

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Süßstoffen (Aspartam, Rebaudiosid A) und  
Zucker (Saccharose) auf das metabolische Profil im Urin

Verfasserin

Heike Stipsits

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Jürgen König



## **Danksagung!**

Herzlichen Dank gilt Herrn Prof. Jürgen König, sowie Frau Dr. Elisabeth Rudolph für die Ermöglichung der Ausarbeitung dieses interessanten Themas.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei den Teilnehmern der Studie bedanken, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Ernährungsinterventionsstudie nicht möglich gewesen wäre.

Ein Dankeschön auch an meine Familie und Freunde für die Unterstützung!



## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VI
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....	1
2 LITERATURÜBERSICHT .....	2
2.1 Metabolomics/Metabonomics .....	2
2.1.1 Definition Metabolomics/Metabonomics.....	2
2.1.2 Omics-Kaskade .....	4
2.1.3 Analytische und biologische Variationen bei Metabolomics.....	4
2.1.4 Probensammlung, Lagerung und Stabilität.....	5
2.1.5 <i>Intra</i> -individuelle Variationen und <i>inter</i> -individuelle Variationen.....	6
2.1.6 Probandenkollektiv .....	8
2.1.7 Variation/Stabilität des Messgeräts.....	9
2.1.8 „Snapshots“ .....	10
2.1.9 Datenauswertung.....	10
2.2 Zucker und Süßstoffe .....	11
2.2.1 Allgemeines über Kohlenhydrate.....	11
2.2.2 Saccharose.....	11
2.2.3 Polyole bzw. Zuckeralkohole.....	12
2.2.4 Metabolismus von Zucker und Zuckeralkoholen.....	13
2.2.4.1 Verdauung und Absorption .....	13
2.2.4.2 Metabolismus .....	14
2.2.5 Metabolische Eigenschaften von Zuckeralkoholen .....	15

2.2.6 Künstliche Süßstoffe .....	16
2.2.7 Süßstoffe und Energieaufnahme .....	17
2.2.8 Aspartam .....	18
2.2.8.1 Chemische Struktur und Synthese von Aspartam.....	19
2.2.8.2 Metabolismus von Aspartam .....	19
2.2.8.3 Vergleich der Aufnahme von Methanol über Aspartam und über natürliche Quellen.....	22
2.2.8.4 Aspartam und Phenylketonurie.....	22
2.2.8.5 Sicherheit und Zulassung von Aspartam .....	23
2.2.8.6 Toxikologische Bewertung von künstlichen Süßstoffen .....	23
2.3 Stevia.....	25
2.3.1 Die Gattung Stevia .....	25
2.3.2 <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni).....	25
2.3.3 Chemische Struktur.....	26
2.3.4 Einsatz von Stevia.....	26
2.3.5 Positive Eigenschaften von Steviolglycosiden als Süßstoff .....	27
2.3.6 Absorption und Metabolismus .....	27
2.3.7 Toxizität von Stevia .....	30
2.3.7.1 Genotoxizität bzw. Mutagenität.....	30
2.3.7.2 Akute orale Toxizität .....	30
2.3.7.3 Subchronische Toxizität.....	31
2.3.7.4 Zytotoxizität.....	31
2.3.7.4 Reproduktionstoxizität und teratogene Toxizität.....	31
2.3.8 Bewertung der EFSA .....	32
3 MATERIAL UND METHODEN .....	33
3.1 Studiendesign.....	36

3.1.1 Studienablauf: .....	36
3.2 Ermittlung der Süßkraft von Rebaudiosid A und Aspartam .....	38
3.3 Probenaufarbeitung und Lagerung .....	40
3.3.1 Etablierung der Probenaufbereitung vor der LC-MS-Messung .....	40
3.3.2 Probenaufbereitungsmethode .....	46
3.3.3 Qualitätskontrolle der Analysen .....	47
3.4 Parameter zur HPLC-MS Analyse .....	48
3.4.1 HPLC-Parameter .....	48
3.4.2 MS-Parameter .....	49
3.5 Statistische Auswertung .....	50
3.5.1 Ziel der PCA-Analyse: .....	51
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	54
4.1 Inter- und intra-individuelle Schwankungen der Probanden .....	54
4.2 Clusterung der Süßstoffe innerhalb eines Probanden .....	61
5 SCHLUSSBETRACHTUNG .....	65
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	67
7 SUMMARY .....	68
8 ANHANG .....	69
8.1 Influence, Score und Loading Plots der PCA-Analyse einzelner Probanden .....	69
8.2 Influence, Score und Loading Plots der PCA-Analyse von Proband 1 bis 13 .....	74
8.3 Ernährungsplan .....	79
9 LITERATURVERZEICHNIS .....	80

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strategies for metabolomic investigations .....	3
Abbildung 2: "Omics-Kaskade" .....	4
Abbildung 3: Kohlenhydratstoffwechsel .....	15
Abbildung 4: Abbauprodukte von Aspartam .....	19
Abbildung 5: Chemische Struktur von Aspartam ((N-L- $\alpha$ -Aspartyl-L-phenylalanin .... 1-methylester) .....	19
Abbildung 6: Metabolismus von Aspartam .....	21
Abbildung 7: Entwicklung und Zulassung nicht-nutritiver Süßstoffe .....	23
Abbildung 8: Chemische Strukturen der Steviolglykoside Steviosid und Rebaudiosid A und dessen Metabolit Steviol .....	26
Abbildung 9: Metabolismus von Rebaudioside A beim Menschen und bei Ratten .....	29
Abbildung 10: schematische Darstellung des Studiendesigns .....	38
Abbildung 11: PCA-Modell.....	52
Abbildung 12: Score und loading plot der PCA-Analyse aller Probanden: Stevia versus Kontrolle .....	55
Abbildung 13: Score und loading plot der PCA-Analyse aller Probanden: Stevia versus Kontrolle (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2) .....	56
Abbildung 14: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 1 .....	57
Abbildung 15: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1) .....	60
Abbildung 16: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 7 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1) .....	60
Abbildung 17: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4 .....	61
Abbildung 18: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4 (ohne Nüchternwerte).....	62



## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Süßkraft natürlicher Zuckeraustauschstoffe.....	13
Tabelle 2: Süßkraft künstlicher Süßstoffe.....	16
Tabelle 3:Zusammenfassung der Testversuche .....	46
Tabelle 4: Herstellung des Standards und der Kontrollprobe .....	47
Tabelle 5: Multi-Step Gradient .....	49
Tabelle 6: Ernährungsplan .....	79

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>LC-MS</b>	[Liquid-Chromatography-Massenspektrometrie]
<b>NMR</b>	Kernspinresonanzspektroskopie [Nuclear magnetic resonance]
<b>UPLC</b>	[Ultra Performance Liquid Chromatography]
<b>HPLC</b>	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<b>GC-MS</b>	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisation
<b>PCA</b>	Hauptkomponentenanalyse [Principal Component Analysis]
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>KH</b>	Kohlenhydrate
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>ADI</b>	[Acceptable Daily Intake]
<b>NOEL</b>	[No Observed Effect Level]
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>kcal</b>	Kilokalorien
<b>g</b>	Gramm
<b>mg</b>	Milligramm
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>mL</b>	Milliliter
<b>min</b>	Minute
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>l</b>	Liter
<b>H</b>	Stunde
<b>mm</b>	Millimeter
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute [revolutions per minute]
<b>Ø</b>	Durchschnitt
<b>Mol</b>	Stoffmengeneinheit

<b>mmol</b>	Millimol
<b>V</b>	Volt
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>PKU</b>	Phenylketonurie
<b>FDA</b>	Behördliche Lebensmittelüberwachung und die Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten [US Food and Drug Administration]
<b>JECFA</b>	Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe [Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives]
<b>EFSA</b>	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
<b>ANS</b>	Gremium für Lebensmittelzusatzstoffe und Lebensmitteln zugesetzte Nährstoffquellen
<b>AMES-Test</b>	Testverfahren, um Mutagene zu identifizieren
<b>EXPOCHI-Projekt</b>	[Dietary Exposure Assessments for Children in Europe]
<b>NDNS</b>	[National Diet and Nutrition Survey]
<b>(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub></b>	allgemeine Summenformel der Kohlenhydrate
<b>HCOOH</b>	Ameisensäure
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Ammoniumhydrogencarbonat
<b>C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub></b>	Methotrexat
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>TIC</b>	[Total Ion Chromatogram]
<b>SAFA</b>	[saturated fatty acid]
<b>MUFA</b>	[monounsaturated fatty acid]
<b>PUFA</b>	[polyunsaturated fatty acid]



## 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Ernährungsforschung bzw. -wissenschaft fokussiert sich heutzutage immer mehr auf die Bewahrung und Optimierung der Gesundheit durch Ernährung.

Technologische Fortschritte in der Wissenschaft ergeben sich durch umfassende Untersuchungen der „Omics Kaskade“, welche die Analyse der Genomics, Transkriptomics, Proteomics und Metabolomics darstellt.

Ernährungsempfehlungen wurden erstellt, um den Nutzen essentieller Nährstoffe und die Sicherstellung eines gut funktionierenden Organismus zu erfassen. Heutzutage ist klar, dass viele dieser Nährstoffe zusammen mit nicht essentiellen bioaktiven Verbindungen, welche auch in der Nahrung präsent sind, mit vielen Stoffwechselwegen interagieren und die Gesundheit beeinflussen [SCALBERT et al., 2009].

Durch die Erforschung des Metaboloms kann die Fähigkeit für besseres Verständnis biologischer Funktionen und des Stoffwechsels bereitgestellt werden.

Diese Diplomarbeit verfolgt das Ziel, Unterschiede des metabolischen Profils verschiedener Süßstoffe (Rebaudiosid A, Aspartam und Sachharose) anhand von humanen Urinproben zu untersuchen.

Bei Rebaudiosid A handelt es sich zusammen mit Steviosid um eine Hauptkomponente der Pflanze *Stevia rebaudiana* (Bertoni), welche in gewissen Regionen Südamerikas (Paraguay, Brasilien) seit Jahrzehnten als Süßstoff verwendet wird. Stevioside und Rebaudioside A besitzen eine ungefähr 300mal höhere Süßkraft als Saccharose (0,4% Lösung) [GEUNS, 2008].

Durch den Ersatz von *Stevia rebaudiana* anstatt der Verwendung von Zucker könnte durch die Reduzierung des Zuckerkonsums nicht nur die damit verbundene Reduktion der täglichen Kalorienaufnahme erzielt werden, sondern möglicherweise auch ein Beitrag zur allgemeinen Gesundheit der Bevölkerung geleistet werden, da aufgrund aktueller Daten die Zunahme der übergewichtigen Personen in der Bevölkerung ständig im Wachsen ist.

Durch Intervention mit verschiedenen Süßstoffen soll mittels LC-MS-Messungen Veränderungen der Stoffwechselmetaboliten zwischen den Interventionsgruppen anhand von humanen Urinproben untersucht werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Metabolomics/Metabonomics

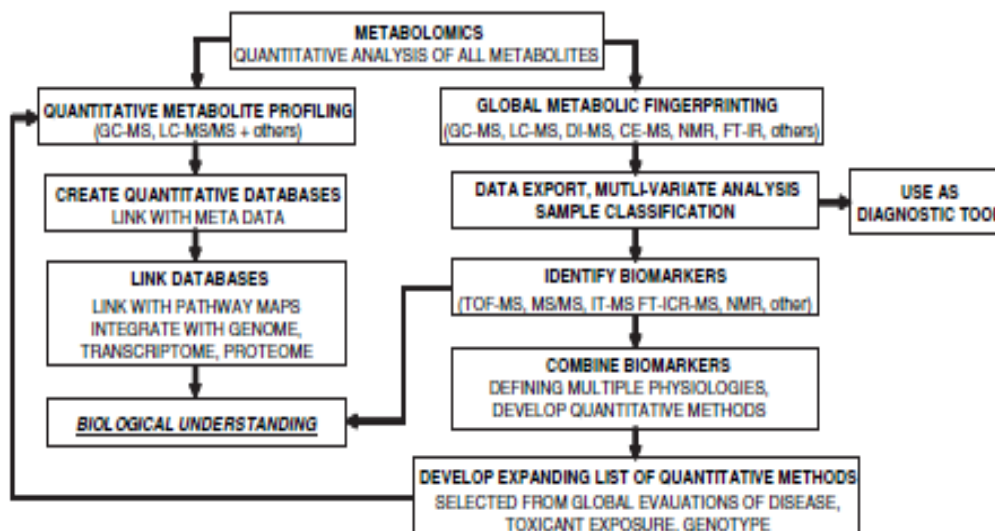
#### 2.1.1 Definition Metabolomics/Metabonomics

Metabolomics wird definiert als die quantitative Analyse der dynamischen multiparametrischen metabolischen Reaktionen von lebenden Systemen aufgrund pathophysiologischer Reize oder genetischer Veränderungen [NICHOLSON et al., 1999].

Sowohl der Begriff Metabolomics, als auch die Bezeichnung Metabonomics sind in der Literatur gebräuchlich, allerdings weisen beide die gleiche Bedeutung auf. Durch verschiedene Anwendungen von NMR (nuclear magnetic resonance) – Spektroskopie, um multikomponente metabolische Zusammensetzungen von biologischen Flüssigkeiten, Zellen und Geweben zu untersuchen, wurde das Konzept von Metabolomics entwickelt. Es stellt ein Instrument dar, um die globale metabolische Regulation eines Organismus zu erforschen. Metabolomics zielen auf die Detektion von Veränderungen in der Verteilung und Konzentration von Metaboliten in biologischen Geweben und Matrix, hauptsächlich durch die Verwendung von NMR und Massenspektrometrie ab [REZZI et al., 2007].

Metabolomics erlaubt die Charakterisierung des Effekts eines Nährstoffs, eines Nahrungsmittels oder der Ernährung mit einer höheren Präzision. Die Analyse von hunderten Metaboliten in biologischen Proben wie Urin, Blut, Gewebe und Zellen kann mit diesem Verfahren umgesetzt werden. Aufgrund der Sensitivität und Selektivität ist die Massenspektrometrie die Methode der Wahl, um das menschliche Metabolom und die komplexen metabolischen Einflüsse von Nährstoffen und Nahrungsmittel zu erforschen. Gezieltes Profiling (in denen Metaboliten a priori bekannt sind) und Fingerprinting (der Nachweis der Identität von Metaboliten a posteriori) wurden in MS-basierten Metabolomics durchgeführt. Gezieltes Profiling ist in der Regel für die Quantifizierung einer bestimmten Klasse von Metaboliten (Lipide, Fettsäuren, Acylcarnitine, Gallensäuren, organische Säuren, Nucleoside, etc.) konzipiert worden. Es wird seit vielen Jahren in der Ernährungsforschung verwendet. Doch die zunehmende Leistung bzw. Entwicklung der MS-Techniken erlaubt heute die gleichzeitige Analyse

von mehreren hundert Metaboliten, deshalb auch die Bezeichnung Metabolomics [SCALBERT et al., 2009].



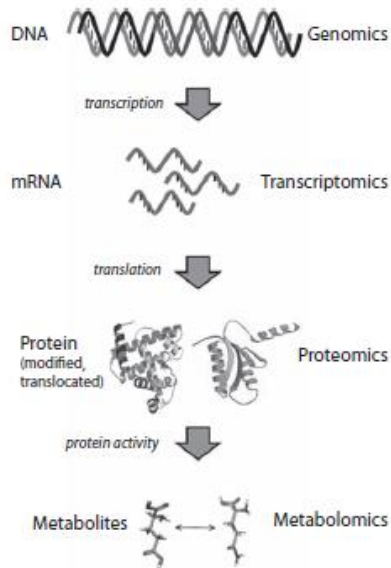
**Abbildung 1: Strategies for metabolomic investigations**

[DETTMER et al., 2007]

Aber vor allem der Mangel an gut etablierten und standardisierten Methoden und Verfahren, sowie die Schwierigkeiten bei der Identifizierung unterschiedlicher Metaboliten zeigt, dass die Forschung bzw. der Fortschritt auf diesem Gebiet durch diese Problematik noch eingeschränkt ist. Die Entzifferung der komplexen Interaktionen zwischen einem Nährstoff und dem menschlichen Organismus bildet somit eine Herausforderung für das 21. Jahrhundert [SCALBERT et al., 2009].

### 2.1.2 Omics-Kaskade

Obwohl Metabolomics den Endpunkt der Omics-Kaskade darstellt, gibt es derzeit keine Methode, um alle Metaboliten auf einmal zu analysieren [DETTMER et al., 2007].



**Abbildung 2: "Omics-Kaskade"**

[MICHLMAYR und OEHLER, 2010]

### 2.1.3 Analytische und biologische Variationen bei Metabolomics

Minimierung von ungewollten Faktoren, welche zu Schwankungen bzw. Variationen führen, ist essentiell bei der Durchführung von Studien mit Metabolomics. Solche Abweichungen können zusammengefasst werden als analytische und biologische Variationen. Dazu zählen Probensammlung, Lagerung und Stabilität, Probenvorbehandlung, Variation/Stabilität des Messgerätes, intra-individuelle Variationen bedingt durch Stress, Ernährung, sowie tägliche Schwankungen, inter-individuelle Variationen aufgrund von genetische Faktoren, und inter-individuelle Abweichungen infolge der An- und Abwesenheit einer Krankheit, Unterschiede in der Ernährung, Geschlecht und Umweltfaktoren [SCALBERT et al., 2009, RASMUSSEN et al., 2010, MAHER et al., 2007]. Einen negativen Einfluss auf das resultierende Ergebnis einer Studie können solche ungewollten Faktoren darstellen [SCALBERT et al., 2009].



In der vorliegenden Interventionsstudie wird das metabolische Profil von humanen Urinproben analysiert, deshalb beschränkt sich der Inhalt der Diplomarbeit bezüglich der Metabolomics-Forschung hauptsächlich auf Analysen mit Urin.

Urin stellt ein sehr beliebtes Biofluid für metabolomische Ermittlungen dar, nicht nur wegen der nicht-invasiven Erfassung der Proben, sondern auch aufgrund der Möglichkeit, mehrere Proben über einen längeren Zeitraum zu sammeln [SAUDE und SYKES, 2007].

#### **2.1.4 Probensammlung, Lagerung und Stabilität**

Ist die Stabilität der zu analysierenden Proben nicht gegeben, kann dies einen unerwünschten Störfaktor bedeuten. Gika et al untersuchte in einer Studie die Stabilität von humanen Urinproben unter verschiedenen Handhabungs- und Lagerbedingungen für metabolomische Ermittlungen mittels LC-MS und UPLC-MS Methoden. Untersucht wurde unter anderem die Kurzzeitstabilität der Proben in einem Autosampler bei 4°C, weiters die Haltbarkeit von gefrorenen Proben sowie die Einfrier- und Auftaustabilität [GIKA et al., 2008]. Gika et al und Rasmussen et al kamen zu dem Ergebnis, dass die Stabilität der Proben bei 4°C in einem Autosampler für bis zu 48 Stunden gewährleistet ist [GIKA et al., 2008, RASMUSSEN et al., 2010]. Die Lagerung von Urin bis zu 6 Monaten bei Temperaturen von -20°C oder darunter kann für Metabolomics-Studien als geeignet betrachtet werden. Noch wichtiger ist, dass zumindest auf Grundlage der PCA-Analyse gezeigt werden konnte, dass es keine offensichtlichen Unterschiede im Profil von Urinproben bei Temperaturen von -20°C und -80°C mit LC-MS oder UPLC-MS und +ve oder -ve ESI (positive/negative Elektrospray-Ionisation) gibt. Ebenso scheint die Zahl der Einfrier- und Auftauzyklen (bis zu 9) nicht die Zusammensetzung der Proben zu beeinträchtigen [GIKA et al., 2008].

Saude und Sykes erforschten den Einfluss der Probenvorbereitung und Lagerung von Urinproben auf das metabolische Profil mittels NMR-Analysen. Durch die Filtration des Urins konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Die Zugabe des Stabilisators Natriumazid bewirkte eine Hemmung der Metabolitenveränderungen und mit zunehmender Konzentration an Natriumazid konnte die höchste Stabilität der Metaboliten erreicht werden. Weiters wurden Unterschiede zwischen dem Geschlecht innerhalb der 4-wöchigen Studiendauer beobachtet, wobei das männliche Geschlecht

geringere Schwankungen des metabolischen Profils, verglichen mit Frauen, aufweist. Lagerung der Urinproben bei 4°C lässt eine schwache Reduktion bei der Veränderung der Metaboliten erkennen, während die Lagerung von Urin bei -80°C fast keinen Einfluss auf das metabolische Profil darstellt [SAUDE und SYKES, 2007]. Die Aufbewahrung von Urinproben bei über 4°C kann zu Abweichungen des metabolischen Profils führen, sowie eine bakterielle Kontamination verursachen [RASMUSSEN et al., 2010; SCALBERT et al., 2009].

### **2.1.5 *Intra-individuelle Variationen und inter-individuelle Variationen***

Menschliche Individuen weisen viel größere Schwankungen des metabolischen Profils in Urinproben gegenüber Versuchen mit Tieren auf. Dies ist nicht nur auf genetische Unterschiede zurückzuführen, sondern auch auf das Geschlecht, Alter, Ernährung, die Lebensweise sowie die spezifische Exposition von chemischen Stoffen des Einzelnen sowie die Unterschiede in der Darmflora üben einen Einfluss aus [LUTZ et al., 2008]. Die Einflussnahme der Ernährung auf das metabolische Profil ist noch nicht vollständig geklärt, klar ist aber, dass die Ernährung sowohl einen akuten als auch einen chronischen Effekt hat [Walsh et al., 2007]. Wagner et al konnte, bezogen auf das Geschlecht, eine doppelt so hohe Streuung bei Frauen verglichen mit Männern feststellen. Bei dieser Studie handelte es sich um eine Kontrollstudie, d.h. ohne Einschränkungen bezüglich Nahrungsaufnahme und physische Aktivitäten, um geschlecht- und zeitabhängige Differenzen zu analysieren. Größere Abweichungen bei Frauen könnten aufgrund des weiblichen Hormonspiegels resultieren, welcher einen enormen Störfaktor auf das metabolische Muster darstellt [WAGNER et al., 2007].

Rasmussen et al untersuchte anhand von humanen Urinproben den Effekt von standardisierter und nicht-standardisierter Ernährung sowie den Einfluss des Geschlechts auf das metabolische Profil mittels <sup>1</sup>H NMR. Durch die Gabe von standardisierter Ernährung an drei aufeinanderfolgenden Tagen zeigte sich ein annähernd homogenes Urinprofil, verglichen mit der nicht-standardisierten Ernährung [RASMUSSEN et al., 2010]. Diätetische Maßnahmen 24 Stunden vor der Probennahme kann die Variation verringern und somit die Interpretation der Daten bei Studien mit Urin verbessern [Walsh et al., 2007]. Die Analyse der geschlechtsspezifischen

Unterschiede zeigt eine größere renale Ausscheidung von Zitrat und Alanin bei Frauen als bei Männern, und größere Mengen an Kreatinin im männlichen Urin. Höhere Zitrat-Spiegel bei Frauen könnten durch das Östrogen gesteuert werden, während die vermehrte Ausscheidung von Kreatinin bei Männern aufgrund der größeren Muskelmasse resultieren kann [RASMUSSEN et al., 2010].

Legido-Quigley et al ermittelte die Auswirkungen der Probenvorbereitung (1:4-Verdünnung vs. Flüssig-Flüssig-Extraktion) sowie chromatographischer Verfahren (lange vs. kurze Gradienten) auf postprandiale Urin-Biomarker von menschlichen Probanden nach Aufnahme unterschiedlicher Diäten mittels UPLC-MS Analysen. Verdünnte Proben unter Verwendung des Gradienten 1 (lang, 40 – 95% Acetonitril für 12 Minuten) und extrahierte Proben mit Gradient 2 (kurz, 0 – 20% Acetonitril für 5 Minuten) präsentierten vergleichbare Cluster der Urinprofile nach der Diät (ca. 2000 Koeffizienten), allerdings erzielte die Messung der verdünnten Urinproben das beste Clustering und die höchsten  $Q^2$ -Werte. Der  $Q^2$ -Wert bezeichnet die Qualität eines Prognose-Parameters, welcher durch Messung der Höhe der Varianz durch das PLS-DA Model vorhergesagt wird und mit einem Wertebereich von 0 bis 1 festgelegt ist. Die Ergebnisse der Prognose resultieren in der Identität unbekannter Proben, basierend auf vordefinierte Gruppen. Sie können ebenso wertvolle Informationen, wie z.B. das Ausschließen der Zuordnung einer Probe zu einer Gruppe, liefern. Demzufolge scheint die Methode unter Verwendung der verdünnten Proben das größere Potential für ungezielte Metabolomics-Studien und insbesondere für die Identifizierung von Schlüsselmetaboliten in Ernährungsinterventionsstudien darzustellen [LEGIDO-QUIGLEY et al., 2009].

Veränderungen des metabolischen Profils, welche durch die Ernährung resultieren, stellen somit eine Herausforderung für Metabolomics in der humanen Ernährungsforschung dar, denn die Unterscheidung dieser Veränderungen von normalen physiologischen Schwankungen kann sich schwierig gestalten. Da Menschen sehr unterschiedliche Wesen sind, ist es auch nicht überraschend, dass spektrale Outputs stark von intra- und interindividuellen Schwankungen beeinflusst werden. Normale physiologische Schwankungen können folglich einen Störfaktor bei Humanstudien bedeuten, deshalb ist es von großer Wichtigkeit, Faktoren - welche zu normalen physiologischen Variationen beitragen – kontrollieren und verstehen zu können. Walsh

et al untersuchte den Umfang intra- und interindividueller Variationen von standardisierter Ernährung auf das metabolische Profil in Speichel-, Plasma- und Urinproben. Intra- und interindividuelle Schwankungen zeigten sich in jedem Biofluid, eine Reduktion der interindividuellen Variation konnte jedoch nur bei Urinproben, aber nicht im Plasma oder Speichel festgestellt werden [WALSH et al., 2006]. Hauptunterschied zwischen Plasma und Urin ist das Verhältnis zwischen den Metaboliten und Nicht-Metaboliten. Blut stellt eine reiche Quelle von Nährstoffen und Metaboliten dar, welche von einem Organ zum anderen transportiert werden. Diese metabolisch aktiven Verbindungen sind im Blut so weit wie möglich enthalten und gehen nur in den Urin über, wenn ihre Konzentration im Plasma steigt und die relevante Nierenschwelle überschritten wird. Im Gegensatz dazu, sind die aus der Ernährung abgeleiteten non-nutrienten Verbindungen, welche nicht im Stoffwechsel beteiligt sind, polarer, um die renale Nierenschwelle zu verringern, was ihren Eintritt in den Urin begünstigt. Die Hauptfunktion von Urin stellt die Entfernung unerwünschter Verbindungen im Körper dar, folglich ist die Konzentration an non-nutrienten Verbindungen im Urin höher als im Plasma. Eine direkte diätetische Wirkung auf das metabolische Profil ist infolgedessen im Urin eindeutiger nachweisbar als in Plasmaproben [GIBNEY et al., 2005]

Urin repräsentiert daher ein sensitives metabolisches Profil auf unmittelbare Ernährungsaufnahme [WALSH et al., 2006].

