben. Es wurde 2 mal mit je 3 mL einer 0,5 M Lösung von Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9) und nicht mit dest. H₂O ausgeschüttelt. Die weitere Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte wie unter Blutproben beschrieben.

Fett

Das bei -80 °C von unbehandelten Tieren eingefrorene Fett wurde mit einem Skalpell zerkleinert und dabei langsam aufgetaut. Zu 0,5 g der homogenisierten Probe wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung hinzugefügt und es wurde gut gemischt. Die weitere Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte wie unter Organproben beschrieben.

2.2.1.5 Instrumentelle Bedingungen

Zur analytischen Bestimmung wurde ein Gaschromatograph (GC) mit massenselektivem Detektor (MSD) im NCI-Modus (negativ chemische Ionisation) eingesetzt. Als Autosampler diente der Gerstel MPS2.

Gaschromatograph	HP 6890
Injektor:	Split/Splitless, Temperatur 250 °C
Liner:	Agilent 5062-3587 mit Glaswolle
Injektionsvolumen:	1 - 2 µL
Trennsäule:	z. B. HP5ms Länge 30 m, ID 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trägergas	Helium
Flow:	konstanter Fluß 1,2 ml/min
Temperaturprogramm:	50°C (2 min.), 5 °C/min. auf 70 °C, 40°C/min. auf 280°C (5 min.)
Massenspektrometer:	MSD 5973, NCI-mode (40 % Methan)
Quellentemp.:	150 °C
Quadrupoltemp.:	106 °C
Transferlinetemp.:	280 °C
Datenaufnahme:	Messung im SIM-Mode mit 2 Massen je Komponente (siehe Tabelle 2.6)

Datenauswertung:

Tabelle 2.6: m/z (Masse/Ladung, für die Datenauswertung)

HFBA-Derivat von	Target (m/z)	Qualifier (m/z)
3-MCPD	482	502
3-MCPD-d ₅	486	507

Ein Chromatogramm einer mit 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ dotierten Blutprobe nach Aufarbeitung und Derivatisierung zeigt beispielhaft Abbildung 2.3.

2.2.1.6 Kalibrierung, Bestimmungsgrenze, Validierungsparameter

Unter Verwendung der Matrixkalibrierstandards (siehe 2.2.1.3) wurden Mehrbereichskalibrierungen nach der „Internen Standard-Methodik“ für unterschiedliche Konzentrationsbereiche erstellt (z.B. Blut: 4-80 ng/mL, 10-125 ng/mL, 250-2500 ng/mL, R² 0,999; Urin: 2-50 ng/mL, 100-500 ng/mL, R² 0,998; Leber, Niere: 10-50 ng/g, 50-500ng/g, R² 0,997-0,999; Fett: 50-200 ng/g, 100-1000 ng/g, R² 0,997. Die Abbildung 2.4 zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für 3-MCPD in Blut.

Die Bestimmungsgrenzen werden von dem eingesetzten Probenvolumen/-masse und dem Probenendvolumen bestimmt. Für Blut und Urin können unter optimalen Bedingungen Bestimmungsgrenzen von 2 ng/mL erreicht werden. Unter Routinebedingungen hat sich eine Bestimmungsgrenze von 12 ng/ml bzw. 12 ng/g bewährt. Diese Grenze ist nicht das analytisch erreichbare Limit, sondern wird bestimmt durch Hintergrundbelastungen aus Reagenzien und Materialien, die um mindestens den Faktor 2 unterhalb der definierten Bestimmungsgrenze liegen sollten.

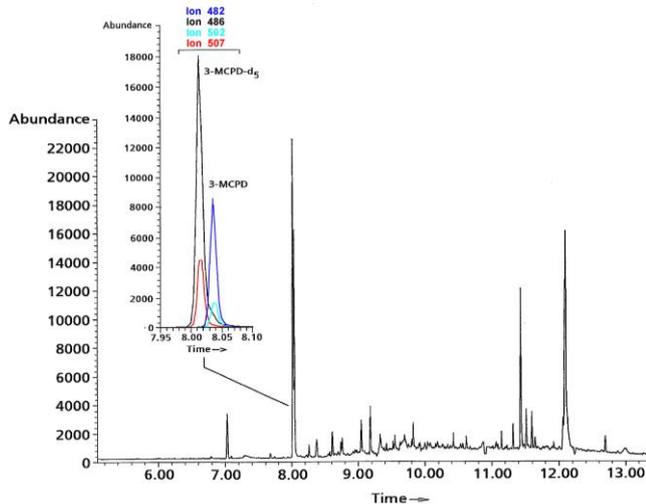


Abbildung 2.3: Ionenchromatogramm einer dotierten Rattenblutprobe (20 ng/ml 3-MCPD) nach Aufarbeitung und Derivatisierung (HFBA Derivat).

