

Abschlußbericht

Forschungsvorhaben Nr. 2809HS013

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Glycidyl-Fettsäureestern

**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: 01.09.2009-29.02.2012

29. Februar 2012

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, Lebensmittelbedarfs-
gegenständen

Rochusstraße 1
53123 Bonn

Wissenschaftliche Begleitung

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen
Leiter der Abteilung Lebensmittelsicherheit (Abt. 5)
Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Str. 8-10
10589 Berlin

Zuwendungsnehmer und Berichtersteller

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

Projektleiter: Dr. Otto Creutzenberg

Tierhaus: Dr. Thomas Tillmann, Volker Rehse

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

Radioaktive ADME-Analytik: Dr. Tanja Hansen, Gudrun Kühne, Beatrix Sczygiel

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	5
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
1.2	Wissenschaftliche und technische Ausgangssituation	6
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemisch-analytische Untersuchungen	11
2.1.1	Durchführung der Tierversuche	11
2.1.1.1	Beschaffung der Prüfsubstanzen	11
2.1.1.2	Applikation der Prüfsubstanzen	11
2.1.1.3	Design und Durchführung	11
2.1.2	Analytik	12
2.1.2.1	Bestimmung von Hämoglobinaddukten	12
2.1.2.2	Bestimmung von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin	14
2.2	Radioaktive Untersuchungen	
2.2.1	Durchführung der Tierversuche	15
2.2.1.1	Beschaffung der Prüfsubstanzen	15
2.2.1.2	Applikation der Prüfsubstanzen	15
2.2.1.3	Design und Durchführung	15
2.2.2	Analytische Untersuchungen mit $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ –Radiomarkierung (GLP)	16

3 Ergebnisse	17
3.1 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der chemisch-analytischen Untersuchungen	17
3.1.1 Blutuntersuchungen – Hämoglobinaddukte	17
3.1.2 Urinkonjugate - Mercaptursäure	19
3.2 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der radioaktiven Untersuchungen	24
3.2.1 Exkretion	24
3.2.2 Blutkinetik	26
3.2.3 Organverteilung	26
3.2.4 Bilanz	29
3.3 Diskussion der in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse und weiterer Forschungsbedarf	30
3.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	35
4 Zusammenfassung	36
5 Literaturverzeichnis	38

Anhänge

Chemisch-analytische Vorgehensweise

Anhang I A – Übersicht: Tiergewichte, Urinmasse, Urindichte, Creatiningehalte	41
Anhang I B – Einzelergebnisse, Mittelwerte, Standardabweichungen	45
Anhang I C – Ausführliche Beschreibung der Analysemethoden	51
Anhang I D – Report: Study to Gain Blood and Urine Samples Following a Single Oral Administration of Glycidyl Palmitate and Glycidol to Rats	63

Radioaktive Vorgehensweise

Anhang II - Toxicokinetics of radiolabelled glycidyl palmitate	64
--	----

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des BfR-Ringversuchs zur Analytik von 3-MCPD-Fettsäureestern wurden in Palmölfetten große, methodenabhängige Differenzen in den 3-MCPD-Gehalten festgestellt. Diese Unterschiede ließen sich unter Anderem auch auf das Vorkommen von Glycidyl-Fettsäureestern zurückführen. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass Glycidyl-Ester in raffinierten Ölen und Fetten in nicht unerheblichem Maße vorhanden sind (Weißhaar und Perz, 2010; Masukawa et al., 2010).

Glycidol ist im Jahre 2000 von der IARC (IARC, 2000) und von der MAK-Kommission (DFG, 2000) eingestuft wurden. Die MAK-Kommission hat es als Humankanzerogen der Kategorie 2 eingestuft (d.h. wahrscheinlich krebserregend beim Menschen, nachweislich krebserregend im Tierversuch). Weiterhin wurde Glycidol in einer Verordnung vom Europäischen Parlament (Europäisches Parlament, 2008) mit der Einstufung Kanzerogenität 1B, Keimzell-Mutagenität 2 und Reproduktionstoxizität 1 B gelistet.

Toxikologische Bewertungen für Glycidyl-Fettsäureester liegen nicht vor. Aus diesem Grunde stellt sich die toxikologisch relevante Frage, ob durch hydrolytische Spaltung des Esters Glycidol freigesetzt und eventuell bioverfügbar wird. Ähnlich wie bei den 3-MCPD-Estern, jedoch wegen der Einstufung in Kategorie 2 mit höherer Brisanz, ergibt sich für die Glycidyl-Ester-Aufnahme aus Nahrungsmitteln insbesondere für Säuglinge bei Annahme einer vollständigen Hydrolyse ein Risiko (BfR, 2009a). Aufgrund der fehlenden toxikologischen Daten geht man bei der Risikobetrachtung dabei zunächst von einem 100%igen Abbau zu Glycidol aus.

Die zwei nachfolgend aufgeführten Vorgehensweisen wurden vor der Projektdurchführung diskutiert:

a) Orale Verabreichung von Glycidylpalmitinsäureester und Glycidol im Rattenversuch. Anwendung von chemisch analytischen Verfahrensweisen zur Bestimmung des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Blut (Aufbereitung von Blut, Analyse mittels Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-NCI-MS)) und zur Bestimmung des Urinkonjugates N-Acetyl-S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein (Aufbereitung von Urin, Analyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS (ESI))).

b) Orale Verabreichung von radioaktiv markiertem Glycidylpalmitat ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$) im Rattenversuch und Durchführung einer ADME-Studie (Verbrennungsautomat, Radioaktivitätsmessungen) in verschiedenen biologischen Matrices (z.B. Blut, Urin, Leber, Fett, Darminhalte usw.) sowie in der Ausatemluft.

Beide Vorgehensweisen, die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens realisiert wurden, liefern in Ergänzung zueinander Aussagen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Glycidyl-Fettsäureestern im Organismus. Mit Hilfe der chemischen Analyse der Biomarker können direkte Vergleiche zwischen der Gabe von Glycidyl-Ester und freiem Glycidol gezogen werden, während die radioaktive Methode eine prozentuale Gesamtverteilung im Körper darstellen kann, hierbei aber keinerlei Rückschlüsse auf molekulare Strukturen zulässt. Allerdings erlaubt die Verwendung einer Doppelmarkierung Rückschlüsse zum Metabolismus und zum Grad der Fettsäurespaltung.

Mit dem vorliegenden Forschungsvorhaben sollten neue Erkenntnisse zum Metabolismus von Glycidyl-Fettsäureestern in der Ratte gewonnen werden. Die Daten sollen einen Beitrag für eine fundierte Quantifizierung des Gefährdungspotentials durch die Aufnahme von Glycidyl-Fettsäureestern über Nahrungsmittel leisten. Die neuen Erkenntnisse zum kinetischen Verhalten der Glycidyl-Fettsäureester im Organismus und die vorhandene Datenbasis zum Vorkommen der Glycidylester in verschiedenen Speiseölen und daraus hergestellten Produkten werden eine Abschätzung des Risikos der Bevölkerung gegenüber Glycidyl-Fettsäureestern erlauben, und in der Folge eine belastbare Risikobewertung durch das BfR, die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) und ein Risikomanagement durch das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Verbraucherschutz (BMELV) ermöglichen.

1.2 Wissenschaftliche und technische Ausgangssituation

Toxikologische Betrachtungen

Als Hauptmetabolit nach Esterspaltung wird Glycidol vermutet. Es war bei Projektbeginn nicht bekannt, ob die Spaltung der Glycidyl-Ester im Organismus zu Glycidol nur teilweise oder vollständig (d.h. zu 100%) erfolgt.

Glycidol ist als wahrscheinliches Humankarzinogen eingestuft worden. Umfangreiche toxikologische Studien wurden im Rahmen des „National Toxicology Program“ (NTP, 1990) durchgeführt. Folgende toxische Effekte wurden u.a. zusammenfassend in der MAK-Liste der DFG (DFG, 2000) und der IARC Monographie (IARC, 2000) für Glycidol aufgeführt:

- Gentoxtizität: *in vitro*: positiv; *in vivo* (Mikrokerne, Chromosomenaberration, Schwester-Chromatid-Austausch): positiv
- Kanzerogenität: Nach oraler Applikation in verschiedenen Organen von Ratte und Maus:
 - Dosisabhängig signifikant erhöhte Tumoreninzidenz in Gehirn, Vormagen, Darm, Haut, Zymbaldrüse und Schilddrüse, Mesotheliome in der tunica vaginalis testis (Ratte, Männchen); im Gehirn, in der Mundhöhle, im Vormagen und in der Klitoris, Mammatumoren (Ratte, Weibchen).
 - Dosisabhängig signifikant erhöhte Tumoreninzidenz bei Männchen und Weibchen: Adenome, Adenokarzinome in der Harderschen Drüse. Zusätzlich bei Männchen: in Vormagen, Leber und Lunge; bei Weibchen: in Brustdrüse, Uterus und Unterhautgewebe (NTP, 1990). Auffällig: Nierentumoren wurden im Gegensatz zu 3-MCPD nicht beobachtet; offenbar erfolgt bei der Ratte im Magen keine quantitative 3-MCPD-Bildung

Im Zusammenhang mit der Diskussion um Glycidyl-Fettsäureester wurden in den letzten Jahren umfassende Betrachtungen zur Toxikologie von Glycidol durchgeführt (Bakhiya et al., 2011; Habermeyer et al., 2011). Zusammenfassend wird Glycidol als Kanzerogen mit gentoxischem Wirkmechanismus im Tiermodell betrachtet. Es gibt keine epidemiologischen oder klinischen Studien an Menschen.

Ein toxikologisch unbedenklicher Schwellenwert bzw. TDI-Wert kann nicht abgeleitet werden. Es gilt das Minimierungsprinzip (ALARA¹-Prinzip) (BfR, 2009a)

¹ as low as reasonably achievable = so gering wie vernünftigerweise erreichbar

Untersuchungen zum Metabolismus und analytische Vorgehensweisen

Glycidol ist aufgrund seiner Epoxidstruktur sehr reaktiv und wird sofort im Organismus weiter metabolisiert. Es kann mit nukleophilen Gruppen wie beispielsweise den heterocyclischen Stickstoffatomen der DNA-Basen oder mit Proteinen reagieren. Bei Alkylierung der Aminofunktion des N-terminalen Valins im Hämoglobin entsteht dabei das Hämoglobinaddukt N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin. Des Weiteren wird Glycidol in einer Konjugationsreaktion an das Glutathion gebunden und nach mehreren Metabolierungsschritten im Urin als Mercaptursäure ausgeschieden. Weiterhin kann durch eine mögliche enzymatische Epoxidringöffnung Glycerin gebildet werden, das im Fettstoffwechsel zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut und u.a. über die Atemluft ausgeschieden wird (siehe Abbildung 1).

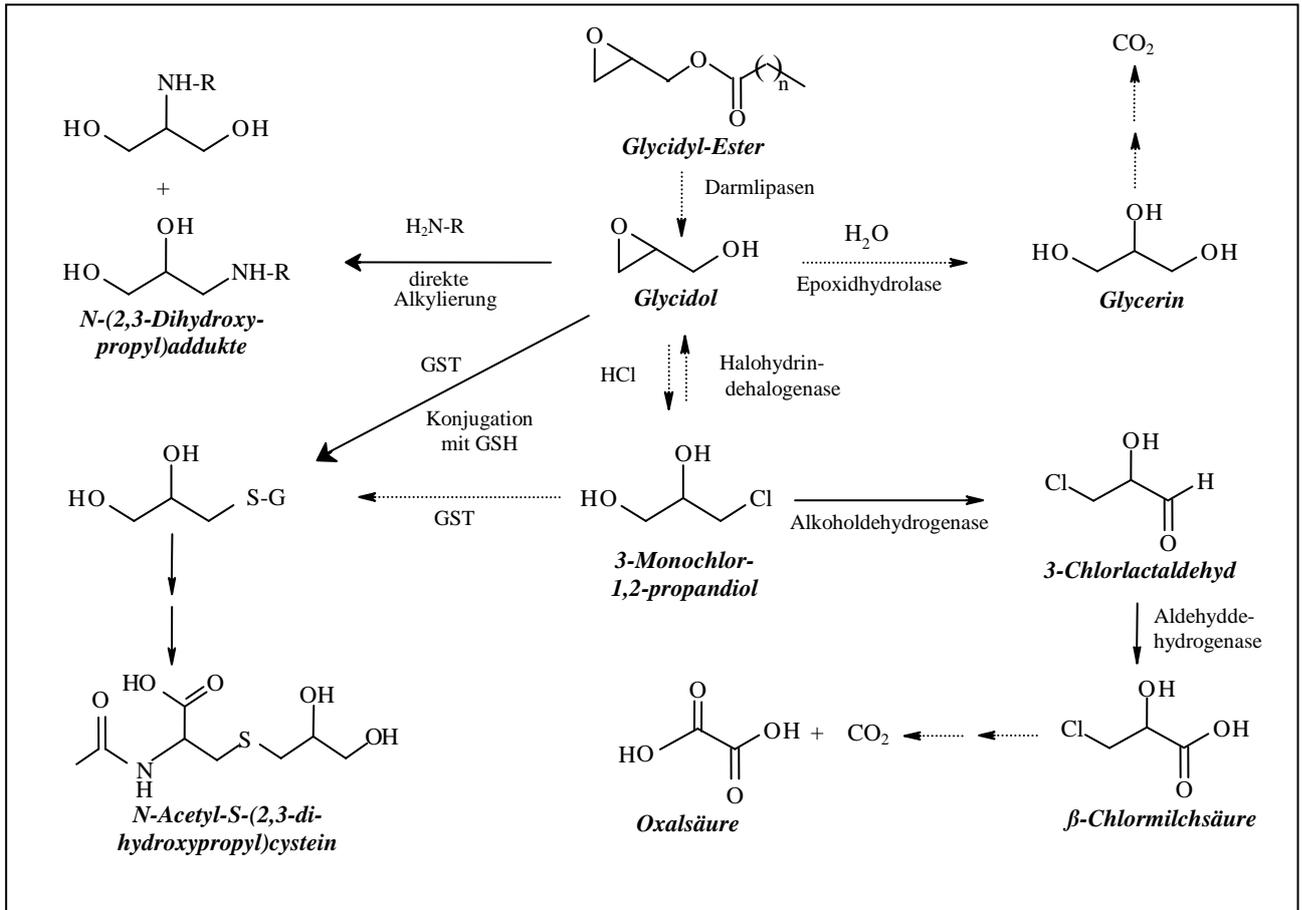


Abbildung 1: Möglicher Stoffwechsel von Glycidyl-Estern im Organismus (modifizierte Darstellung basierend auf Literaturberichten (Jones, 1975; Jones et al, 1978; NTP, 1990; Lynch et al., 1998; Abkürzungen: R- z.B. Valin im Hämoglobin; GST - Gluthathion-S-Transferase; GSH - Gluthathion))

Eine Methode zur Bestimmung des Hämoglobinaddukts N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin wurde in einer Arbeit von Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 1996) im Zusammenhang mit dem Biomonitoring von Epichlorhydrin berichtet. Das nach Epichlorhydrin Exposition *in vivo* gebildete Addukt N-(3-Chlor-2-hydroxypropyl)valin wird zum N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-Addukt hydrolysiert. Die Autorin diskutierte auch die Möglichkeit, dass die Adduktbildung über das 3-MCPD oder das Glycidol erfolgt. In der beschriebenen Methodik wurden die Erythrozyten abgetrennt und das Globin isoliert. Mit Hilfe des modifizierten Edmanabbaus wurde vom N-Terminus der Globinkette das N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin als Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivat (PFPTH-Derivat) abgespalten und anschließend die verbliebenen Hydroxygruppen acetyliert. Die Messung erfolgte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie im negativ-chemischen Ionisationsmodus. Quantifiziert wurde über die Standardglobine N-(2,3-Dihydroxypropyl)globin, sowie über markiertes N-(2,3-Dihydroxy(d₅)propyl)globin. Diese wurden durch Inkubation von Hämolsat mit Glycidol bzw. d₅-Glycidol (synthetisiert aus d₅-Epichlorhydrin) und nach anschließender Globinisolierung

hergestellt. Die Analyse und Quantifizierung erfolgten nach Totalhydrolyse, modifiziertem Edmanabbau und Derivatisierung mittels GC-MS/MS über die synthetisierten N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-PFPTH-Derivate.

In einer folgenden Arbeit von Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 2000) vermutet die Autorin, dass die Bildung der N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-Addukte auf die mögliche Entstehung von alkylierenden Epoxiden oder Glycidol (-intermediaten) bei der Erhitzung von Lebensmitteln zurückzuführen ist.

Aufgrund der Berichte über das Vorkommen von Glycidyl-Estern in Speiseölen (BfR, 2009a; Weißhaar und Perz, 2010; Masukawa et al., 2010a; Bakhiya et al., 2011;) untersuchte Honda (Honda et al., 2011) unter Verwendung der Methode von Hindsø Landin das Auftreten des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin in Personen, die Nahrungsmittel konsumiert hatten, zu deren Zubereitung Diacylglycerol reiches Speiseöl, welches Glycidyl-Ester enthält, verwendet wurde. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe konnten keine Unterschiede im Hämoglobinadduktlevel festgestellt werden. Die analytische Bestimmung des Hämoglobinadduktlevels erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 1996), jedoch ohne Totalhydrolyse der Standardglobine (N-(2,3-Dihydroxypropyl)globin, N-(2,3-Dihydroxy(d₅)propyl)globin).

