

3-MCPD- und Glycidol-Fettsäureester

- Stand zur Toxikologie**
- Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung**

Dr. Otto Creutzenberg

Dr. Edith Berger-Preiß

BLL - OVID, Berlin, 18. Januar 2011

Befunde in Tierversuchen nach 3-MCPD-Applikation

Zielorgan nach oraler Aufnahme ist die Niere

- **Erhöhte relative Nierengewichte**
- **Erhöhte Inzidenz von tubulären Hyperplasien**

Gentoxizität

- ***in vitro*: positiv - *in vivo* (MN, UDS, Comet-Test): negativ**
- **Daher Annahme: Tumoren in chronischen Studien mit Schwellwert**

Toxikologie von 3-MCPD

Subchronischer Test in Ratten

Studiendesign (Marchesini et al., 1989)

0 - 9 - 27 - 43 mg 3-MCPD/kg K.G./Tag (über Trinkwasser)

Nach 28/90 Tagen: rel. Nierengewicht signifikant erhöht in niedriger Dosis

Chronische Tests in Mäusen und Ratten (4)

- 3 ohne Tumorinzidenzen
- 1 Rattenstudie → benigne Tumoren in einigen Organen

Studiendesign (Sunahare et al., 1993)

0 - 1.1 - 5.2 - 28 mg 3-MCPD/kg K.G./Tag (über Trinkwasser); 104 Wochen

Risikobewertung (Annahme: 100% 3-MCPD-Freisetzung)

Nierenhyperplasie als empfindlichster Endpunkt gewählt;

PMTDI: 2 µg 3- MCPD/kg/Tag (BfR, 2007)

**MOE-Faktor: Abstand der Dosis Tiereffekt/humane Aufnahme:
bei Säuglingen 30-40 (zu niedrig)**

3-MCPD lange in Würzsaucen bekannt

3-MCPD-mono-und -diester: entstehen vor allem bei der thermischen Ölraffination (sog. Desodorierung) → keine Tox-Daten

Frage: Werden 3-MCPD-ester nach oraler Aufnahme in relevanter Menge durch Lipasen/Hydrolyse gespalten?

EFSA-Projekt

**Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters
in a 90-day toxicological study**

Durchführung: Universität Parma

D. Poli, R. Andreoli

EFSA-Projekt: 90-Tage Oraltest

- **Synthese von 3-MCPD-dipalmitoylester**
- **m/f Ratten; Applikation: 7 Tage pro Woche**
- **3-MCPD in Trinkwasser; 3-MCPD-diester in Futter**
- **Endpunkte: nach OECD; Biomarker Nephrotox; 3-MCPD-Analytik**

Toxikologie von 3-MCPD-estern

EFSA-Projekt: 90-Tage Oraltest

Dosierung äquimolar

3-MCPD und 3-MCPD-diester: 20 – 80 – 330 $\mu\text{mol/kg/Tag}$

Dosierung absolut

3-MCPD: 2,2 – 8,8 – 35,4 mg/kg/Tag

3-MCPD-diester: 11,7 – 47 – 188 mg/kg/Tag

**Untersuchung zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung
von 3-MCPD-Estern**

Chemisch-Analytischer Ansatz

Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von 3-MCPD im Blut, Urin und Organen (Niere, Leber, Kot, Coloninhalt, Dünndarminhalt) der Ratte

→ $\mu\text{g/kg}$ -Bereich

Pilotstudien mit Ratten

A. 3-MCPD-1-palmitinsäure-2-stearinsäurediester und 3-MCPD

Ziele

- **Testung der analytischen Methode**
- **erste Aussagen über das Auftreten von freiem 3-MCPD in Blut und Urin**

B. Optimierte Zeitpunkte für kinetische Untersuchungen; Bestimmung von 3-MCPD in Organen

Methode zur Bestimmung von 3-MCPD

- **Blut bzw. Urin wird mit Wasser verdünnt**
- **Organe und Darminhalte werden homogenisiert und mit Wasser verdünnt**
- **Zugabe des deuterierten internen Standards (3-MCPD-d5)**
- **Vermischen der Probe mit Silicagel**
- Überführung der rieselfähigen Mischung in eine Chromatographiesäule
- **Elution mit Ethylacetat**
- Eluat trocknen mit ausgeglühtem Natriumsulfat und überführen des Ethylacetats in ein Turbo-Vap Gefäß
- Einengen am TurboVap (ca. 1ml), filtrieren, einengen im N₂-Strom (ca. 200 µl)