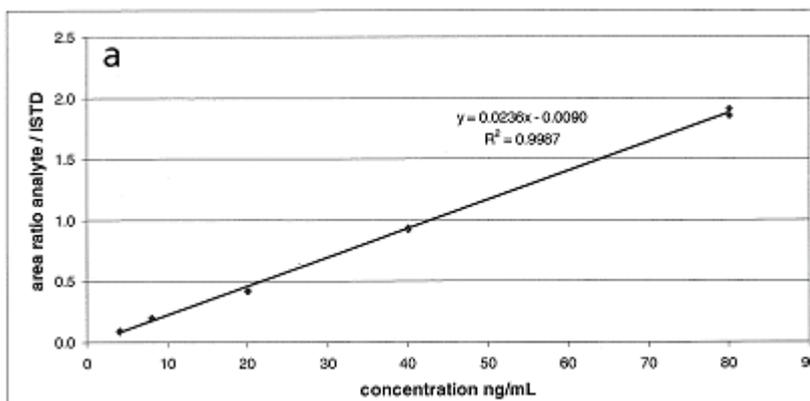


Abbildung 2.4: Kalibriergerade für 3-MCPD (HFBA-Derivat) in Rattenblut (Konzentrationsbereich 4-80 ng/ml 3-MCPD, 40 ng/ml 3-MCPD-d₅)

Zur Bestimmung der Präzision wurden Matrixproben mit 3-MCPD dotiert und an einem Tag bzw. an verschiedenen Tagen gemessen. Für Rattenblut ergaben sich bei einer Konzentration von 10 ng/mL bzw. 500 ng/mL innerhalb der Serie bzw. von Tag zu Tag (n=5) relative Standardabweichungen von 2-6 % und relative Wiederfindungen von 94-111 %. Die Messungen im Urin (n=6) bei 10 ng/mL und 300 ng/mL ergaben relative Standardabweichungen von 2-12 % und relative Wiederfindungen von 79-105%.

Für Leber/Niere/Fett wurden bei einer Konzentration von 200 ng/g für Messungen in der Serie (n=6) und Messungen von Tag zu Tag (n=3) relative Standardabweichungen von 1-10 % und relative Wiederfindungen von 83-103 % ermittelt.

2.2.2 Bestimmung von fettsäuregebundenem 3-MCPD (3-MCPD-ester nach Esterhydrolyse) in Blut, Leber, Niere, Fett und simultane Bestimmung von freiem 3-MCPD und 3-MCPD-ester (nach Esterhydrolyse) in Kot, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt, Dünndarmwand, Dickdarmwand nach dem PBA-Verfahren

2.2.2.1 Prinzip der Methode

Die biologischen Proben werden ggf. zerkleinert und homogenisiert und mit tert.-Butylmethylether (t-BME) extrahiert. Der Extrakt sowie der Probenrückstand werden intensiv mit einer 20 % igen NaCl-Lösung ausgeschüttelt, um vorhandenes freies 3-MCPD abzutrennen. Das freie 3-MCPD wird mit Phenylboronsäure (PBA) derivatisiert und das Phenylboronsäure-Derivat des 3-MCPD wird nach Extraktion mit n-Hexan analysiert.

Die Hydrolyse des 3-MCPD-esters im tert. Butylmethylether-Extrakt erfolgt mit einer methanolischen Natriummethylat-Lösung. Nach der Extraktion des freigesetzten 3-MCPDs wird mit Phenylboronsäure (PBA) derivatisiert und das Phenylboronsäure-Derivat des 3-MCPD wird nach Extraktion mit n-Hexan analysiert.

Zur Analyse des Derivates von 3-MCPD wird die Kapillargaschromatographie mit massenselektivem Detektor im EI-Modus verwendet. Die Quantitative Bestimmung erfolgt über eine Kalibrierung in der jeweiligen Matrix nach dem Internen-Standard-Verfahren (Interne Standards: 3-MCPD-d₅ und 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol-d₅).