Weitere methodische Hinweise zur Bestimmung von Hämoglobinaddukten anderer alkylierender Substanzen sind einer DFG-Methode zu entnehmen (van Sittert, 1996). Die Quantifizierung der verschiedenen Hämoglobinaddukte erfolgte hier über die Kalibration mit den entsprechenden alkylierten Valin-leucin-anilid Standardverbindungen. Die Verwendung eines Dipeptidstandards zur Quantifizierung bietet den Vorteil, dass Verluste bei der Aufarbeitung kompensiert werden können. Die Synthese des N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-leucin-anilids, sowie eines markierten internen Standards wurde von Belov (Belov et al., 2005) beschrieben. Diese Standards wurden von Müller (Müller et al., 2005) im Rahmen von Untersuchungen zum Biomonitoring nach einer Epichlorhydrin-Exposition verwendet. Die Methodik beruht auf dem modifizierten Edmanabbau von Hämoglobinaddukten (van Sittert, 1996) gefolgt von einer Ketalisierung der vicinalen Hydroxyfunktionen mit Hilfe von schwefelsaurem Aceton (Paulsson et al., 2003).

Den Nachweis für das Auftreten der Urinkonjugate S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein und N-Acetyl-S-(2,3-Di-hydroxypropyl)cystein (DHPMA) nach intraperitonealer Gabe von Glycidol bei der Ratte und Maus erbrachte Jones (Jones, 1975) bei Untersuchungen zum Metabolismus von u.a. 3-Chlor-1,2-propandiol.

Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Mercaptursäure N-Acetyl-S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein im Humanurin wurden von Eckert (Eckert et al., 2010; 2011)

durchgeführt. Als mögliche Ursachen für das Auftreten dieses Biomarkers im Humanurin wurden 3-MCPD und die Fettsäureester von 3-MCPD und Glycidol in Nahrungsmitteln diskutiert. Das von den Autoren beschriebene Analyseverfahren beruht auf einer Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Urins mit Hilfe einer SPE-Säule (Isolute EN-Material) gefolgt von einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer HILIC-Säule (hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie) und der Detektion mit einem Tandem-Massenspektrometer.

Neben diesen chemisch-analytischen Vorgehensweisen liegen verschiedene ADME-Arbeiten mit radioaktiv markiertem Glycidol vor, die quantitative Daten zum Metabolismus liefern.

Bei der intraperitonealen Gabe von ^{14}C -markiertem Glycidol bei Ratten und Mäusen konnte Jones (Jones, 1975) eine Abatmung an $^{14}\text{CO}_2$ von 15-16 % der Gesamtdosis feststellen.

Nomeir (Nomeir et al., 1995) führte eine ADME-Studie (Adsorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) nach oraler und intravenöser Verabreichung von ^{14}C -Glycidol bei der Ratte durch. Dabei fand eine Absorption des Glycidols von ca. 87-91% aus dem Magen-Darm-Trakt statt. Innerhalb von 72 Std. wurden 40-48 % der ^{14}C -Glycidol-Äquivalente im Urin, 5-12% in den Faeces und ca. 26-32% als CO_2 ausgeschieden. Ca. 10% der Dosis verblieben nach 72 Std. in Geweben, mit den höchsten Konzentrationen in Blutzellen, Schilddrüse, Leber, Niere und Milz.

2 Material und Methoden

2.1 Chemisch-analytische Untersuchungen

2.1.1 Durchführung der Tierversuche

2.1.1.1 Beschaffung der Prüfsubstanzen

Glycidol

Aldrich, Cat.- Nr. G5809-5G, Chargen-Nr. BCBC 1906V

Glycidylpalmitinsäureester

TRC, Toronto, Kanada; Cat.-Nr. G615950, Chargen-Nr. 6-KPA-81-1

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))

2.1.1.2 Applikation der Prüfsubstanzen

Die Testsubstanzen Glycidol und Glycidylpalmitinsäureester wurden den Ratten durch einmalige orale Gabe (Schlundsonde) verabreicht. Die Testsubstanzen wurden als Lösungen in Maisöl angesetzt und mit 8 mL Maisöl/kg KG verabreicht.

Es wurden äquimolare Dosen von 209,4 mg/kg KG (=0,67 mmol/kg) Glycidylpalmitinsäureester und von 50 mg/kg KG (=0,67 mmol/kg) Glycidol verwendet.

Die Dosis wurde aufgrund vergleichbarer Applikationen mit radioaktiv markiertem Glycidol von 37,5 und 75 mg/kg KG gewählt (Nomeir et al., 1995).

2.1.1.3 Design und Durchführung

Der Tierversuch wurde unter GLP-Bedingungen (Details in Anhang I D) und in Anlehnung an die Richtlinie OECD 417 durchgeführt.

Die Testsubstanzen wurden den Tieren nach Fasten (über Nacht) verabreicht. Nach der Substanzgabe wurden die Tiere in Metabolismuskäfigen gehalten. Nach definierten

Zeitintervallen wurden die zu untersuchenden Blut- bzw. Urinproben gewonnen. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Übersicht zu den Behandlungsgruppen und Probenahmeterminen

Gruppe	Anzahl Ratten	Substanz	Biologische Probe
1 Glycidylpamitin- säureester	16	Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg Ratte (= 0,67 mmol/kg)	Blutentnahme (nach Tötung); Probenahme an 4 Zeitpunkten, d.h. 4 h, 8 h, 24 h, 48 h nach Behandlung
2 Glycidol	16	Glycidol / 50 mg/kg Ratte (= 0,67 mmol/kg)	Urinprobenahme zu 3 Zeitpunkten, d.h. 8 h, 24 h, 48 h nach Behandlung (für alle lebenden Tiere)
3 Vehikel	2	Maisöl 8 ml/kg	
	Gesamt		Gesamt
	34		34 Blutproben
			54 Urinproben
Anmerkung: Ratten wurden die Nacht vor der Behandlung fasten gelassen; Vollblut (K-EDTA) und Urinproben wurden gesammelt			

2.1.2 Analytik

2.1.2.1 Bestimmung von Hämoglobinaddukten

Im Rattenglobin wird das N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin als Pentfluorphenylthiohydantoin-Derivat bestimmt. Nach Isolierung des Globins aus dem EDTA-Vollblut wird das alkylierte N-terminale Valin nach Zusatz von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin(¹³C₅,¹⁵N)-leucin-anilid als internem Standard mit Hilfe von Pentafluorphenylisothiocyanat durch einen modifizierten Edman-Abbau aus der Globinkette abgespalten und gleichzeitig derivatisiert (Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivat, PFPTH-Derivat). Anschließend werden die freien Hydroxyfunktionen des Valins mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

Zur Analyse der acetylierten PFPTH-Derivate wird die Kapillargaschromatographie mit einem massenselektiven Detektor im NCI-Modus verwendet. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine interne Kalibrierung in der Globinmatrix nach dem Internen Standard-Verfahren.

In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der analytischen Methode zur Bestimmung von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin in Rattenblut schematisch dargestellt. Detaillierte Angaben zur Methodik sind in Anhang I C aufgeführt beschrieben.

Die Methodik basiert auf Verfahren zur Analytik von verschiedenen Hämoglobinaddukten (van Sittert, 1996) und N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin in Globin (Hindsø Landin et al., 1996; Müller et al., 2005).

Blutprobenahme und Hämolyse

Blut (EDTA)	Zentrifugation (800 g, 10 min)
Erythrozyten	Waschen (0,9 % Natriumchloridlösung, 3 x)
	Lyse (dest. Wasser, -20 °C)



Globinisolierung

Lysate	Zugabe zu 50 mM Salzsäure in 2-Propanol
	Mischen für 15 min and Zentrifugation (800 g, 10 min)
	Globinfällung durch Zugabe von Ethylacetat zum Überstand
	Lagerung der Suspension (2 h, 4 °C)
	Zentrifugation (800 g, 10 min)
	Waschen des Globins mit Ethylacetat and Hexan
	Trocknen des Globins über Nacht im Vakuumexsikkator



Modifizierter Edmanabbau

Globin in Formamid	Zugabe von 1 M Natriumhydroxid
	Zugabe des internen Standards
	Zugabe von Pentafluorphenylisothiocyanat
	Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur
	Inkubation bei 45 °C für 2 h



Extraktion

Formamid-Lösung	Extraktion mit Diethylether (2 x)
	Einengen der vereinigten Diethyletherphasen bis zur Trockene
Rückstand	Aufnahme in Toluol
	Waschen mit Wasser und danach mit 0.1 M Natriumcarbonatlösung
	Einengen bis zur Trockene



Acetylierung

Rückstand	Zugabe von 12.5 % Essigsäureanhydrid/12.5 % Triethylamin (v,v) in Acetonitril (offen Schütteln, 15 min)
	Einengen bis zur Trockene
	Aufnahme in Pentan
	Waschen mit Methanol/dest. Wasser (60/40, v/v)
	Einengen bis zur Trockene
	Aufnahme in Toluol



GC-NCI-MSD Analyse

Toluol-Extrakte (PFPTH-Derivate)	DB-5MS column
	Splitless Injektion von 1 µL
Quantifizierung	Matrixkalibration (gepooltes Blindglobin) in verschiedenen Konzentrationsbereichen (Internes Standard-Verfahren)

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Bestimmung von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin in Rattenblut

2.1.2.2 Bestimmung von N-Acetyl-S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin

In Rattenurin wird N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein bestimmt. Nach Zugabe des internen Standards (N-Acetyl-d₃-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein) und Verdünnung wird die Mercaptursäure an einer HILIC-Säule getrennt und mittels Tandemmassenspektrometer detektiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine Kalibrierung in der Urinmatrix nach dem Internen Standard-Verfahren.

In Abbildung 2.2 ist der Ablauf der Methode zur Bestimmung N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein in Urin schematisch dargestellt. Detaillierte Angaben zur Methodik sind in Anhang I C aufgeführt. Die Methodik basiert auf Verfahren, die zur Analytik von Mercaptursäuren in Humanurin eingesetzt wurden (Eckert et al., 2010; EFSA, 2011).

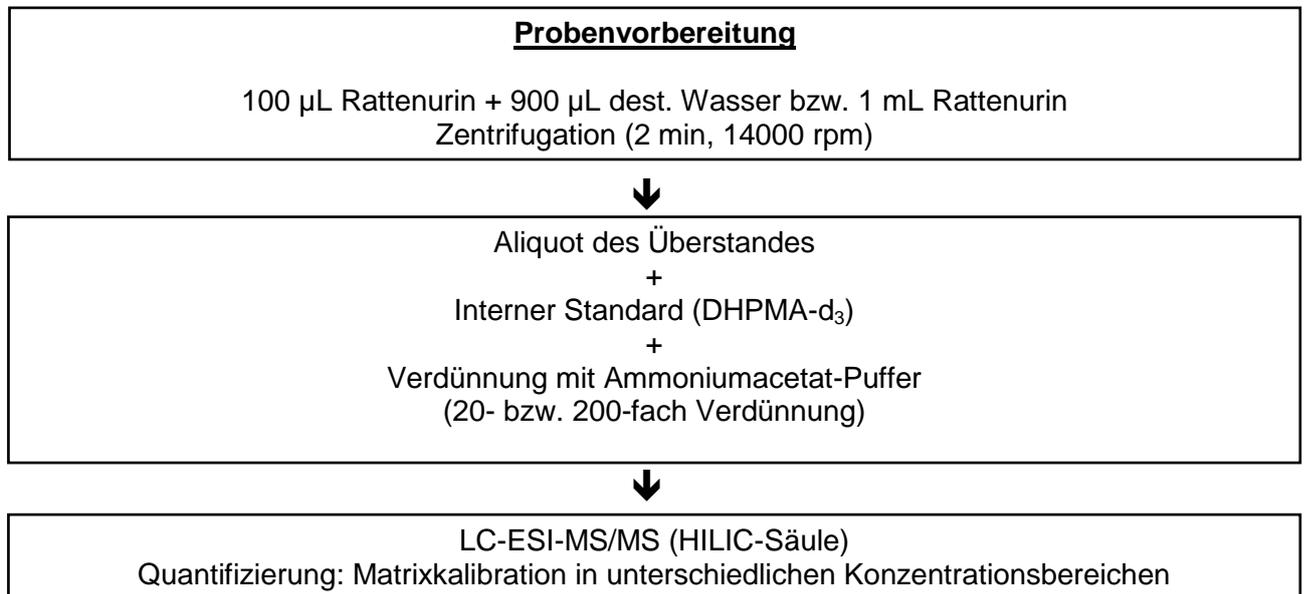


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Bestimmung von DHPMA in Rattenurin

2.2 Analytische Untersuchungen mit ^{14}C , ^3H -Radiomarkierung

2.2.1 Durchführung der Tierversuche

2.2.1.1 Beschaffung der Prüfsubstanzen

Glycidylpalmitinsäureester

TRC, Toronto, Kanada; Cat.-Nr. G615950, Chargen-Nr. 6-KPA-81-1.

[2- ^{14}C]-markierter Glycidylpalmitinsäureester

Quotient Bioresearch Ltd (Cardiff, Wales); Chargen-Nr. CFQ40980; radiochemische Reinheit 99,4 %; spezifische Aktivität 999 MBq/mmol (3,2 MBq/mg).

[9,10- ^3H]-markierter Glycidylpalmitinsäureester

Quotient Bioresearch Ltd (Cardiff, Wales), Chargen-Nr. TRQ40515, radiochemische Reinheit 99,9 %, Spezifische Aktivität 1,89 TBq/mmol (5981 MBq/mg).

Maisöl (Vehikel)

Sigma, C-8267 (2,5 L), Chargen-Nr. MCB4650

2.2.1.2 Applikation der Prüfsubstanzen

Glycidylpalmitinsäureester wurden für die orale Applikation in Maisöl gelöst. [2- ^{14}C]-markierter Glycidylpalmitinsäureester und [9,10- ^3H]-markierter Glycidylpalmitinsäureester wurden mit nicht-radioaktiver Substanz gemischt, um in der Applikationslösung eine spezifische Aktivität von 1MBq/ml [^{14}C], 4MBq/ml [^3H] und eine Konzentration von 41,88 mg/ml zu erzielen. 5 ml/kg Körpergewicht wurden appliziert, so dass die pro Tier verabreichte Gesamtaktivität im Mittel 1,2 MBq [^{14}C] und 4,9 MBq [^3H] betrug.

2.1.1.3 Design und Durchführung

Der Tierversuch wurde unter GLP-Bedingungen und entsprechend OECD 417 durchgeführt. Eine Übersicht zu den Behandlungsgruppen ist in Tabelle 2.2 gegeben. Die Testsubstanz wurde den Tieren nach Fasten (über Nacht) verabreicht. Die Tiere der Gruppe 1 wurden anschließend für 7 Tage in Metabolismuskäfigen gehalten und Faeces, Urin und Ausatemluft wurden täglich gesammelt. Den Tieren der Gruppe 2 wurden 2, 4, 8 und 24h nach der Applikation Blutproben entnommen. Gruppe 1 wurde 7 Tage, Gruppe 2 24h nach der Applikation getötet und sezirt. Dabei wurden Organ- und Gewebeproben entnommen. In allen Proben erfolgte die Bestimmung der [^{14}C] und [^3H] Radioaktivität mittels beta-Counting.

Tabelle 2.2: Übersicht zu den Behandlungsgruppen und Proben

Gr.	Verwendung	Tier-Nr.	Proben für die Radioaktivitätsmessung (¹⁴ C, ³ H)
1	Exkretion (Stoffwechselläufig) für 1 Woche, Organverteilung an Tag 7	1101, 1102, 1103, 1104	Kot, Urin, Ausatemluft (nur ¹⁴ C), Herz, Lunge, Leber, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nierenfett, Gehirn, Augen, Knochen, Blut (getrennt in Plasma + Zellen), Magen- und Darminhalt
2	Blutkinetik, Organverteilung nach 24h	2101, 2102, 2103, 2104	Blutproben (2, 4, 8 und 24h, getrennt in Plasma + Zellen), Herz, Lunge, Leber, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nierenfett, Gehirn, Augen, Knochen, Blut (getrennt in Plasma + Zellen), Magen- und Darminhalt

2.2.2 Analytische Untersuchungen mit ¹⁴C/³H –Radiomarkierung (GLP)

Tabelle 2.3: Übersicht zu den Behandlungsgruppen und Probenahmeterminen

Group No.	Purpose	Sex	Animal-No.	Samples for Radioactivity measurements (¹⁴ C, ³ H)
1	Excretion, Tissue Distribution on day 7	m	1101, 1102, 1103, 1104	Faeces, urine, expired air (¹⁴ C only), heart, lungs, liver, spleen, stomach, small intestine, large intestine, muscle, kidneys, adrenals, testes, renal fat, brain, eyes, bone, blood
2	Blood Kinetics, Tissue Distribution at 24h	m	2101, 2102, 2103, 2104	Blood samples (2, 4, 8 and 24h), heart, lungs, liver, spleen, stomach, small intestine, large intestine, muscle, kidneys, adrenals, testes, renal fat, brain, eyes, bone, blood

Weitere Details siehe Appendix II.