### **2.1.6 Probandenkollektiv**

Die Anzahl des Probandenkollektivs spielt eine wesentliche Rolle bei der Durchführung von Interventionsstudien. Einerseits sind Studien mit großen Probandenzahlen essentiell für die Aussagekraft einer Studie, allerdings kann dies auch größere Abweichungen innerhalb der Teilnehmer bedeuten.

In den meisten Fällen können Probanden nicht als ihre eigene Kontrollgruppe auftreten, und damit bedarf es höherer Studienteilnehmerzahlen. Es zeigte sich, dass das Verhältnis zwischen der Anzahl der Variablen und die Anzahl der Proben ein sehr wichtiger Faktor für die Ergebnisse der Validierung ist, und dass höhere Fehlerquoten auftreten, wenn die Zahl der Proben sinkt [WAGNER et al., 2007].

### 2.1.7 Variation/Stabilität des Messgeräts

Es ist erforderlich, dass wiederholte Messungen der gleichen Probe (quality control samples) stattfinden, um die Stabilität der LC-MS Analysen mit der Zeit zu überprüfen. Die Messung der zu untersuchenden Proben kann als annehmbar angesehen werden, wenn sich die Schwankungen bei der Qualitätskontrolle innerhalb angemessener Grenzen befindet (relative Standardabweichung von weniger als 15 bis 20%) [LUTZ et al., 2008]. Im Allgemeinen erfordern feine metabolische Veränderungen - welche bei Ernährungsstudien beobachtet werden - sowie große interindividuelle Variationen im menschlichen Stoffwechsel die Verwendung von Techniken mit hoher Reproduzierbarkeit wie NMR-Spektroskopie, denn diese bedarf wenig Probenvorbereitung bzw. -aufarbeitung. Methoden der UPLC-MS und GC-MS sind sensitiver in der Erfassung von Veränderungen niedrigerer Metabolitenkonzentrationen, jedoch auch anfälliger für analytische Variationen. Die Probenvorbereitung und die chromatographischen Methoden von UPLC-MS können daher einen Einfluss auf die analytische Reproduzierbarkeit ausüben, sodass die analytischen Schwankungen möglicherweise größere Auswirkungen als die Biologischen haben könnten [LEGIDO-QUIGLEY et al., 2009]. Doch das Hauptproblem bei der Anwendung von NMR-Techniken ist die geringe Sensitivität. Um dieses Problem zu bewältigen, werden zunehmend sensitive LC-MS Methoden eingesetzt, vor allem für das Screening von humanen Biofluid-Proben. Die Komplexität der Urinproben macht Analysen schwierig und Ionenunterdrückung stellt einen Nachteil der LC-MS Methoden dar, insbesondere bei der Anwendung von Elektrosprayionisation in Kombination mit der Messung von „fullscans“. Möglichkeiten, um diese Problematik zu umgehen, bestehen in der Extraktion der Metaboliten vor der Analyse und die Verwendung von spezifischem Säulenfüllmaterial. Wagner et al wandte in einer Studie einen völlig anderen Ablauf bzw. Vorbereitung an, nämlich on-line Probenanreicherung sowie Reinigung mit einer Säulen-Schalteinheit. Da in Urinproben des Öfteren unterschiedliche Salzgehalte und pH-Werte beobachtet werden, welche zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Ionensuppression führen kann, wurden die Proben angesäuert (pH 1 – 2), um diese Effekte zu vermeiden. Die Anwendung der on-line Probenanreicherung und der Reinigung mittels einer Säulen-Schalteinheit sowie die Ansäuerung der Proben können eine Abnahme der Ionenunterdrückung bewirken und damit kann eine signifikante

Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses - verbunden mit mehreren Signalen pro Probe - erzielt werden [WAGNER et al., 2007].

### **2.1.8 „Snapshots“**

Studien mit Metabolomics konzentrierten sich bis vor kurzem auf die Messung von metabolischen „snapshots“ von einzelnen Proben, welche durch unkontrollierte Variablen erkennbar beeinflusst werden. Ein großer Nachteil solcher Versuche zeigt sich durch die tägliche Variabilität. Eine Möglichkeit, diese täglichen Schwankungen zu eliminieren bzw. einzuschränken, kann durch vielfache Probensammlung erfolgen. Diese basiert auf der Identifikation eines einzelnen metabolischen Fingerabdrucks, gebildet durch den invarianten Teil mehrerer Proben einer einzelnen Person. Die Verfügbarkeit solcher Metabotypen, welche charakteristisch für Einzelne sind, kann grundlegend für Versuche der Nutrigenomik sein [ASSFALG et al., 2008].

### **2.1.9 Datenauswertung**

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA – Principal Component Analysis) ist ein multivariates statistisches Instrument, mit dem Datensätze aus einer großen Anzahl von Variablen analysiert werden können [WALSH et al., 2006]. PCA analysiert eine Datentabelle von mehreren abhängigen Variablen, die im Allgemeinen interkorreliert sind. Ziele der PCA sind die Extraktion der wichtigsten Informationen aus der Datentabelle, die Komprimierung der Datengröße, die Vereinfachung der Beschreibung des Datensatzes und die Analyse der Beobachtungen sowie der Variablen. Zur Umsetzung dieser Ziele erfolgt durch Anwendung der PCA eine Berechnung neuer Variablen, genannt Hauptkomponenten, welche als lineare Kombinationen aus den ursprünglichen Variablen stammen. Die erste Hauptkomponente ist erforderlich, um die größtmögliche Varianz zu erhalten. Die zweite Komponente wird orthogonal zur ersten Komponente berechnet und hat die größtmögliche Trägheit. Die Berechnung der anderen Komponenten erfolgt auf die gleiche Weise. Die Werte dieser neuen Variablen werden als „factorscores“ bezeichnet. Diese „factorscores“ können geometrisch als die Projektionen der Beobachtungen auf die Hauptkomponenten interpretiert werden [ABDI und WILLIAMS, 2010].

## **2.2 Zucker und Süßstoffe**

### **2.2.1 Allgemeines über Kohlenhydrate**

Kohlenhydrate stellen eine Gruppe natürlich auftretender Substanzen mit unterschiedlicher Süßkraft dar, welche aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff zusammengesetzt sind [MARIE und PIGGOTT, 1991]. Saccharide oder Kohlenhydrate sind Polyhydroxyaldehyde (Aldosen) oder Polyhydroxyketone (Ketosen) und entsprechen meist der allgemeinen Summenformel  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . Die Arten der Kohlenhydrate variieren durch die Anzahl der Kohlenstoffatome im Grundmolekül und der stereochemischen Konfiguration des Wasserstoff- und Sauerstoffatoms innerhalb des Moleküls. Einen Beitrag leisten Kohlenhydrate in der allgemeinen Ernährung, indem sie die Zellen mit 4 kcal Energie/g KH versorgen. Die Einteilung erfolgt in drei Hauptgruppen, welche als Monosaccharide, Disaccharide und Polysaccharide bezeichnet werden. Für die Ernährung bedeutsame Monosaccharide stellen die Hexosen Glukose, Fruktose und Galaktose dar. Disaccharide bestehen aus zwei chemisch miteinander verbundenen Monosacchariden. Zu den am häufigsten in Lebensmitteln vorkommende Disaccharide zählen Saccharose, Maltose und Laktose. Letzteres ist auch unter dem Namen Milchzucker bekannt und setzt sich aus Glukose und Galaktose zusammen, Maltose besteht aus zwei Glukose-Einheiten und findet sich nur während der frühen Phasen der Keimung. Polysaccharide sind komplexe Kohlenhydrate mit einer Vielzahl an Monosacchariden, angeordnet in einer geraden oder verzweigten Struktur. Von Bedeutung für die Ernährung sind Stärke, Ballaststoffe und Glykogen. Zusammengesetzt ist Stärke aus vielen miteinander verbundenen Glukose-Molekülen, welche von 400 bis einigen Hunderttausenden reichen können. Es dient in Pflanzen als Speicherform von Glukose. Samen zählen zur reichsten Stärkequelle [KRETCHMER und HOLLENBECK, 1991].

### **2.2.2 Saccharose**

Saccharose, besser bekannt unter der Bezeichnung Tafelzucker, ist das am weitesten verbreitete Disaccharid. Die Verbindung setzt sich aus den Hexosen Glukose und Fruktose zusammen [KRETCHMER und HOLLENBECK, 1991]. Rund 60 % der Saccharose wird aus dem Zuckerrohr und 40 % aus Zuckerrüben gewonnen

[KRETCHMER und HOLLENBECK, 1991; MARIE und PIGGOTT, 1991]. Zucker findet sich im Saft der meisten Früchte und einigen Wurzelgemüsen, vor allem in der Zuckerrübe *Beta vulgaris*, welche zu den Pflanzen der gemäßigten Klimazone zählt. Es kommt im Pflanzensaft vieler Bäume, wie dem amerikanischen Zuckerahorn *Acer saccharum*, dem Johanniskrautbaum *Ceratonia siliqua* und bestimmten Palmen vor. Ebenso befindet sich Zucker im Stamm und Wurzeln vieler Gräser, insbesondere im subtropischen kontinentalen Gras, dem Zuckerrohr *Saccharum officinarum* [MARIE und PIGGOTT, 1991].

### 2.2.3 Polyole bzw. Zuckeralkohole

Zuckeralkohole unterscheiden sich von den Sacchariden durch die Reduktion der Aldehyd- oder Ketonfunktion. Einige Polyole sind in der Natur zu finden, vorwiegend im Gemüse, Zuckeralkohole werden aber weitgehend industriell gefertigt. Die Substitution zu einem Zucker von einer Alkohol-Funktion anstelle einer Aldehyd- oder Ketongruppe wandelt eine zyklische Form in eine Lineare um. Dadurch erlangen Polyole eine höhere chemische Stabilität und eine höhere Affinität zu Wasser. Weiters erhalten Zuckeralkohole eine geringere Kapazität zur Kristallisation und sie verlieren die Eigenschaft, eine Maillard-Reaktion zu verursachen [MARIE und PIGGOTT, 1991].

Die chemische Struktur von Zuckeralkoholen ermöglicht eine Klassifikation in:

1. hydrierte Monosaccharide:
  - Sorbit
  - Mannit
  - Xylit
2. hydrierte Disaccharide:
  - Isomalt
  - Maltit
  - Laktit
3. eine Mischung aus hydrierten Sacchariden und Polysacchariden:
  - hydrierter Glukosesirup [MARIE und PIGGOTT, 1991].



<b>Natürliche Zuckeraustauschstoffe</b>	<b>Mal süßer als Saccharose (nach Gewicht)</b>	<b>Mal süßer als Saccharose (Nahrungsenergie)</b>	<b>Energiedichte von Saccharose</b>
<b>Isomalt</b>	0.45 – 0.65	0.9 – 1.3	0.5
<b>Lactit</b>	0.4	0.8	0.5
<b>Maltit</b>	0.9	1.7	0.525
<b>Mannit</b>	0.5	1.2	0.4
<b>Xylit</b>	1	1.7	0.6
<b>Sorbit</b>	0.6	0.9	0.65
<b>Thaumatococcus</b>	2000	-	-
<b>Stevia</b>	250	-	-

Tabelle 1: Süßkraft natürlicher Zuckeraustauschstoffe

[TANDEL, K. R.,2011]

## 2.2.4 Metabolismus von Zucker und Zuckeralkoholen

### 2.2.4.1 Verdauung und Absorption

Stärke und Disaccharide werden im Darm von Enzymen, welche in Pankreas und im Darm sezerniert werden, verdaut. Die Vollständigkeit der Digestion im Dünndarm hängt von der Nahrungsquelle ab. Während Stärke aus Reis nahezu vollständig verwertet wird, können 20 % der Stärke aus Bohnen nicht absorbiert werden. Die freigesetzten Monosaccharide werden über die Darmwand durch Diffusion, aktiven Transport oder durch Metabolisierung innerhalb der Darmwand zu Laktat, aufgenommen. In welchem Ausmaß einzelne Nahrungsmittel absorbiert werden, ist abhängig von der Magenentleerung und Verdauung sowie von der Transportzeit durch den Darm und der Wirksamkeit, mit welcher die Darmwand durchquert wird und in den Pfortaderkreislauf gelangt. Ein Test zeigt, dass 50 g Saccharose vollständig absorbiert werden können, ebenso die gleiche Menge Fruktose als 20%ige Lösung. Nur etwa 75 % des Brennwertes von Sorbit und Xylit und 60 % aus Maltit können absorbiert werden. Unverdaute Polyole werden im Dickdarm mit Hilfe von Bakterien zu Metaboliten wie Kohlendioxid, Wasserstoff und Methan fermentiert [MARIE und PIGGOTT, 1991].

### 2.2.4.2 Metabolismus

Glukose spielt eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung eines leicht verfügbaren Substrates für energieerfordernde Prozesse in den meisten Geweben. Es wird durch die Enzyme des Zitratzyklus zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert, ATP wird freigesetzt. Fruktose wird unabhängig von Insulin in der Leber durch das Enzym Fruktokinase rasch phosphoryliert, denn im Gegensatz dazu fehlen den peripheren Geweben die notwendigen Enzyme für den Fruktosestoffwechsel, [MARIE und PIGGOTT, 1991] d.h. die Fruktokinase ist nahezu auf die Leber beschränkt, während die Glukosephosphorylierung ubiquitär ist [KRETCHMER und HOLLENBECK, 1991]. Fruktose-1-Phosphat wird anschließend von der Aldolase zu Triosephosphaten (Glyceraldehyd, Dihydroxyacetonphosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat) gespalten. Diese Zwischenprodukte der Glykolyse-Glukoneogenese werden in der Leber zu Glukose und Glykogen umgewandelt. Etwa 30 % der gebildeten Triosephosphate werden zu Pyruvat und Laktat umgeformt [MARIE und PIGGOTT, 1991].

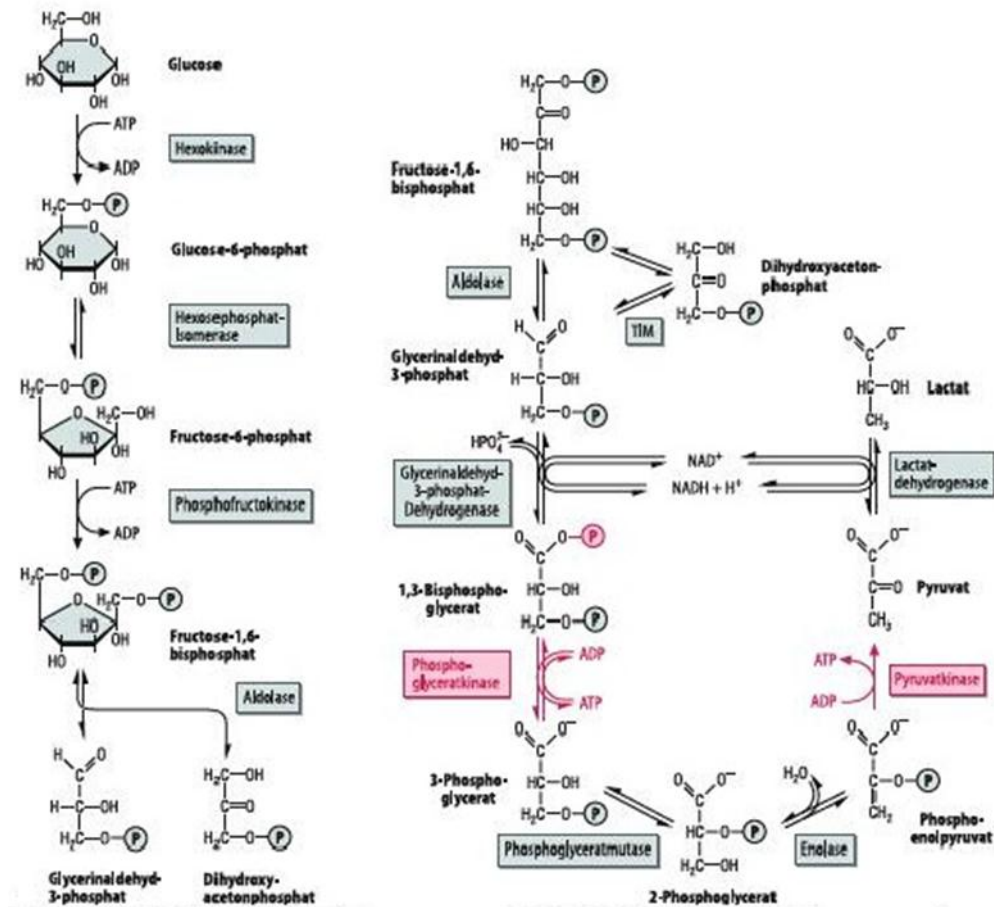


Abbildung 3: Kohlenhydratstoffwechsel

[LÖFFLER, G. et al. 2007]

### 2.2.5 Metabolische Eigenschaften von Zuckeralkoholen

Alle Zuckeralkohole werden langsam und unvollständig absorbiert. Die absorbierte Menge stellt weniger als die Hälfte der zugeführten Dosis dar, und nur der Teil, der verwendet wurde, um Glukose oder Glykogen aufzubauen produziert einen Bedarf an Insulin. Alle nichtabsorbierten Polyole werden von der Darmflora hauptsächlich zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut, wobei Acetat das am quantitativ wichtigsten Fermentationsendprodukt repräsentiert. Acetat wird leicht aus dem Darm absorbiert, allerdings wird es über den Zitratzyklus oxidiert und nicht als Vorstufe für Glukose verwendet. Zuckeralkohole bewirken somit nur einen geringen oder keinen Anstieg von Glukose und Blutinsulin nach oraler Belastung [KRETCHMER und HOLLENBECK, 1991].

### 2.2.6 Künstliche Süßstoffe

Chemisch gesehen stellen künstliche Süßstoffe eine sehr vielfältige Gruppe dar, von Aminosäuren (Aspartam) bis hin zu halogenierten Zuckern wie Sucralose reichend. Darüber hinaus ergeben sich innerhalb dieser Gruppe signifikante Unterschiede bezüglich deren Süßkraft. Während Cyclamat etwa 30mal süßer als Saccharose ist, verzeichnet Alitam eine 2000-fache Süßkraft bezogen auf Zucker. Die Süße ist jedoch subjektiv zu betrachten und abhängig von einer Vielzahl an Faktoren, einschließlich Temperatur, pH-Wert, des verwendeten Mediums, der Konzentration des Süßstoffes und des Geschmacksempfindens [MARIE und PIGGOTT, 1991].

<b>Künstlicher Zuckerersatz</b>	<b>Mal süßer als Saccharose (nach Gewicht)</b>	<b>Zulassung durch FDA</b>	<b>Akzeptierte tägliche Aufnahme [ADI (mg/kg KG/Tag)]</b>
<b>Alitam</b>	2000	anstehende Zulassung	-
<b>Acesulfam K</b>	200	1088	15
<b>Cyclamat</b>	30	verboten 1969, bevorstehende Wieder- Genehmigung	-
<b>Aspartam</b>	160 – 200	1981	40
<b>Neotam</b>	8000	2002	18
<b>Saccharin</b>	300	1958	5
<b>Sucralose</b>	600	1998	zugelassen für den Einsatz unter vorläufiger Regelung

Tabelle 2: Süßkraft künstlicher Süßstoffe

[TANDEL, K.R., 2011]

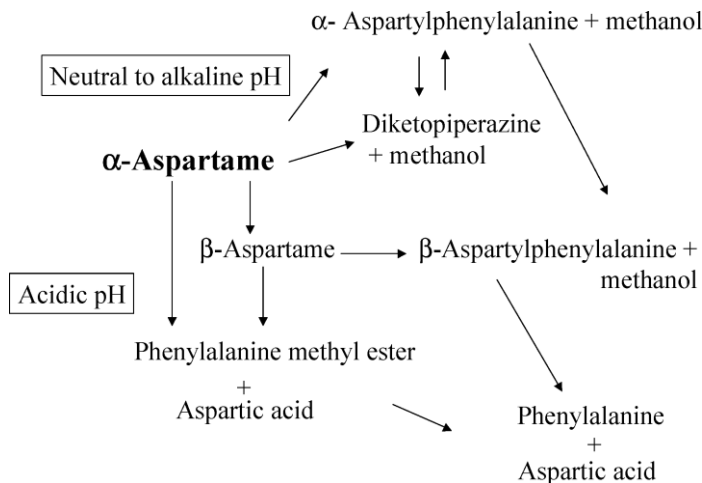
### 2.2.7 Süßstoffe und Energieaufnahme

Menschen assoziieren den süßen Geschmack mit Nahrungsenergie und verbinden daher die Sinneswahrnehmung „süß“ als eine Art Belohnung. Die angeborene Akzeptanz zur Süße scheint eine Vielfalt an zentralen Mechanismen zu involvieren, darunter Dopamin, Serotonin und endogene Opioidpeptide. In den vergangenen hundert Jahren verzeichnet der Zuckerkonsum einen drastischen Anstieg, wobei der höchste Beitrag zuckerhaltigen Getränken zugeschrieben werden kann.

Derzeit sind fünf Süßstoffe durch die US Food and Drug Administration genehmigt, zu diesen zählen Acesulfam-K, Aspartam, Neotam, Saccharin und Sucralose. Neben diesen Süßstoffen ist in der Europäischen Union zusätzlich der Süßstoff Cyclamat zugelassen [BELLISTE und DREWNOWSKI, 2007]. Saccharin ist der erste künstlich hergestellte Süßstoff, synthetisiert von Remsen und Fahlberg im Jahr 1879. Neben seiner hohen Süßkraft, ist Saccharin auch für seinen bitteren Nachgeschmack bekannt. Durch die Zulassung von Cyclamat in den 1950er Jahren konnte der bittere Geschmack durch Mischung beider Süßstoffe verbessert werden. Im Jahr 1981 erfolgte die Genehmigung von Aspartam. Die neuen Süßstoffe, zu denen Acesulfam-K, Sucralose, Alitam und Neotam zählen, besitzen ebenfalls ähnliche Limitationen. Der Geschmack ist häufig mit einem bitteren und metallischen Beigeschmack verbunden und bietet nicht das voluminöse Mundgefühl wie Saccharose. Die Kombination mehrerer synergistischer Süßstoffe führte zu einer Verbesserung der Qualität gesüßter Produkte [WEIHRAUCH und DIEHL, 2004]. Obwohl künstliche Süßstoffe eine sehr hohe Süßkraft aufweisen, ist ihr Beitrag zur Energieaufnahme vernachlässigbar. Während die Aufnahme einer Glukoselösung zu einer Abnahme der Aktivität des oberen Hypothalamus führt, zeigt eine gleich süße Aspartamlösung bzw. klares Wasser nicht denselben Effekt. Im Gegensatz zu Glukose wird Aspartam insulinunabhängig verstoffwechselt und besitzt nicht die gleichen Auswirkungen auf das Gehirn und den Pankreas wie Zucker. Differenzen bezüglich des Ernährungsverhaltens des Menschen auf Sättigung, Energieaufnahme und Süße von Zucker und Süßstoffen werden in der wissenschaftlichen Literatur zwiespältig betrachtet [BELLISTE und DREWNOWSKI, 2007].

### 2.2.8 Aspartam

Aspartam wurde 1965 durch Zufall von James Schlatter, einem Chemiker des pharmazeutischen Unternehmens G.D. Searle entdeckt, als er an der Entwicklung einer Substanz gegen Magengeschwüre arbeitete. Der Süßstoff ist, verglichen mit Saccharose, etwa 160 bis 180mal süßer und verfügt über einen klaren Süßgeschmack, dennoch zeigt Aspartam einen langsameren und schleichenden Wirkungseintritt [AGER et al., 1998]. Aspartam besitzt einen kalorischen Wert von 4 kcal/g, allerdings auf Grund der hohen Süßkraft ist die zum Süßen benötigte Menge relativ gering und somit der kalorische Beitrag unbedeutend [AGER et al., 1998]. Es ist sehr stabil unter trockenen Bedingungen [MAGNUSON et al., 2007] und schwer löslich in Wasser (etwa 3 g/100 ml, pH 3, Raumtemperatur). Seine Löslichkeit kann durch einen höheren oder niedrigeren pH, als auch durch steigende Temperaturen verbessert werden. Der Abbau der Verbindung steigt jedoch unter denselben Verhältnissen [AGER et al., 1998]. Ein hoher pH-Wert, erhöhte Temperaturen sowie lange Lagerbedingungen können zur Zyklisierung zum Diketopiperazin Cycloaspartylphenylalanin und kleiner Mengen von  $\beta$ -Aspartam führen. Diketopiperazine sind auch herkömmliche Bestandteile der Nahrung, wie z.B. in proteinreichen Nahrungsmitteln wie Käse, Kakao, in Kaseinhydrolysaten und in Röstmalzen beim Brauen. Die Exposition von Diketopiperazin aus Aspartam in Produkten ist aufgrund des Verlustes der Süßkraft des Produkts limitiert. Tierexperimente und Studien am Menschen belegen, dass Diketopiperazin schlecht absorbiert und nicht von Säugetier-Enzymen metabolisiert und rasch mit dem Urin ausgeschieden wird.  $\beta$ -Aspartyldipeptide werden durch Umlagerung von  $\alpha$ -Aspartyldipeptiden gebildet, können aber auch von Nierenenzymen synthetisiert werden. Mindestens 14  $\beta$ -Aspartyldipeptide und 6  $\beta$ -Aspartyltripeptide wurden im menschlichen Urin identifiziert.  $\beta$ -Aspartylphenylalanin, die freie Säure von  $\beta$ -Aspartam wurde ebenfalls in Plasma- und Urinproben von gesunden Probanden, ohne Konsum von Aspartam, identifiziert [BUTCHKO et al., 2002]. Das Stabilitätsmaximum von Aspartam in wässriger Lösung liegt bei einem pH von 4,3. Bei niedrigeren pH-Werten kommt es zu einer raschen Reduktion der Halbwertszeit von Aspartam [AGER et al., 1998].

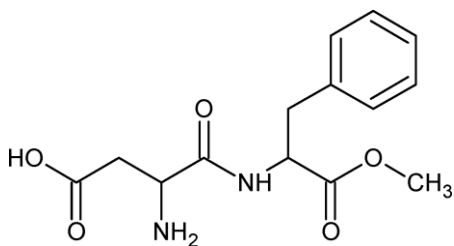


**Abbildung 4: Abbauprodukte von Aspartam**

[MAGNUSON et al., 2007]

### 2.2.8.1 Chemische Struktur und Synthese von Aspartam

Aspartam ist ein Dipeptid und aus den beiden Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin aufgebaut. Seine Herstellung involviert die Dehydratation von Asparaginsäure, um ein Säureanhydrid zu formen, welches anschließend mit Phenylalanin oder seinem Methylester zum Endprodukt umgesetzt wird [AGER et al., 1998].