2.2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

3-MCPD (98%) - Sigma-Aldrich (Germany); 3-MCPD-d₅ (d₅: 98 %) - Cambridge Isotope Laboratories, CIL(USA) bzw. Promochem (Germany); 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol (98 %), 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol- d₅ (d₅: 99 %) - TRC (Kanada); tert.-Butylmethylether (t-BME) - Sigma-Aldrich (Germany); Aceton, Essigsäure (99 %), Hexan, Natriumchlorid (NaCl) - Merck (Deutschland); Phenylboronsäure (PBA), Natriummethylat (NaOCH₃ in Methanol - Sigma-Aldrich (Germany))

Eine NaCl-Lösung (20 %) wurde hergestellt durch Lösen von 200 g NaCl in dest. H₂O.

Das Derivatisierungsreagenz wurde hergestellt durch Lösen von 5 g PBA in 19 ml Aceton und 1 mL dest. H₂O.

2.2.2.3 Herstellung von Standardlösungen und von Kalibrierstandards

Die Stammlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ (interner Standard) wurden in Essigsäureethylester hergestellt. Die zum Spiken der unterschiedlichen Matrices eingesetzten Standardlösungen wurden durch weitere Verdünnung mit Acetonitril erhalten. Die Stammlösungen von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol und 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol- d₅ (Interner Standard) wurden in t-BME hergestellt. Die zum Spiken der unterschiedlichen Matrices eingesetzten Standardlösungen wurden durch weitere Verdünnung erhalten.

Kalibrierstandards für Blut und Organe (Leber, Niere, Fett) – Bestimmung von 3-MCPD - ester

Rattenblut von unbehandelten Tieren (Poolblut, EDTA Blut, 0,25 mL, 1 mL bzw. 2 mL) sowie Homogenate (siehe 2.2.1.3) der zerkleinerten Organe (3 g Leber, 1 g Niere, 1 g Fett) wurden zur Herstellung der entsprechenden Matrixkalibrierstandards verwendet. Anschließend wurden die Standardlösungen von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol und 1,2-Dipalmitoyl - 3-chlor-1,2-propandiol- d₅ (Interner Standard) hinzu dotiert, um 3-MCPD-ester-Konzentrationen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zu erhalten. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiter verarbeitet wie die Blutproben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

Kalibrierstandards für Darmwände, Darminhalt, Kot - Bestimmung von 3-MCPD-ester und freiem 3-MCPD

Die bei -80 °C von unbehandelten Tieren eingefrorenen Dünndarm- und Dickdarmwände wurden aufgetaut und mit einer Schere/Skalpell zerkleinert und homogenisiert. Jeweils 1 g der zerkleinerten Darmwände sowie jeweils 0,5 oder 1 g homogenisierter Dünndarm- bzw. Dickdarminhalt sowie Kot wurden zur Herstellung der entsprechenden Matrixkalibrierstandards verwendet. Es wurden getrennte Matrixstandards für freies 3-MCPD und 3-MCPD Ester hergestellt. Zur Herstellung der 3-MCPD Kalibrierstandards wurden die aufgeführten Matrices mit den Standardlösungen von 3-MCPD und 3-MCPD-d₅ (interner Standard) dotiert. Zur Herstellung der 3-MCPD-ester Kalibrierstandards wurden die aufgeführten Matrices mit Standardlösungen von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol und 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol- d₅ (interner Standard) dotiert, um 3-MCPD Ester Konzentrationen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zu erhalten. Die Konzentrationen des Internen Standards wurden für Mehrbereichskalibrierungen entsprechend angepasst. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiter verarbeitet wie für die Darmwände, -inhalte und Kot beschrieben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

2.2.2.4 Probenaufbereitung und Derivatisierung

Blut und Organproben - Bestimmung von fettsäuregebundenem 3-MCPD (3-MCPD Ester)

Die bei -80 °C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und homogenisiert.