Methode zur Bestimmung von 3-MCPD

- **Zum Eluat Isooctan, Triethylamin und Heptafluorbuttersäure-anhydrid hinzufügen**
- **30 Minuten bei 60 °C derivatisieren**
- Zugabe einer Mischung aus Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat, mischen mit Vortexer, zentrifugieren, organische Phase abnehmen
- Zugabe von Wasser, mischen mit Vortexer und zentrifugieren (nicht bei Organen)
- Organische Phase abnehmen und auf 200 µl einengen (ca. 300-500 bei Urinprobe)
- **Analyse mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie (NCI-Technik)**

Development and validation of an analytical method for determination of 3-chloropropane-1,2-diol in rat blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical ionization mode

Edith Berger-Preiß · Susanne Gerling · Elisabeth Apel · Alfonso Lampen · Otto Creutzenberg

Received: 21 April 2010 / Revised: 3 June 2010 / Accepted: 14 June 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract We have developed a highly selective and sensitive method using gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization for measuring 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in rat blood and urine. Samples were adsorbed on silica gel, extracted with ethyl acetate, and derivatized by chemical derivatization with heptafluorobutyric acid anhydride. For quantification, matrix-based calibration curves and 3-MCPD-*d*₅, as an isotope-labeled internal standard, were used. The relative recoveries of 3-MCPD were between 80 and 110% in most cases and the relative standard deviations were typically less than 10%, with some exceptions. The limit of quantification of the method was found to be about 2 ng/mL. In conclusion, a valuable, robust, and sensitive method for detection of 3-MCPD is now available for biokinetics studies.

Keywords Biomonitoring · 3-chloropropane-1,2-diol · Rat · Blood · Urine · Gas chromatography-mass spectrometry

Introduction

Chloropropanols such as 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 3-MCPD esters have been detected in acid-hydrolyzed vegetable proteins, soy sauces and related products, and in other processed foods [1].

Toxicology studies have shown toxic lesions induced by free 3-MCPD in kidneys of experimental animals. However, since this compound induced benign tumors in experimental animals, it is considered to be nongenotoxic in vivo [2, 3]. Recently, 3-MCPD fatty acid esters were detected in relevant amounts in a number of food samples, in particular in palm oil [4]. The human oral bioavailability of 3-MCPD fatty acid esters, however, is unknown. Therefore, a complete risk assessment of this potential food safety concern is currently not possible.

To assess the exposure of the population on a safe basis, the German and European consumer protection authorities have initiated projects to generate data on the contamina-

Tierversuche: Orale 3-MCPD- und 3-MCPD-diester-Applikation

Dosisbegründung für 3-MCPD

Äquimolare Dosierung, d.h. jeweils einmalige Gabe von 500 µg 3-MCPD/kg KG

Ziel: Ermöglichung eines Direktvergleichs der Bilanzen zwischen freiem 3-MCPD und 3-MCPD-diester

Zwei Pilotstudien

Dosierung 2. Pilotstudie

500 µg 3-MCPD/kg KG

2780 µg 3-MCPD-diester/kg KG (entsprechend 500 µg 3-MCPD/kg KG)

(3-MCPD: M_r :110,54; 1-Palmitoyl-2-stearyl-3-MCPD: M_r 615,41)

2. Pilotstudie: Orale 3-MCPD- und 3-MCPD-diester-Applikation

Gruppe	Zahl der Tiere	Substanz/Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$ K.G.)	Biologische Probe	Analytische Methode	Erwartete Nachweisgrenze
1	4	3-MCPD-1-palmitin-säure-2-stearin-säure-diester / 2780	Urin Vollblut Feces Leber Niere Darminhalte	GC-MS-NCI	μg -Bereich
2	4	3-MCPD / 500			
3	2	Vehikel (Hintergrund)			