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der chemisch analytischen Untersuchungen

3.1.1 Blutuntersuchungen - Hämoglobinaddukte

Die Ergebnisse der Hämoglobinaddukt-Untersuchungen (Bestimmung von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Blut) nach oraler Applikation der Ratten mit Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG) und Glycidol (50 mg/kg KG) in Maisöl sind in der Tabelle 3.1 (Anhang I B, Tabelle B1) sowie in Abbildung 3.1 aufgezeigt. Das Design der Studie ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Sowohl nach Gabe des Glycidyl-Esters als auch nach Gabe von Glycidol ist das alkylierte N-terminale Valin im Globin (N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin, DHPV) bestimmbar. Nach der oralen Applikation des Glycidyl-Esters ist ein Anstieg an DHPV von 875 pmol/100 mg Globin bis zu 1450 pmol/100mg im Zeitraum von 4 h bis 48 h nach der Anwendung zu beobachten. Bei Gabe der äquimolaren Dosis von Glycidol ist bereits 4 h nach der Applikation ein DHPV-Adduktlevel von 1270 pmol/100 mg Globin erreicht, der auf gleichem Niveau (Ausnahme: 24 h) bis zu 48 h nach der Applikation mit 1232 pmol/100 mg Globin bleibt. Die relativen Standardabweichungen bei Bestimmung des N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Globin variieren bei den mit Glycidyl-Ester behandelten Tieren zwischen 7,6 und 14,5 %. Bei den mit Glycidol behandelten Tieren bewegen sie sich zwischen 6,5 und 20,6 % und sind in den ersten Stunden nach der Applikation höher als nach Gabe des Glycidyl-Esters (Anhang I B, Tabelle B1).

Statistische Untersuchungen mit der Varianzanalyse (ANOVA) haben gezeigt, dass die Konzentrationsunterschiede im Adduktlevel zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (4 - 8 - 24 - 48 Stunden nach Applikation) bei den Tieren, denen Glycidyl-Ester bzw. Glycidol verabreicht wurde, nicht signifikant verschieden sind (mit $p > 0,01$).

Innerhalb der Gruppe der Tiere, denen Glycidyl-Ester verabreicht wurde, gibt es Unterschiede in den N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin Konzentrationen des Globins zwischen den 8 h- und 48 h-Werten auf dem 1 % Niveau sowie zwischen den 4 h- und 48 h-Werten auf dem 0,1 % Niveau. Innerhalb der Gruppe der Tiere, denen Glycidol verabreicht wurde, gibt es zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Auftreten des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Rattenblut lassen die Annahme zu, dass der Hämoglobinadduktlevel im Blut ähnlich ist, sowohl nach Verabreichung des Glycidylpalmitinsäureesters als auch nach Glycidol Gabe.

Bei der Applikation des Glycidyl-Esters kommt es aufgrund der intestinalen Hydrolyse zu einer zeitlichen Verzögerung der Absorption.

Tabelle 3.1: Hämoglobinaddukte - Statistische Kenngrößen zur Konzentration von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Rattenglobin 4 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG, n=4), Glycidol (50 mg/kg KG, n=4)

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	DHPV-Konzentration im Globin nach			
		4 h	8 h	24 h	48 h
Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	Min.-Max. [pmol/100 mg]	781-935	966-1255	1286-1388	1236-1685
	Mittelwert [pmol/100 mg]	875	1081	1339	1450
	SD [pmol/100 mg]	67	124	45	211
Glycidol (50 mg/kg)	Min.-Max. [pmol/100 mg]	960-1552	998-1429	1344-1557	1066-1511
	Mittelwert [pmol/100 mg]	1270	1225	1479	1232
	SD [pmol/100 mg]	261	181	96	198

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze 100 pmol/50 mg Globin

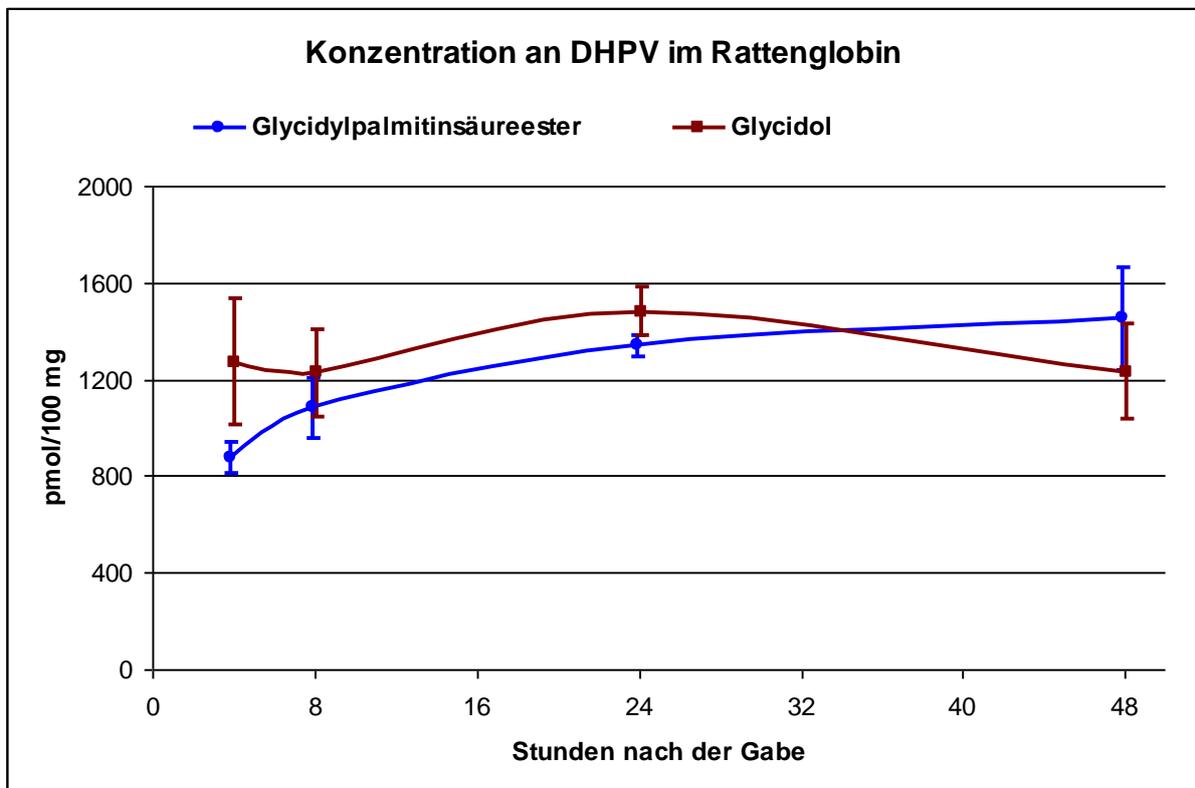


Abbildung 3.1: Konzentrationen von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Rattenglobin 4-48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG, n=4), Glycidol (50 mg/kg KG, n=4), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1.

3.1.2 Urinkonjugate - Mercaptursäure

Nach der Verabreichung von Glycidylpalmitinsäureester mit einer Dosierung von 209,4 mg/kg KG bzw. von Glycidol mit einer Dosierung von 50 mg/kg KG in Maisöl wurden von den Tieren, die sich in Stoffwechselläufigen befanden, über bestimmte Zeitintervalle Urinproben gesammelt. Das Design der Studie ist in Tabelle 2.1 aufgezeigt. Angaben zu Urinmengen und Creatiningehalten sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen für die Mercaptursäure N-Acetyl-S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein (DHPMA) im Urin sind in den Tabellen 3.3-3.4, sowie in Abbildung 3.2-3.3 zusammenfassend aufgeführt.

Die Einzelergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang B1 gezeigt (Tabellen B2 - B5).

Tabelle 3.2: Urinsammlung - Statistische Kenngrößen zum Urinvolumen und der Creatinkonzentration im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG)

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	Urinvolumen und Creatinkonzentration nach		
		0-8 h [n=12]	8-24 h [n=8]	24-48 h [n=4]
Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg)	Urinvolumen Min.-Max. [mL]	0,8 - 4,8	6,9 - 22,1	11,2 - 23,2
	Urinvolumen Mittelwert [mL]	2,3	11,8	16,4
	SD [mL]	1,4	5,1	5,5
	Creatinkonz. Min.-Max. [mmol/L]	3,7 - 13,1	3,0 - 8,1	2,7 - 7,1
	Creatinkonz. Mittelwert [mmol/L]	8,2	5,7	5,0
	SD [mmol/L]	3,2	1,7	2,2
Glycidol (50 mg/kg)	Urinvolumen Min.-Max. [mL]	0,9 - 5,4	9,8 - 14,3	17,1 - 23,2
	Urinvolumen Mittelwert [mL]	2,1	12,1	20,1
	SD [mL]	1,5	1,7	2,6
	Creatinkonz. Min.-Max. [mmol/L]	2,9 - 13,1	3,6 - 7,6	3,1 - 4,2
	Creatinkonz. Mittelwert [mmol/L]	8,3	4,7	3,6
	SD [mmol/L]	3,1	1,4	0,4

Die Tabelle 3.3 und Abbildung 3.2 zeigen die Konzentrationen von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Urin der Versuchstiere nach unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach der oralen Applikation des Glycidyl-Esters liegen die DHPMA-Konzentrationen im Zeitraum von 0-8 h nach der Gabe bei 1053 µg/mL (1138 µg/mg Creatinin) und fallen im weiteren Zeitverlauf stark ab. Bei Gabe der äquimolaren Dosis von Glycidol sind die Konzentrationen ähnlich und liegen bei 1310 µg/mL (1451 µg/mg Creatinin). Wie aus der Abbildung 3.2 deutlich wird, ist die zeitliche Abnahme der DHPMA-Konzentrationen vergleichbar mit denen nach Applikation des Glycidyl-Esters.

Tabelle 3.3: Urinkonjugate - Statistische Kenngrößen zur Konzentration von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG)

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	DHPMA-Konzentration im Urin nach		
		0-8 h [n=12]	8-24 h [n=8]	24-48 h [n=4]
Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	DHPMA-Konz. Min.-Max. [µg/mL]	449 – 2291	194 – 475	18,6 - 29,1
	DHPMA-Konz. Mittelwert [µg/mL]	1053	327	24,0
	SD [µg/mL]	532	105	5,6
	DHPMA-Konz. Min.-Max. [µg/mg Creatinin]	575 - 1541	384 - 612	36,0 – 61,1
	DHPMA-Konz. Mittelwert [µg/mg Creatinin]	1138	515	46,3
	SD [µg/mg Creatinin]	282	101	11,4
Glycidol (50 mg/kg)	DHPMA-Konz. Min.-Max. [µg/mL]	615 – 2257	206 - 436	11,9 – 20,4
	DHPMA-Konz. Mittelwert [µg/mL]	1310	291	17,0
	SD [µg/mL]	503	83,2	3,9
	DHPMA-Konz. Min.-Max. [µg/mg Creatinin]	1005 - 1907	368 - 795	34,0 – 49,7
	DHPMA-Konz. Mittelwert [µg/mg Creatinin]	1451	565	41,2
	SD [µg/mg Creatinin]	302	132	6,9

Anmerkungen: BG - Bestimmungsgrenze 2 µg/mL Urin

Tabelle 3.4: Urinkonjugate - Statistische Kenngrößen zum Gehalt von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Gesamturin und zur Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG.), Glycidol (50 mg/kg KG).

Substanz (Dosis)	Kenngrößen	DHPMA-Gehalt und Wiederfindung im Urin nach		
		0-8 h [n=12]	8-24 h [n=8]	24-48 h [n=4]
Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	DHPMA-Gehalt Min.-Max. [µg]	626-3679	2378-4477	322-432
	DHPMA-Gehalt Mittelwert [µg]	2043	3495	372
	SD [µg]	960	855	45,2
	DHPMA-Wiederfindung Min.-Max. [%]	1,4-8,4	5,4-10,2	0,8-1,0
	DHPMA-Konz. Mittelwert [%]	4,8	8,0	0,9
	SD [%]	2,3	1,8	0,1
Glycidol (50 mg/kg)	DHPMA-Gehalt Min.-Max. [µg]	984-3342	2806-4259	277-414
	DHPMA-Gehalt. Mittelwert [µg]	2299	3403	335
	SD [µg]	712	542	60,7
	DHPMA-Wiederfindung Min.-Max. [%]	2,3-7,6	6,4-9,7	0,6-0,9
	DHPMA-Konz. Mittelwert [%]	5,4	7,8	0,8
	SD [%]	1,6	1,3	0,1

In der Tabelle 3.4 sind die Angaben (DHPMA Gehalt, Wiederfindung) für den im jeweiligen Zeitintervall gesammelten Gesamturin aufgeführt. Während der ersten 8 h nach der Applikation des Glycidylpalmitinsäureesters werden 2043 µg N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein ausgeschieden, in der nachfolgenden Zeitperiode (nach 8-24 h) 3495 µg. Das bedeutet, dass zu diesen Zeiten 4,8 % bzw. 8,0 % der verabreichten Dosis über die hier untersuchte Mercaptursäure im Urin ausgeschieden werden. Insgesamt werden im Mittel 13,7 % der verabreichten Dosis wiedergefunden. Den Gesamtverlauf der Ausscheidung zeigt Abbildung 3.2.

Bei der oralen Gabe von Glycidol ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 3.2). Nach 8 h werden 2299 µg N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein (5,4 % der verabreichten Dosis)

und im Zeitraum von 8-24 h 3403 µg (7,8% der verabreichten Dosis) ausgeschieden. Im gesamten Untersuchungszeitraum werden im Mittel 14,0 % der verabreichten Dosis wiedergefunden.

Des Weiteren zeigten statistische Untersuchungen mit der Varianzanalyse (ANOVA), dass es hinsichtlich der Ausscheidung von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Urin zu keinem Zeitpunkt statistische signifikante Unterschiede auf dem 1 % Niveau gibt, wenn man die Tiere miteinander vergleicht, denen äquimolare Dosen von Glycidyl-Ester bzw. Glycidol verabreicht wurden.

Die Ergebnisse zur Ausscheidung des N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein Konjugates im Urin, das als Marker für eine Glycidolexposition diskutiert wird, zeigen, dass die Absorption von Glycidol bei beiden Gruppen ähnlich ist, was die Annahme stützt, dass es zu einer 100 %-igen Hydrolyse des Esters im Intestinaltrakt kommt.

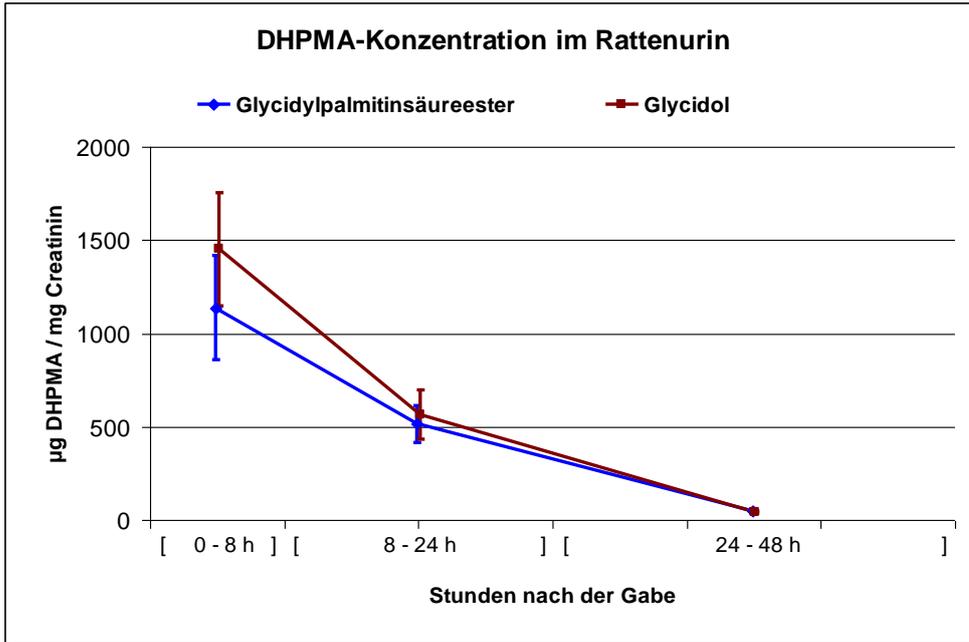


Abbildung 3.2: Konzentration von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein (in Bezug auf Creatinin, Mittelwert mit Standardabweichungen) in Rattenurin 0-48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1.

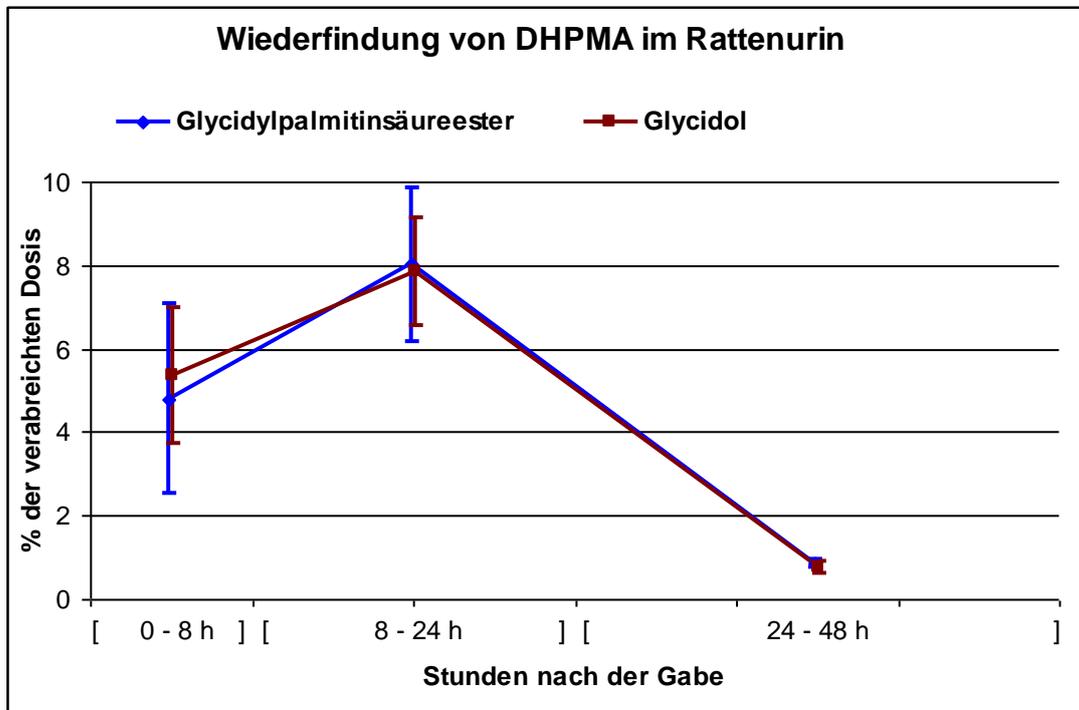


Abbildung 3.3: Wiederfindung von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein in % (in Bezug zur verabreichten Dosis, Mittelwert mit Standardabweichungen) in Rattenurin 0-48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG), Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1.

3.2 Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der radioaktiven Untersuchungen

3.2.1 Exkretion

Im Mittel wurden 21,6 % der ^{14}C -Aktivität und 50,8 % der ^3H -Aktivität während der 7-tägigen Sammelperiode mit den Faeces ausgeschieden (Tabelle 3.5 und 3.6). Die ^{14}C -Exkretion mit dem Urin machte 41,3 % aus, während nur 7,7 % der ^3H -Aktivität mit dem Urin ausgeschieden wurden (Tabelle 3.7 und 3.8). Im Käfigwaschwasser wurden 3,4 % (^{14}C) und 1,0 % (^3H) der Radioaktivität wiedergefunden (Tabelle 3.9 und 3.10). Über die Ausatemluft wurden im Mittel 32,9 % der ^{14}C -Aktivität und 20,5 % der ^3H -Aktivität ausgeschieden (Tabelle 3.11 und 3.12).

Tabelle 3.5: Faecale ^{14}C -Exkretion nach oraler Applikation von [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Glycidylpalmitat und Glycidyl [$9,10\text{-}^3\text{H}$] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	0,2474	0,0295	0,0010	0,0005	0,0004	0,0000	0,0000	0,2787	23,23
1102	0,2543	0,0133	0,0013	0,0005	0,0014	0,0000	0,0000	0,2709	22,57
1103	0,2549	0,0078	0,0018	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,2649	22,07
1104	0,2060	0,0120	0,0020	0,0012	0,0005	0,0002	0,0001	0,2220	18,50
								Mean:	21,59
								SD:	2,11

Tabelle 3.6: Faecale ^3H -Exkretion nach oraler Applikation von [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Glycidylpalmitat und Glycidyl [$9,10\text{-}^3\text{H}$] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	3,2131	0,2625	0,0505	0,0355	0,0279	0,0213	0,0185	3,6293	74,07
1102	1,0567	0,2031	0,0688	0,0791	0,0668	0,0434	0,0370	1,5548	31,73
1103	2,2669	0,1611	0,0740	0,0516	0,0407	0,0350	0,0267	2,6562	54,21
1104	1,7416	0,1511	0,0724	0,0508	0,0466	0,0274	0,0224	2,1123	43,11
								Mean:	50,78
								SD:	18,03

Tabelle 3.7: ^{14}C -Exkretion mit dem Urin nach oraler Applikation von [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Glycidylpalmitat und Glycidyl [$9,10\text{-}^3\text{H}$] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	0,4256	0,0257	0,0088	0,0044	0,0034	0,0024	0,0019	0,4721	39,34
1102	0,4700	0,0460	0,0099	0,0044	0,0033	0,0021	0,0023	0,5380	44,83
1103	0,3810	0,0226	0,0070	0,0045	0,0032	0,0024	0,0019	0,4226	35,22
1104	0,4920	0,0382	0,0084	0,0052	0,0030	0,0023	0,0018	0,5509	45,91
								Mean:	41,32
								SD:	4,98

Tabelle 3.8: ³H-Exkretion mit dem Urin nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	0,0999	0,0511	0,0366	0,0396	0,0378	0,0268	0,0204	0,3121	6,37
1102	0,1037	0,0984	0,0667	0,0637	0,0805	0,0649	0,0441	0,5218	10,65
1103	0,0940	0,0558	0,0302	0,0303	0,0340	0,0241	0,0206	0,2890	5,90
1104	0,1206	0,0551	0,0437	0,0483	0,0458	0,0328	0,0320	0,3783	7,72
								Mean:	7,66
								SD:	2,14

Tabelle 3.9: ¹⁴C-Aktivität im Käfigwaschwasser nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	0,0179	0,0015	0,0013	0,0007	0,0008	0,0013	0,0010	0,0245	2,04
1102	0,0412	0,0039	0,0018	0,0007	0,0017	0,0007	0,0012	0,0512	4,27
1103	0,0360	0,0029	0,0019	0,0008	0,0014	0,0015	0,0011	0,0456	3,80
1104	0,0282	0,0037	0,0020	0,0011	0,0019	0,0024	0,0019	0,0412	3,44
								Mean:	3,39
								SD:	0,96

Tabelle 3.10: ³H-Aktivität im Käfigwaschwasser nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	total	% der Dosis
1101	0,0179	0,0023	0,0022	0,0013	0,0016	0,0026	0,0020	0,0299	0,61
1102	0,0407	0,0057	0,0033	0,0013	0,0034	0,0013	0,0026	0,0583	1,19
1103	0,0370	0,0042	0,0032	0,0013	0,0028	0,0031	0,0022	0,0540	1,10
1104	0,0274	0,0058	0,0037	0,0023	0,0040	0,0052	0,0041	0,0524	1,07
								Mean:	0,99
								SD:	0,26

Tabelle 3.11: ¹⁴CO₂ –Exkretion in der Ausatemluft nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	MBq total	% der Dosis
1101	0,1892	0,0401	0,0316	0,0254	0,0204	0,0160	0,0141	0,3374	28,12
1102	0,2084	0,0572	0,0452	0,0403	0,0300	0,0263	0,0201	0,4244	35,37
1103	0,2078	0,0440	0,0377	0,0274	0,0216	0,0177	0,0151	0,3686	30,71
1104	0,2470	0,0568	0,0433	0,0366	0,0246	0,0231	0,0216	0,4501	37,51
								Mean:	32,93
								SD:	3,71

Tabelle 3.12: ³H₂O –Exkretion in der Ausatemluft nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind MBq.

Tier-Nr.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	MBq total	% der Dosis
1101	0,4883	0,1049	0,0871	0,0694	0,0563	0,0456	0,0387	0,8883	18,13
1102	0,4933	0,1579	0,1339	0,1185	0,0896	0,0794	0,0605	1,1231	22,92
1103	0,4642	0,1130	0,1012	0,0742	0,0594	0,0500	0,0430	0,8976	18,32
1104	0,5461	0,1454	0,1190	0,1014	0,0701	0,0681	0,0603	1,1028	22,51
								Mean:	20,47
								SD:	2,25

3.2.2 Blutkinetik

Die Kinetik der ^{14}C -Aktivität im Plasma zeigte einen deutlichen Abfall innerhalb von 24h, während die Aktivität in den Erythrozyten etwa gleich blieb (Tabelle 13). Die ^3H -Aktivität stieg sowohl im Plasma als auch in den Erythrozyten an (Tabelle 3.14).

Tabelle 3.13: Kinetik der ^{14}C -Aktivität im Blut nach oraler Applikation von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycidylpalmitat und Glycidyl $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis

Erythrozyten						
Time (h)	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
2	1,40	1,23	1,38	1,08	1,27	0,13
4	1,28	1,23	1,11	1,09	1,18	0,08
8	1,35	0,96	1,09	1,03	1,11	0,15
24	0,96	0,98	1,23	1,37	1,14	0,17
Plasma						
Time (h)	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
2	1,37	1,27	1,82	1,21	1,42	0,24
4	0,93	0,92	0,86	0,91	0,90	0,03
8	0,85	0,65	0,67	0,64	0,70	0,09
24	0,36	0,39	0,31	0,34	0,35	0,03

Tabelle 3.14: Kinetik der ^3H -Aktivität im Blut nach oraler Applikation von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycidylpalmitat und Glycidyl $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis

Erythrozyten						
Time (h)	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
2	0,77	0,47	1,06	1,46	0,94	0,36
4	1,63	1,75	2,34	1,88	1,90	0,27
8	2,72	1,78	2,36	2,69	2,39	0,38
24	2,51	2,51	2,90	3,34	2,81	0,34
Plasma						
Time (h)	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
2	4,82	4,29	7,00	4,12	5,06	1,15
4	5,19	4,87	6,35	5,31	5,43	0,56
8	8,30	6,88	7,45	9,05	7,92	0,83
24	5,45	7,18	7,00	5,43	6,26	0,83

3.2.3 Organverteilung

Nach 24h wurden die höchsten ^{14}C -Aktivitäten in Leber (5%), Muskulatur (5%), Knochen (1%) und Erythrozyten (1%) gefunden. Die höchsten ^3H -Aktivitäten wurden in Muskulatur (18%), Fettgewebe (7%) und Leber (6%), gefolgt von Dünndarm (3%), Dickdarminhalt (2%), Knochen (2%) und Plasma (2%) ermittelt.

An Tag 7 wurden die höchsten ^{14}C -Aktivitäten in Leber (3%), Muskulatur (3%), Fettgewebe (1%) und Erythrozyten (1%) gefunden. Die höchsten ^3H -Aktivitäten wurden in Muskulatur und Fettgewebe (jeweils 9%) bestimmt.

Insgesamt wurden im restlichen Kadaver an Tag 7 10% der ^{14}C Aktivität und 24% der ^3H Aktivität wiedergefunden.

Tabelle 3.15: Organverteilung der ^{14}C Aktivität **24h** nach oraler Applikation von [2- ^{14}C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10- ^3H] Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.:	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
Gehirn	0,091	0,097	0,098	0,047	0,083	0,021
Augen	0,012	0,018	0,004	0,009	0,011	0,005
Knochen	1,190	0,877	1,184	0,867	1,029	0,158
Erythrozyten	1,209	1,311	1,061	0,827	1,102	0,182
Plasma	0,389	0,385	0,314	0,330	0,355	0,033
Herz	0,040	0,042	0,032	0,040	0,038	0,004
Lungen	0,086	0,097	0,076	0,139	0,099	0,024
Milz	0,169	0,055	0,105	0,089	0,105	0,041
Leber	5,462	4,860	3,625	5,767	4,929	0,820
Muskulatur	4,461	4,850	4,776	5,325	4,853	0,309
Hoden	0,168	0,188	0,202	0,139	0,174	0,024
Nieren	0,267	0,226	0,239	0,246	0,245	0,015
Nebennieren	0,006	0,007	0,006	0,007	0,006	0,001
Fettgewebe	0,585	0,543	0,660	0,722	0,628	0,069
Magen	0,129	0,138	0,146	0,028	0,110	0,048
Mageninhalt	0,013	0,045	0,033	0,001	0,023	0,017
Dünndarm	0,526	0,575	0,635	0,078	0,454	0,220
Dünndarminhalt	0,075	0,068	0,072	0,014	0,057	0,025
Dickdarm	0,242	0,242	0,215	0,213	0,228	0,014
Dickdarminhalt	0,690	0,376	0,412	0,030	0,377	0,234

Tabelle 3.16: Organverteilung der ¹⁴C Aktivität **7 Tage** nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.:	1101	1102	1103	1104	Mean	SD
Gehirn	0,035	0,028	0,037	0,036	0,034	0,004
Augen	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,001
Knochen	0,371	0,408	0,438	0,486	0,426	0,042
Erythrozyten	1,210	0,932	1,233	1,046	1,105	0,123
Plasma	0,034	0,032	0,035	0,034	0,034	0,001
Herz	0,034	0,029	0,026	0,027	0,029	0,003
Lungen	0,048	0,046	0,041	0,042	0,044	0,003
Milz	0,028	0,029	0,031	0,041	0,032	0,005
Leber	4,110	1,291	5,403	1,911	3,179	1,657
Muskulatur	2,871	2,259	3,033	2,813	2,744	0,291
Hoden	0,042	0,040	0,045	0,061	0,047	0,009
Nieren	0,091	0,066	0,078	0,084	0,080	0,009
Nebennieren	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,001
Fettgewebe	1,021	0,661	1,186	1,546	1,104	0,318
Magen	0,031	0,038	0,039	0,038	0,037	0,003
Mageninhalt	0,002	0,005	0,002	0,001	0,002	0,001
Dünndarm	0,086	0,078	0,095	0,103	0,091	0,009
Dünndarminhalt	0,015	0,008	0,019	0,018	0,015	0,004
Dickdarm	0,055	0,071	0,054	0,078	0,064	0,010
Dickdarminhalt	0,032	0,014	0,037	0,012	0,024	0,011

Tabelle 3.17: Organverteilung der ³H Aktivität **24h** nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.:	2101	2102	2103	2104	Mean	SD
Gehirn	0,212	0,228	0,228	0,127	0,199	0,042
Augen	0,020	0,013	0,018	0,017	0,017	0,003
Knochen	1,537	1,677	1,617	1,499	1,583	0,069
Erythrozyten	0,785	0,756	0,896	0,497	0,734	0,146
Plasma	1,462	1,502	1,649	1,192	1,451	0,165
Herz	0,233	0,237	0,208	0,236	0,229	0,012
Lungen	0,362	0,378	0,325	0,407	0,368	0,029
Milz	0,410	0,182	0,323	0,221	0,284	0,089
Leber	5,939	5,245	5,594	5,698	5,619	0,250
Muskulatur	15,746	17,659	16,535	21,189	17,782	2,081
Hoden	0,383	0,385	0,392	0,352	0,378	0,015
Nieren	0,682	0,589	0,721	0,579	0,643	0,061
Nebennieren	0,036	0,034	0,038	0,034	0,035	0,001
Fettgewebe	5,916	7,198	5,049	8,135	6,575	1,182
Magen	0,494	0,637	0,641	0,533	0,576	0,064
Mageninhalt	0,186	0,526	0,395	0,112	0,305	0,164
Dünndarm	2,514	3,126	3,387	2,654	2,920	0,352
Dünndarminhalt	0,673	0,521	0,684	0,555	0,608	0,071
Dickdarm	0,718	0,952	0,678	0,583	0,733	0,136
Dickdarminhalt	2,592	1,632	1,946	1,695	1,966	0,380

Tabelle 3.18: Organverteilung der ^3H Aktivität **7 Tage** nach oraler Applikation von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycidylpalmitat und Glycidyl $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.:	1101	1102	1103	1104	Mean	SD
Gehirn	0,064	0,121	0,079	0,102	0,092	0,022
Augen	0,010	0,018	0,010	0,014	0,013	0,004
Knochen	0,372	0,970	0,443	0,961	0,687	0,280
Erythrozyten	0,261	0,486	0,336	0,483	0,391	0,097
Plasma	0,352	0,717	0,410	0,633	0,528	0,151
Herz	0,062	0,119	0,069	0,103	0,088	0,024
Lungen	0,077	0,294	0,093	0,151	0,154	0,086
Milz	0,032	0,091	0,047	0,072	0,060	0,022
Leber	0,537	1,079	0,745	1,357	0,930	0,314
Muskulatur	6,758	10,500	6,958	10,286	8,626	1,771
Hoden	0,102	0,224	0,130	0,312	0,192	0,083
Nieren	0,169	0,351	0,238	0,284	0,260	0,066
Nebennieren	0,005	0,024	0,013	0,018	0,015	0,007
Fettgewebe	6,028	9,563	8,376	13,465	9,358	2,691
Magen	0,095	0,313	0,153	0,193	0,188	0,080
Mageninhalt	0,067	0,201	0,120	0,121	0,127	0,048
Dünndarm	0,377	0,912	0,507	0,830	0,657	0,221
Dünndarminhalt	0,143	0,175	0,138	0,140	0,149	0,015
Dickdarm	0,247	0,951	0,347	0,533	0,519	0,269
Dickdarminhalt	0,240	0,399	0,280	0,307	0,307	0,059

3.2.4 Bilanz

Für beide Isotope konnte eine zufriedenstellende Wiederfindung erzielt werden (Tabelle 3.19 und 3.20).

Tabelle 3.19: Wiederfindung der ^{14}C Aktivität **7 Tage** nach oraler Applikation von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycidylpalmitat und Glycidyl $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.	Faeces	Urin	Käfigwasch- wasser	Ausatemluft	Organe/ Gewebe	Gesamt Wiederfindung
1101	23,2	39,3	2,0	28,1	10,1	102,9
1102	22,6	44,8	4,3	35,4	6,0	113,1
1103	22,1	35,2	3,8	30,7	11,8	103,6
1104	18,5	45,9	3,4	37,5	8,4	113,7
Mean	21,6	41,3	3,4	32,9	9,1	108,3
SD	1,8	4,3	0,8	3,7	2,1	5,1

Tabelle 3.20: Wiederfindung der ³H Aktivität **7 Tage** nach oraler Applikation von [2-¹⁴C] Glycidylpalmitat und Glycidyl [9,10-³H] Palmitat. Ergebnisse sind % der applizierten Dosis.

Tier-Nr.	Faeces	Urin	Käfigwasch- wasser	Ausatempluft	Organe/ Gewebe	Gesamt Wiederfindung
1101	74,1	6,4	0,6	18,1	16,0	115,2
1102	31,7	10,7	1,2	22,9	27,5	94,0
1103	54,2	5,9	1,1	18,3	19,5	99,0
1104	43,1	7,7	1,1	22,5	30,4	104,8
Mean	50,8	7,7	1,0	20,5	23,3	103,2
SD	15,6	1,9	0,2	2,3	5,8	7,9

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

Bisher gibt es wenig Informationen zum Biomonitoring von Glycidol und keine Informationen zu Glycidyl-Estern nach oraler Applikation. 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 Glycidyl-Estern und Glycidol im Organismus ermöglichen. Im Mittelpunkt des vorliegenden Forschungsvorhabens stand die Frage, ob die Spaltung der Glycidyl-Ester im Organismus vollständig oder nur teilweise verläuft.

Zur Klärung dieser wichtigen Frage wurden in der vorliegenden Studie zwei Vorgehensweisen eingeschlagen. Zum einen sollte auf chemisch-analytischen Wege anhand des Auftretens spezifischer Biomarker gezeigt werden, dass es intermediär durch metabolische Spaltung des Glycidyl-Esters zum Auftreten von Glycidol kommt, zum anderen sollte durch eine ADME-Studie mit radioaktiv markiertem Glycidyl-Fettsäureester eine quantitative Bewertung der Verteilung im Organismus möglich sein.

Im Rahmen einer Tierstudie mit Wistar-Ratten wurden nach oraler Applikation von Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG) und Glycidol (50 mg/kg KG) bei äquimolarer Dosierung Daten generiert, die es ermöglichen, das Verhalten von Glycidyl-Ester und Glycidol im Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu vergleichen.

Für das Hämoglobinaddukt (N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin) im Blut sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation (4 h, 8 h, 12 h, 48 h) Konzentrationen von 875 pmol/100 mg Globin bis 1450 pmol/100mg Globin (nach Glycidyl-Ester-Gabe) und zwischen 1225 pmol/100 mg Globin und 1479 pmol/100 mg Globin (nach Glycidol-Gabe) zu beobachten.

Statistische Untersuchungen zeigten, dass es bezüglich des Hämoglobinadduktlevels zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gibt, denen Glycidyl-Ester bzw. Glycidol verabreicht wurde. Jedoch gibt es innerhalb der Gruppe der Tiere, denen Glycidyl-Ester appliziert wurde, für die N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin Konzentrationen im Globin zwischen den 4 h- und 48 h-Werten signifikante Unterschiede auf dem 0,1 % Niveau. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Freisetzungsgrad von Glycidol ins Blut bei beiden Gruppen ähnlich ist, was für die Annahme spricht, dass es zu einer vollständigen Hydrolyse des Glycidyl-Esters im Darmtrakt kommt. Bei oraler Applikation des Glycidyl-Esters kommt es aufgrund der intestinalen Hydrolyse zu einer leichten zeitlichen Verzögerung der Absorption des Glycidols.

Hämoglobinaddukte im Blut werden häufig gemessen, um eine Exposition gegenüber alkylierenden Chemikalien (z.B. Ethylenoxid, Popylenoxid, Acrylamid Glycidamid) zu erfassen. Die kovalent an das N-terminale Valin der Globinkette gebundenen Addukte werden als Biomarker zur Quantifizierung der inneren Beanspruchung verwendet (Boogaard, 2002; UBA, 2004; Ogawa et al., 2006). Der Vorteil dieser Biomarker ist, dass sie chemisch stabil sind, und da das Hämoglobin im Erythrozyten stabil ist, der Abbau nur durch die Lebensdauer der Erythrozyten bestimmt wird.

Über die Bildung von Hämoglobinaddukten nach der Exposition mit Glycidol und Epichlorhydrin berichtete Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 1996; 1999). Angaben zum Adduktlevel von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Hämoglobin beziehen sich auf Untersuchungen zur Adduktbildung nach in-vitro Reaktionen von Blutzellen mit Glycidol, nach einer Epichlorhydrinbehandlung (Injektion) von Ratten und auf Blutproben von Rauchern (Hindsø Landin et al., 1996; 1999). Bei einer Dosierung von 40 mg Epichlorhydrin/kg KG wurde nach 30 Tagen ein Adduktlevel von 44 pmol/g Globin ermittelt. Bei Rauchern (15-20 Zigaretten/Tag) lag der Adduktlevel zwischen 6,5 und 11,2 pmol/g Globin. Bei Personen mit unbekannter Exposition bestimmte Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 2000) Adduktlevel von 1-2 pmol/g Globin. Um die Hypothese zu prüfen, ob es für den Hintergrundlevel einen Zusammenhang mit Glycidol oder verwandten Verbindungen aus erhitzten Nahrungsmitteln gibt, führten die Autoren eine Fütterungsstudie (Ratte) mit gebratenem Futter durch. Es kam zu einem Anstieg des N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin Levels von 0,8-1,3 pmol/g Globin (Kontrolltiere) auf 1,0-1,8 pmol/g Globin (Testgruppe). Für den Anstieg im Adduktlevel wurden verschiedene Gründe diskutiert, wie z.B. die Bildung von alkylierenden Epoxiden oder Glycidol (-intermediaten) durch das Erhitzen der Nahrung. Hindsø Landin (Hindsø Landin et al., 1997) berichtete auch über das Vorkommen von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Globin von mit Epichlorhydrin exponierten Arbeitern (3-58 pmol/g Globin) und die Autoren verglichen diese Werte mit verschiedenen nicht exponierten

Gruppen (3-40 pmol/g Globin, 0,5-11 pmol/g Globin). Das Auftreten von Hämoglobinaddukten nach Epichlorhydrinexposition wurde auch von Bader (Bader et al., 2009) berichtet, allerdings bestimmten diese Autoren das N-(3-Chlor-2-hydroxypropyl)valin und nicht das von Hindsø Landin beschriebene N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin.

Untersuchungen zum Auftreten des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Menschen führte Honda (Honda et al., 2011) durch. Die Autoren verglichen den Adduktlevel von Personen, die über 120 Tage mit DAG Öl (Diacylglycerin reiches Speiseöl, für das eine Glycidyl-Ester Konzentration von ca. 269 µg/g berichtet wurde) zubereitete Nahrung in der Kantine aufgenommen hatten, mit Personen, die dieses Öl nicht häufig zu sich nahmen. Im Ergebnis wurde ein Adduktlevel von $3,5 \pm 1,9$ pmol/g Globin (Öl-Konsumierende) und $7,1 \pm 3,1$ pmol/g Globin (nicht Öl-Konsumierende) gefunden. Die Autoren schlussfolgerten, dass es zu keiner ansteigenden Exposition mit Glycidol in der Personengruppe kommt, die das Glycidyl-Ester enthaltende DAG Öl aufgenommen hatte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen, dass es nach der Exposition von Ratten mit Glycidol sowie auch nach Glycidyl-Ester Gabe zur Bildung des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin kommt. Die in der Literatur angegebenen Daten zum Hämoglobinadduktlevel sind mit den Werten, die in der vorliegenden Tierstudie erhalten wurden, aufgrund der unterschiedlichen Expositionsszenarien nicht vergleichbar.

Des Weiteren wurde die Ausscheidung des Konjugates N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Urin der Tiere nach Glycidyl-Ester- und Glycidol-Gabe untersucht.

Im Zeitraum von 0-8 h nach der Applikation sind die höchsten Konzentrationen zu beobachten. Das trifft sowohl für die Tiere mit Glycidyl-Ester Applikation (1053 µg/mL bzw. 1138 µg/mg Creatinin) als auch auf die Tiere mit Glycidol Applikation (1310 µg/mL bzw. 1451 µg/mg Creatinin) zu, wobei sich die Einzeltiere sowohl im ausgeschiedenen Urinvolumen als auch der gemessenen Konzentration (relative Standardabweichungen 38-51%) stark unterscheiden.

Vom ersten Sammelintervall (0-8 h Urin) zur zweiten Sammelperiode (8-24 h Urin) steigt bei beiden Gruppen der im Gesamturin ausgeschiedene Gehalt an N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein an, von 4,8 % auf 8,0 % nach Glycidyl-Ester Gabe bzw. von 5,4% auf 7,8 % nach Glycidol Gabe, im Zeitraum von 24-48 h wird kaum noch Konjugat ausgeschieden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum (0-48 Stunden nach Substanzgabe) werden 13,7 % bzw. 14,0 % der verabreichten Dosis als N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Urin der Tiere wiedergefunden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die verabreichten Prüfsubstanzen (Glycidyl-Ester/Glycidol) nach Metabolisierung im Stoffwechsel als Konjugat in gleichem Maße mit dem Urin der Tiere ausgeschieden werden. Das stützt die Annahme, dass es zu einer vollständigen Hydrolyse des Glycidyl-Esters im Intestinaltrakt kommt und Glycidol einer weiteren und schnellen Metabolisierung unterliegt.

Die Hydroxyalkyl-Mercaptursäuren (N-Acetyl-cystein-S-Konjugate) sind geeignete Biomarker und werden verwendet, um eine Exposition mit alkylierenden Substanzen (z.B. Acrolein, 1,3-Butadien, Propylenoxid, Glycidol) nachzuweisen. Sie werden im Urin ausgeschieden und entstehen durch die Reaktion elektrophiler Stoffe mit Glutathion. Die Konjugationsreaktion mit Glutathion schützt die Zelle vor elektrophilen Stoffen.

Nach der Exposition mit radioaktiv markiertem Glycidol in einer Tierstudie (Nomeir et al., 1995) wurde gefunden, dass 40-48 % der ¹⁴C-Glycidol-Aquivalente innerhalb von 72 h im Urin ausgeschieden werden. Den Nachweis der Urinkonjugate S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein und N-Acetyl-S-(2,3-Di-hydroxypropyl)cystein (DHPMA) nach intraperitonealer Gabe von Glycidol bei der Ratte und Maus erbrachte Jones (Jones et al., 1975) bei Untersuchungen zum Metabolismus von u.a. 3-Chlor-1,2-propandiol.

In einer Studie von Eckert (Eckert et al., 2011) wurden Urinproben der Bevölkerung auf das Vorkommen von Mercaptursäuren, als Metabolite von alkylierenden Reagenzien untersucht. Im Urin wurde das N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein mit einer Konzentration von 206 µg/g Creatinin (Nichtraucher) und 217 µg/g Creatinin (Raucher) bestimmt, was im Vergleich zu den berichteten Werten anderer Hydroxyalkyl-Mercaptursäuren einem relativ hohem Backgroundlevel entspricht. Als mögliche Ursachen dafür wurden 3-MCPD und die Fettsäureester von 3-MCPD und Glycidol in Nahrungsmitteln diskutiert.

Die in der vorliegenden Studien gewonnenen Erkenntnisse bestätigen, dass es nach der Exposition von Ratten mit Glycidol sowie auch nach Glycidyl-Ester Gabe zur Bildung der Mercaptursäure N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein kommt. Ein Vergleich der Literaturdaten mit den Werten aus dieser Studie ist aufgrund der nicht vergleichbaren Expositionsszenarien nicht möglich.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens wurden umfangreiche Daten zum Vorkommen spezifischer Biomarker nach oraler Applikation von Glycidyl-Ester und Glycidol im Tierversuch generiert. Aufgrund der äquimolaren Dosierung von Glycidyl-Ester und Glycidol sind vergleichende Betrachtungen zum Verhalten im Organismus möglich.

Es wird deutlich, dass der Hämoglobinadduktlevel (N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin) im Globin nach Verabreichung von Glycidyl-Ester und Glycidol ähnlich ist, mit einer leichten

Verzögerung bei Applikation des Glycidyl-Esters. Auch die Ausscheidung der Mercaptursäure (N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein) im Urin der Tiere ist bei beiden Prüfsubstanzen ähnlich und liegt bei 14 % der verabreichten Dosis. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es bei der Darmpassage zu einer vollständigen Spaltung des Glycidyl-Esters kommt, wobei intermediär Glycidol freigesetzt wird, das sich genau so verhält, wie oral appliziertes Glycidol.

Im radioaktiven Teil der hier vorgestellten Studie wurde virtuell doppelt-markiertes Glycidylpalmitat eingesetzt, wobei sich die ^{14}C -Markierung am C2 des Glycidols und die ^3H -Markierung in Position 9 und 10 der Palmitinsäure befand. Durch den Vergleich der Kinetik beider Isotope sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob und in welchem Ausmaß eine Spaltung des Esters erfolgt. Aufgrund der fehlenden Übereinstimmung in der Toxikokinetik der ^{14}C - und der ^3H -Aktivitäten ist davon auszugehen, dass der überwiegende Anteil des bioverfügbaren Glycidylpalmitats (> 90%) in Glycidol und Palmitinsäure gespalten wird. Die Kinetik der ^{14}C -Aktivität spiegelt wahrscheinlich die Kinetik des freigesetzten Glycidols wieder. Dies legt auch der Vergleich mit den von Nomeir (Nomeir et al., 1995) publizierten Daten nahe.

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie liefern neue Erkenntnisse zum Verhalten von Glycidyl-Estern und Glycidol im Organismus nach oraler Applikation in zwei Tierstudien. Die neuen Daten zum kinetischen Verhalten der Glycidyl-Fettsäureester im Organismus und die vorhandene Datenbasis zum Vorkommen der Glycidylestern in raffinierten Speisefetten und daraus hergestellten Produkten, insbesondere in Säuglingsmilchnahrung, ermöglichen eine wissenschaftlich basierte Abschätzung des Risikos der Bevölkerung gegenüber Glycidyl-Fettsäureestern aus Nahrungsmitteln.

Klärung noch offener Fragen und weiterer Forschungsbedarf

Zur Bestätigung der gefundenen Ergebnisse wäre es empfehlenswert, eine Langzeitfütterungsstudie mit einem raffiniertem Speisefett/Öl durchzuführen, welches hohe Konzentrationen von Glycidyl-Estern enthält. Eine solche Studie würde zeigen, in welchem Maße es unter realen Bedingungen zu einem Anstieg der spezifischen Biomarker kommt. Ggf. sollte dafür noch eine zweite Tierspezies eingesetzt werden (z.B. Primaten), um zu zeigen, ob es Spezies spezifische Unterschiede im Verdauungssystem gibt.

3.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie erweitern den Wissensstand zur Bioverfügbarkeit von Glycidyl-Fettsäureestern im Organismus. Sie stellen eine breite Datenbasis für Entscheidungen im Bereich der Lebensmittelsicherheit zur Verfügung und dienen zur fundierten Risikobewertung von Glycidyl-Estern durch die nationalen Behörden, wie das Bundesinstitut 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 Glycidyl-Fettsäureestern im Magen-Darmtrakt und zur Absorption und Verteilung im Organismus nach oraler Verabreichung von Glycidyl-Ester in zwei Tierstudien generiert.

Zur Klärung dieser wichtigen Frage wurden zwei Vorgehensweisen eingeschlagen. Zum einen sollte auf chemisch-analytischen Wege anhand des Auftretens geeigneter Biomarker gezeigt werden, ob es intermediär durch metabolische Spaltung des Glycidyl-Esters zum Auftreten von Glycidol kommt, zum anderen sollte durch eine ADME-Studie mit radioaktiv markierten Glycidyl-Fettsäureestern ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Doppelmarkierung) eine quantitative Bewertung der Verteilung im Organismus möglich sein.

In der ersten Tierstudie mit Wistar-Ratten wurde nach oraler Applikation von Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG) und von Glycidol (50 mg/kg KG) in Maisöl (Referenz) nach jeweils äquimolarer Dosierung das Auftreten spezifischer Biomarker, als Maß für die Metabolisierung des Glycidyl-Esters zu Glycidol im Organismus, zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen.

Für das Hämoglobinaddukt (N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin) im Blut wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation (4 h, 8 h, 12 h, 48 h) Konzentrationen von 875 pmol/100 mg Globin bis 1450 pmol/100mg (nach Glycidyl-Ester Gabe) und zwischen 1225 pmol/100 mg Globin und 1479 pmol/100 mg Globin (nach Glycidol Gabe) beobachtet. Statistische Untersuchungen zeigten, dass es bezüglich des Hämoglobinadduktlevels zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gibt, denen Glycidyl-Ester bzw. Glycidol verabreicht wurde. Jedoch innerhalb der Gruppe der Tiere, denen Glycidyl-Ester verabreicht wurde, gibt es für die N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin Konzentrationen im Globin zwischen den 4 h- und 48 h-Werten signifikante Unterschiede auf dem 0,1 % Niveau.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Freisetzungsgrad von Glycidol ins Blut bei beiden Gruppen ähnlich ist, was für die Annahme spricht, dass es zu einer vollständigen Spaltung des Glycidyl-Esters kommt, mit einer leichten zeitlichen Verzögerung der Absorption aufgrund der intestinalen Hydrolyse.

Die Urinuntersuchungen zur Ausscheidung des Konjugates N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein zeigten, dass die höchsten Konzentrationen im Zeitraum von 0-8 h auftreten. Das trifft sowohl für die Tiere mit Glycidyl-Ester Applikation (1053 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 1138 $\mu\text{g}/\text{mg}$)

Creatinin) als auch auf die Tiere mit Glycidol Applikation (1310 µg/mL bzw. 1451 µg/mg Creatinin) zu. Über den gesamten Untersuchungszeitraum (0-48 Stunden nach Substanzgabe) werden bei den Tieren mit Glycidyl-Ester Applikation 13,7 % und bei den Tieren mit Glycidol Applikation 14 % der verabreichten Dosis als N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein ausgeschieden.

Die Ergebnisse der Urinuntersuchungen zeigten, dass die Absorption von Glycidol bei beiden Gruppen ähnlich ist, was die Annahme stützt, dass es zu einer 100 %-igen Hydrolyse des Glycidyl-Esters im Intestinaltrakt kommt.

In einer radioaktiven Studie wurden 8 Wistar-Ratten mit 209,4 mg/kg KG radioaktiv markiertem (2-¹⁴C, 9,10-³H) Glycidylpalmitinsäureester oral behandelt und es wurde die Exkretion, Organverteilung und Blutkinetik für beide Isotope untersucht. Die augenfälligen Unterschiede in der ¹⁴C- und der ³H-Kinetik bestätigen die Annahme einer nahezu vollständigen Hydrolyse des Glycidyl-Esters nach intestinaler Absorption.

5 Literaturverzeichnis

- Bader, M., Rosenberger, W., Gutzki, F. M., and Tsikas, D., 2009, Quantification of N-(3-chloro-2-hydroxypropyl)valine in human haemoglobin as a biomarker of epichlorohydrin exposure by gas chromatography-tandem mass spectrometry with stable-isotope dilution: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 877, p. 1402-1415.
- Bakhiya, N., Abraham, K., Gurtler, R., Appel, K. E., and Lampen, A., 2011, Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food: *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 55, p. 509-521.
- Belov, V. N., Müller, M., Ignatenko, O., Hallier, E., and de Meijere, A., 2005, Facile Access to Isotopically Labelled Valylleucyl Anilides as Biomarkers for the Quantification of Hemoglobin Adducts to Toxic Electrophiles: *Eur. J. Org. Chem.*, v. 2005, p. 5094-5099.
- BfR, 2009a, Erste Einschätzung zur Bewertung der in raffinierten pflanzlichen Fetten nachgewiesenen Gehalte von Glycidol-Fettsäureestern: Stellungnahme Nr. 007/2009 des BfR vom 10. März 2009.
- Boogaard, P. J., 2002, Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 778, p. 309-322.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft, S. z. P. G. A., 2000, "MAK- und BAT-Werte-Liste: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte". Wiley-VCH, Weinheim 2000, 30. Lieferung.
- Eckert, E., Drexler, H., and Goen, T., 2010, Determination of six hydroxyalkyl mercapturic acids in human urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS): *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 878, p. 2506-2514.
- Eckert, E., Schmid, K., Schaller, B., Hiddemann-Koca, K., Drexler, H., and Goen, T., 2011, Mercapturic acids as metabolites of alkylating substances in urine samples of German inhabitants: *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v. 214, p. 196-204.
- Europäisches Parlament, 2008, Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, Annex VI , Tabelle 3.1.
- Habermeyer, M., Guth, S., and Eisenbrand, G., 2011, Identification of gaps in knowledge concerning toxicology of 3-MCPD and glycidol esters: *Eur. J. Lip. Sci. Technol.*, v. 113, p. 314-318.
- Hindsø Landin H., Osterman-Golkar, S., Zorcec, V., and Tornqvist, M., 1996, Biomonitoring of epichlorohydrin by hemoglobin adducts: *Anal. Biochem.*, v. 240, p. 1-6.
- Hindsø Landin H., Grummt, T., Laurent, C., and Bates, A., 1997, Monitoring of occupational exposure to epichlorohydrin by genetic effects and hemoglobin adducts: *Mutat. Res.*, v. 381, p. 217-226.
- Hindsø Landin H., Segerback, D., Damberg, C., and Osterman-Golkar, S., 1999, Adducts with haemoglobin and with DNA in epichlorohydrin-exposed rats: *Chem. Biol. Interact.*, v. 117, p. 49-64.

- Hindsø Landin H., Tareke, E., Rydberg, P., Olsson, U., and Tornqvist, M., 2000, Heating of food and haemoglobin adducts from carcinogens: possible precursor role of glycidol: Food Chem. Toxicol., v. 38, p. 963-969.
- Honda, H., Onishi, M., Fujii, K., Ikeda, N., Yamaguchi, T., Fujimori, T., Nishiyama, N. and Kasamatsu, T., 2011, Measurement of glycidol hemoglobin adducts in humans who ingest edible oil containing small amounts of glycidol fatty acid esters: Food Chem. Toxicol., v. 49, p. 2536-2540.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Some industrial chemicals., 2000, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Lyon, France 2000, p. 469-486.
- Jones, A.R., 1975, The Metabolism of 3-Chloro-, 3-Bromo- and 3-Iodopropan-1,2-diol in Rats and Mice: Xenobiotica, v. 5, no 3, p. 155-165.
- Jones, A.R., Milton, D.H. and Murcott, C., 1978, The oxidative Metabolism of α -Chlorohydrin in the Male Rat and the Formation of Spermatocoeles, no. 9, 573-582.
- Lynch, B.S. Bryant, D.B., Hook, G.J., Nestmann, E.R. and Munro, L.C.: Carcinogenicity of monochloro-1,2-propandiol (alpha-chlorohydrin, 3-MCPD). Int. J. Toxicol., 1998, 17, 947-76.
- Masukawa, Y., Shiro, H., Nakamura, S., Kondo, N., Jin, N., Suzuki, N., Ooi, N. and Kudo, N., 2010, A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils: J. Oleo. Sci., v. 59, p. 81-88.
- Müller, M., Belov, V., de Meijere, A., Bünger, J., Emmert, B., Heutelbeck, A. and Hallier, E., 2005, Entwicklung eines neuen Biomonitoringverfahrens zur Bestimmung des Hämoglobinadduktes N-(2,3-Dihydroxypropyl)-Valin nach Epichlorhydrinexposition: Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 45, 531-533.
- Nomeir, A. A., Silveira, D. M., Ferrala, N. F., Markham, P. M., McComish, M. F., Ghanayem, B. I. and Chadwick, M., 1995, Comparative disposition of 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) in rats following oral and intravenous administration: J. Toxicol. Environ. Health, v. 44, p. 203-217.
- NTP, 1990, Toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS No. 556-52-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies) , Technical Report Series No. 374, NIH Publication No. 90-2829. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.
- Ogawa, M., Oyama, T., Isse, T., Yamaguchi, T., Murakami, T., Endo, Y. and Kawamoto, T., 2006, Hemoglobin adducts as a Marker of Exposure to Chemical Substances, Especially PRTR Class I Designated Chemical Substances: J. Occup. Health, 48, p. 314-328.
- Paulsson, B., Athanassiadis, I., Rydberg, P. and Tornqvist, M., 2003, Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis: Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 17, p. 1859-1865.
- UBA, Humanbiomonitoring Kommission, 2004, Verwendung von Hämoglobinaddukten für das Monitoring von Belastungen und Beanspruchungen durch gentoxische Stoffe: Umweltmed. Forsch. Prax. 9 (1), 47-52.

van Sittert, N. J., 1996, N-2-Cyanoethyl-Valin, N-2-Hydroxyethyl-Valin, N-Methyl-Valin (zum Nachweis einer Belastung/Beanspruchung durch Acrylnitril, Ethylenoxid sowie methylierende Substanzen) , *in* Hartwig, A., editor, Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Weinheim, Wiley-VCH, p. 1-21.

Weißhaar, R. and Perz, R., 2010, Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils: Eur. J. Lip. Sci. Technol., v. 112, p. 158-165.

Anhang I A

Übersicht: Tiergewichte, Urinmasse, Urindichte, Creatiningehalte

Tabelle A1: Tiergewichte, Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer	Körpergewicht (g) Tag 0	Körpergewicht (g) Tag 1	Körpergewicht (g) Tag 2	Kadavergewicht (g)		
1 Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg)	1101	251.3			257.7		
	1102	255.6			257.3		
	1103	262.8			261.3		
	1104	270.0			269.7		
	1105	270.5			269.5		
	1106	250.9			259.6		
	1107	267.9			272.8		
	1108	266.8			268.2		
	1109	269.4			295.2	294.5	
	1110	270.0			297.0	295.3	
	1111	270.6			295.4	294.6	
	1112	271.3			295.5	294.3	
	1113	265.6				266.9	270.1
	1114	283.9				310.5	310.4
	1115	261.8				297.6	297.5
	1116	274.3				312.0	310.5
2 Glycidol (50 mg/kg)	2101	249.9			253.4		
	2102	250.0			257.5		
	2103	258.9			266.0		
	2104	251.5			262.2		
	2105	260.3			260.0		
	2106	262.9			267.0		
	2107	267.7			271.0		
	2108	264.9			263.1		
	2109	269.5			300.4	300.3	
	2110	270.9			294.0	293.6	
	2111	264.0			286.2	285.8	
	2112	270.0			293.4	291.4	
	2113	273.8				306.6	307.3
	2114	272.7				313.4	309.8
	2115	269.3				313.6	306.9
	2116	274.7				304.3	303.3
3 Vehikel	3101	258.6			296.3		
	3102	272.0			307.7	306.9	

Tabelle A2: Urinvolumina, Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer	Urinmasse (g) 0 - 8 h	Urinmasse (g) 8 - 24 h	Urinmasse (g) 24 - 48 h
1 Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1101			
	1102			
	1103			
	1104			
	1105	1.2		
	1106	1.2		
	1107	4.6		
	1108	2.9		
	1109	1.0	8.9	
	1110	0.8	21.0	
	1111	2.4	13.8	
	1112	2.7	7.1	
	1113	1.6	6.6	12.1
	1114	2.2	13.0	17.6
	1115	0.8	7.1	10.7
	1116	4.6	12.1	22.1
2 Glycidol (50 mg/kg)	2101			
	2102			
	2103			
	2104			
	2105	1.0		
	2106	1.4		
	2107	1.6		
	2108	1.2		
	2109	4.7	12.0	
	2110	1.9	13.5	
	2111	1.5	9.5	
	2112	1.1	9.3	
	2113	1.6	12.0	22.1
	2114	5.1	13.6	19.9
	2115	0.9	11.2	16.3
	2116	2.0	10.9	18.1
3 Vehikel	3101	2.8	11.5	20.0
	3102	3.0	12.6	18.3

Urindichte:

Täglich wurden die Dichten der Urine bestimmt und ein Mittelwert von 1,05 g/mL berechnet.

Weiterführende Berechnungen wurden mit dem Urinvolumen durchgeführt.

Tabelle A3: Creatininkonzentrationen im Rattenurin, Dosierung: Glycidylpalmitin-säureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer	Creatinin (mmol/L Urin) 0 - 8 h	Creatinin (mmol/L Urin) 8 - 24 h	Creatinin (mmol/L Urin) 24 - 48 h
1 Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1101			
	1102			
	1103			
	1104			
	1105	7,64		
	1106	11,84		
	1107	4,89		
	1108	5,37		
	1109	11,49	7,19	
	1110	10,85	2,96	
	1111	7,57	4,47	
	1112	5,74	6,89	
	1113	10,44	6,66	7,14
	1114	3,67	5,00	3,57
	1115	13,14	8,06	6,51
	1116	5,61	4,46	2,69
2 Glycidol (50 mg/kg)	2101			
	2102			
	2103			
	2104			
	2105	11,75		
	2106	8,90		
	2107	7,61		
	2108	11,35		
	2109	3,23	4,36	
	2110	7,36	3,60	
	2111	7,53	5,54	
	2112	7,90	4,85	
	2113	13,12	3,71	3,10
	2114	2,85	4,00	3,52
	2115	9,16	7,63	4,15
	2116	8,59	3,58	3,71
3 Vehikel	3101	3,26	4,87	5,01
	3102	7,24	4,08	3,58

Anhang I B

Einzelergebnisse, Mittelwerte, Standardabweichungen

Tabelle B1: Ergebnisse Hämoglobinaddukte - Konzentration von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin im Rattenglobin 4 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG, n=4), Glycidol (50 mg/kg KG, n=4). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer (Blutnahmezeitpunkt)	DHPV pmol / 100 mg Globin	MW Gruppe pmol DHPV/ 100 mg Globin	SD Gruppe pmol DHPV/ 100 mg Globin	RSD Gruppe %
1 Glycidyl- palmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1101 (4h)	903	875	66,5	7,6
	1102 (4h)	935			
	1103 (4h)	883			
	1104 (4h)	781			
	1105 (8h)	966	1081	124	11,5
	1106 (8h)	1024			
	1107 (8h)	1255			
	1108 (8h)	1078			
	1109 (24h)	1322	1339	44,6	3,3
	1110 (24h)	1286			
	1111 (24h)	1388			
	1112 (24h)	1361			
	1113 (48h)	1685	1450	211	14,5
	1114 (48h)	1236			
	1115 (48h)	1565			
	1116 (48h)	1313			
2 Glycidol (50 mg/kg)	2101 (4h)	1164	1270	261	20,6
	2102 (4h)	1552			
	2103 (4h)	960			
	2104 (4h)	1404			
	2105 (8h)	1285	1225	181	14,8
	2106 (8h)	1189			
	2107 (8h)	1429			
	2108 (8h)	998			
	2109 (24h)	1557	1479	95,7	6,5
	2110 (24h)	1344			
	2111 (24h)	1534			
	2112 (24h)	1483			
	2113 (48h)	1119	1232	198	16,1
	2114 (48h)	1511			
	2115 (48h)	1234			
	2116 (48h)	1066			
Vehikel	3101 (48h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (48h)	< BG			

Tabelle B2: Ergebnisse Urinkonjugate - Konzentration von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer (Zeitintervall Urinsammlung)	DHPMA µg/mL Urin	MW Gruppe µg/mL Urin	SD Gruppe µg/mL Urin	RSD Gruppe %
1 Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1105 (0-8h)	497	1053	532	50,6%
	1106 (0-8h)	1503			
	1107 (0-8h)	646			
	1108 (0-8h)	873			
	1109 (0-8h)	1095			
	1110 (0-8h)	1103			
	1111 (0-8h)	859			
	1112 (0-8h)	901			
	1113 (0-8h)	1655			
	1114 (0-8h)	449			
	1115 (0-8h)	2291			
	1116 (0-8h)	762			
	1109 (8-24h)	475	327	105	32,0%
	1110 (8-24h)	197			
	1111 (8-24h)	194			
	1112 (8-24h)	319			
	1113 (8-24h)	461			
	1114 (8-24h)	328			
	1115 (8-24h)	356			
	1116 (8-24h)	289			
1113 (24-48h)	29,1	24,0	5,6	23,3%	
1114 (24-48h)	19,8				
1115 (24-48h)	28,6				
1116 (24-48h)	18,6				
2 Glycidol (50 mg/kg)	2105 (0-8h)	2257	1310	503	38,4%
	2106 (0-8h)	1286			
	2107 (0-8h)	1018			
	2108 (0-8h)	2160			
	2109 (0-8h)	677			
	2110 (0-8h)	1331			
	2111 (0-8h)	1162			
	2112 (0-8h)	1365			
	2113 (0-8h)	1595			
	2114 (0-8h)	615			
	2115 (0-8h)	1041			
	2116 (0-8h)	1208			
	2109 (8-24h)	228	291	83,2	28,6%
	2110 (8-24h)	206			
	2111 (8-24h)	387			
	2112 (8-24h)	436			
	2113 (8-24h)	223			
2114 (8-24h)	255				
2115 (8-24h)	318				
2116 (8-24h)	273				
2113 (24-48h)	11,9	17,0	3,9	23,2%	
2114 (24-48h)	19,8				
2115 (24-48h)	20,4				
2116 (24-48h)	15,8				
Vehikel	3101 (0-8h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (0-8h)	< BG			
	3101 (8-24h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (8-24h)	< BG			
	3101 (24-48h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (24-48h)	< BG			

Tabelle B3: Ergebnisse Urinkonjugate - Konzentration von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer (Zeitintervall Urinsammlung)	DHPMA µg/mg Creatinin	MW Gruppe µg/mg Creatinin	SD Gruppe µg/mg Creatinin	RSD Gruppe %
1 Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1105 (0-8h)	575	1138	282	24,7%
	1106 (0-8h)	1122			
	1107 (0-8h)	1168			
	1108 (0-8h)	1437			
	1109 (0-8h)	842			
	1110 (0-8h)	898			
	1111 (0-8h)	1003			
	1112 (0-8h)	1388			
	1113 (0-8h)	1401			
	1114 (0-8h)	1080			
	1115 (0-8h)	1541			
	1116 (0-8h)	1200			
	1109 (8-24h)	584	515	101	19,6%
	1110 (8-24h)	588			
	1111 (8-24h)	384			
	1112 (8-24h)	409			
	1113 (8-24h)	612			
	1114 (8-24h)	580			
	1115 (8-24h)	390			
	1116 (8-24h)	573			
1113 (24-48h)	36,0	46,3	11,4	24,6%	
1114 (24-48h)	49,0				
1115 (24-48h)	38,9				
1116 (24-48h)	61,1				
2 Glycidol (50 mg/kg)	2105 (0-8h)	1698	1451	302	20,8%
	2106 (0-8h)	1277			
	2107 (0-8h)	1183			
	2108 (0-8h)	1682			
	2109 (0-8h)	1853			
	2110 (0-8h)	1599			
	2111 (0-8h)	1365			
	2112 (0-8h)	1527			
	2113 (0-8h)	1075			
	2114 (0-8h)	1907			
	2115 (0-8h)	1005			
	2116 (0-8h)	1243			
	2109 (8-24h)	462	565	132	23,3%
	2110 (8-24h)	507			
	2111 (8-24h)	618			
	2112 (8-24h)	795			
	2113 (8-24h)	530			
	2114 (8-24h)	563			
2115 (8-24h)	368				
2116 (8-24h)	675				
2113 (24-48h)	34,0	41,2	6,9	16,7%	
2114 (24-48h)	49,7				
2115 (24-48h)	43,4				
2116 (24-48h)	37,6				
Vehikel	3101 (0-8h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (0-8h)	< BG			
	3101 (8-24h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (8-24h)	< BG			
	3101 (24-48h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (24-48h)	< BG			

Tabelle B4: Ergebnisse Urinkonjugate - Gehalte von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)-cystein im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Gruppe (Dosis)	Tiernummer (Zeitintervall Urinsammlung)	DHPMA µg/ Gesamturin	MW Gruppe µg/ Gesamturin	SD Gruppe µg/ Gesamturin	RSD Gruppe %
1 Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1105 (0-8h)	626	2043	960	47,0
	1106 (0-8h)	1894			
	1107 (0-8h)	3122			
	1108 (0-8h)	2658			
	1109 (0-8h)	1150			
	1110 (0-8h)	926			
	1111 (0-8h)	2165			
	1112 (0-8h)	2556			
	1113 (0-8h)	2781			
	1114 (0-8h)	1036			
	1115 (0-8h)	1925			
	1116 (0-8h)	3679			
	1109 (8-24h)	4438	3495	855	24,5
	1110 (8-24h)	4339			
	1111 (8-24h)	2812			
	1112 (8-24h)	2378			
	1113 (8-24h)	3194			
	1114 (8-24h)	4477			
	1115 (8-24h)	2651			
	1116 (8-24h)	3672			
	1113 (24-48h)	370	372	45,2	12,1
	1114 (24-48h)	366			
	1115 (24-48h)	322			
	1116 (24-48h)	432			
2 Glycidol (50 mg/kg)	2105 (0-8h)	2371	2299	712	31,0
	2106 (0-8h)	1890			
	2107 (0-8h)	1711			
	2108 (0-8h)	2722			
	2109 (0-8h)	3342			
	2110 (0-8h)	2656			
	2111 (0-8h)	1831			
	2112 (0-8h)	1576			
	2113 (0-8h)	2680			
	2114 (0-8h)	3292			
	2115 (0-8h)	984			
	2116 (0-8h)	2538			
	2109 (8-24h)	2872	3403	542	15,9
	2110 (8-24h)	2926			
	2111 (8-24h)	3861			
	2112 (8-24h)	4259			
	2113 (8-24h)	2806			
	2114 (8-24h)	3640			
	2115 (8-24h)	3737			
	2116 (8-24h)	3127			
2113 (24-48h)	277	335	60,7	18,1	
2114 (24-48h)	414				
2115 (24-48h)	349				
2116 (24-48h)	300				
Vehikel	3101 (0-8h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (0-8h)	< BG			
	3101 (8-24h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (8-24h)	< BG			
	3101 (24-48h)	< BG	< BG	< BG	< BG
	3102 (24-48h)	< BG			

Tabelle B5: Ergebnisse Urinkonjugate - Wiederfindung in % (in Bezug zur verabreichten Dosis) von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin 0 - 48 h nach Substanzgabe. Dosierung: Glycidylpalmitinsäureester (209,4 mg/kg KG), Glycidol (50 mg/kg KG). Design der Tierstudie siehe Tabelle 2.1

Substanz (Dosis)	Tiernummer	Prozentualer Anteil DHPMA an der Gesamtdosis [%]			
		0-8 h	8-24 h	24-48 h	Gesamt*
Glycidylpalmitin- säureester (209,4 mg/kg)	1105	1,43			k.A.
	1106	4,76			k.A.
	1107	7,48			k.A.
	1108	6,37			k.A.
	1109	2,63	10,15		12,78
	1110	2,12	9,92		12,04
	1111	4,95	6,43		11,38
	1112	5,85	5,44		11,29
	1113	6,66	7,65	0,89	15,20
	1114	2,27	9,80	0,80	12,86
	1115	4,61	6,35	0,77	11,74
	1116	8,42	8,4	0,99	17,80
Glycidol (50 mg/kg)	2105	5,68			k.A.
	2106	4,53			k.A.
	2107	4,10			k.A.
	2108	6,52			k.A.
	2109	7,64	6,57		14,21
	2110	6,07	6,69		12,77
	2111	4,39	9,25		13,64
	2112	3,61	9,74		13,35
	2113	6,13	6,42	0,63	13,18
	2114	7,53	8,33	0,95	16,80
	2115	2,25	8,55	0,80	11,60
	2116	5,81	7,15	0,69	13,64

* Tier 1109-1112, 2109-2112 von 0-24 h; Tier 1113-1116, 2113-2116 von 0-48 h

Anhang I C

Ausführliche Beschreibung der Analysenmethoden

2.1.2 Analytik

2.1.2.1 Bestimmung von Hämoglobinaddukten (N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin in Rattenglobin)

2.1.2.1.1 Prinzip der Methode

In Globin wird das N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin als Pentfluorphenylthiohydantoin-Derivat bestimmt. Nach Isolierung des Globins aus dem EDTA-Vollblut wird das N-substituierte Valin unter Verwendung von Pentafluorphenylisothiocyanat von der Globinkette abgespalten und gleichzeitig zum Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivat (PFPTH) umgesetzt (modifizierter Edmanabbau). Anschließend werden die Hydroxygruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

Zur Analyse der acetylierten PFPTH-Derivate wird die Kapillargaschromatographie mit einem massenselektiven Detektor im NCI Modus verwendet. Die quantitative Bestimmung erfolgt in der Globinmatrix über eine Kalibrierung nach dem Internen Standard-Verfahren (Interner Standard: N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin(¹³C₅, ¹⁵N)-leucin-anilid).

2.1.2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Glycidol (96 %) – Sigma-Aldrich (Germany); Glycidyl palmitate (98 %) – TRC Toronto (Kanada); N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-leucin-anilid (DHPVLA), N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin(¹³C₅, ¹⁵N)-leucin-anilid (DHPV*LA), - Kadem Custom Chem GmbH (Deutschland); Natriumchlorid, 2-Propanol, Salzsäure rauchend 37%, Natriumcarbonat, Ethylacetat, Hexan, Diethylether, Toluol, Ethanol - Merck (Deutschland); Formamid, Pentafluorphenylisothiocyanat, Essigsäureanhydrid, Triethylamin - Sigma-Aldrich (Germany); Natriumhydroxidplättchen, Pentan – Fluka (Germany); Methanol – Arcros Organics (Belgium); Acetonitril - J.T. Baker (Holland)

2.1.2.1.3 Herstellung der Standardlösungen und von Kalibrierstandards

Die Stammlösungen von N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin-leucin-anilid (DHPVLA), N-(2,3-Dihydroxypropyl)valin(¹³C₅, ¹⁵N)-leucin-anilid (DHPV*LA, Interner Standard) wurden in Ethanol hergestellt. Die zum Spiken des Globins eingesetzten Standardlösungen (1-10 nmol/mL) wurden durch weitere Verdünnung mit Ethanol erhalten.

Kalibrierstandards für Globin

Aus Rattenblut von unbehandelten Tieren (Poolblut, EDTA Blut) wurde Globin isoliert (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung), welches zur Herstellung von Matrixkalibrierstandards verwendet wurde. Es wurden je 50 mg Blindglobin in 3 mL Formamid gelöst und mit 50 µL 1 M Natronlauge der pH-Wert (ca. pH 9) eingestellt. Anschließend wurden die

Standardlösungen von DHPVLA und DHPV*LA (Interner Standard) hinzudotiert, um DHPV-Konzentrationen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zu erhalten. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiterverarbeitet wie die Globinproben (siehe Probenaufbereitung und Derivatisierung).

2.1.2.1.4 Probenaufbereitung und Derivatisierung

2.1.2.1.4.1 Probenahme und Hämolyse

Vollblut (9 mL) wurde in EDTA-enhaltenden Monovetten genommen. Das Blut wurde in 15 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert und 10 min bei 800 g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde verworfen. Die verbleibenden Erythrozyten wurden mit 5 mL isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend zentrifugiert (800 g) bis der Überstand klar und farblos war (i.d.R. 3x). Die Hämolyse wurde durch Zugabe von 4 mL Milliporewasser und anschließender Lagerung bei -20 °C über Nacht erreicht. Die Proben sind in diesem Zustand nicht länger als vier Wochen aufzubewahren.

2.1.2.1.4.2 Globinisolierung

Die gefrorenen Lysate wurden auf Raumtemperatur aufgetaut, äquilibriert und durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert. Um etwa 200-250 mg Globin zu gewinnen, wurden in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen 2 mL Lysat zu 12 mL 50 mM HCl in 2-Propanol gegeben. Die Proben wurden für 15 min auf dem Schüttler (600 U) inkubiert und danach 10 min bei 2500 g zentrifugiert, um die Zellreste anzutrennen. Der Überstand wurde in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und es wurden langsam 8 mL Ethylacetat hinzugegeben, um das Globin zu fällen. Die Ausfällung des Globins wurde durch Aufbewahrung der Proben bei ca. 4 °C für ca. 90 Minuten vervollständigt. Nach 10 minütigen Zentrifugieren bei 800 g wurde das überstehende Lösungsmittel verworfen und das Protein mit 10 mL Ethylacetat solange gewaschen und zentrifugiert bis der Überstand klar und farblos war (i.d.R. 3x). Anschließend wurde das Globin mit 5 mL Hexan gewaschen, zentrifugiert (800 g, 10min), und nach Abnahme des Lösungsmittelüberstandes das Proteinisolat über Nacht in Vakuumexsikkator getrocknet.

2.1.2.1.4.3 Modifizierter Edmanabbau - 1. Derivatisierung

50 mg Globin wurden in einem Zentrifugenröhrchen in Formamid gelöst und es wurden DHPV*LA (Interner Standard, 1000 pmol) und 1 M NaOH hinzugegeben. Zur Homogenisierung wurden die Proben im Ultraschallbad 30 min behandelt und es wurde anschließend PFPITC hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben über Nacht geschüttelt (400 U). Um die Derivatisierung zu vervollständigen, wurden die Proben am nächsten Tag 2 h bei 45 °C inkubiert. Die derivatisierten Proben wurden nach dem

Abkühlen mit gesättigter NaCl-Lösung versetzt und nacheinander zweimal mit Diethylether extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch Mischen für 1 min am Vortexer und Zentrifugation bei 2500 g für 10 min. Die Diethyletherphasen wurden in ein Zentrifugenglas überführt, unter N₂ (Turbovap: 35 °C, 15 psi, ca. 20 min) eingengt und der Rückstand in Toluol aufgenommen. Die Lösung wurde nacheinander mit Reinstwasser und Natriumcarbonat-Lösung (0,1 M) gewaschen und jeweils 1 min gevortext und zentrifugiert (2500 U, 5 min). Die Toluolphase wurde in ein Zentrifugenglas überführt und im N₂-Strom bis zur Trockene eingengt (Turbovap: 50 °C, 25 psi, ca. 40 min).

2.1.2.1.4.4 Acetylierung - 2. Derivatisierung

Die Acetylierung erfolgte durch Zugabe eines Acetylierungsreagenzes (12,5 % Triethylamin und 12,5 % Essigsäureanhydrid in Acetonitril) und Derivatisierung bei geöffnetem Zentrifugenglas unter Schütteln bei RT. Nach 15 min wurde das Derivatisierungsreagenz im N₂-Strom abgeblasen (Turbovap: 40 °C, 20 psi, ca. 10 min). Der Rückstand wurde in Pentan aufgenommen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und bidest. Wasser gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 2500 U). Die organische Phase wurde im N₂-Strom eingengt (Turbovap: 40 °C, 20 psi, ca. 10 min), in Toluol aufgenommen und in ein GC-Vial mit Einsatz überführt.

2.1.2.1.5 Instrumentelle Bedingungen

Gaschromatograph:	HP 6890
Software:	HP Chem Station
Injektor:	Split/Splitless, Temperatur 280 °C
Liner:	verjüngt mit Glaswatte
Injektionsvolumen:	1 µl (Gerstel MPS2)
Trennsäule:	HP5ms, Länge 30m, ID 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trärgas	Helium
Flow:	konstanter Fluss 1,2 ml/min
Temperaturprogramm:	90°C, 1 min halten, 25 °C/min 120 °C, 10°C/min bis 240°C, 25 °C/min 300 °C 10 min halten
Massenspektrometer:	MSD 5973, NCI-mode (40 % Methan)
Quellentemp.:	150 °C
Quadrupoltemp.:	106 °C
Transferlinetemp.:	280 °C
Datenaufnahme:	Messung im SIM-Mode mit 4 Massen je Komponente (siehe Tabelle 2.1.2.1)

Tabelle 2.1.2.1: Ionenspuren (Masse/Ladung, m/z) für die Datenaufnahme und -auswertung

Substanz	Target (m/z)	Qualifier (m/z)
DHPV-PFPTH	462	379, 454
DHPV*-PFPTH	468	380, 459

Ein Chromatogramm einer realen Rattenglobinprobe nach Aufarbeitung und Derivatisierung zeigt beispielhaft Abbildung 2.1.2.1.

2.1.2.1.6 Kalibrierung, Bestimmungsgrenze, Validierungsparameter

Unter Verwendung der Matrixkalibrierstandards wurde eine Kalibrierung nach der „Internen Standard-Methodik“ für den Konzentrationsbereich von 100-2000 pmol /50 mg Globin erstellt (R^2 0,9988). Die Abbildung 2.1.2.2 zeigt die Kalibriergerade für das DHPV (PFPTH-Derivat) in Globin.

Die Bestimmungsgrenzen werden von den eingesetzten Globinmengen und dem Probenendvolumen bestimmt. Für Globin kann unter optimalen Bedingungen eine Bestimmungsgrenze von 20 pmol/100 mg Globin erreicht werden. Unter Routinebedingungen hat sich eine Bestimmungsgrenze von 100 pmol/50 mg Globin bewährt. Diese Grenze ist nicht das analytisch erreichbare Limit, sondern wird bestimmt durch Untergrundbelastungen aus Reagenzien und Materialien.

Zur Bestimmung der Präzision wurden Blindglobinproben mit DHPVLA dotiert und an einem Tag bzw. an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und gemessen. Für Konzentrationen von 200 und 1000 pmol/50 mg ergaben sich bei Messungen innerhalb der Serie (jeweils n=6) bzw. von Tag zu Tag (jeweils n=6) relative Standardabweichungen von 2-6 % und relative Wiederfindungen von 85-104 %.

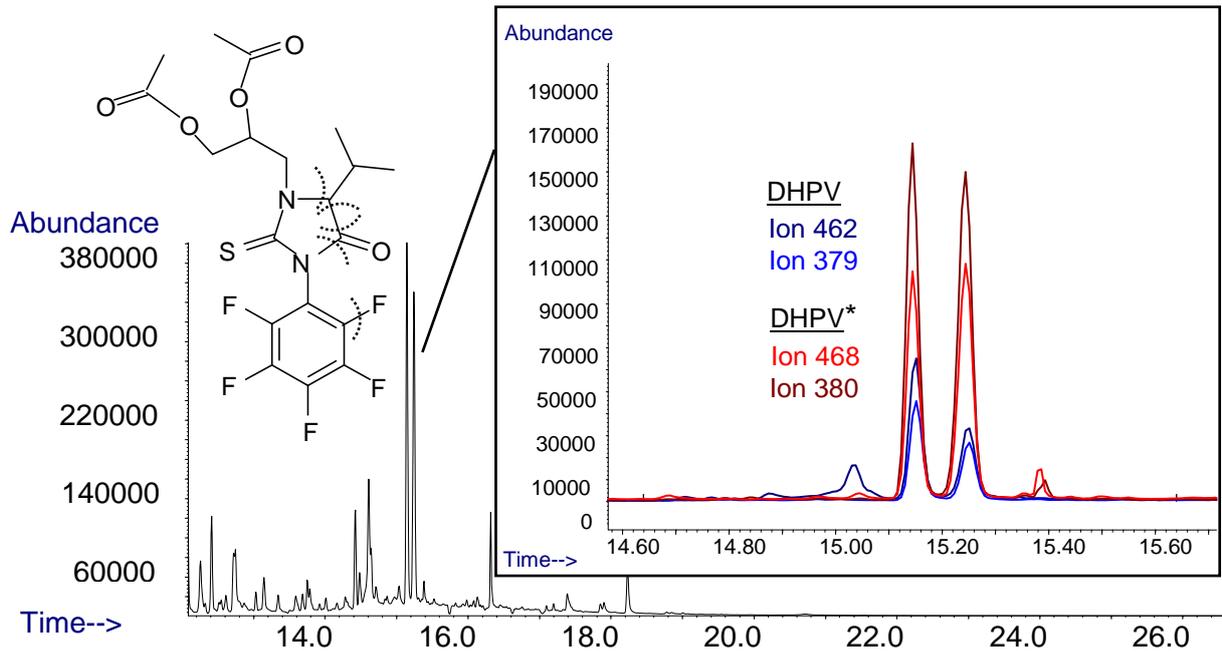


Abbildung 2.1.2.1: Ionenchromatogramm einer realen Rattenglobinprobe nach Aufarbeitung und Derivatisierung (PFPTH-Derivat)

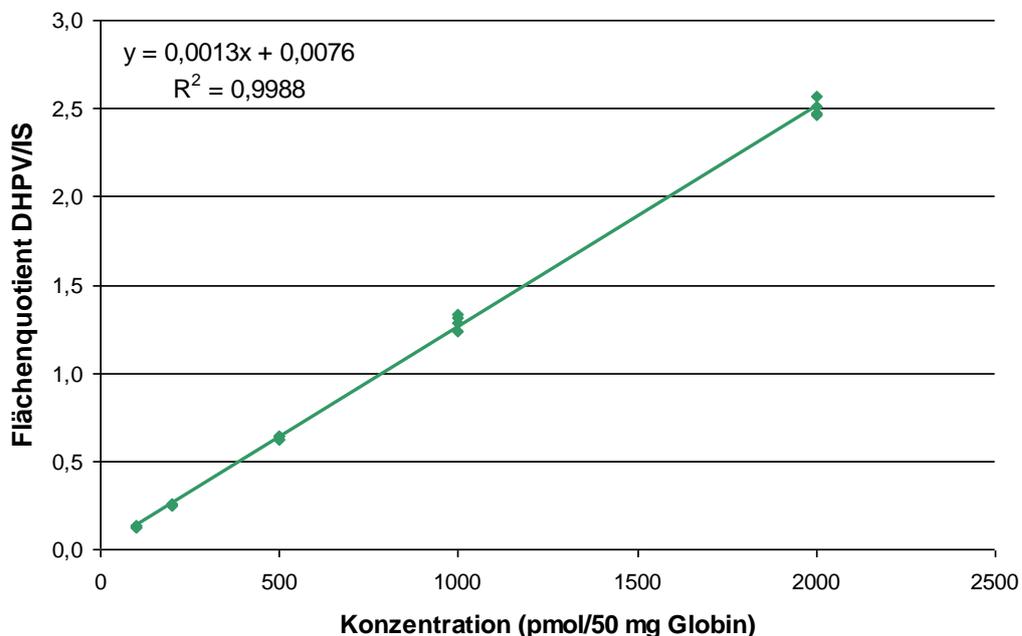


Abbildung 2.1.2.2: Kalibriergerade für DHPV (PFPTH-Derivat) in Rattenglobin (Konzentrationsbereich 100-2000 pmol DHPV/50 mg Globin, 1000 pmol DHPV*/50 mg Globin (IS))

2.1.2.2 Bestimmung von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein im Rattenurin

2.1.2.2.1 Prinzip der Methode

Im Rattenurin wird N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein bestimmt. Nach Zugabe des Internen Standards und Verdünnung wird die Mercaptursäure an einer HILIC-Säule getrennt und mittels Tandemmassenspektrometer detektiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine Kalibrierung in der Urinmatrix nach dem Internen Standard-Verfahren (Interner Standard: N-Acetyl-d₃-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein).

2.1.2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine (DHPMA), N-Acetyl-d₃-S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine (d₃-DHPMA) - Synthese im Fraunhofer ITEM; Ammoniumformiat, Ammoniumacetat - Fluka (Germany); Ameisensäure (100%), Essigsäure (99%) - Sigma-Aldrich (Germany); Acetonitril - J.T. Baker (Holland); Millipore® Wasser

2.1.2.2.3 Herstellung von Standardlösungen und von Kalibrierstandards

Die Stammlösungen von DHPMA und d₃-DHPMA (Interner Standard) wurden in destilliertem Wasser hergestellt. Die zum Spiken der unterschiedlichen Matrices eingesetzten Standardlösungen wurden durch weitere Verdünnung mit dest. Wasser erhalten.

Kalibrierstandards für die Bestimmung von N-Acetyl-S-(2,3-Dihydroxypropyl)cystein

Rattenurin von unbehandelten Tieren (Poolurin normal gefütterter Ratten) wurde zur Herstellung der Urinkalibrierstandards verwendet. Anschließend wurden die Standardlösungen von N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine und N-Acetyl-d₃-S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine (Interner Standard) hinzudotiert, um DHPMA-Konzentrationen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zu erhalten. Die Kalibrierstandards wurden in der gleichen Weise weiter verarbeitet wie die Urinproben (siehe Probenaufbereitung).

2.1.2.2.4 Probenaufbereitung

Vor der Analyse wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Je nach zu erwartendem Konzentrationsbereich wurden bei niedrigen bis mittleren Konzentrationen 1 mL Urin und bei hohen Konzentrationen 100 µL Urin und 900 µL dest. Wasser in 1,5 mL-Mikrozentrifugengefäße pipettiert. Die Proben wurden bei 14000 rpm 2 min zentrifugiert.

Bei mittleren und hohen Konzentrationen wurden 880 µL Verdünnungslösung, bei niedrigen Konzentrationen 130 µL Verdünnungslösung (5,7 mM Ammoniumacetat, 0,061 % Essigsäure in Acetonitril/Wasser (98/2, v/v)) vorgelegt und anschließend 50 µL des

zentrifugierten Überstandes hinzupipettiert. Anschließend wurden definierte Volumina an Internem Standard aus den Arbeitsstandardlösungen sowie teilweise dest. Wasser hinzudotiert. Die Vials wurden verschlossen und kurz am Vortexer vermischt.

2.1.2.2.5 Instrumentelle Bedingungen

Geräte	HPLC System:	Agilent Serie 1100
	MS/MS-System:	Finnigan TSQ 7000
	Software:	Xcalibur, Finnigan
Trennsäule	Vorsäule:	Luna HILIC 4 x 2.0 mm (Phenomenex)
	HPLC-Säule:	Luna HILIC 150 x 2.0 mm (Phenomenex) Partikel 3 µm, 200 Å
	Temperatur:	30 °C
Mobile Phase	Solvent A:	5 mM Ammoniumacetat, 0,05% Essigsäure in Acetonitril/H ₂ O (88/12, v/v)
	Solvent B:	5 mM Ammoniumacetat, 0,05% Essigsäure in Acetonitril/H ₂ O (pH 4,5, 5/95, v/v)
	Gradientenprogramm:	0-11 min 100 % A 11-13 min auf 65 % A und 35% B 13-18 min 65 % A und 35% B 18-20 min auf 100 % A 20-35 min 100 % A
	Flußrate:	0,2 mL/min
Injektor	Injektionsvolumen:	10 µL
Ionenquelle	Ionisationsmodus	ESI negativ
	ESI-Spannung:	-4500 V
	Kapillarentemperatur:	300 °C
	Sheath-Gas:	Stickstoff 60 psi
	Auxiliary-Gas:	Stickstoff 20 psi
	Kollisionsgas:	Argon 3 psi
Scantyp	MRM-Mode	
	MRM-Übergänge zur Quantifizierung	
	[d ₃]-DHPMA:	m/z: 239 → 107 (quan), 89 (qual)
	DHPMA:	m/z: 236 → 107 (quan), 89 (qual)
	Scan time:	0,1 s

Ein Chromatogramm einer gespikten Urinprobe mit N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine und N-Acetyl-d₃-S-(2,3-dihydroxypropyl)cysteine (Interner Standard) nach Aufarbeitung zeigt beispielhaft Abbildung 2.1.2.3.

2.1.2.2.6 Kalibrierung, Bestimmungsgrenze, Validierungsparameter

Unter Verwendung der Matrixkalibrierstandards wurden Mehrbereichskalibrierungen nach der „Internen Standard-Methodik“ für unterschiedliche Konzentrationsbereiche von DHPMA erstellt (2-20 µg/mL, $R^2 = 0,9968$; 10-200 µg/mL, $R^2 = 0,9989$; und 200-3000 µg/mL, $R^2 = 0,9998$).

Die Abbildung 2.1.2.4 zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für DHPMA in Rattenurin nach Aufarbeitung.

Die Bestimmungsgrenze für DHPMA liegt bei dieser Verfahrensweise bei 2 µg/mL Urin. Diese Grenze ist nicht das analytisch erreichbare Limit, sondern wird bestimmt durch Hintergrundbelastungen, die um mindestens den Faktor 2 unterhalb der definierten Bestimmungsgrenze liegen sollten.

Zur Bestimmung der Präzision wurden Blindurinproben der Ratte mit DHPMA dotiert und an einem Tag bzw. an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und gemessen. Für DHPMA Konzentration von 5, 20, 50, 200, 500, 2000 µg/mL ergaben sich bei Messungen innerhalb der Serie (jeweils 6 bei jeder Konzentration) sowie von Tag zu Tag (jeweils 6 bei jeder Konzentration) relative Standardabweichungen von 1-4 % und relative Wiederfindungen von 94-115 %. An der Bestimmungsgrenze von 2 µg/mL wurden Standardabweichungen von 7-11 % und relative Wiederfindungen von 82-114 % ermittelt.

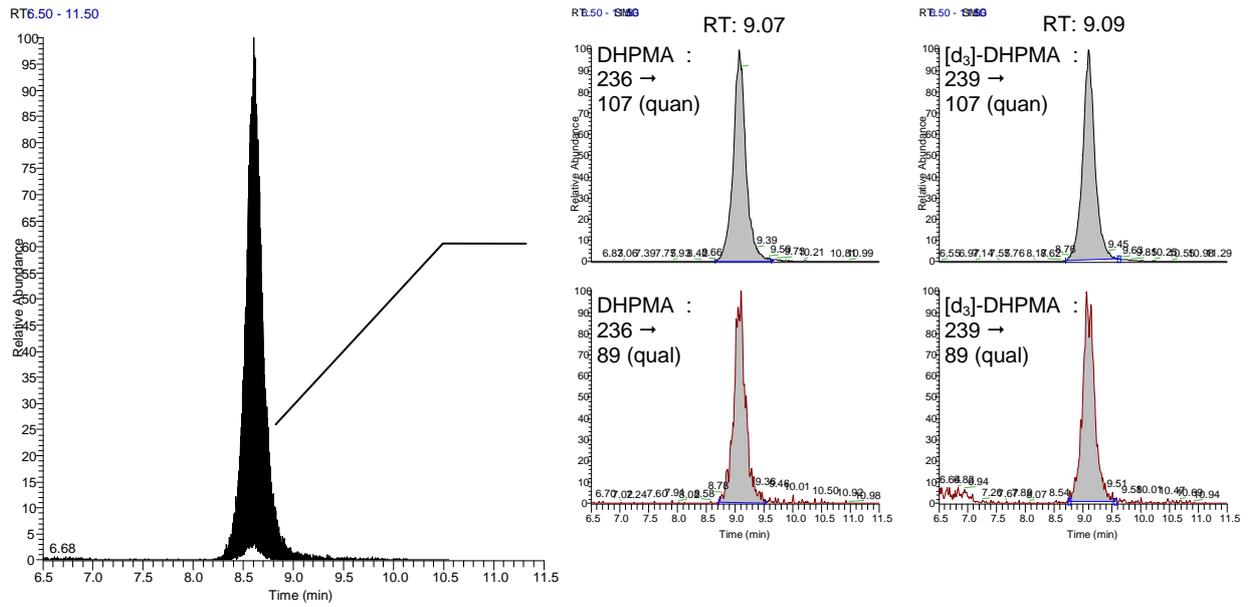


Abbildung 2.1.2.3: MRM-Chromatogramm von DHPMA in Rattenurin (Konzentration DHPMA 500 µg/mL, 1000 µg/mL Interner Standard).

Mittlere Kalibrierung

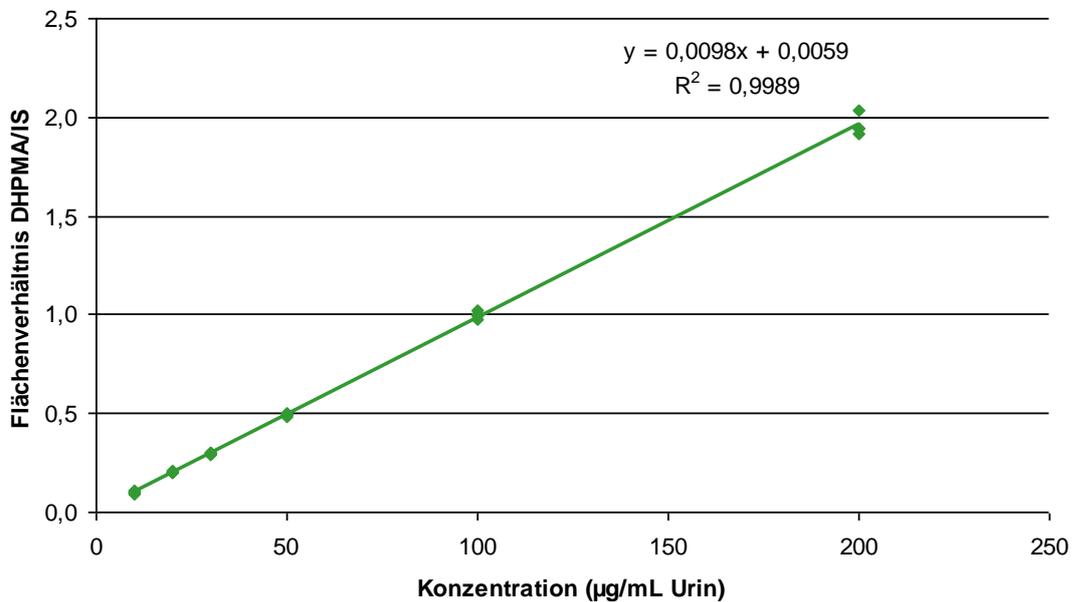


Abbildung 2.1.2.4: Kalibriergerade für DHPMA im Rattenurin nach Aufarbeitung (Konzentrationsbereich 10-200 µg/mL, 100 µg/mL Interner Standard).

2.1.2.3 Bestimmung von Creatinin im Rattenurin

2.1.2.3.1 Prinzip der Methode

Creatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure eine gelb-orange gefärbte Verbindung. Die Konzentration des während der Reaktionszeit gebildeten Farbstoffs ist ein Maß für die Creatinin-Konzentration. Die Bestimmung erfolgt durch Messung der Absorptionzunahme bei 500 nm (modifizierte Jaffé-Reaktion ohne Eiweißfällung).

2.1.2.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Creatinin, Merck (Deutschland); Testkombination Creatinin (R1: Natriumhydroxid 0,2 mol/L (6 x 51 mL), R2: Pikrinsäure 25 mmol/L (3 x 28 mL)) - Randox (United Kingdom); Lyphocheck Quantitative Urine Control 2 (12 x 10 mL) – BIO RAD (USA)

2.1.2.3.3 Herstellung von Standardlösungen und von Kalibrierstandards

Die Lyphocheck Quantitative Urine Control 2-Lösung (rekonstituierter Referenzurin) wurde nach Vorschrift mit 10 mL dest. Wasser angesetzt und als Kontrollstandard in der Serie mitgemessen.

Kalibrierstandards für die Creatininbestimmung im Urin

Die Stammlösung für Creatinin wurde in destilliertem Wasser hergestellt (113,12 mg in 100 mL dest. Wasser, 10 mmol/L).

2.1.2.3.4 Probenaufbereitung

Vor der Analyse wurden die Urinproben bei Raumtemperatur aufgetaut und gut durchmischt. Die Proben wurden bei 14000 rpm 2 min zentrifugiert. 200 µL des Überstandes wurden in Probevials pipettiert. Bei hohen Konzentrationen wurde der Urin für den entsprechenden Kalibrierbereich mit dest. Wasser verdünnt.

2.1.2.3.5 Instrumentelle Bedingungen

Gerät:	Roche Cobas FARA II Centrifugal analyser	
	Wellenlänge:	500 nm
	Temperatur:	37 °C
Analyseprogramm:	Injektionsvolumen:	5 µL
		20 µL dest. Wasser
	Standard R2:	200 µL
	Zentrifugation:	60 sec
	1. Messung	nach 55 sec
	Standard R1:	50 µL

Zentrifugation:	20 µL dest. Wasser
2. Messung:	37 °C für 2 sec
3-11. Messung:	nach 0,5 sec
	im 10 sec Intervall

2.1.2.3.6 Kalibrierung, Bestimmungsgrenze, Validierungsparameter

Unter Verwendung des Kalibrierstandards wurde eine Einpunktkalibrierungen durchgeführt.

Die Bestimmungsgrenze für Creatinin liegt bei 0,6 mmol/L in Urin.

Als Qualitätskontrolle wurde ein rekonstituierter Referenzurin in jeder Messserie mitgeführt.

Für Creatininkonzentration von 0,6-30 mmol/L ergaben sich bei Messungen innerhalb der Serie (n=3) relative Standardabweichungen von 0,4-4,4 % und relative Wiederfindungen von 94-108 %.

Anhang I D

Report

Study to Gain Blood and Urine Samples Following a Single Oral Administration of Glycidyl Palmitate and Glycidol to Rats

(20 Seiten; separate pdf-Datei)

Anhang II

Report

Toxicokinetics of radiolabelled glycidyl palmitate

(65 Seiten; separate pdf-Datei)