Ca. 2 g Rattenblut (EDTA-Blut) bzw. Homogenate der zerkleinerten Organproben (ca. 3 g Leber, 1 g - 2 g (Niere oder Fett) wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen und es wurde ein definiertes Volumen der Internen Standardlösung von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propan- d₅ hinzugefügt und gut durchmischt. Anschließend wurden 4 mL 20 % ige NaCl-Lösung und 4 ml t-BME hinzugefügt und die Probe wurde für 15 Minuten kräftig geschüttelt (waagrecht, Schüttelmaschine). Danach wurde 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und diese nochmals für 10 Minuten mit 4 mL 20 % iger NaCl-Lösung geschüttelt. Es wurde erneut zentrifugiert und die organische Phase wiederholt für 5 Minuten mit 4 ml 20 % iger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde die organische Phase abgenommen, diese in ein Zentrifugenglas überführt und es wurden 400 µL der Natriummethylat-Lösung hinzugefügt. Die Probe wurde kurz geschüttelt (1 Minute mit dem Vortexer) und es wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Anschließend wurden 200 µL Essigsäure und 5 ml 20 % ige NaCl-Lösung hinzugegeben, die Probe wurde geschüttelt und für 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann zur Derivatisierung mit 200 µL der PBA-Lösung versetzt, es wurde geschüttelt (Vortexer) und die Probe für 30 Minuten bei 90 °C derivatisiert.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 ml Hexan hinzugefügt, es wurde mit dem Vortexer gemischt (Extraktion des cyclischen Phenylboronsäurederivates von 3-MCPD) und anschließend zur Phasentrennung 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde

mit 2 ml dest. H₂O ausgeschüttelt, nach Zentrifugation abgenommen und in ein GC-Vial überführt. Die Hexanphase wurde ggf. verdünnt bzw. im Stickstoffstrom auf ein kleineres Endvolumen eingengt. Ein Endvolumen von < 0,5 ml ist nicht empfehlenswert.

Darmwände, Darminhalte, Kot - Bestimmung von 3-MCPD Ester und freiem 3-MCPD

Die bei -80 °C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und homogenisiert. Die Darmwände wurden zuvor mittels Schere /Skalpelle zerkleinert. Jeweils 1 - 2 g der zerkleinerten Darmwände bzw. zwischen 0,3 - 2 g der Dünndarm- bzw. Dickdarminhalte sowie Kot wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen und es wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung von 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol- d₅ hinzugefügt und gut durchmischt. Anschließend wurden 4 ml t-BME hinzugefügt und die Probe wurde für 15 Minuten kräftig geschüttelt (waagrecht, Schüttelmaschine). Danach wurde 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Zu der organischen Phase wurden 4 mL 20 % iger NaCl-Lösung gegeben, es wurde geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein Zentrifugenglas überführt. Die organische Phase wurde wiederholt mit 3 mL 20 % iger NaCl-Lösung ausgeschüttelt und es wurde anschließend zentrifugiert. Die organische und wässrige Phase wurden getrennt und jeweils separat weiter verarbeitet.

Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und es wurde ein definiertes Volumen der internen Standardlösung von 3-MCPD-d₅ hinzugefügt. Mit dieser wässrigen Phase wurde der Matrixrückstand erneut ausgeschüttelt (10 Minuten, waagrecht, Schüttelmaschine) und es wurde anschließend 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, zur Derivatisierung mit 200 µL der PBA-Lösung versetzt, geschüttelt und die Probe für 30 Minuten bei 90 °C derivatisiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 ml Hexan hinzugefügt, es wurde mit dem Vortexer gemischt und anschließend 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde mit 2 ml dest. H₂O ausgeschüttelt, nach Zentrifugation abgenommen und in ein GC-Vial überführt. Die Hexanphase wurde ggf. verdünnt bzw. im Stickstoffstrom auf ein kleineres Endvolumen eingengt. Ein Endvolumen von < 0,5 ml ist nicht empfehlenswert. Zur organischen Phase wurden 400 µL der Natriummethylat-Lösung hinzugefügt. Die Probe wurde kurz geschüttelt (Vortexer) und es wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die weitere Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte wie oben für Blut und Organproben beschrieben.