2. Pilotstudie: Orale 3-MCPD- und 3-MCPD-diester-Applikation

Zielstellung

1. Erfassung des 3-MCPD-Maximums mit größerer Schärfe
2. Sektionen im Bereich des Maximums
3. Bestimmung des freien 3-MCPDs auf breiterer Basis, d.h. in
 - Blut
 - Urin
 - Organen (Leber, Nieren)
 - Darminhalten (Dünn-, Dickdarm, Kot)

Hauptstudie: Chemisch- analytischer Weg, hier: **Blut**

- **Optimierter Hauptversuch mit 20fach erhöhter Dosis:
10 mg/kg 3-MCPD und 53,2 mg/kg 3-MCPD-diester; einmalig**
- **Optimierte Blutprobenahme zur Erfassung des Maximums**
- **Optimierte Sammlung der Urin- und Kotproben**
- **Separate 3-MCPD-Bestimmung nach chemischer Hydrolyse
des Diesters in Körperflüssigkeiten und Organen**

	Hauptstudie (chem.-analyt. Weg)	
Ratten	2 Gruppen = 3-MCPD-diester (3-MCPD-Dipalmitat) und freies 3-MCPD n pro Gruppe und Phase = 5 pro Gruppe: Vehikel: n = 2 → pro Gruppe und Phase: 7 Tiere (5 Experiment + 2 Kontrolle)	
Phase I Blut	3-MCPD-diester seriell Blut: 9 Zeitpunkte Bestimmung von freiem 3-MCPD und nach Esterhydrolyse	freies 3-MCPD seriell Blut: 9 Zeitpunkte Bestimmung von freiem 3-MCPD
Phase II Urin, Feces, (Organe)	tägl. Urin/Feces, 7 Zeitpunkte (Tag 1), dann 1x tägl. bis zu 5 d; nach 7 d Sektion und Organentnahme Bestimmung von freiem 3-MCPD und nach Esterhydrolyse	tägl. Urin/Feces, 7 Zeitpunkte (Tag 1), dann 1x tägl. bis zu 5 d; nach 7 d Sektion und Organentnahme Bestimmung von freiem 3-MCPD
Phase III Organe, Blut bei c_{max}	bei c_{max} : Organe Nieren, Leber, Blut, Fett, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt; 6 Organe bei c_{max} Bestimmung von freiem 3-MCPD und nach Esterhydrolyse	bei c_{max} : Organe Nieren, Leber, Blut, Fett, Dünndarminhalt, Dickdarminhalt; 6 Organe bei c_{max} Bestimmung von freiem 3-MCPD

Hauptstudie: Chemisch- analytischer Weg, hier: **Blut Phase I**

- **Diestergabe**
 - Im Blut Zunahme des 3-MCPD bis 4 hrs, nach 48 hrs ist 3-MCPD nicht mehr bestimmbar
 - Wiederfindung: max. 0,9%

 - **3-MCPD-Gabe**
 - Höchste Konz.nach 0,5 hrs, nach 24 hrs nicht mehr bestimmbar
 - Wiederfindung: max. ca. 8%

 - **3-MCPD-diester nicht im Blut nachweisbar (indirekt durch Esterspaltung)**
-

Hauptstudie: Chemisch- analytischer Weg, hier: **Blut Phase I**

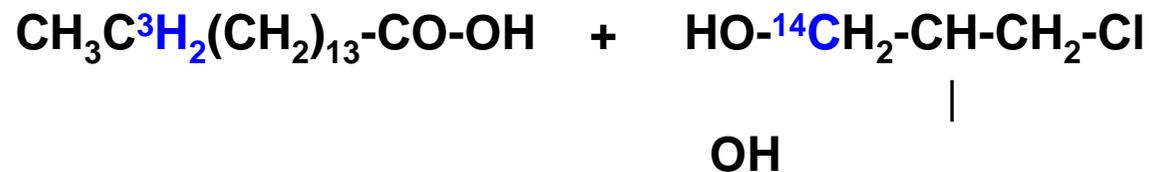
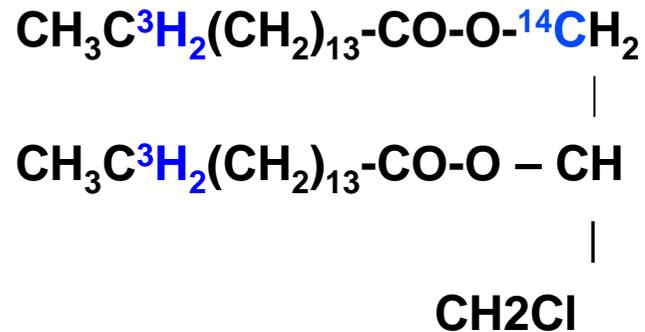
- **Diester und 3-MCPD zeigen ähnlich große kumulative AUC-Werte über 48 hrs, d.h. beide Substanzen führen zu vergleichbaren 3-MCPD-Werten im Blut**

Hauptstudie: Chemisch- analytischer Weg, hier: **Kot Phase II**

- **Validierung der Methode**
- **Ausarbeitung eines optimierten Sammelregimes im Pilotversuch**
- **→ Phase II Hauptversuch**

Alternative B Hauptversuch radioaktiv
(wird zunächst nicht weiterverfolgt, da chemische Analytik evtl. > 80% nachweisen kann)

Synthese des radioaktiven Diesters



Alternative B

Hauptversuch radioaktiv

Modul	Zahl der Tiere	Analyse der Proben
1	5	- tägliche Sammlung von Urin und Feces, bis zu 7 Tagen - nach Sektion Karkasse und Magen-Darm-Trakt separat - Abatemluft täglich
2	5	serielle Blutproben (ca. 200 µl) nach 0.5, 1, 4, 10, 48 Std.
3	2 x 5	bei C_{max} und nach 7 Tagen: Nieren, Nebennieren, Nierenfett, Gehirn, Augen, M-D-Trakt, Herz, Leber, Lunge, Muskelfleisch, Blut, Blutplasma, Milz, Hoden, Restkarkasse, Knochen

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Glycidol-Fettsäureestern (FK 2809HS013)

Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Glycidol-Fettsäureestern

CHEMISCH-ANALYTISCH

- Methodenentwicklung zur Bestimmung des Hämoglobin-Addukts im Blut
N-(2,3-dihydroxypropyl)valin
- Methodenentwicklung zur Bestimmung des Urin-Konjugats
N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein
- Tier-Pilotstudie
- Optimierte Hauptstudie

RADIOAKTIV

- Tierstudie (radioaktiv): modulares 3-Stufen-Modell

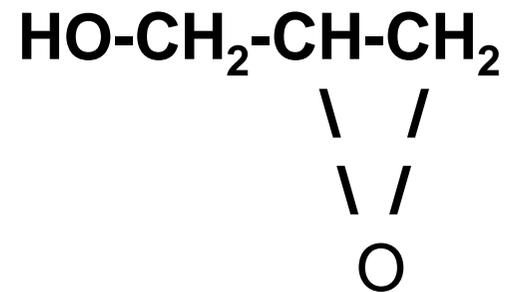


Glycidol: Epoxidstruktur mit hoher Reaktivität

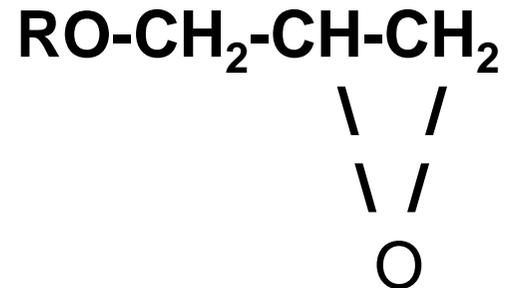
- 2 Stereoisomere: R/L
- Bifunktionelles Alkylans:
 - Reaktion mit DNS zu 3-(2,3-Dihydroxy-propyl)-dU und -dT
 - Reaktion mit Proteinen
- Haut- und Schleimhaut-reizend; neurotoxische Wirkung
- Mutagene Aktivität *in vitro* und *in vivo*
- Oraltest: kanzerogen (2A)

Biomonitoring von Glycidol

GLYCIDOL

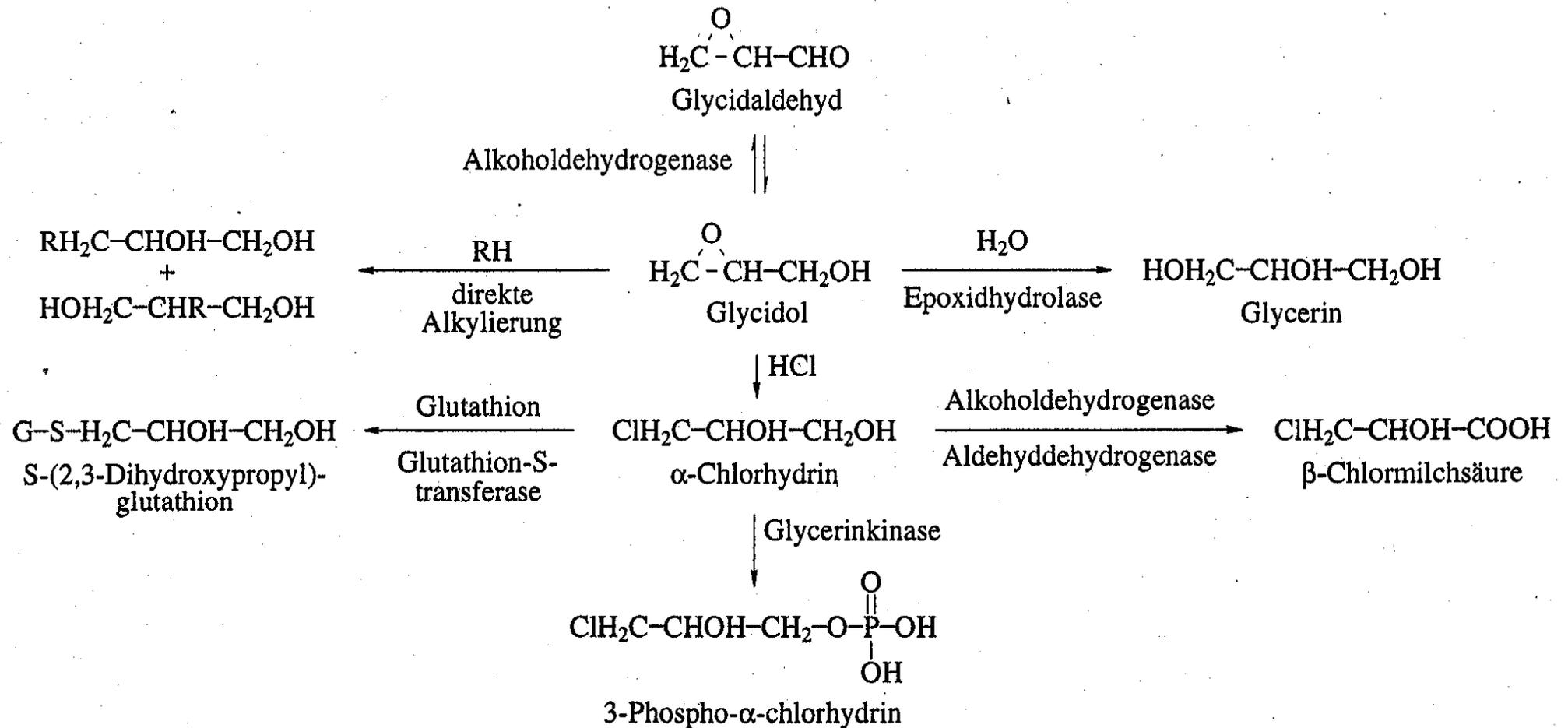


GLYCIDYLESTER



R: Palmitoyl-

Metabolisierung des Glycidols im Organismus (nach ACGIH, 1996; in MAK, 2000)



Biomonitoring von Glycidol mithilfe von Hämoglobinaddukten

Bildungswege: 2,3-Dihydroxypropyl-Addukte

Die Epoxidstruktur des Glycidols ist äußerst reaktiv und reagiert mit den nukleophilen Gruppen von DNA oder Proteinen

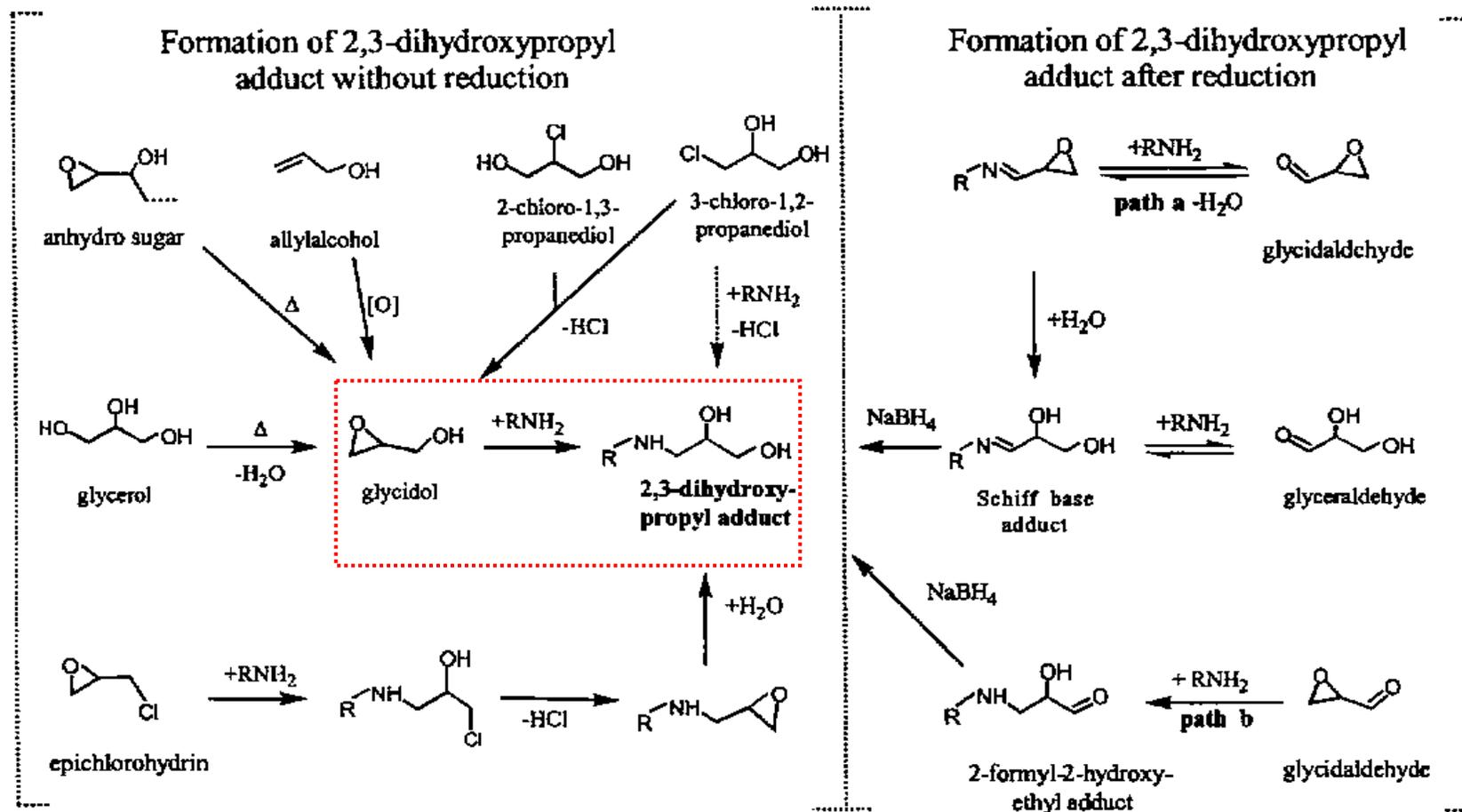


Fig. 1. Possible pathways for formation of the *N*-terminal *N*-(2,3-dihydroxypropyl)valine adduct in Hb.

Biomarker in Blut und Urin

BLUT

N-(2,3-dihydroxypropyl)valin-Addukt

URIN

mit Glutathion konjugiertes Glycidol

N-Acetyl-S-(2,3-dihydroxypropyl)cystein, als Folgeprodukt von
2,3-Dihydroxypropyl-glutathion

ADME-Tests

¹⁴C-Glycidol bei der Ratte; Nomeir et al. (1995)

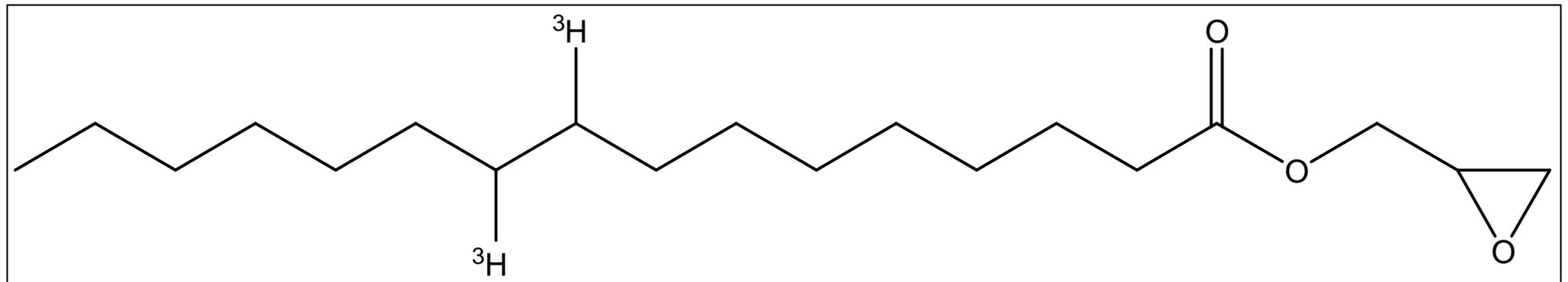
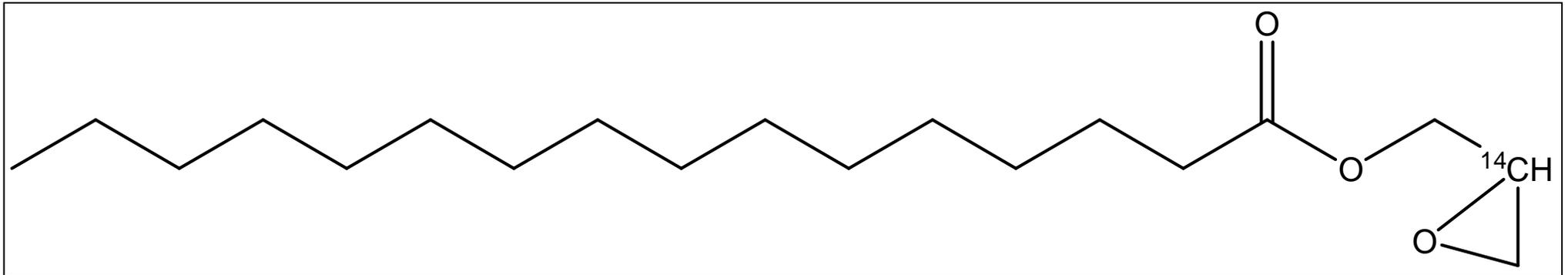
- ca. 90% wird aus dem Magen-Darm-Trakt absorbiert, davon:
 - ca. 45% Glycidol-Äquivalente im Urin
 - ca. 10% als CO₂ ausgeschieden
 - ca. 10% in Geweben
(max. in Blutzellen, Schilddrüse, Leber, Niere und Milz)
- ca. 9% in den Feces

¹⁴C-Glycidol bei der Ratte; IARC (2000)

- i.p.-Applikation: Hauptmetabolite S-(2,3-Dihydroxypropyl)-glutathion und S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein aus dem Urin isoliert.

Skizze einer Pilotstudie (radioaktiv)

Glycidylpalmitate: ^{14}C und ^3H



Skizze einer Hauptstudie (radioaktiv)

Phase	Zahl der Tiere	Analyse der Proben (einmalige Applikation)
1	4	<ul style="list-style-type: none">- tägliche Sammlung von Urin und Feces über 7 Tage- nach 7 Tagen Sektion und Organentnahme: Nieren, Nebennieren, Nierenfett, Gehirn, Augen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Herz, Leber, Lunge, Muskelfleisch, Blut, Blutplasma, Milz, Hoden, Knochen- Abatemluft täglich
2	4	serielle Blutproben (ca. 200 µl) nach 0.5, 1, 4, 10, 48 Std.
3	4	bei C_{max} : Nieren, Nebennieren, Nierenfett, Gehirn, Augen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Herz, Leber, Lunge, Muskelfleisch, Blut, Blutplasma, Milz, Hoden, Knochen