**Abbildung 5: Chemische Struktur von Aspartam ((N-L- $\alpha$ -Aspartyl-L-phenylalanin 1-methylester)**

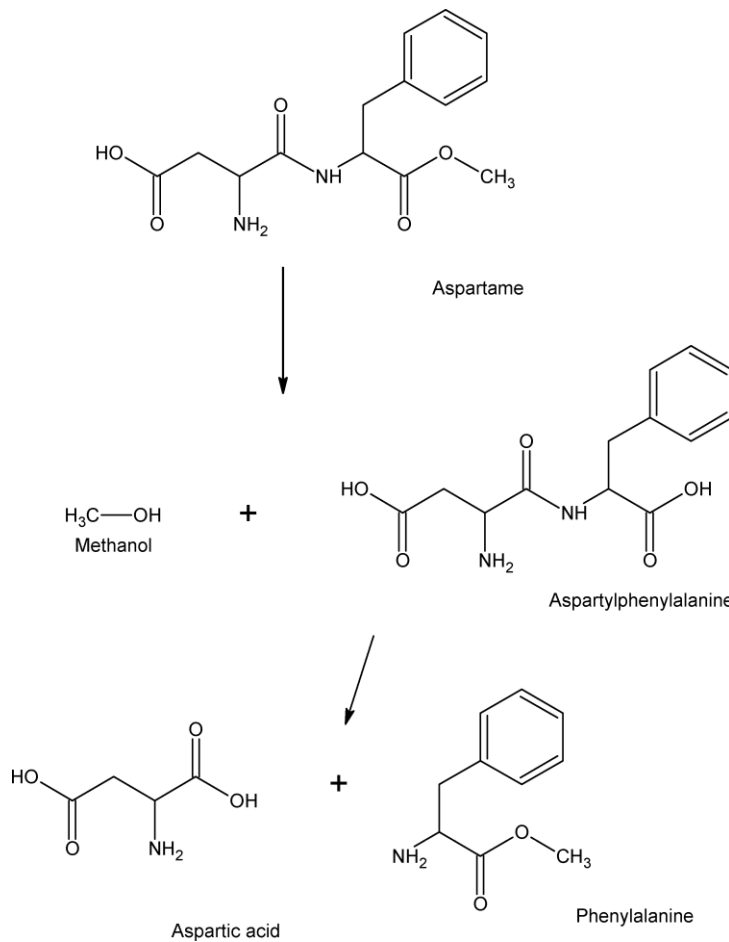
[MAGNUSON et al., 2007]

### 2.2.8.2 Metabolismus von Aspartam

Eine intensive Erforschung der intestinalen Absorption und des Metabolismus von Aspartam erfolgte an Schweinen, Primaten, Nagetieren sowie am Menschen. Alle untersuchten Arten metabolisieren Aspartam im Gastrointestinaltrakt durch Esterasen

und Peptidasen in drei Komponenten, nämlich in die beiden Aminosäuren Asparaginsäure und Phenylalanin sowie Methanol. Aspartam kann vollständig im gastrointestinalen Lumen in diese drei Verbindungen hydrolysiert werden und in den allgemeinen Kreislauf abgegeben werden, oder es kann zu Methanol und dem Dipeptid Aspartylphenylalanin hydrolysiert werden. In diesem Fall wird das Dipeptid in die Zellen der Magen-Darm-Schleimhaut absorbiert und dann in seine Aminosäuren gespalten. Weiters kann dieser Zuckerersatzstoff auch vor der Hydrolyse in den Schleimhautzellen absorbiert und innerhalb der Zelle in seine Komponenten gespalten werden und anschließend in den Kreislauf gebracht werden. Die vorhandenen Daten zeigen, dass Aspartam nicht vor der Hydrolyse in den Blutkreislauf gelangt [MAGNUSON et al., 2007].





### Abbildung 6: Metabolismus von Aspartam

[MAGNUSON et al., 2007]

Stoffwechselstudien am Menschen zeigen, dass Aspartam zu Aspartat, Phenylalanin und Methanol abgebaut wird. Weder Aspartam noch Aspartylphenylalanin konnten nach Verabreichung einer einmaligen Dosis von 200 mg/kg KG oder nach wiederholter oraler Gabe von 10 mg/kg KG/h für 8 Stunden im Blut nachgewiesen werden. Der Stoffwechsel der gespaltenen Komponenten von Aspartam ist identisch mit dem Abbau dieser Komponenten aus anderen Nahrungsmitteln. Nach teilweiser Umwandlung zu Tyrosin durch die hepatische Phenylalaninhydroxylase gelangt Phenylalanin aus dem Portalblut in den freien Aminosäurenpool. Aspartat wird in den Enterozyten metabolisiert, wodurch über Transaminierung Oxalacetat hergestellt wird. Dadurch reduziert sich die Konzentration an Aspartat, welche in den Pfortaderkreislauf und in den freien Aminosäurenpool gelangt. Die Metabolisierung von Methanol zu Formaldehyd erfolgt bei Primaten und beim Menschen durch die

Alkoholdehydrogenase. Die weitere Oxidierung zur Ameisensäure durch die Formaldehydhydrogenase findet sehr rasch statt, denn Formaldehyd weist eine Halbwertszeit von nur ein bis zwei Minuten auf, sodass es zu keiner Akkumulation von Formaldehyd kommen kann. Die Ameisensäure wird letztlich über die Bildung von 10-Formyltetrahydrofolat zu CO<sub>2</sub> und Wasser umgewandelt [MAGNUSON et al., 2007].

### **2.2.8.3 Vergleich der Aufnahme von Methanol über Aspartam und über natürliche Quellen**

Der Mensch gelangt über eine Vielzahl an Quellen mit Methanol in Kontakt, denn Methanol kommt natürlich als Bestandteil im Blut, Urin, Speichel und der ausgeatmeten Luft, sowie in Nahrungsmitteln wie frischen Früchten und Säften, Gemüse und vergorenen Getränken als auch durch endogene Produktion von Verbindungen wie Pektin vor. Die Menge an Methanol, welche durch den Verzehr aspartamhaltiger gesüßter Getränke resultiert, wird auf 55 mg Methanol/L geschätzt. Im Vergleich dazu nimmt man durch den Konsum von Fruchtsäften bis zu 680 mg Methanol/L und Zitrusfrüchten bis zu 180 mg Methanol/L auf [MAGNUSON et al., 2007].

### **2.2.8.4 Aspartam und Phenylketonurie**

Personen mit der selten auftretenden Erbkrankheit PKU (Phenylketonurie) haben eine stark eingeschränkte Fähigkeit Phenylalanin zu metabolisieren und weisen folglich extrem hohe Plasma-Phenylalanin-Konzentrationen auf. Wenn diese Störung nicht erkannt wird und diätetische Einschränkungen von Phenylalanin nicht rechtzeitig eingeleitet werden, können eine Vielzahl an schweren Entwicklungsstörungen sowie neurologischen Folgeerscheinungen auftreten. Personen, welche heterozygot für PKU sind (PKUH), sind Träger dieser Erkrankung und deren Stoffwechsel von Phenylalanin ist etwas vermindert. Allerdings gibt es keine diätetische Einschränkung von Phenylalanin für Personen mit PKUH und sie weisen ebenso keine neurologischen Folgeerscheinungen auf. Umfangreiche Stoffwechselstudien mit PKUH haben gezeigt, dass Aspartam, auch in Mengen weit über der 90. Perzentile als sicher gelten. Darüber hinaus zeigen Toleranzstudien und detaillierte Auswertungen der Gehirnfunktion in

dieser Gruppe keine nachteiligen Auswirkungen von Aspartam [BUTCHKO et al., 2002].

### 2.2.8.5 Sicherheit und Zulassung von Aspartam

Auf Basis der Evaluierung von Sicherheitsbewertungsstudien wurde Aspartam im Jahr 1981 durch die FDA (US Food and Drug Administration) zugelassen, mit einem empfohlenen ADI-Wert (acceptable daily intake) von 20 mg/kg KG. Dieser ADI basiert auf den NOEL-Werten (no observed effect Level) präklinischer Studien mit 2000 bis 4000 mg Aspartam/kg KG. Aufgrund weiterer klinischer Studien erfolgte 1984 eine Erhöhung des ADI-Wertes durch die FDA auf 50 mg/kg KG. Die Empfehlung der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) für den ADI von Aspartam liegt bei 40 mg/kg KG [MARIE und PIGGOTT, 1991]. Im Jahr 2006 bestätigte die EFSA den etablierten ADI der JECFA [MAGNUSON et al., 2007]. Zwei Jahre nach Zulassung von Aspartam wurde die Anwendung in kohlenensäurehaltigen Getränken eingeführt und im Jahr 1993 kam es zum Einsatz in Backwaren, Süßigkeiten und insbesondere in Getränken, sowie in vielen weiteren Produkten [AGER et al., 1998].

Date of discovery and approval of currently marketed nonnutritive sweeteners (NNS) and their Acceptable Daily Intake (ADI)<sup>1</sup>

Sweetener	Year discovered	Year approved for use in foods	JECFA ADI <i>mg/kg body wt</i>	EFSA ADI <i>mg/kg body wt</i>	FDA ADI <i>mg/kg body wt</i>	NFI DVFA <i>mg/kg body wt</i>
Acesulfame-K	1967	1988	15	9	15	40
Aspartame	1965	1981	40	40	50	15
Cyclamate	1937	1958	111	7	NA <sup>2</sup>	11
Saccharin	1879	1977	5	5	5	5
Sucralose	1976	1998	15	15	5	15
Neotame	1965	2002	0-2	1	18	

<sup>1</sup> JECFA, Joint Commission of Experts on Food Additives of the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization; EFSA, European Food Safety Agency; FDA, Food and Drug Administration; DVFA, Danish Veterinary and Food Administration; NA, not available.

<sup>2</sup> Cyclamate has been banned in the United States since 1969.

### Abbildung 7: Entwicklung und Zulassung nicht-nutritiver Süßstoffe

[MATTES UND POPKIN, 2009]

### 2.2.8.6 Toxikologische Bewertung von künstlichen Süßstoffen

Eine Blasenkrebs-induzierende Wirkung von Saccharin und Cyclamat aus tierexperimentellen Studien an Ratten konnte durch epidemiologische Studien am

Menschen nicht bestätigt werden. Trotz einiger eher nichtwissenschaftlicher Annahmen gibt es keine Hinweise, dass Aspartam karzinogene Eigenschaften besitzt. Ein erhöhtes relatives Risiko von 1,3 zeigten Fall-Kontroll-Studien durch sehr hohe Aufnahmemengen ( $> 1,7$  g/Tag). Da viele Produkte nicht nur mit einem Süßstoff versehen sind, sondern mit mehreren Zuckerersatzstoffen kombiniert werden, gestaltet sich die Beurteilung des karzinogenen Risikos eines einzelnen Süßstoffes schwierig [WEIHRAUCH und DIEHL, 2004].

Neue wissenschaftliche Studien über die Auswirkungen von Aspartam auf die Gesundheit wurden kürzlich publiziert. Die Verabreichung hoher Aspartam-Dosen über das Futter an Tieren während der gesamten Lebensdauer führte bei männlichen Mäusen zum Auftreten von Leber- und Lungenkrebs. Keine kanzerogenen Eigenschaften konnten bei weiblichen Mäusen festgestellt werden [SOFFRITTI et al., 2010]. Die EFSA führte eine Bewertung über diese Studie durch, diese erfolgte auf Basis der verfügbaren Informationen und sie kam zu dem Ergebnis, dass sowohl die Validität der Studie als auch der statistische Ansatz nicht überprüft und die Ergebnisse nicht interpretiert werden können. Darüber hinaus, können im Hinblick auf die allgemein anerkannten Mängel der Relevanz für die menschliche Risikobewertung die publizierten Ergebnisse von SOFFRITTI et al. 2010 keine wissenschaftlichen Beweise für genotoxische und karzinogene Eigenschaften des Süßstoffes liefern [Statement of EFSA, 2011a]. Eine prospektive Kohortenstudie aus dem Jahr 2010 zeigt einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme gesüßter Getränke und dem Auftreten von Frühgeburten [HALLDORSSON et al., 2010]. Laut EFSA liegen keine Beweise für eine kausale Verbindung zwischen dem Konsum künstlich gesüßter Getränke und Frühgeburten vor. Weitere Studien sind erforderlich, um einen Zusammenhang bestätigen oder ablehnen zu können [Statement of EFSA, 2011a].

## 2.3 Stevia

### 2.3.1 Die Gattung Stevia

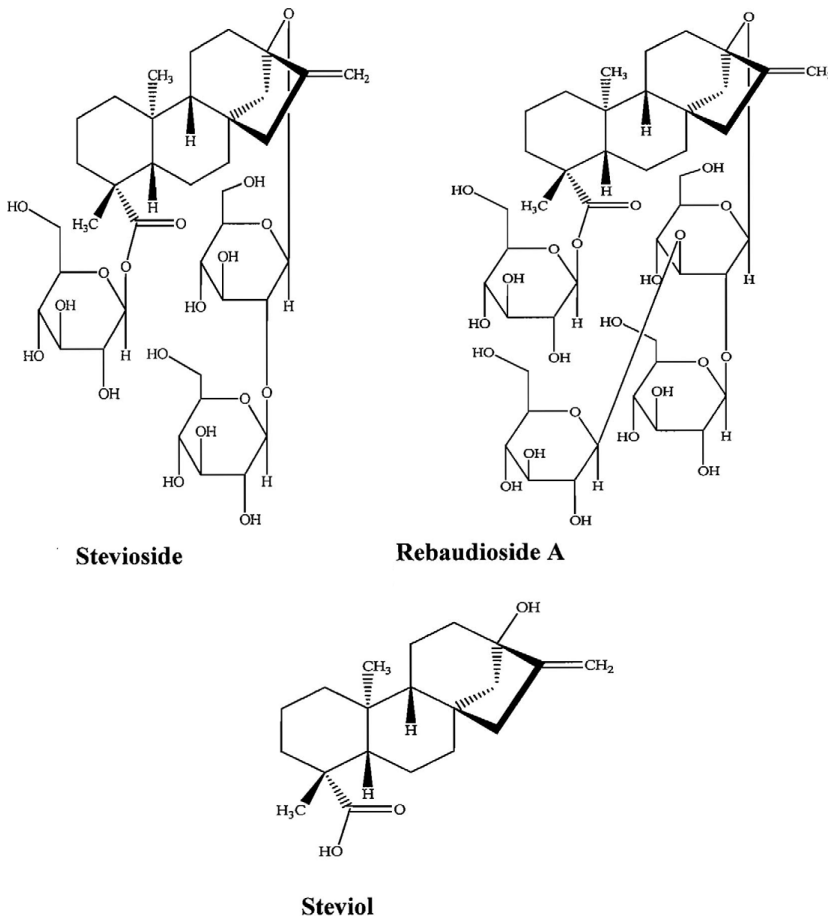
Das Verbreitungsgebiet der Gattung Stevia erstreckt sich über den Süden der Vereinigten Staaten, Argentinien und dem brasilianischem Hochland, durch Mexiko, den zentralamerikanischen Staaten und den südamerikanischen Anden. Innerhalb der Gattung wird die Anzahl der Arten auf 150 bis 300 geschätzt. Die reichste Quelle von Steviosiden und verwandten Verbindungen stellt allein Stevia rebaudiana dar, und keiner der anderen Arten aus dieser Gattung kann hohe Konzentrationen solcher Verbindungen produzieren [BRAHMACHARI et al., 2011].

### 2.3.2 Stevia rebaudiana (Bertoni)

*Stevia rebaudiana Bertoni* ist ein mehrjähriger Strauch der Familie der *Asteraceae* und wird häufig als „süßes Kraut Paraguays“ bezeichnet [GEUNS, 2003; BRAHMACHARI et al., 2011]. Die Blätter der Stevia-Pflanze enthalten eine komplexe Mischung von mindestens acht süßen Diterpen-Glykosiden, genannt Steviol-Glykoside [GARDANA et al., 2003; WILLIAMS und BURDOCK, 2009] Stevioside und Rebaudioside A stellen die Hauptsüßstoffkomponenten von Stevia dar [GEUNS, 2008; PRAKASH et al., 2008; BRAHMACHARI et al., 2011] und sind etwa 100 bis 300 mal süßer als Saccharose, wobei sich die Intensität der Süßkraft und die Geschmacksprofile voneinander unterscheiden und je nach Konzentration und Umweltfaktoren abweichen können [CARDELLO et al., 1999]. Auch die Ausbeute von Steviosid und Rebaudiosid A kann stark variieren, von ungefähr 5 – 22 % und 1,25 – 12 % des Trockengewichts der Blätter, abhängig von Sorte und Wachstumsbedingungen [WILLIAMS und BURDOCK, 2009]. In niedrigeren Konzentrationen sind Steviolbioside, Rebaudioside B – F und Dulcoside A enthalten [GEUNS, 2003]. Rebaudioside B und Steviolbioside zählen jedoch nicht zu den nativen Bestandteilen der Pflanze, sondern entstehen während des Extraktionsverfahrens [GEUNS, 2003; PRAKASH, 2008].

### 2.3.3 Chemische Struktur

Strukturell gesehen sind Steviosid und Rebaudiosid A sehr ähnlich, wobei letzteres eine zusätzliche Glukose-Einheit enthält [CARAKOSTAS et al., 2008].



**Abbildung 8: Chemische Strukturen der Steviolglykoside Steviosid und Rebaudiosid A und dessen Metabolit Steviol**

[CARAKOSTAS et al., 2008]

### 2.3.4 Einsatz von Stevia

Lange Zeit galt kommerzielles Interesse für die Verwendung von Steviolglykosiden als Süßstoffe. Regulatorische Barrieren aufgrund unzureichender Daten und ungelöster Sicherheitsfragen sowie ein bitterer Nachgeschmack verhinderte die breitere

Vermarktung von Steviolglykosiden. Die Entwicklung dieses Süßstoffes wurde durch eine verwirrende Vielfalt an veröffentlichten Studien mit rohen oder halb gereinigten Proben sowie schlecht definierten oder unterschiedlichen Daten eingeschränkt. Die JECFA etablierte im Jahr 2007 eine Vorschrift, mit dieser Steviolglycosidsüßstoffe aus mindestens 95 % der sieben bekannten Steviolglykosiden bestehen müssen. Rebiana ist eine weit verbreitete Bezeichnung für Steviolglycoside, welche vorwiegend aus Rebaudiosid A zusammengesetzt sind [CARAKOSTAS et al., 2008].

Süßungsmittel aus Stevia sowie die Extrakte der Blätter dieser Pflanze sind dagegen kommerziell erhältlich in Japan, Korea, China, Süd-Ost-Asien und Südamerika, wo sie seit einigen Jahrzehnten zum Süßen für eine Vielzahl von Lebensmitteln einschließlich Getränken eingesetzt werden [KOYAMA et al., 2003a]. Seit 1995 dürfen pulverisierte Stevia-Blätter in den USA als Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden [GEUNS, 2003].

### **2.3.5 Positive Eigenschaften von Steviolglykosiden als Süßstoff**

Die Verwendung von Stevia oder Steviolglykosiden als Süßstoff ist mit einigen Vorteilen verbunden. Es handelt sich um ein natürliches Produkt, welches keine Kalorien enthält. Des Weiteren können die Blätter in deren natürlichen Zustand zum Süßen verwendet werden. Aufgrund der hohen Süßkraft sind geringe Mengen zum Süßen ausreichend und die Pflanze weist ferner keine toxischen Eigenschaften auf. Die Blätter, als auch Steviolglycoside können gekocht werden, sind bei Temperaturen bis zu 200 °C stabil und enthalten einen Lakritz-ähnlichen Nachgeschmack, der häufig als bitter empfunden wird und einen bitteren Beigeschmack, auch bei Getränken, verursacht [GEUNS, 2008].

### **2.3.6 Absorption und Metabolismus**

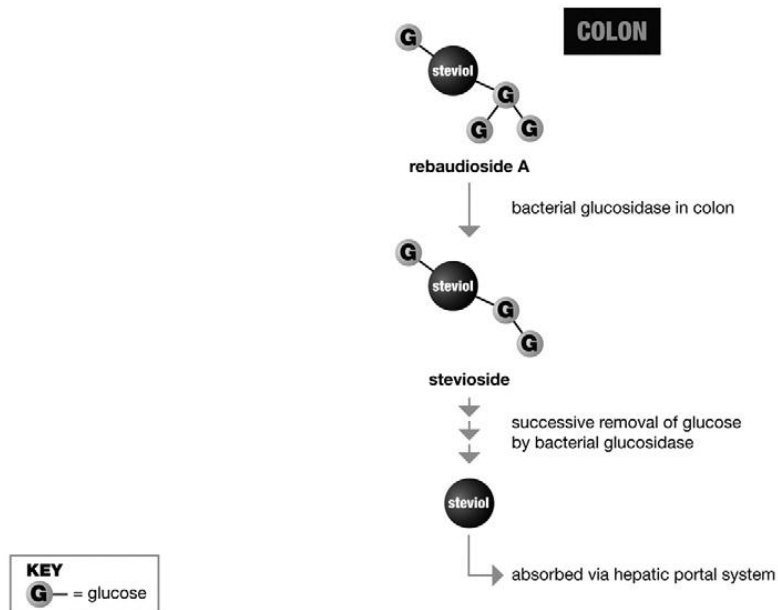
Unter anaeroben Bedingungen wurde in Batch-Kulturen der Einfluss von Steviosid und Rebaudiosid A auf die intestinale Mikroflora mittels Stuhlproben gesunder Probanden untersucht und es erwies sich, dass Stevioside und Rebaudiosid A dabei vollständig zu ihrem Aglykon Steviol hydrolysiert werden, aber Steviol nicht weiter abgebaut wird. Beide Süßstoffe weisen keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der

menschlichen Darmflora auf [GARDANA et al., 2003]. Koyoma et al. bestätigt in einer in vitro Studie den Abbau von Steviosid und Rebaudiosid A zu Steviol in der menschlichen Darmflora unter anaeroben Voraussetzungen [KOYOMA et al., 2003a]. Basierend auf den publizierten Studien der letzten Jahre folgerte die JECFA, dass alle Steviolglykoside in vivo zu Steviol metabolisiert werden. Bisherige Arbeiten an Ratten und Menschen zeigten, dass (1) Stevioside wenig bis gar nicht ins Blut aufgenommen werden, (2) dass bei Ratten einige Metabolite in den enterohepatischen Kreislauf gelangen und (3) dass die Umwandlung von Steviol zu seinen Glukuroniden einen wichtigen Eliminationsweg darstellt. Ebenso ereignet sich der Stoffwechsel von Rebaudiosid A in Ratten und beim Menschen auf die gleiche Weise wie bei Steviosiden. Die Ausscheidung von Steviolglukuroniden bei Ratten erfolgt vor allem durch den Kot über die Gallenwege, während Menschen Glukuronide vorwiegend über den Urin ausscheiden. Dies ist auf unterschiedliche Schwellenwerte des Molekulargewichts beim Menschen und Ratten für die biliäre Ausscheidung von organischen Anionen (Glukuronide), was bei vielen aufgenommenen Stoffen beobachtet wird, zurückzuführen [CARAKOSTAS et al., 2008].



## Absorption, Metabolism and Excretion of Rebaudioside A

### In the colon – breakdown to steviol occurs:



### In the liver of humans and rats:

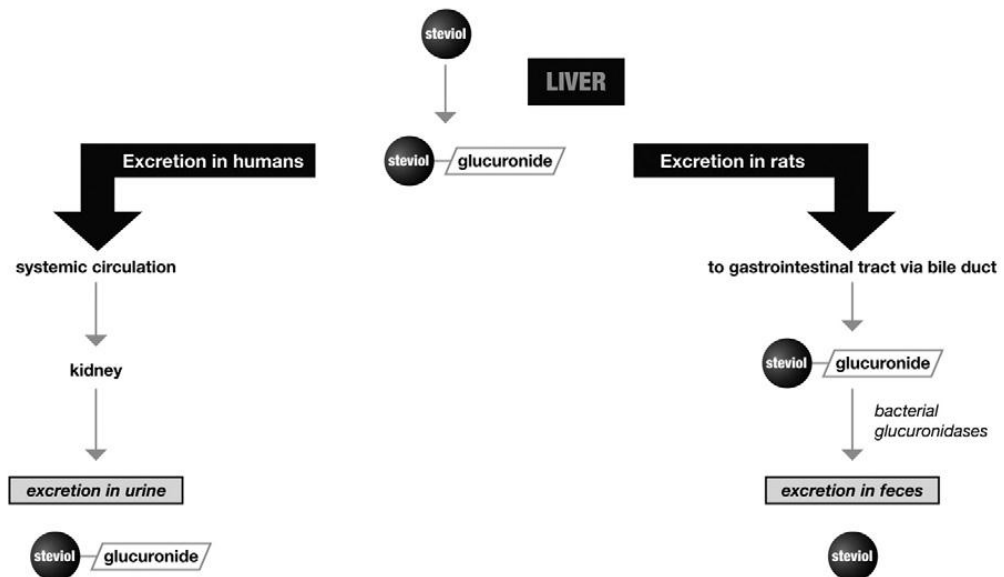


Abbildung 9: Metabolismus von Rebaudioside A beim Menschen und bei Ratten

[CARAKOSTAS et al., 2008]

### 2.3.7 Toxizität von Stevia

#### 2.3.7.1 Genotoxizität bzw. Mutagenität

Die potentielle Genotoxizität von *Stevia rebaudiana* wurde anhand von in vitro und in vivo Studien mit Hilfe eines AMES-Tests, chromosomalen Abberations-Tests, Mauslymphomtests, DNA-Synthese-Tests und Knochenmark-Mikronukleus-Tests gemessen. *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, Mauslymphom und V79-Zellen von chinesischen Hamstern wurden für die in vitro Studie herangezogen, welche mit Konzentrationen an Rebaudiosid A von bis zu 5000 µg/mL für 4 bis 48 Stunden ausgesetzt waren. Rebaudiosid A zeigte keine mutagene Aktivität in jedem der Stämme. Ebenso verursachte der in vivo Maus-Mikronukelus-Test mit Dosen bis zu 750 mg/kg KG, sowie der DNA-Synthese-Test mit männlichen Wistar-Ratten (Dosen bis zu 2000 mg/kg KG) keine genotoxischen Eigenschaften [WILLIAMS und BURDOCK, 2009]. Um das genotoxische Potenzial in eukaryontischen Zellen zu bewerten, wurden DNA-Läsionen unter Anwendung des Comet-Assay (Einzelzellgelelektrophorese) durch orale Verabreichung von Steviosiden analysiert, indem männliche Wistar Ratten 45 Tage mit wässriger Steviosidlösung (4 mg/mL) ad libitum gefüttert wurden. Die Ergebnisse weisen hingegen DNA-Strangbrüche in Blutzellen, Milz, Leber und Gehirn auf, wenn Steviosid subchronisch oral zugeführt wird [NUNES et al., 2007]. Einige Experten bewerteten die Studie von NUNES et al. und interpretierten eine Reihe von methodischen Problemen sowie Schwierigkeiten beim Interpretieren der Daten, einschließlich des Mangels an ausreichenden Kontrollen [CARAKOSTAS et al., 2008].

#### 2.3.7.2 Akute orale Toxizität

Die akute orale Toxizität wurde durch Gabe von Steviosiden mit Konzentrationen von 300 mg/kg KG und 2000 mg/kg KG an Ratten getestet. Es wurden keine Veränderungen bezüglich der Haut, der Augen, des Felles, der Atemwege, des autonomen und zentralen Nervensystems beobachtet. Keines der Tiere zeigte abnormes Verhalten wie Krämpfe, Zittern, Speichelfluss, Lethargie, Durchfall, übermäßigen Schlafkonsum oder Koma. Ebenso konnte kein Gewichtsverlust bei den Tieren festgestellt werden und die pathologische Untersuchung wies ebenfalls keine Anomalien auf [RAJAB et al., 2009].

### **2.3.7.3 Subchronische Toxizität**

Durch orale Verabreichung von wässrigen Extrakten aus Stevia-Blättern wurde an 24 männlichen Wistar Albino Ratten die subchronische Toxizität an 28 Tagen untersucht. Dosen bis zu 2000 mg/kg KG/Tag waren mit keiner subchronischen Toxizität verbunden und können somit für den Menschen als sicher betrachtet werden [RAMANATHAN und SELLAPPAN, 2010].

### **2.3.7.4 Zytotoxizität**

Zytotoxische Eigenschaften von Steviosidpulver wurden am L-929-Stamm von Säugetierkulturzellen überprüft. Das Testmaterial (Steviosidpulver) wurde im Kulturmedium mit 3 verschiedenen Konzentrationen (5 g/L, 2,5 g/L, 1,25 g/L) gelöst. Schwere zytotoxische Reaktionen auf Fibroblasten konnten bei der höchsten Konzentration sowie leichte zytotoxische Eigenschaften bei einer Konzentration von 2,5 g/L festgestellt werden. Die niedrigste Konzentration weist keine Zytotoxizität auf. Die Menge an gereinigtem Steviosid mit einer Konzentration von 1,25 g/L entspricht der Konzentration von 250 bis 350 g Saccharose/L, bezogen auf einer 200 bis 300 mal höheren Süßkraft von Steviosiden als Saccharose. Demzufolge wird bei Konsum von Steviosiden die zytotoxische Grenze nicht überschritten [RAJAB et al., 2009].

### **2.3.7.4 Reproduktionstoxizität und teratogene Toxizität**

Um die teratogene Toxizität und die Reproduktionstoxizität zu erforschen, wurde adulten weiblichen Swiss Albino Mäusen 500 bzw. 800 mg Stevia-Extrakte oder Stevioside pro kg KG innerhalb eines Zeitraumes von 45 Tagen verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt eine Kochsalzlösung. Nahrung und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Weder das Stevia-Extrakt, noch die Stevioside führten zu einer Veränderung des weiblichen Zyklus von Swiss Albino Mäusen. Es konnten keine signifikanten Abweichungen bezüglich der histologischen Merkmale des Uterus und der Eierstöcke zwischen den Gruppen beobachtet werden. Ferner konnten keine groben anatomischen und histopathologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Die Paarung von behandelten Mäusen mit unbehandelten Mäusen hatte keine negativen Auswirkungen auf die Fertilität und ebenso gab es keine großen Unterschiede in der

Anzahl der Föten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass *Stevia rebaudiana* und seine reine Komponente Steviosid als nicht toxisch im Hinblick auf die Fortpflanzung angesehen werden kann [KUMAR und OOMMEN, 2008].

### **2.3.8 Bewertung der EFSA**

Das Gremium für Lebensmittelzusatzstoffe und Lebensmitteln zugesetzte Nährstoffquellen (ANS) hat im April 2010 einen ADI-Wert für Steviolglykoside von 4 mg/kg KG festgelegt. Auf Anfrage der Europäischen Kommission hat die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), eine überarbeitete Abschätzung der Exposition von Steviolglykosiden durch seine Verwendung als Lebensmittelzusatzstoff für Kinder und Erwachsene, basierend auf Referenzwerten, dargestellt. Zur Bewertung der Exposition wurden mehrere Datenbanken über den Lebensmittelverzehr herangezogen. Für Kinder wurden Daten aus dem EXPOCHI-Projekt und aus der UK-NDNS Umfrage verwendet. Die Schätzungen für Erwachsene basierten allein auf Daten des Vereinigten Königreichs. Die mittlere erwartete ernährungsbedingte Exposition von Steviolglykosiden, ausgedrückt als Steviol-Äquivalente, europäischer Kinder (Alter 1-14 Jahre) reicht von 0,4 bis 6,4 mg/kg KG/Tag und bei hohem Konsum gesüßter Getränke 1,7 bis 16,3 mg/kg KG/Tag. Nach Überprüfung umfangreicher Daten durch die EFSA wurde eine Korrektur für den Verbrauch nicht-alkoholischer aromatisierter Getränke (Softdrinks) von Kindern als notwendig erachtet. Die korrigierte Schätzung der Exposition ergibt an der 95. Perzentile einen ADI von 1,0 bis 12,7 mg/kg KG/Tag für Kinder, und unterscheiden sich daher nur geringfügig von den Schätzungen der ANS. Die überarbeitete mittlere Expositionsabschätzung von Steviolglykosiden für Erwachsene ergab einen ADI-Wert von 1,9 bis 2,3 mg/kg KG/Tag, während das ANS-Gremium für diese Population einen ADI von 2,2 bis 2,7 mg/kg KG/Tag ermittelte. Zu den Hauptursachen für die insgesamt zu erwartenden Exposition von Steviolglykosiden beider Populationen werden alkoholfreie aromatisierte Getränke gezählt, sodass es bei hohem Anteil an Softdrinks in der Ernährung in mehreren Ländern zu einer Überschreitung des etablierten ADI von 4 mg/kg KG/Tag führen kann [STATEMENT of EFSA, 2011b].

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Die nachfolgend aufgelisteten Chemikalien, Materialien und Geräte wurden zur Durchführung der Ernährungsinterventionsstudie benötigt.

#### Materialien:

- Spritzen 3 mL von Braun (Melsungen, Deutschland)
- Spritzenfilter Rotilabo®, CME, steril, Porengröße 0,45 µm, Ø außen 33 mm von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Nadeln Sterican®, Ø 0,60 x 30 mm von Braun (Melsungen, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (Eppis) 1,5 mL, Greiner Bio-One GmbH
- Vial, 2 mL, Amber, Agilent Technologies (Deutschland)
- Rotilabo®-Einsätze 100 µL, Borosilikat, Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Snap cap 11 mm, Polypropylen, Agilent Technologies (US)
- Eppendorf Tubes, 1,5 mL, Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen
- Messzylinder 500 mL
- Messkolben 100 mL

#### Chemikalien:

- Wasser, ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG, (Karlsruhe, Deutschland)
- Ameisensäure, ROTIPURAN®  $\geq 98\%$ , p.a., ACS, Carl Roth GmbH & Co KG, (Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG, (Karlsruhe, Deutschland)
- Methotrexat  $\geq 99,0\%$  (HPLC, Sumofenantiomers), Sigma-Aldrich, (Buchs, Schweiz)
- Ammoniumhydrogencarbonat  $\geq 99\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co KG, (Karlsruhe, Deutschland)
- Hippursäure, 98 %, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)
- Acetonitril, ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co KG, (Karlsruhe, Deutschland)
- Argon  $\geq 99,999\%$ , ALPHAGAZ™ Ar<sup>1</sup>, Druck bei 15 °C: 200 bar, Air Liquide Austria GmbH, (Schwechat, Austria)
- Stickstoff

Süßstoffe:

- Rebaudiosid A
- Aspartam
- Saccharose
- Zitronensaft: 100 % Zitronensaft aus Zitronensaftkonzentrat, RAUCH Fruchtsäfte, (Rankweil, Austria)

Geräte:

- Waage: Sartorius ISO 9001 Modell KB BA 100 von Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
- Zentrifuge: Jouan BR4i multifunction Centrifuge von Thermo Electron Corporation Key Write-DTM (Frankreich)
- Heizplatte: IKA® RCT Basic Safety Control
- Konzentrator: Concentrator plus/Vacufuge® plus, Eppendorf AG, (Hamburg, Deutschland)
- Pipetten: Eppendorf Reference® variable (5–200 µL, 100-1000 µL) von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- HPLC: UltiMate 3000 (Dionex, Austria)
- MS: microTOF-Q II (Bruker, Bremen)

### 3.1 Studiendesign

Zur Durchführung der Ernährungsinterventionsstudie wurden stoffwechselgesunde weibliche Probanden gesucht, um anhand von Urinproben Unterschiede des metabolischen Profils innerhalb verschiedener Süßstoffe (Rebaudiosid A, Saccharose und Aspartam) zu ermitteln. Die Probandenrekrutierung erfolgte anhand von Plakaten, Einträgen in Internetforen sowie durch Mundpropaganda. Ausgeführt wurde die Planung und Umsetzung der Interventionsstudie am Department für Ernährungswissenschaften (Emerging Focus Nutrigenomics).

#### Einschlusskriterien zur Teilnahme:

- weiblich
- Alter: 20 - 35 Jahre
- BMI: 18 - 23 kg/m<sup>2</sup>
- Nichtraucher
- Mischköstler
- stoffwechselgesund (keine Allergien, Diabetes, Bluthochdruck,..)
- keine Einnahme von Medikamenten
- keine exzessive sportliche Betätigung während und vor der Teilnahme

Nach Abschluss des Rekrutierungsverfahrens ergab sich ein Probandenkollektiv von insgesamt 29 Teilnehmern, wobei davon 13 Probanden vier Mal die Studie absolvierten (d.h. jeder Proband durchlief jede Intervention: Rebaudiosid A/Saccharose/Aspartam sowie Kontrollgruppe). Die restlichen 16 Probanden dieses Kollektivs nahmen jeweils nur an einer der oben genannten Interventionsgruppen teil, sodass letztlich insgesamt 340 Urinproben zur Metabolomics-Analyse zur Verfügung standen.

#### **3.1.1 Studienablauf:**

Der Studienablauf gliederte sich in insgesamt 4 Tage pro Interventionsgruppe, wobei der erste Tag dazu diente, die Probengefäße sowie das Mittagessen für beide Tage vom Institut abzuholen und eventuell auftretende Fragen bezüglich des Ablaufes bzw. der



Durchführung abzuklären. Die teilnehmenden Probanden wurden dazu angehalten, sowohl am zweiten, als auch am dritten Tag der Studie einen Ernährungsplan – beide Tage enthielten den gleichen Ernährungsplan - einzuhalten, um mögliche auftretende Variationen durch den Einfluss der Ernährung einzuschränken. Am dritten Tag folgte die wesentliche Aufgabe des Probanden durch Sammeln des Urins, als auch durch Intervention mit Süßstoffen. Der Morgenurin wurde in dem dafür vorgesehenen Probengefäß gesammelt und anschließend ein Aliquot dessen ins Labor der Universität Wien (Emerging Focus Nutrigenomics) gebracht. Nach Abgabe der Urinprobe erfolgte noch vor dem Frühstück die Intervention mit dem jeweiligen Süßstoff (oder der Kontrollprobe) durch Trinken einer 10%igen Stevia/Aspartam/Saccharoselösung mit Zitronensaft oder eines Zitronenwassers, welches als Kontrollgruppe diente. Die weitere Sammlung des 24-Stunden-Urins wurde in Zeitperioden von jeweils 6 Stunden vollzogen, wobei der gesamte Urin pro Zeiteinheit in einem großen Behälter gesammelt wurde und nur ein Teil des Sammelurins für nachfolgende Analysen herangezogen wurde.

#### Einteilung der Urinproben bzw. des Sammelns von Urin in Zeiteinheiten:

- Morgenurin (nüchtern) vor dem Frühstück
- 1. Periode: 0 - 6 h nach Intervention
- 2. Periode: 7 - 12 h nach Intervention
- 3. Periode: 13 - 18 h nach Intervention
- 4. Periode: 19 - 24 h nach Intervention

Die Aufbewahrung bzw. Lagerung der Urinproben während der Sammlungsperiode erfolgte bei 4 °C. Am vierten Tag der Studie wurde jeweils ein Aliquot des Sammelurins jeder Zeitperiode am Institut abgegeben und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gekühlt gelagert.

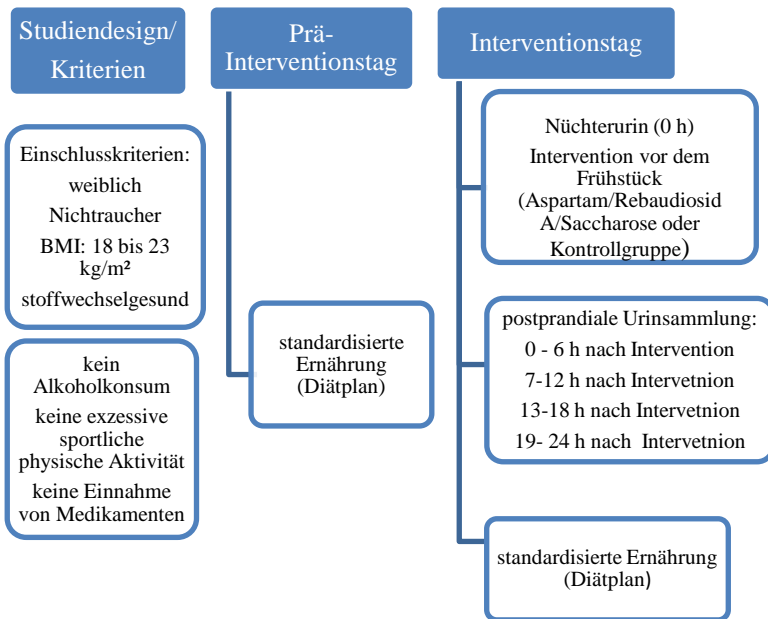


Abbildung 10: schematische Darstellung des Studiendesigns

### 3.2 Ermittlung der Süßkraft von Rebaudiosid A und Aspartam

Die sensorische Ermittlung der Süßkraft beider Süßstoffe wurde mit Hilfe einer Kollegin (Cordula Rech) im Rahmen deren Diplomarbeit mit dem Thema „Flavourprofil eines mit Rebaudiosid A optimierten, zuckerreduzierten Zitronen-Erfrischungsgetränkes“ am Department für Sensorik der Universität Wien ermöglicht. Nach Durchführung einiger sensorischer Prüfverfahren zur Bestimmung der Süßkraft von Rebaudiosid A und Aspartam ergaben sich folgende Konzentrationen:

- 0,055%ige Aspartam-Lösung entspricht der Süßkraft einer 10%igen Saccharoselösung
- 0,06%ige Aspartam-Zitronen-Lösung entspricht der Süßkraft einer 10%igen Saccharose-Zitronen-Lösung
- 0,06%ige Rebaudiosid A-Lösung entspricht der Süßkraft einer 10%igen Saccharoselösung

- 0,065%ige Rebaudiosid A-Zitrone-Lösung entspricht der Süßkraft einer 10%igen Saccharose-Zitronen-Lösung

Weitere Berechnungen waren notwendig, um die erforderliche Menge zur Herstellung einer 10%igen Süßstofflösung zu ermitteln, wobei als Bezugswert eine 10%ige Saccharoselösung diente.

**Saccharose:**

10 % Saccharose + 10 % Zitronensaft auf 500 mL mit Wasser auffüllen

*50 g Saccharose + 50 mL Zitronensaft auf 500 mL mit Leitungswasser auffüllen*

**Kontrollgruppe:**

*50 mL Zitronensaft auf 500 mL mit Leitungswasser auffüllen*

Berechnungen:

Ausgehend von Saccharose resultierte die Berechnung wie folgt:

**Aspartam:**

50 g Saccharose .....10 %

X .....0,06 %

*0,3 g Aspartam + 50 mL Zitronensaft auf 500 mL mit Leitungswasser auffüllen*

**Rebaudiosid A:**

50g Saccharose.....10 %

x.....0,065 %

*0,325 g Rebaudiosid A + 50 mL Zitronensaft auf 500 mL mit Leitungswasser auffüllen*

### **3.3 Probenaufarbeitung und Lagerung**

Je ein Aliquot des Sammelurins wurde bis zur weiteren Behandlung wie nachfolgend beschrieben aufbereitet:

1000 µL der unverdünnten Urinprobe wurde ohne Zusatz eines Stabilisators in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 mL) pipettiert. Um den Sauerstoff aus dem Urin zu entfernen, wurden die Proben zunächst mit Argon begast und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Bis zur weiteren Aufarbeitung und nachfolgender Messung sind die Urinproben tiefgekühlt bei -20 °C gelagert worden. Um ausreichend Probenmaterial sicherzustellen, wurde ein Backup von etwa 10 mL jeder Probe auf die gleiche Weise aufgearbeitet und tiefgekühlt aufbewahrt. Die Lagerungsdauer der Proben bis zur Analyse reichte von einem Monat bis maximal einem halben Jahr.

#### **3.3.1 Etablierung der Probenaufbereitung vor der LC-MS-Messung**

Um eine geeignete Methode zur Aufarbeitung der Proben zu ermitteln, erfolgte im Voraus eine intensive Literaturrecherche zum Thema Aufarbeitung von Urinproben bei LC-MS Messungen und im Anschluss daran wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt. Zur Umsetzung der Testversuche kam Eigenurin zum Einsatz. Es waren verschiedene Versuche zur Etablierung der Probenaufbereitungsmethode notwendig, um bestmögliche Analysenergebnisse zu erzielen. Diese sind wie anschließend erläutert umgesetzt worden:

Zur Ausführung der ersten drei Testversuche wurden je 400 µL Ausgangsvolumen Urin herangezogen, welcher unmittelbar vor der LC-MS Messung mit einem internen Standard (Hippursäure) versetzt worden ist.

#### **VERSUCH 1:**

Die unverdünnte Urinprobe wurde zwei Minuten lang bei 13000 g zentrifugiert, anschließend durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µL filtriert und weiters mit Hilfe eines Vacufuge® plus Konzentrators bei Raumtemperatur konzentriert. Der eingedampfte Urin wurde daraufhin in 200 µL eines 66%igen Methanols gelöst und bis zur anschließenden Messung bei 4 °C gekühlt gelagert.

VERSUCH 2:

Dieser Versuch diente zur Prüfung der Notwendigkeit einer Proteinfällung.

400 µL des Urins wurden a) mit 800 µL Methanol

b) mit 700 µL Methanol

c) mit 600 µL Methanol

und d) mit 500 µL Methanol versetzt, um eine Proteinfällung durchzuführen. Die Anwendung dieses Verfahrens führte zu keiner Fällung von Proteinen, infolgedessen wurde diese Methode zur Probenaufarbeitung des Urins nicht zur weiteren Analyse eingesetzt.

VERSUCH 3:

Die Zentrifugation des Probenmaterials wurde in derselben Weise wie bereits im Versuch 1 erläutert durchgeführt. Ferner erfolgte eine 1:3 Verdünnung durch Verwendung von HPLC-Wasser (400 µL Urin + 800 µL HPLC-Wasser). Die weitere Vorgehensweise ist ident mit der von Versuch 1.

Herstellung des internen Standards Hippursäure

Hippursäure 98%,  $M = 179,17 \text{ g/mol}$

13,7 mg Hippursäure wurden mit Hilfe einer Analysenwaage eingewogen und durch Verwendung einer Vollpipette genau in 100 µL HPLC-Wasser gelöst.

Zur Bestimmung der Konzentration der hergestellten Lösung wurde folgende Berechnung angewandt:

→ 1,37 mg / 1000 mL

$$n = \frac{m}{M}$$

$$n = \frac{0,00137 \text{ g}}{179,17 \text{ g/mol}}$$

$$n = 0,000007646 \text{ mol}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$c = \frac{0,000007646 \text{ mol}}{100 \text{ mL}}$$

$$c = 7,6 \times 10^{-5} \text{ mmol Hippursäure/100mL}$$

Unmittelbar vor der HPLC-MS Messung wurde den aufbereiteten Urinproben 20  $\mu\text{L}$  Hippursäure zugesetzt und im Anschluss daran die Proben am Vortexer gemischt. Die Standardlösung -bestehend aus 200  $\mu\text{L}$  Methanol (66%) und 20  $\mu\text{L}$  Hippursäure - wies eine errechnete Konzentration von 22,31 mmol/220  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen auf.

#### VERSUCH 4:

Es wurden verdünnte Proben (1:4 Verdünnung, 250  $\mu\text{L}$  Urin + 750  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser) als auch unverdünnte Proben mit einem Gesamtvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  zur Umsetzung der Versuchsreihe herangezogen und in 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Ferner wurden die Proben bei 14000 U/min (Umdrehungen pro Minute) für fünf Minuten zentrifugiert und durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Nach 3,5 stündigem Konzentrationsverfahren erfolgte das Lösen der Probensubstanz in 200  $\mu\text{L}$  66%igem Methanol. Als interner Standard wurde den Proben kurz vor der Messung 20  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung zugegeben.

Der bei der Messung verwendete Standard bildete eine Lösung aus 200  $\mu\text{L}$  Methanol (66%) und 20  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Gemisch.

100  $\mu\text{L}$  der Urinproben als auch der Standardlösung wurden in Autosamplervials überführt.

#### VERSUCH 5:

Bis zur Aufnahme der Urinproben in 66%-igem Methanol war die Vorgehensweise in Versuch 5 identisch mit den vorangegangenen Arbeitsschritten in Versuch 4. Der darauffolgende Teil der Aufarbeitung bestand aus einer weiteren Zentrifugation des Urins bei 11000 rpm (U/min) für zwei Minuten, wobei der Überstand der zentrifugierten Probe in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Unmittelbar vor der Messung wurden 10  $\mu\text{L}$  der Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung in einem Autosamplervial vorgelegt und 90  $\mu\text{L}$  der Probe zugegeben. Die Standardlösung

bestand ebenso aus 10  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung und 90  $\mu\text{L}$  Methanol.

#### VERSUCH 6:

Versuch 6 diente zur Optimierung der bestmöglichen Verdünnung zur Analyse des metabolischen Profils in Urinproben. Dabei wurden drei verschiedene Urinverdünnungen angesetzt, um anschließend das Ergebnis der Analysen miteinander zu vergleichen und daraus die optimale Verdünnungsmethode zu ermitteln. Ein Vergleich zur Abschätzung des geeigneten bzw. für Urinproben entsprechenden Lösungsmittels wurde durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Lösungsmitteln erzielt.

Zwei Ansätze mit je drei Verdünnungen wurden hergestellt:

- 1:2 Verdünnung (500  $\mu\text{L}$  Urin + 500  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser)
- 1:4 Verdünnung (250  $\mu\text{L}$  Urin + 700  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser)
- 1:10 Verdünnung (100  $\mu\text{L}$  Urin + 900  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser)

Die Proben wurden bei 11000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert, mittels eines Spritzenfilters (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und unter Anwendung eines Konzentrators (Concentrator plus/Vacufuge® plus) etwa 4 h bei Raumtemperatur konzentriert. Ein Ansatz - bestehend aus drei Verdünnungen - des zuvor eingedampften Urins wurde in 200  $\mu\text{L}$  Methanol (66 %), der zweite Ansatz in 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril (Gemisch aus 50  $\mu\text{L}$  Acetonitril und 50  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser) gelöst. In Folge daran sind die Proben nochmals für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert worden. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  HCOOH (Ameisensäure) erfolgte die Mischung der Probensubstanz am Vortexer. 90  $\mu\text{L}$  der Probensubstanz und 10  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung stellten die Analysesubstanz dar. Die Herstellung zweier verschiedener Standards (Methanol und Acetonitril) war erforderlich, um die Urinproben mit dem jeweils eingesetzten Lösungsmittel zu analysieren.

Herstellung des internen Standards Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung

Es sollten 100 mL einer 10 mmolaren Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Ausgangsstoff hergestellt und anschließend mit Methotrexat (1,2%) versetzt werden.

Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ),  $M = 79,06 \text{ g/mol}$

Die Einwaage von 80,5 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  wurde mit HPLC-Wasser in einem 100 mL Messkolben zur Lösung gebracht und mit 1,2 mg Methotrexat versetzt.

Daraus ergibt sich eine **10,18 mmolare Ammoniumhydrogencarbonatlösung**.

Berechnung der Konzentration von Methotrexat:

Methotrexat ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_5$ ),  $M = 454,44 \text{ g/mol}$

→ 0,12 mg / 1000 mL

$$n = \frac{m}{M}$$

$$n = \frac{0,00012 \text{ g}}{454,44 \text{ g/mol}}$$

$$n = 0,000000264 \text{ mol}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$c = \frac{0,000000264 \text{ mol}}{100 \text{ ml}}$$

$$c = 2,6 \times 10^{-6} \text{ mmol/100 mL}$$

**2,6×10-6 mmol Methotrexat in 100 ml einer 10,18 mmolaren Ammoniumhydrogencarbonatlösung**



	ZENTRIFUGATION	FILTRATION	EINDAMPFUNG	AUFNAHME (LSG- MITTEL)
VERSUCH 1 (unverdünnte Urinprobe)	13000 g (2 min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	bei Raumtemperatur	Methanol (66 %)
VERSUCH 2	Durchführung einer Proteinfällung mit Methanol. Es kam zu keiner Fällung von Proteinen, da im Urin kaum Proteine zu finden sind.			
VERSUCH 3 (1:3 Verdünnung des Urins)	13000 g (2min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	Bei Raumtemperatur	Methanol (66 %)
Anwendung des internen Standards Hippursäure bei den Versuchen 1 und 3.				
	ZENTRIFUGATION	FILTRATION	EINDAMPFUNG	AUFNAHME (LSG- MITTEL)
VERSUCH 4 (1:4 Verdünnung, unverdünnte Urinprobe)	14000 rpm (5 min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	Raumtemperatur 3,5 h	Methanol (66 %)
VERSUCH 5 (1:4 Verdünnung, unverdünnte Urinprobe)	14000 rpm (5 min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	Raumtemperatur 3,5 h	Methanol (66 %)
Versuch 5: Nach der Aufnahme des eingedampften Urins wurden die Proben nochmals bei 11000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt.				
VERSUCH 6 (Ansatz 1) (1:2, 1:4, 1:10 Verdünnung des Urins)	11000 rpm (5min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	Raumtemperatur	Methanol (66 %)

VERSUCH 6 (Ansatz 2) (1:2, 1:4, 1:10 Verdünnung des Urins)	11000 rpm (5 min)	Spitzenfilter mit Porengröße 0,45 µm	Raumtemperatur	Acetonitril
Versuch 6: Nach Auflösen des eingedampften Urins mit dem jeweiligen Lösungsmittel erfolgte eine weitere Zentrifugation der Proben für zwei Minuten.				
Anwendung des internen Standards Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat bei den Versuchen 4, 5 und 6.				

Tabelle 3: Zusammenfassung der Testversuche

### 3.3.2 Probenaufbereitungsmethode

Anhand der durchgeführten Testverfahren zur Probenaufarbeitung humaner Urinproben und anschließender wissenschaftlicher Beurteilung der Versuchsergebnisse konnte das geeignete Aufbereitungsverfahren zur Analyse des metabolischen Profils ermittelt werden.

Folgende Methode wurde herangezogen:

Die etablierte Probenaufbereitung beinhaltet eine 1:4 Verdünnung des Urins mittels HPLC-Wasser (250 µL Urin + 750 µL). In Folge wurde die Probensubstanz bei 11000 U/min fünf Minuten zentrifugiert, des Weiteren mit Hilfe eines Spritzenfilters (Porengröße 0,45 µm) filtriert und durch Einsatz eines Vacufuge® plus Konzentrators bei Raumtemperatur etwa 4 Stunden annähernd bis zur Gänze konzentriert/eingengt. Das konzentrierte Probenmaterial wurde in 200 µL 66%igem Methanol gelöst und wiederholt für zwei Minuten zentrifugiert. 99 µL der Probensubstanz wurden in ein Autosamplervial überführt, nach Zusatz von 1 µL HCOOH war die Probe zur Analyse bereit. Das überschüssige bzw. übriggebliebene Probenmaterial wurde umgehend bei -20 °C gekühlt gelagert.

### 3.3.3 Qualitätskontrolle der Analysen

Um die Qualität der HPLC-MS Analysen zu gewährleisten, als auch eine mögliche auftretende Ionensuppression bei der MS-Analyse zu kontrollieren, sind Standardmessungen und Bestimmungen von Kontrollproben zur Qualitätskontrolle durchgeführt worden. Die Standards, ebenso wie die Kontrollproben, wurden mit Methotrexat versetzt und unter den gleichen Bedingungen wie die der Urinproben hergestellt, und in genau definierten Abständen gemessen. In einem Durchgang wurden 20 Proben gemessen, die Messung des Standards sowie der Kontrollprobe erfolgte jeweils zu Beginn der Analyse, nach 10 Proben und am Ende.

<b>STANDARD</b>	89 $\mu\text{L}$ Methanol (66 %)	10 $\mu\text{L}$ Ammoniumhydrogen- carbonat/Methotrexat- Lösung	1 $\mu\text{L}$ HCOOH
<b>KONTROLLPROBE (1:4 Verdünnung)</b>	89 $\mu\text{L}$ Probe	10 $\mu\text{L}$ Ammoniumhydrogen- carbonat/Methotrexat- Lösung	1 $\mu\text{L}$ HCOOH

Tabelle 4: Herstellung des Standards und der Kontrollprobe

#### Herstellung des internen Standards Ammoniumhydrogencarbonat/Methotrexat-Lösung

Es sollten 100 mL einer 10 mmolaren Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Ausgangsstoff hergestellt und anschließend mit Methotrexat versetzt werden.

Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ),  $M = 79,06 \text{ g/mol}$

Die Einwaage von 79,1 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ist mittels HPLC-Wasser in einem 100 mL Messkolben zur Lösung gebracht worden und mit 0,99 mg Methotrexat versetzt worden.

Daraus ergibt sich eine **10 mmolare Ammoniumhydrogencarbonatlösung**.

Die gekühlte Lagerung der Lösung erfolgte bei 4 °C.

Berechnung der Konzentration von Methotrexat:

Methotrexat ( $C_{20}H_{22}N_8O_5$ ),  $M = 454,44 \text{ g/mol}$

→ 0,099 mg / 1000 mL

$$n = \frac{m}{M}$$

$$n = \frac{0,000099 \text{ g}}{454,44 \text{ g/mol}}$$

$$n = 0,000000218 \text{ mol}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$c = \frac{0,000000218 \text{ mol}}{100 \text{ mL}}$$

$$c = 2,2 \times 10^{-6} \text{ mmol/100mL}$$

**2,2×10<sup>-6</sup> mmol Methotrexat in 100 mL einer 10 mmolaren Ammoniumhydrogencarbonatlösung**

### 3.4 Parameter zur HPLC-MS Analyse

#### 3.4.1 HPLC-Parameter

Der zur Messung angewandte Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (Dionex Austria GmbH, Wien, Österreich) setzt sich aus einer Ultimate 3000 Series zusammen, ausgestattet mit einem Ultimate 3000 Column Compartment, einem Ultimate 3000 Autosampler sowie einer Ultimate 3000 Pumpe. Die Steuerung des Gerätes erfolgte durch Verwendung eines Computers über Hystar 3.2. Der Durchmesser der verwendeten Trennsäule beträgt 2,1 mm mit einer Länge von 150 mm sowie einer Partikelgröße von 3 µm (Fortis Phenyl), erworben von Fortis Technologies. Die Vorsäule misst ebenso einen Durchmesser von 2,1 mm. Die zur HPLC-Messung verwendeten Lösungsmittel waren Acetonitril (ACN) und Wasser, die jeweils mit Ameisensäure versetzt wurden. Zum Einsatz kam ein Multi-Step Gradient, wobei

Eluent A Wasser und Eluent B Acetonitril darstellt, welcher folgendermaßen ausgeführt wurde:

	Retentionszeit [min]	Flussrate [mL/min]	% B (ACN)
1	0.000	0.300	0.1
2	0.000	0.300	0.1
3	2.000	0.300	0.1
4	12.000	0.300	25.0
5	17.000	0.300	35.0
6	25.000	0.300	45.0
7	30.000	0.300	45.0
8	35.000	0.300	35.0
9	37.000	0.300	0.1
10	40.000	0.300	0.1

Tabelle 5: Multi-Step Gradient

weitere HPLC-Parameter:

- Säulenofen: 25 °C
- Autosampler: 4 °C
- Flow: 0.3 mL/min

10 µL der Probe wurde aus dem Autosampler zur Metabolomics-Analyse entnommen.

### 3.4.2 MS-Parameter

MS-Methode Source:

- Endplattenvorlauf: -500 V
- Kapillare: 4500 V

- Nebulizer: 0.4 Bar
- Trockengas: 4.0 L/min
- Trockentemperatur: 180 °C

Ionenpolarität: positiv

Massenbereich: von 100 bis 3000 m/z

Das micro TOF-Q II Massenspektrometer war mit einer ESI COMPASS 1.3 Quelle ausgestattet.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Auswertungsprogrammes Data Analysis 4.0 und des Statistikprogrammes Profile Analysis 1.1 (Bruker Daltonik GmbH, Software for Profiling and Statistical Evaluation of LC/MS Data Sets, Bremen, Deutschland).

Folgendes Skript wurde zur Ausführung der Datenprozessierung angewandt:

#### Data Analysis Script:

```
Analysis.ClearChromatogramRangeSelections  
Analysis.ClearResults  
Analysis.AddChromatogramRangeSelection 1, 30.0, 100.0, 1500.5  
Analysis.FindMolecularFeatures  
Analysis.Save  
Analysis.Compounds.Clear  
Analysis.Save  
Form.close
```

Die Rohdaten, d.h. die einzelnen Spektren der HPLC-MS-Analyse (Total Ion Chromatograms, TIC) wurden im Data Analysis vorprozessiert, um sie anschließend im Profile Analysis statistisch nach der Hauptkomponentenanalyse auszuwerten. Diese Prozessierung wurde anhand des Kriteriums „Find Molecular Features (FMF)“ durchgeführt. Chromatographische Peak-Erkennung laut FMF wurde wie folgt

angewendet: Enhanced Quadratic Mode, S/N-Verhältnis von 20. Des Weiteren wurde jedes Chromatogramm automatisch nachkalibriert. Als Kalibrationslösung wurden LiFormiate angewandt, welche zusätzlich als interne Qualitätskontrolle fungierten. Aufgrund der Rechenkapazität bzw. der umfangreichen Datensätze war es erforderlich, die Spektren im Data Analysis zu prozessieren, wo die Berechnung der Spektren einzeln erfolgte. Im Gegensatz dazu werden im Profiler die gesamten Spektren in einem berechnet, sodass dies zu einer Überlastung der technischen Möglichkeiten/Fähigkeiten führte. Des Weiteren wurden die bereits vorgerechneten Daten in den Profiler eingespielt, um anschließend nach den Kriterien „Bucket Generation“ berechnet zu werden.

Buckets sind durch  $m/z$  und Retentionszeit regulierbare Größen, die die Intensität aller Signale in das entsprechende Fenster zusammenfassen [GAQUEREL et al., 2010].

Die Datensätze wurden von Minute 1 bis 30 im Massenbereich ( $m/z$ ) von 100 bis 1500 mit Profile Analysis ausgewertet. Zur Anwendung kam „Advanced bucketing“ mit einer Bucketgröße von 0,2 min und 5 mDa.

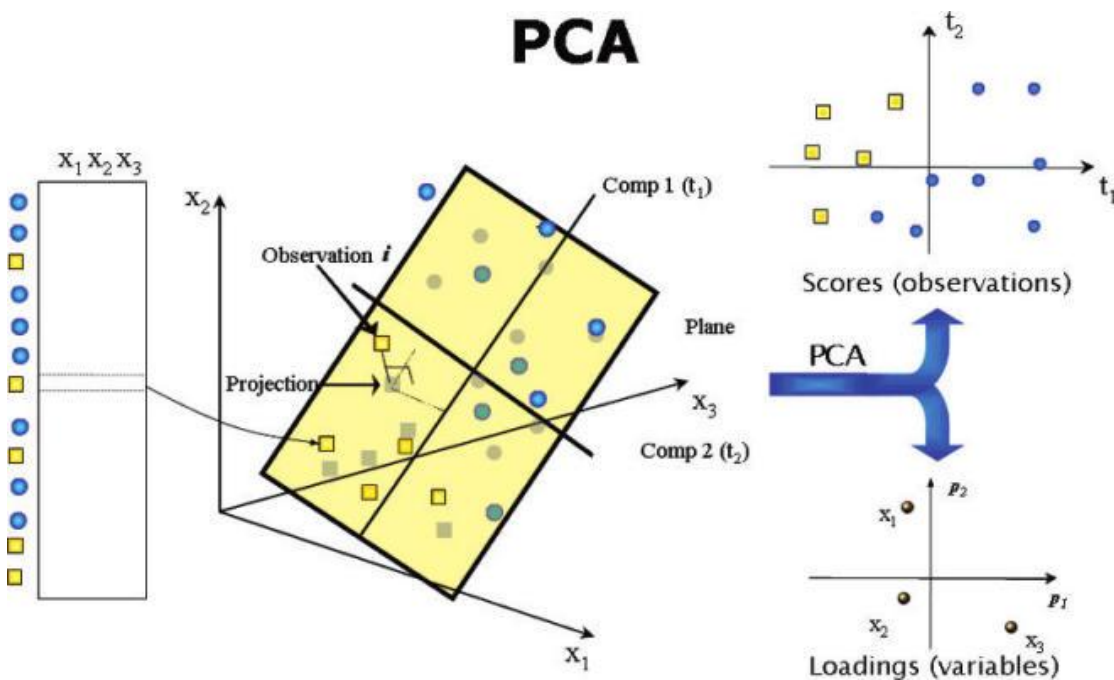
„Advanced bucketing“ stellt eine Bucketing-Technik, basierend auf ausgewählten Peaks, dar. Mit diesem Verfahren werden nur Buckets gebildet, sofern ein Peak vorhanden ist. So reduziert es die Größe der „bucket tables“ im Vergleich zu „rectangular bucketing“, welches in Tausenden von Buckets resultiert, die meisten von ihnen mit Null Intensität [Bruker Daltonics, 2007]. Der Bucket Filter - beschreibt die Anzahl der Werte in einem Bucket – wurde auf  $> 2$  gesetzt. Die Intensitätswerte der Buckets in einer Probe wurden auf die gesamte Intensität (sum of bucket values in analysis) normalisiert. Die Durchführung der PCA-Analyse erfolgte mit Profile Analysis nach Pareto Skalierung.

Unter Pareto Skalierung versteht man die Teilung jeder Variable durch die Quadratwurzel der Standardabweichung [TRYGG et al., 2007]. Aufgrund dieser Vorgehensweise erhält man eine entsprechende Clusterung der Datensätze, welche im „Ergebnis- und Diskussionsteil“ näher erläutert bzw. dargestellt werden.

### **3.5.1 Ziel der PCA-Analyse:**

Primäres Ziel der PCA-Analyse stellt die Reduzierung eines umfangreichen Datensatzes dar – erworben aus einer Vielzahl an Proben – um die wichtigsten Unterschiede

zwischen den Proben ohne Verlust von Informationen zu extrahieren. Diese Variationen werden als Hauptkomponenten der Proben beschrieben, wobei jede Hauptkomponente orthogonal zur nächsten ist. PCA dient als Mustererkennungstechnik und infolgedessen zur Visualisierung eines multivariaten Datensatzes, um Trends, Beobachtungen und Ausreißer zu definieren. Diese Visualisierung wird durch die Umwandlung von Variablen in ein Kovarianz basierendes Koordinatensystem mit den Hauptkomponenten als Achsen erreicht, und so ein zweidimensionales Bild, genannt Score plot, geschaffen. Mit dieser graphischen Darstellung können Gruppierungen oder Muster von Probengruppen erfasst werden. Für jedes Score plot bildet die PCA-Analyse ein Loading plot, in welchem die wichtigsten Datenpunkte – welche für die Differenzierung verantwortlich sind – abgebildet sind [KUHNER, et al. 2010]. Anhand dieses Datenauswertungsprogrammes bzw. der Anwendung der PCA-Analyse wurde versucht, intra- als auch interindividuelle Unterschiede des metabolischen Profils unterschiedlicher Süßstoffe im Urin beschreiben und darstellen zu können.



**Abbildung 11: PCA-Modell**

[TRYGG et al., 2007]



Dieses Modell zeigt einen Score-Plot, in dem die Beziehung zwischen den Beobachtungen und den Proben in Modellebene visualisiert werden, zum Beispiel für Gruppierungen, Trends oder Ausreißer. Der Loading-Plot beschreibt den Einfluss der Variablen im Model und die Beziehung zwischen ihnen [TRYGG et al., 2007].

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zur Analyse des metabolischen Profils unterschiedlicher Süßstoffe anhand humaner Urinproben standen insgesamt 340 Proben von 29 Teilnehmern zur Verfügung.

Zur Interpretation der Daten wurden ausschließlich die Proben jener Probanden herangezogen, welche vier Mal die Studie absolvierten, d.h. jene, die jede Intervention vollzogen haben. Daraus resultiert ein Probandenkollektiv von 13 Teilnehmern und schließlich 260 Urinproben.

### **Kernaussage/Fragestellung:**

Können Unterschiede im metabolischen Profil humaner Urinproben nach Intervention mit Süßstoffen (Rebaudiosid A/Aspartam/Saccharose) beobachtet werden?

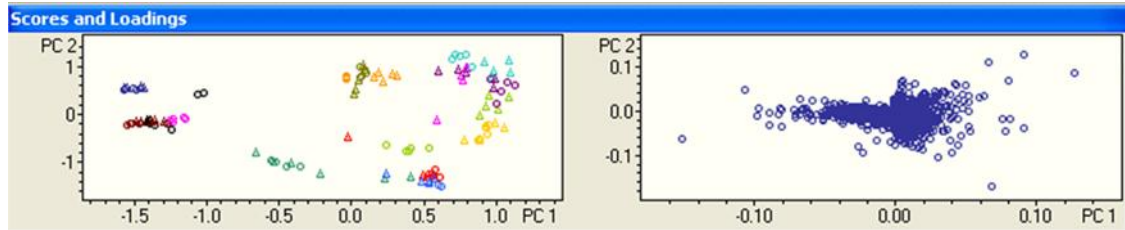
Anhand dieser Studie soll nun geklärt werden, ob Veränderungen des metabolischen Profils nach Intervention mit Süßstoffen auftreten.

Ausgehend von der ursprünglichen Kernaussage der Diplomarbeit wurde versucht, die unter Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse ausgewerteten Daten, zu erörtern.

### **4.1 Inter- und intra-individuelle Schwankungen der Probanden**

Erste Betrachtungen ergeben, dass innerhalb des Probandenkollektivs zu große inter-individuelle Schwankungen vorliegen, um Unterschiede im metabolischen Profil nach Intervention mit verschiedenen Süßstoffen erkennen zu können, sodass die Kernaussage aufgrund dessen nicht untermauert werden kann.

Um die Problemstellung präziser behandeln zu können, wird nun anhand konkreter Beispiele versucht, auf diese Thematik einzugehen.

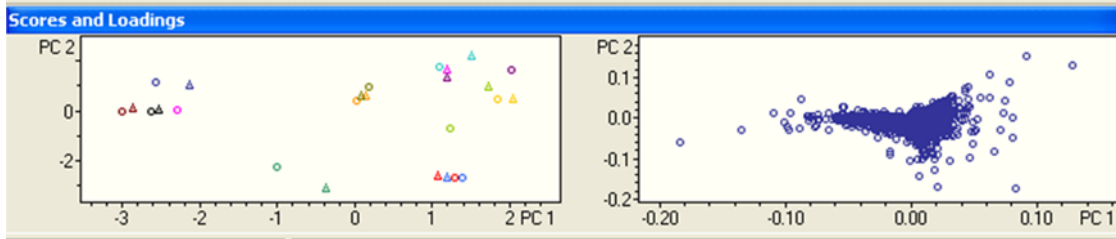


**Abbildung 12: Score und loading plot der PCA-Analyse aller Probanden: Stevia versus Kontrolle**

(siehe Anhang Abbildung XVI)

Jede Farbe in der Abbildung bezieht sich auf einen einzelnen Probanden, wobei die Kreise die unterschiedlichen Zeitpunkte der Kontrollgruppe und die Dreiecke die unterschiedlichen Zeitpunkte die Interventionsgruppe (in diesem Fall Stevia/Rebaudiosid A) darstellen. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNER et al., 2011].

Bei Begutachtung der Analyse aller Probanden (Stevia versus Kontrolle) wird deutlich, dass eine probandenweise Clusterung vorliegt und sowohl die Kontroll- als auch die Steviagruppe eines Probanden kaum voneinander abweichen. Anders als ursprünglich angenommen und erhofft, ist bei den einzelnen Behandlungen die inter-Probandenschwankung größer als die intra-Probandenschwankung, was infolgedessen bedeutet, dass keine offensichtlichen Unterschiede des metabolischen Profils aufgrund der Intervention mit einem Süßstoff in Bezug auf die Kontrollgruppe beobachtet werden kann. Es ist jedoch anzumerken, dass manche Probanden größere Abweichungen zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe aufweisen, was möglicherweise der Einfluss von intra-individuellen Schwankungen eines Studienteilnehmers mit sich bringt. Ähnliche Ergebnisse erzielten ebenso die Analysen des Süßstoffes Aspartam und Saccharose, welche im Anhang (siehe Abbildung XIV und XVIII) abgebildet sind.

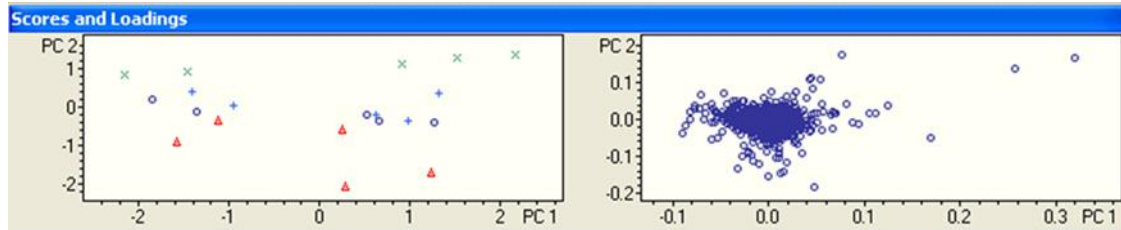


**Abbildung 13: Score und loading plot der PCA-Analyse aller Probanden: Stevia versus Kontrolle (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)**

(siehe Anhang Abbildung XVII)

Jede Farbe in der Abbildung bezieht sich auf einen einzelnen Probanden, wobei die Kreise die unterschiedlichen Zeitpunkte der Kontrollgruppe und die Dreiecke die unterschiedlichen Zeitpunkte die Interventionsgruppe (in diesem Fall Stevia/Rebaudiosid A) darstellen. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNER et al., 2011].

Ein Vergleich der Kontroll- und Steviagruppe aller Probanden zu einem bestimmten Zeitpunkt – 12 h nach Intervention – zeigt wiederholt eine Gliederung bezüglich der Probanden. Idealerweise, so die Grundannahme, sollte eine Clusterung in Kontroll- und Steviagruppe des gesamten Probandenkollektivs möglich sein. Bei genauerer Betrachtung sind dennoch bei einzelnen Probanden abermals Differenzen zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe erkennbar, was wiederum die Auswertung bzw. die Resultate der PCA-Analyse der einzelnen Probanden untermauert, auf welche später eingegangen wird.



**Abbildung 14: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 1**

(siehe Anhang Abbildung I)

Jeder Süßstoff ist durch eine andere Farbe und ein Symbol gekennzeichnet.  $\circ$  stellt die Kontrollgruppe,  $\Delta$  Stevia,  $\times$  Aspartam und  $+$  die Intervention mit Saccharose dar. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNERT et al., 2011].

Die Auswertung eines einzelnen Probanden zeigt hier keine eindeutige Clusterung der einzelnen Süßstoffgruppen, was eventuell mit größeren intra-individuellen Schwankungen in Verbindung gebracht werden kann. Hinsichtlich dieses Ergebnisses könnte allerdings auch ein Zusammenhang mit externen Faktoren bestehen. Nennenswert ist jedoch, dass in dieser Abbildung jeweils die beiden linken Symbole die Nüchternwerte der einzelnen Süßstoffe und die drei Punkte der einzelnen Behandlungen in der Darstellung rechts die postprandialen Werte ausdrücken. Ähnliche Resultate der PCA-Analysen konnten auch bei Proband 3, 10 und 13 beobachtet werden (siehe Anhang Abbildung III, X und XIII). Infolgedessen ist hier dennoch ein Einfluss der Intervention klar erkennbar, was darauf schließen lässt, dass Urinproben ein geeignetes Medium für die Erforschung des metabolischen Profils von Ernährungsinterventionsstudien darstellen, jedoch hier möglicherweise intra-individuelle Schwankungen das Ergebnis beeinflussen.

Obwohl das Studiendesign der Interventionsstudie darauf zielte, die inter-individuellen Schwankungen möglichst gering zu halten (Diätplan vor und innerhalb des Zeitraumes der Intervention, Eingrenzung des Probandenprofils durch Anwendung von Ein- bzw. Ausschlusskriterien) wird das metabolische Profil dennoch, besonders in Urinproben, sehr stark von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst.

Ein großes Problem stellt nicht nur der Genotyp eines Individuums dar, sondern auch Alter, Umweltfaktoren, Ernährungsstatus, Lebensstil und ebenso Metaboliten aus

symbiotischen Organismen (Darmflora) üben großen Einfluss auf die Zusammensetzung des metabolischen Profils aus. Folglich können metabolische Veränderungen von biologisch komplexen Organismen, wie es bei Menschen der Fall ist, in Bezug auf pathologische Reize nur schwer von normalen physiologischen Schwankungen unterschieden werden [ASSFALG et al., 2008]. Aufgrund der Tatsache, dass Menschen sehr unterschiedliche Wesen sind, ist es nicht abwegig, dass spektrale Ergebnisse der meisten Metabolomics-Studien mit menschlichen Probanden stark von inter-, als auch intraindividuellen Abweichungen beeinflusst werden, und diese physiologischen Schwankungen daher einen großen Störfaktor (Confounder) darstellen können [WALSH et al., 2006].

Da der Aufbau des Studiendesigns möglichst standardisiert erfolgen sollte, wurden ausschließlich weibliche Probanden zur Analyse herangezogen, auch weil sich die Rekrutierung männlicher Probanden bei vorangegangenen Studien als noch problematischer herausgestellt hat. Möglicherweise könnten hormonelle Zyklusschwankungen Auswirkungen auf die Ergebnisse haben, da der Hormonstatus, die gegenwärtige Phase im Menstruationszyklus für Frauen im gebärfähigem Alter sowie tägliche Variationen Faktoren sind, die zu intra-individuellen Schwankungen beitragen können [FAVÉ et al., 2011].

Eine weitere Studie, welche den Einfluss der Phasen des Menstruationszyklus auf das metabolische Profil prämenopausaler Frauen ermittelte, zeigte ein kontroverses Resultat. Die Auswertung ergab, dass der Menstruationszyklus eine beträchtliche Auswirkung auf die metabolische Zusammensetzung im Plasma ausübt, jedoch kein signifikanter Effekt im Urin nachweisbar ist [WALLACE, et al., 2010].

Trotz des Ergebnisses der Studie von Wallace et al., sollten hormonelle Schwankungen, welche sicherlich bei Frauen im prämenopausalen Alter vorherrschen, bei Metabolomics-Studien nicht außer Acht gelassen werden.

Von Bedeutung könnte auch sein, dass bei Durchführung der Ernährungsinterventionsstudie ein Diätplan die einzige Überprüfung der standardisierten Nahrungsaufnahme darstellte, die Aufnahme der Mahlzeiten allerdings nicht anhand eines Ernährungsprotokolls kontrolliert wurde, sodass eventuell Abweichungen bei den Mahlzeiten sowohl innerhalb eines Probanden, als auch interindividuell (innerhalb aller Probanden) entstanden sind. Die Bereitstellung

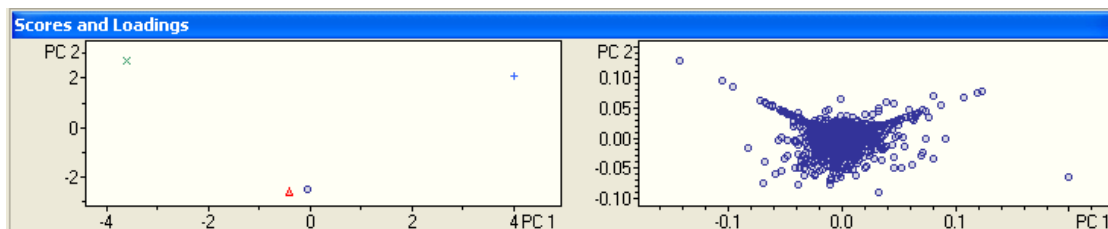
standardisierter Ernährung sollte die Stabilisierung des metabolischen Profils des Urins sicherstellen bzw. verbessern.

Wissenschaftliche Studien bestätigen, dass unter externen und internen Faktoren, welche das Metabolom beeinflussen können, sich die Ernährung als einen sehr wichtigen externen Faktor erwiesen hat, aufgrund dessen, weil es bemerkenswerte Veränderungen in der Zusammensetzung des Urins produziert. Diese Änderungen könnten auf das Vorhandensein exogener Metaboliten aus Nahrungsbestandteilen, wie sekundäre Pflanzenstoffe oder vom Mikroflorastoffwechsel zurückzuführen sein. Llorach-Asunción et al. konnte anhand humaner Urinproben belegen, dass nach Aufnahme von Kakaopulver eine Unterscheidung des metabolischen Profils im Urin vor und nach der Intervention beobachtet werden kann [LLORACH-ASUNCIÓN et al., 2010]. Eine weitere Studie bestätigt einen akuten Einfluss der Nahrungsaufnahme auf das metabolische Profil im Urin. Als Maßnahme zur Verringerung der normalen physiologischen Variationen in Urinproben bei Metabolomics-Studien stellt die Analyse und Betrachtung der letzten Nahrungsaufnahme sowie der Zeitpunkt der Probenahme dar [WALSH et al., 2006]. Favé et al. konnte zeigen, dass postprandiale Urinproben eine stabile chemische Zusammensetzung über einen Zeitraum von 2 bis 4 h nach Aufnahme eines standardisierten Frühstücks aufweisen, was ein flexibles Zeitfenster für die Sammlung von Urin darstellt. Nüchternurinwerte bildeten eine stabile Basis für den Vergleich mit postprandialen Proben [FAVÉ et al., 2011], was hier ebenfalls gezeigt werden konnte.

Standardisierte Ernährung an drei aufeinanderfolgenden Tagen konnte ein homogeneres Urinprofil im Vergleich mit einer nicht-standardisierten Diät aufweisen [RASMUSSEN et al., 2010].

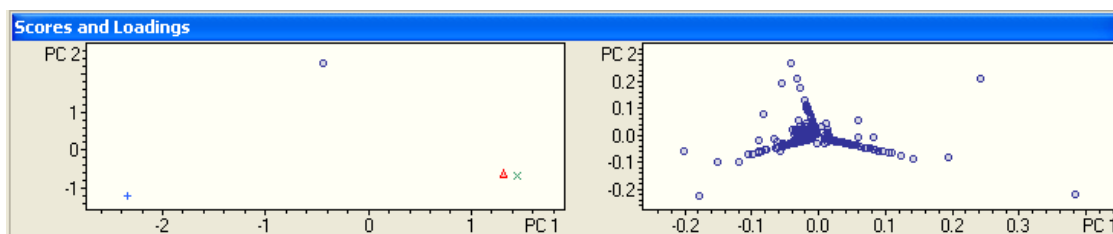
Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenso mit der Frage, wie viel Normalisierung bzw. Homogenisierung des metabolischen Profils im Urin durch sorgfältige Kontrolle der Ernährung und Umwelt erreicht werden kann. Dazu wurde gepoolter 24 h Urin gesammelt. Erweiterte diätetische Standardisierung über 24 h hinaus zeigte keine zusätzliche Wirkung auf die Normalisierung des metabolischen Profils im Urin. Akute ernährungsbedingte Effekte zeigten deutlichere Unterschiede, welche möglicherweise bei der Sammlung des gepoolten 24 h Harns verdünnt wurden. Da jedoch das Profiling

dieser Studie auf NMR Daten basierte, konnten möglicherweise Komponenten niedrigerer Konzentration nicht detektiert werden [WINNIKE et al., 2009].



**Abbildung 15: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1)**

(siehe Anhang Abbildung XXI)



**Abbildung 16: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 7 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1)**

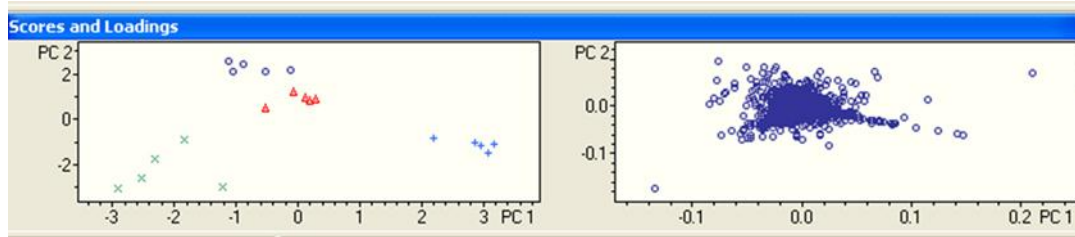
(siehe Anhang Abbildung XXV)

Jeder Süßstoff ist durch eine andere Farbe und ein Symbol gekennzeichnet.  $\circ$  stellt die Kontrollgruppe,  $\Delta$  Stevia,  $\times$  Aspartam und  $+$  die Intervention mit Saccharose dar. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNERT et al., 2011].

Betrachtet man die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse zweier unterschiedlicher Probanden jeweils 6 h nach Intervention kann kein direkter Zusammenhang der einzelnen Süßstoffe beobachtet werden. Die Abbildung des Probanden 4 gibt Aufschluss über eine mögliche Clusterung innerhalb der Stevia- und Kontrollgruppe, wohingegen bei Proband 7 ein scheinbar gleichartiger Effekt auf das metabolische Profil nach Verabreichung von Stevia und Aspartam zu sehen ist. Folglich scheint jeder Süßstoff eine unterschiedliche Wirkung auf das metabolische Profil im Urin eines Individuums auszuüben.



## 4.2 Clusterung der Süßstoffe innerhalb eines Probanden



**Abbildung 17: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4**

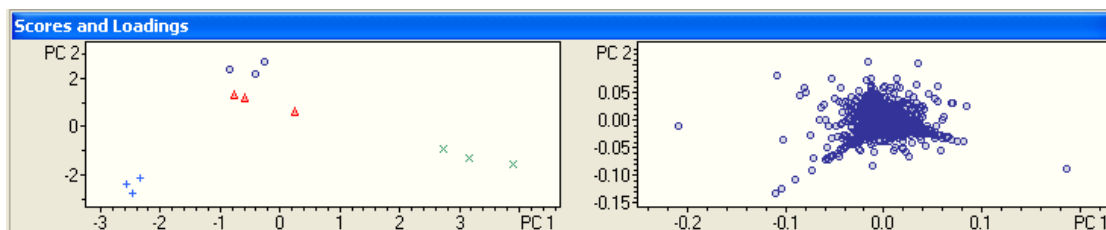
(siehe Anhang Abbildung IV)

Jeder Süßstoff ist durch eine andere Farbe und ein Symbol gekennzeichnet.  $\circ$  stellt die Kontrollgruppe,  $\Delta$  Stevia,  $\times$  Aspartam und  $+$  die Intervention mit Saccharose dar. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNER et al., 2011].

Eine weitere Fragestellung ergibt sich bei Beurteilung der PCA-Analyse des Probanden 4. Es wird nun ermittelt, ob ein Unterschied zwischen den Behandlungen mit den jeweiligen Süßstoffen und der Kontrollgruppe innerhalb eines Probanden besteht.

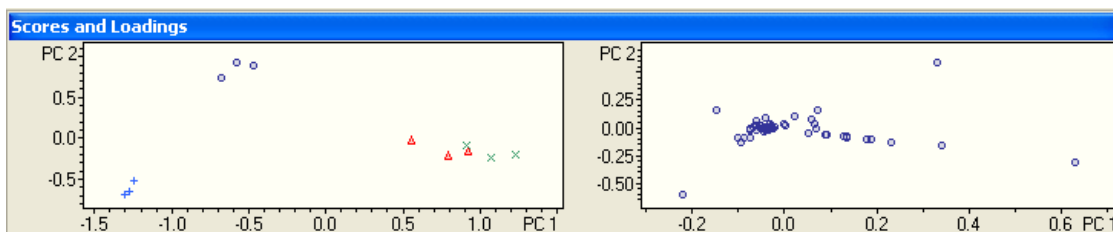
Bei Betrachtung des Ergebnisses dieses Probanden, welcher jede Intervention durchlaufen hat, kann eine deutliche Clusterung der einzelnen Süßstoffgruppen erkannt werden, was darauf schließen lässt, dass die einzelnen Süßstoffe aufgrund des metabolischen Profils unterschieden werden können. Es kann angenommen werden, dass sowohl die Süßstoffe, als auch die Kontrolle eine andersartige Wirkung auf das metabolische Profil im Urin ausüben. Ein Vergleich der Nüchternwerte der Kontrollgruppe mit den Nüchternwerten der Süßstoffe, hat jedoch ergeben, dass innerhalb dieser große Abweichungen erkennbar sind, trotz der ersten Annahme, dass sich eigentlich keine Schwankungen im metabolischen Nüchternprofil ergeben sollten. Dies könnte auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Durchführung der einzelnen Interventionen zurückzuführen sein, d.h. aufgrund der Tatsache, dass zwischen den einzelnen Behandlungen einige Wochen lagen, und somit externe Faktoren einen möglichen Zusammenhang damit liefern. Die statistische Auswertung der Probanden 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 und 12 (siehe Anhang Abbildung II, V, VI, VII, VIII, IX, XI, XII),

ergab ebenso eine klare Clustering in Bezug auf die Süßstoffgruppen, wodurch ein eindeutiger metabolischer Effekt der einzelnen Süßstoffe in Urinproben bestätigt werden kann.



**Abbildung 18: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 4 (ohne Nüchternwerte)**

(siehe Anhang Abbildung XX)



**Abbildung 19: Score und loading plot der PCA-Analyse von Proband 7 (ohne Nüchternwerte)**

(siehe Anhang Abbildung XXIV)

Jeder Süßstoff ist durch eine andere Farbe und ein Symbol gekennzeichnet.  $\circ$  stellt die Kontrollgruppe,  $\Delta$  Stevia,  $\times$  Aspartam und  $+$  die Intervention mit Saccharose dar. Das rechte Bild zeigt ein Loading Plot. Innerhalb des Loading Plots entspricht jeder Datenpunkt einem RT-m/z Paar, welches für die beobachtenden Variationen und deren Abstand von der Mitte des Plots verantwortlich ist, und den Einfluss auf die Gruppierung der Proben definiert [KUHNER et al., 2011].

Die Gegenüberstellung der Auswertung zweier Probanden ohne Berücksichtigung der Nüchternwerte ergibt wiederholt eine erkennbare Gliederung hinsichtlich der Süßstoffe, wobei bei Proband 7 eine Tendenz zwischen den Süßstoffen Stevia und Aspartam erkennbar ist. Letztendlich kann eine Unterscheidung der einzelnen Süßstoffe (Rebaudiosid A/Aspartam und Saccharose), als auch der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigen bisherige Forschungen auf dem Gebiet der Metabolomics im Zusammenhang mit Ernährungsinterventionen und Urinproben.

Ein Beispiel stellt eine Metabolomics Untersuchung von humanen Urinproben nach Aufnahme von grünem Tee dar. Die Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse resultierte in einer klaren Trennung der Kontrollgruppe von der behandelten Gruppe mittels LC/MS/MS, GC/MS und  $^1\text{H}$  NMR. Die statistische Analyse der LC/MS sowie  $^1\text{H}$  NMR Daten erlaubte die Identifikation potentieller Biomarker entsprechend der Intervention mit grünem Tee [LAW et al., 2008].

Die Auswirkung diätetischer Interventionen mit sekundären Pflanzenstoffen auf akute Veränderungen des metabolischen Profils im Urin wurde von Walsh et al ermittelt. Deutliche Unterschiede im metabolischen Profil konnten nach Entfernung des Obst- und Gemüseanteils in der Diät (LPD - low phytochemical diet) im Vergleich zu ND (normal diet) sowie der SPD (standard phytochemical diet) beobachtet werden. Akute Veränderungen des metabolischen Profils im Urin können somit anhand dieser Studie bestätigt werden. Infolgedessen kann daraus geschlossen werden, dass diätetische Standardisierung sowie diätetische Einschränkungen 24 Stunden vor Probensammlung möglicherweise zur Verbesserung der Interpretation der Daten durch die Reduktion störender Effekte aufgrund diverser Nahrungsaufnahme innerhalb der Studienpopulation führen kann [WALSH et al., 2007].

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Erforschung des Effekts der Probenaufbereitung sowie chromatographischer Verfahren auf postprandiale Urinbiomarker humaner Urinproben nach Aufnahme unterschiedlicher Diäten reich an gesättigten Fettsäuren (SAFA), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA). Unabhängig vom Verfahren der Probenaufarbeitung konnte jede diätetische Intervention bezüglich des metabolischen Profils deutlich voneinander unterschieden werden. Hinsichtlich dieses eindeutigen Resultats muss jedoch hinzugefügt werden, dass im Gegensatz zu der im Zuge der Diplomarbeit durchgeführten Studie diese Untersuchung auf einer 4-wöchigen Run-in Periode basierte, wobei jeder Versuchsteilnehmer während dieses Zeitraumes einer Basisdiät unterzogen wurde, und somit interindividuelle Variationen möglicherweise besser kompensiert werden konnten [LEGIDO-QUIGLEY et al., 2010].

Eine Studie von Kuhnert et al, welche sich mit der Differenzierung der grünen Kaffeebohnenvarietäten *Coffea arabica* und *Coffea canephora* (auch unter der Bezeichnung Robusta bekannt) hinsichtlich deren individuellen phytochemischen Profils beschäftigte, konnte annähernde Ergebnisse darlegen. Analysiert wurden wässrige methanolische Kaffeebohnenextrakte mittels LC-ESI-TOF-MS und anschließender PCA-Analyse unter Verwendung der gleichen Auswertesoftware, mit welcher auch die statistische Auswertung der Diplomarbeit erfolgte. Der Score Plot erlaubte eine klare Gliederung in Arabica und Robusta Bohnen. Gezieltes Profiling resultierte in der Unterscheidung beider Kaffeesorten durch molekulare Marker, welche allerdings nur aufgrund vorheriger Identifikation von etwa hundert sekundären Metaboliten möglich war [KUHNERT et al., 2011].

Die Erfassung dieser eindeutigen Ergebnisse sind jedoch sowohl aufgrund des *a priori* Knowhows über die Zusammensetzung der Proben [KUHNERT et al., 2011], als auch aufgrund der direkten Messung von Kaffeebohnenextrakte zurückzuführen und sollen daher keinen Vergleich für die Ermittlung metabolischer Veränderungen anhand humaner Urinproben nach Ernährungsintervention darstellen, sondern zur Veranschaulichung der Möglichkeiten und Fähigkeiten einer PCA-Analyse unter Verwendung von LC-MS Daten dienen.

Gezieltes Profiling setzt Wissen über die metabolische Zusammensetzung der Nährstoffe voraus und kann aufgrund dessen die statistische Auswertung in Metabolomics Studien verbessern bzw. erleichtern.

Zusammengefasst kann bemerkt werden, dass die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse großen interpersonellen Schwankungen unterliegen, bei Betrachtung der einzelnen Probanden allerdings eine klare Clusterung der Süßstoffgruppen beobachtet werden konnte. Weitere statistische Anwendungen sind jedoch entscheidend, um bestmögliche Analysenergebnisse erzielen zu können und die Identifizierung einzelner Verbindungen zu ermöglichen, um die metabolischen Einflüsse nach Ernährungsinterventionen besser verstehen zu können.

## 5 SCHLUSSBETRACHTUNG

Da Lebensmittel Tausende von Metaboliten enthalten und weitere Stoffwechselintermediate nach Nahrungsaufnahme, Verdauung, Absorption und Metabolismus resultieren, stellen die Metaboliten in Körperflüssigkeiten eine potentiell reiche Quelle an Informationen über die ernährungsbedingte Exposition dar. Metabolomics erlaubt eine umfangreiche Analyse von Molekülzusammensetzungen anhand humaner Biofluide, und bietet daher bessere objektive Informationen hinsichtlich der letzten oder habituellen Nahrungsaufnahme [FAVÉ et al., 2011].

Primäres Ziel dieser Ernährungsinterventionsstudie war die Ermittlung des Einflusses von Süßstoffen (Rebaudiosid A/Aspartam) und Saccharose im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf das metabolische Profil im Urin. Hauptaugenmerk wurde auf den pflanzlichen Süßstoff *Stevia rebaudiana* – genau genommen auf das Steviolglykosid bzw. Rebaudiosid A – gelegt. Einige wissenschaftliche Studien konnten bereits metabolische Veränderung im Urin nach Ernährungsinterventionen nachweisen, wodurch ein postprandialer Einfluss auf das Metabolom bestätigt werden kann.

Von großer Bedeutung bei der Planung und Durchführung von Ernährungsinterventionsstudien ist das Studiendesign. Es ist besonders wichtig, ein möglichst homogenes Probandenprofil zu erstellen, um auftretende Variationen eines Individuums zu minimieren. Störfaktoren können sowohl intra- als auch interindividueller Natur sein. Zu diesen zählen unter anderem das Geschlecht, Lebensstil, Alter, Umweltfaktoren, kulturelle Einflüsse sowie bei weiblichen Personen der Hormonstatus.

Erwähnenswert sind ebenso analytische und biologische Variationen, welche auch die Analyse des Metaboloms beeinflussen können. Darunter versteht man die Probensammlung, Lagerung der Proben, Probenaufbereitung und Messung sowie die instrumentelle Variation/Stabilität. Die Reduzierung ungewollter Störfaktoren bildet daher eine zentrale Aufgabenstellung in Metabolomics-Studien, um folglich resultierende negative Einflüsse auf das Ergebnis der Studie einzugrenzen [SCALBERT et al., 2009].

### Studiendesign:

260 Urinproben aus 13 weiblichen Probanden wurden, wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, aufbereitet, mittels HPLC-MS Analyse gemessen und anschließend die Daten durch Anwendung des Statistikprogrammes Profile Analysis mit Hilfe der PCA-Analyse ausgewertet. Anders als erwartet, ergaben erste Betrachtungen der PCA-Auswertung aller Probanden zu große interindividuelle Schwankungen, um einen direkten Einfluss der Intervention mit Süßstoffen bestätigen zu können. Die Ergebnisse der Auswertung einzelner Probanden zeigten jedoch eine eindeutige Clusterung innerhalb der verschiedenen Süßstoffe, sodass postprandiale Effekte auf das humane metabolische Profil im Urin mit dieser Studie belegt werden konnten.

Weitere statistische Beurteilungen, sowie die Bestimmung einzelner Molekülstrukturen und Verbindungen sind erforderlich, um genauere bzw. aussagekräftigere Resultate erzielen zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Metabolomics zur Ermittlung des metabolischen Profils in humanen Biofluiden stellt ein bedeutendes Instrument für die Erforschung auf dem Gebiet der Ernährungsinterventionsstudien dar. Aufgrund mangelnder bzw. unterschiedlicher standardisierter Protokolle sowie verschiedener Strategien zur Durchführung derartiger Studien, stellt die Planung und Umsetzung solcher Studien eine große Herausforderung dar. Die meisten, in der Literatur vorhandenen Versuchsanweisungen, basieren auf Daten der NMR-Analyse und nur wenige finden sich im Zusammenhang mit HPLC-MS Methoden und humanen Urinproben. Trotz der Vielzahl unterschiedlicher Informationen bezüglich der Planung und Durchführung einer Interventionsstudie konnte dennoch ein geeignetes Studiendesign, angefangen von der Probensammlung bis hin zur Messung der Urinproben und anschließender Auswertung ausgearbeitet werden.

In der Studie sollte der Einfluss von Rebaudiosid A/Aspartam sowie Saccharose, als auch unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe, auf metabolische Veränderungen in humanen Urinproben untersucht werden. Das Probandenkollektiv bestand aus 13 weiblichen Teilnehmern, welche jede Intervention einmal absolvierte und somit jeder Proband selbst als Kontrollgruppe fungierte. Die Auswertung ergab Unterschiede im metabolischen Profil bei Betrachtung der Analyse eines einzelnen Probanden, wo es zu einer eindeutigen Clusterung der einzelnen Süßstoffe kam. Die Beurteilung der Daten aller Probanden zeigte zu große interindividuelle Schwankungen, um eine eindeutige bzw. klare Aussage treffen zu können. In Anbetracht dessen, sind weitere statistische Anwendungen von Bedeutung, um umfangreichere Analyseergebnisse ermöglichen zu können. Zusammengefasst kann dennoch dargelegt werden, dass sowohl Urin ein passendes Medium, sowie die Messung der Proben mittels HPLC-MS Analyse eine geeignete Methode für Metabolomics-Studien darstellen, um postprandiale Einflüsse in Urinproben beschreiben zu können.

## 7 SUMMARY

The development of metabolomics to get information about the metabolic profile in human biofluids is a paramount instrument for the investigation in nutrition intervention studies.

Due to less or different standard protocols and different strategies to fulfill such studies it is a great challenge to implement these studies.

In literature, most tries and facts are based on NMR-analysis and fewer facts are found in connection with HPLC-MS methods and human urine samples. In spite of the huge number of different information regarding the scheduling and realization of an intervention study, a suitable design for the study could be found, starting with the collection of the samples, including the measurement of the urine samples and evaluation at the end.

The influence of Rebaudiosid A, Aspartam and Sucrose, with consideration of a checkgroup, of metabolic changes and human urine samples has to be inspected. The collective of the test persons consisted of 13 female participants. They had to absolve each intervention at least once. Every single person has to act as his own checkgroup.

The result showed us differences in the metabolic profile in viewing the analysis of each test person. An obvious clustering of each sweetener was the result by inspection of a single participant. The judgement of all test persons together demonstrates big inter-individual variations to give up a clear statement.

More statistical analysis are necessary, to enable extensive analysis results.

In summary it has to be said, that urine is a perfect medium as well as the measurement of the samples with HPLC-MS analysis is a perfect method for metabolomics studies to show postprandial influences which can be measured in urine samples.



## 8 ANHANG

## 8.1 Influence, Score und Loading Plots der PCA-Analyse einzelner Probanden

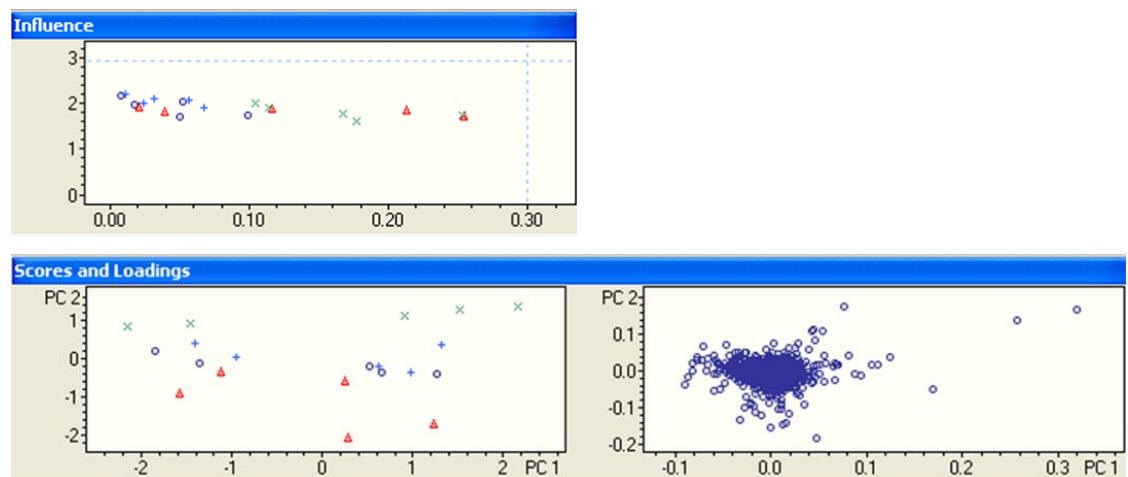
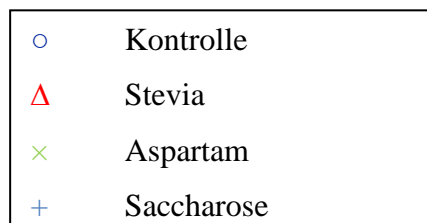


Abbildung I: Proband 1

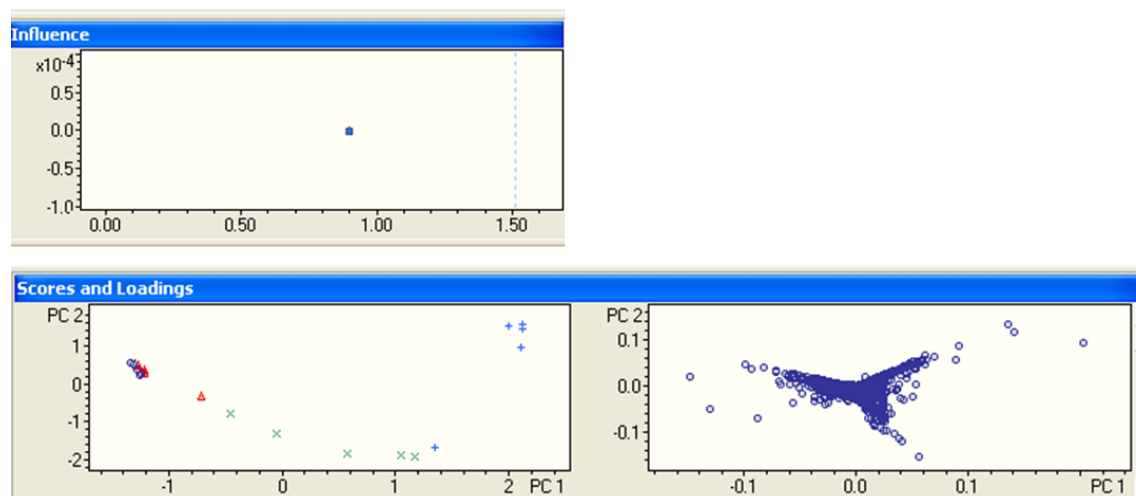


Abbildung II: Proband 2

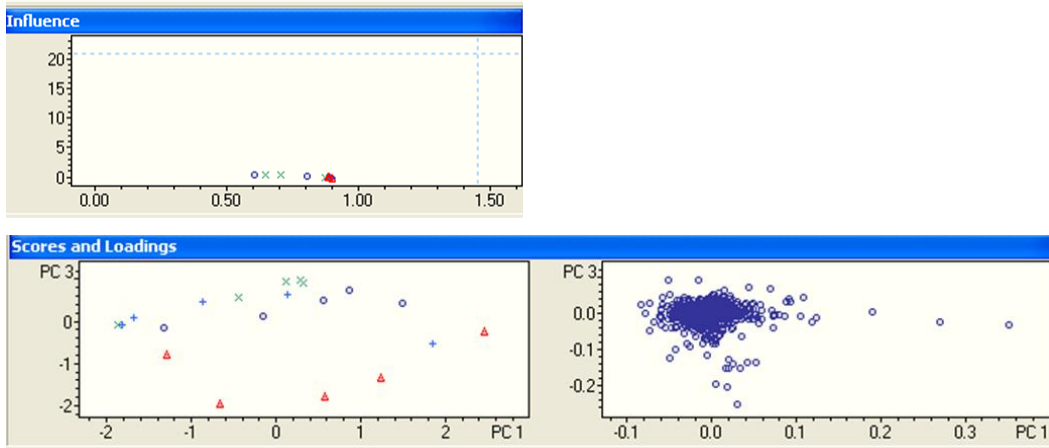


Abbildung III: Proband 3

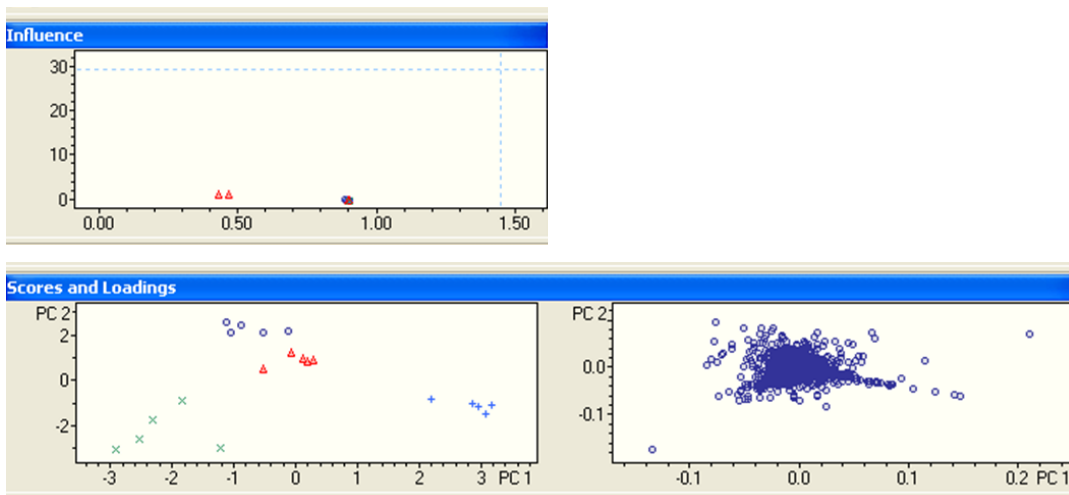


Abbildung IV: Proband 4

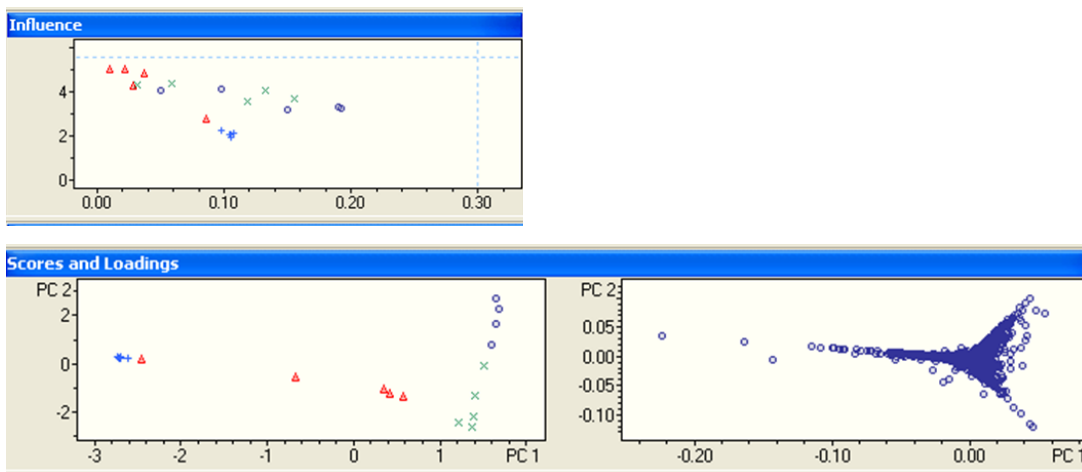


Abbildung V: Proband 5

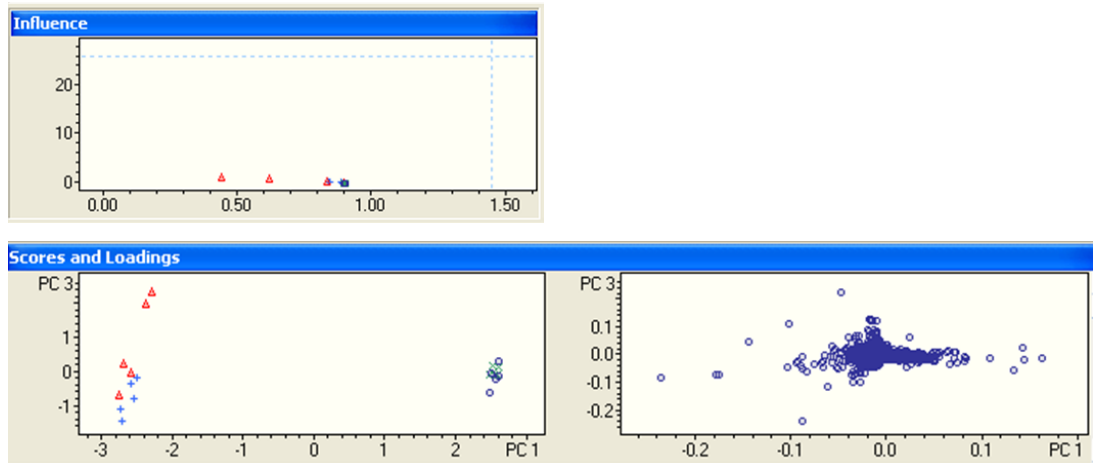


Abbildung VI: Proband 6

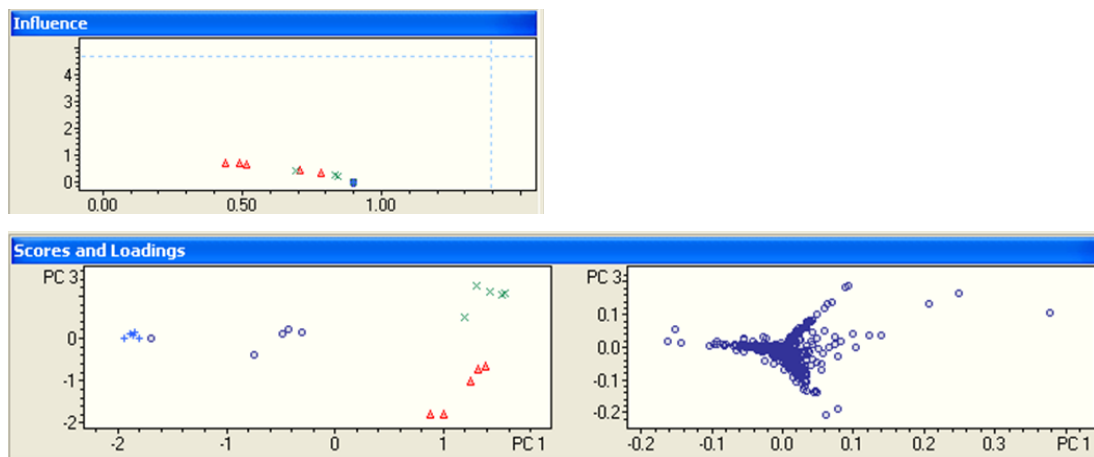


Abbildung VII: Proband 7

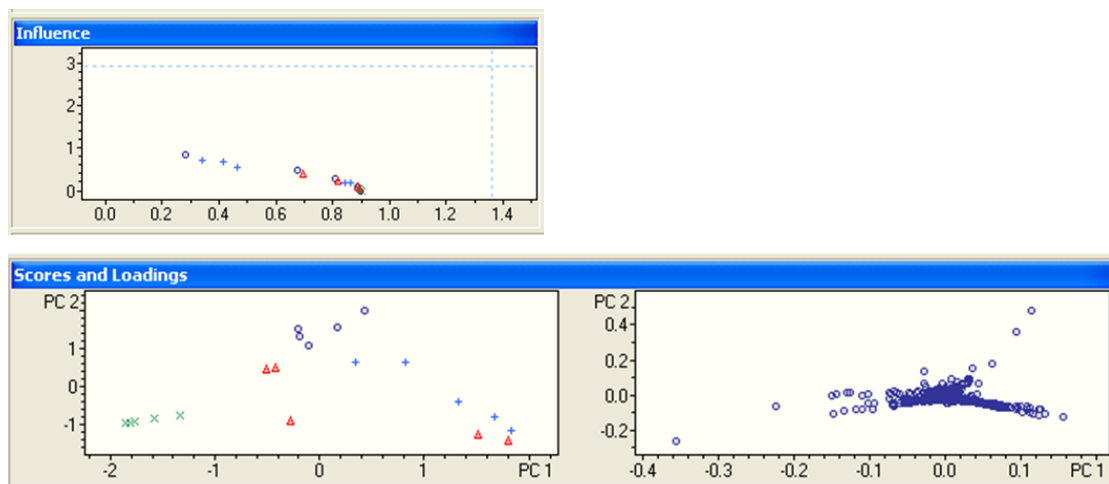


Abbildung VIII: Proband 8

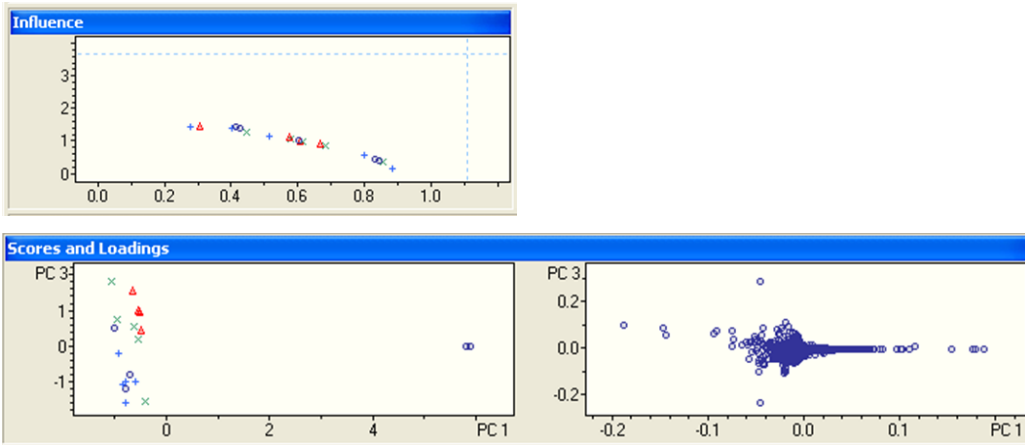


Abbildung IX: Proband 9

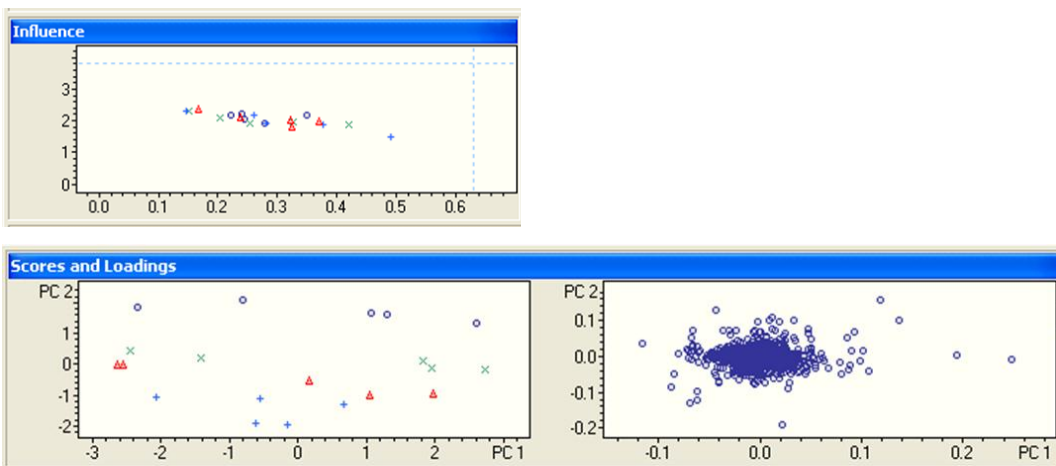


Abbildung X: Proband 10

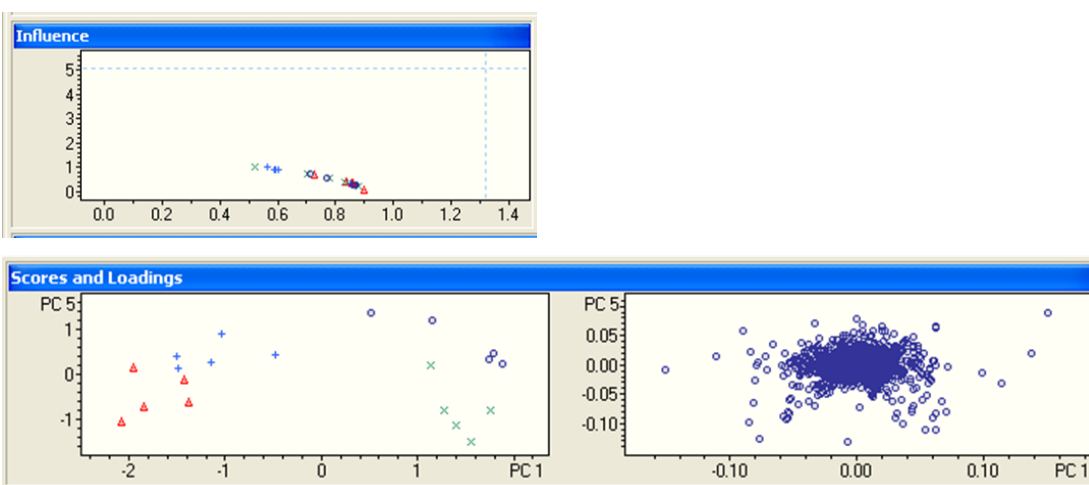


Abbildung XI: Proband 11

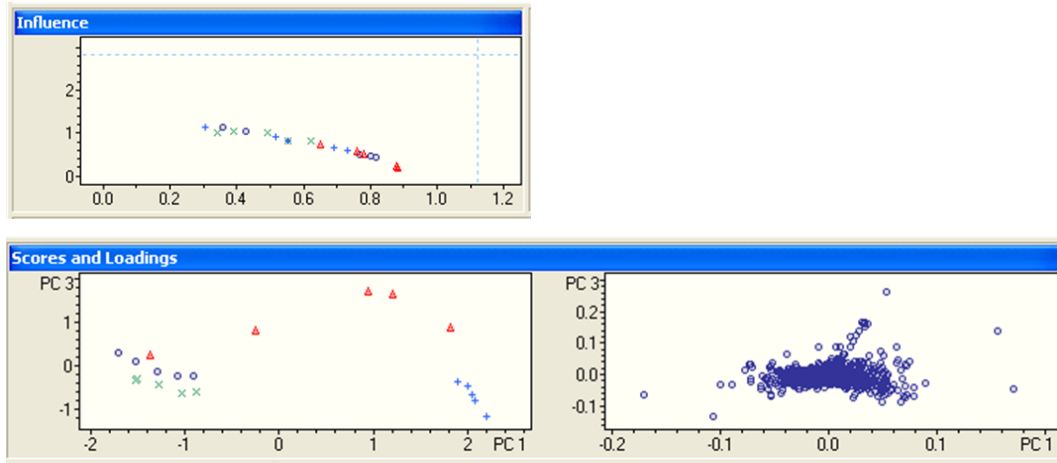


Abbildung XII: Proband 12

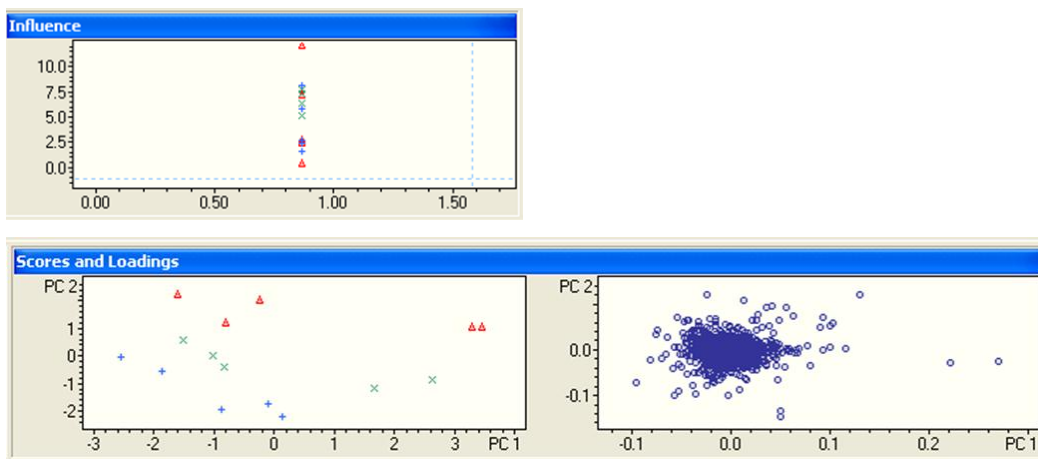


Abbildung XIII: Proband 13

## 8.2 Influence, Score und Loading Plots der PCA-Analyse von Proband 1 bis 13

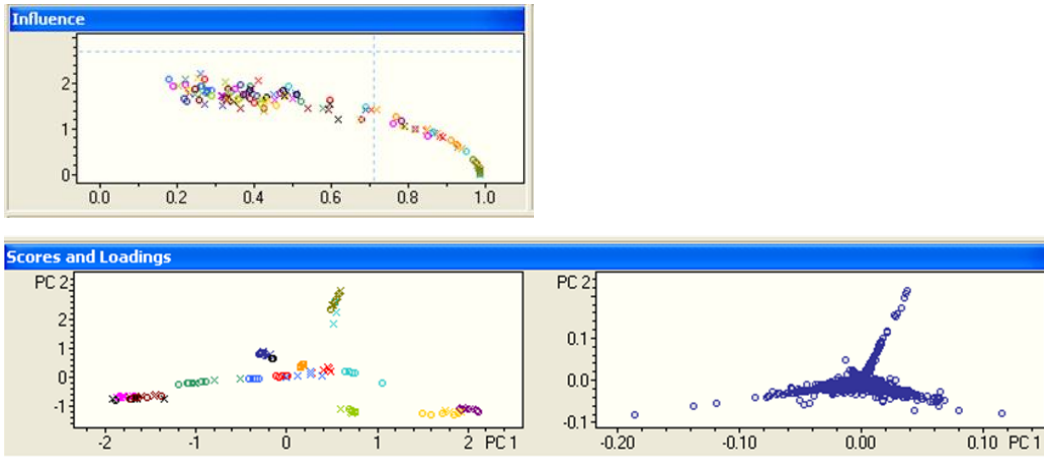


Abbildung XIV: Aspartam versus Kontrolle

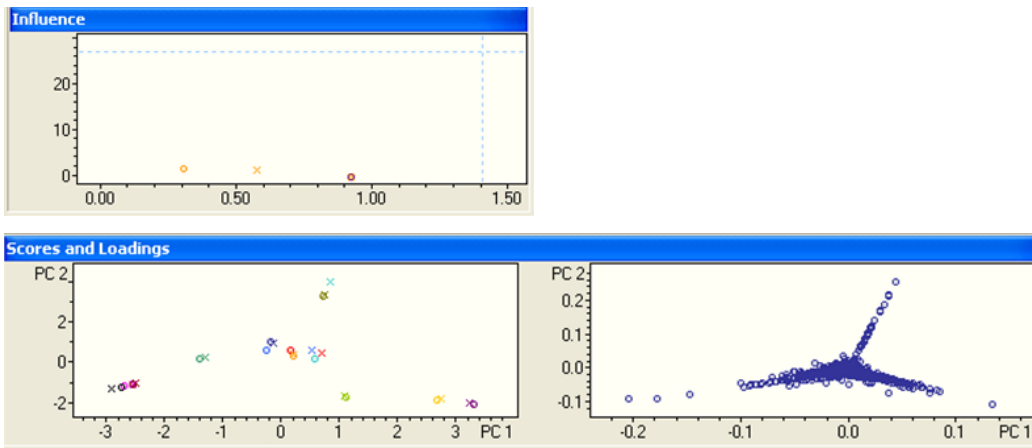
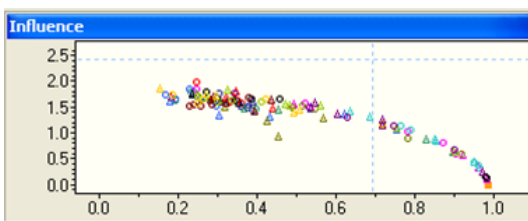


Abbildung XV: Aspartam versus Kontrolle (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)



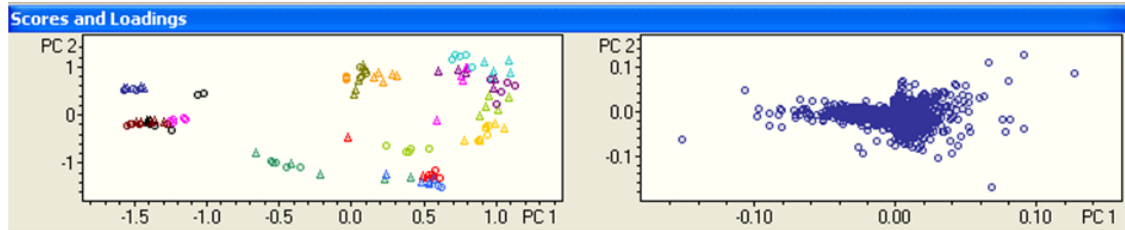


Abbildung XVI: Stevia (Rebaudiosid A) versus Kontrolle

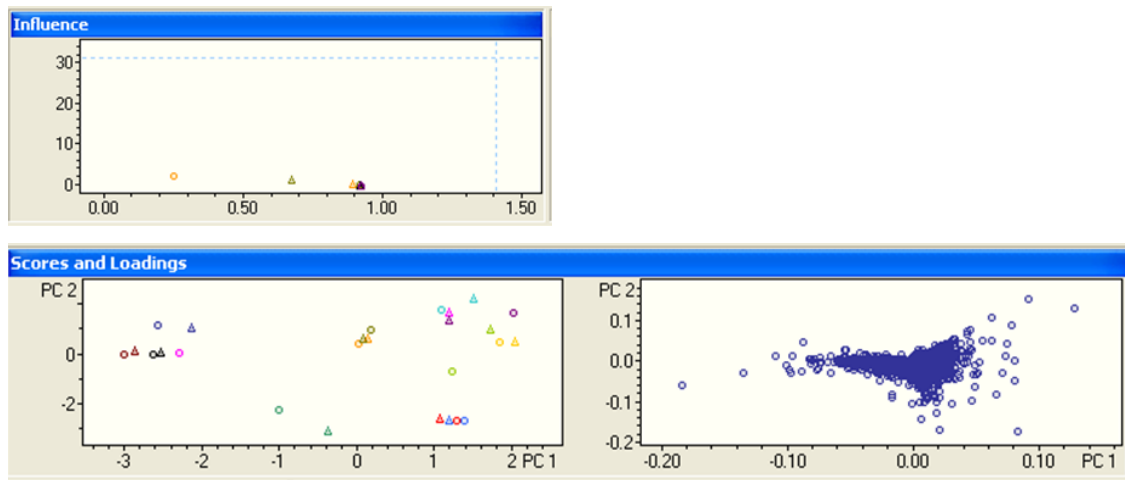


Abbildung XVII: Stevia (Rebaudiosid A) versus Kontrolle (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)

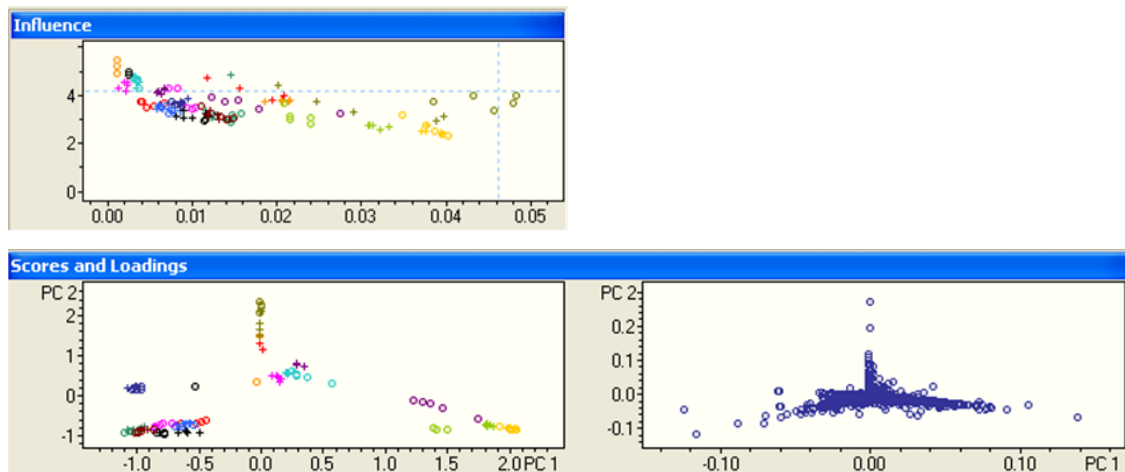


Abbildung XVIII: Saccharose versus Kontrolle

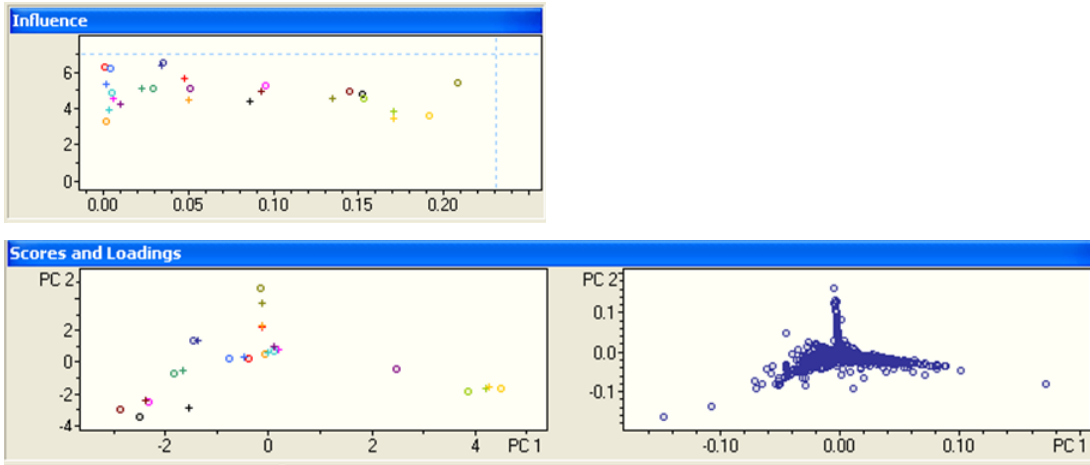


Abbildung XIX: Saccharose versus Kontrolle (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)

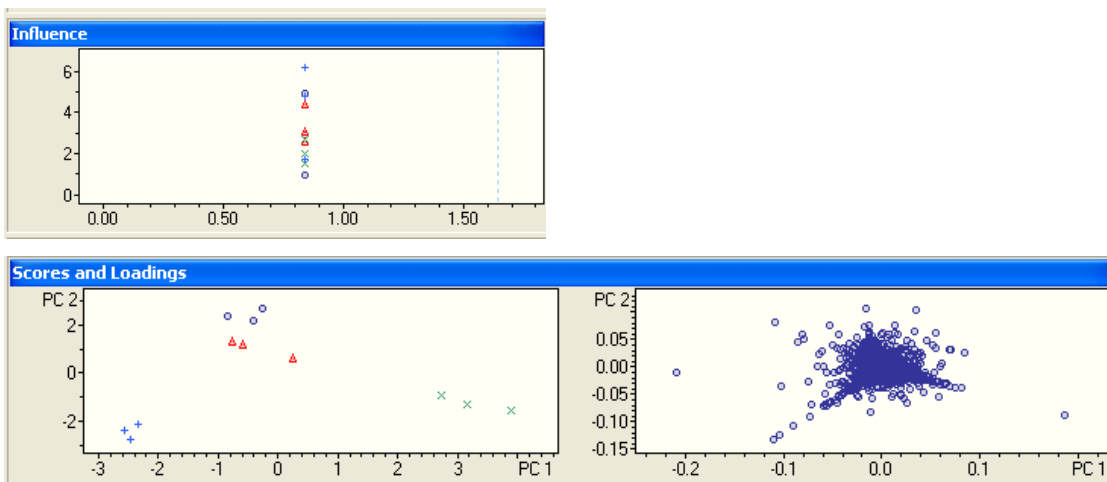


Abbildung XX: Proband 4, ohne Nüchternwerte

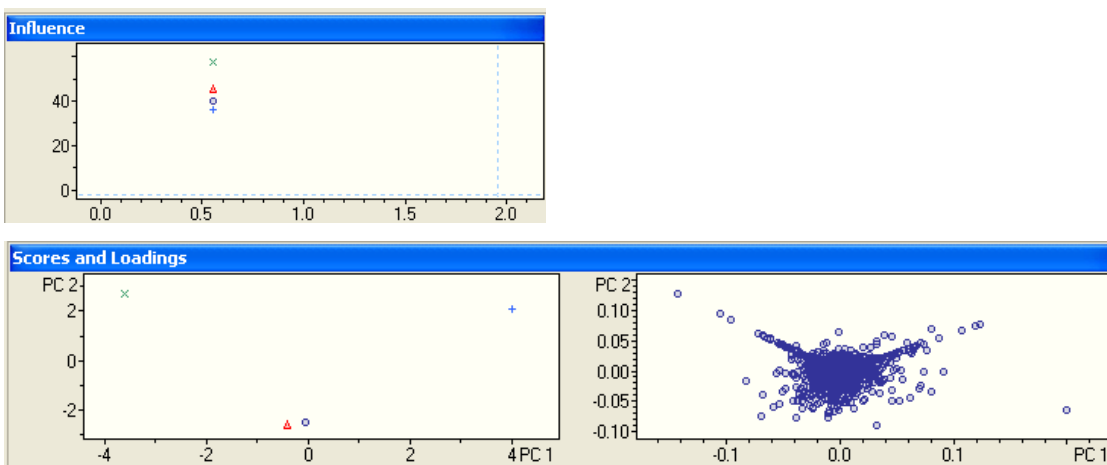


Abbildung XXI: Proband 4 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1)



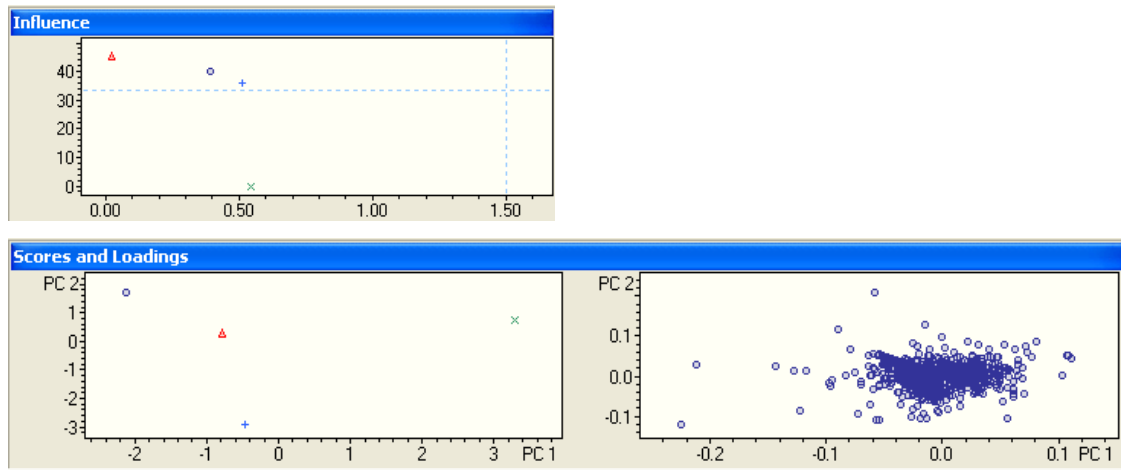


Abbildung XXII: Proband 4 (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)

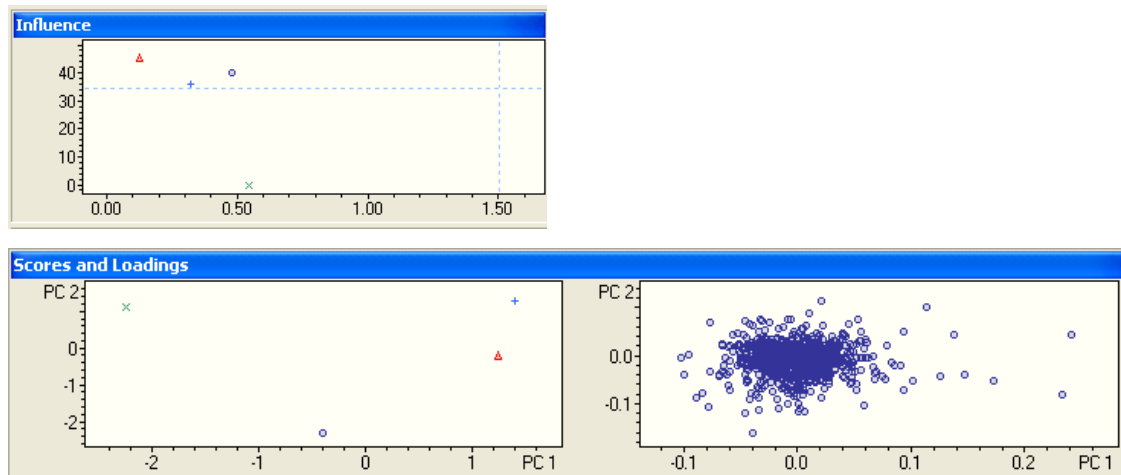


Abbildung XXIII: Proband 4 (18 h nach Intervention, Zeitpunkt 3)

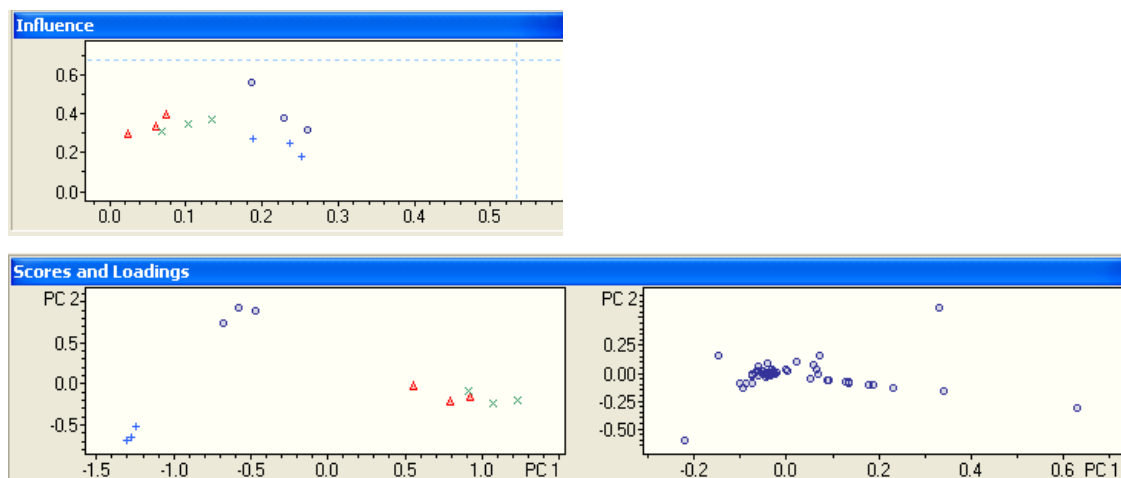


Abbildung XXIV: Proband 7, ohne Nüchternwerte

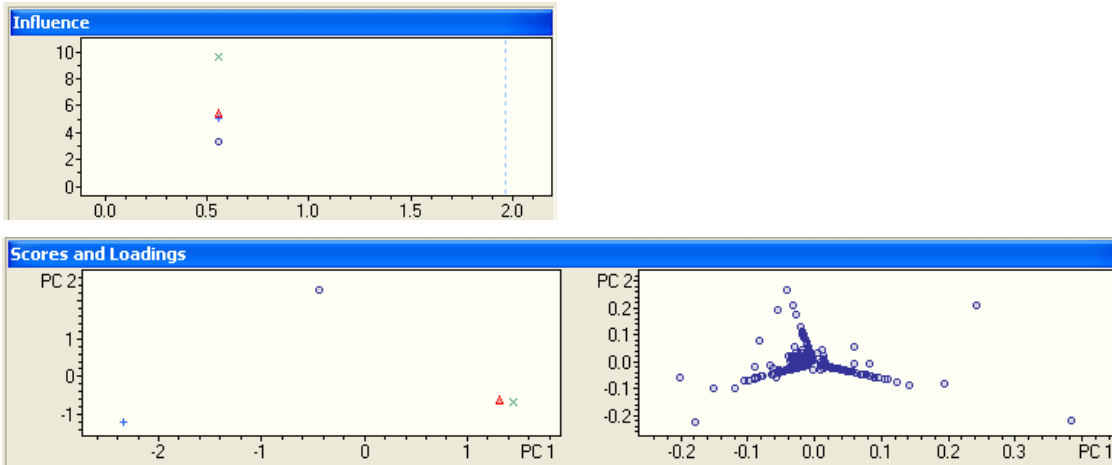


Abbildung XXV: Proband 7 (6 h nach Intervention, Zeitpunkt 1)

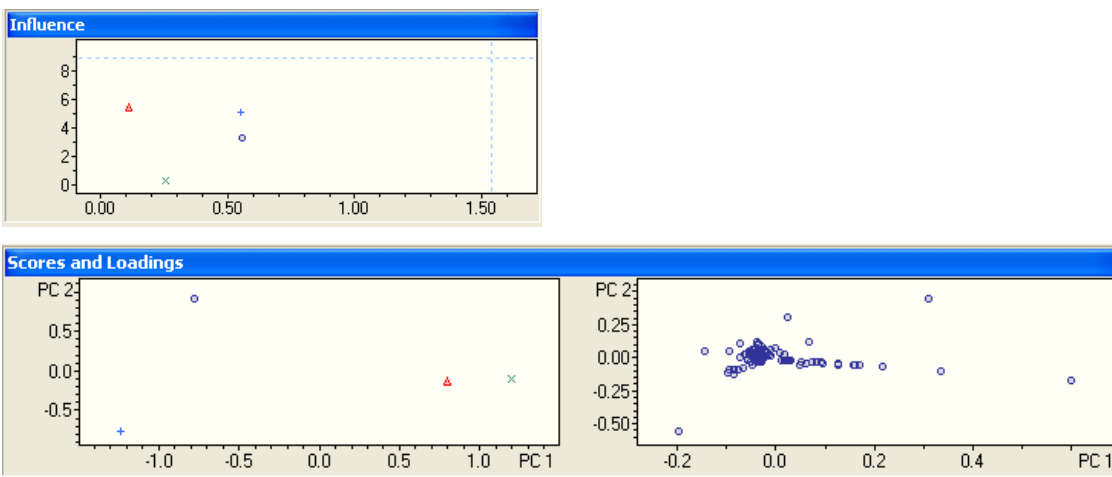


Abbildung XXVI: Proband 7 (12 h nach Intervention, Zeitpunkt 2)

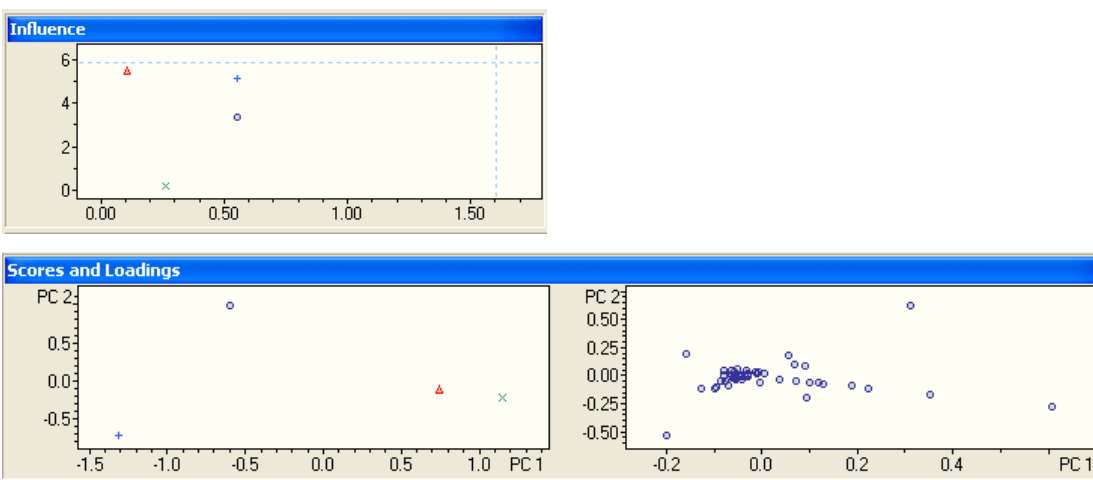


Abbildung XXVII: Proband 7 (18 h nach Intervention, Zeitpunkt 3)

### 8.3 Ernährungsplan

---

Frühstück:

**2 Stück Vollkornbrot (100 g)**

**Butter (10 g)**

**2 Scheiben Käse/Wurst/Schinken (50 g)**

---

Zwischenmahlzeit:

**Joghurt mit Früchten (180 g)**

---

Mittagessen:

**1 Portion Chili con carne**

**1 Stück Gebäck (Kornspitz, Weckerl)**

**Butter**

---

Nachmittagsjause:

**1 Stück Obst**

**Nüsse**

---

Abendessen:

**Gemischter Salat mit Joghurtdressing/ Essig-Öl-Marinade**

**1 Stück Vollkornbrot**

**Butter (10 g)**

**Wurst/Käse/Schinken (30 g)**

---

Getränke:

**1,5 l in Form von Wasser oder ungesüßtem Tee/Kaffee**

---

Tabelle 6: Ernährungsplan

**9 LITERATURVERZEICHNIS**

GEUNS, M.C. J. Stevioside. *Phytochemistry* 2003, 64: 913-921.

GEUNS, M.C. J. Stevioside: A Safe Sweetener and Possible New Drug for the Treatment of the Metabolic Syndrome. *American Chemical Society* 2008, 596-614.

NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C.; HOLMES, E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999, 29: 1181-1189.

REZZI, S.; RAMADAN, Z.; FAY, B. L.; KOCHHAR, S. Nutritional Metabolomics: Applications and Perspectives. *Journal of Proteome Research* 2007, 6: 513-525.

SCALBERT, A.; BRENNAN, L.; FIEHN, O.; HANKEMEIER, T.; KRISTAL, B. S.; OMMAN van B.; PUJOS-GUILLOT, E.; VERHEIJ, E.; WISHART, D.; WOPEREIS, S. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 2009, 5: 435-458.

DETTMER, K.; ARONOV, P.A.; HAMMOCK, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007, 26(1): 51-78.

MICHLMAYR, A.; OEHLER, R. 'Omics': state of the art in vitro techniques employed in surgical research. *EurSurg* 2010, 42/3: 127-133.

GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; WILSON, I.D. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine, Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *Journal of Chromatography A* 2008, 1189: 314-322.

LUTZ, U.; BITTNER, N.; LUTZ, R. W.; LUTZ, W. K. Metabolite profiling in human urine by LC-MS/MS: Method optimization and application for glucuronides from dextromethorphan metabolism. *Journal of Chromatography B* 2008, 871: 349-356.

SAUDE, E. J.; SYKES, B. D. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics* 2007, Vol. 3, No. 1, 19-27.

RASMUSSEN, L. G.; SAVORANI, F.; LARSEN, T. M.; DRAGSTED, L.O.; ASTRUP, A.; ENGELSEN, S. B. Standardization of factors that influence human urine metabolomics. *Metabolomics* 2010, Vol. 7, No. 1, 71-83.

LEGIDO-QUIGLEY, C.; STELLA, C.; PEREZ-JIMENEZ, F.; LOPEZ-MIRANDA, J.; ORDOVAS, J.; POWELL, J.; FRANS VAN-DER- QUDERAA; WARE, L.; LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; HOLMES, E. Liquid chromatography-mass spectrometry methods for urinary biomarker detection in metabonomic studies with application to nutritional studies. *Biomedical Chromatography* 2010, 24: 737-743.

WALSH, M.; BRENNAN, L.; MALTHOUSE, J.P.G.; ROCHE, H.M.; GIBNEY, M.J. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006, 84: 531-539.

WAGNER, S.; SCHOLZ, K.; SIEBER, M.; KELLERT, M.; VOELKEL, W. Tools in Metabonomics: An Integrated Validation Approach for LC-MS Metabolic Profiling of Mercapturic Acids in Human Urine. *Analytical Chemistry* 2007, 79: 2918-2926.

WALSH, M.; BRENNAN, L.; PUJOS-GUILLOT, E.; SÉBÉDIO, J.; SCALBERT, A.; FAGAN, A.; HIGGINS, D. G.; GIBNEY, M. J. Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomics profiles. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007, 86: 1687-1693.

MAHER, A. D.; ZIRAH, S. F. M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. Experimental and analytical variation in human urine in <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Analytical Chemistry* 2007, 79: 5204-5211.

ASSFALG, M.; BERTINI, I.; COLANGIULI, D.; LUCHINAT, C.; SCHÄFER, H.; SCHÜTZ, B.; SPRAUL, M. Evidence of different metabolic phenotypes in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2008, 105 (5): 1420-1424.

PRAKASH, I.; DUBOIS, G. E.; CLOS, J. F.; WILKENS, K. L.; FOSDICK, L. E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46: 75-82.

BRAHMACHARI, G.; MANDA, L. C.; ROY, R.; MONDAL, S.; BRAHMACHARI, A. K. Stevioside and related compounds – Molecules of pharmaceutical promise: A critical overview. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci* 2011, 1: 5-19.

CARDELLO, H. M. A. B.; DA SILVA, M. A. P. A.; DAMASIO, M. H. Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plant Foods for Human Nutrition* 1999, 54: 119-130.

GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; PIETTA, P. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003, 51: 6618-6622.

KOYAMA, E.; KITAZAWA, K.; OHORI, Y.; IZAWA, O.; KAKEGAWA, K.; FUJINO, A.; UI, M. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology* 2003a, 41: 359-374.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology* 2009, 47: 1831-1836.

RAMANATHAN, P.; SELLAPPAN, R. S. Safety study of aqueous leaves extract of stevia rebaudiana leaves in albino rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, 2 (1): 477-481.

KUMAR, R. D.; OOMMEN, O. V. Stevia rebaudiana Bertani does not produce female reproductive toxic effect: Study in Swiss albino mouse. *Journal of Endocrinology and Reproduction* 2008, 12 (1): 57-60.

NUNES, A. P. M.; FERREIRA-MACHADO, S. C.; NUNES, R. M.; DANTAS, F. J. S.; DE MATTOS, J. C. P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology* 2007, 45: 662-666.

KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C. B. *Sugars and Sweeteners*. CRC Press, 1991, Boca Raton, Florida.

MARIE, S.; PIGGOTT, J. R. *Handbook of sweeteners*. Blackie, 1991, Glasgow England.

BELLISTE, F.; DREWNOWSKI, A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *European Journal of Clinical Nutrition* 2007, 61: 691-700.

AGER, D. J.; PANTALEONE, D. P.; HENDERSON, S. A.; KATRITZKY, A. R.; PRAKASH, I.; WALTERS, D. E. *Commercial, Synthetic Nonnutritive Sweeteners*. *Angewandte Chemie International Edition* 1998, 37: 1802-1817.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology* 2004, 15:1460-1465.

MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009, 89: 1-14.

MAGNUSON, B. A.; BURDOCK, G. A.; DOULL, J.; KROES, R. M.; MARSH, G. M.; PARIZA, M. W.; SPENCER, P. S.; WADDELL, W. J.; WALKER, R.; WILLIAMS, G. M. Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. *Critical Reviews in Toxicology* 2007, 37: 629-727.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; MANSERVIGI, M.; TIBALDI, E.; LAURIOLA, M.; FALCIONI, L.; BUA, L. Aspartame Administered in Feed, Beginning Prenatally Trough Life Span, Induces Cancers of the Liver and Lung in Male Swiss Mice. *American Journal of Industrial Medicine* 2010, 53: 1197-1206.

HALLDORSSON, T. I.; STRØM, M.; PETERSEN, S. B.; OLSEN, S. F. Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery: a prospective cohort study in 59,334 Danish pregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010, 92: 626-633.

Statement of EFSA on the scientific evaluation of two studies related to the safety of artificial sweeteners. *EFSA Journal* 2011a, 9(2):2089.

BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; COMER, C. P.; MAYHEW, D. A.; BENNINGER, C.; BLACKBURN, G. L.; J. de SONNEVILLE, L. M.; GEHA, R. S.; HERTELENDY, Z.; KOESTNER, A.; LEON, A. S.; LIEPA, G. U.; MCMARTIN, K. E.; MENDENHALL, C. L.; MUNRO, I. C.; NOVOTNY, E. J.; RENWICK, A. G.; SCHIFFMAN, S. S.; SCHOMER, D. L.; SHAYWITZ, B. A.; SPIERS, P. A.; TEPHLY, T. R.; THOMAS, J. A.; TREFZ, F. K. Aspartame: Review of Safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2002, 35: 1-93.



ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal Component Analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, 2 (2010).

Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. Statement of EFSA. EFSA Journal 2011b, 9(1):1972.

CARAKOSTAS, M. C.; CURRY, L. L.; BOILEAU, A. C.; BRUSICK, D. J. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food and Chemical Toxicology 2008, 46: 1-10.

RAJAB, R.; MOHANKUMAR, C.; MURUGAN, K.; HARISH, M.; MOHANAN, P. V. Purification and toxicity studies of stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Toxicology International 2009, 16, 1: 49-54.

TANDEL, K. R. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 2011, 2(4): 236-243.

LÖFFLER, G.; PETRIDES, P. E.; HEINRICH, P. C. Biochemie und Pathobiochemie. 8. völlig neu bearb. Aufl.. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2007, 360.

KUHNERT, N.; JAISWAL, R.; ERAVUCHIRA, P.; EL-ABASSY, R. M.; B. von der KAMMER.; MATERNY, A. Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. Analytical Methods 2011, 3: 144-155.

FAVÉ, G.; BECKMANN, M., LLOYD, A. J.; ZHOU, S.; HAROLD, G.; LIN, W.; TAILLIART, K.; XIE, L.; DRAPER, J.; MATHERS, J. C. Development and validation of a standardized protocol to monitor human dietary exposure by metabolite fingerprinting of urine samples. Metabolomics 2011, 7: 469-484.

GAQUEREL, E.; HEILING, S.; SCHOETTNER, M.; ZUREK, G.; BALDWIN, I. T. Development and Validation of a Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for Induced Changes in *Nicotiana attenuata* Leaves during Simulated Herbivory. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2010, 58 (17): 9418-9427.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research* 2007, 6: 469-479.

WINNIKE, J.; BUSBY, M. G.; WATKINS, P. B.; O'CONNELL, T. M. Effects of a prolonged standardized diet on normalizing the human metabolome. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009, 90:1496-501.

BRUKER DALTONICS. Profile Analysis 1.1. Software for Profiling and Statistical Evaluation of LC/MS Data Sets. *Bruker Daltonik GmbH* 2007, 5-12.

WALLACE, M.; HASHIM, Y. Z. H.-Y.; WINGFIELD, M.; CULLITON, M.; MCAULIFFE, F.; GIBNEY, M. J.; BRENNAN, L. Effects of menstrual cycle phase on metabolomics profiles in premenopausal woman. *Human Reproduction* 2010, 25 (4): 949-956.

GIBNEY, M. J.; WALSH, M.; BRENNAN, L.; ROCHE, H. M.; GERMAN, B.; B. van OMMEN. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005, 82 (3): 497-503.

LAW, W. S.; HUANG, P. Y.; ONG, E. S.; ONG, C. N.; LI, S. F. Y.; PASIKANTI, K. K.; CHAN, E. C. Y. Metabonomics investigation of human urine after ingestion of green tea with gas chromatography/mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22: 2436-2446.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

**Name:** Heike Stipsits  
**Adresse:** Frauenkirchnerstraße 4, 7141 Podersdorf am See  
**Nationalität:** Österreich  
**Telefon:** 0699/11 10 89 51  
**Email:** heikest1@gmx.at  
**Geburtsdatum:** 30.04.1984  
**Familienstand:** Ledig  
**Führerschein:** Kategorie B

## Ausbildung

---

seit Oktober 2005: *Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaften, 1090 Wien; geplanter Abschluss des Diplomstudiums: Jänner 2012*

Ausbildungsschwerpunkt: *Psychologie der Ernährung/Ernährungsberatung; Experimentelle Ernährungsforschung (Metabolomics)*

Diplomarbeitsthema: *Einfluss von Süßstoffen auf das metabolische Profil im Urin (HPLC-MS - Analyse)*

September 2003 – September 2005: *Kolleg für Chemie* in der Rosensteingasse, 1170 Wien

Ausbildungsschwerpunkt: *Umweltechnik und Umweltschutzmanagement*

September 1998 – Juli 2003:

*Pannoneum – Tourismusschule in 7100 Neusiedl am See*

Ausbildungsschwerpunkt: *Tourismusmanagement*

Erworbene Qualifikation: *Matura*

## Beruflicher Werdegang

- 04.10.2010 bis 29.10.2010: **Praktikum: Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien, Magistratsabteilung 38, 1030 Wien**  
Organoleptik (Probenaufbereitung)  
Bakteriologie (Probenansatz, Verdünnungsreihen, Keimdiagnostik, Arbeit mit pathogenen Keimen)
- 02.02.2009 bis 02.03.2009 **Praktikum: Psychosomatisches Zentrum Waldviertel, 3730 Eggenburg**  
Mithilfe bei diätologischen und ernährungswissenschaftlichen Tätigkeiten; Teilnahme an Gruppentherapien, an Koch- und Genusstrainings; Datenverwaltung des „Schlank-ohne-Diät-Programms“; Auswertung von Fragebögen
- 11.04.2008 bis 16.05.2008: **Praktikum: Praxis für ganzheitliche Ernährungstherapie, Edith Kubierna (Diätologin), 2491 Neufeld**  
Ausarbeiten von ernährungswissenschaftlichen Themen; Erstellung und Berechnung (DGE-PC) von Rezepten; Assistenz bei Ernährungsberatungen und Vorträgen; Erstellung eines Artikels; Überarbeitung und Gestaltung von Ernährungsberatungsunterlagen; Mitarbeit bei der Konzeption und Ausarbeitung
- 08/2004: **Praktikum: BUNGE Austria, 2460 Bruck/Leitha**  
Labor
- 07/2004: **Praktikum: Gewässeraufsicht, 7041 Wulkaprodersdorf**  
Labor

## Persönliche Fähigkeiten und Kompetenzen

- Muttersprache:**
- Deutsch
- Fremdsprachenkenntnisse:**
- Englisch (in Wort und Schrift)
  - Französisch (Schulniveau)
- Computerkenntnisse:**
- MS Office
  - fundierte fachliche Kenntnisse bei der Erfassung von Analyseergebnissen mit den Programmen Data Analysis und Profile Analysis (erworben im Zuge meiner Diplomarbeit)
- Technische Fähigkeiten:**
- souveräne Handhabung von Laborgeräten
  - präziser Umgang bei der Durchführung von Analysen
- Organisatorische Fähigkeiten:**
- zielbewusstes Arbeiten und Handeln
  - Ausdauer, Geduld
  - lösungsorientiertes Handeln
  - Organisationsfähigkeit