2.2.2.5 Instrumentelle Bedingungen

Gaschromatograph	HP 6890
Injektor:	Split/Splitless, Temperatur 250 °C
Liner:	Agilent 5062-3587 mit Glaswolle
Injektionsvolumen:	1 µL
Trennsäule:	z. B. HP5ms Länge 30 m, ID 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trärgas	Helium
Flow:	konstanter Fluß 1,2 ml/min
Temperaturprogramm:	60 °C (1 min.), 20 °C/min. auf 150 °C, 5 °C/min. auf 170°C, 30 °C/min. auf 280°C (5 min.)
Massenspektrometer:	MSD 5975i, EI-mode
Quellentemp.:	230 °C
Quadrupoltemp.:	150 °C
Transferlinetemp.:	280 °C
Datenaufnahme:	Messung im SIM-Mode mit 2 Massen je Komponente (siehe Tabelle 2.7)

Datenauswertung:

Tabelle 2.7: m/z (Masse/Ladung, für die Datenauswertung)

Phenylboronsäure-Derivat von	Target (m/z)	Qualifier (m/z)
3-MCPD*	147	196
3-MCPD-d ₅	150	201

*4-chlormethyl-2-phenyl-1,3,2-dioxaborolan

Ein Chromatogramm einer realen Darmwandprobe (Interner Standard: 1,2-Dipalmitoyl-3-chlor-1,2-propandiol- d₅) nach Aufarbeitung (organische Phase), Esterspaltung und Derivatisierung mit Phenylboronsäure zeigt beispielhaft Abbildung 2.5.

2.2.2.6 Kalibrierung, Bestimmungsgrenze, Validierungsparameter

Unter Verwendung der Matrixkalibrierstandards (siehe 2.2.2.3) wurden Mehrbereichskalibrierungen nach der „Internen Standard-Methodik“ für unterschiedliche Konzentrationsbereiche für freies 3-MCPD erstellt (z.B. Dünndarm-, Dickdarminhalt, -wand, Kot: 0,5-20 µg/g, R² 0,997-0,999) sowie separat für 3-MCPD-ester (z.B. Dünndarm-, Dickdarminhalt, -wand Kot: 0,5-10 µg/g und 100-1000 µg/g, R² 0,997-0,998; Blut/Leber/Niere/Fett: 0,25-1 µg/g, R² 0,980-0,999).

Die Abbildung 2.6 zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für Rattendickdarminhalt nach Aufarbeitung (organische Phase), Esterspaltung und Derivatisierung (PBA-Derivat).

Die Bestimmungsgrenzen werden von dem eingesetzten Probenvolumen/-masse und dem Probenendvolumen bestimmt.

Die Bestimmungsgrenze für 3-MCPD-ester liegt bei 0,25 µg/g in Blut/Leber/Niere/Fett. Für Darminhalte/-wände liegt die Bestimmungsgrenze bei 0,5 µg/g für das fettsäuregebundene 3-MCPD (nach Esterhydrolyse) als auch für die Bestimmung des freien 3-MCPD.

Zur Bestimmung der Präzision wurden Matrixproben mit 3-MCPD und 3-MCPD-ester dotiert und an einem Tag bzw. an verschiedenen Tagen gemessen. Für Dünndarm-, Dickdarminhalt ergaben sich für freies 3-MCPD bei Konzentration von 5 µg/g und 10 µg/g innerhalb der Serie sowie von Tag zu Tag (n=5) relative Standardabweichungen von 2-8 % und relative Wiederfindungen von 91-114 %. Für 3-MCPD-ester ergaben sich für die Messungen innerhalb der Serie bzw. von Tag zu Tag bei n=5 und Konzentrationen von 5 und 400 µg/g bzw. 600 µg/g (Dickdarminhalt) relative Standardabweichungen von 2-5 % und relative Wiederfindungen von 92-110 %. Für Blut/Leber/Niere/Fett wurden relative Standardabweichungen von 0,5-3 % bestimmt (Präzisionen in der Serie) und relative Wiederfindungen von 90-102 %.

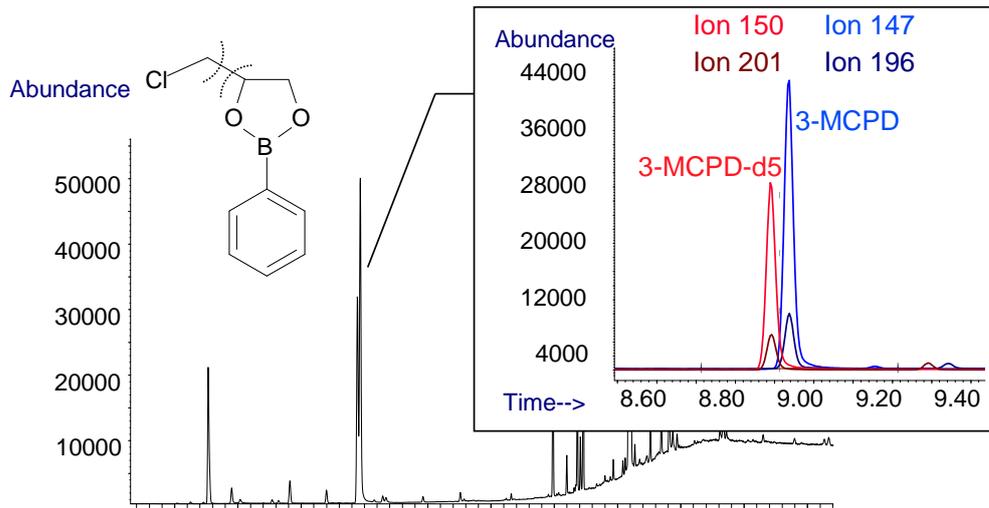


Abbildung 2.5: GC-MS (EI) Chromatogramm einer realen Probe der Rattendünndarmwand nach Aufarbeitung (organische Phase), Esterspaltung und Derivatisierung (PBA-Derivat von 3-MCPD).

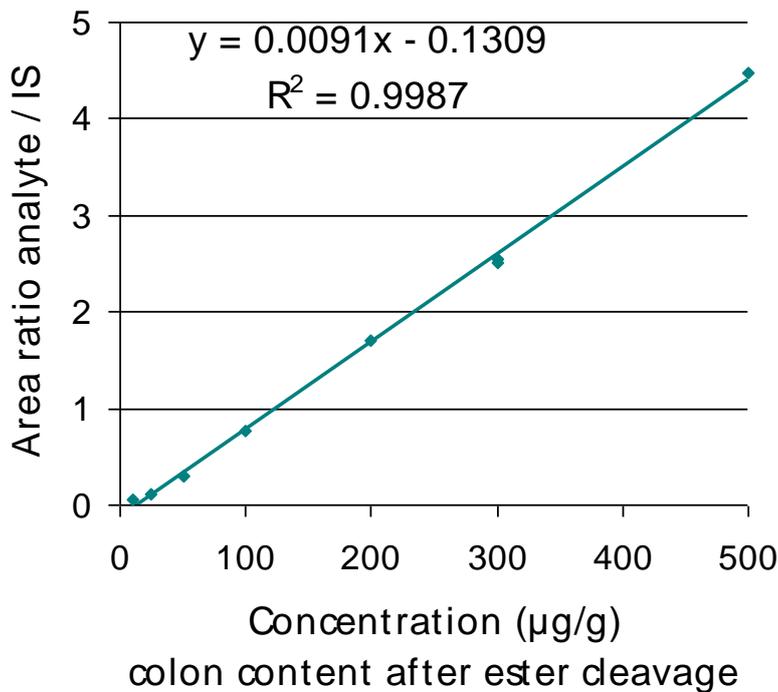


Abbildung 2.6: Kalibriergerade für 3-MCPD-ester im Rattendickdarminhalt nach Aufarbeitung (organische Phase), Esterspaltung und Derivatisierung (PBA-Derivat von 3-MCPD) (Konzentrationsbereich 10-500 µg/g 3-MCPD-ester, 100 µg/g interner Standard.)

Anhang D

Beschreibung der Tierversuche

Tiersystem

Männliche, zu Beginn der Prüfung ca. 8-9 Wochen alte Wistar-Ratten (Stamm Crl:WI) wurden von Charles River Deutschland, Sulzfeld, bezogen. In den meisten Fällen werden Adsorptions/Distributions/Metabolismus/Biopersistenz (ADME)-Prüfungen mit nur einem Geschlecht durchgeführt, weil für diese Art von Prüfungen meist keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auftreten. Wistar-Ratten wurden in diesem Projekt verwendet, weil für die meisten bisher am Fraunhofer ITEM durchgeführten ADME-Tests männliche Wistar-Ratten verwendet wurden. Dies hat auch praktische Gründe, weil aus den schwereren Männchen größere Blutmengen zur Analyse gewonnen werden können.

Applikation

Die Applikation erfolgte durch orale Gavage. Dazu wurden die Test- und Referenzsubstanzen in dem Vehikel Maisöl gelöst. Beim 3-MCPD ist dies sehr schnell möglich, bei den 3-MCPD-estern erfordert dies jedoch mehr Zeit und wurde neben Schütteln und Rühren durch kurzzeitige Ultraschallunterstützung unterstützt; im Endergebnis muß eine klare, gelbe Lösung ohne weiße feste Esterrückstände zum Nachweis der Homogenität vorliegen.

Das Applikationsvolumen betrug 8 ml/kg.

Akklimatisierung

Zur Akklimatisierung wurden die Tiere etwa 1-2 Wochen vor Prüfungsbeginn im Fraunhofer ITEM gehalten.

Randomisierung

Die gewichtsbezogene Randomisierung wurde vor Beginn der Prüfung durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, daß die Körpergewichte nicht mehr als $\pm 20\%$ vom mittleren Körpergewicht aller Tiere abwichen.

Identifikation

Jedes Tier erhielt eine individuelle Nummer, mit der der entsprechende Käfig neben der Prüfungsnummer gekennzeichnet und das Tier durch Schwanzmarkierung (Farbstift) gekennzeichnet wurde. Alle Daten eines Tieres wurden unter dieser Nummer gesammelt.

Im Tierraum befanden sich Etiketts mit folgender Beschriftung: Prüfungsnummer, Gruppennummer, Tiernummer, Tierart, Geschlecht, Prüfsubstanz, Dosierung, Applikationsart. Wenn ein Tier starb oder getötet wurde, wurde der Todestag auf dem Etikett vermerkt, das Etikett auf ein Sterbeprotokoll geklebt und dieses mit dem Tier zur Sektion gegeben. Ein identisches im Sektionslabor aufbewahrtes Etikett wurde auf das Sektionsprotokoll geklebt. Vor der Sektion wurde die Übereinstimmung der Daten auf dem ausgefüllten Sterbeprotokoll, dem Gefäß für die Lunge und dem Sektionsprotokoll überprüft.

Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte während der Prüfung im Tierraum T1.034. Die Tiere wurden zu zweit in Makrolon⁷ (Polycarbonat)-Käfigen Typ III mit Weichholzgranulat Lignocel BK8-15 der Fa. Altromin, Lage, Deutschland gehalten. Die Käfige und die Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Zur Gewinnung von Urin- und Kotproben erfolgte die Haltung in Stoffwechsellkäfigen, zur Fütterung wurde dabei Mehlfutter gereicht.

Die Tiere erhielten pelletiertes Futter Ssniff V1534, der Fa. Ssniff-Spezialdiäten (Soest, Germany) ad libitum. Keine Futtercharge wurde länger als vier Monate nach Herstellungsdatum verwendet. Das Futter wurde im Raum T1.015 bei einer Temperatur von $18\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ und $40\% \pm 15\%$ relativer Feuchte gelagert. Die Tiere erhielten Trinkwasser der Stadtwerke Hannover ad libitum. Futter und Trinkwasser wurden einmal wöchentlich gewechselt.

Die Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Tierräumen wurden elektronisch überwacht und aufgezeichnet. Die Temperatur war auf $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ eingestellt, die relative Basis-Luftfeuchtigkeit auf $55\% \pm 15\%$. Die Beleuchtung der Tierräume erfolgte in einem 12-stündigen hell/dunkel Rhythmus.

Tägliche und wöchentliche Beobachtungen

Alle Tiere wurden täglich mindestens einmal durchgesehen. Tiere, die Veränderungen aufwiesen, wurden vom zuständigen Tierarzt oder seinem Stellvertreter untersucht. Die Käfige dieser Tiere wurden gekennzeichnet und die Tiere besonders beobachtet. Einmal wöchentlich wurde der Gesundheitszustand aller Tiere vom Tierarzt oder seinem Stellvertreter untersucht.

Körpergewichtsbestimmung

Die Körpergewichte der Tiere wurden individuell mit einem automatischen Wägesystem ermittelt und abgespeichert.

Abfallbeseitigung

Biologisches Abfallmaterial einschließlich Futter, Einstreumaterial und anderer Materialien wurde gesammelt und in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt.