

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München
Lehrstuhl: Univ.–Prof. Dr. Dr. h.c. A. Stolle

und dem

Walther–Straub–Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig–Maximilians–Universität München
Kommissarischer Vorstand:
Univ.–Prof. Dr. E. Richter

**Vorkommen und Toxikokinetik
von Myosmin
in Abhängigkeit von Rauchen und Ernährung**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

von
Katharina Schütte–Borkovec
aus
Hannover

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Stolle
Korreferent/en:	Jun.-Prof. Dr. Deeg

Tag der Promotion: 18.Juli 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 1 -
2	LITERATURÜBERSICHT ZUM THEMA MYOSMIN	- 3 -
2.1	Tabak und dessen Verarbeitung	- 3 -
2.1.1	Historischer Hintergrund	- 3 -
2.1.2	Die Tabakpflanze	- 6 -
2.1.3	Verschiedene Konsumierungsarten von Tabak	- 8 -
2.1.4	Der Tabakrauch	- 9 -
2.1.5	Die Tabakalkaloide	- 11 -
2.2	Vorkommen von Myosmin	- 13 -
2.2.1	Geschichtliches	- 13 -
2.2.2	Biosynthese von Myosmin in der Tabakpflanze	- 14 -
2.2.3	Nachweis von Myosmin in <i>Nicotiana tabacum</i>	- 17 -
2.2.4	Schnupftabakanalysen im Hinblick auf Myosmin	- 19 -
2.2.5	Identifizierung von Myosmin im Zigarettentabak	- 20 -
2.2.6	Myosmin im Tabakrauch und in der Umgebungsluft	- 22 -
2.2.6.1	Quantifizierung der Myosminkonzentration im Tabakrauch	- 22 -
2.2.6.2	Myosminbelastung in durch Tabakrauch verschmutzter Umwelt	- 25 -
2.2.7	Das Vorkommen von Myosmin in weiteren Pflanzen	- 27 -
2.2.8	Myosminkonzentration in Abwehrsekreten von Ameisen (<i>Messor spp.</i>)	- 28 -
2.2.9	Die Existenz von Myosmin in verschiedenen Nahrungsmitteln	- 29 -
2.2.10	Myosmin in Körperflüssigkeiten (Muttermilch, Speichel, Plasma)	- 30 -
2.2.10.1	Muttermilch	- 31 -
2.2.10.2	Speichel	- 32 -
2.2.10.3	Vergleich der Myosminkonzentrationen in Speichel und Plasma	- 33 -
2.2.11	Myosminbelastung des Menschen	- 33 -
2.3	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Myosmin	- 34 -
2.4	Analytik von Myosmin	- 35 -
2.5	Synthesemöglichkeiten von Myosmin	- 39 -
2.6	Toxikokinetik	- 41 -
2.6.1	Autoradiographische Untersuchungen	- 41 -
2.6.1.1	Verteilung	- 42 -
2.6.1.2	Ausscheidung	- 44 -
2.6.2	Metabolisierung von Myosmin	- 44 -
2.6.2.1	Biomonitoring	- 44 -
2.6.2.2	Akuter Metabolismus von Myosmin in Ratten	- 45 -
2.6.2.3	Subakuter Metabolismus von Myosmin in Ratten	- 47 -
2.7	Toxizität des Myosmins	- 48 -
2.7.1	Akute und chronische Toxizität	- 48 -
2.7.2	Toxische Wirkungen auf Kreislauf und Muskulatur	- 48 -
2.7.3	Effekte von Myosmin an cholinergen Rezeptoren sympathischer Ganglien	- 50 -
2.7.4	Toxische Wirkungen auf die Fruchtbarkeit	- 52 -
2.7.5	Genotoxizität von Myosmin	- 52 -
2.8	Nitrosamine	- 57 -
2.8.1	Endogene Nitrosaminbelastung	- 57 -
2.8.2	Exogene Nitrosaminbelastung	- 58 -
2.8.3	Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)	- 59 -
2.8.4	Metabolismus und Organspezifität von NNK und NNN	- 61 -

2.8.5	Nitrosierung von Myosmin	- 64 -
2.8.6	Peroxidierung von Myosmin	- 66 -
2.8.7	Adduktbildungen	- 66 -
2.8.7.1	Hämoglobinaddukte	- 66 -
2.8.7.2	DNA-Addukte	- 67 -
2.8.7.3	Hydroxypyridylbutanon freisetzende Addukte	- 68 -
2.9	Ösophaguskarzinom	- 71 -
2.9.1	Bedeutung von TSNA und Myosmin für den Ösophaguskrebs	- 74 -
2.10	Zielsetzung der Arbeit	- 76 -
3	MATERIAL UND METHODEN	- 77 -
3.1	Material	- 77 -
3.2	Chemikalien	- 79 -
3.2.1	Herstellung der Reagenzien	- 79 -
3.3	Gute Laborpraxis	- 80 -
3.4	Methoden	- 81 -
3.4.1	Analysengang für Speichel- und Plasmaproben	- 81 -
3.4.1.1	Entnahme von Plasma und Speichel	- 81 -
3.4.1.2	Festphasenextraktion	- 81 -
3.4.1.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion	- 83 -
3.4.1.4	Überführung in Hexan	- 84 -
3.4.2	Analysengang für Zehennägel	- 84 -
3.4.2.1	Probenvorbereitung	- 84 -
3.4.2.2	Verdauung	- 85 -
3.4.2.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion	- 85 -
3.4.2.4	Überführung in Hexan	- 85 -
3.5	GC/MS-Analyse	- 85 -
3.5.1	Nachweis charakteristischer Fragmente im Single Ion Monitoring (SIM)	- 87 -
3.5.1.1	GC-Bedingungen	- 88 -
3.5.1.2	MS-Bedingungen	- 88 -
3.5.2	Berechnung der Konzentration von Myosmin, Cotinin und Nikotin	- 89 -
3.6	Validierung der Methode	- 89 -
3.6.1	Plasma	- 89 -
3.6.1.1	Herstellung der Verdünnungsreihen	- 89 -
3.6.2	Zehennägel	- 91 -
3.6.2.1	Herstellung der Verdünnungsreihen	- 91 -
3.6.3	Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	- 93 -
3.6.4	Präzision	- 94 -
3.6.5	Linearität und Wiederfindungsrate	- 94 -
3.6.6	Statistische Auswertung der Daten	- 94 -
4	ERGEBNISSE	- 96 -
4.1	Ergebnisse der Literaturrecherche	- 96 -
4.2	Analytik	- 97 -
4.2.1	Identifizierung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin	- 97 -
4.2.1.1	Fragmentierung von Myosmin	- 97 -
4.2.1.2	Fragmentierung von Cotinin	- 99 -
4.2.1.3	Fragmentierung von Nikotin	- 101 -
4.2.2	Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln	- 103 -

4.2.2.1	Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode	- 103 -
4.2.2.2	Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß	- 104 -
4.2.2.3	Wiederfindung der Analyten	- 105 -
4.2.2.4	Identifizierung der Nachweisgrenze und Festlegung der Bestimmungsgrenze	- 105 -
4.2.3	Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Speichel und Plasma	- 105 -
4.2.3.1	Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode	- 105 -
4.2.3.2	Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß	- 106 -
4.2.3.3	Wiederfindung der Analyten	- 106 -
4.2.3.4	Identifizierung der Nachweisgrenze und Festlegung der Bestimmungsgrenze	- 107 -
4.3	Bestimmung von Myosmin im Plasma von Schweinen und im Schweinefutter	- 107 -
4.3.1	Tiere	- 107 -
4.3.2	Bestimmung von Myosmin im Schweineplasma	- 107 -
4.3.3	Zusammensetzung und Analyse des Schweinetrockenfutters	- 109 -
4.4	Bestimmung von Myosmin, Nikotin und Cotinin in Zehennägeln und Speichel von Menschen	- 110 -
4.4.1	Demographische Daten der Probanden	- 110 -
4.4.2	Konzentration von Myosmin, Nikotin und Cotinin in Zehennägeln	- 110 -
4.4.3	Bestimmung der Konzentration von Myosmin und Cotinin im Speichel	- 113 -
4.5	Zeitlicher Verlauf der Myosminkonzentration im Speichel in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme	- 114 -
4.5.1	Vorversuch	- 114 -
4.5.2	Gruppenversuch	- 116 -
4.5.2.1	Myosmingehalt der Mittagsmahlzeit	- 117 -
4.5.2.2	Zeitlicher Verlauf der Myosminkonzentrationen im Speichel	- 117 -
5	DISKUSSION	- 121 -
5.1	Beurteilung der Methode	- 123 -
5.2	Myosmin im Schweineplasma und zugehörigen Futter	- 124 -
5.3	Myosmin in menschlichen Zehennägeln und Speichel	- 125 -
5.4	Zeitabhängige Verlaufsstudie der Myosminkonzentration im Speichel	- 129 -
5.5	Schlussfolgerung	- 132 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 133 -
7	SUMMARY	- 136 -
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 138 -
9	TABELLENVERZEICHNIS	- 141 -
10	LITERATURVERZEICHNIS	- 143 -
11	ANHANG	- 162 -
	Danksagung	- 167 -
	Lebenslauf	- 168 -

Abkürzungen

AUC	Area under the curve
COT	Cotinin
CPE	Cloud point extraction
CPRT	Chinolinsäurephosphoribosyltransferase
CYP	Cytochrom
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLT	Dunkler luftgetrockneter Tabak
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronen-Stoß-Ionisation
ETS	Environmental tobacco smoke
EREF	Exposure relevant emission factor
eV	Elektronenvolt
F	Filterzigarette
FF	Full flavor
FFLT	Full flavor low tar
Fpg	Formamidopyrimidinglykosylase
i.v.	Intravenös
GLP	Gute Laborpraxis
GC	Gaschromatographie
HCL	Salzsäure
HPB	Hydroxypyridylbutanon
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Hauptstromrauch, (mainstream smoke)
ISTD	Interner Standard
LOAEL	Lowest observed adverse effect load
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LVG	Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim

LZ	Leichte Zigarette, (light cigarette)
Lsg.	Lösung
M	Molekulargewicht
mg	Milligramm
μl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
MYO	Myosmin
NAB	<i>N</i> -Nitrosoanabasin
NAT	<i>N</i> -Nitrosoanatabin
NaOH	Natronlauge
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NFZ	Filterlose Zigarette, (non filter cigarette)
ng	Nanogramm
NIK	Nikotin
NMR	Nuclear magnetic resonance
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (nicotine derived nitrosamino ketone)
NNN	<i>N'</i> -Nitrosornikotin
NO	Stickstoffmonoxid
NPD	Nitrogen-phosphorus detector
NPIP	<i>N</i> -Nitrosopiperidin
NPRO	<i>N</i> -Nitrosoprolin
NPYR	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidin
NS	Nebenstromrauch, (sidestream smoke)
NSAR	<i>N</i> -Nitrososarcosin
NTCA	<i>N</i> -Nitrosothiazolincarbonsäure

OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
pg	Pikogramm
pH	Pondus Hydrogenii
p .i.	Post injectionem
PP	Polypropylen
psi	Pounds per square inch
R	Rest (in chemischen Formeln)
RPC	Reversed-phase-chromatographie
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
SPME	Solid phase microextraction
Std.	Stunden
TLC	Thin layer chromatographie
TSNA	Tabakspezifische Nitrosamine
t_R	Retentionszeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
u	Unified atomic mass unit (atomare Masseneinheit)
ULT	Ultra low tar
UV	Ultraviolett
V	Volumen
Zig.	Zigaretten

1 Einleitung

Myosmin, 3-(1-pyrrolin-2-yl) pyridin, wurde lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen. Dies änderte sich mit der Entdeckung von *Zwickenpflug et al.* [1] und *Tyroller et al.* [2]. Sie konnten Myosmin in einer breiten Palette von Nahrungsmitteln wie z.B. Kartoffeln und Reis, und auch in Lebensmitteln tierischer Herkunft wie Milch und Sahne nachweisen. Seitdem ist Myosmin nicht mehr als ausschließlich in Tabak vorkommend einzustufen. Dies wurde auch von *Maier et al.* [3] durch den Nachweis von Myosmin in menschlichen Körperflüssigkeiten wie Muttermilch, Speichel und Plasma erhärtet. Mit Hilfe des Comet-Assays konnten *Kleinsasser et al.* [4] eine konzentrations- und zeitabhängige DNA-Schädigung durch Myosmin nach *in vitro* Inkubation humaner Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten zeigen. In einer weiteren Arbeit wurde die Genotoxizität von Myosmin mit Hilfe des Comet-Assays in der humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinie OE33 gezeigt [5].

Bei der Nitrosierung von Myosmin entsteht das tabakspezifische Nitrosamin *N'*-Nitrosornikotin, welches bei Nagern Tumoren im Ösophagus, der Nase und der Lunge auslöst. In größeren Mengen entsteht durch Nitrosierung und auch Peroxidierung ein reaktives Zwischenprodukt welches zu DNA- und Proteinaddukten führt. Die gleichen Addukte wurden nach metabolischer Aktivierung von *N'*-Nitrosornikotin und einem weiteren human-karzinogenen tabakspezifischen Nitrosamin gefunden.

Nachdem Myosmin auch in menschlichem Speichel und Muttermilch identifiziert werden konnte, stellte sich die Frage, wie hoch die Belastung des Menschen mit Myosmin ist, und ob sie durch Rauchen wesentlich beeinflusst wird. Da Myosmin sowohl in Lebensmitteln tierischer Herkunft, wie auch in menschlichem Plasma nachgewiesen wurde, war es ebenso interessant das Plasma von Schweinen, auf Myosmin hin zu untersuchen.

Neben einer umfangreichen Literaturrecherche zu dem Thema Myosmin war das erste Ziel dieser Arbeit, die bislang verwendete Analytik zur Identifizierung von Tabakalkaloiden in Speichel, Plasma und Zehennägeln, in Hinblick auf die Wiederfindungsrate, Empfindlichkeit und Präzision, zu optimieren und alle benutzten Analysenvorgänge zu validieren. Zu den weiteren Zielen gehörte der Nachweis dieser Alkaloide in verschiedenen Versuchen:

- Bestimmung der Myosminkonzentration in Plasma von nüchternen Schweinen, von Schweinen nach der Nahrungsaufnahme und im zugehörigen Futter.
- Untersuchung der langfristigen Belastung des Menschen mit Myosmin in Abhängigkeit des Rauchstatus durch Bestimmung von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln

als Langzeitmarker und die Korrelation mit den Myosmin- und Cotininkonzentrationen im zugehörigen Speichel als Kurzzeitmarker.

- Die Durchführung eines Gruppenversuchs, bei dem von allen Testpersonen unter gleichen Grundvoraussetzungen und gleicher Nahrungsaufnahme die individuelle Myosminbelastung im Speichel über den Tag verteilt analysiert wurde. Aus den Myosminkonzentrationen wurden individuelle Myosminbelastungsprofile erstellt. Zusätzlich wurde die an dem Versuchstag aufgenommene Nahrung untersucht.

2 Literaturübersicht zum Thema Myosmin

2.1 Tabak und dessen Verarbeitung

2.1.1 Historischer Hintergrund

Der Ursprung der Tabakkultur begann vor mehr als 3000 Jahren im damals unentdeckten Amerika. Anbau und Konsum von Tabak gab es von Brasilien bis Kanada bereits lange vor der Ankunft der Spanier.

Die ameroindianische Zivilisation fing an zusammengerollte Tabakblätter zu rauchen. Diese überdimensionalen Zigarren nannten sie „Tabaco“. Diese Form des Tabakgenuss war primär in Brasilien, Zentralamerika und den Karibischen Inseln vertreten.

Die Vielfalt der Konsumierungsarten war damals schon sehr groß, der Tabak wurde in Verbindung mit Kalk gekaut (Nordküste Südamerikas), als Puder geschnupft (Karibische Inseln), in Schilfröhrchen geraucht (Mexiko) und im Gebiet des heutigen Guyana wurden die Tabakblätter sogar zu einem Saft ausgekocht.

Im vorkolumbianischen Amerika war der Tabak nicht nur eine Heilpflanze, sondern diente auch für religiöse Zwecke. Einerseits benutzten Priester und Schamanen die Tabakpflanze um mit den Göttern in Kontakt zu treten, andererseits zur medizinischen Anwendung. Sie legten Tabakblätter auf Wunden zur Beschleunigung der Wundheilung, Schlangenbisse wurden damit verarztet und gegen Asthma und Krankheiten der Atemwege wurde Tabak geraucht.

Mit der Entdeckung Amerikas am 12. Oktober 1492 erhielt auch die Alte Welt Kenntnis von Tabak. Als Christoph Columbus auf den Bahamas anlegte, brachten ihm die Inselbewohner Präsente, darunter befanden sich auch Tabakblätter. Mit diesem Geschenk konnte er erst etwas anfangen, als zwei seiner Männer auf der Insel Kuba Eingeborenen zusahen, wie sie sich die Blätter in den Mund steckten, diese anzündeten und dann den Rauch „tranken“. Christoph Columbus führte die Tabakpflanze daraufhin erstmals nach Europa ein.

Aber am spanischen, wie auch am portugiesischen Hof wurde der Tabak zunächst nur als Zierpflanze genutzt. Erst im 16. Jahrhundert propagierte der Leibarzt von Philipp II. den Tabak als Allheilmittel.

Im Jahr 1556 brachte erstmals der Mönch André Thevet Tabaksamen nach Frankreich. Hier erreichte der Tabak nun endgültig dank Jean Nicot, welcher als französischer Diplomat und Gesandter am portugiesischen Hof war, seinen Durchbruch. Nicot glaubte an die heilende Wirkung der Pflanze und schickte der Königin Katharina von Medici Tabakpulver, um die

Migräne ihres Sohnes zu heilen. Das Pulver zeigte eine gute Wirkung und wurde nun unter den Schutz der Königin gestellt. Der Verkauf des Tabakpulvers blieb den Apothekern vorbehalten. Zu Ehren Jean Nicots wurde die Pflanze von nun an „*Nicotiana Tabacum*“ genannt.

Erst Ende des 16. Jahrhunderts begannen die Spanier die eingerollten Blätter nach indianischem Vorbild zu rauchen, ebenso wurde in Frankreich der Tabakkonsum in Form von Pfeifenrauchen immer populärer. Allgemein erlangte diese neue Mode immer größere Beliebtheit und der Tabak wurde rasch zu einem teuren und bedeutungsvollen Handelsgut, Tabak war damals das Zehnfache von Pfeffer wert.

In jedem Land, in dem sich der Tabakkonsum verbreitete, gab es auch damals bald schon viele Gegner, es kam zu massiven Verbotsversuchen im 17. Jahrhundert, die sowohl kirchlicher als auch wirtschaftlicher und politischer Natur waren. Ungeachtet dieser Verbote nahm der Tabakkonsum dennoch stark zu, woraufhin die Landesherren den Gebrauch zwar gestatteten, aber gezielt besteuerten. Tabak wurde zu dem so genannten „Penicillin des 17. Jahrhunderts“. Er wurde zur Therapie von Verbrennungen und Wunden empfohlen, heilte angeblich Warzen, linderte Koliken und beseitigte sogar uterine Probleme [6]. Bis zum ersten Weltkrieg war der Tabakkonsum in den USA, Europa und Japan trotzdem eher bescheiden. 1920 lag der Pro-Kopf-Verbrauch (bezogen auf den Bevölkerungsanteil der über 15-jährigen) in den westlichen Staaten zwischen 400 und 800 Zigaretten pro Jahr. In den 1930er Jahren war Deutschland der größte Tabakimporteur der Welt, pro Jahr wurden 100.000 t aus Griechenland, Türkei und Bulgarien eingeführt. Dabei rauchten 80% aller Männer und 20% aller Frauen (Pro-Kopf-Verbrauch ca. 3500 Zigaretten pro Jahr). Im August 1939, mit Beginn des zweiten Weltkrieges, wurde der Tabak rationiert, es gab nun Raucherkarten: Männern standen pro Monat 40 Zigaretten zu, Frauen erhielten 20 Stück.

Bis dahin hatte das Regime in Deutschland unter Hitler mit Zigarettenmarken wie „Sturm“, „Alarm“ oder „Trommler“ viel Geld verdient. Doch dann wurde das Rauchen zum „Laster minderer Rassen“ erklärt. Ebenso mobilisierte Hitler die Forschung und spendete 1941 sogar 100.000 Reichsmark aus der Kasse der Reichskanzlei zur Gründung des Instituts zur Erforschung der Tabakgefahren in Jena.

Bereits 1939 war es dem jungen Kölner Mediziner *Müller* [7] erstmals gelungen, den kausalen Zusammenhang zwischen Rauchen und Lungenkrebs durch detaillierte pathologische Fallstudien festzustellen und epidemiologisch zu untermauern. *Lickint* [8], trotz sozialdemokratischer Vergangenheit wegen seiner Forschungen von Reichsgesundheitsführer Conti protegirt, konnte zeigen, dass Tabakrauch auch Nichtraucher schädigt und prägte den Begriff

des Passivrauchens. In anderen Ländern war die Forschung frühestens in den Fünfziger- und Sechzigerjahren so weit. Dies konnte auch an dem Tabakkonsum in Deutschland festgemacht werden, hier fiel der Tabakverbrauch zwischen 1940 und 1950 pro Kopf um die Hälfte (Abbildung 1), was jedoch in dieser Zeit eher eine Frage der finanziellen Möglichkeiten war und nicht an dem zunehmenden Gesundheitsbewusstsein lag. In den USA verdoppelte sich der Tabakkonsum im selben Zeitraum.

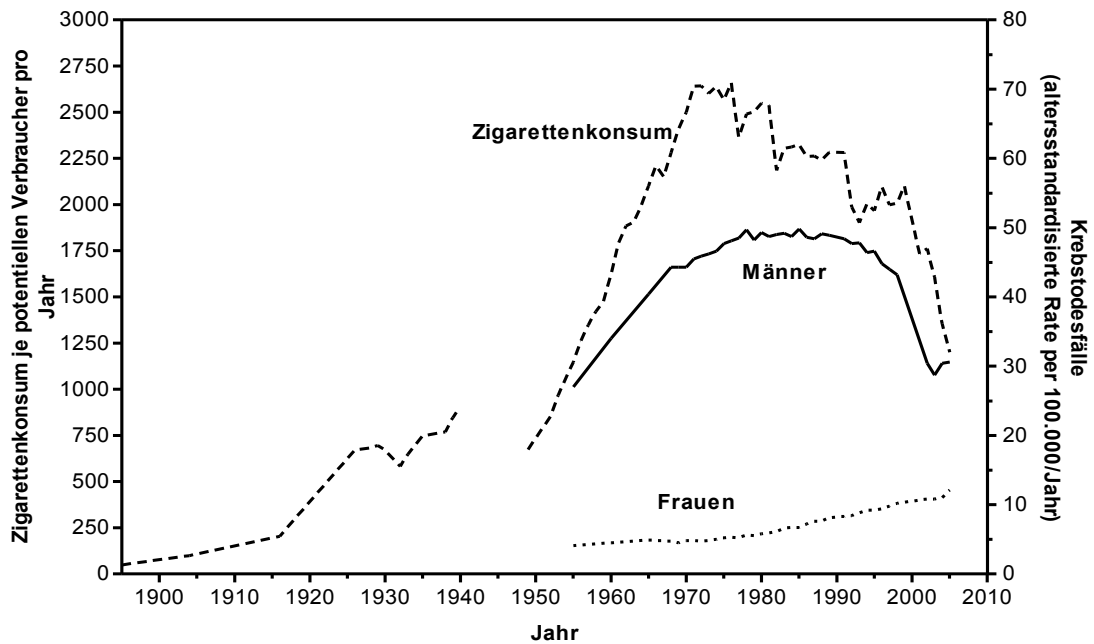


Abbildung 1: Entwicklung des Zigarettenkonsums (---) von Erwachsenen (> 15 Jahre) von 1900 bis 2005 und die Lungenkrebsraten bei Männern (–) und Frauen (...) von 1955 bis 2005 in Deutschland [9].

Es ist dennoch erstaunlich, dass selbst solch ein totalitärer Staat wie Deutschland unter dem Nazi-Regime nicht in der Lage war, gegen eine mächtige Tabakindustrie zu gewinnen. Die Siegermächte USA und UK ignorierten viele Forschungsergebnisse aus Deutschland, darunter die Erforschung des Krebsrisikos, komplett. Im Gegenteil, sie schifften stattdessen 1948/49 90.000 Tonnen Tabak als Teil des Marshall-Plans kostenlos nach Deutschland ein [10]. Im Nachkriegsdeutschland war die Zigarette nun wieder ein kostbares Gut und erlangte die Bedeutung einer Zweitwährung. Danach kam es bis Mitte der 1960er Jahre zu einer rasanten Entwicklung, der jährliche Tabakkonsum stieg auf 2400 Zigaretten pro Kopf. Mitte der 50er Jahre erschienen dann auch in den USA und England Berichte über die negative Wirkung des Rauchens aus der Klinischen Medizin, doch gab es damals noch zu wenig medizinische Argumente gegen den Tabakkonsum. Erst als Vergleiche und Langzeitstudien zwischen Rauchern und Nichtrauchern durchgeführt wurden, stellte man die gesundheitsschädlichen

Folgen und das sehr starke Suchtpotential eindeutig fest. Die ersten großen Untersuchungen wurden in den 1950er Jahren, also mehr als zehn Jahre später als in Deutschland, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden vom amerikanischen „Surgeon General’s Advisory Committee“ zusammengefasst und veröffentlicht (Abbildung 2), diese schockierten die Gesellschaft.

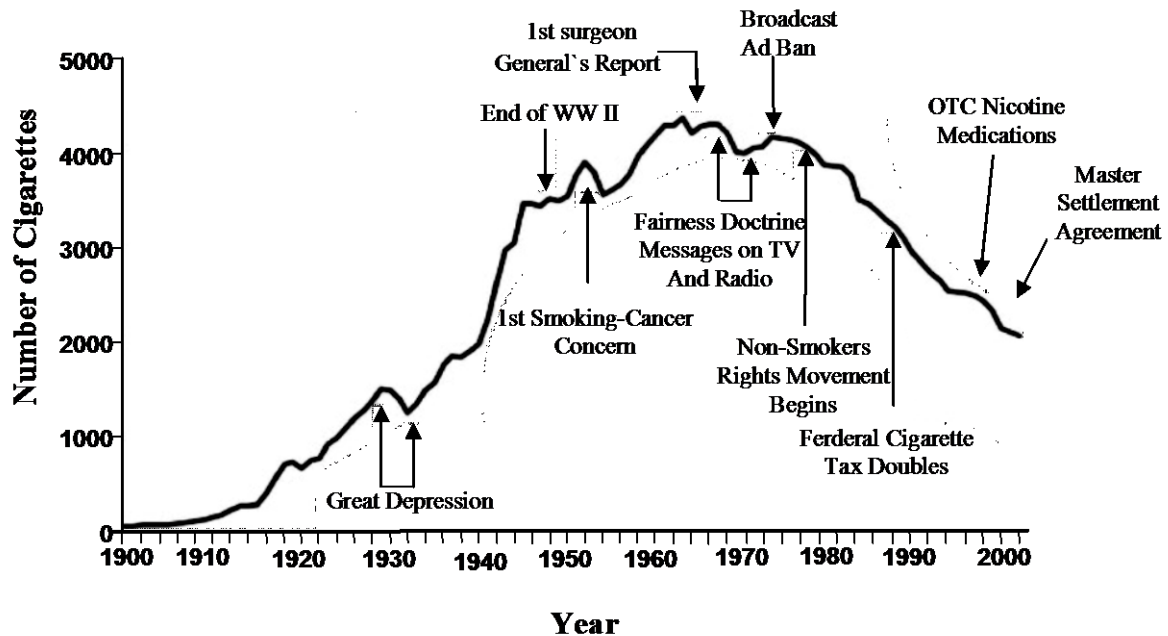


Abbildung 2: Zigarettenkonsum in Amerika 1900-2000 [11].

Mit beginnendem Gesundheitsbewusstsein ging der Konsum in den industrialisierten Staaten zurück. Der Pro-Kopf-Verbrauch in Deutschland sank weiter ab. Im Gegensatz dazu konnte in den Entwicklungsländern im gleichen Zeitraum eine Steigerungsrate von bis zu 260% (China) verzeichnet werden.

2.1.2 Die Tabakpflanze

Die Tabakpflanze (*Nicotiana spp.*) ist eine Pflanzengattung aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*), in der sich u.a. auch die Tomate, Kartoffel und die Tollkirsche befinden. Kennzeichnend für alle Tabakarten ist das vorrangig in den Wurzeln produzierte Alkaloid Nikotin. Bis heute sind ca. 65 Tabakarten bekannt, die sich stark in ihren Formen unterscheiden. Als Nutzpflanze haben dennoch nur zwei Arten wirtschaftliche Bedeutung erlangt, die zahlreiche Varietäten bilden. Die am meisten verbreitete Art ist der Virginische Tabak (*Nicotiana tabacum*), zu der nahezu alle heute angebauten Sorten gehören. Diese Tabakart kommt ursprünglich aus Nordargentinien. Sie ist eine Kreuzung zwischen Waldtabak (*N. sylvestris*) und filzigem Tabak (*N. tomentosa*) und hat rosarote Blüten. Sie wächst ca. 70-200 cm hoch, ist einjährig und blüht zwischen Juni und September (Abbildung 3). Der

aus *N. tabacum* gewonnene Tabak ist im Allgemeinen milder als der von *N. rustica*. In den frischen Blättern enthält er zwischen 0,05–4% des Alkaloids Nikotin, in getrockneten Blättern kann der Nikotingehalt bis auf 9% ansteigen. Die Samen wiederum sind frei von Nikotin, (<http://www.giftpflanzen.com/>).

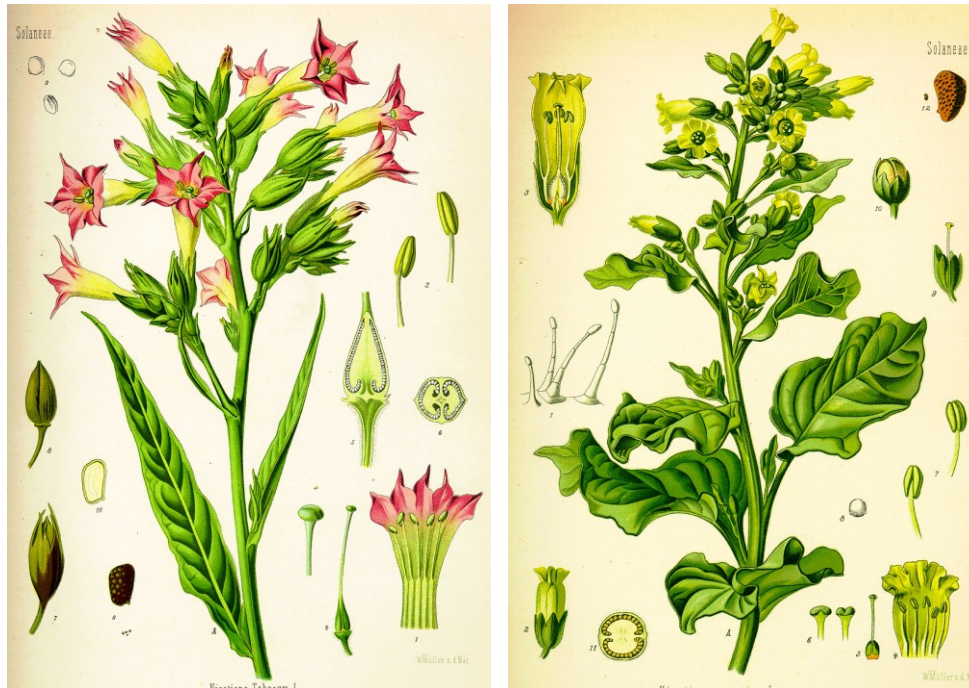


Abbildung 3: *Nicotiana tabacum* (links), *Nicotiana rustica* (rechts).

Die wichtigsten Sorten des Virginischen Tabaks können nach Verwendungszweck in folgende Grundtypen eingeteilt werden, (<http://www.tabakanbau.de/de/artikel-8263.php>):

- **Zigaretten- und Pfeifentabak**

Virginia:

Hochwachsende breitblättrige Sorten, die stark zuckerhaltig sind und primär als Fülltabak für Zigaretten- und Pfeifentabak verwendet werden. Die Blätter werden in beheizten Schuppen heißluftgetrocknet und können einige Tage nach der Ernte verarbeitet werden.

Burley:

Brauner, pyramidenförmig wachsender Tabak mit vergrößerter Zellstruktur, die dadurch zu einer hohen Absorptionsfähigkeit von Aromastoffen führt. Deshalb wird diese Sorte vor allem für Zigaretten- und Pfeifentabak verwendet.

- **Würztabak für Zigaretten- und Pfeifenschnitt (Schnupf- und Kautabak)**

Zur Harmonisierung der schnell abbrennenden Virginia- und Burleymischungen werden dem Schnitt die aromatischen Orient- und kräftigere Würztabake zugegeben.

Orientsorten:

Kleinwüchsige, sehr zuckerhaltige und nikotinarmer Sorten, die hohe Gehalte an aromatischen Ölen und Harzen aufweisen.

Kentucky / Maryland:

Ein dunkelbrauner Würztabak mit einem sehr kräftigen Geschmack, der auch gut für die Verarbeitung zum Schnupf- und Kautabak geeignet ist.

- **Dunkler luftgetrockneter Tabak für Zigarren und Feinschnitt (DLT)**

Alle Zigarrentabaksorten werden 2-3 Monate in Trockenscheunen aufgehängt und anschließend fermentiert, sie sind sehr aromatisch, besonders witterungsbeständig und können bei guter Qualität als Zigarrendeckblatt verwendet werden.

- **Reine Zigarrensorten**

In diese Kategorie gehören die bekannten Tabakarten wie z.B.: Havanna, Brasil und Java.

Vereinzelt wird auch noch der Bauerntabak (*Nicotiana rustica*) angebaut, dessen ursprüngliche Heimat Mittelamerika ist. Es ist eine bis zu 150 cm große, einjährige Pflanze mit grünlich-gelben Blüten, die von Juni bis September blüht. Konsumiert wird diese Tabaksorte nur noch in Russland als so genannter „Machorka“ und von Indianern in Mittel- und Südamerika. Der Bauerntabak enthält in den frischen Blättern 4-7,5% Nikotin, in getrockneten Blättern kann der Alkaloidgehalt aber bis auf 16% ansteigen. Im Durchschnitt ist der Nikotingehalt etwa doppelt so hoch wie im Virginischen Tabak. Verwendet wird in Europa diese Art nur noch als Feinschnitt für Wasserpfeifen [12].

2.1.3 Verschiedene Konsumierungsarten von Tabak

Nach der Ernte des Tabaks wird dieser getrocknet, was je nach Art der Trocknung Tage (Heißlufttrocknung), Wochen (Räuchertrocknung) oder Monate (Naturtrocknung) dauert.

Auf die Trocknung erfolgt die Fermentierung. In dieser Phase werden unerwünschte Substanzen abgebaut, braune Pigmente weiterentwickelt, Stärke in Zucker umgewandelt und der Nikotin- und Eiweißgehalt reduziert.

Bei der natürlichen Fermentierung werden die Tabakblätter übereinander gelegt, durch den Eigendruck und die Restfeuchtigkeit erwärmt sich der Tabak dann je nach Typ bis auf 40 °C. Die Fermentierungsdauer beträgt 35-40 Tage, in dieser Zeit werden dem Tabak meistens noch Aromastoffe zugefügt.

Danach wird der Tabak geschnitten und je nach Gebrauch weiterverarbeitet zu:

- **Rauchtabak:** Pfeife, Zigarre, Zigarette, Bidies
- **Kautabak:** verschiedene Arten, Priem
- **Schnupftabak:** Brasil, moist und dry Snuff, Snus, klassische Schnupftabakarten

Die vor allem in **Deutschland** gebräuchliche Form von Schnupftabak oder „*nasal snuff*“ ist ein sehr feines Tabakpulver. Dies wird speziell für das Einziehen in die Nasenschleimhäute, dem so genannten „*sniffing*“, hergestellt.

Im **englischen** und **schwedischen** Sprachraum versteht man unter dem Begriff Schnupftabak meist Mundtabak bzw. „*oral snuff*“ oder „*Snus*“, der nicht für den nasalen Gebrauch bestimmt ist. Dieser Mundtabak wird zwischen Zahnfleisch und Unterlippe geklemmt und etwa nach einer halben Stunde ausgespuckt.

Weiterhin wird *snuff* noch anhand des Feuchtigkeitsgehalts eingeteilt. *Moist snuff* besitzt einen Feuchtigkeitsgehalt von 20-50%, während *dry snuff* nur 4-6% Feuchtigkeit enthält [13]. Bei den Schnupftabaksorten, die in Amerika hergestellt werden, handelt es sich in der Regel um luftgetrocknete dunkle Sorten. Der getrocknete Tabak reift bis zu einem Jahr, bis er zu Schnupftabak verarbeitet wird. Nach der Reifung wird dieser geschnitten, mit Wasser und der jeweiligen Geschmacks Mischung versetzt und in geschlossenen Behältern für mehrere Wochen fermentiert [14].

2.1.4 Der Tabakrauch

Beim Rauchen von Zigaretten, Zigarren und Pfeifentabak unterscheidet man, wie in Abbildung 4 dargestellt, zwischen dem Hauptstromrauch (HS) und dem Nebenstromrauch (NS). Der Hauptstromrauch entsteht unter Verbrennung bei 700 bis 900 °C in der Glimmzone der Zigarette unter Einwirkung großer Mengen Sauerstoff durch den Zug des Rauchers und wird von diesem größtenteils inhaliert. Der Nebenstromrauch wird im gleichen Bereich unter geringerer Hitze (400 bis 600 °C) und in Sauerstoffarmut während der Zugpause gebildet. Er passiert nur in geringen Mengen den Filter der Zigarette. Aus den unterschiedlichen Bedingungen während der Verbrennung resultieren zwei sehr unterschiedliche Stoffgemische. Wir unterscheiden hier die gasförmige Phase mit den flüchtigen Substanzen wie Benzol, Vinyl-

chlorid oder Acrolein und die Partikelphase, den „Teer“, in dem sich die halb- und nichtflüchtigen Stoffe, beispielsweise die Alkaloide (auch das Nikotin), aromatische Amine oder polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK) befinden. Man schätzt die Gesamtzahl der vorhandenen Verbindungen auf bis zu 12 000, wobei mehr als 4 000 Verbindungen isoliert und identifiziert wurden [15,16]. Darunter befinden sich organspezifische Kanzerogene, Cokanzerogene, sowie Promotoren und Inhibitoren der Tumorigenese [9,17,18]. Einige der wichtigsten Kanzerogene im HS und NS sind in Tabelle 1 dargestellt. Der environmental tobacco smoke (ETS), also der Tabakrauch in der Raumluft, welcher sich zu etwa 85% aus NS und 15% exhalierendem HS zusammensetzt, belastet nicht nur den Passivraucher, sondern auch den Raucher selbst. Obwohl der NS die Kanzerogene in Folge der unvollständigeren Verbrennung in bis zu 130-facher Konzentration des HS enthält, ist die Aufnahme gefährlicher Stoffe durch die schnelle Verdünnung mit der Raumluft und durch Alterungsprozesse deutlich geringer als beim Raucher. Die Beurteilung des Gefahrenpotentials des ETS ist schwierig und wird kontrovers geführt [19,20].

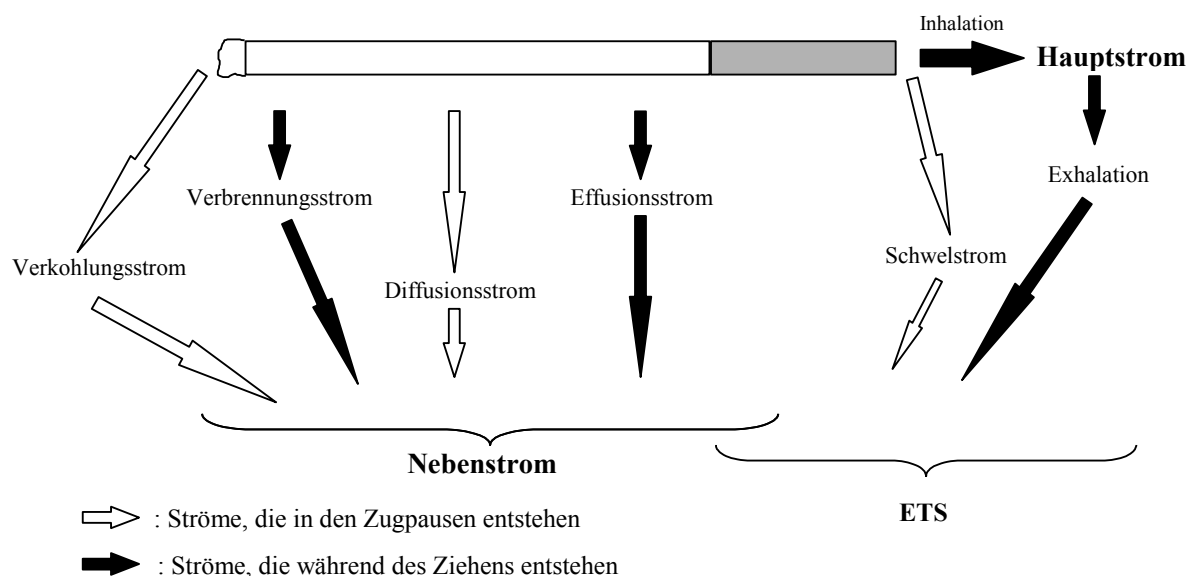


Abbildung 4: Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette [21].

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Exposition des Menschen mit ETS und einer gehäuften Wahrscheinlichkeit an Lungenkrebs zu erkranken untersucht. Wenn auch die Mehrzahl der Studien ein geringfügig erhöhtes Risiko für Nichtraucher ergeben hat, so lässt sich der Zusammenhang statistisch nicht sicher beweisen [22,23]. Daher sollte die ETS-Belastung nur als ein Faktor neben der Ernährung und allgemeinen Lebensgewohnheiten für die Aufnahme genotoxischer Substanzen, wie Benzol, PAK, aroma-

tischer Amine und den TSNA verstanden werden [24]. Das größte kanzerogene Potential im Tabakrauch wird den Substanzgruppen der PAK und den TSNA zugeschrieben [25].

Tabelle 1: Kanzerogene in HS und NS von Zigaretten.

Substanz	NS µg/Zigarette	NS/HS	mögliche Zielorgane
Benzol	240-490	8-10	Knochenmark (Leukämie)
Formaldehyd	1500	50	Nase
Teer (Gesamtpartikel)	0,14-30 mg	1-16	
Benzo[a]pyren	0,04-0,07	2,5-20	Lunge, Kehlkopf
N-Nitrosodimethylamin	0,2-1,0	20-130	Leber, (Niere)
4-Aminobiphenyl	0,14	31	Harnblase
N'-Nitrosornikotin	0,15-1,7	0,5-5,0	Ösophagus, Mundhöhle
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) ¹	0,2-1,4	1-22	Lunge, Kehlkopf, Pankreas, Leber

¹NNK = nicotine derived nitrosamino ketone

Fett gedruckte Organe sind als Zielorgane der Kanzerogenese für den Menschen sicher nachgewiesen

2.1.5 Die Tabakalkaloide

Als Alkaloide werden vorwiegend in Pflanzen, seltener in Pilzen und Tieren, auftretende basische Naturstoffe mit einem oder mehreren, meist heterozyklischen im Molekül eingebauten Stickstoffatomen bezeichnet. Der Name Alkaloid (gelehrte Neubildung, zusammengesetzt aus dem arabischen Wort: *Al qualja* = *Pflanzenasche* und der griechischen Endung: *-oides* = *ähnlich*) geht auf den Apotheker C.F.W. Meissner zurück, der den Begriff 1819 einführte.

Zu den bekanntesten Vertretern der Tabakalkaloide zählen das Nikotin, Nornikotin, Anatabin und das Anabasin, bei denen ein in Position 3 substituierter Pyridylring das Grundgerüst bildet (Abbildung 5).

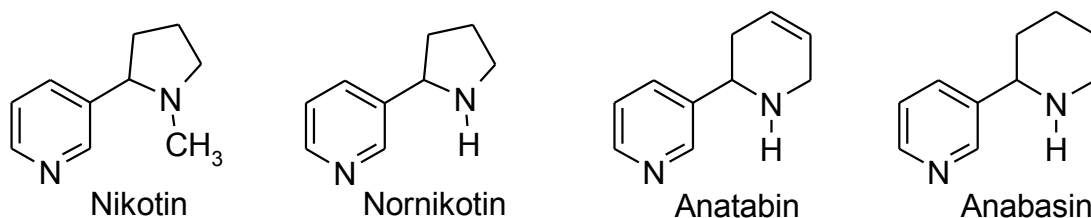


Abbildung 5: Strukturen der Haupttabakalkaloide.

In den über 60 Arten der Tabakpflanzen ist das Nikotin zu 50-60% das Hauptalkaloid. Nach Ernte und Fermentation enthält der Rohtabak je nach Sorte 5 bis 180 mg/g Nikotin, während in 30-40% der Pflanzen wiederum das Normikotin den größten Anteil ausmacht. Das Anabasin ist nur bei einigen Tabakarten, z.B. in *N. glauca* das Hauptalkaloid, wogegen das Anatabin immer nur in geringeren Prozentsätzen als die anderen Alkaloide in der Tabakpflanze anzutreffen ist. Bei Normikotin und Anatabin belaufen sich die Werte im Rohtabak auf durchschnittlich 2 mg/g bzw. 1 mg/g [26].

Im Allgemeinen muss immer auf Pflanzenart, Anbauweise, Reifungsgrad sowie den Einsatz von Düngemitteln geachtet werden, denn dies alles beeinflusst die Menge an Alkaloiden in der Pflanze immens. Vor allem unterschiedliche Anpflanzungsarten können die Konzentration der Alkaloide extrem differieren lassen. Bei einem Freilandanbau ist in der Regel der Alkaloidgehalt signifikant erhöht, im Gewächshaus hingegen werden von der Pflanze viel weniger Alkaloide produziert.

Dazu kommt, dass die Alkaloidwerte innerhalb einer Anpflanzungsweise und Pflanzengattung zwar korrelieren, sich aber in der Zusammensetzung stark unterscheiden [27,28].

Die Bildung von Nikotin findet in den Wurzeln der Pflanze statt, von dort aus gelangt es in die Blätter, die dann die höchste Konzentration von diesem Tabakalkaloid aufweisen [29]. Der Alkaloidgehalt erhöht sich bei der Fermentation nochmals.

Neben den Hauptalkaloiden beinhaltet die Tabakpflanze auch Alkaloide, die in sehr viel geringeren Konzentrationen vorkommen. Diese Nebenalkaloide sind in der Regel Produkte des Nikotinmetabolismus.

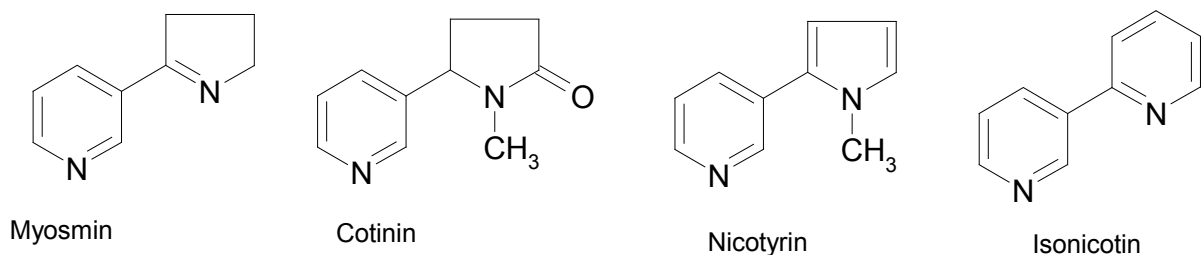


Abbildung 6: Nebenalkaloide des Tabaks.

Dazu gehört auch das Myosmin (Abbildung 6), das in der Tabakpflanze ebenso ein Metabolit des Nikotins wie Normikotins ist und nicht, wie angenommen, erst beim Fermentierungsprozess entsteht. Dies zeigten erste Untersuchungen von *Fejér-Kossey* [30], die Tabakblätter von *N. glauca* und der Sorte Kentucky analysierte. Die Blätter wurden bei geringen Tempe-

raturen luftgetrocknet, nicht fermentiert und am Tag der Ernte untersucht. Parallel dazu sind frische Knospen und Blüten am gleichen Tag ebenso direkt nach dem Pflücken analysiert worden. In den luftgetrockneten sowie in den frischen Proben wurde Myosmin identifiziert, was nun der Beweis für das natürliche Vorkommen bzw. für die Synthese von Myosmin in der Tabakpflanze war. Somit konnte Myosmin zu den natürlichen Tabakalkaloiden gezählt werden [31,32].

Es wurde bisher nicht ganz geklärt, warum Pflanzen überhaupt Alkaloide produzieren. Die meisten Wissenschaftler sind der Meinung, dass die Alkaloide primär eine Rolle bei der Abwehr gegen potentielle Fraßfeinde, Pilze, Bakterien, Viren und Insekten spielen [33]. Auch werden den Alkaloiden der Tabakpflanze (*Nicotiana ssp.*) ganz verschiedene Funktionen zugeordnet. Sie fungieren als Stickstoffreserve, dienen als Wachstumsregulatoren, sind an der Entwicklung der jungen Pflanze beteiligt und sind Entgiftungs- und Abfallprodukte des Pflanzenmetabolismus [34].

2.2 Vorkommen von Myosmin

2.2.1 Geschichtliches

Obwohl Myosmin neben Nikotin zu den ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloiden gehört, wurde ihm lange Zeit wenig Beachtung geschenkt.

Allgemein kann man die Entdeckung und Erforschung von Myosmin und anderer Nebenalkaloide des Tabaks, die sich nun über etwa 100 Jahre hinzieht, in drei Phasen einteilen:

- 1. Phase 1900-1914:** Die Periode, in der die Nebenalkaloide von *Pictet* und *Noga* [35] entdeckt worden sind.
- 2. Phase 1930-1940:** In dieser Zeitspanne wurden sehr viele Erkenntnisse, vor allem durch *Späth et al.*, gesammelt.
- 3. Phase ab 1940:** Testphase immer neuerer, genauerer Analysenmethoden [36].

1933 kam es durch *Wenusch* und *Schöller* [37] bei Forschungsarbeiten über die Zusammensetzung des Zigarrenrauchs zu der Namensgebung von Myosmin. Bei ihren Untersuchungen haben sie Destillate von Zigarrenrauchgasen ausgefällt, mit Pikrinsäure versetzt und in eine kristalline Form überführt. Als diese wiederum mit Natriumhydroxyd und einigen Tropfen Wasser versetzt wurden, entstand ein intensiver, an Mäuseurin erinnernder Geruch, der später als das charakteristische Kriterium von Myosmin immer wieder hervorgehoben wird. Unter Verwendung des griechischen Wortes Myo (Maus, Muskel) wurde der diesem Pikrat

zugrunde liegenden Base der Name „Myosmin“ gegeben. Myosmin konnte damals weder im Rohtabak noch in Tabakprodukten nachgewiesen werden. Deshalb wurde angenommen, dass es während des Rauchprozesses in der Glutzone aus Nikotin entsteht. Ebenso wurde vermutet, dass Myosmin nur in Zigarrenrauch und nicht in Zigarettenrauch vorkommt, da es nur bei Tabaksorten entstehen würde, die einen alkalischen Hauptstromrauch lieferten. Myosmin wurde also zu jenen Aromastoffen gezählt, die den charakteristischen Unterschied zwischen dem Zigaretten- und Zigarrenrauch schaffte [38]. Die chemische Formel von Myosmin wurde 1936 erstmals von *Späth et al.* [39] festgelegt und dann später durch die erstmalige Myosminsynthese von *Späth* und *Mamoli* [40] bestätigt. Ein Verfahren, größere Ausbeuten von Myosmin, zu gewinnen wurde 1944 von *Woodward et al.* [41] berichtet. Mittels Dehydrogenierung von Nikotin bei 570 °C über Quarz erhielten sie neben Myosmin andere Produkte wie Ammoniak, Methylamine, Cyanide u.v.m.

1952 berichteten *Tso* und *Jeffrey* [42] von der erfolgreichen Trennung vierundzwanzig verschiedener Tabakalkaloide, bzw. ihren Derivaten. Darunter wurde auch Myosmin, aus getrocknetem Maryland-Tabak mittels Flüssigextraktion und darauf folgender Papierchromatographie, extrahiert (Tabelle 2). Damals nahm diese Technik pro Probe noch einen Zeitaufwand von sieben bis acht Wochen in Anspruch.

Myosmin wurde somit lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen, was verständlich war, da es in Tabak zuerst identifiziert worden ist. Nachdem es im Tabak aber nur in vergleichsweise geringen Mengen vorkommt, stand es lange Zeit im Schatten seiner vermeintlich potenteren Verbindungen und war auch aus diesem Grund nicht Gegenstand intensiverer Forschung. Dies hat sich aufgrund der Entdeckung von Myosmin in Nüssen [1], Lebens- und Genussmitteln [43] geändert. Sogar im Abwehrsekret von Ameisen konnte Myosmin nachgewiesen werden [44]. Auf weitere Quellen von Myosmin wird in nachfolgenden Abschnitten noch ausführlich eingegangen.

2.2.2 Biosynthese von Myosmin in der Tabakpflanze

Myosmin entsteht in der Tabakpflanze durch Metabolisierung von Nikotin, welches wie alle Alkaloide unter Beteiligung von Aminosäuren gebildet wird. Die Alkaloidsynthese findet primär in den Wurzeln statt, von dort aus werden die Alkaloide in die Blätter transportiert [45].

Der Pyridinring der Tabakalkaloide stammt von der Nikotinsäure, als deren Vorstufe die Chinolinsäure identifiziert wurde. Letztere wird aus Glycerinaldehyd-3-phosphat, dessen C-Atome sich alle in den Positionen C-4, C-5 und C-6 des Pyridinrings wieder finden [46], und aus Aspartat oder Malat zusammengesetzt (Abbildung 7). Bei der Gabe von 3-¹⁴C-Aspartat und

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malat an *N. rustica* konnte ein Einbau der markierten C-Atome fast nur an der Position C-2 oder C-3 des Pyridinrings festgestellt werden. Auch liefert die Aminosäure den Stickstoff des Pyridinrings.

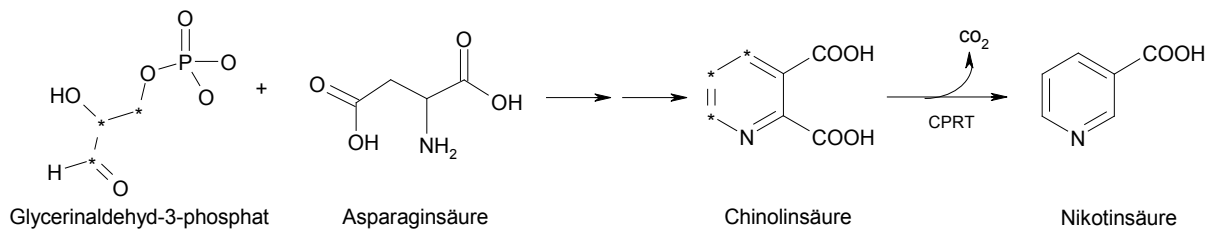


Abbildung 7: Biosynthese der Nikotinsäure, CPRT: Chinolinsäurephosphoribosyltransferase

Die Synthese des Pyrrolidinrings geht vom Putrescin aus (Abbildung 8). Dieses wird entweder durch Decarboxylierung der Aminosäure Ornithin oder über die Vorstufen Arginin, Agmatin und *N*-Carbamilputrescin gebildet [47]. Putrescin wird wiederum durch die Putrescin-*N*-methyltransferase methyliert, wobei der Methylgruppendonator die Aminosäure Methionin ist. *N*-Methylputrescin wird oxidativ desaminiert zu 4-Methylaminobutanal, welches dann spontan zum *N*-Methyl- Δ' -pyrrolium-Salz zyklisiert [48].

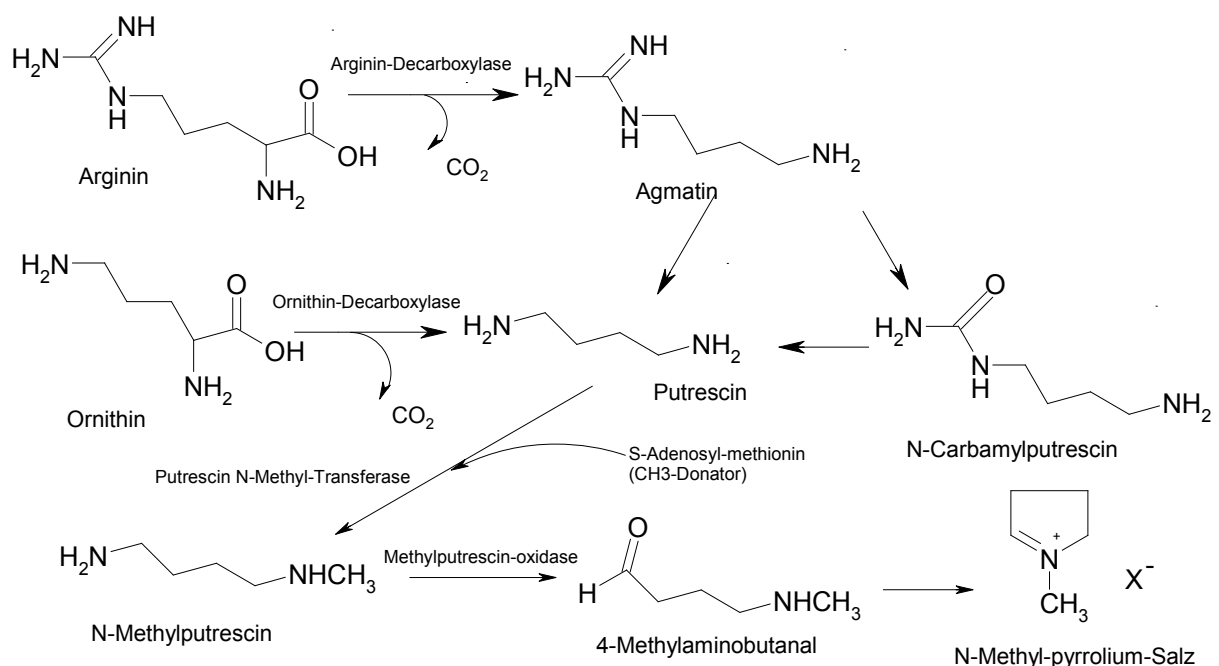


Abbildung 8: Biosynthese des *N*-Methyl-pyrrolium-Salzes.

Für den Zusammenbau der beiden Vorstufen zum Nikotin muss die Nikotinsäure ihre Carboxyl-Gruppe abgeben (Abbildung 9). Dies geschieht weiteren Untersuchungen zur Folge über die 3,6-Dihydronikotinsäure, die dann nach einer Protonenwanderung und anschließender Decarboxylierung das 1,2-Dihydropyridin bildet [49,50]. Nun erfolgt die Synthese mit dem

N-Methylpyrrolonium-Salz zur *S*-Form des Nikotins. Nornikotin entsteht in den grünen Blättern der Tabakpflanze bzw. während der Alterung, aus Nikotin, durch Demethylierung. Die umgekehrte Reaktion, die Methylierung von Nornikotin scheint entgegen früherer Vermutungen in der Tabakpflanze nicht stattzufinden [51].

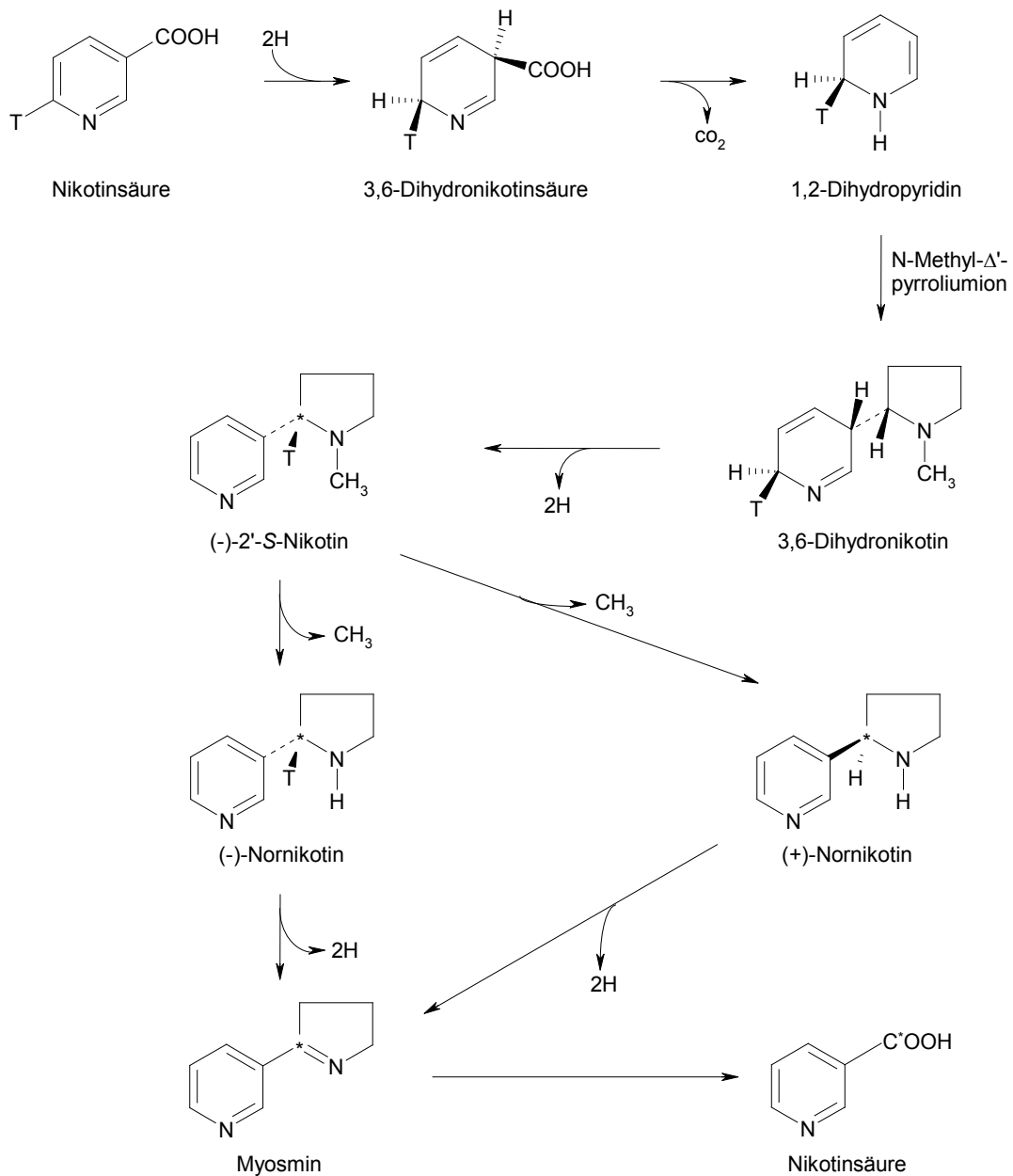


Abbildung 9: Bildung von Nikotin, Nornikotin und Myosmin aus Nikotinsäure.

Myosmin wird in der heranwachsenden Pflanze durch Dehydrogenierung von Nornikotin gebildet [32,52]. Die Bildung von Myosmin ist irreversibel. Während nach Gabe von ^{14}C -Nornikotin noch nach acht Tagen 55% der Radioaktivität in der Tabakpflanze als Nornikotin und 15% als Myosmin wieder gefunden wurde, entstand in *N. glauca* aus 2'- ^{14}C -Myosmin kein Nikotin bzw. Nornikotin [53]. Bei Versuchen zum Nikotinmetabolismus in Burleytabak wur-

de das Verhältnis der Umwandlung von Nikotin zu Nornikotin mit der Myosminbildung verglichen. Hier wurde bestätigt, dass sich mit zunehmender Umwandlung von Nikotin zu Nornikotin auch der Myosmingehalt, sowohl in der Lamina als auch in der Mittelrippe des Blattes, erhöht. Liegt der Nikotinanteil über 20% vom Gesamtalkaloidgehalt, dann war der Myosmingehalt in den Pflanzen sogar höher als der Gehalt an Anabasin [54].

Im Rahmen von Untersuchungen zur chiralen Spezifität des Nikotinabbaus in Zellkulturen von *N. plumbaginifolia* wurde neben Nikotin und Nornikotin auch Myosmin analysiert [55]. Die Alkaloide wurden jeweils in den Zellen, wie auch in dem die Zellen umgebenden Medium, durch GC und chirale HPLC bestimmt. Myosmin konnte zwar während des gesamten Experiments nachgewiesen werden, aber immer nur in Spuren. Die Gesamtkonzentration von Myosmin lag über den gesamten Zeitraum von 2,6 Tagen konstant bei 0,5 μM und war im Medium stets höher als in den Zellen (Tabelle 2). Dies kann nun einerseits bedeuten, dass Myosmin, ebenso schnell wie es gebildet wird, weiter zu Nikotinsäure abgebaut wird, oder aber dass die Myosminbildung in den *N. plumbaginifolia* Zellen nicht der erste Schritt des Nornikotinabbaus ist.

Tabelle 2: Myosminkonzentration (μM), gemessen jeweils im Abstand von zwei Tagen, nach exogener Zufuhr von 1 mg/ml (S)-Nikotin in *N. plumbaginifolia* Zellkulturen [55].

Zeitintervall	Konz. in der Zellkultur	Konz. im Medium	Gesamtkonzentration
2 Tage	0,2	0,3	0,5
4 Tage	0,2	0,3	0,5
6 Tage	0,1	0,4	0,5

2.2.3 Nachweis von Myosmin in *Nicotiana tabacum*

Erst drei Jahrzehnte nach der Entdeckung von Myosmin 1933 durch *Wenusch* und *Schöller* im Tabakrauch, finden sich erste Berichte zum Vorkommen von Myosmin in der Tabakpflanze, obwohl Myosmin schon früher in Tabakzubereitungen (siehe Kapitel 1.2.4.-1.2.6) identifiziert worden war. *Féjer-Kossey* [30,56] macht 1972 zwar noch keine quantitativen Angaben, spricht aber von hohen Gehalten, die sich nach dünnschichtchromatographischer Trennung in Knospen und Blüten von *N. tabacum* und *N. glauca* nachweisen lassen. Um auszuschließen, dass Myosmin durch exogene Prozesse erst per se entsteht, sind die Pflanzenstücke am gleichen Tag der Probenname nach einer Trocknung bei geringen Temperaturen untersucht worden. Dies wurde bewusst so durchgeführt um eventuell ablaufende Fermentierungsprozesse zu verhindern. *Sisler* [57] bestimmte dann 1969 erstmals quantitativ Myosmin in *N. tabacum*.

Dazu wurde Myosmin aus der Matrix extrahiert und anschließend aufgereinigt. Nach Derivatisierung im sauren Milieu mit *o*-Aminobenzaldehyd entstand ein Komplex, der ein charakteristisches Absorptionsspektrum aufwies, welches bei entsprechender Wellenlänge eine Quantifizierung erlaubte. In 10 g *N. tabacum* wurden so zwischen 0,93 und 1,2 mg Myosmin/g Tabak identifiziert. Im Rahmen einer groß angelegten Studie zum Vorkommen von Tabakalkaloiden wurde 1990 auch Myosmin in Pflanzen untersucht, die einerseits im Gewächshaus gezogen worden waren und andererseits aus dem Feldanbau stammten. 64 *Nicotiana*-Arten wurden einzeln auf ihre chemische Zusammensetzung hin untersucht [27]. Die Nikotinalkaloide wurden qualitativ und quantitativ mittels Gaschromatographie untersucht. Hierzu wurden die reifen grünen Blätter im Stadium der Blüte geerntet, gefriergetrocknet, gemahlen und letztlich gesiebt. Myosmin war in keiner Tabakpflanze das Hauptalkaloid und konnte nur in Proben bestimmt werden, welche aus dem Gewächshaus stammten (Tabelle 3). Myosmin wurde nur in einigen Arten gefunden, wobei höhere Myosminmengen in den Spezies *Attenuata* und *Alata* ermittelt worden sind. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass der Gesamtalkaloidgehalt sehr variabel war und in der Regel hatten Freilandpflanzen höhere Werte an Alkaloiden.

Tabelle 3: Gesamtalkaloidgehalt der Pflanzentrockenmasse (mg/g) und prozentualer Anteil von Myosmin in verschiedenen *Nicotiana* Spezies, (gezogen im Gewächshaus) [27].

Klassifizierung	Gesamtalkaloidgehalt	Myosmin
Subgenus: Petunioides		
<i>Abteilung: Acuminatae</i>		
Spezies: <i>Attenuata</i>	9,0	0,6
<i>Abteilung: Bigelovianae</i>		
Spezies: <i>Bigelovii</i>	12,4	in Spuren
Spezies: <i>Clevelandii</i>	15,7	in Spuren
<i>Abteilung: Alatae</i>		
Spezies: <i>Alata</i>	0,2	0,4
Subgenus: Rustica		
<i>Abteilung: Paniculatae</i>		
Spezies: <i>Paniculata</i>	3,8	in Spuren

Shen und *Shao* [58] haben 2006 Tabakblattproben aus China nach dem Flue-Curing mit CPE (cloud point extraction) und nachfolgender GC/MS Bestimmung untersucht. Im Durchschnitt lag der Myosmingehalt bei allen 4 Proben bei 0,03 mg/g (Tabelle 4).

Tabelle 4: Die Alkaloidzusammensetzung von vier Tabakblattproben (mg/g) [58].

Alkaloid	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Mittelwert
Nikotin	21,6	29,0	24,2	21,6	24,1
Myosmin	0,02	0,03	0,03	0,05	0,0325
Nicotyrin	0,02	0,09	0,08	0,2	0,0975

Bei Analysen einzelner Organe von *N. tabacum* und *N. rustica* wurden frische Pflanzenteile beider Arten anhand zweidimensionaler GC/MS quantifiziert [59]. Die Analysen der Tabakorgane Wurzel, Stängel und Blatt, die für Bildung, Transport und Deponierung des Nikotins zuständig sind, sollten einen Überblick geben wie sich Myosmin in der Tabakpflanze verteilt. Wie zu erwarten, war deutlich weniger in den Stängeln als in den Blättern enthalten, die Konzentration in der Wurzel war am geringsten. Ein großer Unterschied zeigte sich aber zwischen *N. tabacum* und *N. rustica*. *N. rustica* verzeichnete in allen Pflanzenteile höhere Werte als *N. tabacum*. Dies war allerdings aufgrund der allgemeinen höheren Alkaloidwerte von *N. rustica* klar gewesen, (Tabelle 5).

Tabelle 5: Myosminkonzentrationen in den Organen von *N. tabacum* und *N. rustica* ($\mu\text{g/g}$ Feuchtgewicht) [59].

Pflanzenteil	<i>N. tabacum</i>	<i>N. rustica</i>
Blatt (Hauptgut)	0,96	1,87
Blatt (Nebengut)	0,62	1,33
Stängel	0,19	1,30
Wurzel	0,14	0,56

2.2.4 Schnupftabakanalysen im Hinblick auf Myosmin

Myosmin wurde bisher nur in amerikanischem Schnupftabak analysiert. Von zwei verschiedenen feuchten Schnupftabaksorten aus den USA wurde das chemische Profil bestimmt. Die Proben wurden gemischt, um repräsentative Durchschnittsproben zu erlangen und nach Aufarbeitung mit GC/NPD gemessen (Tabelle 6). Es ergaben sich Myosmingehalte, die zwischen 0,001 und 0,003% lagen [60]. In weiteren Untersuchungen wurde feuchter Schnupftabak (NY Kentucky reference moist snuff) außer auf Nikotin, Methylsalicylaten und Cotinin ebenfalls auf Myosmin analysiert (Tabelle 7) [61]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die

Myosminkonzentration im Schnupftabak bei ca. 0,001-0,004%, bezogen auf das Feuchtgewicht, liegt.

Tabelle 6: Myosminkonzentration (%) von zwei feuchten Schnupftabakproben und einer Referenzprobe.

Analyt	Snuff Typ A	Snuff Typ B	Referenzsnuff, KY1S3
Feuchtigkeit (%)	24,0	52,7	52,0
pH-Wert	5,84	7,99	6,93
Myosmin (%)	0,001	0,003	0,003

Tabelle 7: Quantitative Bestimmung von einzelnen Komponenten in feuchtem Schnupftabak [61].

Gewicht (mg)	Methylsalicylate (mg/g)	Cotinin (mg/g)	Myosmin ($\mu\text{g/g}$)
100	22,2	0,060	3,9
75	21,7	0,046	3,5
50	21,2	0,058	3,0

2.2.5 Identifizierung von Myosmin im Zigarettentabak

In folgenden verschiedenen Tabaksorten sind bisher bei der Bestimmung der Alkaloide auch die Myosminkonzentrationen ermittelt worden. Die Ergebnisse sind hier chronologisch dargestellt:

(1952) Marylandtabak:

Gesamtalkaloidgehalt: 2,68%, Myosmin: 0,14%

Die Bestimmung erfolgte nach chromatographischer Trennung und UV-Spektroskopie [42].

(1955) Marylandtabak, Burley und Virginia:

Bei Studien von *Jeffrey* und *Tso* [62] zur qualitativen Differenzierung von Tabakalkaloiden wurden Proben getrockneter Tabakblätter von verschiedenen Tabakarten, die vor allem intensiv gewachsen sind, chromatographisch untersucht. Dazu wurde am Beispiel von Marylandtabak der Unterschied zwischen gesundem und mit Tabakmosaikvirus infiziertem Tabak gezeigt.

Auffallend war, dass der Myosmingehalt vor allem bei den Proben erhöht war, bei denen Nor-nikotin das Hauptalkaloid in der Pflanze ist. Dies bestätigt die Ergebnisse für frischen unfermentierten Tabak. Tabak, der mit Tabakmosaikvirus infiziert war, zeigte dagegen diese erhöhten Myosminwerte nicht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Myosminanteil am totalen Alkaloidgehalt verschiedener Tabakarten, bezogen auf das Trockengewicht.

	flue-cured	Burley	Maryland, Robinson Medium Broadleaf					Pennsylvania
	Cherry Red		Bright	Dull bright	Dull	Mosaic free	Mosaic infected	
Myosmin (%)	0,020	0,007	0,096	0,140	0,139	0,132	0,030	0,018
t. A. (%)	2,409	2,828	3,329	4,299	4,087	1,935	1,443	1,877

t. A.: totaler Alkaloidgehalt

1981 flue-cured-composition:

Von *Severson* [63] wurden durch GC/MS die Alkaloide in Zigarettentabak verschiedener Gemische von „flue-cured“ Tabaksorten untersucht. Bei vier von fünf Proben war der Myosminanteil mit 0,1% sehr gering, aber in einer Probe mit extrem hohem Normikotinanteil von 72,7% war auch hier der Myosmingehalt mit 2,4% wieder stark erhöht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Alkaloidfraktionen (%) in fünf verschiedenen Tabakprobenmischungen.

Tabakart	Gesamtalkaloidgehalt	Nikotin	Normikotin	Myosmin	Anabasin	Anatabin
1. Mischung	4,29	17,1	72,7	2,4	2,6	5,2
2. Mischung	4,11	92,9	3,2	0,1	1,0	3,0
3. Mischung	4,29	94,9	1,5	0,1	0,6	3,0
4. Mischung	5,81	95,2	2,6	0,1	0,6	2,4
5. Mischung	5,4	95,2	1,5	0,1	0,6	2,7

(1984) Maryland Tobacco, Virginia und Burley:

Ziel der Untersuchungen von *Schumacher* [64] war es festzustellen, ob Maryland-Tabak irgendwelche besonderen Aromakomponenten enthält. Außerdem sollte die Zusammensetzung dieses Tabaks mit jener von Virginiatabak und Burleytabak (mittlerer und unterer Blattstand) verglichen werden, (Tabelle 10). Die Analysen erfolgten mit GC/MS.

Tabelle 10: Myosmingehalt in Tabaken von Maryland-, Virginia und Burley Tabak ($\mu\text{g/g}$) [64].

	Maryland	flue-cured	middle-stalk Burley	low-stalk Burley
Myosmin	21,57	8,96	38,28	27,9

(1998) Virginiatabak:

Mittels chiraler GC/MS wurde neben den Haupttabakalkaloiden auch Myosmin in ausgewähltem Tabakmaterial analysiert. Es sollte der Unterschied zwischen Tabak von Referenz-Zigaretten der Sorte 2R1 und rauchgetrocknetem Virginiatabak aus Cherry Red Blättern festgestellt werden. Es zeigte sich, dass Cherry Red Tabak, der für seine hohen Nornikotingehalte bekannt ist, mehr als das zehnfache an Myosmin (0,0189%) enthält als der Tabak der Referenzzigarette (0,0013%) [65].

(2005) Perique Tabak:

Dieser Tabak ist ein Würztabak, der aus luftgetrocknetem Red Burley nach anaerober Fermentierung hergestellt wird. Gewöhnlich wird er in Virginiatabak verschnitten. Er ist dunkel, ölig und hat einen pfeffrigen Geschmack mit leichtem Feigencharakter. Perique wächst nur in einem schmalen Bereich westlich von New Orleans, der St. James Parish genannt wird. Aufgrund seiner sehr komplizierten Wuchsbedingungen, einer geringen Produktionsrate und der aufwendigen und langen Verarbeitung (bis zu einem Jahr) ist diese Tabakart sehr selten und teuer. Diese Tabakart wurde deshalb bisher kaum untersucht. GC/MS-Analysen ergaben einen sehr hohen Myosminanteil von 0,059% [66].

2.2.6 Myosmin im Tabakrauch und in der Umgebungsluft

Es existieren viele Untersuchungen sowohl zur Identifizierung wie auch zur Quantifizierung von Schadstoffen in Zigarettenrauch. Viele aussagekräftige Ergebnisse wurden durch Rauchkammeranalysen erlangt. Hierbei wird der von Mensch oder Maschinen generierte Rauch von Fallen bzw. Filtern oder Pumpen gesammelt, in Lösung gebracht und in der Regel per GC/MS oder GC/NPD analysiert.

2.2.6.1 Quantifizierung der Myosminkonzentration im Tabakrauch

Wenusch und *Schöller* analysierten schon 1934 den Tabakrauch auch in Hinblick auf Myosmin, hierbei stellten sie einen Myosmingehalt von 9 µg/Zig. fest [67].

1966 wurde durch *Neurath et al.* [68] ein Mengenvergleich der Basen im Hauptstromrauch von Zigaretten durchgeführt. Hierbei wurden filterlose Zigaretten durch eine Rauchmaschine abgeraucht und das Kondensat analysiert. Myosmin hatte einen Anteil von 12 ppm (berechnet auf Trockensubstanz der verbrannten Tabakmenge).

Von *Matsushima et al.* [69] wurde der relative Anteil der hauptsächlichen Rauchinhaltsstoffe und der stickstoffhaltigen Komponenten in der halbflüchtigen und in der nichtflüchtigen

Phase des Rauches von „flue-cured“ und Burleytabak sowie von türkischem Tabak untersucht. Der Myosmingehalt war im Rauch von Burleytabak wesentlich größer als in dem anderer Tabake (Tabelle 11).

Tabelle 11: Myosmin- und Nikotingehalt von „flue-cured“, Burley und türkischem Tabak ($\mu\text{g}/\text{Zug}$) [69].

Komponenten	flue-cured		Burley (Kentucky)		Turkish	
	Blatt	Schnitt	Blatt	Schnitt	Basma-M	Samsun
Myosmin	1,8	1,0	6,5	5,5	1,6	1,3
Nikotin	381	315	486	400	272	85

Ebenso wurden bei der Untersuchung des Zigarettenrauchs vier verschiedener ungemischter Tabaksorten von *Sakuma et al.* [70] (Virginia, Burley, türkischer Tabak und eine einheimische japanische Tabakvarietät, Matsukawa), die Menge von 34 Basen im Nebenstromrauch (NS) und im Hauptstromrauch (HS) bestimmt. Es ergaben sich Myosmingehalte von 13,1 bis 33,1 $\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ im HS und 73 bis 224 $\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ im NS (Tabelle 12). Es bestätigte sich bei diesen Versuchen, dass Myosmin im Allgemeinen in Burleytabak stärker vertreten ist als in anderen Tabaksorten.

Tabelle 12: Myosminkonzentration in Haupt- und Nebenstromrauch verschiedener Zigaretten ($\mu\text{g}/\text{Zigarette}$) [70].

	Bright			Burley			Turkish			Domestik		
	SS	MS	$\frac{SS}{MS}$	SS	MS	$\frac{SS}{MS}$	SS	MS	$\frac{SS}{MS}$	SS	MS	$\frac{SS}{MS}$
Myosmin	150	20,1	7,5	224	33,0	6,7	73	13,1	5,6	99	24,5	4,0
Nikotin	5830	3330	1,8	5380	2940	1,8	3210	1720	1,9	3290	2510	1,3

Bei einem internationalen Vergleich verschiedener Zigarettenmarken aus elf Ländern wurden 1996 jeweils sechs der gebräuchlichsten Zigarettenmarken des Landes auf die Konzentration der ETS-Komponenten, sowohl in der Gasphase wie auch in der Partikelphase analysiert. Die hierbei benutzte Rauchkammer war 45 m³ groß, sie wurde von sechs Rauchern mit den verschiedenen Zigarettenmarken beraucht. Nach Verlassen der Kammer wurde der Rauch eine Stunde lang durch Pumpen gesammelt.

Die Konzentrationen der ETS-Komponenten lagen bei allen Zigarettenmarken in der gleichen Größenordnung. Die Myosminkonzentrationen wichen im internationalen Vergleich nicht stark voneinander ab (Tabelle 13) [71].

Tabelle 13: Durchschnittliche Konzentrationen der Gasphaseanalyten der Rauchkammer.

Land	Nikotin	Myosmin	
	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	% von Nikotin
Tschechien	101	5,5	5,4
Frankreich	72	4,8	6,7
Deutschland	85	5,4	6,4
Hong Kong	81	5,0	6,2
Italien	98	5,5	5,6
Malaysia	98	6,2	6,3
Portugal	82	5,5	6,7
Spanien	106	6,5	6,1
Schweden	102	6,4	6,3
Schweiz	78	4,7	6,0
USA	79	5,8	7,3
Mittelwert	89,3	5,6	6,3

Eatough et al. [72] analysierten durch Rauchkammeranalysen die chemische Zusammensetzung von Zigarettenrauch. Hierbei untersuchten sie den Rauch auch auf Myosmin. In der Rauchkammer wurden nacheinander vier Zigaretten abgeraucht und die jeweilige Myosminkonzentration ermittelt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Myosmingehalt ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) gemessen in Zigarettenrauch [72].

	Anzahl abgebrannter Zigaretten in der Rauchkammer			
	1	2	3	4
Myosmin	$8,63 \pm 1,02$	$11,84 \pm 4,24$	$14,91 \pm 1,61$	$17,54 \pm 2,20$

In der Rauchkammeranalyse des ETS von *Martin et al.* [73], wurden die 50 meist verkauften Zigarettenmarken und die Kentuckyreferenzzigarette durch GC/NPD analysiert, sie wurden anhand des Teergehaltes in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 15).

Bei Versuchen einen geeigneten Marker für die ETS-Aufnahme zu bestimmen, wurden in sechzehn Städten die ETS-Bestandteile, darunter das Myosmin, in der Luft bestimmt. Myosmin konnte zuverlässig nachgewiesen werden und stand in einem engen Zusammenhang mit Nikotin. Myosmin ist somit als ein Marker für Nikotin anzusehen [74].

Tabelle 15: Myosmin- und Nikotingehalte ($\mu\text{g}/\text{Zig.}$) in unterschiedlichen Zigarettenarten [73].

Komponenten	FF	FFLT	ULT	Mittelwert
Nikotin	1626	1526	1562	1585
Myosmin	50	46	56	49
3-Ethylpyridine	336	319	408	334

FF: full flavor; FFLT: full flavor low tar; ULT: ultra low tar

Bei der Untersuchung von Haupt- und Nebenstromrauch einer Reihe von filterlosen Zigaretten verschiedener Marken war Myosmin in Mengen von 13 bis 33 $\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ im Hauptstromrauch enthalten, der Nebenstromrauch enthielt 4 bis 7,5 mal soviel Myosmin [75].

Nach der Entwicklung einer neuen Referenzzigarette, 2R4F, welche die alte Referenzzigarette 1R4F ablösen sollte, wurden bei beiden Zigarettenarten vergleichsweise mehr als 44 Rauchanalyten quantifiziert [76]. Hierbei unterschied sich der Myosmingehalt mit 0,08 und 0,10 $\text{ng}/\text{Zig.}$ bei der 1R4F- bzw. 2R4F-Zigarette nur unwesentlich.

In einer von *Baek* und *Jenkins* [77] durchgeführten Studie wurde eine 30 m^3 große Testkammer in Tennessee (USA) mit Tabakrauch durch eine Rauchmaschine beraucht und auf charakteristische Spuren von organischen Komponenten untersucht. Bei 8 sehr unterschiedlichen Zigarettentypen war der Gehalt an Myosmin in der Kammerluft im Mittel ($7,0 \pm 1,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) genauso hoch wie bei vier Versuchen mit der 1R4F-Referenzzigarette ($7,0 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

2.2.6.2 Myosminbelastung in durch Tabakrauch verschmutzter Umwelt

Der feine organische Partikelstaub von Tabakrauch ist neben vielen anderen Faktoren ein Bestandteil, der zur allgemeinen Luftverschmutzung in den Städten beiträgt [78]. Für Los Angeles wurde 1982 ein Beitrag von 2,7% an den feinen organischen Partikeln in der Atmosphäre geschätzt. Für eine genauere Bestimmung sollten in einer Studie mit einem Rauchtunnel ähnliche Voraussetzungen geschaffen werden, wie sie sich in einer durch Rauch belasteten Atmosphäre in einer Großstadt ergeben. In einem vertikal ausgerichteten Rauchverdünnungstunnel rauchten Personen vier gängige US Zigarettentypen verschiedener Marken (ohne Filter, light, Menthol und mit Filter). Der am Ende des Tunnels ankommende gemischte Rauch wurde in einer Wirbelkammer mit einem dort befindlichen Quarzfilter aufgefangen und anschließend durch GC/MS analysiert. Für Myosmin und Nikotin sind dabei die folgen-

den Emissionsraten von 178 und 1159 $\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ (Summe aus Haupt- und Nebenstromrauch) ermittelt worden.

Bei den von *Singer et al.* [79] durchgeführten Experimenten wurde die Dynamik von ETS und EREF in einer typischen Raucherwohnung nachempfunden. Der EREF (exposure relevant emission factor) ist der aufnahmerelevante Emissionsfaktor, der betrachtet wird als individueller ETS Belastungsfaktor, welcher sich bei einem Tagesaufenthalt in einem verrauchten Raum ergibt. Bei diesem Versuch wurde über mehrere Monate, jeweils 6-7 Tage pro Woche, der EREF ermittelt. Dabei wurde täglich regelmäßig gelüftet. Die organischen Komponenten sind daraufhin alle paar Tage gemessen worden. 4 Stunden während des Rauchens, 10 Stunden nach dem Rauchen und als Grundbelastung anschließend nochmals weitere zehn Stunden nach dem Rauchen. Die Quantifizierung der Schadstoffe erfolgte durch Desorptions-GC/MS. Tabelle 16 zeigt das Ergebnis, vergleichend für Myosmin und Nikotin im steady state bei verschiedenen häufiger Lüftung und die Zunahme im Vergleich zu einer eintägigen Messreihe und zu den Werten, die in den ersten beiden Tagen der langen Messreihe erhalten wurden.

Tabelle 16: Aufnahmerelevante Emissionsfaktoren ($\mu\text{g}/\text{Zigarette}$) von ETS-Komponenten, gemessen bei gleichmäßiger Belüftung, in einer 50 m^3 großen möblierten Raucherwohnung.

Analyt	Lüftung alle			mittlere Erhöhung gegenüber	
	2 h^{-1}	$0,6\text{ h}^{-1}$	$0,3\text{ h}^{-1}$	1 Tagesmessung	2 Tagesmessung
Nikotin	3070	1660	820	2,30	1,96
Myosmin	160	92	60	2,12	1,83

EREFs: Exposure relevant emission factor

Bei der Untersuchung des Rauchs von 55 Zigaretten ist von *Merckel et al.* [80] unter Benutzung einer neuen Analysenmethode (HS-SPME), die in einem einzigen lösungsmittelfreien Schritt, das Entnehmen, die Extraktion, Konzentrierung und Einführung von Proben in einen GC mit anschließender GC/MS-Messung ermöglicht, das Vorhandensein von Myosmin bestätigt worden. Quantitative Angaben wurden in dieser Publikation nicht gemacht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Myosminkonzentrationen bei allen durchgeführten Analysen in der gleichen Größenordnung liegen. Dies betrifft sowohl die Konzentrationen die sich auf die einzelnen Zigaretten beziehen, wie auch die Angaben aus den Rauchkammern.

2.2.7 Das Vorkommen von Myosmin in weiteren Pflanzen

Im Jahr 1968 wurden bei chemischen Analysen der Papaya (*Carica papaya*) (Abbildung 10), die der Familie der *Caricaceae* (Melonenbaumgewächse), Gattung *Carica*, angehört, neben den Hauptinhaltsstoffen (Papain, Carpaine, Pseudo-carpaine) vier Alkaloide nachgewiesen, von denen drei als Nikotin (0,1028%), Cotinin (0,00278%) und Myosmin (0,00014%) identifiziert werden konnten. In diesem Zusammenhang wird die für Nikotin und dessen strukturverwandte Alkaloide bekannte insektizide Wirkung auch für Myosmin in der Pflanze diskutiert [81,82].

Einige Jahre später wurden die Alkaloide der Blätter von Nachtjasmin (*Cestrum nocturnum*) und Tagesjasmin (*Cestrum diurnum*), die der Familie der *Solanaceae*, Gattung *Cestrum*, angehören, durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Während im Nachtjasmin neben Nikotin, Nornikotin und Cotinin auch Myosmin vorhanden war, konnte im Tagesjasmin kein Myosmin gefunden werden [83]. Somit konnten zum ersten Mal tabakspezifische Alkaloide im Fall des Nachtjasmins außerhalb der Gattung *Nicotiana* und im Fall der Papaya sogar außerhalb der Familie der *Solanaceae* nachgewiesen werden. Allerdings war das Vorkommen von Myosmin bislang mit dem Auftreten von Nikotin und anderen Nikotinoiden verbunden.

Dies gilt auch für das Vorkommen von Myosmin in *Duboisia hopwoodii*, die ebenfalls zur Familie der *Solanaceae* gehört. Die von den Aborigines verwendeten Blätter dieser Pflanze zeichnen sich durch einen hohen Alkaloidgehalt aus. Sie hat mit bis zu 5% auch einen hohen Scopolaminanteil. Die getrockneten Blätter werden als Pituri gekaut oder nach Verkneten mit Pflanzenasche, zu einer Art Kugel zusammengerollt, hinter das Ohr gesteckt. Sowohl peroral als auch percutan werden die Alkaloide resorbiert und führen zu relaxierten bis narkotischen Zuständen. In einer Vergleichsstudie über die Verteilung von verschiedenen Alkaloiden in *D. hopwoodii* in West- und Zentralaustralien wurden die Blätter und Wurzeln der Pflanze mithilfe der GC/MS untersucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Myosmingehalt im Vergleich zu anderen Alkaloiden (Blätter/Wurzeln) von *D. hopwoodii* in verschiedenen Regionen von Australien, (% Anteile am Gesamtalkaloidgehalt).

Alkaloid	Wurzeln (Norden)	Blätter (Norden)	Wurzeln (Westen)	Blätter (Westen)
Myosmin	n.d.	1,4	7,8	in Spuren
Nikotin	19,1	8,8	in Spuren	77,1
Cotinin	n.d.	in Spuren	in Spuren	in Spuren
Nornikotin	17,7	86,2	47,8	20,2

n.d: nicht detektiert

Neben Nikotin, Nornikotin und Hyoscyamin wurde vor allem in den Wurzeln, aber auch in den Blättern, Myosmin nachgewiesen [84,85]. Im Vergleich zur Tabakpflanze sind die Myosminkonzentrationen in *D. hopwoodii* viel höher und stehen in einem ganz anderen Verhältnis zu Nikotin. In dieser Pflanze sind die höchsten Myosminkonzentrationen in der Wurzel und nicht im Blatt zu finden, also genau umgekehrt wie in der Tabakpflanze.



Abbildung 10: *Cestrum nocturnum* (links) und *Carica Papaya* (rechts).

2.2.8 Myosminkonzentration in Abwehrsekreten von Ameisen (*Messor spp.*)

Bei einer Vergleichsstudie über die chemische Zusammensetzung der exokrinen Drüsen von der Ernteameise (*Messor spp.*) wurde festgestellt, dass sich die Zusammensetzung der Sekrete der Gift- und der Dufourdrüsen unterscheiden. Die Dufourdrüse ist eine akzessorische Drüse des Giftapparates der Ameise. Sie sezerniert vor allem geradkettige Kohlenwasserstoffe, wobei die Sekrete jeder Kolonie eine spezifische Zusammensetzung aufweisen. Dies dient der kolonieinternen Kommunikation. Wenn die Späherinnen von Kolonien ein Futterareal entdecken, dann leiten sie die Nestgenossen durch Sekrete der Dufourdrüse als chemische Signale dorthin. Dies bezeichnet man als das so genannte Spurfolgeverhalten.

Die Giftdrüsen dagegen dienen der Abwehr und enthalten Tabakalkaloide wie Anabasin, Anabasein und Myosmin. Die Alkaloide dienen dem Zweck der Verteidigung, ähnlich einer der Funktionen, die Alkaloide in der Tabakpflanze übernehmen. In den Publikationen zum Vorkommen von Myosmin fehlen allerdings quantitative Angaben. Bei der Spezies *M. arenarius* wurde in den Giftdrüsen neben 2,3'-Bipyridin als Hauptinhaltsstoff und Anabasein als sekundärer Inhaltsstoff auch Myosmin nachgewiesen [44]. Dies ist ebenfalls bei einer Studie von

Cruz-Lopez [86] bestätigt worden. Bei der Analyse des ganzen Insekts von *M. cephalotes* war ein Derivat von Myosmin, das *N*-Formylmyosmin sogar der größte Nebenbestandteil der Alkaloidfraktion. Die Zusammensetzung der Abwehrstoffe in den Giftdrüsen ist vermutlich bei der Artenbildung entstanden und hat sich aufgrund einer hohen Effektivität durchgesetzt [87].

2.2.9 Die Existenz von Myosmin in verschiedenen Nahrungsmitteln

Tabelle 18: Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [1,2].

Myosmin nachgewiesen			Myosmin nicht nachgewiesen	
Pflanzenfamilie	Quelle	Konzentration ng/g	Pflanzenfamilie	Quelle
Haselgewächse (<i>Corylaceae</i>)	Haselnuss	0,7	Korbblütler (<i>Compositae lig.</i>)	Blattsalat
Schmetterlingsblütler (<i>Papilionaceae</i>)	Erdnuss	0,2 – 2,0	Gänsefußgewächse (<i>Chenopodiaceae</i>)	Spinat
Nachtschattengewächse (<i>Solanaceae</i>)	Kartoffel	2,41 – 4,47	Kürbisgewächse (<i>Scrophulariaceae</i>)	Gurke
Doldenblütler (<i>Umbelliferae</i>)	Tomate	0,53 – 0,66	Lauchgewächse (<i>Liliaceae</i>)	Zwiebel
Sterkuliengewächse (<i>Sterculiaceae</i>)	Karotte	0,01 – 0,03	Weinrebengewächse (<i>Vitaceae</i>)	Weintraube
Rosengewächse (<i>Rosaceae</i>)	Kakao	0,68 – 0,85	Bananengewächse (<i>Musaceae</i>)	Banane
Ananasgewächse (<i>Bromeliaceae</i>)	Apfel	1,12 – 1,25	Rautengewächse (<i>Rutaceae</i>)	Mandarine Zitrone
Strahlengriffelgewächse (<i>Actinidiaceae</i>)	Ananas	0,66 – 0,72		
Sauergräser	Kiwi	1,15 – 1,61		
Süssgräser (<i>Graminaceae</i>)	Hirse	0,41 – 0,43		
	Weizen	0,37 – 0,51		
	Reis	0,19 – 1,15		
	Mais	0,48 – 1,60		
Milchprodukte	Milch	1,16 – 1,35		
	Sahne	5,93 – 6,26		

Erste Hinweise auf eine wesentlich weitere Verbreitung von Myosmin zeigten Versuche in der Arbeitsgruppe von *Richter et al.* [1]. In mehreren Proben von Erd- und Haselnüssen wurde Myosmin in Konzentrationen zwischen 0,2-2 µg/g nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen wurde dann ein breites Spektrum an Grundnahrungsmitteln, Obst, Gemüse und Genussmitteln auf das Vorhandensein von Myosmin durch GC/MS analysiert [2,43,88]. Die Analysen orientierten sich an den realen Verzehrbedingungen, z.B. wurden Schalen einiger

Obst- und Gemüsesorten getrennt untersucht. Kartoffeln und Reis wurden vor der Analyse gekocht und das Kochwasser untersucht. Nach Selektion der positiv getesteten Nahrungsmittel wurde in diesen die genaue Konzentration von Myosmin ermittelt (Tabelle 18). Auf der Grundlage des Pro-Kopf-Konsums der positiv getesteten Lebensmittel ergibt sich eine durchschnittliche geschätzte jährliche Myosmin-Aufnahme von 497 µg (Tabelle 19). Dies ist nur eine Schätzung und zieht bislang nicht entdeckte Quellen und unterschiedliche Essgewohnheiten nicht mit ein. Da aber die meisten getesteten Nahrungsmittel so genannte Grundnahrungsmittel sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Myosminexposition durch individuelle Nahrungsaufnahme in den Industrienationen nicht extrem divergiert [88].

Tabelle 19: Abschätzung der Myosmin-Exposition durch Nahrungsaufnahme. Werte zum Pro-Kopf-Verbrauch beziehen sich auf Deutschland.

	Pro-Kopf- Verbrauch (kg/Jahr)	Myosmingehalt Min/Max (ng/g)	Myosmin-Exposition		Ø Myosmin- Exposition (µg/Jahr)
			Min (µg/Jahr)	Max (µg/Jahr)	
Reis	3,5	0,19 – 1,15	0,67	4,03	2,35
Mais	4,5	0,48 – 1,60	2,16	7,20	4,68
Weizenmehl	58,9	0,37 – 0,51	21,79	30,04	25,92
Hirse	0,4	0,41 – 0,43	0,16	0,17	0,17
Kartoffeln	70	2,41 – 4,47	168,70	312,90	240,80
Tomaten	17,5	0,53 – 0,66	9,28	11,55	10,41
Kakao	2,9	0,68 – 0,85	1,97	2,47	2,22
Milch	91,2	1,16 – 1,35	105,79	123,12	114,46
Sahne	7,9	5,93 – 6,26	46,85	49,45	48,15
Karotten	5,9	0,01 – 0,03	0,06	0,18	0,12
Apfel	40	1,12 – 1,25	44,80	50,00	47,40
Ananas	1,2	0,66 – 0,72	0,79	0,86	0,83
Summe			403,02	591,97	497,49

2.2.10 Myosmin in Körperflüssigkeiten (Muttermilch, Speichel, Plasma)

Nachdem Myosmin in einer breiten Palette von Lebensmitteln gefunden worden ist, gab es weitere Untersuchungen zum Nachweis von Myosmin in Körperflüssigkeiten. Die Myosminbelastung wurde in Abhängigkeit von Ess- und Rauchgewohnheiten abgeschätzt. Um eine Korrelation zum Raucherstatus zu ermöglichen, wurde parallel zu Myosmin auch Cotinin bestimmt. Beim Menschen stellt Cotinin einen spezifischen Biomarker für die Nikotinbelastung

dar [89]. Erste orientierende Untersuchungen von Muttermilch, Speichel und Plasma ergaben die folgenden Ergebnisse.

2.2.10.1 Muttermilch

Es wurden Muttermilchproben von 23 Frauen untersucht. Die Proben wurden bei gesunden Probandinnen während des Stillens mit einer Milchpumpe abgepumpt. Informationen über die Mütter wie Alter, Ernährungsgewohnheiten und Rauchstatus, sowie Zeitpunkt der Probenahme, wurden in einem Fragebogen abgefragt. Das Alter der Mütter und der Kinder lag im Mittel bei 32 (21-36) Jahren bzw. 32 (11-68) Tagen. Alle Probandinnen zeigten anhand der abgefragten Ernährungsgewohnheiten eine ausgewogene Ernährung. Passivrauchbelastung zu Hause oder am Arbeitsplatz wurde von 5 Frauen angegeben, eine Mutter war Raucherin. Der Rauchstatus wurde neben der Befragung bei allen Frauen durch Bestimmung von Cotinin überprüft (Tabelle 20, Abbildung 11).

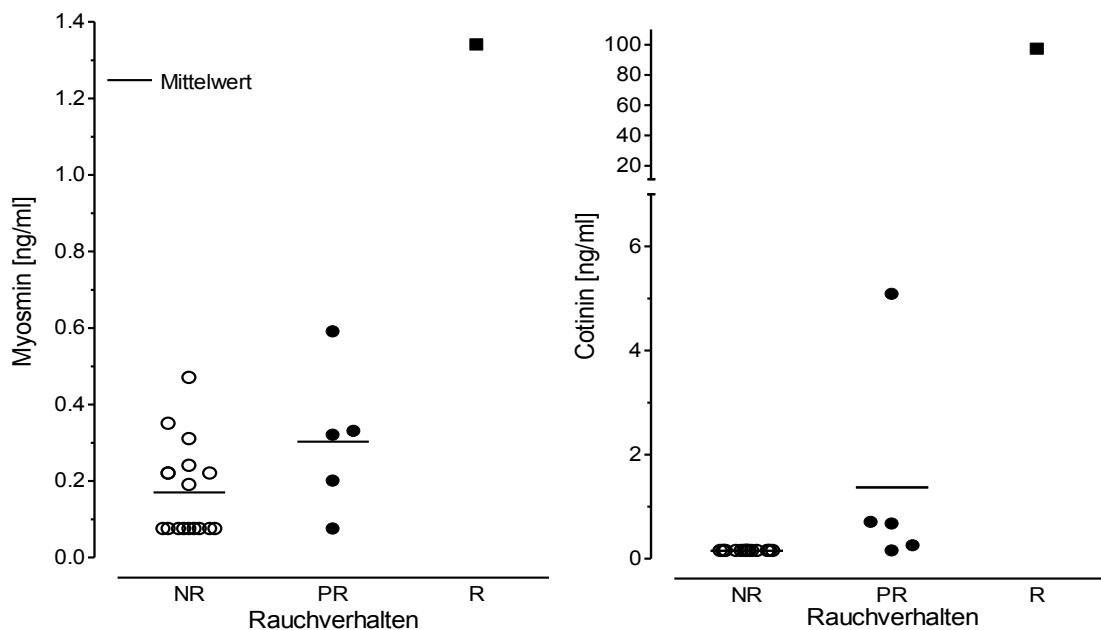


Abbildung 11: Konzentrationen von Myosmin (links) und Cotinin (rechts) in Muttermilch nach Rauchstatus (NR: Nichtraucherin, PR: Passivrauchbelastung; R: Raucherin).

Während das Cotinin bei den 17 Nichtraucherinnen stets unter der Nachweisgrenze lag, konnte es bei 4 von 5 Passivrauch-belasteten Müttern und bei der Raucherin nachgewiesen werden. Myosmin konnte nur bei 8 von 17 Nichtraucherinnen und bei einer Passivraucherin nicht bestimmt werden. Die Myosminbelastung war mit $0,17 \pm 0,12$ ng/ml bei den Nichtraucherinnen nur knapp halb so niedrig wie bei den Passivraucherinnen ($0,30 \pm 0,19$ ng/ml) und nicht signifikant verschieden. Gegenüber den Passivraucherinnen war bei der Raucherin das Myosmin mit 1,34 ng/ml (4,5-fach) wesentlich geringer erhöht als das Cotinin (71-fach).

Tabelle 20: Myosmin- und Cotininbelastungen (ng/ml) in Muttermilch.

	Nichtraucherin (n = 17)	Passivraucherin (n = 5)	Raucherin (n = 1)
Myosmin	0,17 ± 0,12	0,30 ± 0,19	1,34
Cotinin	-	1,37 ± 2,09	97,12

2.2.10.2 Speichel

Die Speichelproben wurden jeweils 1 Std. nach dem Essen bei 22 Probanden untersucht (Tabelle 21). Trotz großer statistisch signifikanter Unterschiede im Cotiningehalt lagen die mittleren Myosminkonzentrationen unabhängig vom Rauchstatus zwischen 1,58 und 1,89 ng/ml.

Tabelle 21: Myosmin- und Cotininbelastungen (ng/ml) im Speichel.

	Nichtraucher (n = 14)	Passivraucher (n = 2)	Raucher (n = 6)
Myosmin	1,58 ± 1,67	1,89 ± 0,35	1,87 ± 1,01
Cotinin	0,46 ± 0,37	2,15 ± 1,89	71,55 ± 41,81

Im Rahmen einer Fastenkur nahm bei einem Nichtraucher die Myosminkonzentration im Speichel mit Reduktion der Nahrungsaufnahme deutlich ab. Allerdings blieb ein Anstieg mit Wiederaufnahme von Nahrung auch innerhalb von einer Woche aus. Cotinin war nur in 4 von 12 Proben nachweisbar und lag unter 1,5 ng/ml (Abbildung 12).

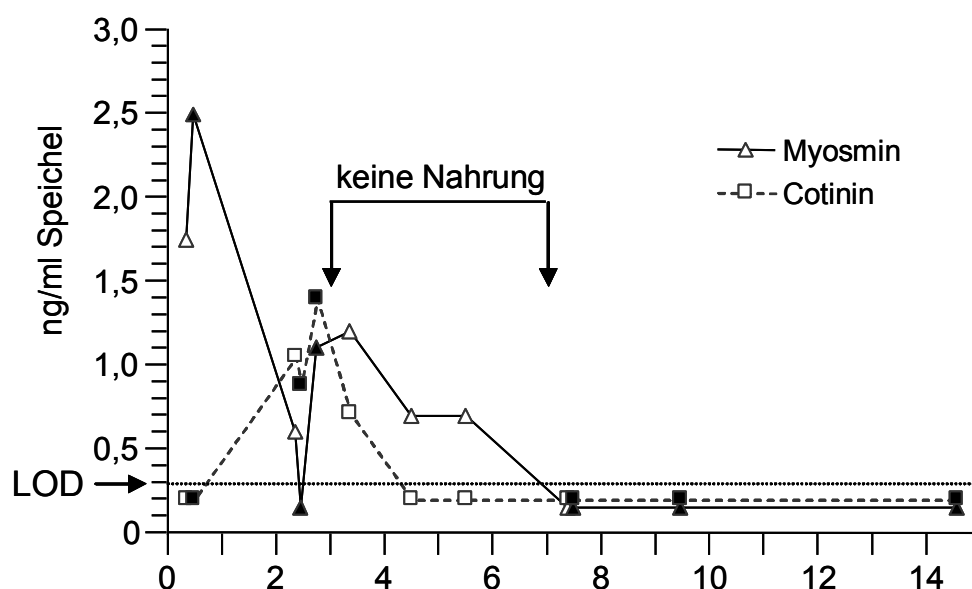


Abbildung 12: Myosmin und Cotinin im Speichel während des Diätversuches, vor und nach der Nahrungsaufnahme genommene Proben sind durch leere bzw. gefüllte Symbole dargestellt; Werte unterhalb der Linie (LOD) liegen unter der Nachweisgrenze.

2.2.10.3 Vergleich der Myosminkonzentrationen in Speichel und Plasma

Im Rahmen des oben genannten Fastenversuchs wurden an zwei verschiedenen Tagen zeitgleich zum Speichel auch Plasmaproben gewonnen und auf Myosmin untersucht. Um das theoretisch zu erwartende Speichel/Plasma-Verhältnis berechnen zu können, wurde jeweils der pH-Wert nach Probennahme bestimmt. Dieser betrug im Speichel 7,31 und 7,44, im Plasma jeweils 7,41 (Tabelle 22). Die Myosminkonzentrationen in Plasma und Speichel waren 1,48 und 1,89 ng/ml bei der ersten Probennahme, eine Woche später 5,56 und 4,66 ng/ml.

Anhand der pH-Werte wurde unter Verwendung der Henderson-Hasselbach-Gleichung das theoretische Speichel zu Plasma Verteilungsverhältnis berechnet. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Werten (Tabelle 22). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich Myosmin hinsichtlich der Verteilung zwischen Plasma und Speichel wie eine schwache Base verhält.

Tabelle 22: Myosminbelastung (ng/ml) in Plasma und Speichel und theoretische, sowie experimentelle Bestimmung des Speichel/Plasma-Verhältnisses (S/P).

	pH-Wert		Plasma	Speichel	S/P _{experimentell}	S/P _{theoretisch}
	Speichel	Plasma				
Probe 1	7,31	7,41	1,48	1,89	1,28	1,18
Probe 2	7,44	7,41	5,56	4,66	0,84	0,95

2.2.11 Myosminbelastung des Menschen

Aufgrund dieser Messergebnisse konnte eine erste grobe Abschätzung der Belastung des Körpers mit Myosmin abgeleitet werden. Ohne Kenntnis der Pharmakokinetik von Myosmin beim Menschen, stützt sich die Berechnung auf Vergleichsdaten bei der Ratte (siehe Kap. 1.6), die eine vergleichbare Kinetik für Nikotin und Myosmin zeigen und auf die reichhaltige Literatur zur Nikotindisposition beim Menschen [90]. In einem Versuch von *Dempsey et al.* [91] wurde bei 62 Probanden ca. eine Stunde nach oraler Aufnahme von 2 mg deuteriertem Nikotin durchschnittlich eine Nikotinkonzentration von 4,7 ng/ml gemessen. Bei vergleichbarer Pharmakokinetik müsste der Proband aus dem Fastenversuch demnach ca. 0,6 und 2,4 mg Myosmin oral aufgenommen haben um eine Stunde nach Nahrungsaufnahme im Plasma Myosminkonzentrationen von 1,48 und 5,56 ng/ml zu erreichen.

Während aufgrund der Nahrungsmittelanalysen die tägliche Aufnahme von Myosmin nur auf 1,1-1,6 µg/Kopf geschätzt wurde [2], lassen demnach die Ergebnisse der Speichel- und Plasmaanalysen von *Maier* [92] eine wesentlich höhere Aufnahme im Milligrammbereich aus

bislang noch nicht identifizierbaren Quellen vermuten. Rauchen und Passivrauchen kommen hierfür nicht in Frage, weil die Myosminkonzentrationen im Speichel weder mit dem selbst berichteten Rauchstatus noch mit den Cotininwerten korrelieren. Somit muss es für das Myosmin noch andere exogene Quellen geben. Eine andere Möglichkeit wäre die endogene Freisetzung von Myosmin aus bisher noch nicht identifizierten Vorstufen. Gegen eine endogene Synthese unabhängig von der Nahrungsaufnahme spricht der Fastenversuch, bei dem die Myosminkonzentration im Speichel unter die Nachweisgrenze abfiel [92].

2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Myosmin

Der chemisch korrekte Name von Myosmin mit der Summenformel $C_9H_{10}N_2$ und der CAS Nummer 532-12-7 lautet 3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridine. Das Molekulargewicht beträgt 146,19 und der pK_a -Wert liegt bei $7,81 \pm 0,2$ [SciFinder 2007]. Myosmin ist bei Raumtemperatur ein hellgelbes Pulver, das nicht wasserdampfflüchtig ist. Der Schmelzpunkt von Myosmin liegt zwischen 44 und 45 °C, der Siedepunkt bei 129 °C. Das Absorptionsmaximum im Infrarotbereich liegt bei $\nu_{C=N} = 1618 \text{ cm}^{-1}$ [93-95], die maximale Absorption ultravioletter Strahlung befindet sich in 95% Ethanol bei $\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$ [96].

Keto-Imin-Tautomerie:

In einer wässrigen Hydroxylamin- oder Phenylhydrazin-Lösung reagiert Myosmin als Carbonyl-Komponente. Dies weist auf ein reversibles Hydrolysegleichgewicht in wässriger Lösung hin (Abbildung 13), was bedeutet, dass in solchen Lösungen eine Mischung von Myosmin und der Aminoketonform enthalten ist.

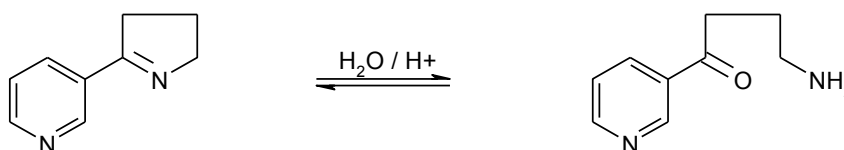


Abbildung 13: Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin.

Im sauren Bereich liegt fast nur die offenkettige Aminoketonform vor, während im neutralen und alkalischen Milieu die geschlossene Ringform überwiegt. Dieses pH-abhängige Gleichgewicht wurde anhand ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren belegt. In Pufferlösungen mit physiologischem pH-Wert von 7,4 liegt nur 1% des Myosmins in offenkettiger Form vor [97,98]. *N*-Methylmyosmin ist resistent gegen eine Hydrolyse, es erfolgt keine hydrolytische Ringöffnung [99].

2.4 Analytik von Myosmin

Die Anfänge der Analytik von Myosmin sind eng mit denen der Tabakalkaloide verknüpft. Die ersten Analysen sind damals anhand von UV-Spektroskopie durchgeführt worden. Dies ist die älteste spektroskopische Methode, die aber wegen ihrer begrenzten Aussagekraft heute in der Praxis keine allzu große Rolle spielt und nicht mehr benutzt wird.

Schon 1949 ist durch *Swain et al.* [96] ein durch UV-Spektroskopie erlangtes Absorptionsspektrum von Myosmin ermittelt worden (Tabelle 23, 24).

Tabelle 23: Lokalisation und Intensität der Absorptionsmaxima von Myosmin [96].

Lösungsmittel	1. Maximum			2. Maximum		
	λ , m μ	k	e	λ , m μ	k	e
95% Ethanol	266	26,6	3890	234	77,7	11360
angesäuertes Ethanol	262	36,1	5280	226	42,7	6240
Neohexan	267	23,2	3390	234	83,6	12220
Wasser	264	29,6	4330	234	69,2	10120

Tabelle 24: Lokalisation und Intensität der Absorptionsminima von Myosmin [96].

Lösungsmittel	1. Minimum		2. Minimum	
	λ , m μ	k	λ , m μ	k
95% Ethanol	261	26,2	214	42,2
angesäuertes Ethanol	244	32,6		
Neohexan	259	21,8	212	34,4
Wasser	261	29,6	214	38,1

Einige Jahre später haben *Tso* und *Jeffreys* [42] die erste Papierchromatographie zur Bestimmung von Myosmin durchgeführt. Bei der Analyse von Maryland Tobacco sind sowohl die Tabakalkaloide als auch deren Umwandlungsprodukte bestimmt worden.

Der Zeitaufwand für diese Papierchromatographie war damals immens, er lag zwischen sieben und acht Wochen. Dies machte die Art der Probenanalyse vor allem bei einer großen Probenanzahl absolut unpraktikabel.

Die Papierchromatographie ergab folgende Ergebnisse:

Myosmin: R_f : 0,92 Farbe: hellgelb

Für die darauf folgende UV-Spektrometrie wurde jeder Spot der Papierchromatographie abgetragen, jeweils zu gleichen Teilen in Lösung mit Natronlauge bzw. Salzsäure gebracht und UV spektrometrisch vermessen worden (Tabelle 25).

Tabelle 25: UV-Absorptionsspektrum von Myosmin.

Analyt	Tabakprobe							
	Saures Medium				Alkalisches Medium			
	1.Max	2.Max	1.Min	2.Min	1.Max	2.Max	1.Min	2.Min
Myosmin im Tabak	263	212	242		262	232	258	218
Standard	264	223	242	212	268	214	260	214

Nach der UV-Spektroskopie wurden diese Proben noch quantifiziert. Der prozentuelle Anteil des Myosmins lag bei 0,14%. Weitere Untersuchungen von Tabak mit dieser Methode wurde in den nachfolgenden Jahren von *Jeffrey* und *Tso* [62] berichtet. Im Anschluss an die UV-Spektrometrie legten 1954 sowohl *Eddy* und *Eisner* [100] als auch *Witkop* [94] das Infrarotspektrum der Tabakalkaloide fest. Aufgrund der Einzigartigkeit der jeweiligen Alkaloide war es von nun an der Analytik möglich eine genaue Zuordnung vorzunehmen. Einzelne Alkaloide wurden unverwechselbar und konnten somit unmissverständlich identifiziert werden.

Bereits 1941 wurden von *Martin* in Zusammenarbeit mit *Synge* die Grundlagen der Gaschromatographie beschrieben und im Jahr 1951 gelangen *James* und *Martin* [101] die ersten praktischen Trennungen nach dem Konzept der Gasverteilungschromatographie. Sie trennten niedrige Karbonsäuren bis C₁₂ bei Temperaturen von 100 bzw. 137 °C. Als stationäre Phase diente bei 300 °C getrocknetes Kieselgur, das mit Silikonöl und Stearinsäure getränkt wurde, als Trägergas wurde Stickstoff benutzt. Die ersten GC-Analysen zu Myosmin wurden dann 1959 von *Quin* [102,103] durchgeführt. Er trennte die Alkaloidfraktion im Rauch von Burleytabak gaschromatographisch auf, unter Benutzung von drei verschiedenen Säulenmaterialien, Ofentemperaturen und Fließgeschwindigkeiten und ermittelte die folgenden Retentionszeiten (Tabelle 26).

Zur Kontrolle wurden dann die Extrakte auf jeweils einer Polypropylenglycol- und einer Polyethylenglycolsäule gemessen. Diese Retentionszeiten sind dann mit denen bekannter Alkaloide verglichen worden.

Tabelle 26: Gaschromatographie von Myosmin im Jahre 1958 [102,103].

Säulenmaterial	Polypropylenglycol	Polybutylenglycol	Polyethylenglycol
Temperatur (°C)	190	180	190
Fließgeschwindigkeit (l/min)	45	50	48
Rt. Myosmin (min)	16,4	14,7	13,4

Rt.: Retentionszeit

In der Regel war dies eine sichere Methode zur Mehrfachprüfung der gemessenen Werte, nur in einem Fall schlug diese Technik fehl, nämlich bei der Unterscheidung von zwei Komponenten: Nornikotin und Myosmin. Diese beiden Alkaloide eluierten auf beiden Säulen mit der gleichen Retentionszeit. Durch Papierchromatographie konnte man aber das Vorhandensein beider Alkaloide nachweisen. Anschließend wurden, in einer wenig aussagekräftigen Quantifizierung, die Peakflächen miteinander verglichen. Für Nornikotin und Myosmin lagen die Mengen in einem Rauchextrakts von ca. 60 Zigaretten bei 88 µg [103].

Mit der Gaschromatographie ist somit ein Analyseverfahren entwickelt worden, das bis heute in vielerlei Verfahren eingesetzt wird und aus dem Laboralltag nicht mehr wegzudenken ist, da es sich durch eine hohe Trennleistung und eine gute Handhabbarkeit auszeichnet. Die Trennung der Analyten beruht dabei auf zwei Effekten. Zum einen dem Dampfdruck der Komponenten und zum anderen der Wechselwirkung mit der stationären Phase. In letzter Zeit hat sich für die Detektion und Quantifizierung die Massenspektrometrie durchgesetzt.

Das erste Massenspektrometer wurde ca. 1913 von dem Nobelpreisträger *Thomson* und einige Jahre später von *Aston* gebaut. Diese Geräte konnten ab den 1950er Jahren kommerziell erworben werden. Anders als die meisten anderen bisherigen Formen der Spektroskopie oder Spektrometrie, induzierte die Massenspektroskopie willentlich destruktive Interaktionen zwischen elektromagnetischer Strahlung und den Analytmolekülen. Die häufigste Anwendung findet der Beschuss der Moleküle mit Elektronen bei 70 eV im Hochvakuum. Die verschiedenen ionisierten Fragmente werden im Magnetfeld nach ihrer Masse unterschiedlich stark abgelenkt und es ergibt sich ein Spektrum, das aufgrund der einzelnen Massen und ihrer charakteristischen relativen Intensität die weitgehend sichere Identifizierung erlaubt.

1965 ist von *Duffield* [104] die erste Massenspektrometrie der Tabakalkaloide durchgeführt worden. Die von ihm ermittelten Massenfragmente für Myosmin (m/z 146) sind:

[M-1]: m/z 145 und die des Basispeaks das [M-28]: m/z 118, dass ein Massenfragment von m/z : 68 entsteht, schloss er damals aus (Abbildung 14).

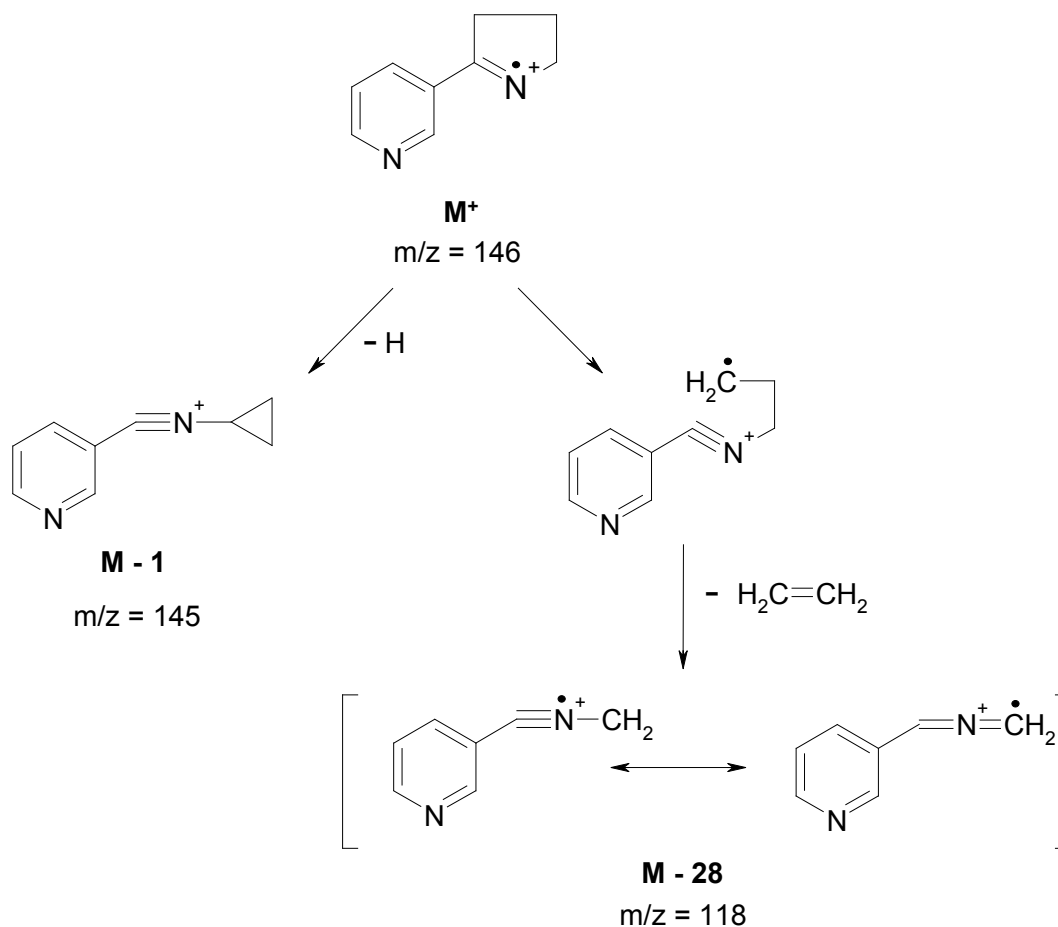


Abbildung 14: Massenfragmente von Myosmin.

Weniger als zehn Jahre später ist dann das Myosmin zum ersten Mal von *Brown* und *Ahmad* [105] im Tabakrauchkondensat gaschromatographisch nachgewiesen worden. Mittels Massenspektrometrie konnte darüber hinaus bewiesen werden, dass es sich hierbei wirklich um Myosmin handelte (Tabelle 27).

Tabelle 27: Identifizierung von Myosmin anhand von GC und nachfolgender MS [105].

GC / R _t (min)	Identifikation durch MS	frühere Nachweismethode
3,4	m/z: 146, m/z: 145, m/z: 118	Papierchromatographie

Ab Mitte der 70er Jahre gelang es trennstärke Säulen mit kleinen Partikeln für die Flüssigkeitschromatographie herzustellen, es wurde die HPLC (high performance liquid chromatography) mit Normalphasensäulen entwickelt. Ende der 70er Jahre gelang durch Entwicklung von modifizierten Kieselgelen mit der Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) nun auch die Trennung von Stoffen in wässrigen Medien. In den frühen 80er Jahren kam es zu einer rasanten Weiterentwicklung in diesem Bereich, hinsichtlich der Trennleistung, Identifizierung,

Reinigung und Quantifizierung. Dazu wurden die gesamten Vorgänge extrem vereinfacht und beschleunigt u.a. durch automatische Probengeber. 1980 sind dann die ersten quantitativen Messungen zu Myosmin mit HPLC mit Reversed Phase-Säule durchgeführt worden [106]. Ab den 80er Jahren begann man die Geräte miteinander zu verkoppeln, dabei diente ein Gerät, z.B. das GC, zu Auftrennung des zur untersuchenden Stoffgemisches und ein entsprechender Detektor, z.B. das MS oder ein NPD zur Identifizierung und gegebenenfalls auch zur Quantifizierung der einzelnen Komponenten. Durch die Kopplung der Geräte gelang es nun schnelle, präzise Messungen mit hohem Probendurchsatz durchzuführen, die im Vergleich zu früher mit einem viel kürzerem Zeitaufwand verbunden waren.

2.5 Synthesemöglichkeiten von Myosmin

Die erste Synthetisierung von Myosmin führten *Späth* und *Mamoli* [40] im Jahr 1936 durch. Hierbei wurde Myosmin anhand einer eigentlich für Nikotin erprobten Methode synthetisiert. *N*-Benzoylpyrrolidon wurde mit Ethylnikotinat und Natriumethanolat kondensiert. Das daraus entstandene Produkt wurde dann mit konzentrierter Salzsäure in einer Druckkammer hydrolysiert. Diese Reaktion beinhaltet in einem Schritt das Abspalten der Benzolgruppe, die Ringöffnung, Decarboxylierung und den erneuten Ringschluss. Das Produkt dieser Reaktion war sowohl in der Struktur, als auch in der chemischen Zusammensetzung, mit dem natürlich vorkommenden Myosmin identisch. Zusätzlich konnten durch diese Synthese andere mögliche Formeln für Myosmin ausgeschlossen und die damals festgelegte Struktur bestätigt werden.

Neben diesem ersten Syntheseweg gibt es mehrere Verfahren bei denen Myosmin in unterschiedlichen Reinheitsgraden erhalten wird.

1. Pyrolyse von Nikotin am Quarz-Kontakt bei Temperaturen von 570 °C. Hier entsteht neben einigen anderen Produkten Myosmin in Ausbeuten zu etwa 33%, abhängig von der Menge des pyrolysierten Nikotins [41] (Abbildung 15).

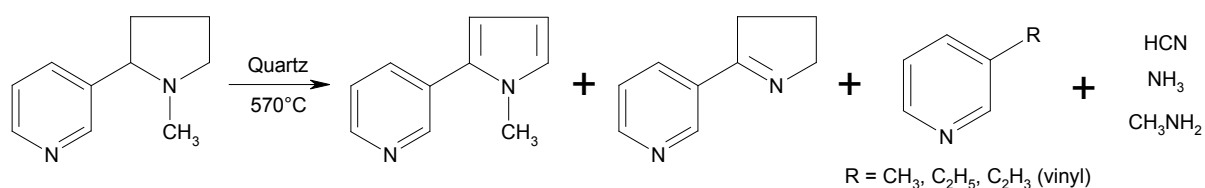


Abbildung 15: Pyrolyse von Nikotin.

2. Bei der Behandlung von 1-(3-Pyridyl)-3-dimethylaminopropan-1-on mit Nitromethan entsteht 1-(3-Pyridyl)-4-nitrobutan-1, welches in Ethanol hydrogeniert und mit Raney-nickel als Katalysator zu Myosmin reduziert werden kann. Hier ist eine Myosminausbeute von 80-90% zu erwarten [107].
3. Als Oxidationsprodukt von Nikotin durch eine vierwöchige Sauerstoffsättigung bei 30 °C erhält man: Nikotinsäure, Oxynikotin, Nikotyrin, Cotinin und Myosmin [108].
4. Eine Vier-Stufen-Synthese wurde im Jahr 1972 durch *Leete* [52] entwickelt (Abbildung 16). α -Morpholin- α -(3-pyridyl)acetonitril (2) wird aus Pyridin-3-aldehyd (1) durch die Addition von wässriger Zyankalilösung mit Morpholinsalz gewonnen. Dieses wird mit Acetonitril und tertiärem Butanol zu γ -Cyano- γ -morpholin- γ -(3-pyridyl)-butyronitrile (4) umgesetzt. Durch die Hydrolyse dieses Produkts mit wässriger Essigsäure erhält man 3-Cyano-1-(3-pyridyl)propan-1-on (3). Wird dieses β -Ketonitril in ethanolischem Ammoniak bei Anwesenheit von Raneynickel 24 Stunden unter Druck hydrogeniert, erhält man eine Mischung aus Myosmin (5) zu 30% und Nor-nikotin (6) zu 60%.

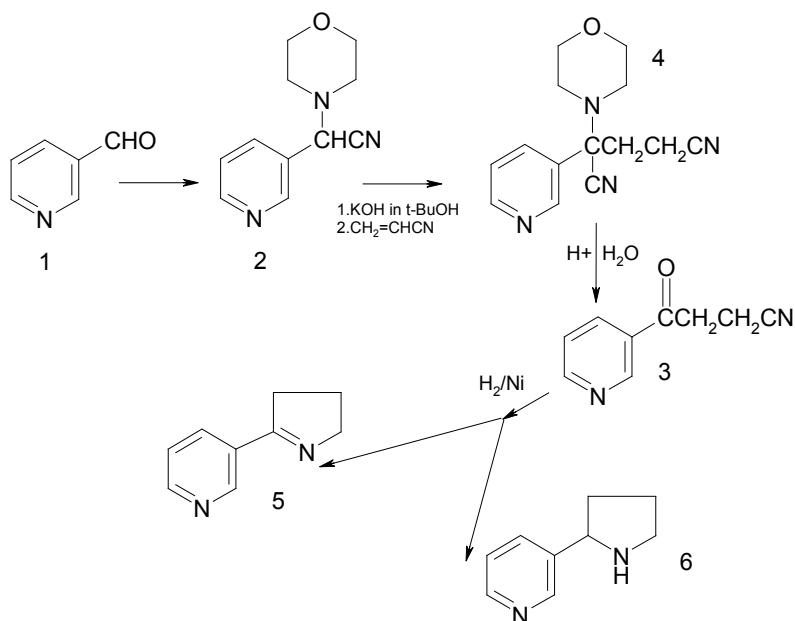


Abbildung 16: Vier-Stufen-Synthese von *Leete* [52].

5. Eine Drei-Stufen-Synthese von Myosmin ist von *Mundy* [109] beschrieben worden. Hier wird Nikotinsäure mit Thiochloriden versetzt, woraus Nikotinoylchlorid gebildet wird. Dies wird mit 2-Pyrrolidon zu *N*-Nikotinoyl-2-pyrrolidon umgesetzt. Die Pyrolyse von *N*-Nikotinoyl-2-pyrrolidon mit gleichen Teilen von Calciumoxid ergibt eine Mischung, die zu 67% Myosmin und zu 33% 2-Pyrrolidone enthält. Die Synthese von

Myosmin aus Nikotinsäureethylester und *N*-Vinylpyrrolidon ist die bis heute meist verwendete Synthese von Myosmin, die von *Brandänge* und *Lindblom* [93] vorgeschlagen wurde (Abbildung 17). Die Myosminausbeute beträgt hierbei 63%.

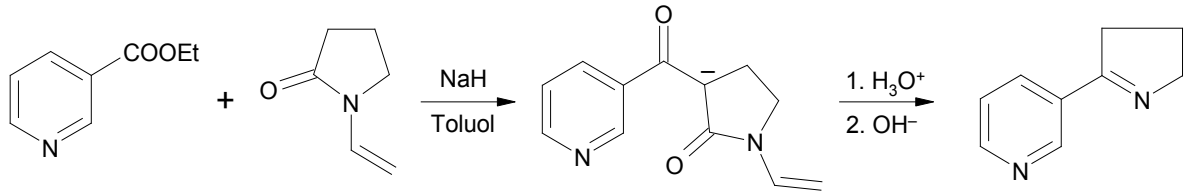


Abbildung 17: Synthese von Myosmin.

- Die Behandlung von Nikotin im Autoklaven mit Säure (pH 5) bei 200 °C, lieferte nach drei Tagen u.a. Myosmin [110].

2.6 Toxikokinetik

2.6.1 Autoradiographische Untersuchungen

Um erste Hinweise zur Toxikokinetik von Myosmin zu erhalten, wurde eine Autoradiographie an Ratten durchgeführt. Die Methode der Ganzkörperautoradiographie, erstmals vorgestellt von *Ullberg* [111,112], macht es möglich, die Verteilung von radioaktiv markierten Substanzen in Geweben von Labortieren zu ermitteln.



Abbildung 18: Anfertigung der Gewebeschnitte mit einem Hochpräzisions-Großschnittkryomikrotom.

Dazu wurde jeweils eine Ratte eines pigmentierten (Long-Evans) und eines nicht pigmentierten (Fischer F344) Stammes 6 und 15 Minuten, sowie eine, vier und 24 Std. nach i. v. Injektion radioaktiv markierten Myosmins ($5\text{-}^3\text{H}$: $1,4 \mu\text{g}/\text{kg} = 8,49 \text{ MBq}/\text{kg}$ oder $2'\text{-}^{14}\text{C}$: $0,27 \text{ mg}/\text{kg} = 3,74 \text{ MBq}/\text{kg}$) durch CO_2 -Asphyxiation getötet und tiefgefroren. Von den Ratten wurden $40 \mu\text{m}$ breite Gefrierschnitte in der Sagittallinie angefertigt (Abbildung 18) und mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen qualitativ und quantitativ ausgewertet. Durch diese Ganzkörperradiographie war es möglich, die Verteilung des radioaktiv gelabelten Myosmins in den Ratten zu bestimmen und somit einen Überblick zur Verteilung, Bindung und Ausscheidung des Stoffes zu bekommen. Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von Myosmin im Gewebe wurde ein Teil der Schnitte seriell mit Lösungsmitteln und Wasser behandelt. Zusätzlich wurden bei den Ratten, die nach vier und 24 Stunden getötet worden sind, Urin und Faezes im Stoffwechsellkäfig gesammelt [113-116].

2.6.1.1 Verteilung

Nach i. v. Applikation verteilte sich das radioaktiv markierte Myosmin schnell über den Blutweg in die meisten Organe. Es besaß somit die Fähigkeit zur Überwindung von zellulären Membranen und zur Anreicherung bzw. Verteilung im intra- und extrazellulären Raum. Dazu zeigte Myosmin, wie auch andere basische Substanzen:

1. eine Affinität zum Melanin
2. eine Anreicherung in
Magenfundus, Speicheldrüse, Tränendrüse, Nase (hier primär in den Epithelien, die ein saures Sekret produzieren), Präputium, akzessorischen Geschlechtsdrüsen, distalen Ösophagus, pigmentierten Haaren und der pigmentierten Retina.

Im zeitlichen Verlauf kann man folgende Verteilung des radioaktiv markierten Myosmins erkennen (Tabelle 28 und Abbildung 19).

Tabelle 28: Verteilung des radioaktiv markierten Myosmins [116].

6 – 60 min p.i.	4 Std. p.i.	24 Std. p.i.
<u>Anreicherung der Radioaktivität in:</u> Hardschen-, Tränen-, Speichel- und Geschlechtsdrüsen, Leber, Melanin, Nierenrinde, Ösophagus und Drüsenmagenwand	<u>Anreicherung der Radioaktivität in:</u> Ösophagus und Akzessorischen Geschlechtsdrüsen <u>Abnahme der Konz. in:</u> anderen vorher genannten Organen	<u>Anreicherung der Radioaktivität in:</u> Melanin und Präputialdrüse

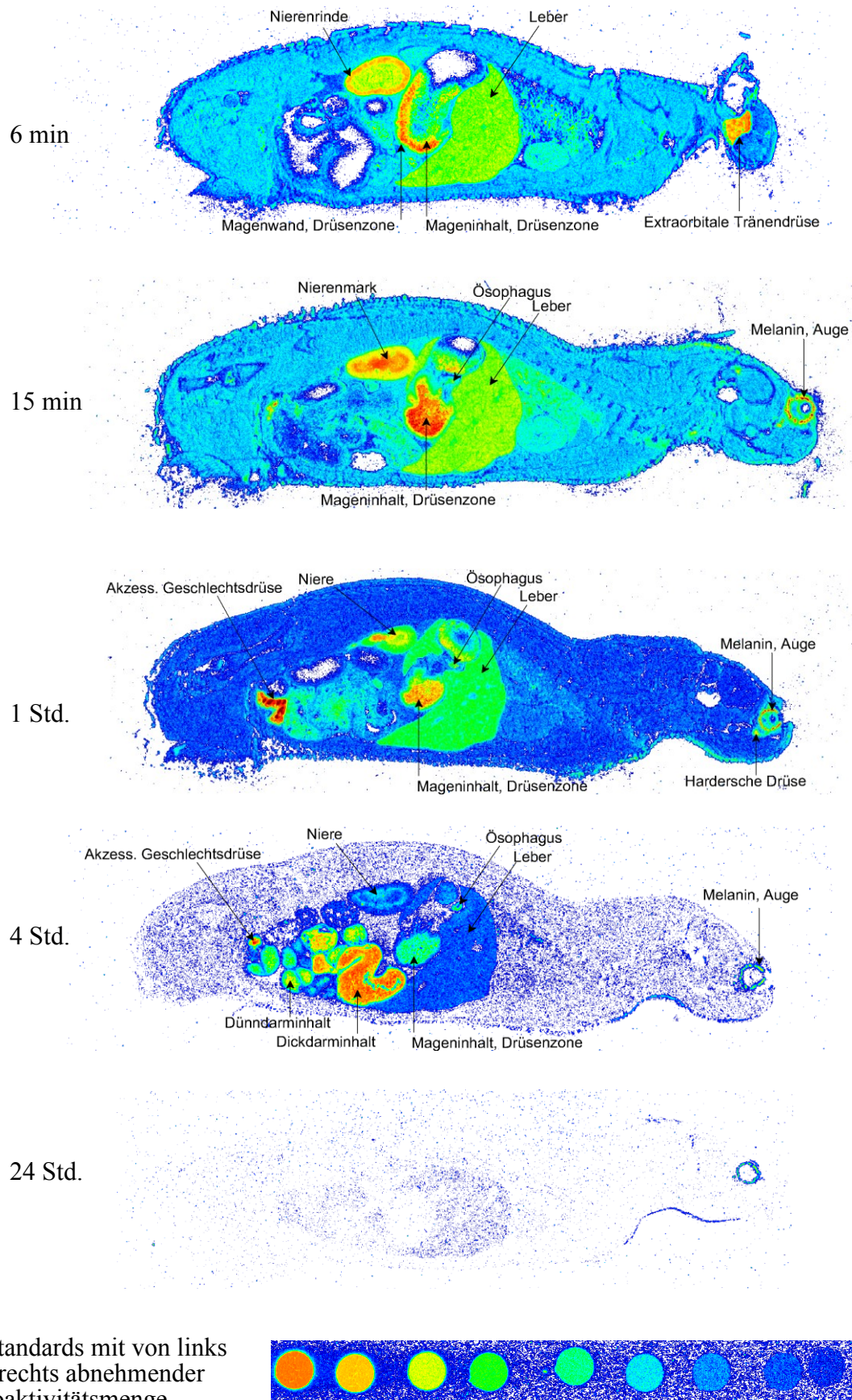


Abbildung 19: Autoradiogramme 0,1 bis 24 Std. nach Applikation von ^{14}C -Myosmin [116].

Da die Bestimmung von nicht extrahierbarer Radioaktivität Hinweise auf kovalente Bindung der Ausgangssubstanz oder ihrer Metaboliten an Makromolekülen geben kann, wurden ausgewählte Schnitte einer Extraktion mit einer Reihe polarer und unpolarer Lösungsmittel unterworfen. In diesen Schnitten konnte die Radioaktivität aus den meisten Organen und Geweben weitgehend entfernt werden. Bei folgenden Geweben war dies nicht möglich:

Melanin, Nasenmuschel, Ösophagus, Lunge und Leber.

Eine Markierung der Mukosa des Ösophagus sowie der pigmentierten Bereiche des Auges konnte auch nach *in vitro* Inkubation der Schnitte von unbehandelten Ratten deutlich gemacht werden.

2.6.1.2 Ausscheidung

Der größte Teil von Myosmin wurde schnell nach Metabolisierung über die Nieren (Abbildung 20) ausgeschieden. Weitere Exkretionswege waren:

1. der Magen
2. die Speichel- und Tränendrüsen
3. wahrscheinlich auch Lunge und Präputialdrüse

Die Abnahme der Radioaktivität folgte, in den meisten Geweben zwischen 15 min und 24 Std., einer Kinetik erster Ordnung. Die Halbwertszeiten lagen zwischen 0,4 Std. in der Speicheldrüse und 1,2 Std. im Melanin der Haut. Die Exkretion von Myosmin bzw. seiner Metaboliten über Urin und Faezes betrug innerhalb von 24 Std. 72% und 15% der Dosis.

2.6.2 Metabolisierung von Myosmin

Studien zum Metabolismus von Myosmin sind bislang, aufgrund der bisherig angenommenen geringen toxikologischen Relevanz, selten. Meistens trat Myosmin als zufälliger Metabolit bei Stoffwechselstudien anderer Substanzen auf. So wurde nach Inkubation von Rattenlebermikrosomen mit NNK Myosmin gefunden, bei *in vivo* Versuchen konnte jedoch kein Myosmin nachgewiesen werden [117].

2.6.2.1 Biomonitoring

Jeder Mensch ist in fast allen Bereichen des Lebens vielen unterschiedlichen Fremdstoffen exponiert. Die größte Aufmerksamkeit muss aber auf Stoffe gerichtet werden, die mutagen, genotoxisch und kanzerogen wirken, als auch auf neurotoxischen, teratogenen und embryotoxischen Stoffen. Diese Substanzen üben in ihren unterschiedlichsten Formen toxische

Effekte auf verschiedene Organsysteme aus. Das Biomonitoring wird streng definiert als die Messung von Fremdstoffen und seinen Metaboliten in verfügbaren Körperflüssigkeiten und der Atemluft [118]. Die im Biomonitoring erfassten Substanzen und ihre Metaboliten bezeichnet man als Biomarker. Die Definition der Biomarker geht jedoch darüber hinaus:

1. Biomarker der internen Dosis

Konzentrationen von Stoffen und deren Metaboliten in biologischem Material wie Blut, Serum, Muttermilch, Haare, Zähne, Ausatemluft, Urin.

2. Biomarker der biologisch effektiven Dosis

Reaktive Substanzen, die an Makromoleküle wie Proteine oder der DNA (so genannte Hämoglobin- und DNA-Addukte) binden.

3. Biomarker der Wirkung

Reaktion des Organismus auf die Belastung.

4. Biomarker der Empfindlichkeit

Nachweis von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Bestimmung der Enzymaktivität.

2.6.2.2 Akuter Metabolismus von Myosmin in Ratten

Zur Untersuchung des dosisabhängigen Metabolismus und zur Identifizierung der Myosmin-metaboliten wurde peroral mittels präparierter Apfelstücke [$5\text{-}^3\text{H}$]-Myosmin in den Dosierungen 0,001; 0,005; 0,5 und 50 $\mu\text{mol/kg KG}$ an Wistar Ratten verabreicht [88,114]. In definierten Zeitintervallen wurden Urin und Faezes gesammelt.

Selbst der in den ersten sechs Stunden gesammelte Urin enthielt kein unverstoffwechseltes Myosmin. Die applizierte Radioaktivitätsmenge konnte nach 48 Stunden fast vollständig in den Urin- und Faezesproben wieder gefunden werden. Der Anteil der Radioaktivität der auf den Urin entfiel, nahm auf über 85% bei den niedrigen Dosierungen und auf 75% bei den höchsten Dosierungen ab. Das Spektrum an Metaboliten im Urin wies primär zwei Haupt-signale auf (Abbildung 20):

- ▶ Ketosäure [4-(3-Pyridyl)-4-oxobutansäure], 50 – 63%
- ▶ 3-Pyridylessigsäure, 20 – 26%
- ▶ HPB, 1,6 – 3,1%
- ▶ 3'-Hydroxymyosmin, 1,6 – 2,4%
- ▶ 3-Pyridylmethanol, 3,1 – 5,3%

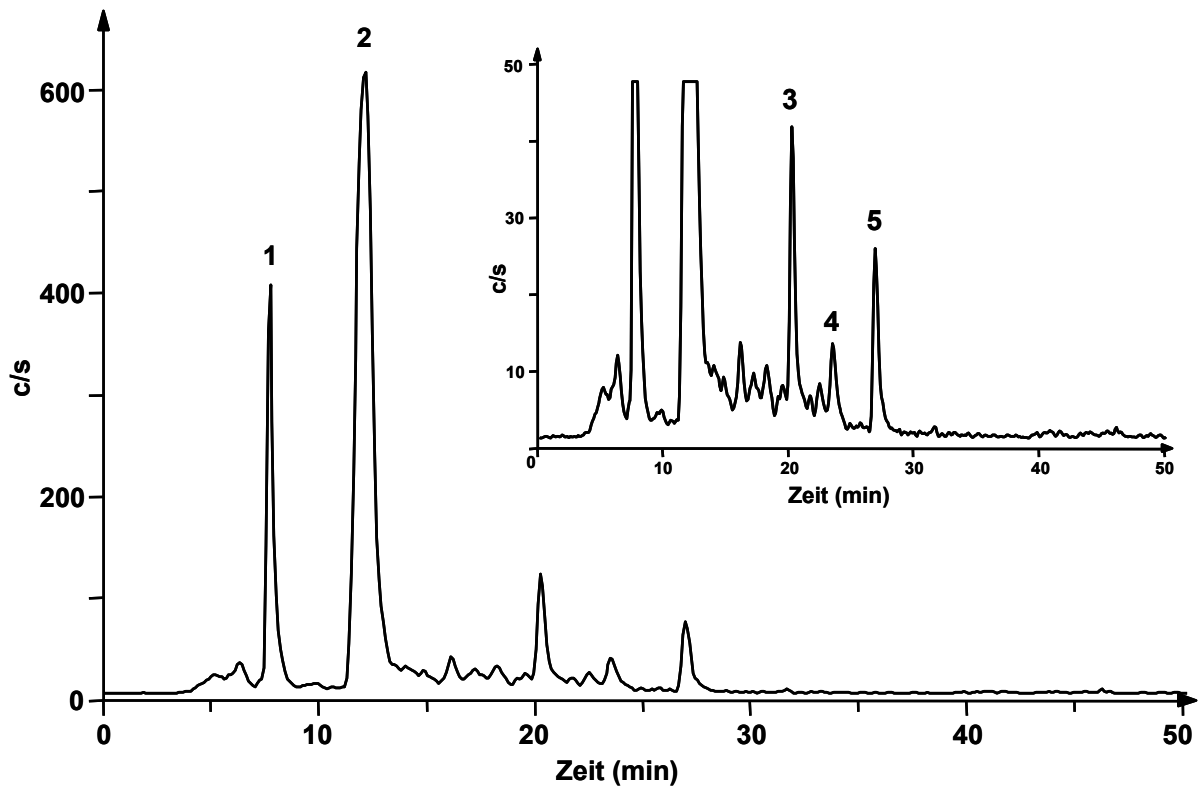


Abbildung 20: HPLC Radiochromatogramm von 0-6 h Urin einer Wistar Ratte nach oraler Gabe von ^3H -Myosmin. Die Signale 1 und 2 repräsentieren die beiden Hauptmetaboliten 3-Pyridylessigsäure bzw. Ketosäure. Drei der kleineren Signale konnten als 3-Pyridylmethanol (3), 3'-Hydroxymyosmin (4) und HPB (5) identifiziert werden [119].

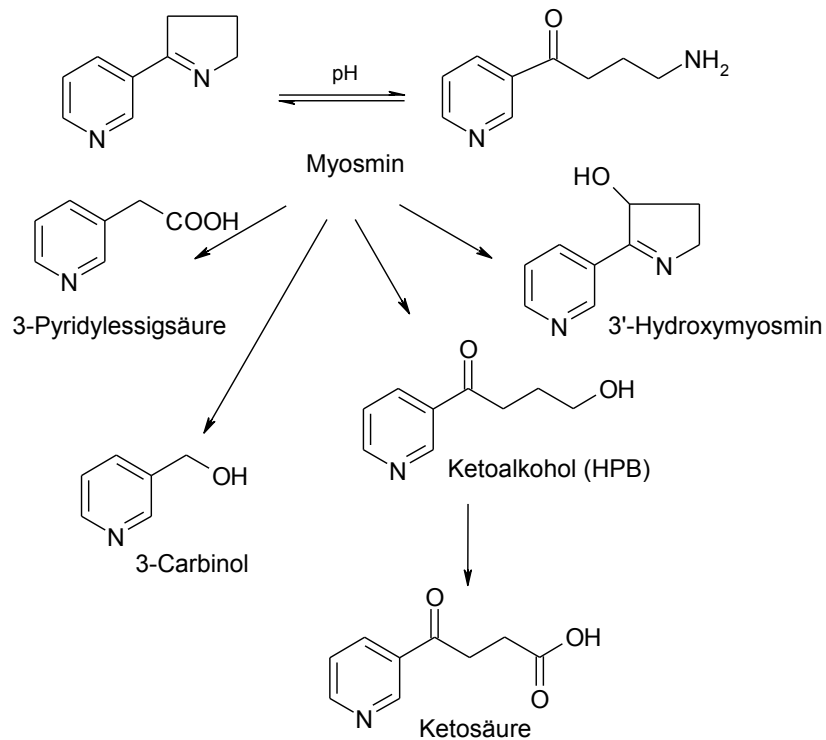


Abbildung 21: Myosminmetaboliten im Rattenurin [114].

2.6.2.3 Subakuter Metabolismus von Myosmin in Ratten

Fischer Ratten wurden bei einem Fütterungsversuch zur Aufklärung des *in vivo* Metabolismus von Myosmin vier Wochen lang mit 30 nmol/kg NNN und 3000 nmol/kg Myosmin belasteten Trinkwasser getränkt. Die Höhe der Dosierungen orientierte sich an realistischen Aufnahmebedingungen. Vergleichbar wäre die Aufnahme von Myosmin durch den ETS oder durch eine normale durchschnittliche Nahrungsaufnahme. Einige Ratten erhielten hohe Dosen, um hier genau die Metaboliten bestimmen zu können. In definierten Zeitintervallen wurden Urin und Faezes gesammelt. Am letzten Versuchstag erhielten die Ratten beide Substanzen zusätzlich in radioaktiver Form ($[5\text{-}^3\text{H}]\text{-Myosmin}$) auf einem Apfelschnitz. Urin und Faezes wurden über einen Zeitraum von 18 Std. gesammelt, die Tiere danach getötet und Blut, sowie verschiedene Organe für spätere Analysen entnommen. Die Radioaktivität wurde in Urin, Faezes und Vollblut bestimmt. Durch Radio-HPLC wurde das Metabolitenspektrum im Urin bestimmt. Myosmin wurde schnell und vollständig verstoffwechselt. Im 18 Stunden Urin wurde kein Myosmin gefunden. Es konnten alle bislang bekannten Metaboliten von Myosmin identifiziert werden [115]. 3-Pyridylessigsäure, Ketosäure und HPB sind aus anderen Metabolismusstudien gut bekannt, aber ihr gemeinsames Auftreten stellt ein Novum dar. Ebenso wie im Versuch zum akuten dosisabhängigen Metabolismus von Myosmin, sind 3-Pyridylessigsäure und Ketosäure die Hauptmetaboliten [114]. Allerdings nahm der Anteil der 3-Pyridylessigsäure nach vierwöchiger Myosmingabe ab und der Anteil von HPB und Ketosäure zu [120,121].

Tabelle 29: Gegenüberstellung der prozentualen Metabolitenanteile des akuten [88] und subakuten ($\mu\text{mol/kg KG}$) Myosmin-Stoffwechsels (MW \pm SD; akut: n = 4; subakut: n = 12).

Dosis ($\mu\text{mol/kg KG}$)	Metaboliten in Rattenurin				
	3-PAA	Ketosäure	3-Carbinol	3'-OH-Myosmin	HPB
0,5 akut	24,6 \pm 0,6	50,0 \pm 2,1	5,3 \pm 0,8	2,0 \pm 0,3	1,9 \pm 0,9
3,0 subakut	16,2 \pm 0,7	57,5 \pm 1,7	6,8 \pm 0,5	1,8 \pm 0,3	3,9 \pm 0,2

3-PAA = 3-Pyridylessigsäure; 3'-OH-Myosmin = 3'-Hydroxymyosmin

Die Ketosäure war bis zu diesen Ergebnissen nur mit dem Konsum von Tabakprodukten assoziiert und galt als weiterer Biomarker einer Tabakexposition [122]. Nachdem die Ketosäure aber einer der Hauptmetaboliten von Myosmin ist, gibt es eindeutig weitere Quellen unabhängig von Tabak und Tabakrauch für diesen Metaboliten [88,114].

3'-Hydroxymyosmin welches nach β -Hydroxylierung von Myosmin entsteht, stellt womöglich einen spezifischen Biomarker für die Myosminexposition dar, denn nach bisherigem Kenntnisstand kann es nur aus Myosmin gebildet werden. Der Fund von sehr geringen Mengen im Urin der Ratten ist vergleichbar mit den nur in Spuren im Nagetierurin vorkommenden Metaboliten des NNN, 3'- und 4'-Hydroxy-NNN [123,124]. Bislang gibt es für Myosmin noch keine Stoffwechseluntersuchungen an Primaten. Nach NNN-Gabe war im Urin von Patas-Affen der Anteil des eventuell auf ähnlichem Weg gebildeten 3'-Hydroxynorcotinins mit 16,9% der Gesamtmetaboliten erstaunlich hoch [125]. Hinsichtlich der akuten bzw. subakuten Myosmingabe zeigt 3'-Hydroxymyosmin im prozentualen Metabolitenanteil keine großen Unterschiede (Tabelle 29).

2.7 Toxizität des Myosmins

2.7.1 Akute und chronische Toxizität

Allgemein existieren zur Toxizität von Myosmin bislang wenige Daten [126,127]. Es liegt nur eine Studie für die Ermittlung des LD₅₀ von Myosmin an Ratten vor [128]. Bei oraler Gabe beträgt der LD₅₀-Wert 1875 mg/kg, dies entspricht etwa einem zehntel der toxischen Dosis von Nikotin. Bei intraperitonealer Injektion liegt der LD₅₀-Wert bei 190 mg/kg. Bei Nikotin und Myosmin stehen Konvulsionen als Vergiftungserscheinung im Vordergrund, sie sind bei Myosmin etwas schwächer ausgeprägt.

Blacklock und *Burgan* [129] injizierten 1962 Ratten nach einer Thoracotomie verschiedene Fraktionen von Zigarettenkondensaten direkt in die Lunge. Eine Suspension von 8 mg Myosmin in 0,1 ml wurde 5 Ratten in die linke Lungenhälfte injiziert. An den Injektionsstellen bildeten sich kleine fibrotische Bereiche und Rundzellinfiltrationen. Die Tiere lebten im Durchschnitt 527 Tage, in dieser Zeit entwickelten sich weder Tumoren, noch gab es Hinweise auf andere pathologische Veränderungen.

Im einzigen Versuch mit chronischer Verabreichung von Myosmin erhielten 60 zehn Wochen alte Mäuse täglich ca. 0,5 mg Myosmin über das Trinkwasser. Nach 50 Wochen überlebten nur 76% der behandelten Mäuse, aber 98% der Kontrolltiere. Eine kanzerogene Wirkung konnte nicht festgestellt werden, die Tumorraten betrug 36% in der Myosmingruppe und 32% bei den Kontrollen [127,130,131].

2.7.2 Toxische Wirkungen auf Kreislauf und Muskulatur

Bei Versuchen an Darm- und Uterusgewebe von Meerschweinchen kam es nach Applikation von 4 mg Myosmin in 50 ml Badlösung zu Kontraktionen einzelner Darmabschnitte, der

Uterus hingegen reagierte nicht [128]. Mit dem Sulfonamid Sulfathiazol konnte dieser Effekt auf den Darm wie auch bei Nikotin gehemmt werden. *Clark et al.* [132] bestätigten die kontrahierende Wirkung von Myosmin am isolierten Ileum des Meerschweinchens. Die relative Potenz (% Nik) gegenüber Nikotin (= 100%) beträgt aber nur 0,2. Vergleichsweise stärker wirkt Myosmin am isolierten *Rectus abdominis* des Froschs (% Nik = 2,5) und an Zwerchfellmuskeln des Meerschweinchens (%Nik = 11) und der Ratte (%Nik = 30). In der gleichen Arbeit wurden auch in verschiedenen Tiermodellen Effekte von intravenös verabreichtem Myosmin mit jenen von Nikotin und anderen Tabakalkaloiden verglichen (Tabelle 30).

Tabelle 30: Wirkungen von Myosmin und anderen Nebenalkaloiden des Tabaks im Vergleich zu Nikotin (= 100%) nach intravenöser Applikation in verschiedenen Tiermodellen [132].

	Myosmin	Nornikotin	Nicotyri n	Anabasi n	Cotinin
Blutdrucksteigerung in Ratten	5	20	2,5	20	< 0,1
Hemmung des Patellarreflexes in Katzen	2,5	50	17	17	< 0,05
Hemmung des Beugerreflexes in Katzen	< 2,5	50	< 10	33	< 0,05
Hemmung des Beugerreflexes in Hühnern	2,5	33	50	33	-
Hemmung des Streckerreflexes in Hühnern	2,5	25	10	20	-

Henrich [133] führte Versuche zu mikrozirkulatorischen Effekten von Nikotin und anderen Tabakalkaloiden einschließlich Myosmin an verschiedenen Geweben von Ratten durch. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen an den Gefäßen des Skelettmuskels wie auch an perfundiertem Mesenterium von Ratten getestet. An den Mesenterialgefäßen hatte Nornikotin den stärksten und Myosmin den schwächsten vasotropen Effekt (Tabelle 31).

Tabelle 31: Vasotroper Effekt der Tabakalkaloide auf die Mesenterialgefäße in Prozent relativ zu Nikotin (= 100%) [133].

Konzentration (M)	Nornikotin	Metanikotin	Dihydrometanikotin	Myosmin
10^{-5}	26	41	53	0
10^{-3}	118	181	411	25
10^{-2}	148	52	72	21
10^{-1}	49	78	58	18

Bei den Versuchen an der Skelettmuskulatur wurde den Ratten das jeweilige Tabakalkaloid in verschiedenen Dosen intraarteriell injiziert. Im Fall von Myosmin wurden ambivalente Effekte verzeichnet. Während bei niedrigen Dosen Blutfluss und Fließgeschwindigkeit zurückgingen, kam es bei hohen Dosen zu einer Steigerung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Alkaloide signifikante, vasokonstriktorische Effekte an den großen Arteriolen und an den abführenden Venolen des Mesenteriums und der Haut auslösten. Dies galt auch für den Bereich der Skelettmuskulatur. Hier lösten alle Alkaloide außer Nornikotin im präkapillaren Gebiet eine Vasokonstriktion aus. Der schwache vasokonstriktorische Effekt von Myosmin an den postkapillaren Venolen war wiederum eine Ausnahme zu den anderen Alkaloiden, die hier eine Vasodilatation der Gefäße bewirkten.

2.7.3 Effekte von Myosmin an cholinergen Rezeptoren sympathischer Ganglien

Um die Effekte von Myosmin an den cholinergen Rezeptoren beurteilen zu können, wurden Versuche an Ganglien von Ratten, *in vitro* wie auch *in vivo*, durchgeführt [134]. Für die *in vitro* Experimente wurde das *Ganglium cervicale superior* inklusive prae- und postganglionärem Nervenstrang von weiblichen Ratten exzidiert. Im Anschluss wurden diese in einen Puffer bei kontrollierter Temperatur verbracht. Daraufhin wurden an das Gewebe Elektroden angelegt um die Spannungsunterschiede bestimmen zu können. Zu Versuchsbeginn wurden die Ganglien mit Rezeptoragonisten wie Nikotin und Muskarin behandelt, anschließend wurde der Lösung dann Myosmin zugesetzt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Nach einer zweiminütigen Applikation von Myosmin kam es zu einer konzentrationsabhängigen Depolarisation, auf die aber keine Repolarisationsphase folgte (Abbildung 22).

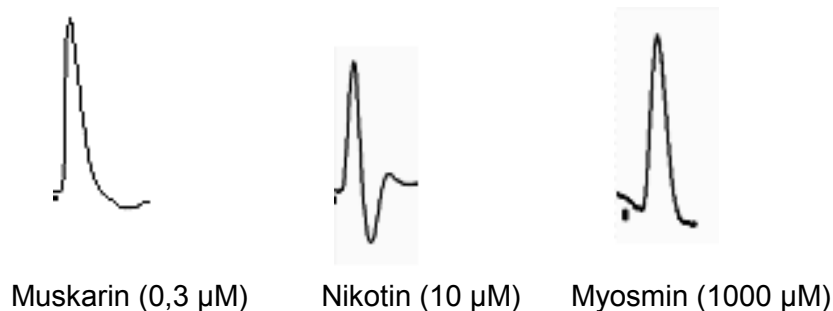


Abbildung 22: Depolarisation der Ganglien nach 2-minütiger Applikation von Myosmin, Muskarin und Nikotin [134].

- Die Depolarisation von Myosmin zeigte einen einphasigen konzentrationsabhängigen Peak mit einem EC_{50} -Wert von 3,04 mM. Die Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin und Hexamethonium (C6) hemmten die intrinsische Aktivität von Myosmin (Abbildung 23).
- Myosmin hemmte die durch Nikotin induzierte Depolarisation. Steigende Konzentrationen von Myosmin (10-300 μ M) verhinderten konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} -Wert von 18,0 μ M die Depolarisation, die durch eine 2-minütige Gabe von Nikotin (10 μ M) ausgelöst wurde (Abbildung 24). Dagegen wurde die Wirkung von Muskarin durch Myosmin nicht signifikant beeinflusst.

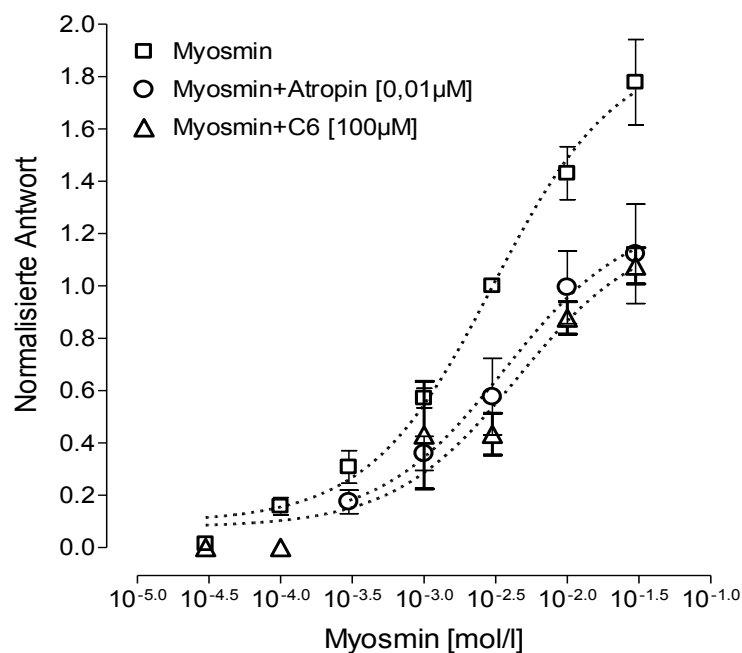


Abbildung 23: Konzentrationsabhängige Depolarisation der Ganglien durch Myosmin (30-30 000 μ M; n = 10) alleine oder in Anwesenheit von Atropin (0,010 μ M; n = 4) oder Hexamethonium (100 μ M; n = 4); MW \pm SE [134].

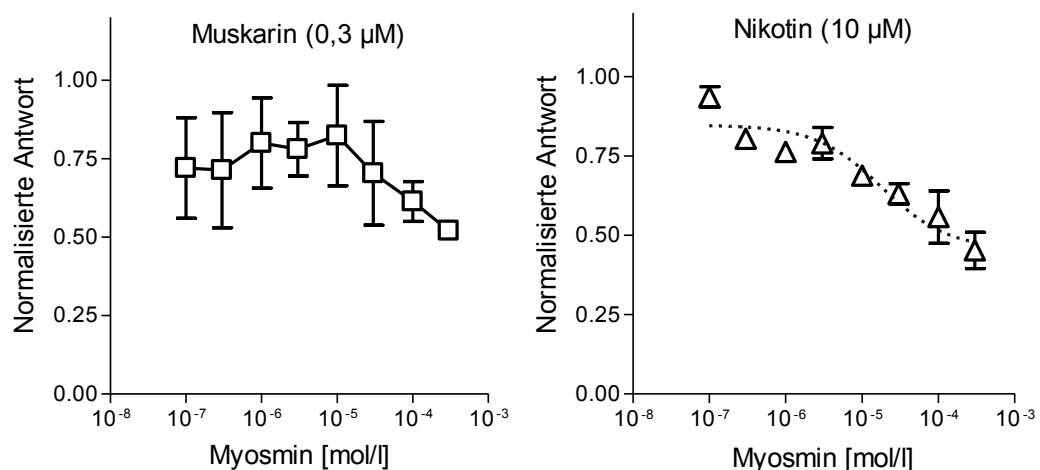


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Hemmung der Muskarin- und Nikotininduzierten Gangliendepolarisation durch Myosmin (MW \pm SE, n = 4) [134].

Diese Experimente zeigen, dass Myosmin eine partiell agonistische Wirkung sowohl am muskarinergen wie auch am nikotinergen Rezeptor hat, wobei die Wirkung am nikotinergen Rezeptor als signifikant anzusehen ist. In Konzentrationen über 100 µM induziert Myosmin eine konzentrationsabhängige Depolarisation, auf die eine schwache Hyperpolarisation folgt. Zusätzlich wird der Effekt, den Nikotin in submaximalen Konzentrationen (10 µM) am Rezeptor ausübt, von Myosmin konzentrationsabhängig blockiert. Dieser Rezeptorantagonismus von Myosmin könnte somit auch die Wirkung von Nikotin beeinflussen.

2.7.4 Toxische Wirkungen auf die Fruchtbarkeit

Bei Versuchen an Hamstern wurden von *Riveles et al.* [135] verschiedene, im Zigarettenrauch per GC/MS identifizierte Pyridine, darunter auch Myosmin, an den Eileitern der Tiere getestet. Es wurden die Oozytenaufnahme, die ziliäre Schlagfrequenz und die infundibuläre Muskelkontraktion bestimmt (Tabelle 32). Die Ergebnisse wurden in Form des LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Load) angegeben. Der LOAEL ist als die niedrigste Konzentration oder Dosis eines verabreichten chemischen Stoffes definiert, bei der im Tierexperiment noch Schädigungen beobachtet werden können. In diesen Versuchen beeinflusste Myosmin bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich nicht nur die Oozytenaufnahme in den Eileitern negativ, sondern hemmte auch die ziliäre Schlagfrequenz, wie auch auf die infundibuläre Muskelkontraktion. Einige im Zigarettenrauch vorkommende Pyridine wirkten bereits im picomolaren Bereich, während Nikotin und Cotinin nur schwach wirksam waren. Die nur in geringen Mengen im Rauch vorhandenen Nebenalkaloide, einschließlich des Myosmins könnten dementsprechend die Fruchtbarkeit einschränken.

Tabelle 32: Vergleich der Hemmwirkung von Tabakalkaloiden auf Oozytenaufnahme, ziliäre Schlagfrequenz und infundibuläre Muskelkontraktion in Eileitern von Hamstern [135].

Analyt	LOAEL (M)		
	Oozytenaufnahme	ziliäre Schlagfrequenz	infun. Muskelkontrakt.
Myosmin	$6,85 \times 10^{-9}$	$68,5 \times 10^{-8}$	$68,5 \times 10^{-8}$
2-Ethylpyridin	$9,35 \times 10^{-12}$	$9,35 \times 10^{-12}$	$9,35 \times 10^{-12}$
Cotinin	$2,84 \times 10^{-2}$	$2,84 \times 10^{-5}$	–
Nikotin	$9,01 \times 10^{-2}$	–	$6,70 \times 10^{-2}$

2.7.5 Genotoxizität von Myosmin

Als genotoxisch werden Effekte von Xenobiotika bezeichnet, die zu Veränderungen der DNA führen. Die Auswirkungen können vielfältig sein. Man unterscheidet dabei zwischen Verän-

derungen (Aberrationen) des Chromatidtyps und des Chromosomentyps. Zu den Chromatid-aberrationen gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, die beispielsweise durch alkylierende Substanzen hervorgerufen werden können. Außerdem zählen zu dieser Gruppe die Mikroläsionen, die durch elektrophile Agenzien gebildet werden. Sie führen zu Gen- oder Punktmutationen, sowie zu Austausch zwischen Schwesterchromatiden. Chromosomen-aberrationen, die wie der Name schon sagt, das Chromosom als Ganzes betreffen, führen dagegen zu Ringbildungen und azentrischen Fragmenten. Die Folgen für den Menschen hängen stark davon ab, ob die Mutationen in Körper- oder Keimzellen auftreten. Mutationen in Körperzellen werden über mitotische Teilungen auf die Tochterzellen übertragen und können u.a. zur Tumorentstehung, Atherosklerose oder anderen Altersvorgängen führen. Die Nachkommen werden von diesen genetischen Veränderungen jedoch nicht betroffen. In Keimzellen können Schäden im genetischen Material dagegen zu Erbkrankheiten und Fertilitäts-einschränkungen führen. Der Großteil der menschlichen Erbkrankheiten wird durch rezessive Gene verursacht, d.h. die Krankheit tritt nur dann auf, wenn sowohl das von der Mutter wie auch das vom Vater vererbte Gen die Mutation aufweisen. Entscheidend für die Folgen einer DNA-Schädigung ist der Zeitpunkt, an dem sie auftritt. Die Zelle hat bis zur nächsten DNA-Replikation Zeit, den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor er durch Weitergabe an die Tochterzellen fixiert wird. Außerdem führen viele Mutationen schnell zum Tod der betroffenen Zelle, so dass die Anzahl dauerhafter (persistenter) Mutationen gering bleibt [136]. Für den Nachweis genotoxischer Effekte steht eine Reihe von Testmethoden zur Verfügung. Am bekanntesten ist der bereits in den frühen 1970er Jahren von *Bruce Ames* [137] entwickelte **Ames-Test**. Hierfür werden Mutanten von *Salmonella typhimurium* eingesetzt, welche die Aminosäure Histidin nicht selbst synthetisieren können. Werden diese Bakterien auf histidin-freien Nährböden gezüchtet, können nur Bakterien überleben, bei denen eine Rückmutation dazu geführt hat, dass Histidin wieder synthetisiert wird. Diese Rückmutation kann entweder spontan auftreten oder durch mutagene Substanzen induziert werden. Nachdem den Bakterien viele fremdstoffmetabolisierende Enzyme von Säugerzellen fehlen, wird im Ames-Test durch Zugabe von aktivierenden Systemen wie Rattenleberhomogenat häufig der Metabolismus von Säugetieren simuliert. Dadurch können auch Substanzen erfasst werden, die eine metabolische Aktivierung benötigen, um mutagene Wirkung zu zeigen.

Der **Mikrokerntest** weist Chromosomenmutationen nach. Es können chromosomenbrechende (klastogene) Ereignisse und die Induktion von Fehlverteilungen (Aneuploidie) nachgewiesen werden. Mikronuklei entstehen, wenn bei der Zellteilung Chromosomenfragmente oder

ganze Chromosomen nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, sondern sich mit einer Kernmembran umgeben.

Beim **Schwesterchromatid-Austauschtest** werden die beiden genetisch identischen Schwesterchromatiden unterschiedlich (meist mit Bromdesoxyuridin) angefärbt. Die Metaphasechromosome in der zweiten Mitose nach der Färbung können dann auf Austausch zwischen den Chromatiden untersucht werden.

Mit der **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)** ist es möglich, ein ganzes Chromosom, das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder auch simultan alle Chromosomen eines Chromosomensatzes, Chromosomenenden oder einzelne Abschnitte (Gene) auf einem Chromosom zu lokalisieren. Die zu untersuchende DNA-Sequenz wird mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden angefärbt. Dadurch kann bei der Diagnose von fötalen Zellen oder Tumorzellen eine Translokation (Verlagerung eines Chromosomenabschnittes auf ein anderes Chromosom) einfach erkannt werden.

Ein weiterer Nachweis der Genotoxizität gelingt mit dem **Comet-Assay**, bei dem die DNA elektrophoretisch aufgetrennt wird. Diese 1988 von *Singh* entwickelte Methode weist die, durch biologische, chemische oder physikalische Noxen hervorgerufene DNA-Schädigung nach. Geschädigte DNA zeigt nach der Elektrophorese anstelle eines Kreises ein Bild, das aufgrund des Aussehens als Comet bezeichnet wird. Der Test kann praktisch an allen zu Einzelzellen separierbaren Geweben sowohl nach *in vitro* wie auch *in vivo* Belastung mit den Prüfsubstanzen durchgeführt werden und er eignet sich auch für das Biomonitoring als Effektmarker [138]. In seiner alkalischen Form weist der Comet-Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche nach. Einzelstrangbrüche werden schnell repariert, so dass sie kaum zu letalen oder mutagenen Schäden führen. Bei der Exzisionsreparatur entstehende kleine DNA-Fragmente, diese bilden ebenfalls einen Teil des Schweifes. Außerdem können Apyrimidin- und Apurin-Stellen nachgewiesen werden, die entstehen, wenn veränderte DNA-Basen durch Reparaturenzyme entfernt werden. Diese Stellen sind alkalilabil, so dass im stark basischen Elektrophoresepuffer Strangbrüche entstehen. Die Entfernung zwischen den DNA-Strangbrüchen liegt im Bereich von etwa 10^9 Dalton (Da), das entspricht einer Länge von 1 mm. Die Länge des Cometenschweifs beträgt jedoch nur einige Hundertstel dieser Strecke. Der Schweif wird wahrscheinlich aus so genannten Loops gebildet, die entstehen, wenn sich die „supercoiled“ DNA nach einem Strangbruch relaxiert. Je mehr Strangbrüche entstehen, umso höher ist die Anzahl der entstehenden Loops und umso mehr DNA befindet sich im Schweif. Als Maß für die Schädigung der DNA, dient das Olive Tail Moment (OTM). Es berechnet

sich aus dem Anteil der DNA im Schweif multipliziert mit der mittleren Wegstrecke der DNA. Zusätzliche Informationen lassen sich durch den Einsatz von Reparaturenzymen gewinnen. Die DNA wird nach der Lyse auf dem Gel mit läsionsspezifischen Reparaturenucleasen behandelt, die am Ort der Schädigung Strangbrüche bilden. Durch die Behandlung mit Endonuclease III können beispielsweise oxidierte Pyrimidine nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Formamidopyrimidinglykosylase (FPG) dient dem Nachweis von 8-Hydroxyguanin, das durch oxidativen Stress entsteht [138]. Die Oxidation der Basen kann zu falschen Basenpaarungen und damit zu einer Veränderung der genetischen Information bzw. Mutationen führen.

Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* *polA*⁺/*polA*⁻ beobachtet werden [139]. Ein Anstieg des spontanen Schwesterchromatidaustausches konnte in Ovarien von Hamstern nach *in vivo* Behandlung nicht festgestellt werden [140].

Mit Hilfe des Comet-Assays konnten *Kleinsasser et al.* [4] dagegen eine konzentrations- und zeitabhängige DNA-Schädigung durch Myosmin nach *in vitro* Inkubation humaner Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten zeigen (Abbildung 25).

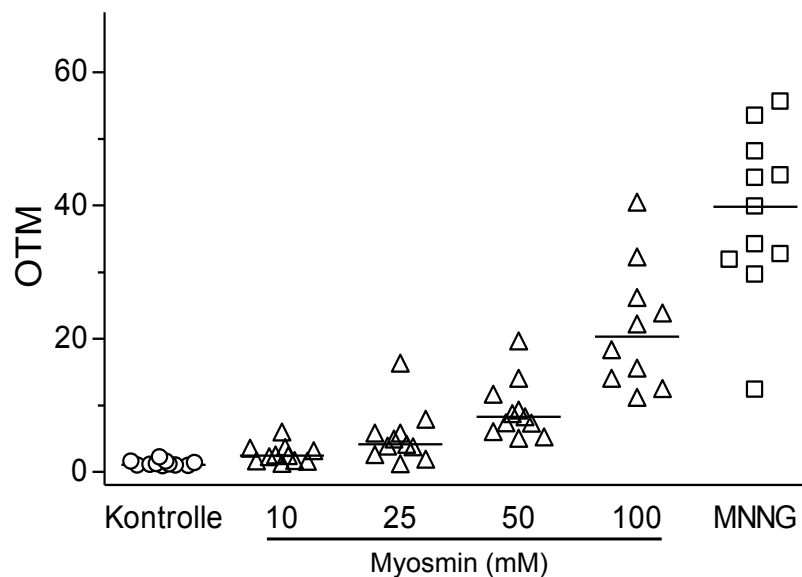


Abbildung 25: Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in humanen Nasenschleimhautzellen nach einer Stunde Inkubation mit Myosmin. Als Positivkontrolle wurde mit 0,035 mM MNNG inkubiert.

In einer weiteren Arbeit wurde die Genotoxizität von Myosmin mit Hilfe des Comet-Assays in der humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinie OE33 untersucht [5]. Bei physiologischem pH von 7,4 führte Myosmin nur zu einem sehr geringen Anstieg der im Comet-Assay nachweisbaren DNA-Schäden. Bei pH 6 bei dem Myosmin bereits leichter nitrosiert werden

kann, kommt es dagegen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Schäden, die durch oxidativen Stress mit Wasserstoffperoxid nicht beeinflusst wurden. Dagegen steigerte die Zugabe von NO• und O₂• freisetzendem 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) die Genotoxizität von Myosmin (Abbildung 26). Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der Reaktion mit NO•. Durch aufsteigende Magensäure kommt es in der Speiseröhre zu nitrosierenden Bedingungen [141,142]. Deshalb sind DNA-Schäden durch Myosmin, welches zusammen mit Nitrit im Speichel vorhanden ist, im unteren Ösophagus möglich. Dies wurde durch den Nachweis von HPB-freisetzenden DNA-Addukten bestätigt (siehe Kapitel 1.8.7).

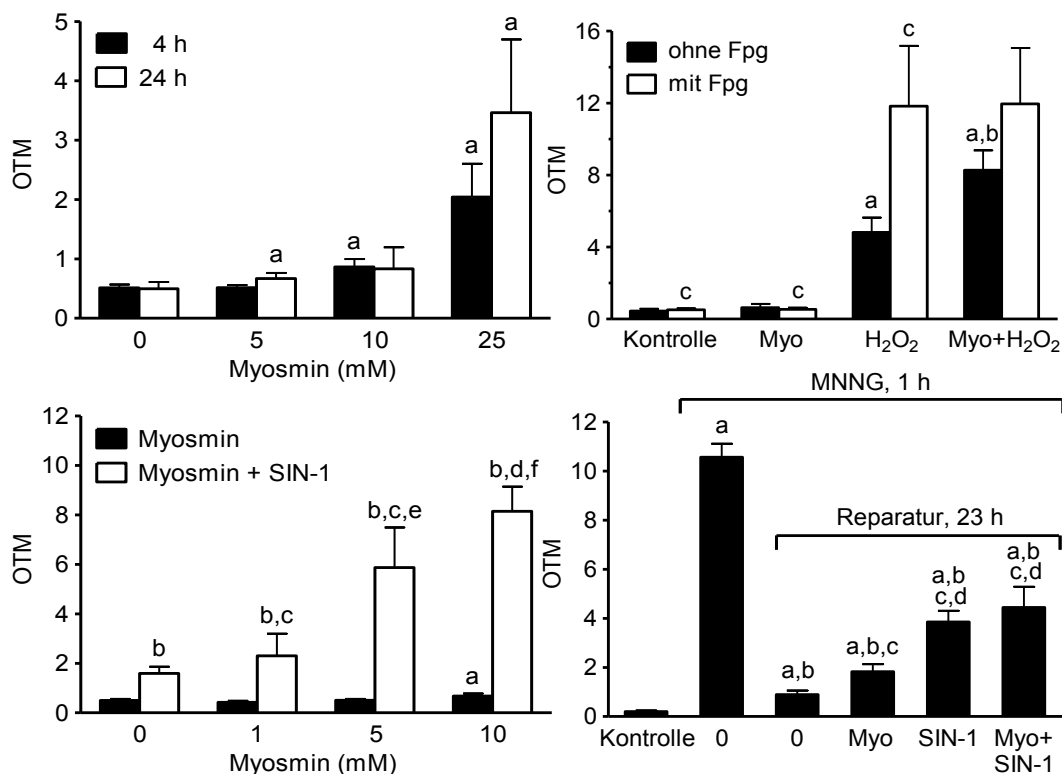


Abbildung 26: Nachweis von DNA-Schäden durch Myosmin in OE33-Zellen mit dem Comet-Assay (OTM = Olive Tail Moment, MW ± SE). Links oben: Inkubation von Myosmin bei pH 6 (a, $p < 0,05$ zur Kontrolle). Rechts oben: Inkubation mit 25 mM Myosmin und/oder H₂O₂ (a, $p < 0,001$ zur Kontrolle; b, $p < 0,01$ zu H₂O₂ alleine; c, $p < 0,05$ zur Fpg-Nachinkubation). Links unten: Inkubation mit und ohne 1 mM SIN-1 (a/b, $p < 0,05/0,001$ zur Kontrolle; c/d, $p < 0,01/0,001$ zu Myosmin alleine; e/f, $p < 0,01/0,001$ zu SIN-1 alleine). Rechts unten: 23 h Inkubation mit 10 mM Myosmin und/oder 1 mM SIN-1 nach 1 h Inkubation mit 1 µM MNNG (a, $p < 0,05$ zur Kontrolle; b, $p < 0,05$ zu 1 h MNNG; c, $p < 0,05$ zu Reparatur alleine; d, $p < 0,05$ zu Myosmin alleine).

In diesem Zusammenhang ist ein weiteres interessantes Ergebnis, dass die Reparatur methylierter DNA durch Myosmin gehemmt wird. Dazu wurden die Zellen zuerst eine Stunde mit dem direkt methylierenden *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) inkubiert. Anschließend gab man den Zellen 23 Stunden Zeit, die entstandenen Schäden in MNNG freien Medium zu reparieren. Das Ergebnis lässt vermuten, dass Myosmin zur Bildung von

DNA-Addukten führt, die von dem Suizidenzym O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) als Substrat erkannt werden und so die Reparaturkapazität der Zelle schwächen.

2.8 Nitrosamine

Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure. Unter Einwirkung von Stickoxiden nitrosieren primäre und sekundäre Amine wiederum unabhängig von der Basizität des Amins [143]. Die eigentliche Reaktion erfolgt dabei über das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenide. Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich die Ausbeute über den Anteil des aktiven Nitrosierungsagens steuern. Das Ausbeuteoptimum befindet sich im Bereich eines pH-Werts von 3,0 bis 3,5. Ein niedrigerer pH-Wert würde zu einer Protonierung des Stickstoffs des sekundären Amins zum Iminiumion führen und eine Reaktion mit nitrosierenden Substanzen behindern. pH-Werte jenseits von 5 hingegen unterbinden weitgehend die säurekatalysierte Nitrosierung (Abbildung 27).

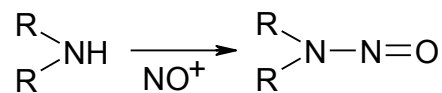


Abbildung 27: Schema der Nitrosierung.

Die Nitrosaminbelastung des Menschen setzt sich aus diversen Faktoren zusammen. Auf der einen Seite werden vom menschlichen und tierischen Körper in allen Bereichen des täglichen Lebens Nitrosamine zusammen mit anderen Giftstoffen aufgenommen, zum anderen besteht im Organismus selbst die Möglichkeit der endogenen Nitrosierung von Substanzen.

2.8.1 Endogene Nitrosaminbelastung

Es ist prinzipiell davon auszugehen, dass Amine im menschlichen Organismus durch endogene Nitrosierung dieselben Nitrosamine bilden, die sich auch *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen darstellen lassen. Die *in vivo* Bildung von Nitrosaminen im Menschen wurde erstmals von *Ohshima* und *Bartsch* im Jahr 1981 belegt [144]. Sie wiesen bei einem nüchternen Mann, dem Nitrat und L-Prolin verabreicht wurde, *N*-Nitrosoprolin (NPRO) im 24 h Urin nach. NPRO ist kein kanzerogenes Nitrosamin, seine Bildung wird aber auch heute noch als Indikator für die Nitrosierungskapazität des Magens angesehen. Die chemische Nitrosierung findet beispielsweise im sauren pH-Milieu des Magens statt, wenn Amine als nitrosierbare Vorstufen und Nitrit oder Stickoxide vorhanden sind. Der Nitritgehalt im Magen lässt sich hauptsächlich auf das mit der Nahrung aufgenommene Nitrat zurückführen. Dieses wird vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu 25% mit Hilfe eines Anionentransporters in

den Speichel abgesondert [145,146]. In der Mundhöhle wird durch Bakterien mehr als 20% des Speichelnitrats, also 5% der aufgenommenen Menge, zu Nitrit reduziert. Dieses wird nahezu komplett mit dem Speichel geschluckt und stellt so die Hauptquelle (80%) für Nitrit im Magen dar [147]. Auch gibt es verschiedene Bakterienstämme wie *Escherichia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* oder *Proteus*, welche die Reaktion zum Nitrosamin aus Nitrat bzw. Nitrit und Amin katalysieren [148-151]. Es wird eine Beteiligung bakterieller molybdänhaltiger Enzymsysteme diskutiert [152]. Diese Vorgänge werden als mögliche Risikofaktoren für Magenkrebs bei Patienten mit Achlorhydrie (optimale Wachstumsbedingungen für Bakterien des Verdauungstraktes) und für Blasenkrebs bei Patienten mit chronischer Harnwegsinfektion angesehen. Eine Blasen- oder Harnwegsinfektion sowie eine mangelhafte Mundhygiene können zu einer zusätzlichen bakterienvermittelten Nitrosaminexposition führen [153]. Die durchschnittliche Nitritkonzentration im Magensaft eines nüchternen Menschen liegt bei pH-Werten < 5 im Bereich von 0,1 bis 2,6 μM und erreicht bei pH-Werten >5 Konzentrationen von 26 bis 54 μM [154]. Dieses Nitrit wird allerdings beim Gesunden durch aktive Sekretion von Ascorbinsäure über Redoxreaktionen ständig abgebaut [155,156].

Ein Entzündungsgeschehen kann ebenfalls für die endogene Bildung von Nitrosaminen verantwortlich sein. Entzündungszellen in chronisch infizierten Geweben bilden große Mengen an Stickoxiden. Im Rahmen der Immunstimulation werden diese durch Makrophagen und Neutrophile induziert. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion der endständige Guanidino-Stickstoff des L-Arginins zu Citrullin oxidiert und dabei NO freigesetzt. Dieses dient als Vasodilatator in den Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch in großem Überschuss produziert wird, reagiert der überwiegende Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien N_2O_3 und N_2O_4 [144,157].

2.8.2 Exogene Nitrosaminbelastung

Die bedeutendsten Quellen für die exogene Nitrosaminbelastung stellen nach dem Rauchen, Tabakschnupfen und -kauen [9], die Nahrungsmittel, Kosmetika und die berufsbedingte Expositionen dar [158]. In Nahrungsmitteln macht das starke Kanzerogen *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) den größten Anteil aus, außerdem sind *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin von Bedeutung. Neben diesen flüchtigen Nitrosaminen finden sich ferner auch wenig bis nicht kanzerogene, nichtflüchtige Nitrosamine, beispielsweise *N*-Nitrososarcosin, *N*-Nitrosoprolin und *N*-Nitrosothiazolidincarbonsäure in Lebensmitteln [159].

Der Gehalt an Nitrosaminen in Nahrungsmitteln kann von 10 bis zu einigen tausend µg/kg reichen [160]. Wesentliche Quellen sind Bier, Fisch, Fleisch und Käse. Lebensmittel enthalten zum Großteil nichtflüchtige Nitrosamine, wie z.B. *N*-Nitrososarcosin, *N*-Nitrosoprolin, *N*-Nitrosothiazolidincarbonsäure. Der Großteil der nicht flüchtigen Substanzen ist noch nicht identifiziert, was die Ermittlung der Exposition erschwert. Sie stellen den größten Anteil unter den Nitrosaminen in Lebensmitteln dar [159]. Mit der Nahrung nehmen die Menschen in Westeuropa durchschnittlich 0,5 µg Nitrosamine pro Person und Tag auf [152]. In gepökelten Fleisch- und Wurstwaren sowie in geräuchertem Fleisch und Fisch können besonders hohe Mengen gefunden werden. Das „Nitritpökelsalz“ verleiht dem Fleisch seine typische Farbe, indem Myoglobin im sauren Milieu zum roten Nitrosomyoglobin umgesetzt wird. Das Lebensmittelrecht regelt über die Zusatzstoffzulassungsverordnung die Anwendung von Nitriten und Nitraten für Fleischerzeugnisse und den Zusatz von Hemmstoffen wie Ascorbinsäure, um die Nitrosaminbelastung zu verringern [161]. Flüchtige Nitrosamine können sowohl durch Nitrosierung der zugehörigen Amine, als auch bei der Zubereitung der Nahrungsmittel, in Form von Kochen und Braten, durch thermische Decarboxylierung nichtflüchtiger Nitrosamine entstehen [162]. Die häufigsten Vertreter der flüchtigen Nitrosamine sind NDMA, *N*-Nitrosopyrrolidin und *N*-Nitrosopiperidin [163]. Diese Verbindungen sind potente Kanzerogene. Zu Beginn der achtziger Jahre sorgte die Entdeckung von NDMA im Bier in ppm-Mengen für Aufsehen. Als Ursache konnte die Verwendung von Ölbrennern zum Trocknen von Malz ausgemacht werden. Diese neuartige Technologie, die zur Erzielung einer besseren Wärmeausbeute eingeführt wurde, setzte das Malz unmittelbar NO-haltigen Abgasen aus. Durch Reduktion der Temperatur am Ölbrenner und Umstellung der Trocknung auf eine indirekte Wärmeübertragung konnte dieses Problem behoben werden [164]. Die Bedeutung von Rückständen in der Nahrung durch Einsatz von Pestiziden oder Tierarzneimitteln wird eher gering eingeschätzt.

2.8.3 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)

Der Nikotingehalt der Tabakblätter beträgt circa 1% bis 8%, selten bis zu 15%. Der Anteil an Nitrosaminen im Tabak ist etwa um den Faktor 3.000 bis 300.000 kleiner. Bisher wurden 7 tabakspezifische Nitrosamine, die durch die Nitrosierung der Tabakalkaloide entstehen, im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert: *N'*-Nitrosoornikotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), *N'*-Nitrosoanatabin (NAT), *N'*-Nitrosoanabasin (NAB), 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (*iso*-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC).

NNN entsteht hauptsächlich durch die Nitrosierung von Normikotin, in geringerem Ausmaß durch Nitrosierung von Nikotin-*N*-oxid [165,166]. Neuesten Untersuchungen zufolge kann auch Myosmin sehr effektiv zu NNN nitrosiert werden [167,168] (siehe Abschnitt 1.7.4.6). Als Hauptentstehungsweg von NNK wurde von *Caldwell et al.* [169] der mikrobielle Abbau von Nikotin-*N*-oxid zu Pseudooxynikotin diskutiert, weil letzteres schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird. Die enzymatische Reduktion der Ketogruppe bei NNK führt zu einem weiteren Nitrosamin, dem NNAL. NAT und NAB entstehen analog zu NNN durch direkte Nitrosierung der Tabakalkaloide Anatabin und Anabasin.

Von allen tabakspezifischen Nitrosaminen konnte NNA bisher nicht im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert werden. Wegen der hohen Reaktivität der Aldehydgruppe geht man von einer raschen Weiterreaktion zu *iso*-NNAC und *iso*-NNAL aus (Abbildung 28) [170].

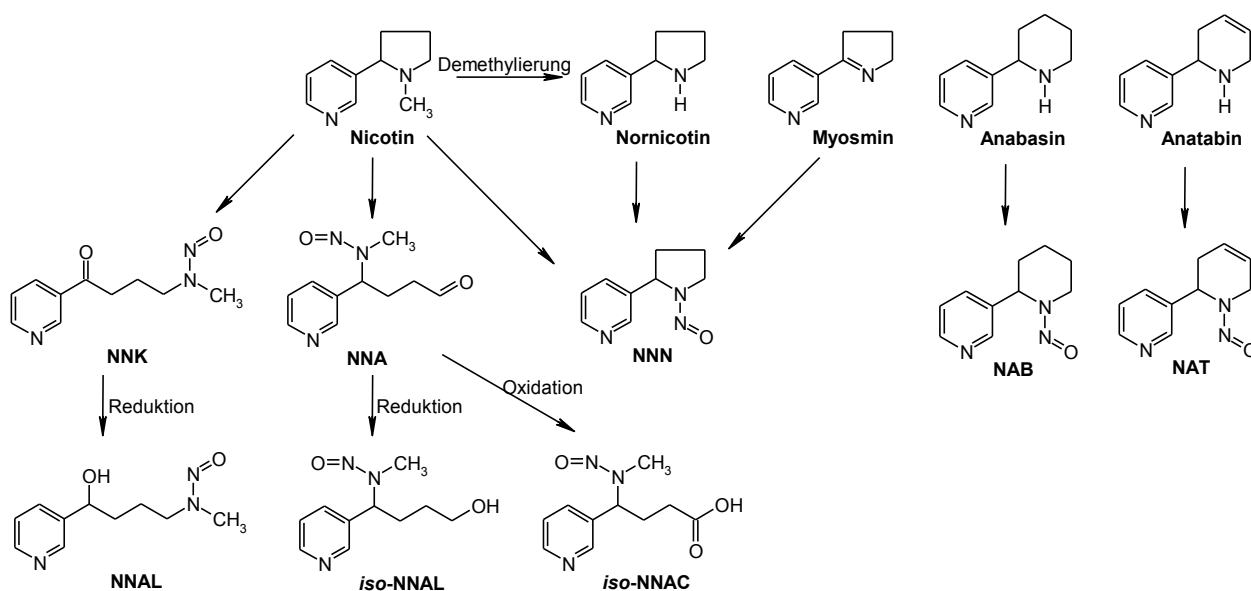


Abbildung 28: Bildung der TSNA (in Abwandlung nach *Hoffmann et al.* [171]).

Die grünen, jungen Blätter der Tabakpflanze enthalten nur geringe Spuren an Nitrosaminen, der maßgebliche Teil entsteht beim Trocknen und Fermentieren der Blätter sowie während der Alterung des Tabaks [172-174]. Der Gehalt an Nitrosaminen ist abhängig von der Alkaloid- und Nitratkonzentration in den Tabakblättern sowie von den Prozessbedingungen der einzelnen Herstellungsstufen [174-176]. Es konnte gezeigt werden, dass die Art der Trocknung entscheidenden Einfluss auf die TSNA-Gehalte im Tabak haben kann. In der Sonne getrocknete orientalische Tabake enthalten deutlich weniger TSNA als die amerikanischen Tabaksorten [177]. In vielen modernen Trockenschuppen Nordamerikas wird flüssiges Propangas mit direkt gefeuerten Brennöfen verwendet, wodurch die bei der Verbrennung entste-

henden Gase direkt in den Trockenschuppen geleitet werden und der Tabak dann diesen Gasen ausgesetzt wird. Insbesondere das bei der Verbrennung NO_x reagiert mit den natürlich vorkommenden Tabakalkaloiden unter Bildung von TSNA bilden. Auf einem Wärmeaustausch beruhende Trocknungsmethoden verhindern, dass der Tabak Verbrennungsgasen und Nebenprodukten ausgesetzt ist und eliminieren somit diese bedeutende Quelle der TSNA Bildung [174]. Auch die gewählten Bedingungen bei der Fermentierung fallen ins Gewicht. Daher finden sich beispielsweise besonders hohe Nitrosamingehalte im Schnupftabak [178].

Einen Überblick über die Konzentrationen der bedeutsamsten TSNA in diversen Tabakprodukten zeigt Tabelle 33.

Tabelle 33: TSNA-Konzentrationen in Tabakprodukten der USA und UK [178,179].

Tabakprodukt	Tabakspezifische Nitrosamine (ppm)		
	NNN	NNK	NAT und NAB
Schnupftabak (feucht)	3,1-135	0,1-13,6	0,64-339
Kautabak	0,6-8,2	0,38	2,4
Zigaretten	0,6-7,9	0,1-1,3	0,5-5,8
Zigarren	3,0-10,7	1,1-3,5	2,5-33
Pfeifentabak (UK)	3,0	0,6	20,5

2.8.4 Metabolismus und Organspezifität von NNK und NNN

Bei Betrachtung der Organospezifität der Tumorigenese der TSNA muss klar zwischen den untersuchten Spezies, den Dosierungen und dem untersuchten Nitrosamin unterschieden werden, da es sonst leicht zu Fehlinterpretationen kommen kann. **NNK** gilt als potenter selektiver Auslöser von Adenokarzinomen der Lunge. Eine Vielzahl von Arbeiten berichten von der Bildung von Lungentumoren durch NNK unabhängig vom Applikationsweg und von der Tierart (Ratte, Maus, Goldhamster, Frettchen). Auch das Auftreten von Tumoren in Leber und Nasenhöhlen ist unabhängig vom Applikationsweg. Der Pankreas ist dagegen nur nach oraler Applikation als Zielorgan betroffen [180].

NNN ist dagegen nur bei Mäusen ein Lungenkanzerogen, bei Ratten ein Kanzerogen für Speiseröhre und Nase und bei Hamstern für Kehlkopf und Nase. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass auch beim NNN die Zielorgane vom Applikationsweg abhängen. Während die subkutane Gabe nahezu ausschließlich zu Nasentumoren führte, erzeugte die perorale Verabreichung Tumoren in der Nase und im Ösophagus [181-183].

Zur Untersuchung des Metabolismus wurden verschiedene Tierarten, Mikrosomen, Gewebeschnitte und Gewebekulturen vom Menschen verwendet. Dadurch konnten die unterschiedlichen Hauptstoffwechselwege in den verschiedenen Organen charakterisiert und quantifiziert werden.

Beim NNK unterscheidet man drei Hauptwege des Metabolismus (Abbildung 29). Durch Carbonylreaktion entsteht NNAL, welches direkt oder nach Glukuronidierung im Urin ausgeschieden wird. Beide Nitrosamine können am Pyridinstickstoff oxidiert werden, es entstehen die nicht kanzerogenen *N*-Oxide, die ebenfalls im Urin auftauchen. Die toxikologisch bedeutendste Reaktion ist die α -Hydroxylierung am Methyl und Methylenkohlenstoff. Tabelle 34 zeigt die Schwerpunkte des Metabolismus von NNK für Leber und Lunge unter Betrachtung der vier Spezies Ratte, Hamster, Maus und Mensch.

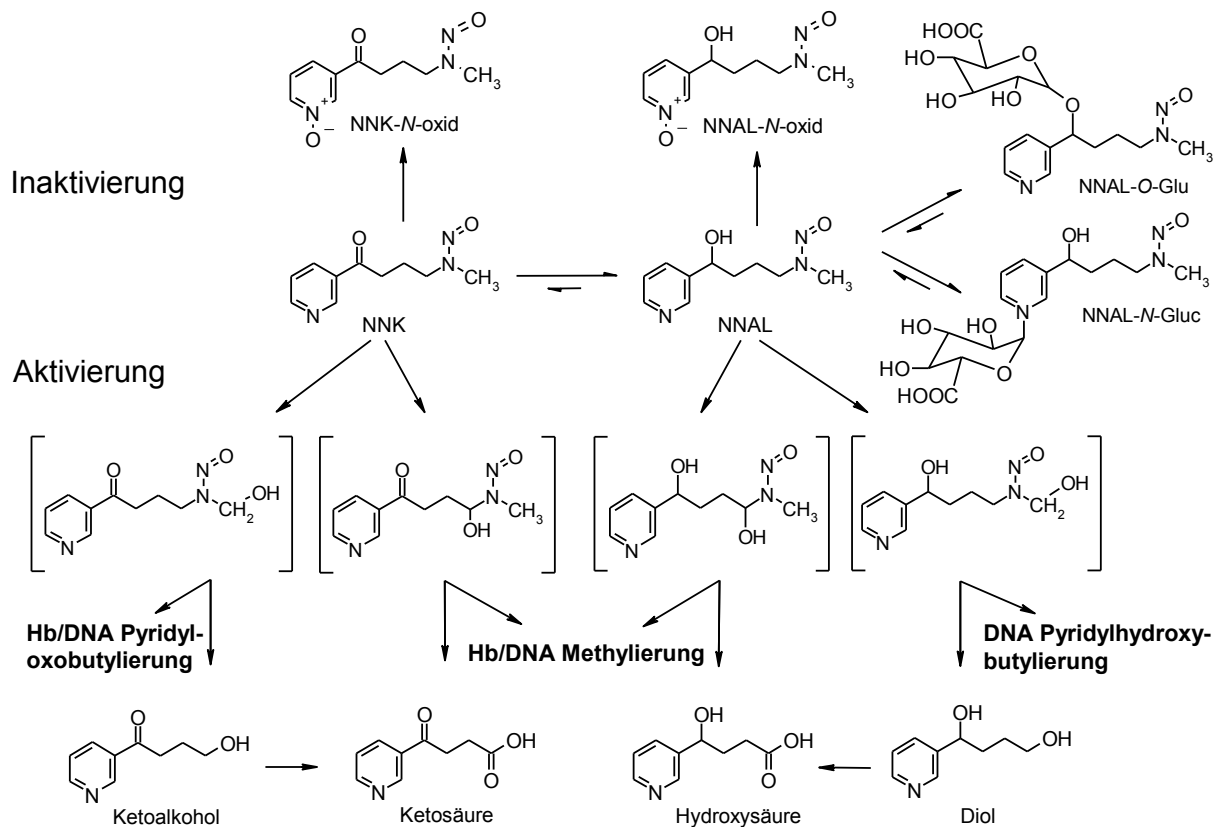


Abbildung 29: Schema des NNK-Metabolismus (modifiziert nach Hecht 1998) [180].

Aus Tabelle 34 lässt sich entnehmen, dass die Aktivierungswege durch α -Hydroxylierungen von NNK beim Menschen weniger stark ausgeprägt sind, als bei den betrachteten Tierspezies. Da für die Aktivierung der Hydroxylierungsreaktionen zusätzlich bei jeder Spezies andere Cytochrom-P450-Isoenzyme zuständig sind, stellt dies die Effektivität der Chemopräventionsuntersuchungen an Tieren bzw. deren Übertragbarkeit auf den Menschen in Frage.

Tabelle 34: Hauptstoffwechselwege von NNK (nach Hecht, 1998).

Gewebe	Spezies	Carbonyl- reduktion	Pyridin-N- Oxidation	α -Methylen- Hydroxylierung	α -Methyl- Hydroxylierung
Leber	Ratte	+++	+	++	++
	Hamster	+++	++	+	++
	Maus	+++	-	++	++
	Mensch	+++	+	++	++
Lunge	Ratte	++	+++	++	++
	Hamster	++	++	+	+++
	Maus	++	+++	++	++
	Mensch	+++	-	+	+

Beim NNK entstehen unter α -Hydroxylierung in einer Reaktionskaskade letztendlich sowohl Methyl- als auch Pyridyloxobutyladdukte. Die Größenordnungen ihres Auftretens sind in Tabelle 35 aufgeführt und zeigen die große Menge und Bedeutung der Pyridyloxobutyladdukte (HPB-Addukte) im Verhältnis zu Methylierungsaddukten, die auch durch eine Vielzahl anderer Kanzerogene erzeugt werden [24]. Neueste Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass auch eine Pyridylhydroxybutylierung unter Bildung von PHB-Addukten stattfindet [184]. Die Unterschiede zwischen Mensch und Nagern zeigen sich auch in der Metabolitenausscheidung im Urin. Während Nager bei niedrigen Dosen praktisch kein NNAL und NNAL-Glucuronid ausscheiden, werden diese Metaboliten in überraschend hohen Mengen im menschlichen Urin gefunden und erfolgreich für das Biomonitoring eingesetzt [185]. Man hat geschätzt, dass ein Raucher mindestens 50% des NNK aus dem Zigarettenrauch in Form dieser Metaboliten ausscheidet [186]. Eine annähernd ähnliche Metabolisierung wurde nur beim Affen gefunden [187,188]. Metaboliten der NNK- α -Hydroxylierung entziehen sich dem spezifischen Nachweis für eine NNK-Belastung, da diese auch von NNN, vor allem aber auch von Nikotin herrühren können [180].

Tabelle 35: Vergleich einzelner Addukt mengen durch α -Hydroxylierung von NNK in verschiedenen Geweben [180].

Spezies	Organ	Relative Adduktgehalte
F-344-Ratte	Lunge	7-Methylguanin > HPB > O ⁶ -Methylguanin > O ⁴ -Methylthymidin
	Nasenmucosa	7-Methylguanin > O ⁶ -Methylguanin > HPB
	Leber	7-Methylguanin > HPB > O ⁶ -Methylguanin > O ⁴ -Methylthymidin
A/J-Maus	Lunge	7-Methylguanin > HPB > O ⁶ -Methylguanin > O ⁴ -Methylthymidin

Die NNN-Aktivierung durch α -Hydroxylierung unterscheidet sich von der für NNK grundsätzlich dadurch, dass keine Methylierungsaddukte gebildet werden können (Abbildung 30). Die 2- und 5-Hydroxylierungen im Pyrrolidinring ergeben die von NNK bekannten HPB- und

HPB-Addukte. Weitere charakteristische Reaktionen im NNN-Metabolismus sind die Pyridin-*N*-Oxidation und die Bildung von Normikotin. Die 3- und 4-Hydroxylierung im Pyrrolidinring wie auch die Bildung von Myosmin und *iso*-Myosmin spielt eine untergeordnete Rolle. Zum NNN-Stoffwechsel im Menschen liegen bisher noch wenige Informationen vor. Anreicherungen von HPB-Addukten unter NNN-Einwirkung sind für die Nasenmucosa und den Ösophagus von Ratten beschrieben und werden mit dem starken Hydroxylierungspotential dieser Gewebe erklärt [189,190]. Insbesondere im Ösophagus zeigte sich hier eine deutlich intensivere Bildung von HPB-Addukten durch NNN als durch NNK [189]. Weiterhin werden HPB-Addukte für Leberzell- und Lungenzell-DNA von NNN behandelten Mäusen berichtet [190-192].

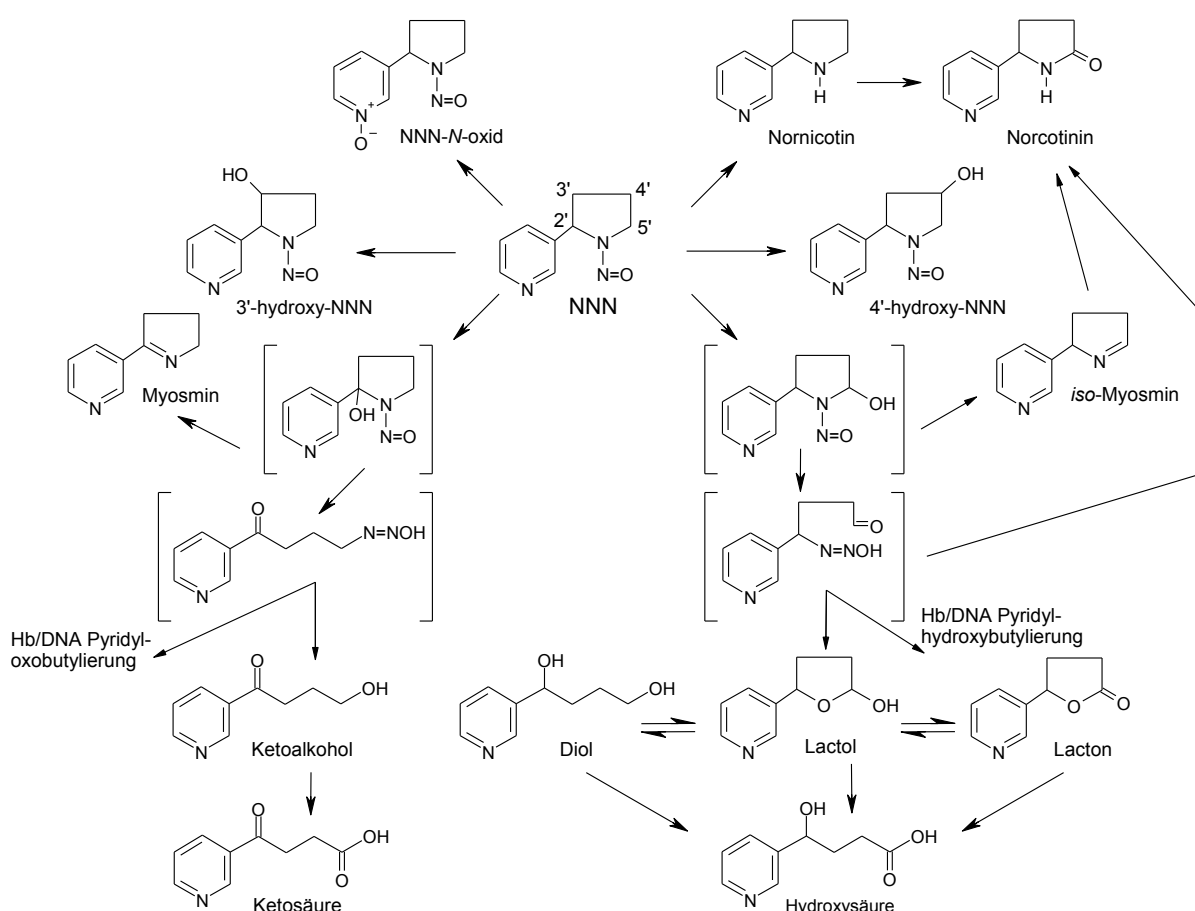


Abbildung 30: Schema des NNN-Metabolismus (modifiziert nach Hecht 1998) [180].

2.8.5 Nitrosierung von Myosmin

Die Nitrosierung von Myosmin *in vitro* wurde erstmalig in einer Veröffentlichung von Zwickenpflug [167] detailliert beschrieben. Er untersuchte die direkte Nitrosierung von Myosmin mit N_2O_3 in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5,5 bis 9. Es resultierte ein Reaktionsgemisch, das in Abhängigkeit vom pH-Milieu zu unterschiedlichen Anteilen aus NNN und HPB bestand. Die Bildung dieser Nitrosierungsprodukte konnte von Zwickenpflug

außerdem in humanem Magensaft nach Zusatz von Myosmin und NaNO_2 nachgewiesen werden. Eine Erklärung liefert das zuvor beschriebene reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Unter sauren Bedingungen hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketonform, und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, das *in situ* wahrscheinlich zum Ketoalkohol zerfällt. Höhere pH-Werte begünstigen dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins. Weitere ausführliche Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Myosmin-Nitrosierung mit radioaktiv markiertem Myosmin zeigten überraschenderweise auch eine Zunahme der NNN-Bildung bei pH-Werten unter 2. Hier wurde sogar mehr NNN als HPB gebildet [168]. Für die Bildung reaktiver Zwischenprodukte scheint der direkte Weg zum Ketoalkohol von besonderer Bedeutung zu sein. Während das NNN zur Bildung reaktiver Produkte eine metabolische Aktivierung benötigt, entsteht das HPB bei der Nitrosierung von Myosmin direkt über eine instabile Zwischenstufe (Abbildung 31). Das hierbei wahrscheinlich auftretende reaktive Diazohydroxid ist als starkes Elektrophil in der Lage, nicht nur mit Wasser zum HPB, sondern auch mit zellulären Makromolekülen kovalente Bindungen einzugehen. Dies wurde mit radioaktiv markiertem Myosmin in Nitrosierungsansätzen an Kalbsthymus-DNA nachgewiesen [168].

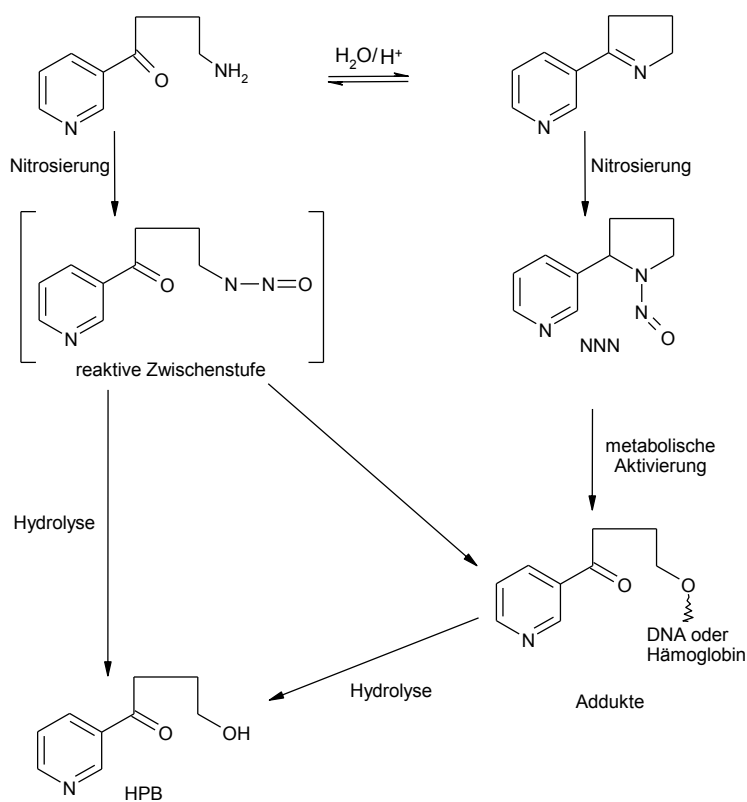


Abbildung 31: pH-abhängige Nitrosierung von Myosmin [167].

In neueren Versuchen zur Nitrosierung von Myosmin bestätigten *Hecht et al.* [193] die Bildung von HPB im sauren Milieu. Bei pH 3,5 fanden sie ein neues Produkt, 3'-Oximinomyosmin, aber kein NNN. Während bei pH-Werten unter 4 möglicherweise NNN mit dem neuen Produkt verwechselt wurde, ist bei höheren pH-Werten die NNN-Bildung aus der geschlossenen Myosminform eher wahrscheinlich.

2.8.6 Peroxidierung von Myosmin

Im Hinblick auf die hohe chemische Reaktivität von Myosmin, begründet in seiner Iminstruktur, ist die Peroxidation ein weiterer Aktivierungsweg. Bei der *in vitro* Peroxidierung wurde Myosmin in eine Mischung von Wasserstoffperoxiden und Essigsäureanhydrid gebracht. Im Anschluss wurde die Lösung 30 min mit Ultraschall behandelt. Die Produkte wurden anhand HPLC/UV und GC/MS analysiert. Neben unverändertem Myosmin wurden 3-Pyridylessigsäure, Ketosäure, 3-Pyridylmethanol, HPB und Nornikotyrin identifiziert. Diese Peroxidation sollte auch *in vivo* ablaufen. Somit könnte es nicht nur durch Nitrosierungsvorgänge, sondern auch durch Peroxidationsreaktionen zur Bildung von HPB-Addukten kommen (Abbildung 32).

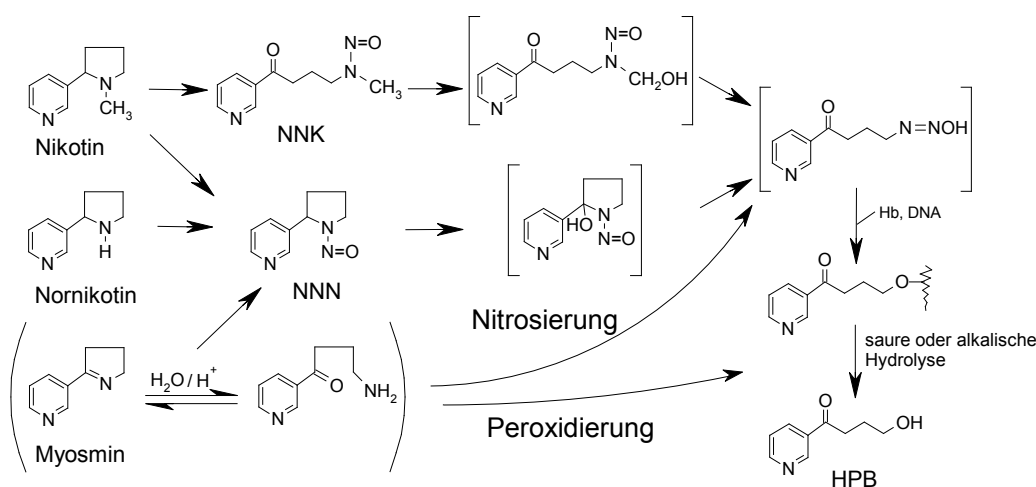


Abbildung 32: Aktivierung von TSNA und Myosmin zu HPB-freisetzenden Addukten [168,180,194].

2.8.7 Adduktbildungen

2.8.7.1 Hämoglobinaddukte

Die Grundlage für die Bestimmung von kovalenten Proteinaddukten zur Erfassung der Exposition des Menschen mit Kanzerogenen wurde von *Ehrenberg* und Mitarbeitern in den 1970er Jahren gelegt [195]. An Proteine als Biomarker werden diverse Anforderungen gestellt. Hierunter fallen die chemische Stabilität des Adduktes unter biologischen Bedingungen, die hinreichende Stabilität des Proteins, die durch die Adduktbildung nicht beeinträchtigt werden

darf, sowie eine leichte Zugänglichkeit für epidemiologische Studien. Außerdem sollte eine Korrelation zwischen Protein- und DNA-Dosis bestehen und die Verfolgung über einen längeren Zeitraum hinweg praktikabel sein. Recht schnell wurde festgestellt, dass Hämoglobin viele dieser Vorteile in sich vereinigt, so dass es als bevorzugtes Protein für die Entwicklung von analytischen Methoden des Biomonitoring eingesetzt wurde [196,197]. Die Bildung von Addukten ist für Hämoglobin im Normalfall kein toxikologisch relevantes Ereignis, stellt aber ein Maß für die stattgefundenene Aktivierung des Kanzerogens dar. Häufig besteht eine Korrelation zwischen Hämoglobin- und DNA-Addukten. Daher werden Hämoglobinaddukte auch als „Surrogatmarker“ für genotoxische Schäden bezeichnet. Hämoglobin besitzt mit durchschnittlich 120 Tagen eine relativ lange Lebensdauer, so dass bei einer chronischen Belastung mit Kanzerogenen eine Aussage zur kumulativen Exposition über den Zeitraum der Lebenszeit der Erythrozyten getroffen werden kann. Bildet das Kanzerogen ein stabiles Addukt, so wird die Menge des Adduktes proportional zum Lebensalter des Hämoglobins sein: 120 Tage alte Hb-Moleküle werden 120mal so hohe Adduktkonzentrationen besitzen wie die Hb-Moleküle, die nur einen Tag alt sind. Der durchschnittliche Wert beträgt die Hälfte der Maximalkonzentration und damit in etwa das 60-fache der täglichen Dosis des Kanzerogens, selbst dann, wenn dessen Zufuhr unregelmäßig erfolgt [198]. Häufig werden die reaktiven Elektrophile jedoch nicht im Erythrozyten selbst gebildet, wie dies bei *N*-Hydroxylaminen der aromatischen Aminen der Fall ist, sondern müssen aus den Zellen, in denen der aktivierende Metabolismus stattfindet, erst in die Erythrozyten einwandern. Dies setzt eine ausreichende Stabilität und Lipophilie der ultimalen elektrophilen Form des Kanzerogens voraus.

Weitere Vorteile des Einsatzes von Hämoglobin im Rahmen eines Biomonitorings bestehen darin, dass es im Blut in großen Mengen (120-160 mg/ml) präsent ist und in der leichten Zugänglichkeit, was insbesondere bei groß angelegten epidemiologischen Studien von Bedeutung ist [199].

2.8.7.2 DNA-Addukte

Nach metabolischer Aktivierung bilden Kanzerogene durch kovalente Bindung Addukte mit Makromolekülen. Prinzipiell kann eine Bindung an allen Stickstoff- und enolisierten Sauerstoffatomen der Nukleinsäurebasen und den Hydroxylgruppen der Phosphorsäure erfolgen, die Adduktbildung beruht jedoch auf spezifischen elektronischen und stereochemischen Parametern[200]. Kanzerogene greifen überwiegend an den Guaninbasen an, wobei die Position des Angriffs wiederum von der chemischen Struktur des Kanzerogens abhängig ist. Zum Bei-

spiel binden Alkylantien hauptsächlich an der N7- und der O6-Position, während aromatische Amine und PAK die Positionen C8 und N2 des Guanins favorisieren (Abbildung 33) [201].

Zusätzlich bestehen Bindungsmöglichkeiten an anderen Stellen des Guanins und an weiteren Basen der DNA, was eine Vielzahl von möglichen Addukten eines einzelnen Kanzerogens zur Folge hat.

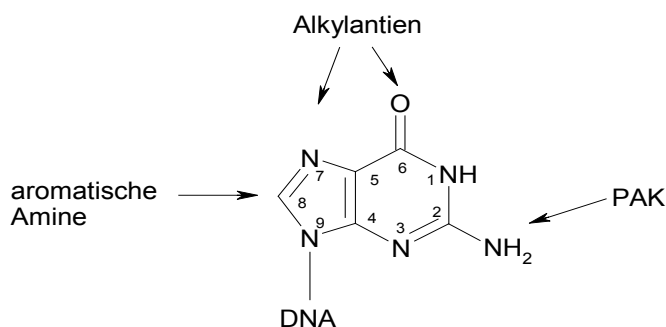


Abbildung 33: Reaktive Zentren des Guanins für diverse Elektrophile [202].

Trotz des offensichtlichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Addukten und der Exposition, scheint das Ausmaß des DNA-Schadens an den spezifischen Stellen hinsichtlich der Kanzerogenität die entscheidendere Rolle zu spielen. Bei vielen chemischen Substanzen lässt sich aufgrund ihrer DNA-Adduktbildung allgemein die Organotropie von Tumoren vorhersagen [203,204]. In Zielorganen einer bestimmten Klasse von Kanzerogenen kann die Bindung an die DNA mit der kanzerogenen Wirksamkeit korreliert werden [205]. Direkt reaktive Kanzerogene, wie Ethylenoxid, alkylieren die DNA in diversen Gewebearten in etwa dem gleichen Ausmaß [206].

DNA-Addukte, die vor der Zellreplikation nicht oder falsch repariert werden, können zu Genmutationen führen oder exponierte Zellen dazu veranlassen, sich in irreversibel veränderte Krebszellen umzuwandeln [205,207]. Liegt diese Initiierung der Zelle vor, werden theoretisch die nachfolgenden Stadien der Promotion und Progression bis hin zu potentiell bösartigen Zell- bzw. Gewebsveränderungen durchlaufen [207]. Somit repräsentieren DNA-Addukte einen frühen, nachweisbaren und kritischen Schritt in der chemischen Kanzerogenese und können als internes Dosimeter der Exposition mit Kanzerogenen betrachtet werden [208,209].

2.8.7.3 Hydroxypyridylbutanon freisetzende Addukte

Als einzige Quelle für HPB freisetzende Addukte galten zunächst die tabakspezifischen Nitrosamine NNK und NNN. HPB-Addukte sollten als Biomarker für die Belastung mit tabakspezifischen Nitrosaminen eingesetzt werden. NNK und NNN sind die am stärksten kanzerogenen Nitrosamine im Tabakrauch und wurden von der IARC als kanzerogen für den Menschen eingestuft (<http://www.iarc.fr>). In Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass für NNK

eine konzentrationsabhängige Beziehung zwischen der Bildung von HPB-Addukten und der Zahl gebildeter Lungentumoren besteht [210]. Auch zwischen den Adduktkonzentrationen an der DNA von Leber und Lunge und am Hämoglobin besteht bei Ratten eine enge Korrelation [211]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Analysenmethode zur Bestimmung der HPB-freisetzenden Hämoglobinaddukte entwickelt [212]. Nachdem NNK und NNN bisher nur in Tabakrauch und Tabakprodukten gefunden wurde, hatte man die Hoffnung mit diesem Biomarker die Belastung der Raucher und auch die Passivrauchbelastung zuverlässig nachweisen zu können. Das Ergebnis war jedoch enttäuschend. Aus der Abbildung 34 ist ersichtlich, dass sich Raucher und Nichtraucher im Mittel nur um das zwei- bis dreifache unterscheiden. Obwohl die Unterschiede noch Signifikanzniveau erreichten, ist wegen der hohen Streuung in vielen Fällen keine Vorhersage möglich, ob es sich aufgrund der Adduktbelastung um eine Probe von einem Raucher oder Nichtraucher handelt. Ein Nachweis der Passivrauchbelastung war mit diesem Biomarker nicht möglich. Diese Ergebnisse wurden in einer Reihe von Untersuchungen in unserer eigenen Arbeitsgruppe bestätigt [213-215].

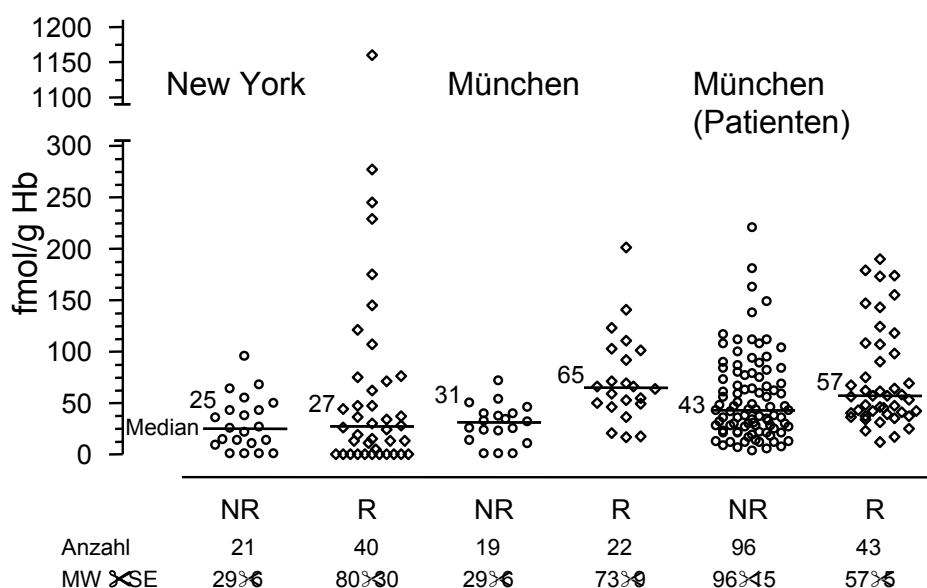


Abbildung 34: HPB-freisetzende Hämoglobinaddukte bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR) aus New York [216] und München [213,215]. Die Patienten mit unterschiedlichen Stadien der Refluxkrankheit oder mit Ösophagustumoren stammten aus der Chirurgischen Klinik rechts der Isar der TU München.

Dagegen unterscheiden sich Raucher und Nichtraucher um mindestens das Hundertfache in der Ausscheidung von NNAL und seinen Glukuroniden [217]. Dieser Biomarker für die NNK-Aufnahme spiegelt aber im Gegensatz zu den HPB freisetzenden Hämoglobinaddukten nicht die metabolische Aktivierung wieder. Aber auch die Hämoglobinaddukte sind, wie bereits ausgeführt, nur Surrogatmarker für die eigentlich interessanten Addukte an der DNA von Zielorganen, beim Raucher z.B. die Lunge. Hierfür musste erst eine sensitive und repro-

duzierbare Analytik entwickelt werden [218]. Es zeigte sich, dass Lungenkrebspatienten in Abhängigkeit vom Rauchstatus durchschnittlich siebenfach höhere Konzentrationen an HPB-freisetzende Addukte in der DNA von peripherem tumorfreiem Lungengewebe hatten. Dagegen waren die Hämoglobinaddukte bei den Rauchern nur unwesentlich höher und zeigten keine Korrelation mit den DNA-Addukten in der Lunge (Abbildung 35).

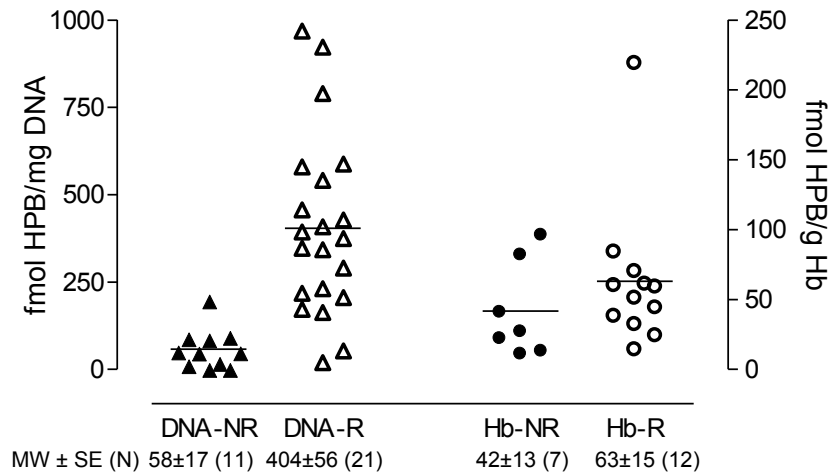


Abbildung 35: HPB-freisetzende Addukte an Hämoglobin und DNA von tumorfreiem peripherem Lungengewebe bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR) mit Lungenkrebs. Die Linien zeigen die Medianwerte [218].

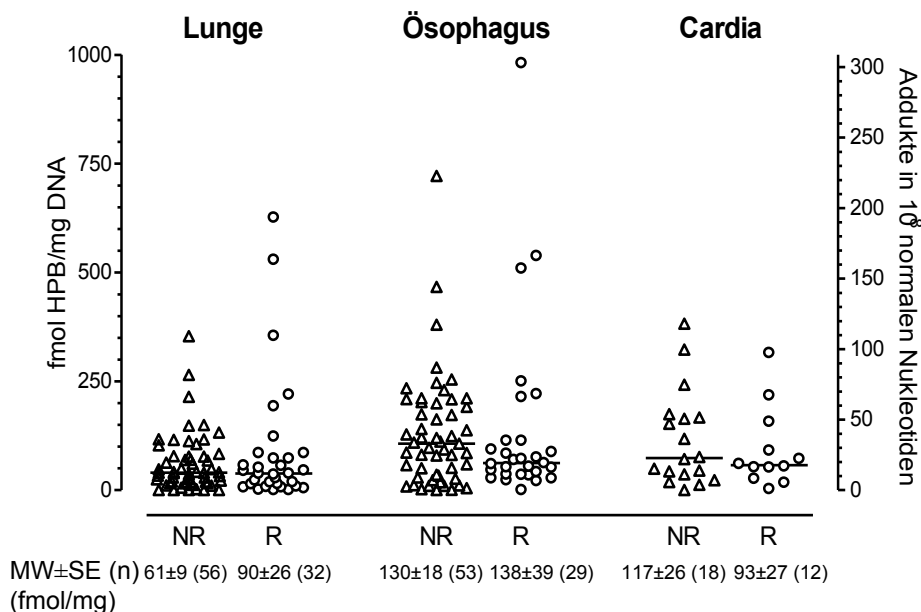


Abbildung 36: HPB-freisetzende Addukte an DNA von Lunge und Mukosa des unteren Ösophagus und der Cardia bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR). Die Gewebe stammen von akut Verstorbenen ohne Tumorerkrankung. Die Linien zeigen die Medianwerte [219].

In Geweben von Autopsien frisch Verstorbener ohne Tumoren konnte die Abhängigkeit der Adduktkonzentration vom Rauchstatus in Lungen-DNA allerdings nicht bestätigt werden [215,219]. Erstaunlicherweise waren in der gleichzeitig untersuchten Mukosa des unteren Ösophagus und der Cardia des Magens sogar höhere Mengen an HPB-Addukten nachweisbar.

Auch diese Addukte waren bei Rauchern nicht erhöht (Abbildung 34). Zwischen den Addukten in der Lunge und in der Mukosa vom Ösophagus oder der Cardia gab es keine Korrelation, während Ösophagus- und Cardiawert sehr gut korrelierten (Abbildung 37).

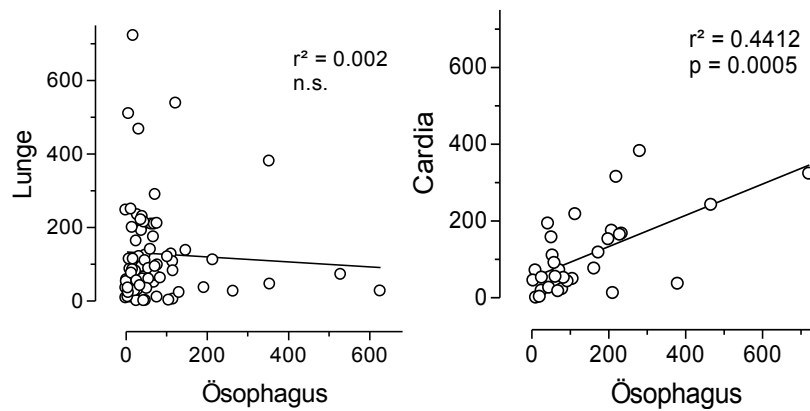


Abbildung 37: Korrelation zwischen HPB-freisetzenden Addukten an DNA von Lunge und Mukosa des unteren Ösophagus und der Cardia von akut Verstorbenen. Die Linien zeigen das Ergebnis der linearen Korrelation, die Korrelationskoeffizienten wurden mit dem Spearman-Rank-Test berechnet [219].

2.9 Ösophaguskarzinom

Der Ösophagus (Speiseröhre) des Menschen ist etwa 30 cm lang, verläuft zwischen Rachen und Magen und weist drei anatomisch bedingte Engstellen auf. Den Ösophagumund am oberen Eingang, die Aortenenge, an der der Ösophagus durch den Aortenbogen und die Trachea begrenzt wird, sowie die Zwerchfellenge. Die Innenseite ist von einer Schleimhaut aus unverhorntem Plattenepithel mit eingestreuten Drüsen bedeckt. Darunter liegen eine submuköse Bindegewebsschicht sowie eine Muskelschicht. Die Muskelschicht besteht im oberen Teil der Speiseröhre aus quergestreifter Muskulatur, die sich beim Schlucken willkürlich zusammenzieht. Im unteren Teil besteht sie dagegen, wie auch im übrigen Verdauungstrakt, aus glatter Muskulatur. Ihre Kontraktionen geschehen unwillkürlich. Die glatte Muskulatur sorgt für den Transport der Nahrung in den Magen.

In Deutschland erkranken jährlich etwa 3700 Männer und 1050 Frauen an Speiseröhrenkrebs, was einem Anteil von unter 2% an allen bösartigen Neubildungen bei den Männern und 0,5% bei den Frauen entspricht. Aufgrund der schlechten Prognose, die sich in den letzten Jahren kaum verbessert hat, ist der Anteil an den Krebstodesfällen mit 3,2% bzw. 1,1% höher. Auf die Mukosa und Submukosa beschränkte Tumoren sind selten und werden meist nur zufällig entdeckt. Wenn das typische Symptom der Schluckbeschwerden (Dysphagie) auftritt, haben Ösophaguskarzinome die Wandschichten häufig schon weitgehend infiltriert bzw. Metastasen in Lymphknoten oder benachbarten Organen gebildet. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern etwa 11% und bei Frauen 8% [220]. Bis Mitte der 1970er Jahre waren

weniger als 5% der Ösophaguskreberkrankungen auf Adenokarzinome zurückzuführen. Seitdem steigt ihr Anteil in großen Teilen Europas und in den USA kontinuierlich an (Abbildung 38). Heute haben Adenokarzinome bei der weißen Bevölkerung der westlichen Industrienationen etwa die gleiche Inzidenz wie Plattenepithelkarzinome und ihr Anteil steigt weiter an.

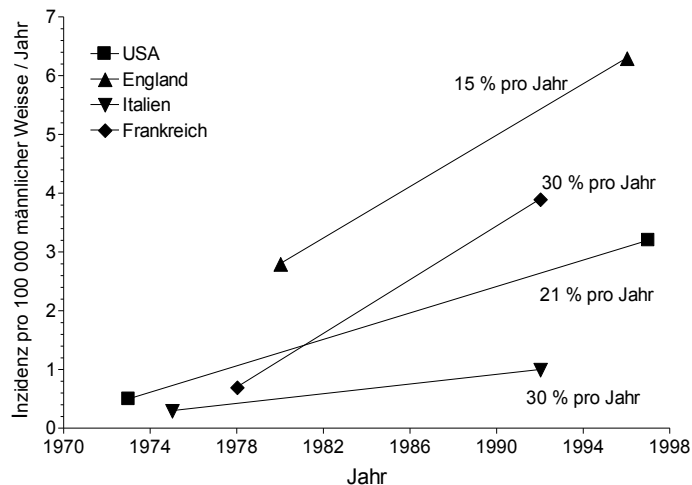


Abbildung 38: Zunahme des Ösophagus-Adenokarzinoms in Italien, USA, Frankreich und England.

Während für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen Rauchen und Alkoholkonsum eindeutig die Hauptrisikofaktoren sind [221], gilt als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von Adenokarzinomen im Ösophagus ein Barrett-Ösophagus. Dieser entsteht durch chronischen Reflux von Magensäure und Duodenalinhalten aus dem Magen. Dadurch kommt es zu einer Umwandlung des Plattenepithels der Speiseröhre in ein Zylinderepithel (Metaplasie). Schließlich folgt eine Dysplasie, d.h. der Verlust der Differenzierung der Zellen des Gewebes. Das Risiko für einen Patienten mit bekanntem Barrett-Ösophagus ein Adenokarzinom zu entwickeln, ist etwa 100-fach erhöht [222]. Die wichtigsten zellulären Mechanismen, die zur Bildung eines Adenokarzinoms führen sind in Abbildung 39 zusammengefasst.

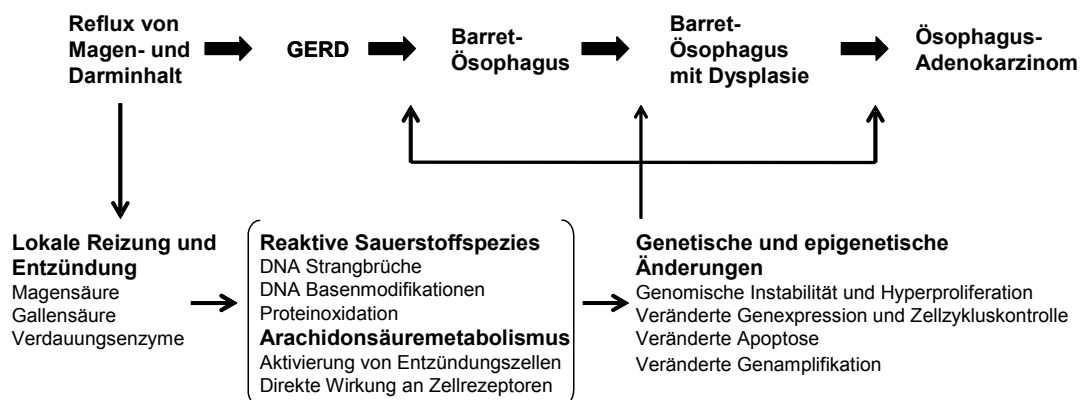


Abbildung 39: Mechanismen, die zur Adenokarzinom-Entstehung im Ösophagus führen (nach Chen et al. [223]), GERD = gastroösophageale Refluxkrankheit.

Salzsäure und Pepsin im Magensaft, sowie konjugierte und nicht konjugierte Gallensäuren, Trypsin und Lysolecithin im Darmsaft sind an der Schädigung der Ösophaguswand und der Entwicklung von Adenokarzinomen beteiligt. Die Ösophagusschleimhaut ist relativ resistent gegen Salzsäure allein, aber längere Episoden einer Belastung mit hohen Konzentrationen (etwa pH 1) und vor allem die Kombination mit Gallensäuren oder Pankreasenzymen führen dazu, dass die Schleimhaut ihre Impermeabilität verliert und Wasserstoffionen passieren können. Gleichzeitig können evtl. auch potente Kanzerogene die Schleimhaut passieren und auf die Mukosastammzellen einwirken. Salzsäure in Kombination mit schon geringen Pepsinkonzentrationen schädigt die Schleimhaut über zwei Mechanismen. Zum einen können Zellinhaltsstoffe verdaut werden, zum anderen kann der Abbau von Oberflächenstrukturen dazu führen, dass sich die Zelle vom Epithel ablöst. Bis heute wird die Rolle der Magensäure bei der Entstehung von Adenokarzinomen des Ösophagus kontrovers diskutiert. Viele klinische Studien haben gezeigt, dass eine Säure unterdrückende Therapie die Symptome der Refluxkrankheit mindern kann und Komplikationen vorbeugt. Selbst der Barrett-Ösophagus regeneriert sich teilweise und es entstehen Inseln mit normalem Plattenepithel. Andererseits bewirkt die Unterdrückung des Reflux keinen Rückgang des Barrett-Ösophagus und eliminiert auch nicht die Gefahr der Adenokarzinomentstehung. Gallensäuren selbst sind nicht kanzerogen, allerdings können sekundäre Gallensäuren, die beim Abbau primärer Gallensäuren durch Bakterien entstehen, als Cokanzerogene wirken. Ihre Wirkung scheint vom Konjugationsstatus und dem pH-Wert der Umgebung abzuhängen. Bei sauren pH-Werten besonders zwischen 3 und 5 können nicht ionisierte und lipophile Gallensäuren in die Schleimhautzellen eindringen, wo sie ionisiert werden und zu Zellschäden führen können. Unkonjugierte Gallensäuren können bei neutralen pH-Werten als Tumorpromotoren wirken [223]. Neben dem Reflux gibt es weitere Risikofaktoren wie Fettleibigkeit und das Rauchen, eine hohe Aufnahme von rotem Fleisch, gesättigten Fettsäuren und Eisen. Auch die Einnahme von Pharmaka, die zu einer Entspannung des unteren Ösophagussphinkters führen, erhöht das Risiko. Männer sind weit häufiger betroffen als Frauen, obwohl Sexualhormone scheinbar keine Rolle spielen. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter, die meisten Patienten erkranken zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr. Auf der anderen Seite kann eine Infektion mit bestimmten *Helicobacter pylori*-Stämmen schützend wirken.

Auch eine an Obst, Gemüse, Fisch und Rohfasern reiche Ernährung sowie die Aufnahme von Antioxidantien senken das Risiko [221]. Generell wird ein Nahrungsüberfluss, Insulinresistenz, viel Fleisch und der hohe Fettanteil an der westlichen Ernährung in Zusammenhang mit der Häufigkeit vieler Tumoren wie Dickdarmkrebs [224], Krebs von Mund und Rachenraum

[225], sowie Brustkrebs [226] gebracht. Des Weiteren soll eine Korrelation zwischen dem Konsum von Fleisch und dem Auftreten von Kolon-, Rektum-, Magen-, Pankreas- und Blasenkarzinomen herrschen [227]. Eine andere Studie diskutiert den Zusammenhang von Nahrung und der Erkrankung an Schilddrüsenkrebs [228]. Während für das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre, wie schon erwähnt, Rauchen und Trinken die Hauptrisikofaktoren sind, scheint für das Adenokarzinom die Ernährung eine entscheidende Rolle zu spielen, weil hier Übergewicht und eine Diät arm an Gemüse und Obst und reich an rotem Fleisch und gesättigten Fettsäuren zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen [229-231].

2.9.1 Bedeutung von TSNA und Myosmin für den Ösophaguskrebs

NNN gehört zu den wenigen Substanzen, die im Tierversuch Ösophaguskrebs auslösen [180]. Deshalb wird auch beim Menschen ein Zusammenhang mit der Entstehung von Ösophaguskrebs vermutet. Anders als Myosmin muss NNN durch α -Hydroxylierung metabolisch aktiviert werden (Abbildung 32). Für die HPB-Bildung ist die Hydroxylierung in der 2'-Position der entscheidende erste Schritt. Diese Reaktion wird von verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen (CYP) katalysiert, wobei den Isoenzymen aus der 2A-Klasse wohl die größte Bedeutung zukommt. Das Isoenzym CYP2A13 katalysiert beispielsweise die 2'-Hydroxylierung von (R)-NNN, das bis zu 25% des NNN im Tabak ausmacht [232]. Das bei dieser Reaktion entstehende instabile Diazohydroxid kann entweder direkt zu HPB hydrolysiert werden oder Biomoleküle wie DNA, RNA oder auch Hämoglobin alkylieren. Mit DNA werden unterschiedlich stabile Addukte gebildet [233]. Außerdem hemmt eines der identifizierten Pyridyloxobutyl-Addukte, das O^6 -[1-oxo-1-(3-pyridyl)but-4-yl]-d-Guanosin, die Aktivität der O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT). Dieses Enzym katalysiert die Reparatur von alkylierter DNA, insbesondere von O^6 -Methylguanin, welches u.a. auch bei der metabolischen Aktivierung von NNK entsteht [180]. O^6 -Methylguanin wird häufig in Tumorgewebe nachgewiesen und scheint eine Rolle in der Tumorentstehung zu spielen. Die AGT erkennt auch das HPB-Addukt als Substrat. Da das Enzym bei der Reaktion inaktiviert wird, schwächen die Pyridyloxobutyladdukte die Reparaturkapazität der Zelle [234-236].

Die von *Zwickenpflug* entdeckte Nitrosierung [167] von Myosmin zu NNN war ein erster Hinweis, dass dieses in seinem Vorkommen nicht auf den Tabak beschränkte Alkaloid für den Ösophaguskrebs von Bedeutung sein könnte. Die Erkenntnisse aus der Myosminnitrosierung lieferten zusätzlichen Interpretationsstoff. Aufgrund der direkten Bildung von HPB ist eine metabolische Aktivierung des Nitrosierungsprodukts im Organismus nicht zwingend erforderlich, um eine DNA- oder Proteinbindung zu ermöglichen. Aus der Reaktionsfolge wird er-

sichtlich, dass bei der Bildung von HPB eine instabile Zwischenstufe durchlaufen wird, welche ebenfalls das Potential für eine Bindung an DNA oder Proteine mitbringt (Abbildung 31). Die Adduktbildung erfolgt also in einer sehr viel direkteren Reaktionsfolge als bislang angenommen. Das bedeutet, dass bei Vorhandensein von nitrosierenden Verbindungen im sauren Milieu bereits ohne Zutun des Organismus aus Myosmin eine Spezies entstehen kann, die kanzerogenes Potential besitzt. Unter Nitrosierungsbedingungen konnte mit radioaktivem Myosmin eine DNA-Bindung der Radioaktivität *in vitro* nachgewiesen werden [168]. *Zwickenpflug und Tyroller* [237] konnten außerdem die Bildung von HPB nach Inkubation von Myosmin mit Wasserstoffperoxid belegen. Da H_2O_2 auch *in vivo* vorhanden ist, scheint eine Beteiligung dieses Reaktionsweges am Myosminmetabolismus möglich.

Bei Ratten erzeugte Myosmin HPB abspaltende Addukte am Hämoglobin und an der Ösophagus-DNA (Abbildung 40) [238]. In dieser Studie wurden drei Tiergruppen 6 Tage lang über das Futter entweder mit 500 ng/kg Myosmin oder mit 500 ng/kg NNN behandelt, die dritte Gruppe zusätzlich zu Myosmin mit 500 mg Nitrit/l im Trinkwasser. Danach wurden die Tiere getötet und die DNA von Leber, Lunge und Ösophagusschleimhaut auf HPB-freisetzende Addukte untersucht.

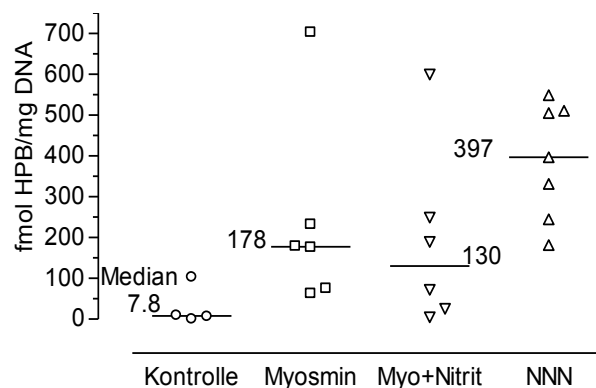


Abbildung 40: HPB-DNA-Addukte in der Ösophagasmukosa von Ratten durch Myosmin und NNN.

In der Ösophagasmukosa, dem wichtigsten Zielorgan der NNN-Kanzerogenese, wurden nach NNN Fütterung die größten Adduktlevel erreicht, aber auch die Myosminfütterung erzeugt DNA-Addukte im Ösophagus, die im Mittel fast die Hälfte der Konzentrationen nach NNN Fütterung erreichten [238]. Dagegen konnten *Hecht et al.* [193] bei ihren Rattenversuchen mit Myosmin alleine oder in Kombination mit Nitrit keine HPB-Addukte nachweisen.

Der Nachweis hoher Konzentrationen von HPB-freisetzenden Addukten in der Mucosa des Ösophagus und der Cardia (Abbildung 36), die unabhängig vom Rauchen, aber mit zunehmender Fettleibigkeit signifikant erhöht waren, ist ein weiteres Indiz für die mögliche Rolle

von Myosmin für das Adenokarzinom des unteren Ösophagus und der Cardia [219]. Bei der Untersuchung von Gewebeproben von Barrett-Ösophagus- und Adenokarzinompatienten haben *Olliver et al.* [239] mit Hilfe des Comet-Assays eine erhöhte Rate von DNA-Schäden gegenüber normalem Plattenepithel und Gewebe des Magens gefunden.

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Myosmin wurde lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen, dies änderte sich mit der Entdeckung von *Zwickenpflug et al.* [1] und *Tyroller et al.* [2]. Sie konnten Myosmin in einer breiten Palette von Nahrungsmitteln u.a. auch in tierischen Produkten wie Milch und Sahne nachweisen. Seitdem ist Myosmin nicht mehr als ausschließlich in Tabak vorkommend einzustufen. Dies wurde von *Maier et al.* [3] durch den Nachweis von Myosmin in menschlichen Körperflüssigkeiten wie Muttermilch, Speichel und Plasma und die fehlende Korrelation mit dem für das Rauchen spezifischen Biomarker Cotinin erhärtet.

Damit stellte sich die Frage, wie hoch die Langzeitbelastung des Menschen mit Myosmin ist, und ob sie durch Rauchen wesentlich beeinflusst wird. Da Myosmin auch in tierischen Produkten nachgewiesen wurde, war es ebenso interessant tierisches Plasma, in diesem Fall Schweineplasma, zu analysieren.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es die bislang verwendete Analytik zur Identifizierung von Tabakalkaloiden in Speichel, Plasma und Zehennägeln zu optimieren und alle in dieser Arbeit benutzten Analysenvorgänge zu validieren.

Das zweite Ziel war der Nachweis dieser Alkaloide anhand dieser Analytik in verschiedenen Versuchen:

- Bestimmung der Myosminkonzentration in Plasma von nüchternen und nicht nüchternen Schweinen und im Schweinefutter.
- Untersuchung der langfristigen Belastung des Menschen mit Myosmin in Abhängigkeit des Rauchstatus durch Bestimmung von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln als Langzeitmarker und die Korrelation mit den Myosmin- und Cotininkonzentration im zugehörigen Speichel als Kurzzeitmarker.
- Die Durchführung eines Gruppenversuchs bei dem von allen Probanden unter gleichen Grundvoraussetzungen und gleicher Nahrungsaufnahme die individuelle Myosminbelastung im Speichel über den Tag verteilt analysiert wurde. Aus den Myosminkonzentrationen wurden individuelle Myosminbelastungsprofile erstellt. Zusätzlich wurde die an dem Versuchstag aufgenommene Nahrung untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Festphasenextraktion:

SPE-Säulen:	Phenomenex, Strata-X-C Cation Mixed Polymer 60 mg/3 ml
SPE-Hähne:	Varian, Luer Stopcocks
Säulenadapter:	Varian, Adapter caps 1, 3, 6 ml
SPE-Vakuumkammer:	Analytichem International, Vac-Elut
Festinstallierte Vakuumpumpe:	Vacuubrand VNC 1
Plexiglasständer für die Elution	Herstellung durch die Werkstatt des Walther-Straub-Instituts

Strata-X-C-Säulen

Das Säulenmaterial der SPE-Säulen bindet spezifisch Analyten aus beliebigen Matrices. Die Festphase muss dabei auf den Analyten abgestimmt werden, um eine gute Wiederfindung trotz der zahlreichen Reinigungsschritte zu gewährleisten. Das Mischphasen-Polymer der Strata-X-C-Säulen besitzt mit Sulfonsäuregruppen und Styrodivinylbenzolgruppen (Abbildung 41) sowohl die Eigenschaften eines starken Kationenaustauschers, als auch die einer Reversed Phase. Damit ist es zur Bindung basischer Substanzen gut geeignet.

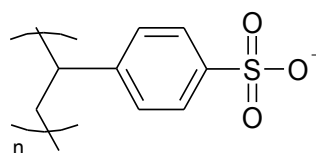


Abbildung 41: Struktur der Strata-X-C-Säulen.

Einweggefäße und Zubehör:

- Schraubgefäße: 12 ml (PP-Röhrchen)
- Wheaton-Gläser: 1,5 ml und 4,0 ml mit Schraubdeckel und Teflondichtung, Chromatographiehandel Müller (1,5 ml) und (4,0 ml)
- Einsätze für Wheaton-Gläser: (Minivials) 50 µl, Chromatographiehandel Müller
- Einmalkanülen: Peha CHB
- Eppendorf-Cups: Volumen 2 ml
- Rack für Wheaton-Gläser: 1,5 und 2 ml und Plexiglasständer für Trockenvorgang

- EDTA-K-Plasmaröhrchen und Monovetten, Sarstedt
- Salivetten, Sarstedt

Pipetten und Zubehör:

- Laborpipetten (Direktverdränger): Gilson Microman: 10 µl, 25 µl, 100 µl, 250 µl, 1000 µl
- Laborpipetten: Gilson Pipetman 200 µl, 1000 µl, 5000 µl
- Pipettenspitzen für Gilson-Laborpipetten
- Glaspipetten: VWR International Glass Pasteur Pipettes 150 mm, mit entsprechenden Pipettenhütchen, Watte

Geräte:

- Magnetrührer: IKA, Combinag RCH
- Präzisionswaage: Cobos precision A-150-SX
- Vortex-Rüttler: Heidolph Reax DR
- Kühlschrank: Siemens, Gefrierschrank: Liebherr Premium
- Zentrifuge: Hettich Zentrifugen Universal 16 R
- Zeitmesser Oregon Scientific
- Stickstoff-Abblasvorrichtung
- Brutschrank: Heraeus Funktion Line, Heraeus-Kendro, Langensebold

GC/MS und Zubehör:

- GC/MS-Gerät: TRIO 1000 Benchtop GC/MS, Fisons Instrument
- GC-Ofen: Fisons Serie 8060, Fisons Instruments
- GC-Spritze: Hamilton Microliter Syringes 701N, 10 µl
- GC-Säule: J&W Scientific DB-5MS, Agilent 5% Phenyl-95% Dimethylsiloxanphase, J&W, Folsom (CA), USA L 30 m, ID 0,25 mm, Film 0,25 µm, Polaritätsindex 8
- Quellen-Modus: EI⁺
- Software: MassLab[®] Version 1.3, Fisons plc.

3.2 Chemikalien

25%ige Ammoniak-Lösung	Merck, reinst
CH ₂ Cl ₂ (Dichlormethan)	Merck, Suprasolv für GC
D ₃ -Cotinin	Toronto-Research
D ₄ -Myosmin	Toronto-Research
D ₃ -Nikotin	Toronto-Research
Eisessig	Merck, 100% wasserfrei
HCl _{conc} (konz. Salzsäure)	Merck
Hexan	Merck, Suprasolv für GC
Kälberserum	Sigma-Aldrich
Keratinpuder	MP Biomedicals Inc.
Methanol	Merck, Suprasolv für GC
NaOH Micropills (Natriumhydroxid)	Riedel de Haen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Reinstwasser (H ₂ O _{reinst})	Hauseigene Millipor-Anlage

3.2.1 Herstellung der Reagenzien

○ **0,1 mol/l Essigsäure:**

555,56 µl Eisessig ad 100 ml mit H₂O_{reinst} auffüllen.

○ **5%ige NH₃-Lösung in 70%igen Methanol (Elutionslösung):**

4 ml 25%ige NH₃-Lösung mit 11,20 ml Methanol und 4,8 ml H₂O_{reinst} mischen.

○ **1 mol/l HCl:**

8,33 ml HCl_{conc.} (37%) ad 100 ml mit H₂O_{reinst} auffüllen.

○ **4 mol/l NaOH:**

16 g Natriumhydroxid in 100 ml H₂O_{reinst} lösen.

○ **Interner-Standard**

c (D₄-Myosmin) = 0,5 ng/µl

c (D₃-Cotinin) = 1,35 ng/µl

c (D₃-Nikotin) = 1,0 ng/µl

Alle Standards sind in Dichlormethan gelöst.

3.3 Gute Laborpraxis

Nach der OECD-Definition (Organisation for Economic Co-Operation and Development) ist Gute Laborpraxis (GLP) ein Qualitätssicherungssystem, das sich mit dem organisatorischen Ablauf und Rahmenbedingungen befasst, unter denen nichtklinische gesundheits- und umweltrelevante Sicherheitsprüfungen geplant, durchgeführt und überwacht werden, sowie mit der Aufzeichnung und Berichterstattung der Prüfungen.

Diese Prüfungen müssen gemäß Chemikaliengesetz (§19a-d) nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt werden. Die GLP-Grundsätze wurden von der OECD entwickelt und auf eine internationale Basis gestellt. Dies bedeutet, dass Studien und Gutachten, wie beispielsweise Krebsstudien, zwingend unter GLP-Bedingungen zu erstellen sind, damit sie OECD weit Gültigkeit erhalten. Einrichtungen und Labors, die Prüfungen unter GLP-Bedingungen durchführen wollen, benötigen eine besondere Form der Akkreditierung, die GLP-Bescheinigung. Zur Erlangung der GLP-Bescheinigung müssen die Prüflabors nachweislich die Einhaltung der GLP-Grundsätze gewährleisten. Diese sehen genau definierte Standards für Organisation, Personal, Räumlichkeiten, Prüf- und Referenzsubstanzen, Arbeitsanweisungen, Ergebnisberichte und die Archivierung vor. Mit der GLP soll die internationale Anerkennung von Prüfergebnissen und hierdurch auch eine Einschränkung der Anzahl der Tierversuche erreicht werden. Akkreditierte Prüflaboratorien müssen gemäß der Norm DIN EN ISO/IEC 17025 oder im Rahmen staatlicher Zulassungsverfahren regelmäßig an Ringversuchen teilnehmen, um die Qualität ihrer Ergebnisse zu sichern und nachzuweisen. Ein Ringversuch oder Ringvergleich bzw. Laborleistungstest ist eine Methode der externen Qualitätssicherung für Messverfahren und Mess- und Prüflaboratorien. Grundsätzlich werden identische Proben mit identischen Verfahren oder mit unterschiedlichen Verfahren untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse erlaubt es, Aussagen über die Messgenauigkeit generell bzw. über die Messqualität der beteiligten Institute zu machen. Ringversuche werden zudem zur Validierung von Vorschriften für Messverfahren verwendet.

Unter Methodenvalidierung in der Analytik versteht man den formellen und dokumentierten Nachweis, dass eine analytische Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und dass sie die an sie gestellten Anforderungen erfüllt. In dieser Arbeit wurde die Analytik durch eine validierte Hausmethode nach DIN 32 645 überprüft. Zur Bewertung dieser Methode wurden Leistungsmerkmale, wie Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate im Rahmen der Methodenvalidierung über einen Arbeitsbereich bestimmt und die Nachweisgrenzen nach oben genannter DIN-Norm berechnet.

3.4 Methoden

3.4.1 Analysengang für Speichel- und Plasmaproben

3.4.1.1 Entnahme von Plasma und Speichel

Den Schweinen wurde direkt in EDTA-K-Monovetten Blut abgenommen. Die menschlichen Speichelproben wurden anhand von Salivetten gesammelt. Dazu musste die Watterolle aus der Salivette etwa für 1,5 min in den Mund genommen werden. Um eine optimale Speichelmenge zu erzielen, sollte die Salivette unter die Zunge gebracht werden. Sowohl die EDTA-K-Monovette wie auch die Salivetten wurden bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Plasma und Speichel wurden in 12 ml PP-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren. Zur Identifizierung wurden die Proben mit einer laborinternen Nummer codiert.

3.4.1.2 Festphasenextraktion

Säulenkonditionierung:

Die SPE-Säulen wurden auf die Hähne mit Luer-Aufsatz gesetzt und zusammen auf die Vakuumkammer gesteckt. Diese wurde über eine Wulffsche Flasche mit der Vakuumpumpe verbunden. Nach Konditionierung der Säulen dreimal jeweils mit 2 ml Elutionslösung (Flussrate 3-6 ml pro min) wurden die Säulen mit 3 ml Methanol konditioniert (Flussrate 9-18 ml/min) und anschließend mit 3 ml 0,1 M Essigsäure angesäuert (Flussrate 9-18 ml/min). Ein Trockenlaufen des Säulenmaterials sollte dabei unbedingt vermieden werden.

Probenvorbereitung:

Die Plasma- und Speichelproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in ein 12 ml PP-Röhrchen überführt und mit 8 µl der Standardlösung versetzt. Dann verdünnte man die Proben mit 4 ml 0,1 M Essigsäure und zentrifugierte anschließend eventuell denaturiertes Protein bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min ab.

Probenaufgabe, Reinigung und Elution:

Die vorbereitete Probe wurde mittels Pasteurpipette auf die konditionierte und equilibrierte Säule gegeben (Flussrate: 3-6 ml/min). Dabei war unbedingt zu vermeiden, dass das Säulenmaterial trocken lief. Dann wurde einmal mit 3 ml 1 M HCl und zweimal mit je 3 ml Methanol gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mittels Vakuum von der Säule gezogen und für drei Minuten bei höchstem Vakuum (ca. 120 mbar) getrocknet. Die Säulen mit Hähnen wurden von der Vakuumkammer genommen, mit Kanülen versetzt und in den Elutionsständer

gestellt. Unter die Kanülen wurden im entsprechenden Rack 4 ml-Wheatongläser gestellt, um das Eluat aufzufangen. Jeweils 2 ml Elutionslösung (5%ige NH_3 -Lösung in 70%igen Methanol) wurde auf die Säulen gegeben. Diese musste eine Minute einwirken, bevor die Hähne geöffnet wurden. Zuletzt wurden auf die Säulen Adapter aufgesetzt, um restliches Elutionsmittel mit Pressluft von der Säule zu blasen (Abbildung 42).

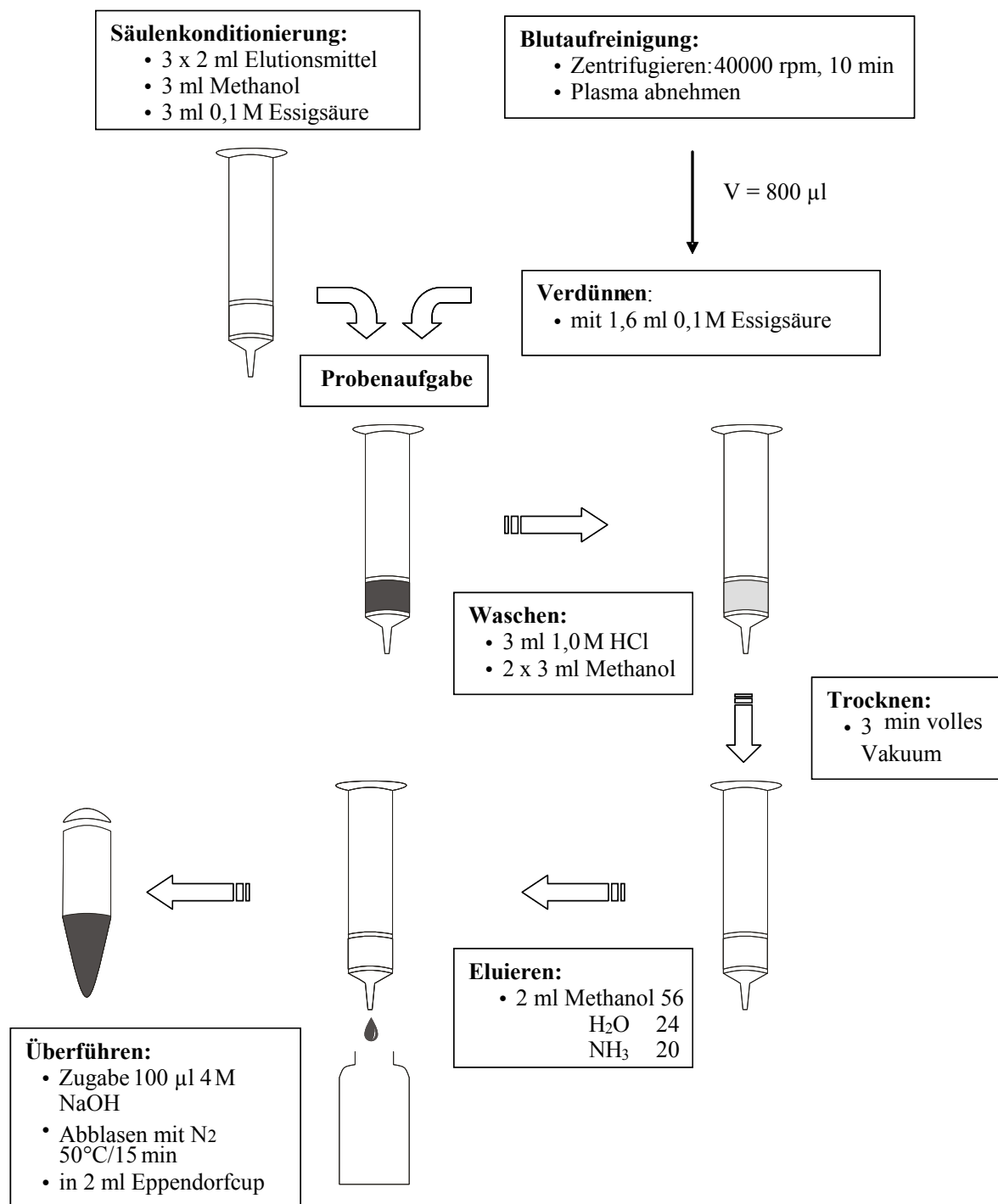


Abbildung 42: Festphasenextraktion der Plasmaproben.

3.4.1.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das Eluat der Festphasenextraktion wurde mit 100 μl 4 M NaOH versetzt. Nach vortexen wurden die Gläser in die Stickstoff-Abblasevorrichtung eingebracht, die zuvor mit einer Heizplatte auf 50 $^{\circ}\text{C}$ erwärmt worden war. Im Stickstoffstrom wurde Methanol und Ammoniak innerhalb von ca. 15 Minuten abgeblasen.

Die verbliebene wässrige Phase wurde in ein 2 ml Eppendorfcup überführt, das Glas mit 500 μl Dichlormethan gespült, die vereinigten Phasen von Hand geschüttelt und danach bei 4 $^{\circ}\text{C}$ mit 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit einer 250 μl Direktverdrängerpipette abgenommen und auf eine mit Watte und Na_2SO_4 beschickte Pasteurpipette gegeben. Die befüllten Pasteurpipetten wurden vorher mit 500 μl Dichlormethan gespült und sind in ein entsprechendes Rack mit 1,5 ml Wheatongläser eingesetzt worden.

Der Vorgang der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde insgesamt zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Pasteurpipette mit 100 μl Dichlormethan nachgespült um das restliche Lösungsmittel in das Glas zu überführen. Zur vollständigen Überführung konnte man mit einem Pipettenhütchen, welches auf die Glaspipette aufgesetzt wird, das restliche Dichlormethan in das Glas drücken (Abbildung 43).

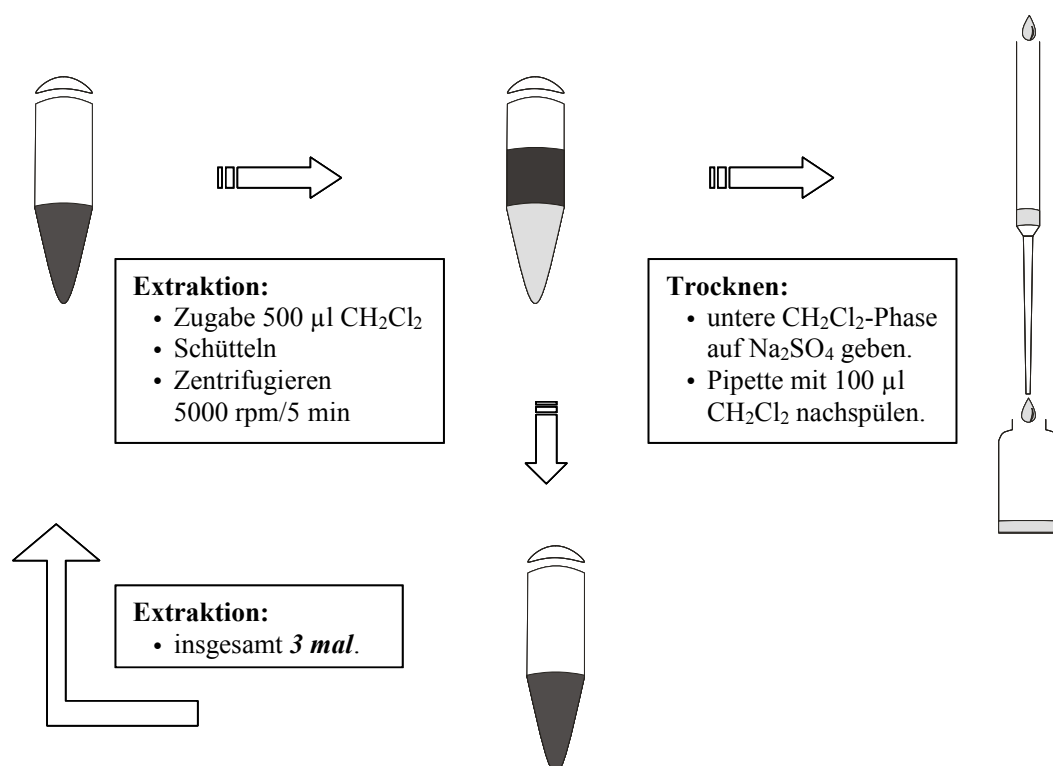


Abbildung 43: Flüssig-Flüssig-Extraktion.

3.4.1.4 Überführung in Hexan

Die getrocknete organische Phase wurde an der Ablasevorrichtung bei 50 °C mit Stickstoff auf ca. 100 µl eingengt. Es wurde mit 1 ml Hexan aufgefüllt und kurz gemischt. Anschließend wurde erneut auf ein Restvolumen von 20 µl eingengt. Mit einer 25 µl Pipette wurde die Lösung in ein Microinsert überführt. Dabei konnte nochmals das exakte Volumen überprüft werden und gegebenenfalls mit Hexan aufgefüllt bzw. auf 20 µl abgeblasen werden. Beim Abblasen der Proben war stets darauf zu achten, dass die Proben nicht zu trocken eingedampft wurden, da es sonst zu erheblichen Verlusten der Analyten kommt (Abbildung 44).

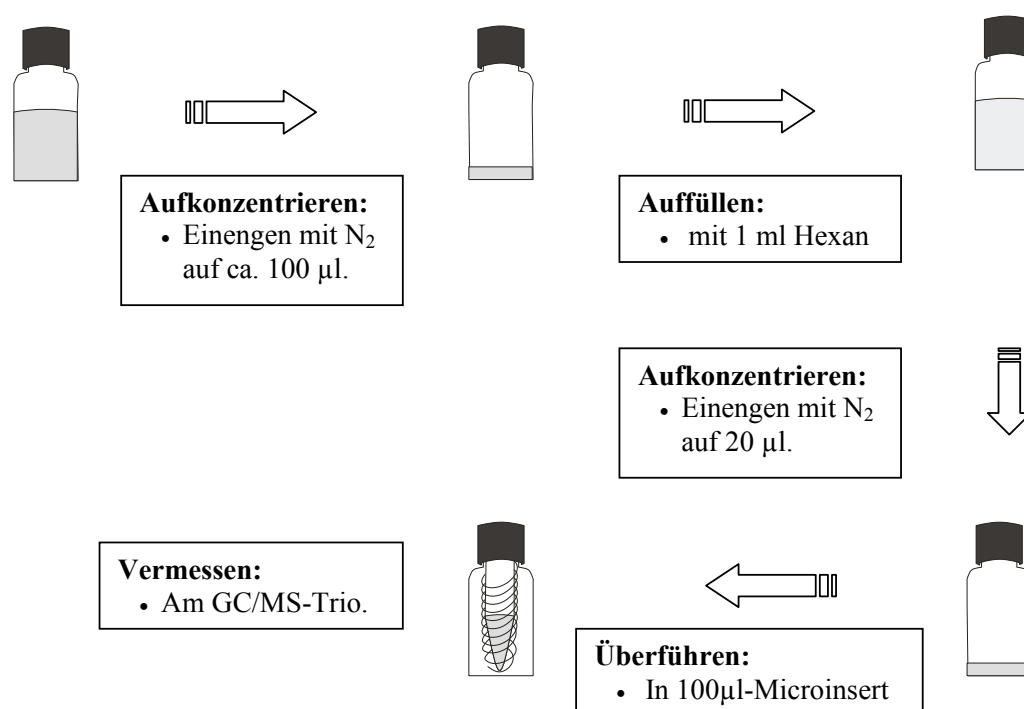


Abbildung 44: Überführung der Proben in Hexan.

3.4.2 Analysengang für Zehennägel

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Die Zehennägel der Probanden (jeweils vom rechten und vom linken Fuß), wurden gewogen und klein geschnitten. Pro Probe wurde jeweils 20-30 mg in ein Eppendorfcup überführt und die Einwaage wurde genau notiert. Die Proben wurden in jeweils 2 ml Dichlormethan für 120 min gewaschen. Danach wurde das Dichlormethan vorsichtig abpipettiert und zusätzlich eine Minute im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurden die Proben mit geöffnetem Deckel für 10 min bei 50 °C in einem Brutschrank vollständig getrocknet.

3.4.2.2 Verdauung

Die getrockneten Proben wurden mit 0,5 ml der 1 M NaOH-Lösung versetzt. Hier war wichtig, alle Nägelteile mit NaOH zu bedecken. Die Eppendorfcups wurden gut verschlossen und zusätzlich doppelt mit Tesafilm verklebt. Zuletzt wurden sie wieder in den Trockenschrank verbracht und über Nacht bei 80 °C inkubiert.

3.4.2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die inkubierten Proben wurden nach dem Abkühlen mit jeweils 8 µl Standardlösung versetzt. Dann wurden sie gevortext und im Anschluss mit 500 µl Dichlormethan aufgefüllt. Die Proben wurden wiederholt zwei Minuten lang gevortext und für fünf Minuten bei 4 °C mit 5000 rpm zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit einer 250 µl Direktverdrängerpipette abgenommen und auf eine mit Watte und Na₂SO₄ befüllte Pasteurpipette gegeben. Die befüllten Pasteurpipetten wurden zuvor mit 500 µl Dichlormethan vorgespült und in ein entsprechendes Rack mit 1,5 ml Wheatongläsern eingesetzt. Der Vorgang der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Pasteurpipette noch mit 100 µl Dichlormethan nachgespült und das Lösemittel mittels Pipettenhütchen in das Glas gedrückt (Abbildung 43).

3.4.2.4 Überführung in Hexan

Die getrocknete organische Phase wurde an der Abblasevorrichtung bei 50 °C mit Stickstoff auf ca. 100 µl eingeeengt, mit 1 ml Hexan aufgefüllt und kurz gemischt. Anschließend ist die Probe erneut auf ein Restvolumen von 20 µl eingeeengt worden. Mit einer 25 µl Pipette wurde die Lösung in ein Microinsert überführt. Dabei wurde nochmals das exakte Volumen überprüft und gegebenenfalls mit Hexan aufgefüllt bzw. auf 20 µl abgeblasen. Beim Abblasen der Proben war stets darauf zu achten, sie nie bis zur Trockenheit einzudampfen, um erhebliche Verluste der Analyten zu vermeiden (Abbildung 44).

3.5 GC/MS-Analyse

Die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) erweist sich als eine gute Analysenmethode zur Trennung, Detektion und Charakterisierung von Bestandteilen komplexer organischer Gemische. Der Vorteil der Kombination beider Geräte liegt in der Untersuchung und Detektion von flüchtigen bis mittelflüchtigen Substanzen bis in den Pikogramm-Bereich. Im Gaschromatograph werden die Substanzen zunächst aufgrund ihrer Siedetemperatur und der unterschiedlichen Interaktion mit der stationären Phase voneinander getrennt. Das Trägergas war bei diesen Analysen Helium. Als stationäre Phasen dienen nie-

drigviskose Flüssigkeiten, die einen dünnen, gleichmäßigen Film auf der Oberfläche der GC-Kapillarsäulen bilden.

Nach der gaschromatographischen Auftrennung der Probenbestandteile werden die Substanzen im Massenspektrometer analysiert. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung der zuvor getrennten Substanzen. Die ionisierten Moleküle bilden nach Zerfall strukturspezifische Fragmente, die entsprechend ihrer Ladungszahl (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) in einem Magnetfeld bzw. in einem elektrischen Feld, voneinander getrennt werden.

Bei der Ionisierung werden verschiedene Arten unterschieden. Neben der Elektronenstoßionisation gibt es noch die chemische Ionisation (CI). In dieser Arbeit wurde die Elektronenstoßionisation (EI) eingesetzt.

Bei der EI werden Elektronen aus einem Heizdraht beschleunigt. Um eine vollständige Fragmentierung der Moleküle zu erhalten, beträgt die Potentialdifferenz meistens 70 Elektronenvolt (eV). Dadurch wird in der Ionenquelle ein Radikalkation gebildet. Dieses Kation wird Molekülion (M^+) genannt, es liefert die Molekülmasse der Substanz (gemessen in atomarer Masseneinheit, u). Durch weitere Fragmentierung entstehen Radikale und Neutralteilchen. Da im Massenspektrometer absoluter Luftausschluss notwendig ist, wird im Hochvakuum gearbeitet. Bereits geringe Spuren von Verunreinigungen durch Substanzen mit hoher Elektronenaffinität wie Sauerstoff oder Wasser können zu starkem Hintergrundrauschen führen. Auch ist auf eine hohe Reinheit der Gase, hier Helium und Methan, zu achten.

Neben den am häufigsten verwendeten Quadrupolmassenfiltern werden auch noch Magnetsektorfeldanalysatoren, Ionenfallen und Tandem-Massenspektrometer eingesetzt. Nach Passieren des Massenanalysators erzeugen die Ionen Ströme, die im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-17} A mittels eines Elektronenvervielfachers (Multiplier) zu messbaren Signalen umgewandelt werden. Die gewonnenen Daten werden danach computergestützt ausgewertet.

In dieser Arbeit wurde ein Gaschromatograph der Serie 8060 der Firma Fisons verwendet, an welchen ein Trio 1000 Quadrupol Massenspektrometer, ebenfalls der Firma Fisons, angeschlossen war. Die Probenaufgabe erfolgte im splitless Verfahren, bei welchem das Rückventil für eine Minute lang geschlossen blieb. Als Trägergas fungierte Helium der Qualität 5.0 mit einem konstanten Druck von 12 psi.

3.5.1 Nachweis charakteristischer Fragmente im Single Ion Monitoring (SIM)

Aus 20 µl der Hexanlösung wurde zur Bestimmung des Myosmingehalts 1 µl in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten erfolgte im Massenspektrometrie im SIM Modus (Single Ion Monitoring).

Zur Quantifizierung dienen die zwei Hauptfragmente der zu messenden Substanzen bzw. deuterierte interne Standards. Bei dem verwendeten MS-Programm wurden zwei zeitlich getrennte Messbereiche mit unterschiedlichen Massen definiert (Tabelle 36, Abbildungen 46 und 47).

Tabelle 36: Zeitfenster der verschiedenen SIM Aufnahmen, sowie Retentionszeiten der Substanzen auf einer DB5-MS Säule.

Substanz	Aufgenommenes Zeitintervall (min)	Retentionszeit (min) ¹	Fragmente (m/z)
Myosmin	4,0 bis 11,5	10,104 - 10,220	118
D ₄ -Myosmin		10,193 - 10,220	122
Cotinin	11,5 bis 18,0	13,401 - 13,501	98
D ₃ -Cotinin		13,384 - 13,444	101
Nikotin	4,0 bis 11,5	9,364 - 9,4	84
D ₃ -Nikotin		9,346 - 9,4	87

¹ Retentionszeiten können je nach Säulenlänge geringfügig variieren

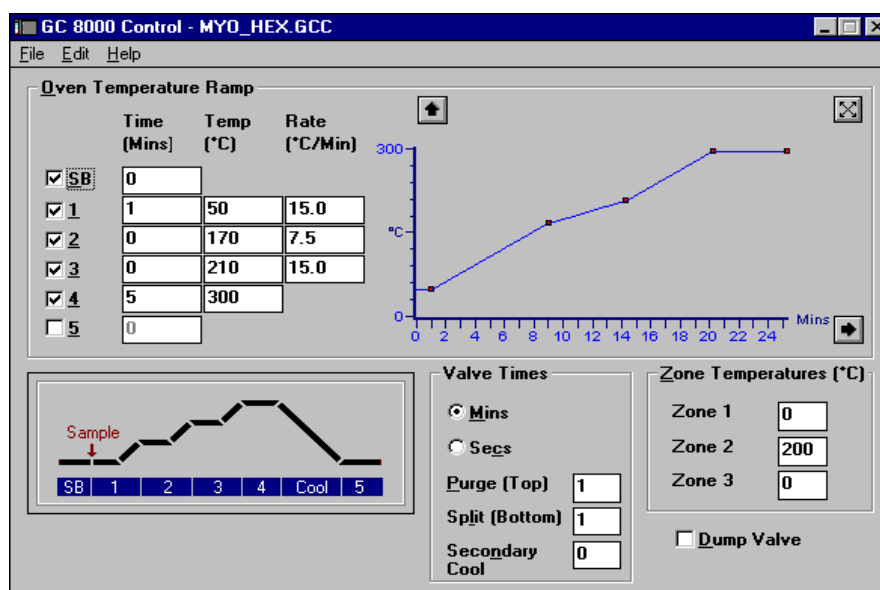


Abbildung 45: Verlauf des GC-Temperaturprogramms.

3.5.1.1 GC-Bedingungen

Säule:	DB 5-MS, J&W Scientific
Injektionsart:	splitless
Injektionstemperatur:	220 °C
Interface-Temperatur:	220 °C
Source-Temperatur:	200 °C
Trägergas:	Helium

Für die Vermessung der Plasma-, Speichel- und Nägelproben wurde folgendes Temperaturprogramm (GC-File: myo_hex.gcc) verwendet (Abbildung 45).

3.5.1.2 MS-Bedingungen

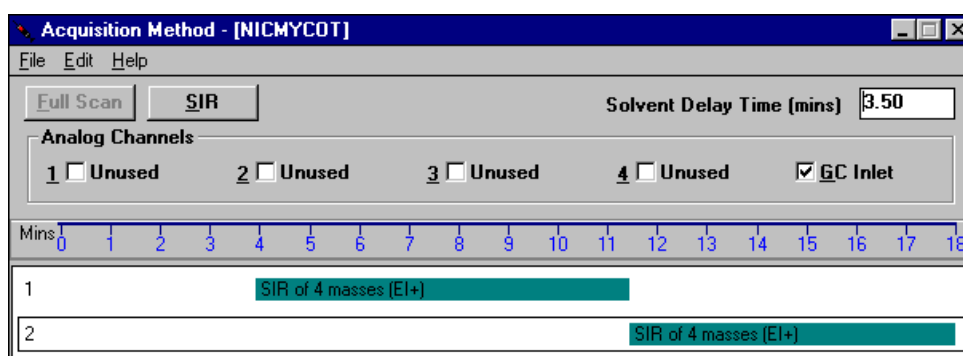


Abbildung 46: Zeitprogramm der einzelnen Massen im MS.

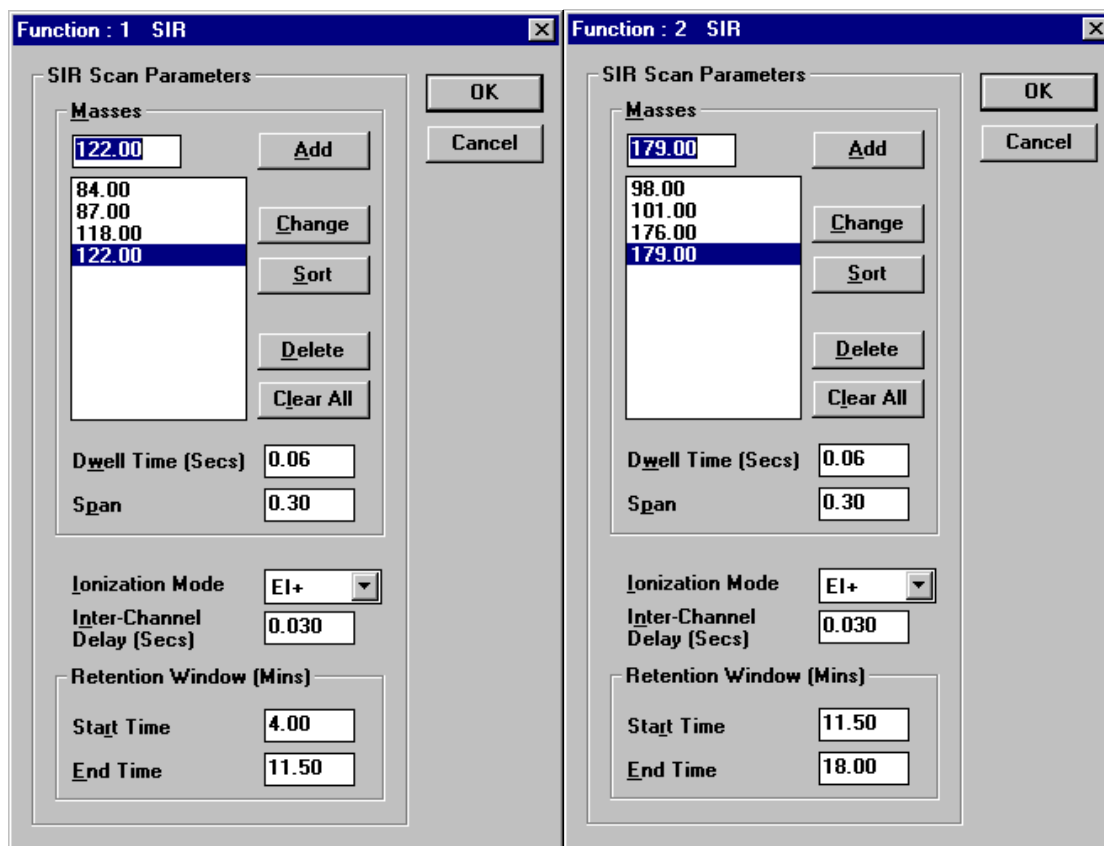


Abbildung 47: Funktion 1 SIR und 2 SIR, Scan Parameters.

3.5.2 Berechnung der Konzentration von Myosmin, Cotinin und Nikotin

Um die Konzentration von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Plasma, Speichel und Zehennägeln zu bestimmen, wurde die Fläche des entsprechenden Ions, wie in der Formel 1 beschrieben, durch die Fläche des internen Standards (ISTD) geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ($M_{\text{Substanz}}/M_{\text{ISTD}}$) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Dieser Wert wurde durch die Menge an eingesetzter Probe (ml bzw. mg) dividiert. Dadurch erhielt man den Wert für die Menge Myosmin, Cotinin bzw. Nikotin in ng/ml, bzw. ng/mg. Die unten genannte Formel beschreibt den Rechenweg für die Berechnung am Beispiel von Myosmin.

$$\text{Myosmin [ng/ml]} = \frac{(\text{Fläche}_{\text{MYO}} - \text{Blindwert}) \cdot M_{\text{MYO}} \cdot \text{absolute Menge}_{\text{D}_4 - \text{MYO}}}{(\text{Fläche}_{\text{D}_4 - \text{MYO}} - \text{Blindwert}) \cdot M_{\text{D}_4 - \text{MYO}} \cdot \text{Menge Probe (ml/mg)}}$$

Formel 1: Berechnung der Konzentration der Alkaloide, anhand des Beispiels von Myosmin.

3.6 Validierung der Methode

Zur Bewertung einer analytischen Methode werden bestimmte Leistungsmerkmale, wie **Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate** im Rahmen einer Methodenvalidierung über einen gewissen Arbeitsbereich bestimmt.

Zur Überprüfung der Methode der Plasmaextraktion wurde anstelle von humanem Plasma Kälberserum verwendet. Anstelle von Zehennägeln wurde synthetisch hergestelltes Keratin benutzt.

3.6.1 Plasma

3.6.1.1 Herstellung der Verdünnungsreihen

Es wurden parallel zwei Reihen mit jeweils neun Proben, sechs wässrigen Blindwerten und vier wässrigen Standards hergestellt.

Die Verdünnungsreihen sollen für **D₀-Myosmin** folgende Konzentrationen enthalten:

0,01 ng; 0,05 ng; 0,1 ng; 0,2 ng; 0,5 ng; 0,8 ng; 1,0 ng; 1,5 ng und 2,0 ng pro ml Plasma.

Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der Methode für Cotinin wurde die Reihe für **D₀-Cotinin** höher angesetzt: **0,2 ng; 0,5 ng; 0,8 ng; 1,0 ng; 1,5 ng; 2,0 ng; 2,5 ng; 3,0 ng und 5 ng** pro ml Plasma.

Die Reihen wurden mit jeweils 2 ml Kälberserum angesetzt (die Blindwerte und wässrigen Standards mit 2 ml Wasser). Den Proben wurde jeweils 8 μl der entsprechenden D₀-Myosmin- und D₀-Cotininkonzentration zugesetzt. Damit konnte die Konzentration der Standardreihen berechnet werden (Formel 2):

$$c[\text{ng}/\mu\text{g}] = \frac{c[\text{ng/ml Plasma}] \times V(\text{Plasma})}{V(\text{zugesetzter Standardlösung})}$$

Formel 2: Berechnung der Konzentration der Standardreihen.

Damit ergab sich folgendes Pipettierschema (Tabellen 37 und 38).

D₀-Myosmin: Stammlösung: c1 (D₀-Myosmin) = 45,00 ng/ μl

D₀-Cotinin: Stammlösung: c1 (D₀-Cotinin) = 50,00 ng/ μl

Tabelle 37: Verdünnungsreihe von D₀-Myosmin.

Myosminkonzentration im Plasma [ng/ml]	Myosminkonzentration im Standard [pg/ μl]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [μl]	Zusatz von CH ₂ Cl ₂ [μl]
2,00	500,0	c1 10	890
1,50	375,0	450	150
1,00	250,0	400	200
0,80	200,0	480	120
0,50	125,0	375	225
0,20	50,0	240	360
0,10	25,0	300	300
0,05	12,5	300	300
0,01	2,5	120	480

2 ml Plasma wurden vorgelegt und jeweils 8 μl einer Konzentration der Myosmin- und der Cotininreihe der entsprechend beschrifteten Plasmaprobe zugesetzt. Dann wurde, dem Protokoll entsprechend der interne Standard zugesetzt. Damit enthielt jede Probe die jeweils gleiche Menge an D₄-Myosmin und die gleiche Menge an D₃-Cotinin. Zusätzlich zu den Reihen wurden Blindwerte angesetzt. Hierfür wurden 2 ml Wasser ohne Zugabe des internen Standards nach dem Protokoll aufgearbeitet. Um zu überprüfen, ob der interne Standard zu einem störenden Signal auf der D₀-Spur führt, wurde dem internen Standard 2 ml reines Wasser

zugesetzt und nach Protokoll aufgearbeitet. Zwei Reihen mit jeweils 9 Proben, 6 Blindwerte und 4 wässrigen Standards ergeben somit eine Anzahl von 28 Proben.

Tabelle 38: Verdünnungsreihe von D₀-Cotin.

Cotininkonzentration im Plasma [ng/ml]	Cotininkonzentration im Standard [pg/μl]	Volumen aus vorheriger Verdünnung [μl]	Zusatz von CH ₂ Cl ₂ [μl]
5,0	1250,0	c1 20,0	780,0
3,0	750,0	360	240
2,5	625,0	500	100
2,0	500,0	480	120
1,5	375,0	450	150
1	250,0	400	200
0,8	200,0	480	120
0,5	125,0	375	225
0,2	50,0	240	360

3.6.2 Zehennägel

3.6.2.1 Herstellung der Verdünnungsreihen

Es wurden parallel zwei Reihen mit jeweils neun Proben, sechs wässrigen Blindwerten und vier wässrigen Standards hergestellt.

Die Verdünnungsreihen enthielten für **D₀-Myosmin** folgende Konzentrationen:

0,001 pg; 0,005 pg; 0,01 pg; 0,05 pg; 0,1 pg; 0,2 pg; 0,5 pg; 0,8 pg; 1,0 pg und 2,0 pg pro mg Keratin.

Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit der Methode für Cotinin und Nikotin wurden die Reihen für **D₀-Cotin** und **D₀-Nikotin** höher angesetzt:

0,02 pg; 0,04 pg; 0,2 pg; 0,5 pg; 0,8 pg; 1,0 pg; 1,5 pg; 2,0 pg; 2,5 pg und 5,0 pg pro mg Keratin.

Die Reihen wurden jeweils mit 20 mg Keratinpuder angesetzt (die Blindwerte und wässrigen Standards mit 2 ml Wasser). Den Proben wurden jeweils 8 μl der entsprechenden D₀-Myosmin-, D₀-Nikotin- und D₀-Cotininkonzentration zugesetzt. Damit kann nun die Konzentration der Standardreihen berechnet werden (Formel 3):

$$c[\text{ng}/\mu\text{g}] = \frac{c[\text{ng}/\text{mg N\u00e4gel}] \times V(\text{N\u00e4gel})}{V(\text{zugesetzter Standardl\u00f6sung})}$$

Formel 3: Berechnung der Konzentration der Standardreihen.

Tabelle 39: Verd\u00fcnnungsreihe D₀-Myosmin.

Myosminkonzentration im Keratin [pg/ml]	Myosminkonzentration im Standard [pg/ μ l]	Volumen aus vorheriger Verd\u00fcnnung [μ l]	Zusatz von CH ₂ Cl ₂ [μ l]
2,0	500,0	c1 10,0	890,0
1,0	250,0	300,0	300,0
0,8	200,0	480,0	120,0
0,5	125,0	375,0	225,0
0,2	50,0	240,0	360,0
0,1	25,0	300,0	300,0
0,05	12,5	300,0	300,0
0,01	2,5	120,0	480,0
0,005	1,25	300,0	300,0
0,001	0,25	120,0	480,0

Tabelle 40: Verd\u00fcnnungsreihe D₀-Cotinin und D₀-Nikotin.

Cot/Nik-Konzentration im Keratin [pg/ml]	Cot/Nik-Konzentration im Standard [pg/ μ l]	Volumen aus vorheriger Verd\u00fcnnung [μ l]	Zusatz von CH ₂ Cl ₂ [μ l]
5,0	1250,0	c1 20,0	780,0
2,5	625,0	300,0	300,0
2,0	500,0	480,0	120,0
1,5	375,0	450,0	150,0
1,0	250,0	400,0	200,0
0,8	200,0	480,0	120,0
0,5	125,0	375,0	225,0
0,2	50,0	240,0	360,0
0,04	10,0	120,0	480,0
0,02	5,0	300,0	300,0

Damit ergab sich folgendes Pipettierschema (Tabellen 39 und 40):

D₀-Myosmin: Stammlösung: c₁ (D₀-Myosmin) = 450 ng/μl

D₀-Cotinin: Stammlösung: c₁ (D₀-Cotinin) = 50,00 ng/μl

D₀-Nikotin: Stammlösung: c₁ (D₀-Nikotin) = 50,00 ng/μl

3.6.3 Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die **Nachweisgrenze** (engl. *limit of detection, LOD*) stellt diejenige Konzentration dar, die qualitativ noch erfasst werden kann. Mit ihr kann das Vorhandensein des Analyten in fünfzig Prozent der Fälle mit der gewählten Methode gezeigt werden. Zur quantitativen Bestimmung berechnet man die **Bestimmungsgrenze** (engl. *limit of determination* bzw. *limit of quantification, LOQ*), sie stellt die Konzentration dar, ab der die Methode vorgegebene Anforderungen an die Präzision erfüllt. Hier wird die Nachweisgrenze nach DIN 32645 bestimmt.

Im Idealfall entspricht dabei die Matrix der Validierungsproben der Matrix der Analysenprobe. Zunächst wird eine Kalibriergerade erstellt, indem die Proben mit den D₀-Analyten in aufsteigender Konzentration versetzt werden, der interne Standard wird jeder Probe in gleicher Konzentration zugegeben. Die Proben werden dann nach dem Methodenprotokoll aufgearbeitet und vermessen. Dabei ist mindestens eine Doppelbestimmung anzusetzen, um die Ergebnisse abzusichern. Nach der **Kalibriergeradenmethode** berechnet sich dann die Nachweisgrenze wie folgt.

$$x_{NG} = \frac{s_y}{m} \times t_{f,\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{\hat{N}} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{XX}}}$$

$$Q_{XX} = \sum_{i=1}^N \bar{x}_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i\right)^2}{N}$$

x_{NG} :	Nachweisgrenze
s_y :	Reststandardabweichung (Abweichung der Messwerte von der Regressionsgeraden)
m :	Steigung der Kalibriergeraden
$t_{f,\alpha}$:	Quantil der studentschen t. Verteilung für Fehler 1. Art (Grenzwert, der abhängt von der Anzahl an Messungen und der Fehlerwahrscheinlichkeit meist 5% ab).
\hat{N} :	Anzahl an Einzelbestimmungen
N :	Anzahl der Kalibrierkonzentrationen
\bar{x}^2 :	Quadrat des Mittelwertes aller Konzentrationen
Q_{XX} :	Quadratsumme (Maß für die Streuung der x-Werte)
x_i :	Mittelwerte der Konzentrationen

Formel 4: Berechnung der Nachweisgrenze anhand der Kalibriergeradenmethode.

In der chromatographischen Praxis wird meist nur die Kalibriergerade bestimmt. Die **Nachweisgrenze** entspricht dann der Konzentration, bei der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) bei **1 zu 3** liegt. Die **Bestimmungsgrenze** liegt bei einem $S/N = 1$ zu **6**.

Doch kommt es häufig bei Messungen zu matrix- bzw. methodenbedingten Blindwerten, wodurch nicht mehr einfach, durch das Signal zu Rausch Verhältnis auf die Nachweisgrenze geschlossen werden kann. Zusätzlich zur Kalibriergeraden werden, wenn vorhanden, die Blindwerte (Leerwerte) vermessen. Über deren Streuung und der Steigung der Kalibriergeraden wird dann die Bestimmungsgrenze berechnet. Hier entspricht die Bestimmungsgrenze dem Mittelwert der Blindwerte plus deren vierfache Standardabweichung, d.h. ab dieser Grenze können Messwerte signifikant vom Blindwert unterschieden werden (vgl. Ausreißertests in der Statistik). Diese Fläche kann dann, mit Hilfe der Gleichung der Kalibriergeraden in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden.

3.6.4 Präzision

Die **Präzision** ist im Messwesen ein Kriterium zur qualitativen Beurteilung eines Messverfahrens. Man erhält die Präzision durch wiederholtes Messen unter gleichen Parametern, mit demselben Messgerät und der gleichen Methode. Die Präzision zeigt somit die Stabilität des Messgeräts und der Methode an. Zur Bestimmung der **Messpräzision** wird ein Standard mehrmals hintereinander gemessen und dann der **Mittelwert mit Standardabweichung** berechnet.

Zur Ermittlung der **Methodenpräzision** wird eine Reihe von gespikten Leerproben hergestellt. Ein Teil wird nacheinander am selben Tag aufgearbeitet und vermessen (*within day*). Der andere Teil wird in einem Intervall von mehreren Wochen aufgearbeitet und vermessen (*between day*). Dann wird jeweils der **Mittelwert mit Standardabweichung** berechnet.

3.6.5 Linearität und Wiederfindungsrate

Nimmt man eine Standardverdünnungsreihe (siehe 2.5.2.1) und vermisst diese ohne Aufarbeitung, so lässt sich die **Linearität** aus der Regression der Geraden und die **Wiederfindungsrate** bestimmen. Die Wiederfindung ergibt sich aus dem Vergleich der Geraden, die man ohne Aufarbeitung und nach Durchlaufen des kompletten Analysengangs erhält.

3.6.6 Statistische Auswertung der Daten

Die in den Versuchen gewonnenen Ergebnisse wurden in die Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft für Windows Excel 2003 (Microsoft, Seattle, USA) und GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA) eingetragen. Anhand dieser Basis-

daten wurden die Absolutwerte, Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD = standard deviation), Standardabweichung vom Mittelwert der Standardfehler (SE = standard error) und die Medianwerte berechnet. Für Werte unterhalb des LOD wurde ein Wert von Null, für Werte zwischen dem LOQ und der LOD, jeweils die Hälfte vom LOQ für die Berechnung verwendet

Die statistischen Analysen und die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism erstellt. Soweit nicht anders angegeben, werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit dem Standardfehler (SE) dargestellt. Nach Prüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test wurde der statistische Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entweder mit dem t-Test (bei Normalverteilung) oder mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt, je nach Voraussetzung mit gepaarten oder mit ungepaarten Daten. Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman Rank Test.

Die Ergebnisse der Schweineplasmaproben sind als Boxplot dargestellt. Dabei entspricht die waagerechte Linie innerhalb des Rechtecks bzw. der Box dem Median der jeweiligen Variablen. Die unteren und oberen Begrenzungen der Box repräsentieren die 25. bzw. 75. Perzentile. Entsprechend liegen 50% aller Messwerte innerhalb des Rechtecks und 50% außerhalb. Die außerhalb der Box vertikal angeordneten Spannweitenlinien (Whisker) markieren die 5. und 95. Perzentile.

Die Ergebnisse der Zehennägel und der Speichelproben werden als Säulendiagramm mit dem jeweiligen Mittelwert und dem Standardfehler dargestellt. Hierbei entspricht die obere Begrenzung der Säule dem Mittelwert und die obere Spannweitenlinie dem SE.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Literaturrecherche

Myosmin wurde erstmals im Jahr 1933 im Zigarettenrauch entdeckt und wurde dementsprechend den Nebenalkaloiden im Tabak zugeordnet.

Seit diesem Zeitpunkt konnte Myosmin in vielen Tabakerzeugnissen wie z.B. Schnupftabak, Zigarren und Zigaretten und dem zugehörigen Rauch identifiziert und quantifiziert werden. In der Tabakpflanze gilt Myosmin als sekundärer Metabolit von Nikotin. Myosmin wurde aber auch in Pflanzen nachgewiesen, die nicht zu der Gattung der Nachtschattengewächse gehören. Das vermeintliche Tabakalkaloid ließ sich aus der Papaya ebenso wie aus dem Nachtjasmin und aus *Duboisia hopwoodii*, einer australischen Pflanzenart, isolieren. Auch im Abwehrsekret der Drüsen einer afrikanischen Ameisenart (*Messor spp.*) war Myosmin enthalten.

Nach der Entdeckung von höheren Mengen an Myosmin in Nüssen 1998 durch *Zwickenpflug*, wurden verschiedene Lebensmittel auf Myosmin untersucht. Tatsächlich war Myosmin in einer Vielzahl von Lebensmitteln nachweisbar. Besonders hohe Rückstände fanden sich in Nüssen, Kartoffeln, Kiwi, Trinkmilch und Sahne. Der Nachweis von Myosmin in Milchprodukten war ein erster Hinweis, dass Myosmin nicht nur in pflanzlichen Produkten, sondern auch in tierischen Nahrungsmitteln vorkommt. Anschließende Untersuchungen von Körperflüssigkeiten wie Speichel, Plasma und Muttermilch ergaben eine Belastung des Menschen mit Myosmin, nicht nur bei Rauchern, sondern in annähernd gleicher Höhe auch bei Nichtrauchern.

Bei der Nitrosierung von Myosmin, die sich unter sauren Bedingungen z.B. im Bereich des ösophagealen Übergangs zur Cardia abspielen könnte, bildet sich das tabakspezifische Nitrosamin NNN, welches in Nagern Tumoren im Ösophagus, der Nase und der Lunge auslöst. Für die kanzerogene Wirkung wird eine instabile Zwischenstufe verantwortlich gemacht, die nicht nur bei der metabolischen Aktivierung von NNN entsteht, sondern auch bei der Nitrosierung und Peroxidierung von Myosmin. Sie führt zu HPB-freisetzenden DNA-Addukten, die mit dem Ösophaguskarzinom in Zusammenhang gebracht werden. Mit dem Comet-Assay konnte gezeigt werden, dass Myosmin *in vitro* DNA-Schäden in humanen Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten wie auch in Zelllinien aus Ösophagus-Adenomkarzinomen erzeugt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Mensch über eine Vielzahl pflanzlicher und tierischer Lebensmittel mit Myosmin belastet wird. Auch wegen des vor kurzer Zeit nachgewiesenen genotoxischen Potentials von Myosmin muss für den Verbraucher ein kanzerogenes Risiko durch dieses Alkaloid in Betracht gezogen werden.

4.2 Analytik

4.2.1 Identifizierung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin

Zur Identifizierung der zu bestimmenden Tabakalkaloide wurden Massenspektren im SCAN-Modus aufgenommen. Dazu wurde eine Standardlösung mit den Analyten Myosmin, Nikotin und Cotinin und deren deuterierten Standards hergestellt. Das im EI-Modus erhaltene Fragmentierungsmuster der jeweiligen Substanz musste dem Referenzspektrum von Myosmin, Nikotin und Cotinin entsprechen. Zusätzlich wurde das jeweilige Spektrum einer Probe mit einem Standardspektrum der MassLab[®] Computerdatenbank verglichen (Abbildungen 51, 55 und 59). Auch hier wurden die Spektren auf Übereinstimmung überprüft. Je nach Gerät muss dabei berücksichtigt werden, dass die Spektren geringfügig unterschiedliche Fragmentierungsverhältnisse aufweisen können. Zur weiteren Identifizierung werden die Retentionszeiten der D₀-Standardlösungen herangezogen, dabei sollten diese mit den jeweiligen deuterierten Standardlösungen übereinstimmen. Der D₀-Peak liegt in der Regel zeitlich direkt nach dem entsprechenden Peak des deuterierten Standards auf dem Chromatogramm.

4.2.1.1 Fragmentierung von Myosmin

Durch Elektronenbeschuss zerfällt Myosmin in die Hauptfragmente m/z 146, 145 und 118 (Abbildung 48) [240], was sich dementsprechend im Spektrum von Myosmin widerspiegelt (Abbildung 49).

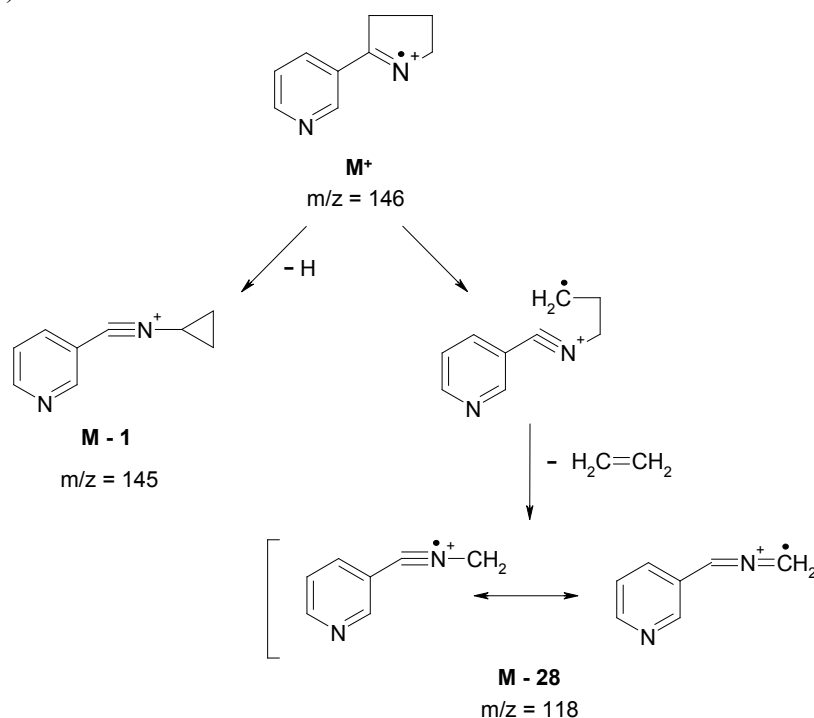


Abbildung 48: Hauptfragmente von Myosmin.

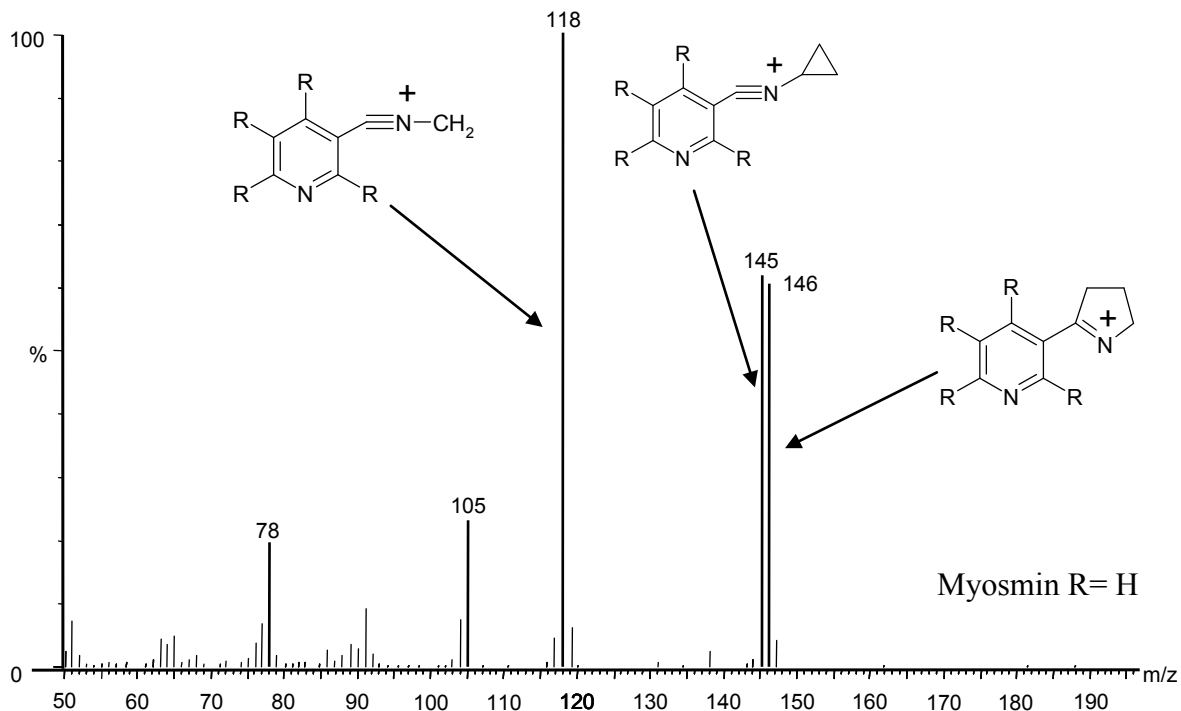


Abbildung 49: Massenspektrum von Myosmin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z: 50-200 bei 70 eV.

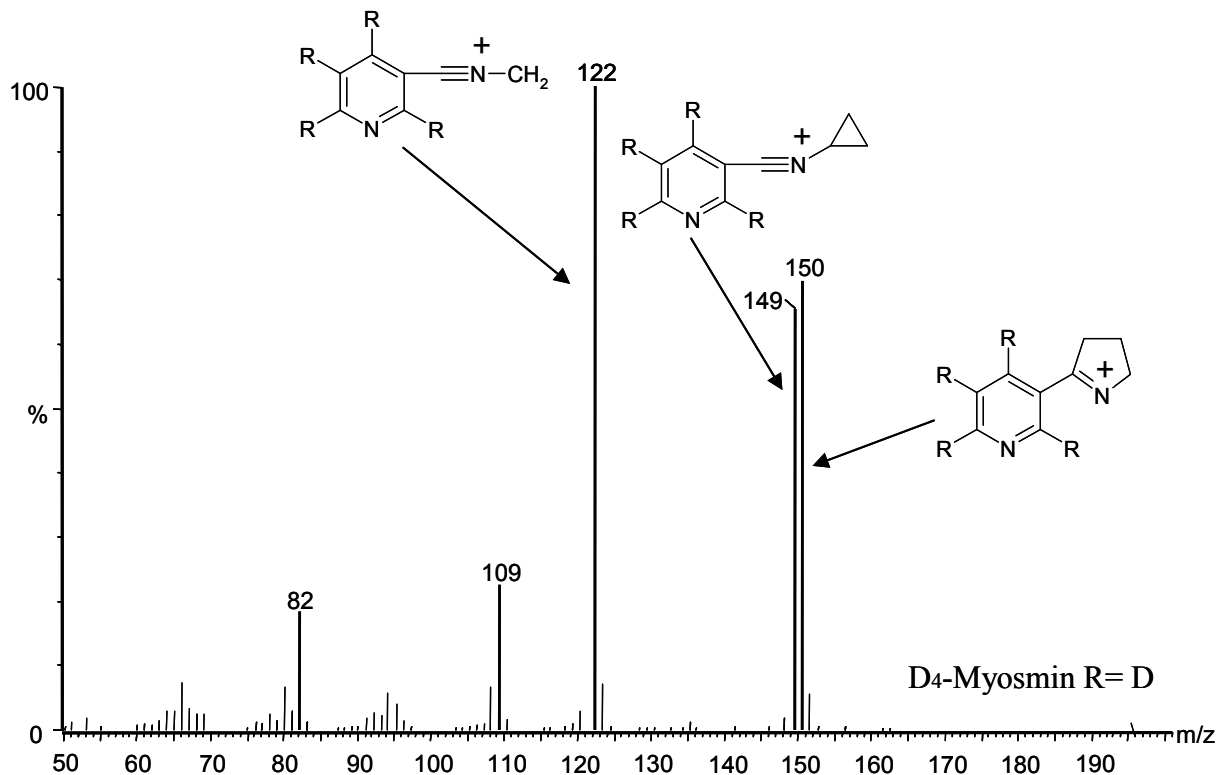


Abbildung 50: Massenspektrum von D₄-Myosmin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z: 50-200 bei 70 eV.

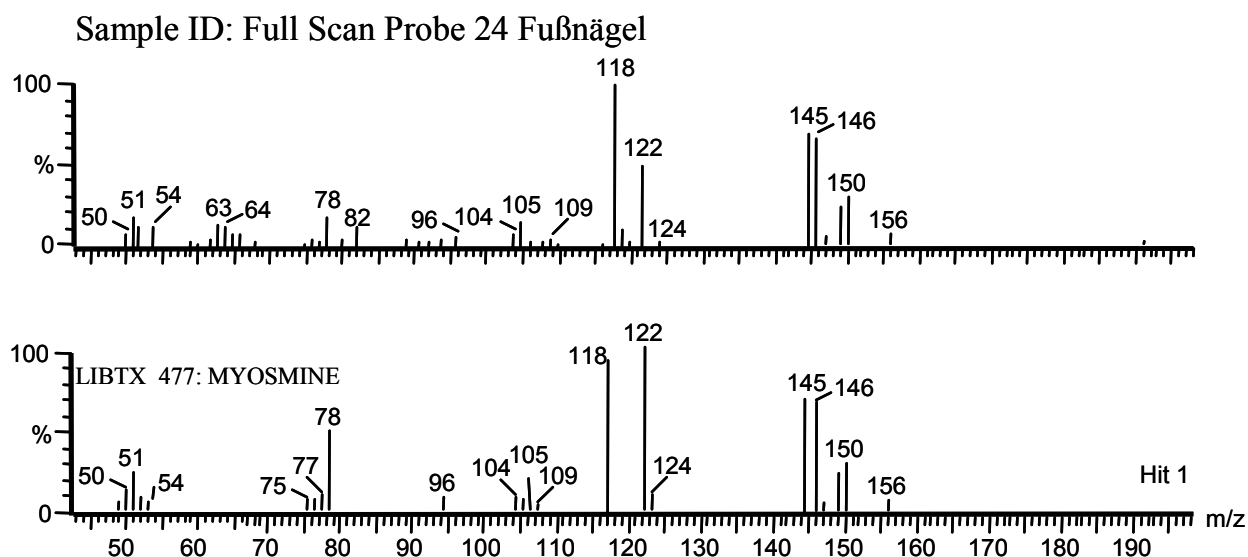


Abbildung 51: Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab® Datenbank (unten).

4.2.1.2 Fragmentierung von Cotinin

Die Hauptfragmente nach Ionisierung durch Elektronenbeschuss von Cotinin stellen die Massen 98, 119, 118 und 147 dar. Der Molekülpeak von Cotinin ist m/z 176 (Abbildung 52) was auch im Spektrum von Cotinin zu sehen ist (Abbildung 53).

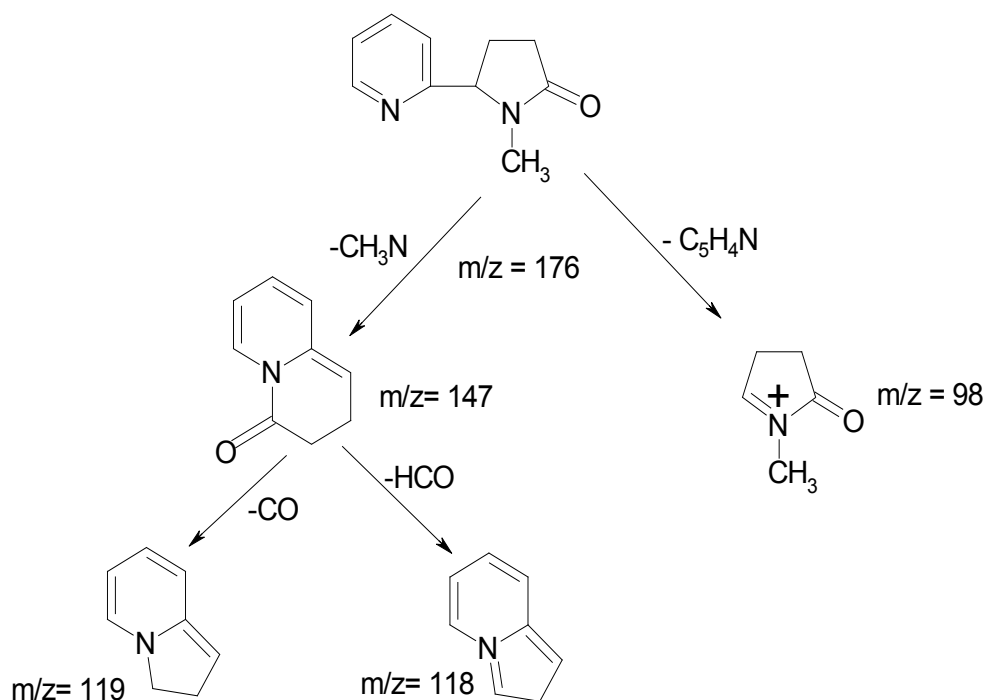


Abbildung 52: Hauptfragmente von Cotinin [240].

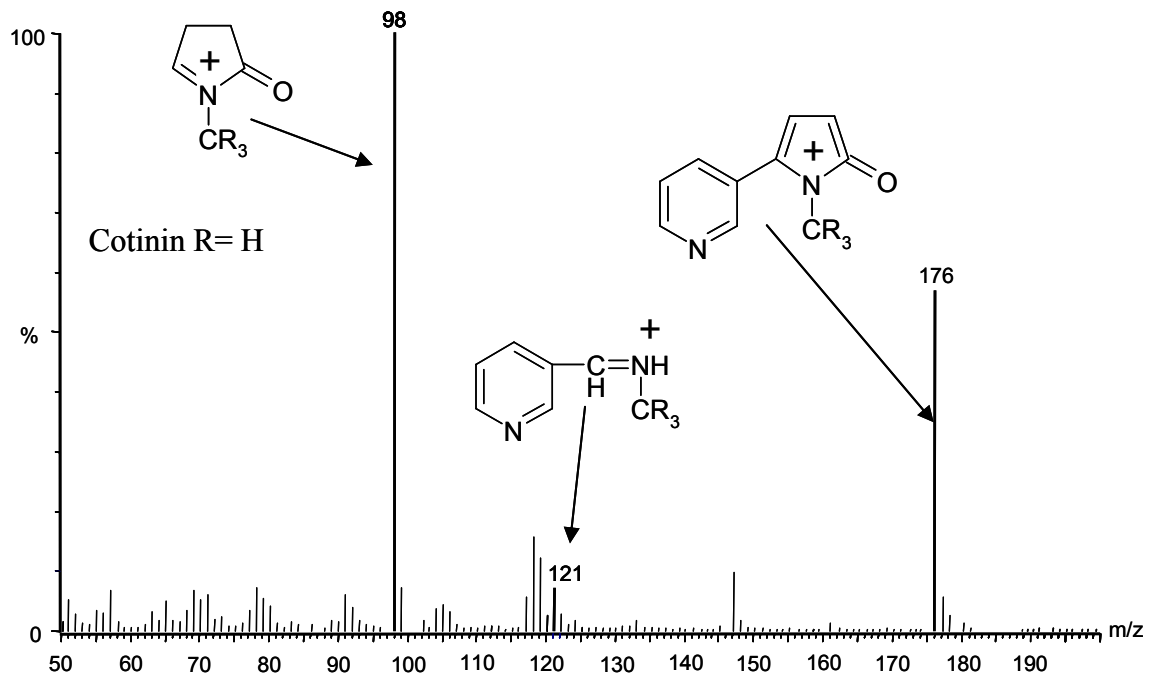


Abbildung 53: Massenspektrum von Cotinin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.

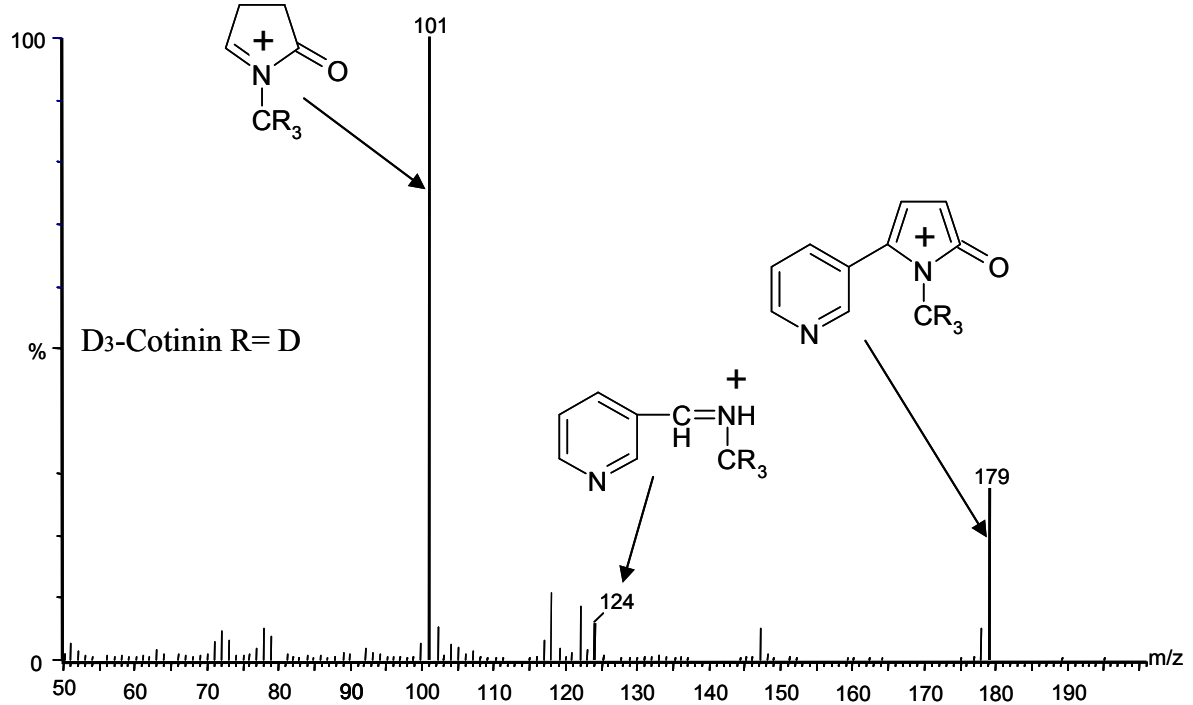


Abbildung 54: Massenspektrum von D₃-Cotinin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.

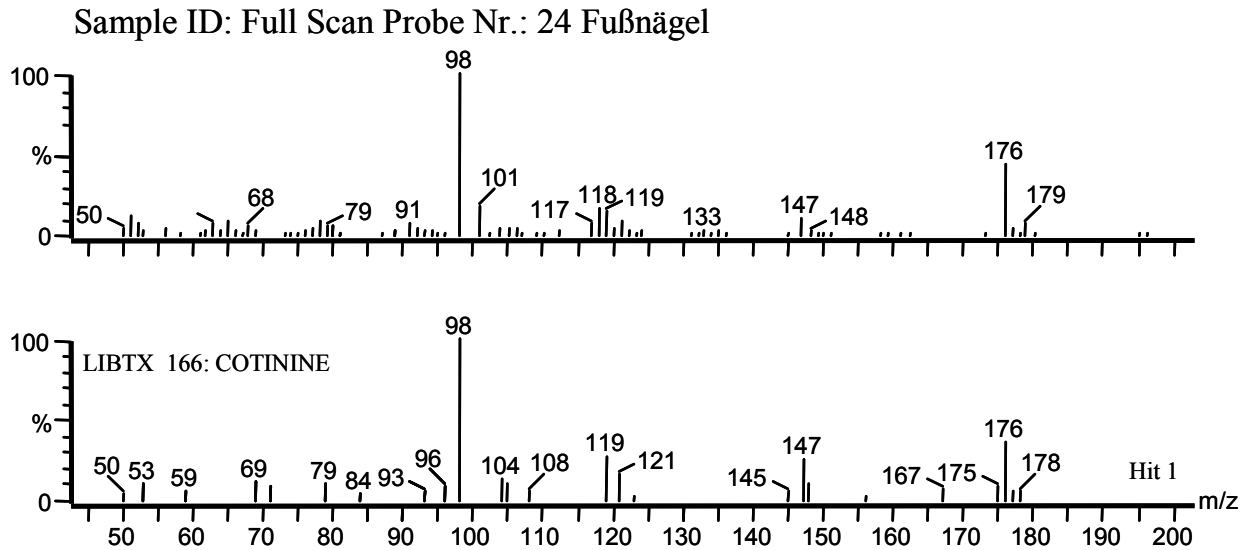


Abbildung 55: Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab[®] Datenbank (unten).

4.2.1.3 Fragmentierung von Nikotin

Das Hauptfragment des Nikotins stellt das Masseladungsverhältnis 84 dar. Weitere Fragmente von Nikotin können auf den Massen 119 und 133 beobachtet werden. Das Fragment des Molekülions zeichnet sich auf der Masse 162 ab (Abbildung 56) dazu im Vergleich das Spektrum von Nikotin (Abbildung 57).

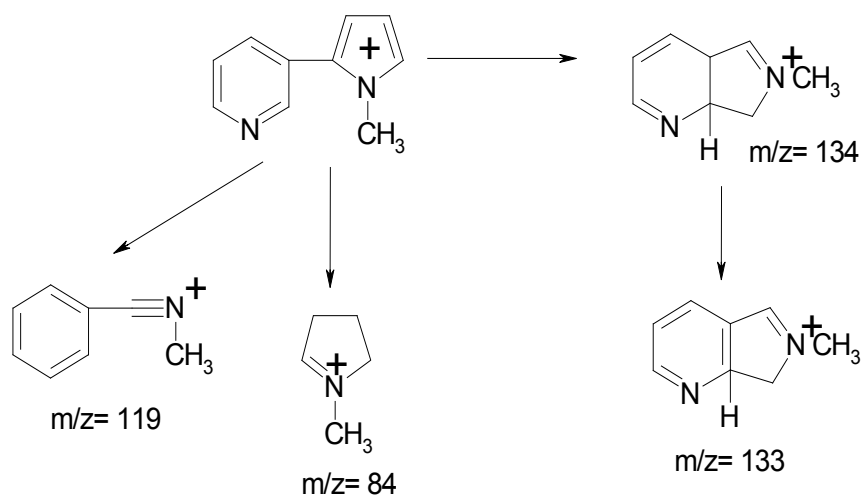


Abbildung 56: Hauptfragmente von Nikotin.

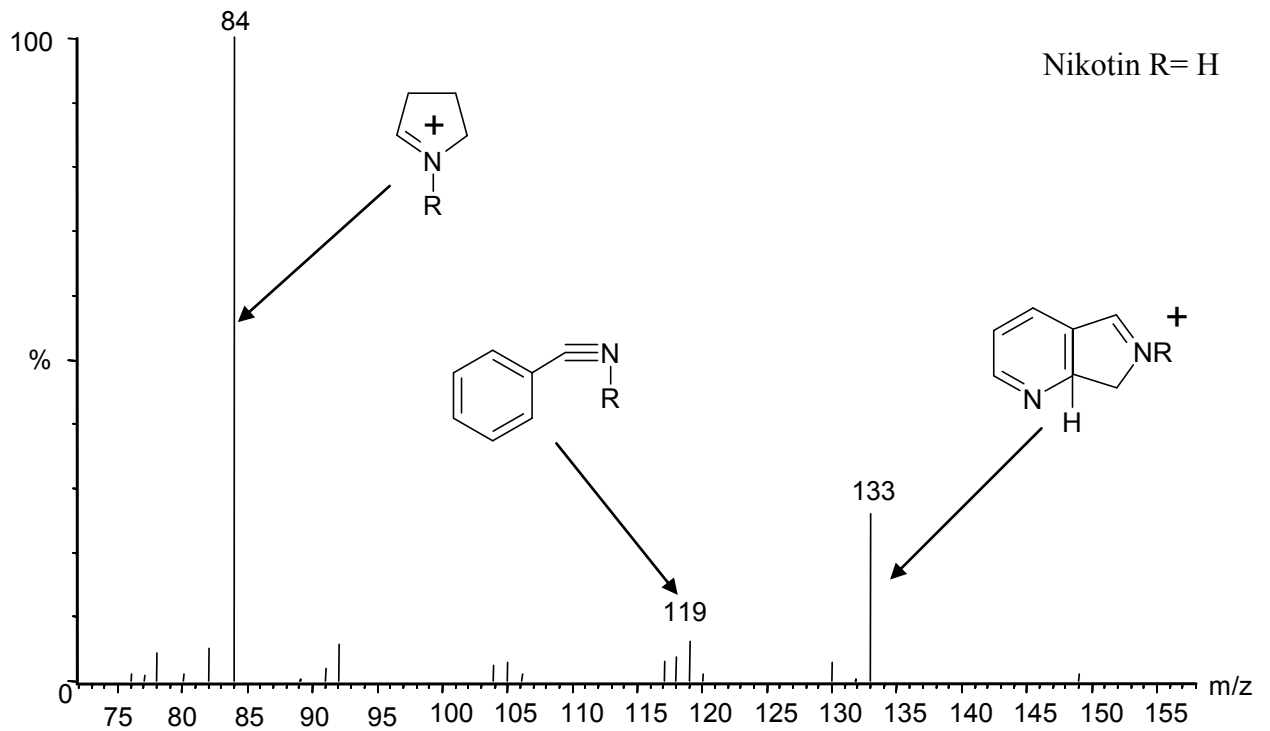


Abbildung 57: Massenspektrum von Nikotin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.

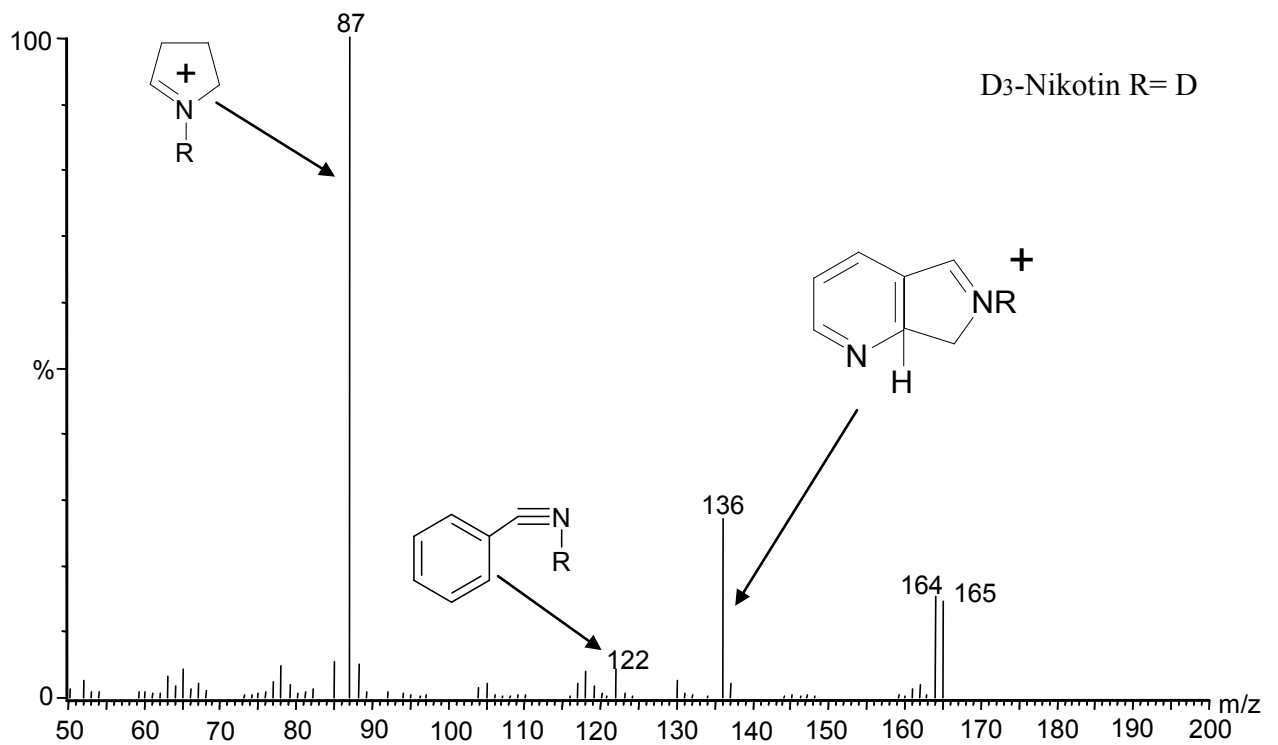


Abbildung 58: Massenspektrum von D₃-Nikotin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.

Sample ID: Full Scan Probe 24 Fußnägel

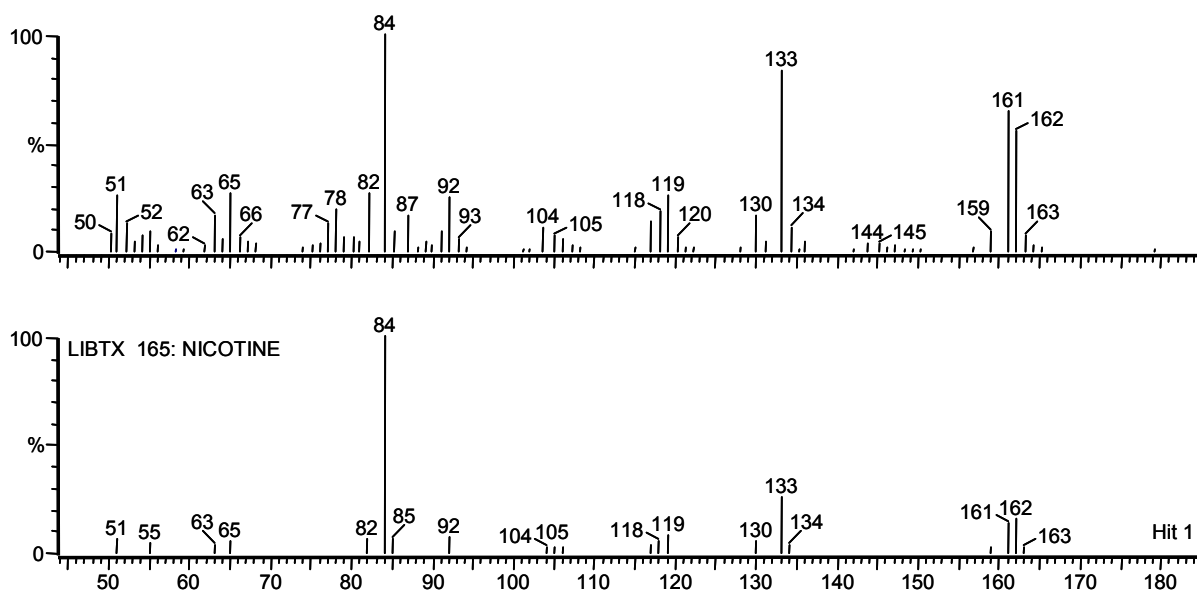


Abbildung 59: Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab® Datenbank (unten).

4.2.2 Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln

Die Validierung der Zehennägel wurde mit synthetisch hergestelltem Keratin durchgeführt.

4.2.2.1 Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode

Bei der Präzision wird zwischen **Messpräzision**, **Tagespräzision** und **Wochenpräzision** unterschieden. Zur Bestimmung der Messpräzision wurde eine Standardlösung sechsmal hintereinander an einem Tag vermessen. Bei der Tages- und Wochenpräzision wurden jeweils verschiedene Nagelproben gepoolt und durch sehr feines Zermahlen homogenisiert.

Bei der **Tagespräzision** wurden diese Proben an einem Tag so aufgearbeitet, als wären es zu analysierende Proben. Die Proben wurden alle mit dem zugehörigen Standard der Konzentration 4 ng/ml Myosmin, 10,5 ng/ml Cotinin und 10 ng/ml Nikotin versehen. Von jeder Probe wurde 1 µl in das GC/MS eingespritzt und auf den entsprechenden Massenspuren vermessen. Neben den Abweichungen der Flächeneinheiten wurde ebenso die Konzentration des jeweiligen D₀-Analyten bestimmt. Die Konzentrationen der Analyten sollten ebenso immer im gleichen Bereich liegen (Tabelle 41).

Die **Wochenpräzision** gleicht der Tagespräzision. Hier wurden über sechs Wochen die Proben der gleichen Ausgangsmatrix aufgearbeitet (Tabelle 42).

Tabelle 41: Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel (MW \pm SD, n = 6).

Substanz	Flächeneinheiten (AU \times 10 ⁶)	Abweichungen	Konzentration (ng/mg)
Myosmin	5,78 \pm 0,84	14,53%	0,11 \pm 0,01
D ₄ -Myosmin	11,40 \pm 0,15	1,35%	-
Cotinin	101,87 \pm 13,56	13,30%	0,63 \pm 0,05
D ₃ -Cotinin	64,00 \pm 4,32	6,75%	-
Nikotin	351,45 \pm 15,48	4,40%	2,98 \pm 0,14
D ₃ -Nikotin	46,10 \pm 1,03	2,24%	-

Tabelle 42: Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel (MW \pm SD, n = 6).

Substanz	Flächeneinheiten (AU \times 10 ⁶)	Abweichungen	Konzentration (ng/mg)
Myosmin	8,22 \pm 0,66	8,00%	0,07 \pm 0,00
D ₄ -Myosmin	19,55 \pm 2,05	10,50%	-
Cotinin	151,51 \pm 13,19	8,70%	0,49 \pm 0,06
D ₃ -Cotinin	120,99 \pm 7,98	6,59%	-
Nikotin	437,76 \pm 34,89	7,97%	0,32 \pm 0,01
D ₃ -Nikotin	525,38 \pm 17,54	3,33%	-

4.2.2.2 Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß

Anhand der unter 2.5.2.1. beschriebenen hergestellten Verdünnungsreihen wurde die Linearität für alle drei Analyten mit doppeltem Ansatz bestimmt. Die Linearität wurde durch das Bestimmtheitsmaß (r^2) berechnet, gleichzeitig konnte durch Vergleich der gemessenen Reihe mit der aufgearbeiteten Verdünnung die Wiederfindung bestimmt werden. Es ergaben sich Bestimmtheitsmaße von 0,97-0,99 (Abbildung 60).

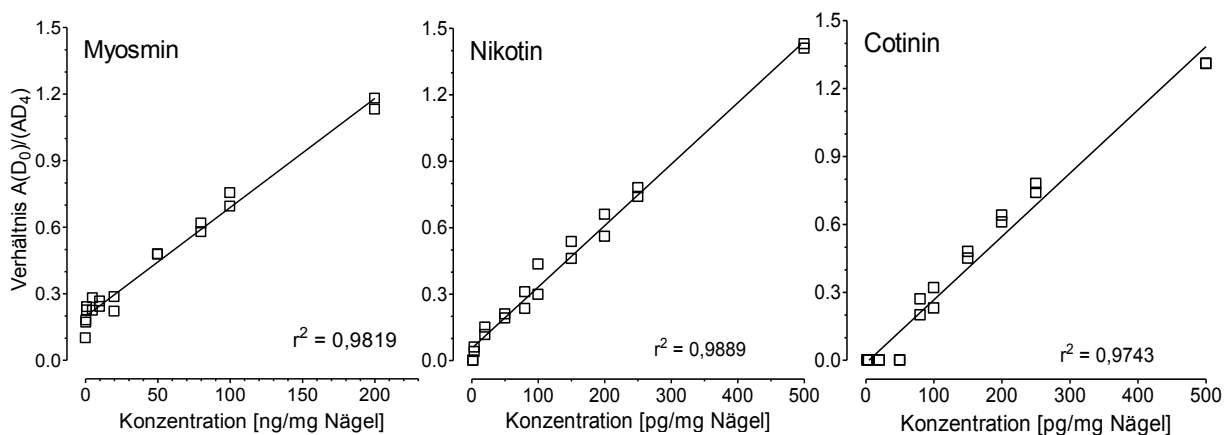


Abbildung 60: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin, Cotinin und Nikotin.

4.2.2.3 Wiederfindung der Analyten

Die *Wiederfindung* des internen Standards lag für Myosmin bei ca. 100%, für Cotinin bei 97,4% und für Nikotin bei 98% (Tabelle 43).

Tabelle 43: Wiederfindung der internen Standards aus Keratin (MW \pm SD, n = 9).

Substanz	D ₄ -Myosmin	D ₃ -Nikotin	D ₃ -Cotinin
Wiederfindung (%)	102 \pm 3,59	98,02 \pm 11,48	97,37 \pm 6,67

4.2.2.4 Identifizierung der Nachweisgrenze und Festlegung der Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde bei allen Analyten durch die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 anhand der Verdünnungsreihen bestimmt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei allen drei Analyten als der 3-fache Wert der Nachweisgrenze festgelegt. (Tabelle 44).

Tabelle 44: Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der Tabakalkaloide in Keratin.

Substanz	Myosmin	Nikotin	Cotinin
Nachweisgrenze (LOD) [ng/mg]	0,01	0,021	0,035
Bestimmungsgrenze (LOQ) [ng/mg]	0,03	0,062	0,107

LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification

4.2.3 Validierung der Methode zur Bestimmung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Speichel und Plasma

Die Validierung der Analytik wurde mit Kälberserum stellvertretend für Plasma und Speichel durchgeführt.

4.2.3.1 Überprüfung der Präzision der GC/MS Anlage und der Methode

Tages- und Wochenpräzision für Myosmin und Cotinin (Tabellen 45 und 46) wurden mit Kälberserum nach dem gleichen Schema bestimmt wie für Keratin (siehe Kapitel 3.1.2.1).

Tabelle 45: Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW \pm SD, n = 6).

Substanz	Flächeneinheiten (AU \times 10 ⁶)	Abweichungen	Konzentration (ng/ml)
Myosmin	7,10 \pm 1,05	14,75%	0,13 \pm 0,02
D ₄ -Myosmin	21,39 \pm 2,89	13,52%	-
Cotinin	10,18 \pm 0,76	7,47%	0,01 \pm 0,01
D ₃ -Cotinin	54,36 \pm 5,13	9,43%	-

Tabelle 46: Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW \pm SD, n = 6).

Substanz	Flächeneinheiten (AU \times 10 ⁶)	Abweichungen	Konzentration (ng/ml)
Myosmin	10,79 \pm 1,93	17,85%	0,16 \pm 0,02
D ₄ -Myosmin	20,73 \pm 1,23	5,95%	-
Cotinin	30,59 \pm 1,14	3,71%	0,20 \pm 0,01
D ₃ -Cotinin	80,87 \pm 1,28	1,58%	-

4.2.3.2 Bestimmung von Linearität und Bestimmtheitsmaß

Anhand der wie unter 2.5.1.1 beschriebenen hergestellten Verdünnungsreihen wurde die Linearität für beide Analyten bestimmt. Die Bestimmung wurde mit doppeltem Ansatz durchgeführt. Zur Angabe der Linearität wurde das Bestimmtheitsmaß (r^2) berechnet, gleichzeitig konnte durch Vergleich der gemessenen Reihe mit der aufgearbeiteten Verdünnung die Wiederfindung bestimmt werden. Die Bestimmtheitsmaße der Verdünnung von Myosmin und Cotinin liegen bei 0,99 und 0,98 (Abbildung 61).

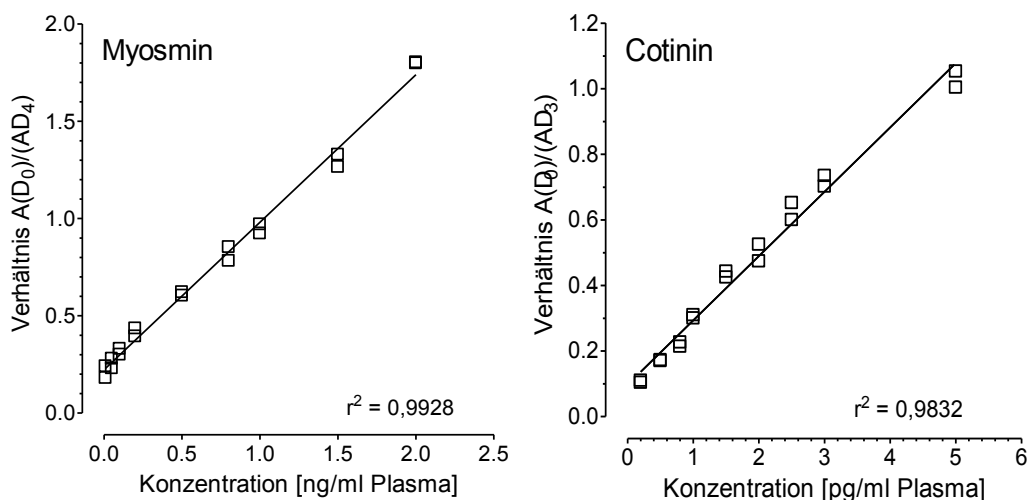


Abbildung 61: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin und Cotinin im Speichel.

4.2.3.3 Wiederfindung der Analyten

Die Wiederfindung des internen Standards lag für Myosmin bei 92,59% und für Cotinin bei 91,11% (Tabelle 47).

Tabelle 47: Wiederfindung der internen Standards aus Kälberserum (MW \pm SD, n = 9).

Substanz	D ₄ -Myosmin	D ₃ -Cotinin
Wiederfindung (%)	92,59 \pm 10,03	91,11 \pm 12,4

4.2.3.4 Identifizierung der Nachweisgrenze und Festlegung der Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze entspricht der Konzentration, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) bei 1 zu 3 liegt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei einem S/N = 1 zu 6 (Tabelle 48).

Tabelle 48: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (ng/ml) in Plasma und Speichel.

Analyt	Nachweisgrenze (LOD)	Bestimmungsgrenze (LOQ)
Myosmin	0,0012	0,0036
Cotinin	0,05	0,16

LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification

4.3 Bestimmung von Myosmin im Plasma von Schweinen und im Schweinefutter

4.3.1 Tiere

Im Rahmen der Studie wurde das Plasma von 25 Schweinen der Rasse Masthybrid Edelschwein/Landrasse auf Myosmin untersucht. Alle Tiere waren Eigentum des Landesversuchsgut (LVG) München, Oberschleißheim. Das Alter der Tiere betrug im Durchschnitt sieben Monate, das Gewicht 105 kg. Sie wurden mit einem selbst gemischten Futter *ad libitum* gefüttert (Tabelle 49).

Bei 13 Tieren wurde nach dem Fressen Blut in EDTA-K-Monovetten abgenommen, den anderen 12 Tieren wurde das Blut nach dem Schlachten abgeführt. Dementsprechend befanden sich diese Tiere in einem nüchternen Zustand. Danach wurde durch Zentrifugieren das Plasma gewonnen.

4.3.2 Bestimmung von Myosmin im Schweineplasma

In 24 von 25 Plasmaproben konnte Myosmin qualitativ und quantitativ mit GC/MS nachgewiesen werden. Lediglich in einer Plasmaprobe eines nüchternen Tieres lag Myosmin unter dem LOD. Die Myosminkonzentrationen im Plasma zeigten bei den Tieren vor und nach der Futteraufnahme signifikante Unterschiede. Im Mittel lagen die Myosminkonzentrationen der nüchternen Schweine bei 0,066 ng/ml und bei den Tieren, die kurz zuvor gefressen hatten, mehr als siebenfach höher bei 0,497 ng/ml (Abbildung 62). Je ein repräsentatives Chromatogramm von Plasma eines nüchternen und eines gefütterten Schweins zeigen die Abbildungen 63 und 64.

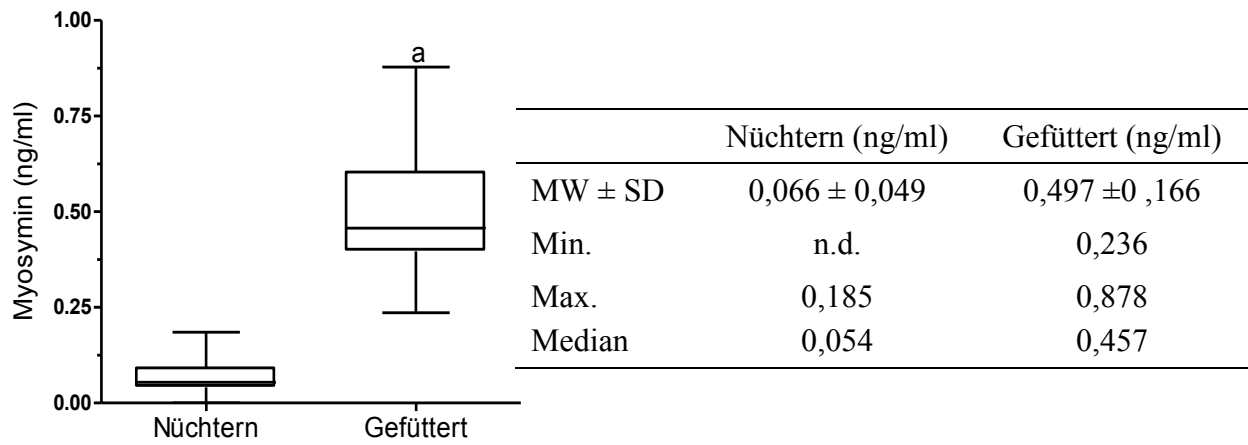


Abbildung 62: Konzentrationsunterschiede von Myosmin zwischen nüchternen (n = 12) und gefütterten Schweinen (1 h nach Fütterungsbeginn; n = 13), a: signifikant verschieden von den Nüchternwerten, p < 0,0001.

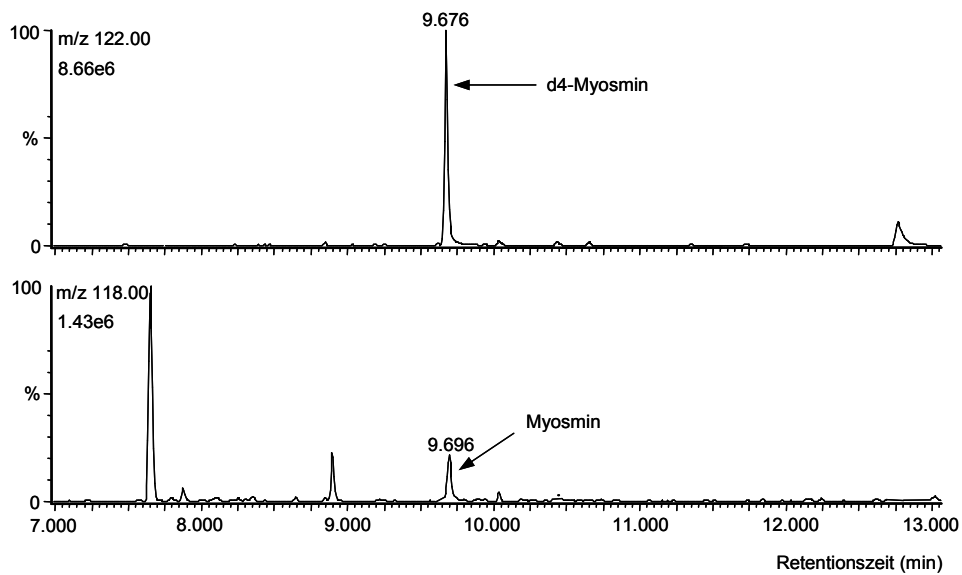


Abbildung 63: Chromatogramm von D₄-Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus der Plasmaprobe eines nüchternen Schweins, aufgenommen jeweils im SIM-Modus bei den entsprechenden Massenspuren m/z 122 und m/z 118.

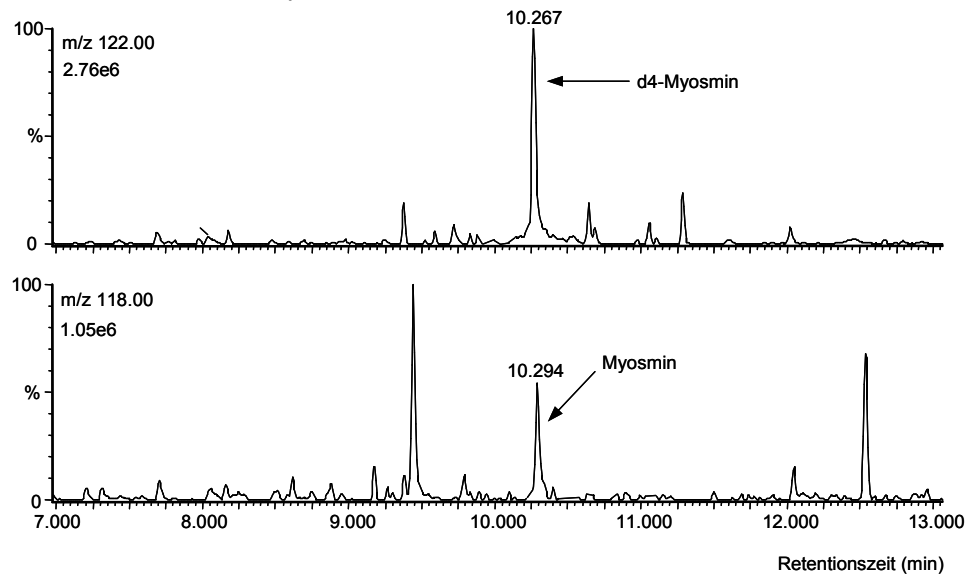


Abbildung 64: Chromatogramm von D₄-Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus der Plasmaprobe eines gefütterten Schweins, aufgenommen jeweils im SIM-Modus bei den entsprechenden Massenspuren m/z 122 und m/z 118.

4.3.3 Zusammensetzung und Analyse des Schweinetrockenfutters

Zusätzlich zum Plasma wurde auch das Trockenfutter (Endmast) analysiert. Das Futter für die Mastschweine wurde im LVG eigens für die Tiere vorgemischt. Die Tiere erhielten Futter *ad libitum*. Im Mittel frisst ein Mastschwein mit einem durchschnittlichen Gewicht von 105 kg täglich ca. 2,75 kg [241]. Das Futter enthielt folgende Inhaltsstoffe (Tabelle 49):

Tabelle 49: Inhaltsstoffe und Zusammensetzung des Endmastfutters, Angaben vom LVG-München.

Alleinfuttermittel bis 107 kg

Zusammensetzung:

55% Gerste	12% Weizen	11% Mais	5% Hafer
14,5% Soja	2,5% Mineralfutter		

Inhaltsstoffe:

18,50% Rohprotein (mit 1,45% Lysin)

8,00% Rohfett

3,60% Rohfaser

5,50% Rohasche (mit 0,70% Calcium, 0,56% Phosphor und 0,20% Natrium)

Von dem Futter wurden jeweils 500 mg sehr fein gemörsert, einen Tag lang in Wasser mit einem Magnetrührer gerührt und anhand der Vorschrift für Plasma- und Speichelanalysen aufgearbeitet. Die Vermessung von 3 Proben mit GC/MS ergab eine mittlere Myosminkonzentration von 124 ng/g (Abbildung 65).

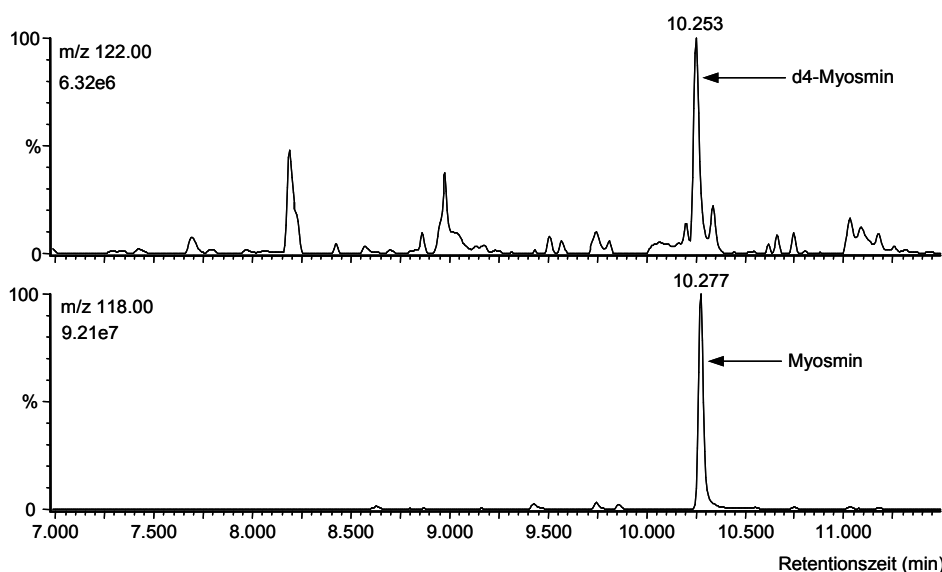


Abbildung 65: Chromatogramm von D₄-Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus einer Futterprobe (aufgenommen im SIM-Modus).

4.4 **Bestimmung von Myosmin, Nikotin und Cotinin in Zehennägeln und Speichel von Menschen**

4.4.1 **Demographische Daten der Probanden**

Im Rahmen der Studie wurden von 26 Probanden Zehennägel und Speichel von 24 Probanden auf die jeweiligen Tabakalkaloide untersucht (Tabelle 50). Unter den Probanden befanden sich 15 Zigarettenraucher und 11 Nichtraucher. Der Raucherstatus wurde anhand eines Fragebogens ermittelt. Das Alter der Probanden lag im Durchschnitt bei 39 Jahren (17-71 Jahre), der Zigarettenkonsum bei den Rauchern im Durchschnitt bei 19 Zigaretten (Fragebogen im Anhang).

Tabelle 50: Demographische Daten und Angaben der Probanden laut Fragebogen.

Anzahl Probanden	26
Geschlecht: m/w	16/10
Alter (Jahre): MW \pm SD (Min./Max.)	39 \pm 16 (17/71)
Raucherstatus: Ja/Nein	15/11
Rauchprodukt: Zigarette	15
Lackieren der Nägel: Ja/Nein	5/21
Nagelerkrankung: Ja/Nein	1/26

m: männlich, w: weiblich, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

4.4.2 **Konzentration von Myosmin, Nikotin und Cotinin in Zehennägeln**

Myosmin lag nur bei einem Nichtraucher unter der Nachweisgrenze (LOD). Bei 7 weiteren Nichtrauchern lag die Myosminkonzentration noch unter der Bestimmungsgrenze (LOQ), hier wurde die Hälfte des LOQ für die Berechnung der Mittelwerte eingesetzt. Bei den Rauchern war in allen Proben Myosmin nachweisbar, nur 2 Werte lagen unter dem LOQ. Cotinin konnte bei allen Rauchern nachgewiesen werden, während bei den Nichtrauchern nur ein Wert über dem LOQ lag, alle anderen unter dem LOD. Nikotin war bei allen Rauchern und bis auf 2 Probanden auch bei allen Nichtrauchern zu bestimmen.

Bei Nichtrauchern lag im Fall von Myosmin der Mittelwert bei 0,021 ng/mg, bei Rauchern bei 0,058 ng/mg ($p < 0,01$). Cotinin war bei Nichtrauchern nicht bestimmbar, bei Rauchern lag der Mittelwert bei 1,136 ng/mg ($p < 0,0001$). Die Nikotinkonzentration in den Zehennägeln der Nichtraucher betrug im Mittel 0,128 ng/mg, die der Raucher 1,789 ng/mg ($p < 0,0001$) (Abbildung 66 und Tabelle 51).

Tabelle 51: Vergleichende Ergebnisse der Analytenkonzentrationen in Zehennägeln zwischen Rauchern und Nichtrauchern (MW \pm SD; ng/mg; Statistik siehe Abbildung 66).

Nichtraucher (n = 11)			Raucher (n = 15)		
Myosmin	Cotinin	Nikotin	Myosmin	Cotinin	Nikotin
0,021 \pm 0,014	0	0,128 \pm 0,079	0,058 \pm 0,052	1,136 \pm 0,843	1,789 \pm 0,964

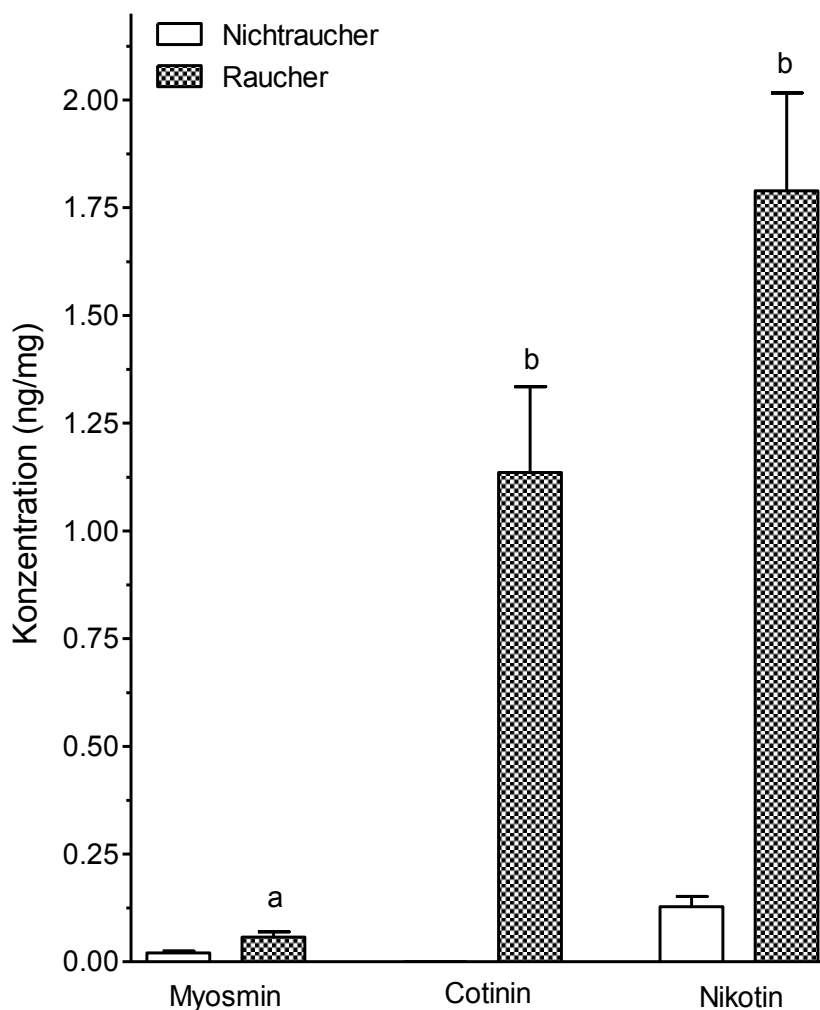


Abbildung 66: Vergleichende Darstellung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln zwischen Nichtrauchern und Rauchern (MW \pm SE), a, b: signifikant verschieden von Nichtraucherwerten, $p < 0,01$ (a) und $p < 0,0001$ (b).

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln von Rauchern und Nichtrauchern sind in der Abbildung 67 dargestellt. Es ergeben sich signifikante Korrelationen sowohl zwischen den Konzentrationen von Myosmin und Nikotin (Spearman $r = 0,67$), als auch zwischen der Myosmin- und Cotininkonzentration ($r = 0,63$). Eine deutlich bessere Korrelation ($r = 0,83$) besteht zwischen den Cotinin- und Nikotinwerten. In Abbildung 68 sind repräsentative Chromatogramme einer Zehennagelprobe eines Rauchers dargestellt.

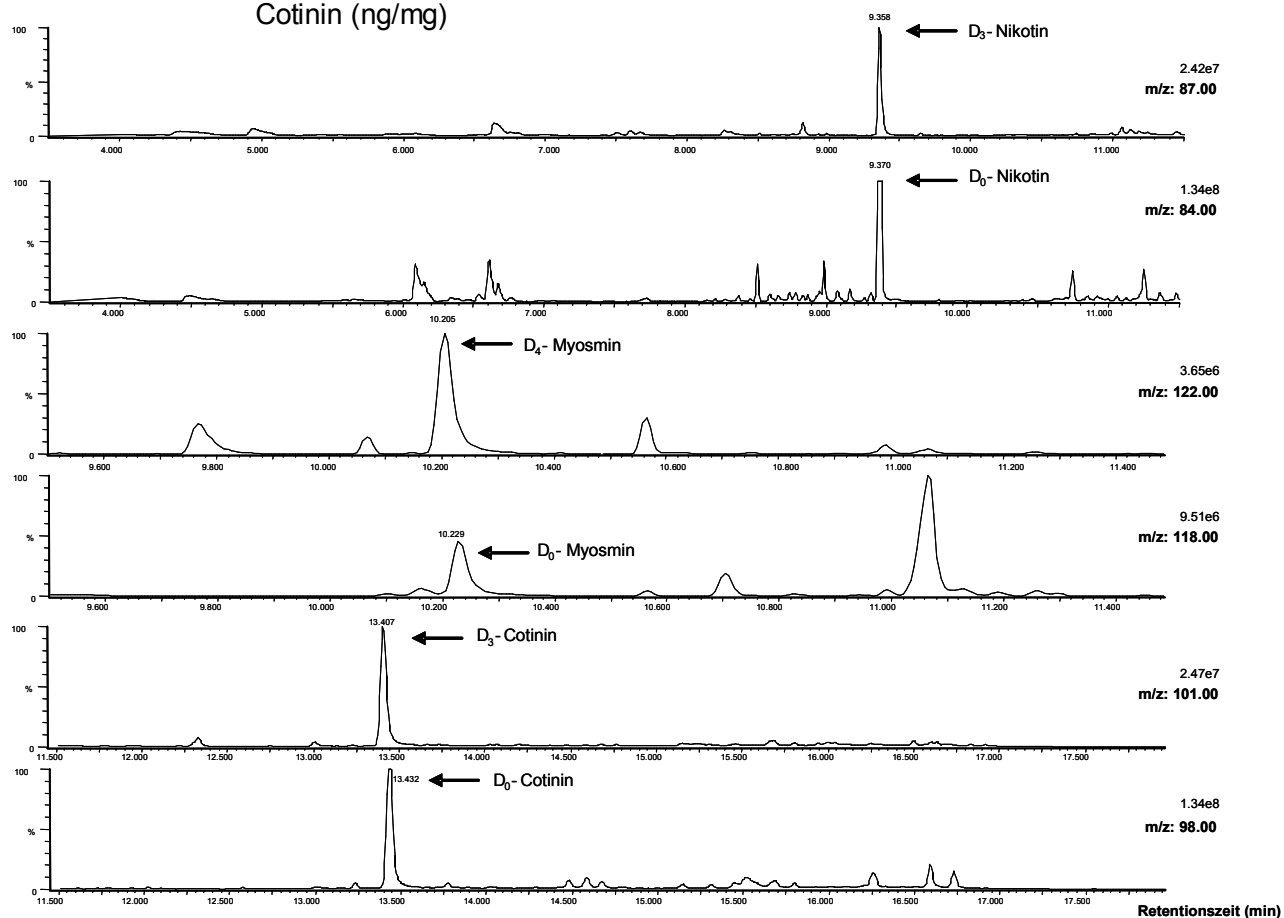
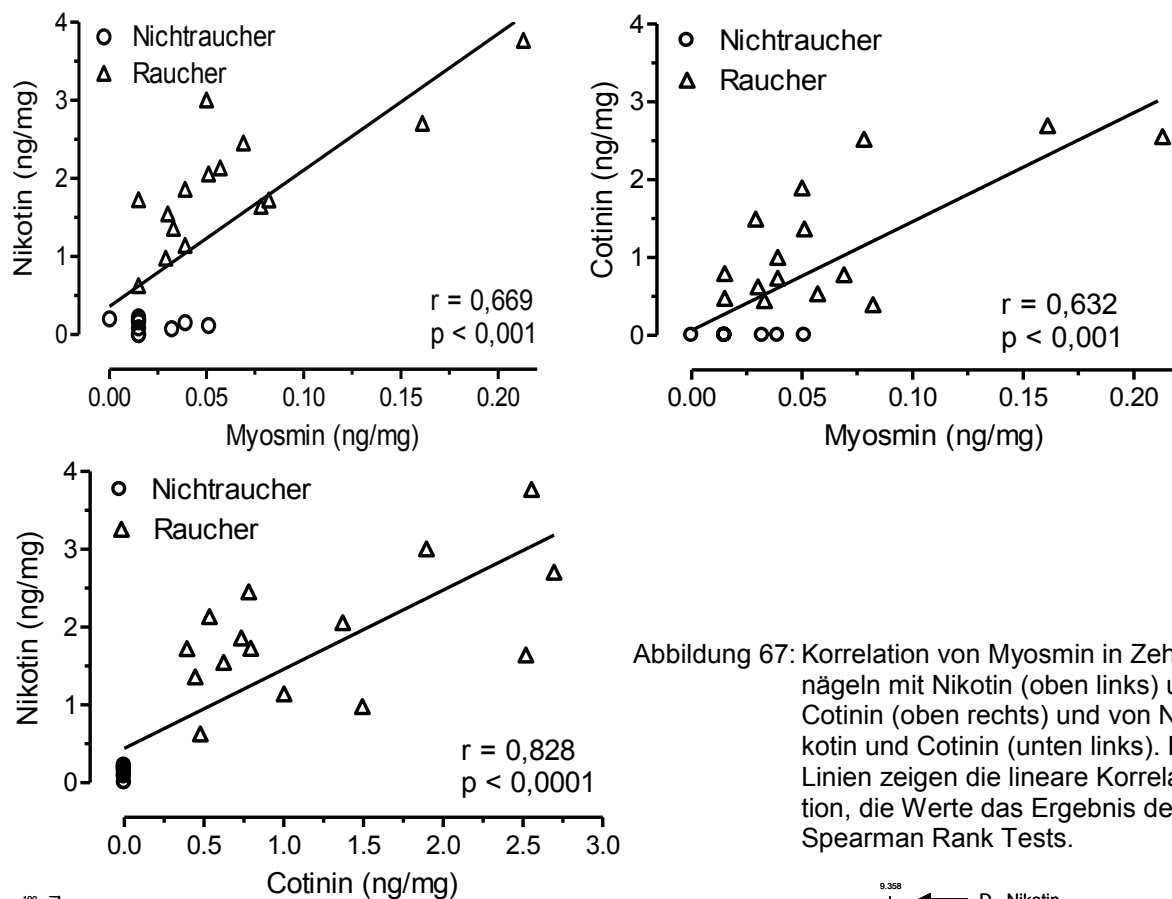


Abbildung 68: Chromatogramme von Myosmin, Cotinin und Nikotin einer Zehennagelprobe eines Rauchers, jeweils von D₀ und des zugehörigen D₃/D₄ Standard.

4.4.3 Bestimmung der Konzentration von Myosmin und Cotinin im Speichel

Parallel zu den Zehennägeln wurde den Probanden Speichel entnommen und auf Cotinin und Myosmin untersucht. Myosmin konnte in allen Speichelproben qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Dagegen wurde Cotinin zwar auch in allen Proben von Rauchern, aber nur in drei von zehn Proben der Nichtraucher nachgewiesen.

Raucher hatten mit 2,54 ng/ml dreifach erhöhte mittlere Myosminkonzentrationen als Nichtraucher (0,73 ng/ml; $p < 0,01$). Das Cotinin erwies sich, wie erwartet, als spezifischer Marker für das Rauchen und war bei den Rauchern mit 83,14 ng/ml 45-mal höher als bei den Nichtrauchern (1,85 ng/ml; $p < 0,001$). Die Werte sind in Tabelle 52 zusammengefasst und in Abbildung 69 graphisch dargestellt. Abbildung 70 zeigt repräsentative Chromatogramme einer Speichelprobe eines Rauchers mit den Analyten und zugehörigen Standards.

Zwischen den Konzentrationen von Myosmin und Cotinin besteht eine signifikante Korrelation ($p < 0,0002$), die für Raucher alleine allerdings sehr viel schwächer ausfällt und nicht mehr signifikant ist (Abbildung 71).

Tabelle 52: Myosmin und Cotinin im Speichel von 15 Rauchern und 11 Nichtrauchern (ng/ml).

	Myosmin		Cotinin	
	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher
MW \pm SD	0,73 \pm 0,65	2,54 \pm 2,68	1,85 \pm 4,50	83,14 \pm 54,30
Minimum	0,20	0,45	12,04	n.d.
Maximum	2,33	10,86	189,0	14,36

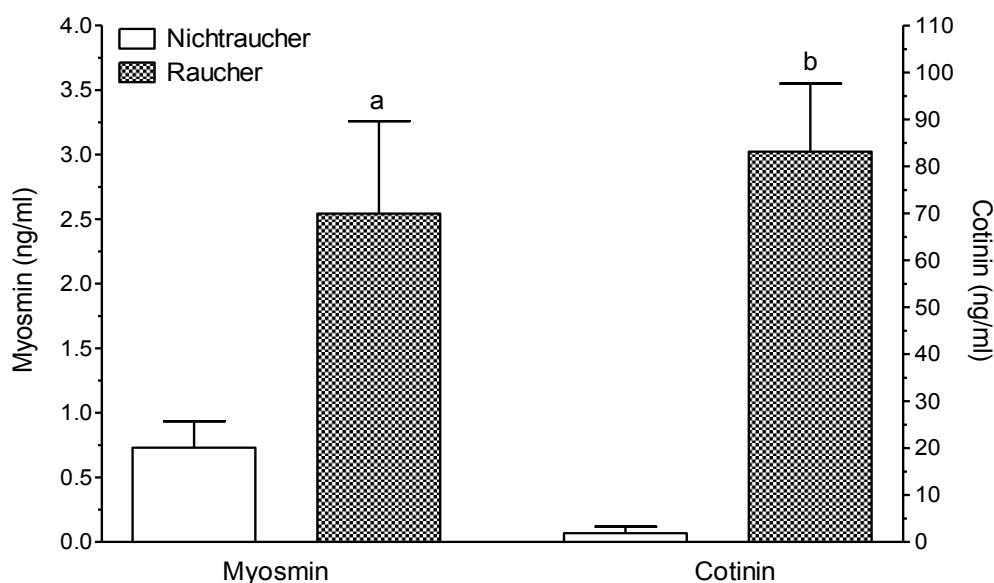


Abbildung 69: Myosmin und Cotinin in Speichelproben von Rauchern und Nichtrauchern (MW \pm SE), a, b: signifikant verschieden von Nichtraucherwerten, $p < 0,01$ (a) und $p < 0,001$ (b).

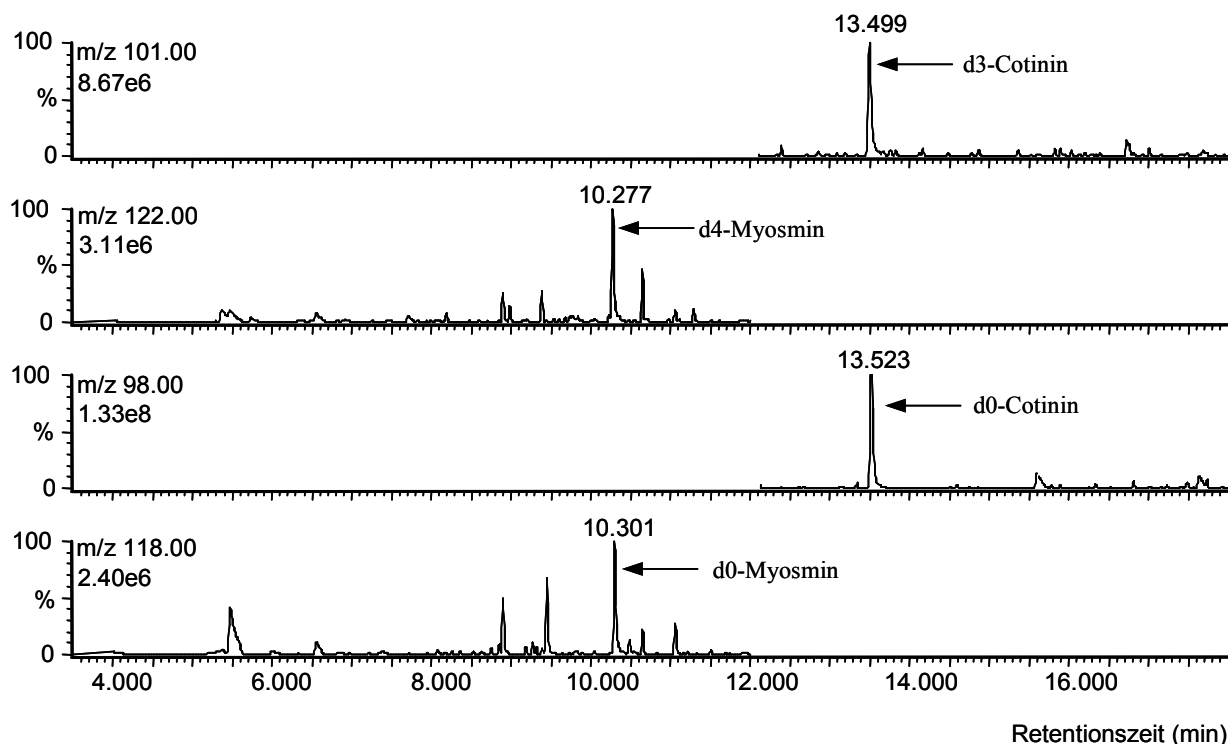


Abbildung 70: Chromatogramm einer Speichelprobe eines Rauchers mit dem Nachweis von Myosmin und Cotinin, jeweils mit dem zugehörigen internen Standards.

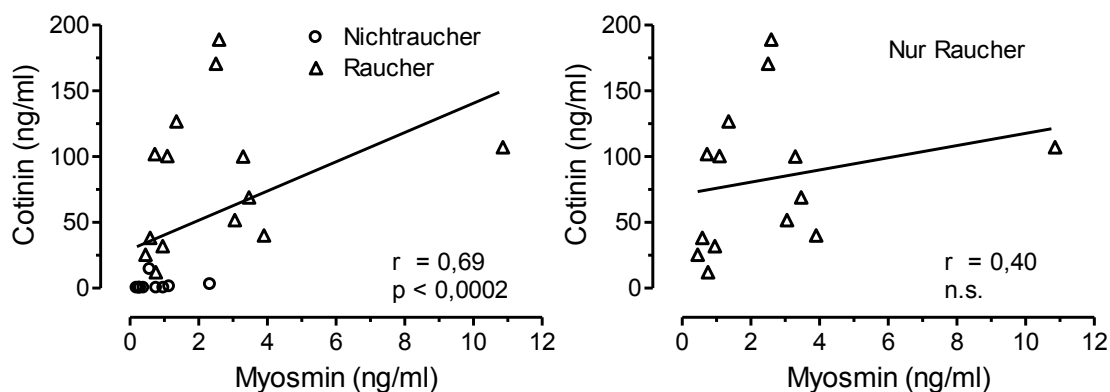


Abbildung 71: Korrelation von Cotinin und Myosmin in Speichel bei allen Probanden (links) und bei Rauchern (rechts). Die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests.

4.5 Zeitlicher Verlauf der Myosminkonzentration im Speichel in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme

Nach einem Vorversuch mit Speichelprobennahmen von einer Person über 29 Stunden wurde in unserem Arbeitskreis ein Versuch durchgeführt, der die individuellen Schwankungen der Myosminkonzentrationen im Speichel in Abhängigkeit zur Nahrungsaufnahme zeigen sollte.

4.5.1 Vorversuch

Im Vorversuch sollte anhand eines Speichelprofils festgestellt werden, ob es Tagesschwankungen von Myosmin gibt und wenn ja, wie hoch sie sind. Die Probandin hatte im Hinblick

auf das Essen, Getränke und Rauchen keine Auflagen, musste aber genau protokollieren, wann sie welche Nahrung zu sich genommen hatte. Der Versuch begann abends um 19 Uhr. Von hier an wurden stündlich bis 24 Uhr Speichelproben genommen. Am nächsten Tag wurde ab 7 Uhr morgens bis 24 Uhr die Probenentnahme im Stundenrhythmus fortgesetzt.

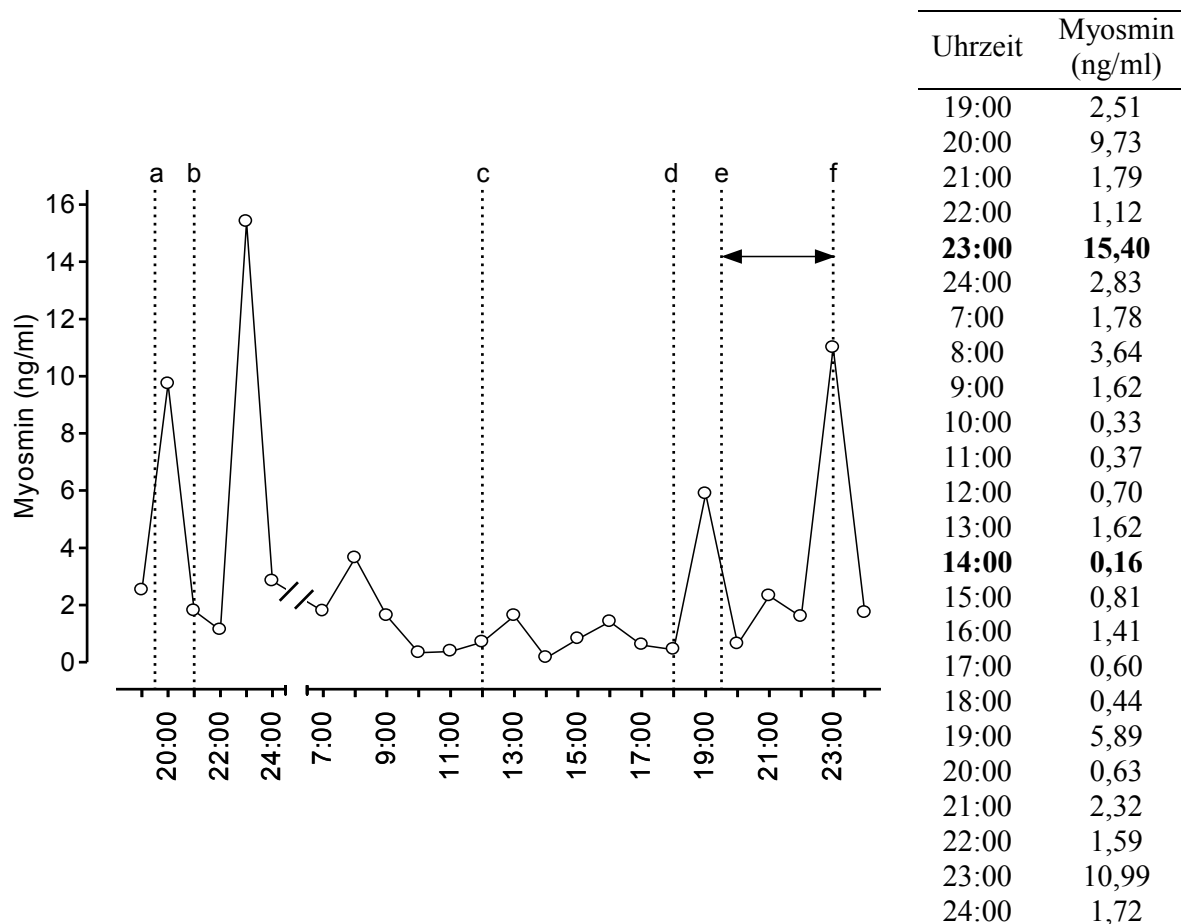


Abbildung 72: Myosminprofil im Speichel einer Probandin im Vorversuch (links) und Zeitpunkte der Probenahmen mit zugehöriger Myosminkonzentration. Die Buchstaben mit den gepunkteten Linien geben die Zeitpunkte der Nahrungs- und Getränkeaufnahme an (siehe Tabelle 53). Der Maximal- und Minimalwert ist fett hervorgehoben.

Tabelle 53: Aufnahme von Nahrung und Getränken im Vorversuch (Gl.: Gläser à 0,2 l).

Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme	Art der Nahrung / Getränke
a	Pilzpfanne
b	Karamellbonbon
c	Pilzpfanne
d	Asiapfanne
e – f	2 Gl. Prosecco, 1 Gl. Rotwein

Die höchste Myosminkonzentration im Speichel wurde am ersten Versuchstag um 23:00 Uhr mit 15,40 ng/ml erreicht, das Minimum lag am zweiten Versuchstag um 14:00 bei 0,16 ng/ml.

4.5.2 Gruppenversuch

Die demographischen Daten der 8 Probanden sind in Tabelle 54 zusammengefasst. Unter den Probanden befanden sich 3 Raucher und 5 Nichtraucher. Das Alter der Probanden lag im Mittel bei 49,8 Jahren (26-63 Jahre). Der Zigarettenkonsum bei den Rauchern betrug täglich im Durchschnitt 19 Zigaretten.

Tabelle 54: Demographische Daten und Angaben der Probanden.

Anzahl Probanden	8
Geschlecht, m / w	3 / 5
Alter (Jahre) MW \pm SD (Min./Max.)	49,8 \pm 14,37 (26 / 63)
Raucherstatus, Ja / Nein	3 / 5
Rauchprodukt, Zigarette / Zigarre / Mundtabak	3 / - / -

Der Versuch begann am Morgen mit der Abgabe einer Speichelprobe vor dem Frühstück um 8 Uhr (Morgenwert). Nach einem anschließenden kleinen Frühstück bestand sowohl Nahrungs- als auch Rauchkarenz. Flüssigkeit war lediglich in Form von Wasser erlaubt. Die zweite Probe wurde um 12 Uhr genommen. Unmittelbar danach nahmen alle Probanden die gleiche Mahlzeit innerhalb von ca. einer halben Stunde zu sich (Tabelle 55). Die nächste Probe wurde eine Viertelstunde nach dem Essen um 12:45 genommen und danach bis 17:30 Uhr weitere Speichelproben in verschiedenen zeitlichen Abständen (Tabelle 56). Von der Mittagmahlzeit wurde ein repräsentatives Aliquot entnommen, fein püriert und auf ihren Myosmingehalt analysiert.

Tabelle 55: Zutaten des Mittagessens für 8 Personen.

Bulgur (türkischer Hartweizengrieß)	1 kg
Putenfleisch	1 kg
Sahne	400 ml
Petersilie	1 Bund
Gemüsebrühe und Curry Paste	je 1 EL
Gewürze: Salz, Pfeffer und Kurkuma	je eine Prise

Tabelle 56: Übersicht Probenentnahme vor und nach der Nahrungsaufnahme.

Speichelprobe	Uhrzeit	Zeitpunkt
1	8:00	nüchtern nach dem Aufstehen
2	12:05	direkt vor dem Mittagessen
3	12:45	direkt nach dem Mittagessen
4	13:00	15 min nach dem Mittagessen
5	13:15	30 min nach dem Mittagessen
6	13:30	45 min nach dem Mittagessen
7	14:00	1 Std. nach dem Mittagessen
8	14:30	1,5 Std. nach dem Mittagessen
9	15:30	2,5 Std. nach dem Mittagessen
10	16:30	3,5 Std. nach dem Mittagessen
11	17:30	4,5 Std. nach dem Mittagessen

4.5.2.1 Myosmingehalt der Mittagsmahlzeit

In 4 Aliquots, zu je 1 g der feinpürierten Probe der Mahlzeit, betrug der mittlere Myosmingehalt 13,46 ng/g (Tabelle 57).

Tabelle 57: Analyse der Mittagsmahlzeit
MW \pm SD (n = 4).

Einwaage (g)	Myosmin (ng/g)
1,07 \pm 0,03 g	13,46 \pm 0,81

4.5.2.2 Zeitlicher Verlauf der Myosminkonzentrationen im Speichel

Die Verläufe der Myosminkonzentrationen im Speichel zeigt die Abbildung 73. In Tabelle 58 werden die Konzentrationen am Morgen und am Mittag (Beginn und Ende der Nahrungskarenz), der Zeitpunkt und das Ausmaß der Minimal- (t_{\min} ; C_{\min}) und Maximalwerte (t_{\max} ; C_{\max}) nach Beginn der Nahrungsaufnahme ($t_0 = 12:00$ Uhr) und die Konzentrationen am Ende des Versuches für die einzelnen Probanden detailliert beschrieben. In 95 der insgesamt 96 Speichelproben konnte Myosmin nachgewiesen und quantifiziert werden. Bei den Morgenwerten wurden starke individuelle Schwankungen festgestellt (MW \pm SD = 1,5 \pm 1,5; Min/Max = 0,054/4,123 ng/ml). Innerhalb von 4 Stunden Nahrungskarenz nahm die Myosminkonzentration bei 5 Probanden z.T. sehr deutlich ab, bei 3 Probanden war dagegen noch ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Insgesamt nahm die Streuung etwas ab (MW \pm SD = 0,63 \pm 0,51; Min/Max = 0,10/1,38 ng/ml). Bis eine Viertelstunde nach dem halbstündigen Mittagessen fiel die Konzentration bei 3 Probanden deutlich weiter ab, bei 4 Probanden noch leicht und bei einer Probandin war der Wert unverändert. Der niedrigste Wert wurde bei 4 Probanden um

12:45 Uhr, bei 3 Probanden um 13:00 Uhr und bei einer Probandin erst um 13:30 Uhr erreicht. Von diesem Zeitpunkt an verliefen die einzelnen Myosminkonzentrationen je nach Proband sehr individuell. Dennoch war es möglich, die verschiedenen Profile in drei Gruppen einzuteilen. Die erste Gruppe besteht aus fünf Probanden, bei denen die Myosminkonzentrationen nach Nahrungsaufnahme nur schwach innerhalb von 90 bis 150 min auf ein Maximum von $0,42 \pm 0,06$ ng/ml (MW \pm SD; Min/Max = 0,361 / 0,499) anstiegen (Abbildung 74 oben links). Bei der zweiten Gruppe (n = 2) steigen die Kurven wesentlich deutlicher an. Beide Probanden erreichen ihr Maximum von 1,474 / 1,240 ng/ml nach 270 min (Abbildung 74 oben rechts). Proband g stellt im Vergleich zu den anderen Probanden eine Ausnahme dar. Innerhalb einer dreiviertel Stunde nach dem Essen kommt es zu einem steilen Anstieg der Kurve bis zu einem Maximum von 3,553 ng/ml. In der nächsten Viertelstunde fällt die Myosminkonzentration steil auf 0,618 ng/ml ab, verringert sich in 15 min nochmals auf 0,323 ng/ml und steigt eine halbe Stunde später wieder auf 0,771 ng/ml an. Ab diesem Zeitpunkt fällt die Konzentration bis zum Endpunkt des Versuchs stetig (Abbildung 74 unten). Fünf Stunden nach Ende des Mittagmahles liegen die Myosminkonzentrationen wieder bei allen Probanden in einem ähnlichen Bereich von $0,206 \pm 0,150$ ng/ml (MW \pm SD; Min/Max = n.d. / 0,453). Die Abbildung 75 zeigt die Mittelwertskurve von 7 Probanden (ohne Proband g).

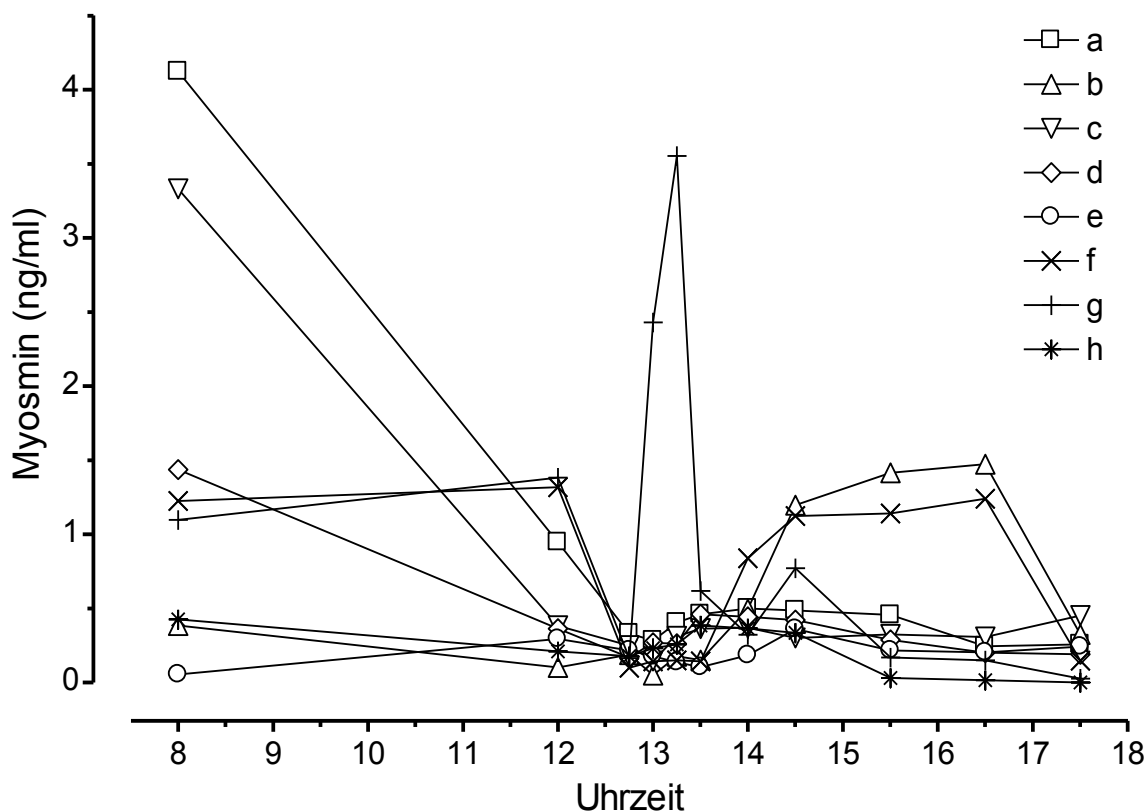


Abbildung 73: Vergleichende Darstellung der Myosminkonzentrationen im Speichel von 8 verschiedenen Probanden.

Tabelle 58: Einfluss eines Mittagessens (12.00-12.30 Uhr) auf die Myosminkonzentration im Speichel. Der Morgenwert wurde um 8.00 Uhr nach dem Frühstück genommen. Der Minimalwert (C_{min}) wurde erst nach dem Essensbeginn erreicht (t_{min}), C_{Ende} gibt den letzten Messwert 5,5 Stunden (t_{Ende}) nach dem Essensbeginn an. Die AUC entspricht der Fläche der Konzentrations-Zeit-Kurve nach dem Essensbeginn (ng×h/ml).

Proband	Morgenwert ng/ml	C_{min} ng/ml	t_{min} min	$C_{max.}$ ng/ml	t_{max} min	C_{Ende} ng/ml	AUC $t_{min} - t_{Ende}$
a	4,123	0,283	60	0,499	120	0,259	0,516
b	0,385	0,050	60	1,474	270	0,324	4,080
c	3,331	0,145	60	0,370	120	0,453	0,849
d	1,436	0,263	45	0,460	90	0,191	0,645
e	0,054	0,104	75	0,361	150	0,244	0,514
f	1,225	0,101	45	1,240	270	0,148	3,377
g	1,098	0,165	45	3,553	75	0,027	2,119
h	0,427	0,179	45	0,385	90	n.d.	0,284
MW	1,509	0,161		1,043		0,205	1,548
SD	1,461	0,080		1,103		0,149	1,469

n.d. = nicht detektierbar

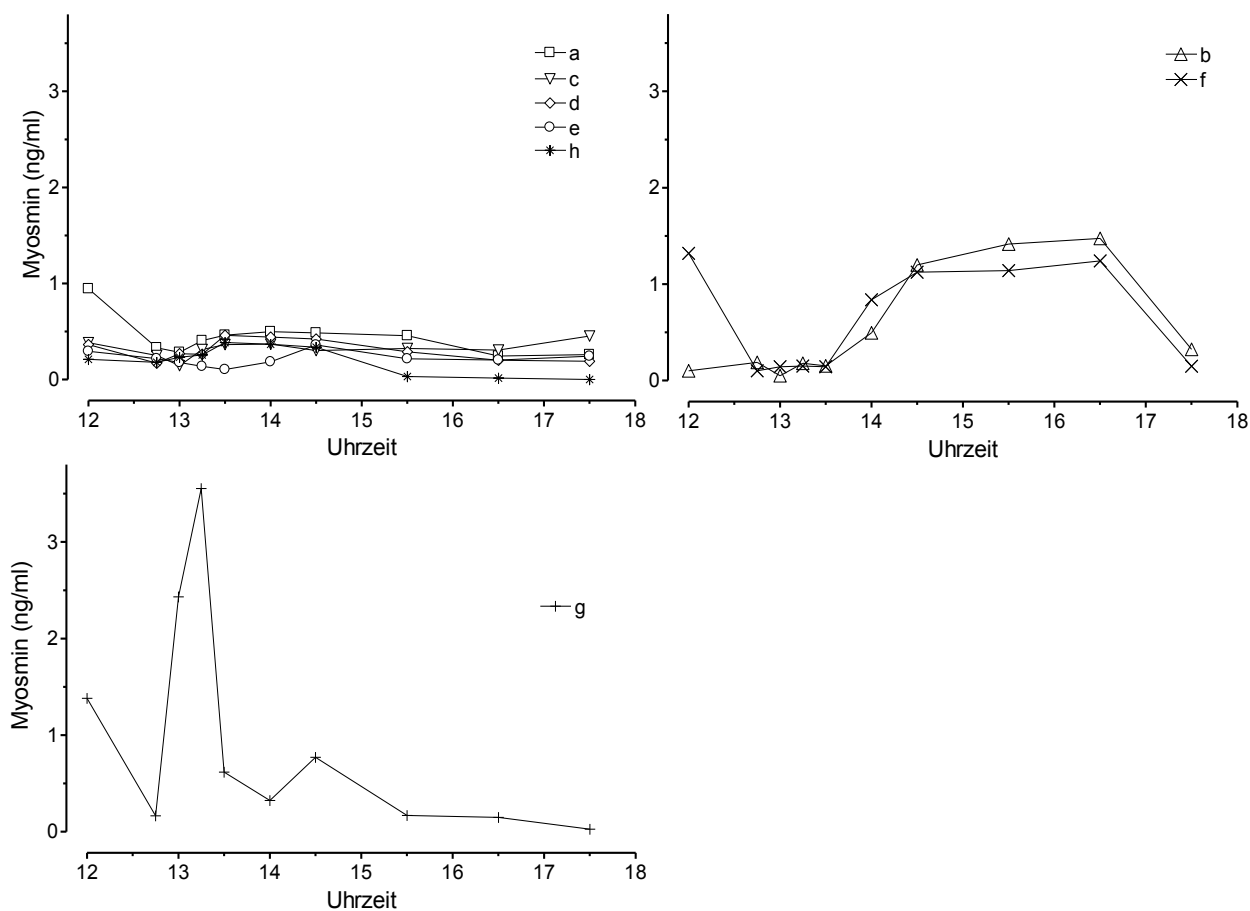


Abbildung 74: Differenzierung des Speichelversuchs in drei Gruppen.

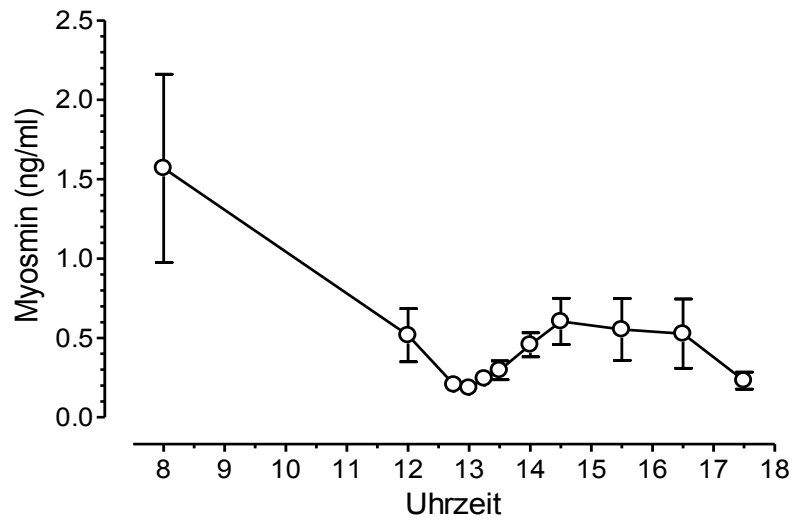


Abbildung 75: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der Myosminkonzentrationen (MW ± SE) von sieben Probanden, außer Proband g.

5 Diskussion

Myosmin gehört zu den ersten Alkaloiden, die nach Nikotin im Tabak nachgewiesen wurde [38]. Das aktuelle Interesse an Myosmin basiert auf der in unserem Arbeitskreis gemachten Entdeckung von *Zwickenpflug* [1]. Er konnte nachweisen, dass dieses, vermeintlich für Tabak spezifisches Alkaloid, unabhängig vom Nikotin, in hohen Konzentrationen in Nüssen vorhanden ist. Weitere Analysen zeigten, dass Myosmin nicht nur in Nüssen, sondern auch in vielen Lebensmitteln zu finden ist, wie z.B. Reis, Kartoffeln, Hirse, Mais und Weizen [2]. Das Vorkommen auch in Trinkmilch und Sahne zeigt deutlich, wie weit verbreitet Myosmin offensichtlich in der Nahrungskette ist. Nach diesen Analysen konnte Myosmin nicht mehr als spezifisches Tabakalkaloid angesehen werden.

Aufgrund seiner Iminstruktur lässt sich Myosmin unter sauren Bedingungen, am effektivsten im Bereich zwischen pH 2 und 5, leicht nitrosieren bzw. peroxidieren [167,168,237]. Bei der Nitrosierung entsteht einerseits das tabakspezifische Nitrosamin NNN und andererseits ein instabiles Zwischenprodukt, welches spontan mit Wasser zum HPB reagiert, aber auch an Proteinen und DNA binden kann. Diese HPB-Addukte entstehen auch nach einer, durch Cytochrom P450 Monooxygenase vermittelten, Aktivierung von NNN und NNK und wurden in zahlreichen Tierversuchen nachgewiesen [242-244]. Die DNA-Bindung von radioaktivem Myosmin wurde *in vitro* nachgewiesen [168]. Ein HPB-absplattendes Addukt wurde schließlich am Hämoglobin und an der DNA von Ösophagus und Leber von mit Myosmin behandelten Ratten gefunden [238]. Wegen der hohen Spezifität von NNK und NNN wurden Hämoglobinaddukte, die HPB freisetzen, zunächst als spezifische Biomarker vorgeschlagen, welche die Belastung mit TSNA aus dem Tabakrauch durch aktives und passives Rauchen anzeigen sollten [245]. Eine Vielzahl von Studien zeigten aber, dass sich die HPB-Addukte zwischen Raucher und Nichtraucher maximal um das zwei- bis dreifache unterscheiden [213-216,246]. Da sich andere Biomarker für die Tabakrauchbelastung, wie z.B. der Hauptmetabolit von Nikotin, das Cotinin, und auch der NNK-Metabolit NNAL, um mindestens Faktor 100 unterscheiden [90,217,247], wurde eine entsprechende Differenz auch für die HPB-Addukte am Hämoglobin erwartet. Auch für HPB-absplattendes DNA-Addukte wurden beim Menschen keine entsprechend hohen Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern gefunden [215,218]. Dies kann nur durch eine hohe Hintergrundbelastung aus anderen Quellen erklärt werden. Wegen seines Vorkommens unabhängig vom Tabak, ist Myosmin wahrscheinlich eine dieser Quellen für die HPB-Addukte.

Die mit einer kovalenten Bindung möglicherweise verbundene Genotoxizität wurde für Myosmin anhand des Comet-Assays mit frisch isolierten Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen und in einer humanen Ösophagus-Adenomzelllinie nachgewiesen [4,236]. In der Zelllinie zeigte sich bei einem pH 6, bei dem Myosmin leichter nitrosiert werden kann, ein verstärkter konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schäden. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Myosmin ein kanzerogenes und genotoxisches Potential besitzt.

Da Myosmin im Urin nicht unverändert ausgeschieden wird, und der bislang einzige spezifische Metabolit, das 3'-Hydroxymyosmin, noch nicht zuverlässig identifiziert werden konnte [115], wurde in der vorliegenden Arbeit unverändertes Myosmin in Proben von Plasma, Speichel und Zehennägeln bestimmt.

Aufgrund der Untersuchungen von *Tyroller et al.* [2], die Myosmin in vielen Lebensmitteln nachgewiesen haben, sollte bei Schweinen, die im Gegensatz zum Menschen keine Exposition durch Zigarettenrauch haben, die Myosminkonzentration ermittelt werden. Den Tieren wurde jeweils im nüchternen Zustand und nach dem Fressen Blut abgenommen. Dabei konnte ein Konzentrationsunterschied von Myosmin im Plasma festgestellt werden

Das zweite Ziel bestand in der Abschätzung der kurz- und langfristigen Belastung des Menschen mit Myosmin in Abhängigkeit der Ernährungsgewohnheiten und des Rauchverhaltens. Dazu wurden menschliche Zehennägel und parallel der Speichel untersucht. Während der Speichel nur eine Momentaufnahme der Analyten im Körper ermöglicht, lässt sich in den Zehennägeln die Exposition über einen längeren Zeitraum beschreiben. Je nach individueller Wachstumsgeschwindigkeit spiegelt 1 mm des Zehennagels eine Belastung von ca. einem Monat wieder [248]. Für beide Matrices war eine Belastung durch Nikotin und Cotinin bereits bekannt und konnte für die Überprüfung des Rauchstatus herangezogen werden [90,248,249]. Anhand autoradiographischer Untersuchungen [116] war bereits bekannt, dass auch Myosmin in der Speicheldrüse von Ratten kumuliert. Absolut neu war der Versuch Myosmin auch in den Zehennägeln nachzuweisen.

Außerdem führten wir in unserem Arbeitskreis einen Gruppenversuch durch. Ziel hierbei war, bei gleichen Grundvoraussetzungen und gleicher Nahrungsaufnahme die individuelle Myosminbelastung über den Tag verteilt darzustellen. Dazu wurden den Probanden mehrere Speichelproben über den Tag verteilt entnommen und ein individuelles Myosminbelastungsprofil erstellt. Ebenso wurde die an dem Versuchstag aufgenommene Nahrung untersucht.

5.1 *Beurteilung der Methode*

Durch vorhergehende Analysen von Myosmin in Muttermilch, Speichel und Plasma waren Anhaltspunkte in der Methode zur Aufarbeitung der Speichel- bzw. der Plasmaproben gegeben [3]. Da aber diese Methode ursprünglich für die Analyse von Muttermilch entwickelt wurde konnten einige Punkte verändert werden. Die Wiederfindung der Analyten war bei dieser Methode relativ gering, somit galt es diese zu optimieren. Auch konnten aufgrund der weniger komplexen Probenmatrix von Speichel und Plasma Vorreinigungsschritte wie z.B. die Lipidabtrennung auf einer C18 Säule bei pH 1 ausgelassen werden.

Auch wurde die Festphasenextraktion verändert. Die SPE-Säulen wurden ausgetauscht, statt der benutzten BondElut C18 und nachfolgender Oasis HLB Säulen wurde nur eine StrataX Säule benutzt. Das Mischphasen-Polymer der Strata-X-C-Säule besitzt mit seinen Sulfonsäure- und Styrodivinylbenzolgruppen sowohl die Eigenschaften eines starken Kationenaustauschers, als auch die einer Reversed Phase. Damit ist es zur Bindung basischer Substanzen wie Myosmin gut geeignet.

Ebenso wurden Teile der weiteren Aufarbeitung z.B. die Flüssig-Flüssig-Extraktion verändert. Das verringerte nicht nur den Zeitaufwand, sondern brachte auch eine Einsparung bei den verwendeten Materialien mit sich. Die Wiederfindung lag daraufhin für Myosmin im Speichel und Plasma bei 92,6%, statt bei 77%. Im Fall von Cotinin bei 91,1%, statt bei 60%. Hinsichtlich Präzision und Nachweisempfindlichkeit ist die Methode vergleichbar zu anderen Methoden für den Nachweis von Cotinin in Speichel und Plasma [250-252]. Aufgrund der Verwendung eines internen Standards konnten eventuell auftretende Schwankungen der Wiederfindung bei den einzelnen Proben zusätzlich korrigiert werden.

Für die Analyse der Zehennägel gab es zwei aktuelle Publikationen, anhand derer die Aufarbeitung leicht an unsere Vorraussetzungen angepasst werden konnte [248,249]. Die Nägel lösten sich in Natronlauge über Nacht restlos auf und konnten im Anschluss direkt durch Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter aufgearbeitet werden. Neben den Analyten Myosmin und Cotinin ließ sich auch Nikotin mit dieser Methode ebenso gut erfassen. Die Wiederfindung war mit ca. 100% für Myosmin, 97,4% für Cotinin und 98% für Nikotin optimal.

In der Praxis erwiesen sich diese Methoden wegen der schnellen, unkomplizierten Aufarbeitung und dem geringen Materialaufwand als eine sehr gute Wahl zur Analyse von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Speichel, Plasma und Zehennägeln.

5.2 **Myosmin im Schweineplasma und zugehörigen Futter**

Die Schweineplasmaproben wurden im LVG-München gesammelt. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug sieben Monate. Das Gewicht der Tiere lag im Mittel bei 105 kg. Alle Tiere wurden mit einer eigenen Futtermischung des LVG *ad libitum* gefüttert, welches 124 ng Myosmin/g enthielt. Im Blut der nüchternen Tiere lag die Myosminkonzentration im Mittel bei 0,066 ng/ml (n.d.-0,185 µg/ml) und war nur bei einer Probe unter der Nachweisgrenze. Bei den gefütterten Tieren erfolgte die Blutentnahme zwischen der ersten und zweiten Stunde nach Beginn der morgendlichen Fütterung. Hier erhöhte sich die Konzentration von Myosmin um das 7,5-fache auf durchschnittlich 0,497 µg/ml (0,236-0,878 µg/ml).

Das Ergebnis zeigt, dass das ursprünglich als spezifisch für den Tabak angesehene Myosmin im Blut von Schweinen vorkommt, die mit Sicherheit keine Rauchexposition hatten. Der entscheidende Beitrag des Futters ergibt sich aus dem Anstieg der Myosminkonzentration nach der Fütterung. Im Futter waren keine Bestandteile von Nachtschattengewächsen wie Kartoffeln, Tomaten oder Auberginen enthalten. Nur in diesen Pflanzen wurden bisher Spuren von Nikotin nachgewiesen [253-255]. Obwohl das Schweinefutter nicht explizit auf Nikotin untersucht wurde, ist davon auszugehen, dass es kein Nikotin enthielt. Dies wird unterstützt durch die Abwesenheit von messbaren Cotininmengen im Plasma der Schweine. Das Ergebnis macht es äußerst unwahrscheinlich, dass Myosmin in den Futterpflanzen aus Nikotin über den Abbau zu Nornikotin mit anschließender Dehydrogenierung gebildet wurde (Abbildung 9, [32,52]). Es muss also einen anderen, bis heute unbekanntem, biologischen Syntheseweg für Myosmin geben, der im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Tabakpflanze unabhängig von einer primären Nikotinbildung ist.

Die Konzentration von Myosmin im Schweinefutter ist 75- bis 300-mal höher als die Werte, die von *Tyroller et al.* [2] für einzelne Grundnahrungsmittel wie Weizen, Reis, Mais und Hirse angegeben wurden. Bei einer täglichen Aufnahme von 2,75 kg des hier analysierten Futters, würde das Schwein 341 µg Myosmin pro Tag aufnehmen, fast soviel wie *Tyroller et al.* [2] für den Menschen als Jahresaufnahme (403-592 µg) geschätzt hat. Allerdings wurden hier nur ein Schätzwert für die Bestandteile des statistischen Warenkorb gemacht, die auf Myosmin untersucht wurden. Verschiedene Fleischsorten, alkoholische und andere Getränke, z.B. Fruchtsäfte und vor allem Kaffee und Tee, müssten erst noch auf Myosmin hin untersucht werden, um ein vollständigeres Bild der Myosminaufnahme des Menschen zu erhalten.

Der eindeutige Nachweis von Myosmin, auch nach mindestens 20-stündiger Nahrungskarenz bei den nüchternen Schweinen, war aufgrund der kurzen Verweildauer von Myosmin in Rat-

tenversuchen [114,116] mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde im Plasma nicht zu erwarten. Der geringe Basiswert an Myosmin bei den nüchternen Tieren könnte bedeuten, dass Myosmin entweder bei Schweinen grundsätzlich langsamer ausgeschieden wird als bei Ratten, oder dass ein tiefes Kompartiment existiert aus dem das Myosmin mit einer deutlich längeren Halbwertszeit abgegeben wird. Eine dritte Möglichkeit wäre eine endogene Bildung von Myosmin aus bislang unbekanntem Vorstufen.

5.3 Myosmin in menschlichen Zehennägeln und Speichel

Die Myosminkonzentrationen im Speichel unterlagen in einem Vorversuch (siehe unten) einer erheblichen tageszeitlichen Schwankung. Im Gegensatz zum Cotinin ist deshalb bei Myosmin davon auszugehen, dass die Messung einzelner Speichelproben wie bei Nikotin nur ein sehr ungenaues Mass für die tägliche Belastung ist. Die Untersuchung von **Zehennägeln** sollte dagegen eine Bewertung der langfristigen Belastung des Menschen mit Myosmin in Abhängigkeit des Rauchstatus ermöglichen. Dazu wurden die Myosminkonzentrationen bei Rauchern und Nichtrauchern ermittelt. Zusätzlich wurde in den Nägeln Nikotin und Cotinin bestimmt. Durch Messung der Cotininkonzentration im Speichel konnte der aktuelle Rauchstatus der Probanden überprüft werden. Gleichzeitig konnte in den Speichelproben ebenfalls Myosmin bestimmt werden.

Die menschliche Langzeitbelastung mit Myosmin anhand von Zehennägeln zu ermitteln ist bislang ein Novum. Ausgangspunkt waren zwei Publikationen, in denen erst kürzlich von der Abhängigkeit der Nikotin- und Cotiningehalte in Zehennägeln vom Rauchstatus berichtet worden war [248,249], obwohl sich diese Matrix zum Langzeitbiomonitoring gut eignet. Die Analyse von Nikotin und Cotinin in Haaren ist hingegen schon sehr lange etabliert und wurde vielfach beschrieben [256-258].

Ein menschliches Kopfhaar durchläuft verschiedene Wachstumsphasen in seiner Entwicklung, im Durchschnitt dauert dies 2-7 Jahre, dabei hat es ein Wachstum von 0,2-0,5 mm pro Tag [259]. Der Einlagerungsweg verschiedener Metaboliten über das Blutgefäßsystem spielt in der Analyse von Haaren die größte Rolle. Bei diesem Einlagerungsweg handelt es sich um basische, nicht proteingebundene, undissoziierte und lipophile Stoffe, die anhand von Konzentrations- und pH-Gradienten durch Zellmembranen in das Keratinozytengewebe, in Matrixzellen und Melanozyten der Haarwurzeln des Haares gelangen. Problematisch dabei ist zum einem die äußere Kontamination und andererseits die Menge der im Haar vorhandenen Melanozyten. Diesen kommt eine besondere Bedeutung zu, weil sie im Unterschied zum keratinisierten Haar, das einen intrazellulären pH-Wert von 6 besitzt, einen pH-Wert zwischen

3-5 aufweisen. Dadurch kommt es entsprechend dem pH-Gradienten zu einer bevorzugten Aufnahme und Anreicherung von basischen Substanzen in Melanozyten und Matrixzellen, von wo sie dann in die Melaningranula eingelagert werden [260]. Die Einlagerung von Nikotin in pigmentierte Haare von Mäusen wurde bereits 1976 von *Waddell und Marlowe* [261] nachgewiesen. *Gerstenberg et al.* [262] haben dann an verschiedenen Rattenstämmen eindeutig gezeigt, dass stärker pigmentierte Haare deutlich mehr Nikotin einlagern als unpigmentierte Haare. Deshalb muss bei Analysen beim Menschen die Haarfarbe berücksichtigt werden, wenn man Rückschlüsse auf die systemische Aufnahme von Nikotin z.B. durch das Passivrauchen ziehen will [263]. Problematisch sind auch die äußerlichen Kontaminationsquellen, durch Schweiß, Sebum, angrenzendem Hautgewebe oder externen Quellen, die gerade bei der Passivrauchbelastung zu erhöhten Ergebnissen führen können. Die hier anstehenden intensiven Reinigungsschritte sind bei der Analyse von Zehennägeln, die im Allgemeinen weniger kontaminiert sind, nicht nötig [264].

Im Gegensatz zu Haaren wachsen Fußnägel viel langsamer, sie haben eine Wachstumsrate von 1 cm in 9-12 Monaten [265]. Während das Haar nur axial wächst, wächst der Fußnägel in zwei Richtungen, zum einen in die Länge und zum anderen in die Breite. Somit lagern sich Fremdstoffe auf zwei Arten in den Nagel ein. Über das Blutgefäßsystem werden die meisten Stoffe in die Nagelmatrix eingelagert, sie können aber auch über das Nagelbett an der Grenze zur Lunula, dem so genannten Nagelhalbmond, eingelagert werden. Alle Fremdstoffe werden im Nagel in das Keratin eingelagert. Melanin ist in Nägeln nicht vorhanden. Somit sind Nägel in allen Punkten eine gute Matrixwahl zur Ermittlung einer Langzeitexposition von bestimmten Substanzen. Allerdings sind für die Tabakalkaloide die Daten, die eine Korrelation zwischen der Belastung und der Konzentration im Nagel erfassen noch sehr unvollständig und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die Zehennägel von Nichtrauchern enthielten in unserer Studie im Mittel 0,02 ng/mg Myosmin und 0,128 ng/mg Nikotin, Cotinin war nicht nachweisbar. Bei Rauchern stiegen die Durchschnittswerte von Myosmin um das 2,8-fache auf 0,058 ng/mg an, bei Nikotin um das 14-fache auf 1,79 ng/mg. Auch Cotinin war bei allen Rauchern nachweisbar, die mittlere Belastung betrug 1,14 ng/mg. Während bei Myosmin für Zehennägel noch keine Vergleichswerte in der Literatur existieren, ergeben sich bei Nikotin und Cotinin gute Übereinstimmungen mit bisher publizierten Daten. *Al-Delaimy et al.* [248] haben Nikotin bei Rauchern, Passivrauchern und Nichtrauchern Zehennägel von 106 Frauen mit einer HPLC-Methode untersucht. Während bei den Raucherinnen die mittlere Nikotinkonzentration (1,71 ng/mg) mit unserem Ergebnis übereinstimmt, war bei den Nichtraucherinnen ein etwas höherer Mittelwert von

0,08 ng/mg gegeben. *Stepanov et al.* [249] entwickelte eine GC/MS-Methode zur Analyse von Nikotin, Cotinin und NNAL in Zehennägeln. Hinsichtlich der Methode und ihrer Validierung gibt es eine gute Übereinstimmung mit unserer Analytik. Bei Nichtrauchern konnten sie weder Cotinin noch Nikotin nachweisen. Dagegen lagen die Werte in Zehennägeln von Rauchern bei *Stepanov et al.* [249] für Cotinin mit $1,6 \pm 1,3$ ng/mg geringfügig, bei Nikotin mit $5,9 \pm 5,6$ ng/mg deutlich über unseren Werten. Man muss allerdings berücksichtigen, dass eine größere Anzahl von Rauchern ($n = 35$) untersucht wurden und dass die Streubreite sehr viel höher war als bei unseren Werten.

Für die Bewertung der Ergebnisse mit Myosmin fehlen noch Vergleichsdaten. Auch wenn der Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern hochsignifikant war, ist der im Vergleich zu Nikotin deutlich geringere Anstieg bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern ein weiterer Beweis dafür, dass der Tabakrauch nicht die einzige Quelle für die Myosminaufnahme durch den Menschen darstellt.

Der **Speichel** wurde parallel zu den Zehennägeln gesammelt und auf Myosmin und Cotinin analysiert. Auch für diese Matrix bestätigt sich der wesentlich geringere Einfluss des Rauchstatus auf Myosmin in Vergleich zu Cotinin. Myosmin war im Speichel der Raucher im Mittel mit 2,54 ng/ml gegenüber den Nichtrauchern mit 0,73 ng/ml nur um das 3,5-fache höher, Cotinin dagegen um das 45-fache (83,14 versus 1,85 ng/ml).

Speichel zählt nicht zu den für das Biomonitoring am häufigsten verwendeten Körperflüssigkeiten, wird aber wegen seiner leichten, nicht-invasiven Gewinnung in einigen Bereichen häufig anstelle von Blut herangezogen. Problematisch wird die Verwendung von Speichel bei Substanzen, deren Membrangängigkeit stark von ihrer Ionisierbarkeit abhängt. Da der pH-Wert des Speichels normalerweise etwas niedriger ist als der des Plasmas, können sich schwach basische Verbindungen z.T. erheblich anreichern [266]. Bei Nikotin wurden im Speichel bis zu 100-fach höhere Konzentrationen gemessen, als im Blut [267-269]. Aufgrund des schwankenden pH-Wertes des Speichels kann sich das Speichel/Plasma-Verhältnis der Substanzen jedoch ändern. Während des Essens kann der pH auf Werte von 5,5 abfallen. Andererseits kann der pH-Wert des Speichels durch Stimulierung, z.B. bei der Probennahme, schnell auf Werte von 7,4 bis 8,0 ansteigen [270], woraus sich andere S/P-Verhältnisse ergeben können.

Für das weniger pH-abhängig ionisierbare Cotinin spielt der pH-Wert des Speichels eine untergeordnete Rolle. Der Rauchstatus lässt sich gut über Cotinin im Speichel bestimmen und macht dieses Tabakalkaloid im Speichel zu einem anerkannten Biomarker für das Rauchen

und die Passivrauchbelastung [271]. Kinder aus Nichtraucherhaushalten hatten mit 0,11 ng/ml signifikant weniger Cotinin im Speichel als Kinder aus Raucherhaushalten mit 1,95 ng/ml ($p < 0,01$) [272]. *Phillips et al.* [273] kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Cotinin kann demnach als Biomarker für die ETS Belastung herangezogen werden. Die Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern aufgrund der Cotinin-Konzentrationen im Speichel erfordert die Festlegung eines cutoff-Wertes, der von *Etter et al.* [274] bei einer Speichelkonzentration von 7-13 ng/ml Cotinin angesetzt wurde, von *West et al.* [275] bei 15 ng/ml.

Neben Cotinin kann auch sein Folgemetabolit, das *trans*-3'-Hydroxycotinin (3OH-Cot) im Speichel bestimmt werden. Nachdem der Umsatz von Cotinin zu 3OH-Cot hochspezifisch für das polymorphe CYP 2A6 ist, hat sich neuerdings die Messung des Verhältnisses dieser beiden Nikotinmetaboliten als zuverlässige Methode zur Bestimmung der entsprechenden Phänotypen erwiesen [91,276]. Im Rahmen des Drogenscreening werden des weiteren im Speichel ein Reihe von illegalen Substanzen, wie Amphetamine, Cannabis oder Opioide und Kokain, nachgewiesen [277], ebenso wie der Missbrauch von Barbituraten und Benzodiazepinen sowie Alkohol [278,279]. Auch Herbizide wie Atrazin sind im bereits Speichel identifiziert worden [280].

Die Konzentrationen von **Cotinin** liegen bei den hier untersuchten Rauchern über den von *Etter et al.* [274] vorgeschlagenen cut-off-Werten. Bei Nichtrauchern lag nur ein Wert mit 14,4 ng/ml knapp darüber. Diese Ergebnisse bestätigten somit den über den Fragebogen, ermittelten Rauchstatus der Probanden. Während die Nichtraucherwerte gut mit den von *Tricker et al.* [271] zitierten Literaturdaten übereinstimmen, sind die Raucherwerte mit durchschnittlich 83 ng/ml niedriger als bei den meisten Studien, deren Mittelwerte meist zwischen 150 und 350 ng Cotinin/ml Speichel liegen.

Zu **Myosmin** im Speichel liegt, wie bei den Zehennägeln, noch keine Studie einer anderen Arbeitsgruppe zum Vergleich vor. Die Myosminkonzentrationen lagen bei den Rauchern in einem dreifachen höheren Konzentrationsbereich und zeigten einen signifikanten Unterschied zu den Nichtrauchern. In der ersten orientierenden Studie an wenigen Probanden fanden *Maier et al.* [3] im Speichel keinen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Tabelle 21), die Mittelwerte lagen mit 1,6 – 1,9 ng/ml aber genau zwischen unseren Werten für Raucher mit 2,5 ng/ml und Nichtraucher mit 0,7 ng/ml. Diese Diskrepanz könnte durch die geringe Anzahl von untersuchten Rauchern, die noch geringere Belastung der Raucher mit Cotinin und die deutlich höherer Streuung der Werte mit 72 ± 42 ng/ml gegenüber 83 ± 15 ng/ml bei unseren Rauchern, erklärt werden.

5.4 Zeitabhängige Verlaufsstudie der Myosminkonzentration im Speichel

Insgesamt sind die Myosminkonzentrationen in Speichelproben jedoch weniger zuverlässig als die Werte für die Zehennägel. Nach *Maier* [92] sind für Myosmin im Speichel und im Plasma ähnliche Konzentrationen zu erwarten. Der Versuch mit den Schweinen hat eindeutig ergeben, dass die Myosminkonzentration im Plasma sehr stark vom Fütterungszustand abhängt. Obwohl die Probanden den Speichel vor der Nahrungsaufnahme am Morgen sammeln sollten, ist nicht gewährleistet, dass die Probennahme immer zu vergleichbaren Zeiten und nach gleicher Dauer der Nahrungs- und Getränkekenz erfolgte. Die schnelle Ausscheidung von Myosmin im Rattenversuch [116] ließ vermuten, dass der Zeitpunkt der Probennahme äußerst kritisch sein könnte. Starke tageszeitliche Schwankungen der Myosminkonzentration im Speichel, wie sie bereits von *Maier* [92] in einem Diätversuch gesehen wurden, bestätigten sich in einem eigenen Vorversuch (Abbildungen 12 und 72). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zeitabhängige Verlaufsstudie unter kontrollierter Nahrungsaufnahme durchgeführt. Der Versuch begann am Morgen mit der Abgabe einer Speichelprobe vor dem Frühstück um 8 Uhr (Morgenwert). Nach einem anschließenden kleinen Frühstück bestand sowohl Nahrungs- als auch Rauchkenz. Flüssigkeitsaufnahme war lediglich in Form von Wasser erlaubt. Die zweite Probe wurde um 12 Uhr genommen. Unmittelbar danach nahmen alle Probanden die gleiche Mahlzeit innerhalb von ca. einer halben Stunde zu sich. Die nächste Probe wurde eine Viertelstunde nach dem Essen um 12:45 genommen und danach bis 17:30 Uhr weitere Speichelproben in verschiedenen zeitlichen Abständen. Von der Mittagsmahlzeit wurde ein repräsentatives Aliquot entnommen, fein püriert und auf ihren Myosmingehalt analysiert.

Trotz dieser standardisierten Bedingungen fiel das Ergebnis dieser Studie sehr heterogen aus. Bei 5 der 8 Probanden war nur ein geringer Anstieg der Myosminkonzentrationen innerhalb von 90 bis 150 min nach Nahrungsaufnahme auf $0,42 \pm 0,06$ ng/ml zu verzeichnen. Zwei Probanden hatten einen deutlicheren, aber verzögerten Anstieg auf 1,47 und 1,24 ng/ml nach 270 min. Bei einem Probanden kam es dagegen in einer dreiviertel Stunde nach dem Essen zu einem steilen Anstieg auf 3,55 ng/ml, gefolgt von einem raschen Abfall auf 0,32 ng/ml innerhalb der nächsten dreiviertel Stunde und wiederum einem Anstieg nach einer halben Stunde auf 0,771 ng/ml.

Dieser heterogene Verlauf der Konzentrationen von Myosmin im Speichel nach der Nahrungsaufnahme macht verständlich, dass die 4 Stunden Nahrungskenz vor dem Mittagessen

nicht ausreichend war um bei allen Probanden einen deutlichen Abfall der Myosminkonzentrationen zu bewirken. Bei 3 Probanden war gegenüber 8:00 Uhr morgens um 12:00 mittags sogar noch ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Angesichts dieser Problematik war die Frequenz der Probennahme sicher nicht optimal. Bei der Wahl der längeren Abstände zum Ende des Versuchs hin, wurde noch davon ausgegangen, dass die Halbwertszeit von Myosmin deutlich kürzer ausfallen würde. Diese Fehleinschätzung führte dazu, dass der zeitliche Abstand der Probennahme ab der Mitte des Versuchs zu groß war und bei einer Wiederholung des Versuchs verkürzt werden müsste. Ein solcher Versuch sollte auch eine längere Nüchternphase vor der Nahrungsaufnahme einschließen um zu sehen, ob die Myosminkonzentration tatsächlich unter die Nachweisgrenze absinken, wie dies in dem Versuch von *Maier* [92] der Fall war.

Ursprünglich wurde angenommen, dass sich der Anstieg und Abfall der Myosminkonzentrationen nach der Nahrungsaufnahme einer Bateman-Funktion anpassen würde, mit der die Anflutungsgeschwindigkeit, t_{\max} und C_{\max} und die Evasionsgeschwindigkeit (Halbwertszeit) von Myosmin bestimmbar wäre. Die Bateman-Funktion dient zur Beschreibung der Kinetik bei allen nicht intravasalen Verabreichungsformen. Hier erfolgt die Aufnahme ins Blut aus einem Depot, das sich z.B. im Magen-Darm-Trakt, Muskel oder unter der Haut befindet. Diese Aufnahme ist in der Regel eine Funktion erster Ordnung, d. h. die im Blut eintretende Menge pro Zeit ist proportional zu der noch im Depot vorhandenen Menge. Da beim Eintritt in die Blutbahn sofort der Evasionsprozess beginnt, ist der resultierende Blutspiegel die Resultante zweier gegenläufiger Prozesse, einer Invasion erster Ordnung und einer Evasion erster Ordnung.

Aufgrund der Versuchsanordnung war es problematisch den Startpunkt für die Berechnung der Bateman-Funktion festzulegen, weil Myosmin mit der Nahrung über einen Zeitraum von einer halben Stunde aufgenommen wurde. Selbst nach Ende der Nahrungsaufnahme stieg die Myosminkonzentration bei den meisten Probanden noch nicht an. Auch fielen die Werte nach dem Erreichen des Maximums nicht bei allen Probanden zuverlässig ab, sondern stiegen z.T. auch wieder an. Für eine grobe Abschätzung der kinetischen Parameter wurde deshalb die Anpassung nur an die Mittelwerte von 7 Probanden (ohne Proband g) mit einer Startzeit von 1 Stunde nach Beginn der Nahrungsaufnahme mit der folgenden Formel berechnet:

$$c(t) = f \frac{c \times k_1}{(k_2 - k_1)} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

Die Abbildung 76 zeigt, dass die Anpassung vor allem im absteigenden Bereich die Mittelwerte relativ schlecht beschreibt. Die Halbwertszeit für die Evasion beträgt 1,6 Stunden und liegt in dem aus den Tierversuch [116] und in Analogie zur Kinetik von Nikotin [91] erwarteten Bereich. Um aber verlässliche Werte zur Pharmakokinetik dieses Alkaloids zu bekommen, müsste man das Verteilungsvolumen, Clearance, Halbwertszeit und den first pass Effekt in Versuchen mit Isotopen-markiertem Myosmin nach kontrollierter Verabreichung durch i.v. Injektion und auf nüchternen Magen mit einer Tablette oder in Wasser gelöst, ermitteln. Hierfür bedarf es einer klinisch kontrollierten Studie mit Genehmigung durch eine Ethikkommission der Universität bzw. Ärztekammer.

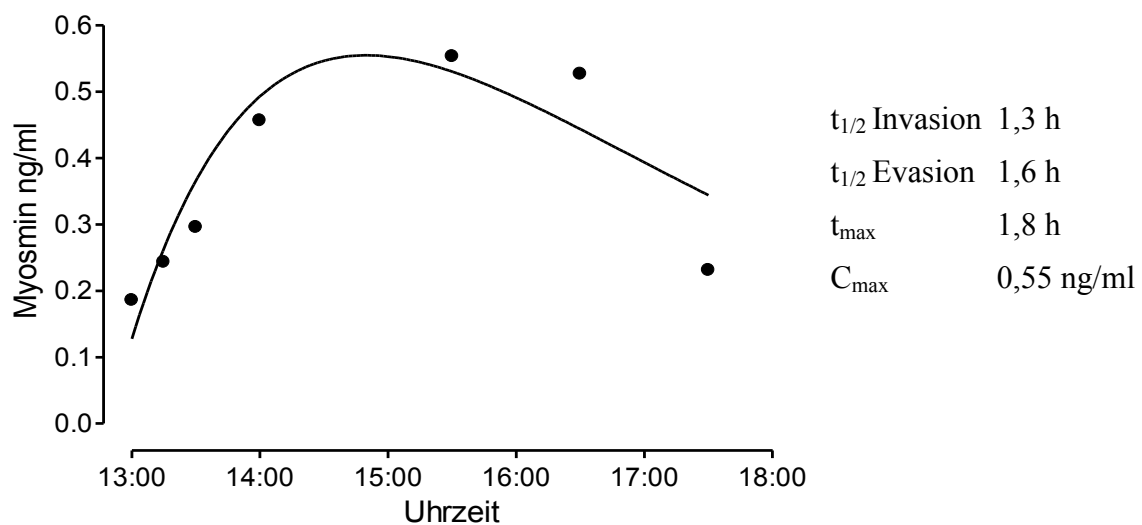


Abbildung 76: Mittelwerte des Speichelprofilversuchs (n = 7, ohne Proband g), angepasst an die Bateman-Funktion.

5.5 **Schlussfolgerung**

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte Analyse von Myosmin in Zehennägeln zeigt das allgemeine Vorkommen dieses Tabakalkaloids im Menschen. Die Myosminbelastung ist bei Rauchern nur geringfügig höher als bei Nichtrauchern. Auch wenn die Myosminkonzentrationen in den Nägeln der Raucher einen signifikanten Unterschied zu den Nägeln der Nichtraucher aufweisen, liegen sie dennoch alle innerhalb einer Größenordnung im ng-Bereich. Diese Mehrbelastung der Raucher durch den Konsum von Tabakerzeugnissen ist für Myosmin sehr viel geringer als für Nikotin und dessen Hauptmetaboliten Cotinin.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die humanen Speichelproben erhalten.

Auch bei nüchternen Schweinen war eine Grundbelastung des Plasmas mit Myosmin nachweisbar, die nach der Fütterung deutlich anstieg.

Die Ergebnisse zeigen die weite Verbreitung von Myosmin beim Menschen und in der Nahrungskette.

Dies wurde durch Bestimmung von Myosmin im Speichel bei den Testpersonen mit standardisierter Nahrungsaufnahme bestätigt. Die Ergebnisse erlauben trotz hoher interindividueller Streuung eine Abschätzung der täglichen Myosminaufnahme durch den Menschen. Diese sollte bei einigen Milligramm liegen und geht somit über die bisherigen Schätzwerte hinaus. Die beobachtete Diskrepanz zwischen der geschätzten Aufnahme von Myosmin über Lebensmittel und Tabakprodukten, mit der tatsächlichen gemessenen Konzentration in den menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten konnte nicht beantwortet werden.

Die Belastung des Menschen mit Myosmin liegt damit in der gleichen Größenordnung wie jene mit dem viel diskutierten Kanzerogen Acrylamid [281].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Myosmin ein genotoxisches und kanzerogenes Potential besitzt und dass die Aufnahme vom Menschen an den Konsum von Tabakprodukten und vielen Lebensmitteln, beim Tier nur an letzteres, gekoppelt ist.

Die chronische Exposition, verbunden mit einer gesteigerten Aktivierung bei der Refluxkrankheit, könnte Myosmin zu einem weiteren auslösenden Krebsfaktor in unserer heutigen Zeit machen.

Um diesen Fragestellungen auf den Grund zu gehen besteht weiterer wissenschaftlicher Bedarf.

6 Zusammenfassung

Myosmin ist eines der Tabakalkaloide, das wie Nornikotin, Anabasin und Anatabin in kleineren Mengen neben Nikotin in der Tabakpflanze und im Tabakrauch vorkommt. Wegen seiner geringen akuten Toxizität und der schwachen Bindung an Nikotinrezeptoren wurde Myosmin lange Zeit keine Beachtung geschenkt. Dies hat sich geändert, seit man einerseits weiß, dass Myosmin unabhängig von Nikotin auch in Nüssen und vielen Grundnahrungsmitteln wie z.B. in Milchprodukten und Kartoffeln, vorkommt und es sich andererseits gezeigt hat, dass es aufgrund seiner Iminstruktur sehr leicht in kanzerogene Stoffe umgewandelt werden kann. Bei der Nitrosierung entsteht das tabakspezifische Nitrosamin *N'*-Nitrosoornikotin, welches bei Nagern Tumoren im Ösophagus, der Nase und der Lunge auslöst. In größeren Mengen entsteht durch Nitrosierung und auch Peroxidierung ein reaktives Zwischenprodukt welches zu DNA- und Proteinaddukten führt. Die gleichen Addukte wurden nach metabolischer Aktivierung von *N'*-Nitrosoornikotin und einem weiteren humankanzerogenen tabakspezifischen Nitrosamin gefunden. Beim Menschen zeigten aber diese Addukte nicht die erwartete hohe Abhängigkeit vom Rauchstatus. Bei autoradiographischen Untersuchungen an Ratten konnte eine starke Anreicherung von Myosmin in der Speicheldrüse, im Melanin und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen festgestellt werden. Erste Untersuchungen am Menschen haben schließlich gezeigt, dass Myosmin in Muttermilch, Plasma und Speichel zu finden ist.

In einer ausführlichen Literaturübersicht werden in der Einleitung der Arbeit alle Aspekte des Vorkommens, der Biosynthese, der Toxikokinetik und –dynamik von Myosmin im Kontext mit anderen Tabakalkaloiden und tabakspezifischen Nitrosaminen dargestellt.

Im experimentellen Teil wird zunächst eine Analysenmethode beschrieben, die für die Bestimmung von Myosmin, Cotinin und Nikotin in verschiedenen Matrices durch Gaschromatographie/Massenspektroskopie, während dieser Arbeit, entwickelt worden ist. Bei Mast Schweinen wurde die Belastung mit Myosmin in Abhängigkeit des Fütterungszustands durch Bestimmung der Plasmakonzentrationen ermittelt.

Die weiteren Untersuchungen widmeten sich der Myosminbelastung des Menschen. Proben von Speichel und Zehennägeln wurden als Kurz- bzw. Langzeitmarker in Abhängigkeit vom Rauchstatus analysiert. Der aktuelle Rauchstatus wurde durch Bestimmung der Cotininkonzentration im Speichel überprüft, die Langzeitbelastung durch Messung von Nikotin und Cotinin in den Zehennägeln. Abschließend wurde der zeitliche Verlauf der Myosminkonzentration

im Speichel in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme anhand eines Versuchs mit 8 Probanden untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Analysemethoden haben niedrige Nachweisgrenzen (0,01, 0,02 und 0,035 ng/mg Myosmin, Nikotin bzw. Cotinin in Zehennägeln und 0,0012 bzw. 0,05 ng/ml Myosmin bzw. Cotinin in Speichel/Plasma), eine hohe Wiederfindungsrate (91-93% im Plasma bzw. 97-102% in den Nägeln) und Präzision (8% bei allen Analyten der Nagelproben; 18% bzw. 4% bei Myosmin und Cotinin im Plasma). Durch Verwendung von deuterierten Verbindungen als interne Standards war eine hohe Spezifität des Nachweises gewährleistet.
- Myosmin wurde im Plasma von 12 nüchternen und 13 Schweinen, die vorher gefressen hatten analysiert. Bei den nüchternen Tieren war Myosmin mit nur einer Ausnahme nachweisbar. Die Konzentration lag bei $0,067 \pm 0,049$ ng/ml. Ein bis zwei Stunden nach Beginn der Fütterung war bei 13 Schweinen die Myosminbelastung im Plasma mit $0,497 \pm 0,166$ ng/ml siebenfach erhöht. Das Schweinefutter enthielt 124 ng Myosmin/g Feuchtwicht.
- In Zehennägeln waren die Konzentrationen aller Analyten bei Nichtrauchern ($n = 11$) signifikant niedriger als bei Rauchern ($n = 15$). Der Unterschied fiel bei Myosmin mit $0,020 \pm 0,014$ versus $0,058 \pm 0,052$ ng/mg ($p < 0,01$) deutlich geringer aus als bei Nikotin mit $0,128 \pm 0,079$ versus $1,789 \pm 0,964$ ng/mg ($p < 0,001$). Cotinin war nur in den Nägeln von Rauchern mit $1,136 \pm 0,843$ ng/mg nachweisbar. Es ergaben sich schwache, aber noch signifikante Korrelationen sowohl zwischen den Konzentrationen von Myosmin und Nikotin (Spearman $r = 0,67$) als auch zwischen der Myosmin- und Cotininkonzentration ($r = 0,63$). Eine deutlich bessere Korrelation ($r = 0,83$) besteht zwischen den Cotinin- und Nikotinwerten.
- Auch in den parallel gewonnenen Speichelproben waren die Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern bei Myosmin mit $0,73 \pm 0,65$ versus $2,54 \pm 2,68$ ng/ml geringer als bei Cotinin mit $1,85 \pm 4,50$ versus $83,14 \pm 54,30$ ng/ml. Zwischen Myosmin und Cotinin besteht eine signifikante Korrelation ($p < 0,0001$).
- Der Verlauf der Myosminkonzentration im Speichel nach der Nahrungsaufnahme zeigte große individuelle Schwankungen. Nach 4-stündiger Nahrungskarenz nahmen alle 8 Probanden innerhalb einer halben Stunde ca. 200 g einer Nahrung auf, die im Mittel 13,5 ng Myosmin/g Feuchtwicht enthielt. Der Basalwert von Myosmin lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,05–0,28 ng/ml Speichel. Nur ein Proband zeigte einen raschen Anstieg

des Myosmins innerhalb einer dreiviertel Stunde auf 3,6 ng/ml. Zwei Probanden erreichten ein Plateau von 1,1 und 1,5 ng/ml zwischen 2½ und 4½ Stunden nach der Nahrungsaufnahme. Bei den restlichen 5 Probanden war nur ein schwacher Anstieg der Myosminkonzentrationen zwischen 1½ and 2½ Stunden auf $0,42 \pm 0,06$ ng/ml zu verzeichnen. Die Anpassung der Daten an die Bateman-Funktion ergab für die Myosminausscheidung mit 1,6 h eine geschätzte Halbwertszeit, die mit der von Nikotin beim Menschen übereinstimmt.

7 Summary

Occurrence and toxicokinetics of myosmine depending on smoking and nutrition

Myosmine, a minor tobacco alkaloid, occurs like the major tobacco alkaloids nicotine, nor-nicotine, anabasine and anatabine in small amounts in tobacco plants and tobacco smoke. Because of its low acute toxicity and the weak affinity to nicotinic receptors, no attention was given to myosmine for a long time. However, this changed with the discovery that myosmine occurs independently of nicotine in a great variety of staple foods, vegetables, fruits, nuts and dairy products and consequently in human milk, plasma and saliva. The possible health impact of myosmine was further demonstrated by its conversion into reactive intermediates with carcinogenic potential. Due to its imine structure, myosmine is readily nitrosated and peroxidated. Nitrosation yields the tobacco-specific nitrosamine *N'*-nitrosornicotine (NNN), a human carcinogen, which produces tumours in oesophagus, oral cavity and the respiratory tract of rodents. In larger quantities, the same reactive intermediates which are formed by metabolic activation of NNN and another tobacco-specific nitrosamine are generated by nitrosation and peroxidation of myosmine. In biomonitoring studies the resulting DNA and protein adducts did not show the expected correlation with smoking status. Therefore, myosmine has been postulated to be an important additional source of these adducts.

In the first chapter, a detailed literature survey is given covering all aspects of occurrence, biosynthesis, toxicokinetics and -dynamics of myosmine in the context of other tobacco alkaloids and tobacco-specific nitrosamines.

In the experimental part, an analytical method was developed to determine myosmine, cotinine and nicotine by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) in different matrices in order to study the occurrence of myosmine in livestock as well as in humans. First, myosmine was determined in plasma of pigs in dependence of the feeding condition. Second, human saliva and toenails from smokers and nonsmokers were analyzed for short and long-term exposure to myosmine and cotinine. The nails were also analyzed for nicotine. Finally, myosmine was determined in multiple samples of saliva of eight test persons to study the kinetics of myosmine under controlled dietary conditions. The results can be summarized as follows:

- The analytical method has low detection limits for myosmine, nicotine and cotinine in toenails with 0.01, 0.02 and 0.035 ng/mg, respectively, and for myosmine and cotinine in plasma/saliva with 0.0012 and 0.05 ng/ml. The recovery is very high with 91-93% in plasma/saliva and 97-102% in toenails. The intraday precision is $\leq 8\%$ for all analytes in

toenails, whereas for plasma/saliva it is 18% with myosmine and 4% with cotinine. The analytical method has a high specificity by the use of deuterated internal standards.

- In the plasma of 12 fasting pigs, myosmine was traceable with only one exception. The concentration of myosmine was 0.067 ± 0.049 ng/ml. Within 1 - 2 hours after start of feeding the concentration of myosmine in the plasma of 13 pigs was 0.497 ± 0.166 ng/ml, a statistically significant 7-fold difference to the fasting pigs ($p < 0.0001$). The swill contained 124 ng myosmine/g wet weight.
- In toenails the concentrations of all analytes were significantly lower in 11 nonsmokers (0.021 ± 0.014 ng/mg) compared to 15 smokers (0.058 ± 0.052 ng/mg, $p < 0.01$). This 2.8-fold difference in myosmine concentrations between smokers and nonsmokers was clearly less than the 14-fold difference in nicotine concentrations (0.128 ± 0.008 versus 1.789 ± 0.964 ng/mg, $p < 0.001$). Cotinine was detectable only in toenails of smokers, 1.136 ± 0.843 ng/mg. Significant correlations exist between the concentrations of myosmine and nicotine (Spearman $r = 0.67$) as well as myosmine and cotinine ($r = 0.63$). A clearly better correlation ($r = 0.83$) was found between cotinine and nicotine values.
- In saliva samples taken in parallel with toenails, the differences between nonsmokers and smokers were also smaller with myosmine, 0.73 ± 0.65 versus 2.54 ± 2.68 ng/ml than with cotinine, 1.85 ± 4.50 versus 83.14 ± 54.30 ng/ml. Nonetheless, concentrations of myosmine and cotinine in saliva were highly correlated ($p < 0.0001$).
- In eight volunteers, the kinetics of myosmine in saliva after food intake showed large individual differences. After four hours of fasting in the morning all subjects took a lunch containing about 2.7 μ g of myosmine within half an hour. The basal concentrations of myosmine in saliva at lunch were between 0.05 and 0.28 ng/ml. In one subject only, a rapid rise of myosmine to 3.6 ng/ml was observed within three-quarters of an hour. In two subjects a plateau of 1.1 and 1.5 ng/ml was reached between 2½ and 4½ hours after lunch. The remaining five subjects showed only a weak rise of myosmine concentrations to a maximum of 0.42 ± 0.06 ng/ml within 1½ and 2½ hours. Fitting the data to the Bateman function, an elimination half-life of about 1.6 hours could be estimated which is roughly equivalent to the plasma half-life of nicotine in humans.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung des Zigarettenkonsums (---) von Erwachsenen (> 15 Jahre) von 1900 bis 2005 und die Lungenkrebsraten bei Männern (–) und Frauen (...) von 1955 bis 2005 in Deutschland [4].	- 5 -
Abbildung 2:	Zigarettenkonsum in Amerika 1900-2000 [6].	- 6 -
Abbildung 3:	<i>Nicotiana tabacum</i> (links), <i>Nicotiana rustica</i> (rechts)	- 7 -
Abbildung 4:	Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette [16].	- 10 -
Abbildung 5:	Strukturen der Haupttabakalkaloide.	- 11 -
Abbildung 6:	Nebenalkaloide des Tabaks.	- 12 -
Abbildung 7:	Biosynthese der Nikotinsäure, CPRT: Chinolinsäurephosphoribosyltransferase	- 15 -
Abbildung 8:	Biosynthese des N-Methyl-pyrrolium-Salzes.	- 15 -
Abbildung 9:	Bildung von Nikotin, Nornikotin und Myosmin aus Nikotinsäure.	- 16 -
Abbildung 10:	<i>Cestrum nocturnum</i> (links) und <i>Carica Papaya</i> (rechts).	- 28 -
Abbildung 11:	Konzentrationen von Myosmin (links) und Cotinin (rechts) in Muttermilch nach Rauchstatus (NR: Nichtraucherin, PR: Passivrauchbelastung; R: Raucherin).	- 31 -
Abbildung 12:	Myosmin und Cotinin im Speichel während des Diätversuches, vor und nach der Nahrungsaufnahme genommene Proben sind durch leere bzw. gefüllte Symbole dargestellt; Werte unterhalb der Linie (LOD) liegen unter der Nachweisgrenze.	- 32 -
Abbildung 13:	Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin.	- 34 -
Abbildung 14:	Massenfragmente von Myosmin.	- 38 -
Abbildung 15:	Pyrolyse von Nikotin.	- 39 -
Abbildung 16:	Vier-Stufen-Synthese von <i>Leete</i> [48].	- 40 -
Abbildung 17:	Synthese von Myosmin.	- 41 -
Abbildung 18:	Anfertigung der Gewebeschnitte mit einem Hochpräzisions-Großschnittkryomikrotom.	- 41 -
Abbildung 19:	Autoradiogramme 0,1 bis 24 Std. nach Applikation von ¹⁴ C-Myosmin [113].	- 43 -
Abbildung 20:	HPLC Radiochromatogramm von 0-6 h Urin einer Wistar Ratte nach oraler Gabe von ³ H-Myosmin. Die Signale 1 und 2 repräsentieren die beiden Hauptmetaboliten 3-Pyridylessigsäure bzw. Ketosäure. Drei der kleineren Signale konnten als 3-Pyridylmethanol (3), 3'-Hydroxymyosmin (4) und HPB (5) identifiziert werden [116].	- 46 -
Abbildung 21:	Myosminmetaboliten im Rattenurin [111].	- 46 -
Abbildung 22:	Depolarisation der Ganglien nach 2-minütiger Applikation von Myosmin, Muskarin und Nikotin [131].	- 50 -
Abbildung 23:	Konzentrationsabhängige Depolarisation der Ganglien durch Myosmin (30-30 000 µM; n = 10) alleine oder in Anwesenheit von Atropin (0,010 µM; n = 4) oder Hexamethonium (100 µM; n = 4); MW ± SE [131].	- 51 -
Abbildung 24:	Konzentrationsabhängige Hemmung der Muskarin- und Nikotininduzierten Gangliendepolarisation durch Myosmin (MW ± SE, n = 4) [131].	- 51 -
Abbildung 25:	Konzentrationsabhängige DNA-Schädigung in humanen Nasenschleimhautzellen nach einer Stunde Inkubation mit Myosmin. Als Positivkontrolle wurde mit 0,035 mM MNNG inkubiert.	- 55 -
Abbildung 26:	Nachweis von DNA-Schäden durch Myosmin in OE33-Zellen mit dem Comet-Assay (OTM = Olive Tail Moment, MW ± SE). Links oben: Inkubation von Myosmin bei pH 6 (a, p < 0,05 zur Kontrolle). Rechts oben: Inkubation mit 25 mM Myosmin und/oder H ₂ O ₂ (a, p < 0,001 zur Kontrolle; b, p < 0,01 zu H ₂ O ₂ alleine; c, p < 0,05 zur Fpg-Nachinkubation). Links unten: Inkubation mit und ohne 1 mM SIN-1 (a/b, p < 0,05/0,001 zur Kontrolle; c/d, p < 0,01/0,001 zu Myosmin alleine; e/f, p < 0,01/0,001 zu SIN-1 alleine). Rechts unten: 23 h Inkubation mit 10 mM Myosmin und/oder 1 mM SIN-1 nach 1 h Inkubation mit 1 µM MNNG (a, p < 0,05 zur Kontrolle; b, p < 0,05 zu 1 h MNNG; c, p < 0,05 zu Reparatur alleine; d, p < 0,05 zu Myosmin alleine).	- 56 -
Abbildung 27:	Schema der Nitrosierung	- 57 -
Abbildung 28:	Bildung der TSNA (in Abwandlung nach <i>Hoffmann et al.</i> [170]).	- 60 -
Abbildung 29:	Schema des NNN-Metabolismus (modifiziert nach <i>Hecht</i> 1998) [179].	- 62 -
Abbildung 30:	Schema des NNN-Metabolismus (modifiziert nach <i>Hecht</i> 1998) [179].	- 64 -
Abbildung 31:	pH-abhängige Nitrosierung von Myosmin [166].	- 65 -
Abbildung 32:	Aktivierung von TSNA und Myosmin zu HPB-freisetzenden Addukten [167,179,193].	- 66 -
Abbildung 33:	Reaktive Zentren des Guanins für diverse Elektrophile [201].	- 68 -
Abbildung 34:	HPB-freisetzende Hämoglobinaddukte bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR) aus New York [215] und München [212,214]. Die Patienten mit unterschiedlichen Stadien der Refluxkrankheit oder mit Ösophagustumoren stammten aus der Chirurgischen Klinik rechts der Isar der TU München.	- 69 -

Abbildung 35:	HPB-freisetzende Addukte an Hämoglobin und DNA von tumorfreiem peripheren Lungengewebe bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR) mit Lungenkrebs. Die Linien zeigen die Medianwerte [217].	- 70 -
Abbildung 36:	HPB-freisetzende Addukte an DNA von Lunge und Mukosa des unteren Ösophagus und der Cardia bei Rauchern (R) und Nichtrauchern (NR). Die Gewebe stammen von akut Verstorbenen ohne Tumorerkrankung. Die Linien zeigen die Medianwerte [218].	- 70 -
Abbildung 37:	Korrelation zwischen HPB-freisetzenden Addukten an DNA von Lunge und Mukosa des unteren Ösophagus und der Cardia von akut Verstorbenen. Die Linien zeigen das Ergebnis der linearen Korrelation, die Korrelationskoeffizienten wurden mit dem Spearman-Rank-Test berechnet [218].	- 71 -
Abbildung 38:	Zunahme des Ösophagus-Adenokarzinoms in Italien, USA, Frankreich und England.	- 72 -
Abbildung 39:	Mechanismen, die zur Adenokarzinom-Entstehung im Ösophagus führen (nach <i>Chen et al.</i> [222]), GERD = gastroösophageale Refluxkrankheit.	- 72 -
Abbildung 40:	HPB-DNA-Addukte in der Ösophagasmukosa von Ratten durch Myosmin und NNN.	- 75 -
Abbildung 41:	Struktur der Strata-X-C-Säulen.	- 77 -
Abbildung 42:	Festphasenextraktion der Plasmaproben.	- 82 -
Abbildung 43:	Flüssig-Flüssig-Extraktion.	- 83 -
Abbildung 44:	Überführung der Proben in Hexan.	- 84 -
Abbildung 45:	Verlauf des GC-Temperaturprogramms.	- 87 -
Abbildung 46:	Zeitprogramm der einzelnen Massen im MS.	- 88 -
Abbildung 47:	Funktion 1 SIR und 2 SIR, Scan Parameters.	- 88 -
Abbildung 48:	Hauptfragmente von Myosmin.	- 97 -
Abbildung 49:	Massenspektrum von Myosmin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z: 50-200 bei 70 eV.	- 98 -
Abbildung 50:	Massenspektrum von D ₄ -Myosmin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z: 50-200 bei 70 eV.	- 98 -
Abbildung 51:	Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab [®] Datenbank (unten).	- 99 -
Abbildung 52:	Hauptfragmente von Cotinin [240].	- 99 -
Abbildung 53:	Massenspektrum von Cotinin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.	- 100 -
Abbildung 54:	Massenspektrum von D ₃ -Cotinin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.	- 100 -
Abbildung 55:	Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab [®] Datenbank (unten).	- 101 -
Abbildung 56:	Hauptfragmente von Nikotin.	- 101 -
Abbildung 57:	Massenspektrum von Nikotin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.	- 102 -
Abbildung 58:	Massenspektrum von D ₃ -Nikotin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV.	- 102 -
Abbildung 59:	Full Scan einer Zehennagelprobe (oben) im Vergleich mit der MassLab [®] Datenbank (unten).	- 103 -
Abbildung 60:	Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin, Cotinin und Nikotin.	- 104 -
Abbildung 61:	Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin und Cotinin im Speichel.	- 106 -
Abbildung 62:	Konzentrationsunterschiede von Myosmin zwischen nüchternen (n = 12) und gefütterten Schweinen (1 h nach Fütterungsbeginn; n = 13), a: signifikant verschieden von den Nüchternwerten, p < 0,0001.	- 108 -
Abbildung 63:	Chromatogramm von D ₄ -Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus der Plasmaprobe eines nüchternen Schweins, aufgenommen jeweils im SIM-Modus bei den entsprechenden Massenspuren m/z 122 und m/z 118.	- 108 -
Abbildung 64:	Chromatogramm von D ₄ -Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus der Plasmaprobe eines gefütterten Schweins, aufgenommen jeweils im SIM-Modus bei den entsprechenden Massenspuren m/z 122 und m/z 118.	- 108 -
Abbildung 65:	Chromatogramm von D ₄ -Myosmin (oben) und Myosmin (unten) aus einer Futterprobe (aufgenommen im SIM-Modus).	- 109 -
Abbildung 66:	Vergleichende Darstellung der Tabakalkaloide Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln zwischen Nichtrauchern und Rauchern (MW ± SE), a, b: signifikant verschieden von Nichtraucherwerten, p < 0,01 (a) und p < 0,0001 (b).	- 111 -

Abbildung 67:	Korrelation von Myosmin in Zehennägeln mit Nikotin (oben links) und Cotinin (oben rechts) und von Nikotin und Cotinin (unten links). Die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests.	112 -
Abbildung 68:	Chromatogramme von Myosmin, Cotinin und Nikotin einer Zehennagelprobe eines Rauchers, jeweils von D ₀ und des zugehörigen D ₃ /D ₄ Standard.	112 -
Abbildung 69:	Myosmin und Cotinin in Speichelproben von Rauchern und Nichtrauchern (MW ± SE), a,b: signifikant verschieden von Nichtraucherwerten, p < 0,01 (a) und p < 0,001 (b).	113 -
Abbildung 70:	Chromatogramm einer Speichelprobe eines Rauchers mit dem Nachweis von Myosmin und Cotinin, jeweils mit dem zugehörigen internen Standards.	114 -
Abbildung 71:	Korrelation von Cotinin und Myosmin in Speichel bei allen Probanden (links) und bei Rauchern (rechts). Die Linien zeigen die lineare Korrelation, die Werte das Ergebnis des Spearman Rank Tests.	114 -
Abbildung 72:	Myosminprofil im Speichel einer Probandin im Vorversuch (links) und Zeitpunkte der Probennahmen mit zugehöriger Myosminkonzentration. Die Buchstaben mit den gepunkteten Linien geben die Zeitpunkte der Nahrungs- und Getränkeaufnahme an (siehe Tabelle 53). Der Maximal- und Minimalwert ist fett hervorgehoben.	115 -
Abbildung 73:	Vergleichende Darstellung der Myosminkonzentrationen im Speichel von 8 verschiedenen Probanden.	118 -
Abbildung 74:	Differenzierung des Speichelversuchs in drei Gruppen.	119 -
Abbildung 75:	Vergleichende Darstellung der Mittelwerte der Myosminkonzentrationen (MW ± SE) von sieben Probanden, außer Proband g.	120 -
Abbildung 76:	Mittelwerte des Speichelprofilversuchs (n = 7, ohne Proband g), angepasst an die Bateman-Funktion.	131 -

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kanzerogene in HS und NS von Zigaretten.	- 11 -
Tabelle 2:	Myosminkonzentration (μM), gemessen jeweils im Abstand von zwei Tagen, nach exogener Zufuhr von 1 mg/ml (S)-Nikotin in <i>N. plumbaginifolia</i> Zellkulturen [51].	- 17 -
Tabelle 3:	Gesamtalkaloidgehalt der Pflanzentrockenmasse (mg/g) und prozentualer Anteil von Myosmin in verschiedenen <i>Nicotiana</i> Spezies, (gezogen im Gewächshaus) [22].	- 18 -
Tabelle 4:	Die Alkaloidzusammensetzung von vier Tabakblattproben (mg/g) [54].	- 19 -
Tabelle 5:	Myosminkonzentrationen in den Organen von <i>N. tabacum</i> und <i>N. rustica</i> ($\mu\text{g/g}$ Feuchtgewicht) [55].	- 19 -
Tabelle 6:	Myosminkonzentration (%) von zwei feuchten Schnupftabakproben und einer Referenzprobe.	- 20 -
Tabelle 7:	Quantitative Bestimmung von einzelnen Komponenten in feuchtem Schnupftabak [57].	- 20 -
Tabelle 8:	Myosminanteil am totalen Alkaloidgehalt verschiedener Tabakarten, bezogen auf das Trockengewicht.	- 21 -
Tabelle 9:	Alkaloidfraktionen (%) in fünf verschiedenen Tabakprobenmischungen.	- 21 -
Tabelle 10:	Myosmingehalt in Tabaken von Maryland-, Virginia und Burley Tabak ($\mu\text{g/g}$) [60].	- 21 -
Tabelle 11:	Myosmin- und Nikotingehalt von „flue-cured“, Burley und türkischem Tabak ($\mu\text{g/Zug}$) [65].	- 23 -
Tabelle 12:	Myosminkonzentration in Haupt- und Nebenstromrauch verschiedener Zigaretten ($\mu\text{g/Zigarette}$) [66].	- 23 -
Tabelle 13:	Durchschnittliche Konzentrationen der Gasphaseanalyten der Rauchkammer.	- 24 -
Tabelle 14:	Myosmingehalt ($\mu\text{g/m}^3$) gemessen in Zigarettenrauch [68].	- 24 -
Tabelle 15:	Myosmin- und Nikotingehalte ($\mu\text{g/Zig.}$) in unterschiedlichen Zigarettenarten [69].	- 25 -
Tabelle 16:	Aufnahmerelevante Emissionsfaktoren ($\mu\text{g/Zigarette}$) von ETS-Komponenten, gemessen bei gleichmäßiger Belüftung, in einer 50 m ³ großen möblierten Raucherwohnung.	- 26 -
Tabelle 17:	Myosmingehalt im Vergleich zu anderen Alkaloiden (Blätter/Wurzeln) von <i>D. hopwoodii</i> in verschiedenen Regionen von Australien, (% Anteile am Gesamtalkaloidgehalt).	- 27 -
Tabelle 18:	Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [38,84].	- 29 -
Tabelle 19:	Abschätzung der Myosmin-Exposition durch Nahrungsaufnahme. Werte zum Pro-Kopf-Verbrauch beziehen sich auf Deutschland.	- 30 -
Tabelle 20:	Myosmin- und Cotininbelastungen (ng/ml) in Muttermilch.	- 32 -
Tabelle 21:	Myosmin- und Cotininbelastungen (ng/ml) im Speichel.	- 32 -
Tabelle 22:	Myosminbelastung (ng/ml) in Plasma und Speichel und theoretische, sowie experimentelle Bestimmung des Speichel/Plasma-Verhältnisses (S/P).	- 33 -
Tabelle 23:	Lokalisation und Intensität der Absorptionsmaxima von Myosmin [93].	- 35 -
Tabelle 24:	Lokalisation und Intensität der Absorptionsminima von Myosmin [93].	- 35 -
Tabelle 25:	UV-Absorptionsspektrum von Myosmin.	- 36 -
Tabelle 26:	Gaschromatographie von Myosmin im Jahre 1958 [99,100].	- 37 -
Tabelle 27:	Identifizierung von Myosmin anhand von GC und nachfolgender MS [102].	- 38 -
Tabelle 28:	Verteilung des radioaktiv markierten Myosmins [113].	- 42 -
Tabelle 29:	Gegenüberstellung der prozentualen Metabolitenanteile des akuten [85] und subakuten ($\mu\text{mol/kg KG}$) Myosmin-Stoffwechsels (MW \pm SD; akut: n = 4; subakut: n = 12).	- 47 -
Tabelle 30:	Wirkungen von Myosmin und anderen Nebenalkaloiden des Tabaks im Vergleich zu Nikotin (= 100%) nach intravenöser Applikation in verschiedenen Tiermodellen [129].	- 49 -
Tabelle 31:	Vasotroper Effekt der Tabakalkaloide auf die Mesenterialgefäße in Prozent relativ zu Nikotin (= 100%) [130].	- 49 -
Tabelle 32:	Vergleich der Hemmwirkung von Tabakalkaloiden auf Oozytenaufnahmerate, ziliäre Schlagfrequenz und infundibuläre Muskelkontraktion in Eileitern von Hamstern [132].	- 52 -
Tabelle 33:	TSNA-Konzentrationen in Tabakprodukten der USA und UK [177,178].	- 61 -
Tabelle 34:	Hauptstoffwechselwege von NNK (nach Hecht, 1998).	- 63 -
Tabelle 35:	Vergleich einzelner Addukt mengen durch α -Hydroxylierung von NNK in verschiedenen Geweben [179].	- 63 -
Tabelle 36:	Zeitfenster der verschiedenen SIM Aufnahmen, sowie Retentionszeiten der Substanzen auf einer DB5-MS Säule.	- 87 -
Tabelle 37:	Verdünnungsreihe von D ₀ -Myosmin.	- 90 -
Tabelle 38:	Verdünnungsreihe von D ₀ -Cotinin.	- 91 -
Tabelle 39:	Verdünnungsreihe D ₀ -Myosmin.	- 92 -
Tabelle 40:	Verdünnungsreihe D ₀ -Cotinin und D ₀ -Nikotin.	- 92 -
Tabelle 41:	Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel (MW \pm SD, n = 6).	- 104 -

Tabelle 42:	Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel (MW ± SD, n = 6).	- 104 -
Tabelle 43:	Wiederfindung der internen Standards aus Keratin (MW ± SD, n = 9).	- 105 -
Tabelle 44:	Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der Tabakalkaloide in Keratin.	- 105 -
Tabelle 45:	Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW ± SD, n = 6).	- 105 -
Tabelle 46:	Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW ± SD, n = 6).	- 106 -
Tabelle 47:	Wiederfindung der internen Standards aus Kälberserum (MW ± SD, n = 9).	- 106 -
Tabelle 48:	Nachweis- und Bestimmungsgrenze (ng/ml) in Plasma und Speichel.	- 107 -
Tabelle 49:	Inhaltsstoffe und Zusammensetzung des Endmastfutters, Angaben vom LVG-München.	- 109 -
Tabelle 50:	Demographische Daten und Angaben der Probanden laut Fragebogen.	- 110 -
Tabelle 51:	Vergleichende Ergebnisse der Analytenkonzentrationen in Zehennägeln zwischen Rauchern und Nichtrauchern (MW ± SD; Statistik siehe Abbildung 66).	- 111 -
Tabelle 52:	Myosmin und Cotinin im Speichel von 15 Rauchern und 11 Nichtrauchern (ng/ml).	- 113 -
Tabelle 53:	Aufnahme von Nahrung und Getränken im Vorversuch (Gl.: Gläser à 0,2 l).	- 115 -
Tabelle 54:	Demographische Daten und Angaben der Probanden.	- 116 -
Tabelle 55:	Zutaten des Mittagessens für 8 Personen.	- 116 -
Tabelle 56:	Übersicht Probenentnahme vor und nach der Nahrungsaufnahme.	- 117 -
Tabelle 57:	Analyse der Mittagsmahlzeit, MW ± SD (n = 4).	- 117 -
Tabelle 58:	Einfluss eines Mittagessens (12.00-12.30 Uhr) auf die Myosminkonzentration im Speichel. Der Morgenwert wurde um 8.00 Uhr nach dem Frühstück genommen. Der Minimalwert (C_{\min}) wurde erst nach dem Essensbeginn erreicht (t_{\min}), C_{Ende} gibt den letzten Messwert 5,5 Stunden (t_{Ende}) nach dem Essensbeginn an. Die AUC entspricht der Fläche der Konzentrations-Zeit-Kurve nach dem Essensbeginn (ng×ng/ml).	- 119 -

10 Literaturverzeichnis

1. Zwickenpflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. J Agric Food Chem 46:2703-2706
2. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. J Agric Food Chem 50:4909-4915
3. Maier M Schulze A Richter E (2005) Biomonitoring of myosmine in human milk and saliva. Toxicol Lett 158:S201-S202
4. Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwickenpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. Toxicology 192:171-177
5. Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in human esophageal cell lines. Proc Am Ass Cancer Res 47:A3566
6. Routh HB Bhowmik KR Parish JL Parish LC (1998) Historical aspects of tobacco use and smoking. Clin Dermatol 16:539-544
7. Müller FH (1940) Tabakmissbrauch und Lungenkarzinom. Z Krebsforsch 49:57-85
8. Haustein K-O (2004) Fritz Lickint (1898-1960) - Ein Leben als Aufklärer über die Gefahren des Tabaks. Suchtmed 6:249-255
9. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. Lehrbuch der Toxikologie;Ch. 35 pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
10. Proctor RN (2001) Tobacco and the global lung cancer epidemic. Nat Rev Cancer 1:82-86
11. Warner KE (2005) Will the next generation of "safer" cigarettes be safer? J Pediatr Hematol Oncol 27:543-550
12. Roth L Daunderer M Kormann K (2006) Giftpflanzen - Pflanzengifte. Hamburg, Germany: Nikol Verlagsges.mbH
13. Brunnemann KD Genoble L Hoffmann D (1987) Identification and analysis of a new tobacco-specific *N*-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol. Carcinogenesis 8:465-469
14. Wahlberg I Ringberger T (1999) Smokeless tobacco. Tobacco production, chemistry and technology;Ch. 14 pp 452-460; eds: Davis DL Nielsen MT, Oxford, Blackwell Science Ltd.
15. Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. J Toxicol Environ Health 50:307-364
16. Wynder EL Hoffmann D (1994) Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. Cancer Res 54:5284-5295

17. Hoffmann D Rivenson A Chung F-L Hecht SS (1991) Relevance of nicotine-derived N-nitrosamines in tobacco carcinogenesis. Effects of Nicotine on Biological Systems. Advances in Pharmacological Sciences; pp 89-101; eds: Adlkofer F Thureau K, Basel/Boston/Berlin, Birkhäuser Verlag
18. IARC (1986) Tobacco Smoking. Lyon, France: IARC
19. Witschi H Espiritu I Peake JL Wu K Maronpot RR Pinkerton KE (1997) The carcinogenicity of environmental tobacco smoke. Carcinogenesis 18:575-586
20. Anon (1997) Passivrauchen am Arbeitsplatz. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten; ed.: DFG, Weinheim, Germany, VCH-Wiley
21. Römpf Chemie-Lexikon (2007) <http://www.roempp.com>
22. Nilsson R (1996) Environmental tobacco smoke and lung cancer: a reappraisal. Ecotoxicol Environ Safety 34:2-17
23. Enstrom JE Kabat GC (2003) Environmental tobacco smoke and tobacco related mortality in a prospective study of Californians, 1960-98. Br Med J 326:1057-1061
24. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. Hum Exp Toxicol 16:449-459
25. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nature Rev Cancer 3:733-744
26. Rundlöf T Olsson E Wiernik A Back S Aune M Johansson L Wahlberg I (2000) Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of N-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. J Agric Food Chem 48:4381-4388
27. Sisson VA Severson RF (1990) Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. Beitr Tabakforsch Int 14:327-339
28. Il'in GS (1965) Biosynthesis of tobacco alkaloids. Izv Akad Nauk SSSR Biol 5:677-681
29. Franke W (1997) Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. 6. Auflage; Stuttgart: Thieme Verlag
30. Fejér-Kossey O (1972) Myosmine in different organs of tobacco plant. Phytochemistry 11:415-416
31. Leete E Chedekel MR (1972) The aberrant formation of (-)-N-methylanabasine from N-methyl- Δ^1 -piperideinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. Phytochemistry 11:2751-2756
32. Kisaki T Tamaki E (1966) Phytochemical Studies on the tobacco alkaloids-X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotatory changes in tobacco plants. Phytochemistry 5:293-300
33. Andersson C Wennström P Gry J (2003) Nicotine alkaloids in Solanaceous food plants. <http://www.norden.org/pub/ebook/2003-531.pdf>

34. Bush LP Fannin FF Chelvarajan RL Burton HR (1993) Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion; Ch. 1 pp 1-30; eds: Gorrod JW Wahren J, London, Chapman & Hall
35. Noga E (1914) The alkaloids in tobacco extract. Fach Mitt Tabakregie Nos. 1 and 2
36. Pailer M (1965) Chemistry of nicotine and related alkaloids (including biosynthetic pathways). Tobacco alkaloids and related compounds; pp 15-36; ed.: von Euler US, New York, Pergamon Press/Macmillan Co.
37. Werle E Schievelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. 2. Mitteilung. Arzneimittelforsch 11:1149-1157
38. Wenusch A Schöller R (1933) Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Zigarrenrauches. Fachl Mitt Österr Tabakregie 2:15-19
39. Späth E Wenusch A Zajic E (1936) Die Konstitution des Myosmins (V. Mitteilung über Tabakbasen). Ber Dtsch Chem Ges 69:393-396
40. Späth E Mamoli L (1936) Synthese des Myosmins (VI. Mitteil. über Tabakbasen) und Bemerkungen zu einer Notiz von Miss T. M. Reynolds und R. Robinson. Ber Dtsch Chem Ges 69B:757-760
41. Woodward CF Eisner A Haines PG (1944) Pyrolysis of nicotine to myosmine. J Am Chem Soc 66:911-914
42. Tso TC Jeffrey RN (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in Maryland tobacco. Arch Biochem Biophys 43:269-285
43. Tyroller S (2001) Myosmin-Analytik in Lebensmitteln. Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät der LMU
44. Brand JM Mpuru SP (1993) Dufour's gland and poison gland chemistry of the myrmicine ant, *Messor capensis* (Mayr). J Chem Ecol 19:1315-1321
45. Leete E (1974) Biosynthesis of the minor alkaloids of tobacco. tobaccodocuments.org/bw/91469:1-20
46. Yang KS Gholson RK Waller GR (1965) Studies on nicotine biosynthesis. J Am Chem Soc 87:4184-4188
47. Yoshida D Mitake T (1966) Agmatine and N-carbamylputrescine as intermediates in the formation of nicotine by tobacco plants. Plant Cell Physiol 7:301-305
48. Dewey LJ Byerrum RU Ball CD (1955) Biosynthesis of the pyrrolidine ring of nicotine. Biochem Biophys Acta 18:141-142
49. Leete E (1977) Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. Recent Adv Chem :365-388

50. Dawson RF Christman DR D'Adamo A Solt ML Wolf AP (1960) The biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotinic acids. *J Am Chem Soc* 82:2628-2633
51. Alworth WL Rapoport H (1965) Biosynthesis of the nicotine alkaloids in *Nicotiana glutinosa*. Interrelationship among nicotine, nornicotine, anabasine, and anatabine. *Arch Biochem Biophys* 112:45-53
52. Leete E Chedekel MR Bodem GB (1972) Synthesis of myosmine and nornicotine, using an acyl carbanion equivalent as an intermediate. *J Org Chem* 37:4465-4466
53. Leete E (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr Tabakforsch Int* 12:113-116
54. Shi H Bush L Krauss M (2004) Effect of nicotine to nornicotine conversion on myosmine and TSNA contents in burley tobacco. *Tobacco Sci Technol* 10:27-30
55. Mesnard F Girard S Fliniaux O Bhogal RK Gillet F Lebreton J Fliniaux M-A Robins RJ (2001) Chiral specificity of the degradation of nicotine by *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures. *Plant Sci* 161:1011-1018
56. Fejér-Kossey O (1967) Separation of ten tobacco alkaloids by thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 31:592-593
57. Sisler EC (1969) Determination of myosmine with o-aminobenzaldehyde. *Anal Biochem* 31:183-188
58. Shen J Shao X (2006) Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography-mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Anal Chim Acta* 561:83-87
59. Mönnikes RN (2006) Bestimmung von Myosmin in den Organen der Tabakpflanze mittels comprehensive zweidimensionaler Gaschromatographie. Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Biologie der Universität Wuppertal
60. Brunnemann KD Qi J Hoffmann D (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem Toxicol* 40:1699-1703
61. Sharma AK Prokopczyk B Hoffmann D (1991) Supercritical fluid extraction of moist snuff. *J Agric Food Chem* 39:508-510
62. Jeffrey RN Tso TC (1955) Qualitative differences in the alkaloid fraction of cured tobaccos. *Agr Food Chem* 3:680-682
63. Severson RF McDuffie KL Arrendale RF Gwynn GR Chaplin JF Johnson AW (1981) Rapid method for the analysis of tobacco nicotine alkaloids. *J Chromatogr A* 211:111-121
64. Schumacher JN (1984) Flavor composition of Maryland tobacco. *Beitr Tabakforsch Int* 12:271-278
65. Perfetti TA Coleman WM (1998) Chiral-gas chromatography-selected ion monitoring-mass selective detection analysis of secondary alkaloids in tobacco and tobacco smoke. *Beitr Tabakforsch Int* 18:35-42

66. Leffingwell JC Alford ED (2005) Volatile constituents of Perique tobacco. *EJEAFCh* 4:899-915
67. Neurath G (1969) Stickstoffverbindungen des Tabakrauches. *Beitr Tabakforsch* 5:115-133
68. Neurath G Dünger M Gewe J Lüttich W Wichern H (1966) Untersuchung der flüchtigen Basen des Tabakrauches. *Beitr Tabakforsch* 3:563-569
69. Matsushima S Ishiguro S Sugawara S (1979) Composition studies on some varieties of tobacco and their smoke. I. Major components in smoke condensate. *Beitr Tabakforsch Int* 10:31-38
70. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr Tabakforsch Int* 12:199-209
71. Nelson PR Conrad FW Kelly SP Maiolo KC Richardson JD Ogden MW (1997) Composition of environmental tobacco smoke (ETS) from international cigarettes and determination of ETS-RSP: particulate marker ratios. *Environ Int* 23:47-52
72. Eatough DJ Benner CL Bayona JM Richards G Lamb JD Lee ML Lewis EA Hansen LD (1989) Chemical composition of environmental tobacco smoke. 1. Gas-phase acids and bases. *Environ Sci Technol* 23:679-687
73. Martin P Heavner DL Nelson PR Maiolo KC Risner CH Simmons PS Morgan WT Ogden MW (1997) Environmental tobacco smoke (ETS): a market cigarette study. *Environ Int* 23:75-90
74. LaKind JS Jenkins RA Naiman DQ Ginevan ME Graves CG Tardiff RG (1999) Use of environmental tobacco smoke constituents as markers for exposure. *Risk Anal* 19:359-373
75. Baker RR (1999) Smoke chemistry. Tobacco production, chemistry and technology; Ch. 12 pp 398-439; eds: Davis DL Nielsen MT, Oxford, Blackwell Science Ltd.
76. Chen PX Moldoveanu SC (2003) Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F Kentucky reference cigarette. *Beitr Tabakforsch Int* 20:448-458
77. Baek S-O Jenkins RA (2004) Characterization of trace organic compounds associated with aged and diluted sidestream tobacco smoke in a controlled atmosphere - volatile organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmosph Environ* 38:6583-6599
78. Rogge WF Hildemann LM Mazurek MA Cass GR (1994) Sources of fine organic aerosol .6. Cigarette smoke in the urban atmosphere. *Environ Sci Technol* 28:1375-1388
79. Singer BC Hodgson AT Nazaroff WW (2003) Gas-phase organics in environmental tobacco smoke: 2. Exposure-relevant emission factors and indirect exposures from habitual smoking. *Atmosph Environ* 37:5551-5561

80. Merckel C Pragst F Ratzinger A Aebi B Bernhard W Sporkert F (2006) Application of headspace solid phase microextraction to qualitative and quantitative analysis of tobacco additives in cigarettes. *J Chromatogr A* 1116:10-19
81. WHO (1998) Medical plants in the south Pacific. Western Pacific Series 19
82. Smalberger T Rall GJH Dd Waal HL (1968) *Carica papaya* alkaloids. *Tydskrif vir Natuurwetenskappe* 8:156-157
83. Halim AF Collins RPBMS (1971) Alkaloids produced by *Cestrum nocturnum* and *Cestrum diurnum*. *Planta Medica* 20:44-49
84. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
85. Watson PL Luanratana O Griffin WJ (1983) The ethnopharmacology of pituri. *J Ethnopharmacol* 8:303-311
86. Cruz-López L Jackson BD Hefetz A Morgan ED (2006) Alkaloids in the venom of *Messor* ants. *Biochem Syst Ecol* 34:199-204
87. Co JE Jones TH Hefetz A Tinaut A Snelling RR (2003) The comparative exocrine chemistry of nine Old World species of *Messor* (Formicidae: Myrmicinae). *Biochem Syst Ecol* 31:367-373
88. Tyroller S (2004) Untersuchungen zu Vorkommen und Metabolismus von Myosmin und chemopräventive Effekte von verschiedenen Tabakalkaloiden und tabakspezifischen Nitrosaminen auf den Stoffwechsel von *N*-Nitrosoornikotin. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU
89. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
90. Hukkanen J Jacob P Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79-115
91. Dempsey D Tutka P Jacob P Allen F Schoedel K Tyndale RF Benowitz NL (2004) Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin Pharmacol Ther* 76:64-72
92. Maier M (2005) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
93. Brandänge S Lindblom L (1976) *N*-Vinyl as N-H protection group. A convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem Scand* 30:39
94. Witkop B (1954) Infrared diagnosis of the hydrochlorides of organic bases. II. The structure of myosmine. *Am Chem Soc* 76:5597-5599
95. Korte F Schulze-Steinen H-J (1962) Umlagerung von α -Aroyl-pyrrolidonen in konz. Salzsäure zu Pyrrolinderivaten. *Chem Ber* 95:2444-2452

96. Swain ML Eisner A Woodward CF Brice BA (1949) Ultraviolet absorption spectra of nicotine, normicotine and some of their derivatives. *J Am Chem Soc* 71:1341-1345
97. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem Scand Ser B* 37:643-644
98. Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J Org Chem* 54:4462-4468
99. Haines PG Eisner A Woodward M (1945) Chemical reactivity of myosmine. *J Am Chem Soc* 67:1258-1262
100. Eddy CR Eisner A (1954) Infrared spectra of nicotine and some of its derivatives. *Anal Chem* 26:1428-1431
101. James AT Martin AJP (1952) Gas-liquid partition chromatography. A technique of the analysis of volatile minerals. *Analyst* 77:915-932
102. Quin LD (1959) Alkaloids of tobacco smoke. I. Fractionation of some tobacco alkaloids and of the alkaloid extract of Burley cigarette smoke by gas chromatography. *J Org Chem* 24:911-914
103. Quin LD (1959) Alkaloids of tobacco smoke. II. Identification of some of the alkaloids in Burley cigarette smoke. *J Org Chem* 24:914-916
104. Duffield AM Budzikiewicz H Djerassi C (1965) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXII. A study of the fragmentation process of some tobacco alkaloids. *J Am Chem Soc* 87:2926-2932
105. Brown EV Ahmad I (1972) Alkaloids of cigarette smoke condensate. *Phytochemistry* 11:3485-3490
106. Piade JJ Hoffmann D (1980) Chemical studies on tobacco smoke LXXVII. Quantitative determination of alkaloids in tobacco by liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 3:1505-1515
107. Stein ML Burger A (1957) New synthesis of myosmine. *J Am Chem Soc* 79:154-156
108. Wada E Kisaki T Saito K (1959) Autoxidation of nicotine. *Arch Biochem Biophys* 79:124-130
109. Mundy BP Larsen BR McKenzie LF Braden G (1972) A convenient synthesis of myosmine. *J Org Chem* 37:1635-1636
110. Kisaki T Maeda S Koiwai A Mikami Y Sasaki T Matsushita H (1978) Transformation of Tobacco Alkaloids. *Beitr Tabakforsch* 9:308-316
111. Ullberg S (1954) Autoradiographical distribution and excretion studies with S35-labelled penicillin. *Soc Exp Biol Med* 85:550-553
112. Ullberg S Larsson B (1981) Whole-body autoradiography. *Meth Enzymol* 77:64-80

113. Glas S (2003) Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
114. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* 33:1648-1656
115. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2003) Metabolism of myosmine in rats. *Proc Am Ass Cancer Res* 44 (2nd ed.):80-81
116. Glas S Tyroller S Zwickenpflug W Steiner K Kiefer G Richter E (2007) Tissue distribution and excretion of myosmine after i.v. administration to Long-Evans rats using quantitative whole-body autoradiography. *Arch Toxicol* 81:151-161
117. Hecht SS Young R Chen CB (1980) Metabolism in the F344 rat of 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen. *Cancer Res* 40:4144-4150
118. Lewalter J Korallus U (1985) Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 56:179-196
119. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2005) 3-Pyridylmethanol and 3'-hydroxymyosmine as urinary metabolites in Wistar rats. *Proc Am Ass Cancer Res* 46:A2121
120. Thalheim C (2005) Wechselseitiger Einfluss von *N*-Nitrosornicotin und Myosmin auf ihren Metabolismus und Einfluss von Nornicotin auf den Metabolismus von *N*-Nitrosornicotin nach subakuter oraler Gabe in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
121. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2004) Interactions of different tobacco-alkaloids and TSNA on NNN metabolism in F344 rats. *Proc Am Ass Cancer Res* 45:A3199
122. Hecht SS Hatsukami DK Bonilla LE Hochalter JB (1999) Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism. *Chem Res Toxicol* 12:172-179
123. Hecht SS Chen CB Ohmori T Hoffmann D (1980) Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, *N*-nitrosornicotine and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 40:298-302
124. Hoffmann D Castonguay A Rivenson A Hecht SS (1981) Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*-nitrosornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 41:2386-2393
125. Upadhyaya P Zimmerman CL Hecht SS (2002) Metabolism and pharmacokinetics of *N*-nitrosornicotine in the patas monkey. *Drug Metab Dispos* 30:1115-1122
126. Hayes JR Steele RH (1989) A review of the literature pertaining to the toxicology of myosmine. *Premier Chem* 1:12-35

127. Werle E Schievelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. 1. Mitteilung. *Arzneimittelforsch* 11:1011-1016
128. Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc Soc Exp Biol Med* 63:423-424
129. Blacklock JWS Burgan JG (1962) The carcinogenic effects of various fractions of cigarette condensate. *Br J Cancer* 16:453-459
130. French FA Freedlander BL Furst A (1957) Absence of effect of myosmine and nicotyrine on the development of spontaneous pulmonary adenomas in strain A mice. *Proc Am Ass Cancer Res* 2
131. Freedlander BL (1957) The effect of tobacco smoke condensate, particularly the nitrogen bases, on the induction of several types of mouse tumors. tobaccodocuments.org/ctr/50000907-0922.html:1-16
132. Clark MSG Rand MJ Vanov S (1965) Comparison of pharmacological activity of nicotine and related alkaloids occurring in cigarette smoke. *Arch Int Pharmacodyn* 156:363-379
133. Henrich H Hessenauer A Brune H (1984) Microcirculatory effects of nicotine and related alkaloids. *Klin Wochenschr* 62 Suppl 2:92-100
134. Schroff K-C Aschhoff S Schmitz O Richter E Zwickenkflug W Cowen MS Remien J Spanagel R (2000) Effects of the tobacco alkaloid myosmine at cholinergic receptors of sympathetic ganglia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1):R87
135. Riveles K Iv M Arey J Talbot P (2003) Pyridines in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning in picomolar doses. *Reprod Toxicol* 17:191-202
136. Marquardt H Schäfer SG (2004) *Lehrbuch der Toxikologie. 2*; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsges.mbH
137. Ames BN Lee FD Durston WE (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* 70:782-786
138. Collins AR Dobson VL Dusinská M Kennedy G Stetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375:183-193
139. Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101:39-43
140. Riebe M Westphal K (1983) Studies on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by various alkaloids. *Mutat Res* 124:281-286
141. Suzuki H Iijima K Scobie G Fyfe V McColl KEL (2005) Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut* 54:1527-1535

142. Combet E Paterson S Iijima K Winter J Mullen W Crozier A Preston T McColl KEL (2007) Fat transforms ascorbic acid from inhibiting to promoting acid catalysed *N*-nitrosation. Gut epub ahead
143. Macholz RM Lewerenz H-J (1989) Lebensmitteltoxikologie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
144. Mirvish SS (1995) Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Cancer Lett 93:17-48
145. Spiegelhalder B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of *N*-nitroso compounds. Food Cosmet Toxicol 14:545-548
146. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) Effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. Food Cosmet Toxicol 14:549-552
147. Eisenbrand G (1981) *N*-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
148. Calmels S Ohshima H Bartsch H (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria - Implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. J Gen Microbiol 134:221-226
149. Calmels S Ohshima H Vincent P Gounot AM Bartsch H (1985) Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH-7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *Escherichia coli* strains. Carcinogenesis 6:911-915
150. Mackerness CW Leach SA Thompson MH Hill MJ (1989) The inhibition of bacterially mediated *N*-nitrosation by vitamin C: relevance to the inhibition of endogenous *N*-nitrosation in the achlorhydric stomach. Carcinogenesis 10:397-399
151. O'Donnell CM Edwards C Ware J (1988) Nitrosamine formation by clinical isolates of enteric bacteria. Fems Microbiol Lett 51:193-197
152. Köhl W Eisenbrand G (2004) *N*-Nitrosoverbindungen. Lehrbuch der Toxikologie;Ch. 30 pp 747-762; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
153. Tricker AR (1996) Excretion of *N*-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of the urinary tract. Eur J Cancer Prev 5 (Suppl. 1):95-99
154. Xu GP Reed PI (1993) *N*-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. Carcinogenesis 14:2547-2551
155. Iijima K Henry E Moriya A Wirz A Kelman AW McColl KEL (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. Gastroenterology 122:1248-1257

156. Moriya A Grant J Mowat C Williams C Carswell A Preston T Anderson S Iijima K McColl KEL (2002) In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand J Gastroenterol* 37:253-261
157. Vermeer ITM Moonen EJC Dallinga JW Kleinjans JCS van Maanen JMS (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res* 428:353-361
158. Eisenbrand G Fuchs A Koehl W (1996) N-Nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl 1):41-46
159. Tricker AR (1997) N-Nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 6:226-268
160. Tricker AR Kubacki SJ (1992) Review of the occurrence and formation of nonvolatile N-nitroso compounds in foods. *Food Add Contam* 9:39-69
161. Belitz H-D Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchenie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer
162. Thornton-Manning JR Nikula KJ Hotchkiss JA Avila KJ Rohrbacher KD Ding X Dahl AR (1997) Nasal cytochrome P4502A: identification, regional localization, and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:22-30
163. Tricker AR Ditrich C Preussmann R (1991) N-Nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12:257-261
164. Baltes W (1995) *Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag
165. Mirvish SS (1975) Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31:325-351
166. Klimisch HJ Stadler L (1976) Formation of N-nitrosornicotine from nicotine N'-oxide. *Talanta* 23:614-616
167. Zwickenspflug W (2000) N-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (N-nitrosornicotine). *J Agric Food Chem* 48:392-394
168. Wilp J Zwickenspflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Toxicol* 40:1223-1228
169. Caldwell WS Greene JM Dobson GP deBethizy JD (1993) Intra-gastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann NY Acad Sci USA* 686:213-228
170. Hoffmann D Amin S Brunnemann KD Prokopczyk B Rivenson A Hecht SS (1990) Tobacco-specific N-nitrosamines: analysis, bioassays and biochemical studies. *N-Nitroso Compounds. Biology and Chemistry*; pp 59-79; eds: Bhide SV Rao KVK, New Delhi, Omega Sci Publ

171. Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 41:1-52
172. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res* 49:5895-5900
173. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J Agric Food Chem* 37:752-756
174. Nestor TB Gentry JS Peele DM Riddick MG Conner BT Edwards ME (2003) Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. *Beitr Tabakforsch Int* 20:467-475
175. Brunnemann KD Hoffmann D (1991) Analytical studies on tobacco-specific *N*-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit Rev Toxicol* 21:235-240
176. Tso TC (1990) Tobacco-specific *N*-nitrosamines. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant; pp 467-486; ed.: Tso TC, Beltsville MD USA, Ideal Inc.
177. D'Andres S Boudoux R Renaud J-M Zuber J (2003) TSNA levels in the mainstream smoke of simplified blend prototypes. *Beitr Tabakforsch Int* 20:331-340
178. Hecht SS Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 8:273-294
179. Wahlberg I Wiernik A Christakopoulos A Johansson L (2000) Tobacco-specific nitrosamines. A multidisciplinary research area. *Agro-Food Ind* 10:23-28
180. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
181. Chen Y-P Johnson GK Squier CA (1994) Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med* 23:251-255
182. Hecht SS Young R Maeura Y (1983) Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of *N*'-nitrosonornicotine and *N*'-nitrosonornicotine-1-*N*-oxide. *Cancer Lett* 20:333-340
183. Hoffmann D Raineri R Hecht SS Maronpot R Wynder EL (1975) A study of tobacco carcinogenesis. XIV. Effects of *N*'-nitrosonornicotine and *N*'-nitrosoanabasine in rats. *J Natl Cancer Inst* 55:977-981
184. Hecht SS Villalta PW Sturla SJ Cheng G Yu N Upadhyaya P Wang M (2004) Identification of O²-substituted pyrimidine adducts formed in reactions of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with DNA. *Chem Res Toxicol* 17:588-597

185. Hecht SS (2002) Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis* 23:907-922
186. Carmella SG Akerkar S Hecht SS (1993) Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res* 53:721-724
187. Meger M Richter E Zwickenpflug W Oehlmann C Hargaden MB Rahim YI Vesell ES (1999) Metabolism and disposition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rhesus monkeys. *Drug Metab Dispos* 27:471-478
188. Hecht SS Trushin N Reid-Quinn CA Burak ES Jones AB Southers JL Gombar CT Carmella SG Anderson LM Rice JM (1993) Metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. *Carcinogenesis* 14:229-236
189. Murphy SE Heiblum R Trushin N (1990) Comparative metabolism of *N*'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by cultured F344 rat oral tissue and esophagus. *Cancer Res* 50:4685-4691
190. Spratt TE Trushin N Lin D Hecht SS (1989) Analysis of *N*²-(pyridyloxobutyl)deoxyguanosine adducts in DNA of tissues exposed to tritium-labeled 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*'-nitrosornicotine. *Chem Res Toxicol* 2:169-173
191. Peterson LA Hecht SS (1991) *O*⁶-Methylguanine is a critical determinant of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone tumorigenesis in A/J mouse lung. *Cancer Res* 51:5557-5564
192. Hecht SS Spratt TE Trushin N (1988) Evidence for 4-(3-pyridyl)-4-oxobutylation of DNA in F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*'-nitrosornicotine. *Carcinogenesis* 9:161-165
193. Hecht SS Han S Kenney PM Wang M Lindgren B Wang Y Lao Y Hochalter JB Upadhyaya P (2007) Investigation of the reaction of myosmine with sodium nitrite in vitro and in rats. *Chem Res Toxicol* 20:543-549
194. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2004) Peroxidation of myosmine. *Proc Am Ass Cancer Res* 45:A3207
195. Ehrenberg L Granath F Törnqvist M (1996) Macromolecule adducts as biomarkers of exposure to environmental mutagens in human populations. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 3):423-428
196. Groth U Neumann H-G (1972) The relevance of chemico-biological interactions for the toxic and carcinogenic effects of aromatic amines. V. The pharmacokinetics of related aromatic amines in blood. *Chem Biol Interact* 4:409-419
197. Wieland E Neumann H-G (1978) Methemoglobin formation and binding to blood constituents as indicators for the formation, availability and reactivity of activated

- metabolites derived from trans-4-aminostilbene and related aromatic amines. Arch Toxicol 40:17-35
198. Skipper PL Tannenbaum SR (1990) Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. Carcinogenesis 11:507-518
 199. Eisenbrand G Metzler M (1994) Toxikologie für Chemiker. Stuttgart, New York: Thieme Verlag
 200. Gupta RC (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 81:6943-6947
 201. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. Carcinogenesis 13:1053-1074
 202. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. Carcinogenesis 13:1053-1074
 203. Kadlubar FF (1994) Biochemical individuality and its implications for drug and carcinogen metabolism: recent insights from acetyltransferase and cytochrome P4501A2 phenotyping and genotyping in humans. Drug Metab Rev 26:37-46
 204. Poirier MC Beland FA (1992) DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. Chem Res Toxicol 5:749-755
 205. Perera FP (1988) The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. Mutat Res 205:255-269
 206. Segerbäck D (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. Chem Biol Interact 45:139-151
 207. Trivers GE Vahakangas K Newman MJ Shamsuddin A Sinopoli N Mann DL Wright WE Harris CC (1985) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in sera from coke-oven workers. Proc Am Ass Cancer Res 26:88
 208. Henderson RF Bechtold WE Bond JA Sun JD (1989) The use of biological markers in toxicology. Crit Rev Toxicol 20:65-82
 209. Weinstein IB (1981) The scientific basis for carcinogen detection and primary cancer prevention. Cancer 47:1133-1141
 210. Staretz ME Foiles PG Miglietta LM Hecht SS (1997) Evidence for an important role of DNA pyridyloxobutylation in rat lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: effects of dose and phenethyl isothiocyanate. Cancer Res 57:259-266
 211. Murphy SE Palomino A Hecht SS Hoffmann D (1990) Dose-response study of DNA and hemoglobin adduct formation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in F344 rats. Cancer Res 50:5446-5452

212. Carmella SG Kagan SS Spratt TE Hecht SS (1990) Evaluation of cysteine adduct formation in rat hemoglobin by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and related compounds. *Cancer Res* 50:5453-5459
213. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin Invest* 72:364-371
214. Branner B Kutzer C Zwicklenpflug W Scherer G Heller WD Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47
215. Hölzle D (2003) Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in Abhängigkeit von Rauchstatus und Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
216. Carmella SG Kagan SS Kagan M Foiles PG Palladino G Quart AM Quart E Hecht SS (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff-dippers, smokers, and non-smokers. *Cancer Res* 50:5438-5445
217. Hecht SS (2006) A biomarker of exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and Ernst Wynder's opinion about ETS and lung cancer. *Prev Med* 43:256-260
218. Hölzle D Schlöbe D Tricker AR Richter E (2007) Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung. *Toxicology* 232:277-285
219. Hölzle D Schlöbe D Richter E Ostermeier-Hatz D von Meyer L Tricker AR (2003) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB)-releasing DNA adducts in lung, esophagus and cardia of sudden death victims. *Proc Am Ass Cancer Res* 44 (2nd ed.):1281-1282
220. Anon (2004) Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland Häufigkeit und Trends. Robert-Koch- Institut
221. Lagergren J (2005) Adenocarcinoma of oesophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? *Gut* 54 (Suppl. 1):I1-I5
222. Stein HJ von Rahden BHA Höfler H Siewert JR (2003) Karzinom des ösophagogastralen Übergangs und Barrett-Ösophagus. *Chirurg* 74:703-708
223. Chen XX Yang CS (2001) Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* 22:1119-1129
224. Braga C La Vecchia C Franceschi S Negri E Parpinel M Decarli A Giacosa A Trichopoulos D (1998) Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma. *Cancer* 82:448-453
225. Franceschi S Favero A Conti E Talamini R Volpe R Negri E Barzan L La Vecchia C (1999) Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx. *Br J Cancer* 80:614-620
226. Franceschi S Favero A (1999) The role of energy and fat in cancers of the breast and colon-rectum in a southern European population. *Ann Oncol* 10 (Suppl. 6):61-63

227. Tavani A La Vecchia C Gallus S Lagiou P Trichopoulos D Levi F Negri E (2000) Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. *Int J Cancer* 86:425-428
228. Franceschi S Levi F Negri E Fassina A Lavecchia C (1991) Diet and thyroid cancer: a pooled analysis of 4 European case-control studies. *Int J Cancer* 48:395-398
229. Chen H Ward MH Graubard BI Heineman EF Markin RM Potischman NA Russell RB Weisenburger DD Tucker KL (2002) Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am J Clin Nutr* 75:137-144
230. Bosetti C La Vecchia C Talamini R Simonato L Zambon P Negri E Trichopoulos D Lagiou P Bardini R Franceschi S (2000) Food groups and risk of squamous cell esophageal cancer in northern Italy. *Int J Cancer* 87:289-294
231. Castellsagué X Muñoz N de Stefani E Victora CG Castelletto R Rolón PA Quintana MJ (1999) Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer* 82:657-664
232. Wong HL Murphy SE Hecht SS (2005) Cytochrome P450 2A-catalyzed metabolic activation of structurally similar carcinogenic nitrosamines: *N'*-nitrosornicotine enantiomers, *N*-nitrosopiperidine, and *N*-nitrosopyrrolidine. *Chem Res Toxicol* 18:61-69
233. Ziegel R Shallop A Jones R Tretyakova N (2003) *K-ras* gene sequence effects on the formation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-DNA adducts. *Chem Res Toxicol* 16:541-550
234. Peterson LA Thomson NM Crankshaw DL Donaldson EE Kenney PJ (2001) Interactions between methylating and pyridyloxobutylating agents in A/J mouse lungs: Implications for 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res* 61:5757-5763
235. Mijal RS Thomson NM Fleischer NL Pauly GT Moschel RC Kanugula S Fang Q Pegg AE Peterson LA (2004) The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct *O*⁶-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. *Chem Res Toxicol* 17:424-434
236. Vogt S Fuchs K Richter E (2006) Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line. *Toxicology* 222:71-79
237. Zwickenpflug W Tyroller S (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol* 19:150-155
238. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and *N'*-nitrosornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl.1):R140
239. Olliver JR Hardie LJ Gong Y Dexter S Chalmers D Harris KM Wild CP (2005) Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:620-625
240. Glenn DF Edwards WB (1978) Synthesis and mass-spectrometry of some structurally related nicotinoids. *J Org Chem* 43:2860-2870

241. Kamphues J Coenen M Kienzle E (2004) Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. Hannover: Schaper
242. Hecht SS (1999) DNA adduct formation from tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Mutat Res* 424:127-142
243. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Analysis of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with (*R*)- and (*S*)-*N'*-nitrosornicotine. *Chem Res Toxicol* 20:246-256
244. Lao Y Yu N Kassie F Villalta PW Hecht SS (2007) Formation and accumulation of pyridyloxobutyl DNA adducts in F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and enantiomers of its metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chem Res Toxicol* 20:235-245
245. Carmella SG Hecht SS (1987) Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N'*-nitrosornicotine. *Cancer Res* 47:2626-2630
246. Atawodi SE Lea S Nyberg F Mukeria A Constantinescu V Ahrens W Brueske-Hohlfeld I Fortes C Boffetta P Friesen MD (1998) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:817-821
247. Meger M Meger-Kossien I Riedel K Scherer G (2000) Biomonitoring of environmental tobacco smoke (ETS)-related exposure to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Biomarkers* 5:33-45
248. Al-Delaimy WK Mahoney GN Speizer FE Willett WC (2002) Toenail nicotine levels as a biomarker of tobacco smoke exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1400-1404
249. Stepanov I Feuer R Jensen J Hatsukami D Hecht SS (2006) Mass spectrometric quantitation of nicotine, cotinine, and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human toenails. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:2378-2383
250. Shin H-S Kim J-G Shin Y-J Jee SH (2002) Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 769:177-183
251. Kim I Darwin WD Huestis MA (2005) Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and *trans*-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 814:233-240
252. Sørensen M Bisgaard H Stage M Loft S (2007) Biomarkers of exposure to environmental tobacco smoke in infants. *Biomarkers* 12:38-46
253. Davis RA Stiles MF deBéthizy JD Reynolds JH (1991) Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Food Chem Toxicol* 29:821-827

254. Domino EF Hornbach E Demana T (1993) Relevance of nicotine content of common vegetables to the identification of passive tobacco smokers. *Med Sci Res* 21:571-572
255. Siegmund B Leitner E Pfannhauser W (1999) Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *J Agric Food Chem* 47:3113-3120
256. Ishiyama I Nagai T Toshida S (1983) Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants, and nicotine) from human hair. *J Forensic Sci* 28:380-385
257. Kintz P Mangin P (1993) Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J Forensic Sci Soc* 33:139-142
258. Uematsu T (1993) Therapeutic drug-monitoring in hair samples - principles and practice. *Clin Pharmacokinet* 25:83-87
259. Pragst F Rothe M Spiegel K Sporkert F (1998) Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments - a time table of drug exposure? *Forensic Sci Rev* 10:81-111
260. Pötsch L Skopp G Moeller MR (1997) Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci Int* 84:25-35
261. Waddell WJ Marlowe C (1976) Localization of nicotine-¹⁴C, cotinine-¹⁴C, and nicotine-1'-N-oxide-¹⁴C in tissues of the mouse. *Drug Metab Dispos* 4:530-539
262. Gerstenberg B Schepers G Voncken P Völkel H (1995) Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab Dispos* 23:143-148
263. Wilson SE Kahn RS Khoury J Lanphear BP (2007) The role of air nicotine in explaining racial differences in cotinine among tobacco-exposed children. *Chest* 131:856-862
264. Palmeri A Pichini S Pacifici R Zuccaro P Lopez A (2000) Drugs in nails: physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clin Pharmacokinet* 38:95-110
265. Tosi A Piraccini B (1999) Biology of nail. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*; Ch. 18 pp 239-244; New York, McGraw-Hill
266. Derendorf H Garrett ER (1987) *Pharmakokinetik - Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
267. Hoffmann D Adams JD (1981) Carcinogenic tobacco-specific *N*-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 41:4305-4308
268. Lindell G Farnebo L-O Chen D Nexø E Rask Madsen J Bukhave K Graffner H (1993) Acute effects of smoking during modified sham feeding in duodenal ulcer patients. An analysis of nicotine, acid secretion, gastrin, catecholamines, epidermal growth factor, prostaglandin E₂, and bile acids. *Scand J Gastroenterol* 28:487-494

269. Teneggi V Squassante L Iavarone L Milleri S Bye A Gomeni R (2002) Correlation and predictive performances of saliva and plasma nicotine concentration on tobacco withdrawal-induced craving. *Br J Clin Pharmacol* 54:407-414
270. Mucklow JC Bending MR Kahn GC Dollery CT (1978) Drug concentration in saliva. *Clin Pharmacol Ther* 24:563-570
271. Tricker AR (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr Tabakforsch Int* 22:147-175
272. Scherer G Meger-Kossien I Riedel K Renner T Meger M (1999) Assessment of the exposure of children to environmental tobacco smoke (ETS) by different methods. *Hum Exp Toxicol* 18:297-301
273. Phillips K Bentley MC Abrar M Howard DA Cook J (1999) Low level saliva cotinine determination and its application as a biomarker for environmental tobacco smoke exposure. *Hum Exp Toxicol* 18:291-296
274. Etter J-F Duc TV Perneger TV (2000) Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol* 151:251-258
275. West R Zatonski W Przewozniak K Jarvis MJ (2007) Can we trust national smoking prevalence figures? Discrepancies between biochemically assessed and self-reported smoking rates in three countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:820-822
276. Lea RA Dickson S Benowitz NL (2006) Within-subject variation of the salivary 3HC/COT ratio in regular daily smokers: prospects for estimating CYP2A6 enzyme activity in large-scale surveys of nicotine metabolic rate. *J Anal Toxicol* 30:386-389
277. Cone EJ (1993) Saliva testing for drugs of abuse. *Ann NY Acad Sci USA* 694:91-127
278. Behrendorff I Steentoft A (2003) Medicinal and illegal drugs among Danish car drivers. *Accid Anal Prev* 35:851-860
279. Kidwell DA Holland JC Athanaselis S (1998) Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B* 713:111-135
280. Denovan LA Lu C Hines CJ Fenske RA (2000) Saliva biomonitoring of atrazine exposure among herbicide applicators. *Int Arch Occup Environ Health* 73:457-462
281. Schettgen T Drexler H Angerer J (2002) Acrylamid in der deutschen Allgemeinbevölkerung - eine Abschätzung der täglichen Aufnahme. *Umweltmed Forsch Prax* 7:331-336

11 Anhang

Anhang 1: Fragebogen zur Myosminstudie.

Bestimmung von Myosmin, Cotinin und Nikotin in Zehennägeln und Speichel

Name, Vorname

Geburtsdatum

Geschlecht m w

Soziokulturelle Faktoren

Höchster Schul- bzw.
Hochschulabschluss

Höchster berufsbildender
Abschluss

Momentan ausgeübter Beruf

Rauchstatus

Sind Sie Raucher? ja nein

Wie lange rauchen Sie bereits?
Angabe in Monaten / Jahren

Rauchen Sie regelmäßig? ja nein

Was rauchen / verwenden Sie? Zigaretten Stück/Tag Jahre
 Zigarren Stück/Tag Jahre
 Pfeife Stück/Tag Jahre
 Kautabak Stück/Tag Jahre
 Schnupftabak Stück/Tag Jahre

Wann rauchten Sie das letzte Mal
vor der Probenentnahme?

Wieviele Zigaretten / Zigarren
rauchten Sie am Entnahmetag?

Raucht -abgesehen von Ihnen-
jemand in Ihrem Haushalt bzw. an
Ihrem Arbeitsplatz? ja nein

Ernährung

- Welche Hauptmahlzeiten nehmen Sie regelmäßig ein? Frühstück Mittag Abendessen
- Nehmen Sie häufig Zwischenmahlzeiten ein? ja nein
- Salzen Sie meist Ihr Essen nach? selten gelegentlich sehr häufig
- Essen Sie gern scharf gewürzte Speisen? selten gelegentlich sehr häufig
- Wie heiß essen Sie Ihre Speisen? eher kalt lauwarm sehr heiß (vom Herd)
- Wie schnell essen Sie? hastig (schlingen) normal bewusst langsam
- Welche Brotsorte bevorzugen Sie? Weißbrot Schwarzbrot Vollkornbrot
- Welche Küche bevorzugen Sie? Bürgerlich Mediterran Vollwertkost
 Vegetarisch Fast Food
- Essen Sie regelmäßig
- Obst/ Gemüse/ Salat nie mehrmals pro Woche täglich
- Fisch nie mehrmals pro Woche täglich
- Fleisch nie mehrmals pro Woche täglich
- Wurst nie mehrmals pro Woche täglich
- geräucherte Nahrungsmittel nie mehrmals pro Woche täglich
- Schokolade nie mehrmals pro Woche täglich
- Bonbons / Gummibärchen nie mehrmals pro Woche täglich
- Kuchen / Torten nie mehrmals pro Woche täglich
- Milch / Milchprodukte (z.B. Joghurt / Kefir / Buttermilch)? nie mehrmals pro Woche täglich
- Gesamte Trinkmenge / Tag l / Tag
- Was trinken Sie hauptsächlich? Mineralwasser Tee Cola / Limo
 Saft Kaffee Sonstiges
.....
.....

Bevorzugen Sie kohlenensäurehaltige Getränke? nie gelegentlich häufig

Trinken Sie Alkohol? nie gelegentlich häufig

Wenn ja, wieviel?
(Gläser/Woche)

- Bier
 Wein
 Schnaps

-Gläser/Wo.
 Gläser/Wo.
 Gläser/Wo.

Seit wann?

-

Wieviele Tassen trinken Sie täglich:

- Kaffee Tassen / Tag
 Schwarzer Tee Tassen / Tag
 Grüner Tee? Tassen / Tag

Zehennägel

Lackieren Sie Ihre Zehennägel? ja nein

Wenn ja, wie häufig? x pro Woche x pro Monat

Wann haben Sie das letzte Mal Ihre Zehennägel lackiert? Tage vor der Entnahme

Hatten Sie in den letzten 6 Monaten eine Nagelerkrankung? ja nein

Wenn ja, auf welcher Seite? rechter Fuß linker Fuß

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich einverstanden, dass die entnommenen Gewebeprobe der Mundschleimhaut, des Speichels und der Zehennägel für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden.

Ich stimme der Erfassung, Verwertung, Weitergabe und Aufbewahrung meiner Daten gemäß den Datenschutzbestimmungen für wissenschaftliche Zwecke zu.

Ich wurde informiert, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und ich diese jederzeit ohne Angabe von Gründen beenden kann.

München, _____

Unterschrift _____

Anhang 2: Ergebnisse der Schweineplasmaproben.

Plasmaprobe nüchtern		Plasmaprobe nach Nahrungszufuhr	
Probenbezeichnung	Myosmin [ng/ml]	Probenbezeichnung	Myosmin [ng/ml]
Nü S9	0,079	SC pp	0,878
Nü S10	0,000	SD pp	0,591
Nü S11	0,100	SE pp	0,568
Nü S12	0,092	SF pp	0,434
Nü S13	0,039	SH pp	0,450
Nü S14	0,043	SI pp	0,457
Nü S15	0,012	1 pp	0,438
Nü 1a	0,055	2 pp	0,306
Nü 2a	0,045	3 pp	0,485
Nü 3a	0,185	4 pp	0,644
Nü 4a	0,092	5 pp	0,358
Nü 5a	0,053	6 pp	0,236
		7H pp	0,617
Mittelwert	0,066	Mittelwert	0,497
S.D.	0,049	S.D.	0,166

Anhang 3: Ergebnisse der Zehennägelanalysen und zugehörigem Speichel von Nichtrauchern.

Nichtraucher	Zehennägel			Speichel		Anz.ger. Zig.	m/w	Alter
	Myosmin (ng/mg)	Cotin (ng/mg)	Nikotin (ng/mg)	Cotin (ng/ml)	Myosmin (ng/ml)			
Nr.: 3	0,039	0,000	0,155	14,364	0,582	0	w	61
Nr.: 6	0,051	0,000	0,115	n.d.	0,778	0	w	17
Nr.: 7	0,015	0,000	0,201	n.d.	0,265	0	w	49
Nr.: 8	0,015	0,000	0,183	n.d.	0,204	0	m	27
Nr.: 9	0,000	0,000	0,202	2,953	2,336	0	m	31
Nr.: 11	0,015	0,000	0,163	1,224	1,152	0	w	30
Nr.: 15	0,015	0,000	0,226	n.d.	0,306	0	w	31
Nr.: 16	0,015	0,000	0,088			0	m	33
Nr.: 18	0,015	0,000	0,000	n.d.	0,980	0	w	35
Nr.: 19	0,032	0,000	0,075	n.d.	0,290	0	w	30
Nr.: 20	0,015	0,003	0,000	n.d.	0,402	0	m	62

Anz. ger. Zig.: Anzahl gerauchter Zigaretten

Anhang 4: Ergebnisse der Zehennägelanalysen und zugehörigem Speichel von Rauchern.

Raucher	Zehennägel			Speichel		Anz. ger. Zig.	m /w	Alter
	Myosmin (ng/mg)	Cotinin (ng/mg)	Nikotin (ng/mg)	Cotinin (ng/ml)	Myosmin (ng/ml)			
Nr.: 1	0,039	0,735	1,860	100,452	1,090	20	w	40
Nr.: 2	0,069	0,781	2,452	101,903	0,725	20	m	30
Nr.: 5	0,039	1,003	1,144	--	--	4	w	20
Nr.: 10	0,015	0,477	0,628	31,916	0,952	10	m	39
Nr.: 12	0,033	0,446	1,361	100,036	3,300	5	w	71
Nr.: 22	0,050	1,896	3,004	107,105	10,860	20	m	29
Nr.: 23	0,015	0,794	1,726	170,560	2,500	20	w	38
Nr.: 24	0,213	2,554	3,770	68,920	3,470	10	w	22
Nr.: 25	0,161	2,696	2,706	188,970	2,600	20	m	26
Nr.: 27	0,030	0,624	1,548	126,728	1,354	20	w	32
Nr.: 29	0,057	0,535	2,137	25,382	0,454	20	w	31
Nr.: 30	0,078	2,519	1,642	38,169	0,589	20	w	35
Nr.: 31	0,051	1,370	2,056	40,100	3,900	40	m	62
Nr.: 32	0,029	1,493	0,979	51,691	3,056	40	m	70
Nr.: 35	0,082	0,394	1,723	12,040	0,757	20	w	68

Anz. ger. Zig.: Anzahl gerauchter Zigaretten

Anhang 5: Ergebnisse der Myosminkonzentrationen des Speichelprofils.

Uhrzeit	Probanden							
	1	2	3	4	5	6	7	8
8:00	4,123	0,385	3,331	1,436	0,054	1,225	1,098	0,427
12:00	0,946	0,102	0,384	0,364	0,294	1,319	1,382	0,211
12:45	0,331	0,188	0,250	0,170	0,217	0,101	0,165	0,179
13:00	0,283	0,050	0,145	0,269	0,178	0,143	2,431	0,233
13:15	0,405	0,179	0,312	0,263	0,138	0,150	3,553	0,257
13:30	0,462	0,153	0,364	0,460	0,104	0,144	0,618	0,385
14:00	0,499	0,495	0,370	0,443	0,185	0,838	0,323	0,367
14:30	0,486	1,198	0,301	0,423	0,361	1,124	0,771	0,336
15:30	0,457	1,415	0,324	0,289	0,216	1,141	0,169	0,032
16:30	0,245	1,474	0,308	0,202	0,203	1,240	0,149	0,016
17:30	0,259	0,324	0,453	0,191	0,244	0,148	0,027	0,000

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die permanente großzügige Unterstützung, die jederzeit gewährte freundliche Anleitung sowie für die vielen wertvollen Anregungen und die große Hilfestellung in fachlichen Fragen.

Auch danke ich Ihm, als kommissarischen Leiter des Walther-Straub-Instituts, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit an dem Symposium on Tobacco Science and Health von der IFSH in Louisville und dem Princess Chulabhorn International Science Congress in Bangkok teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Stolle möchte ich für die Übernahme der Arbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, danken.

Für die Bereitstellung der Blutproben danke ich Herrn Prof. Dr. Heinritzi von der Klinik für Schweine, der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Christopher Heppel sage ich danke für die kompetente Einarbeitung an den GC/MS-Geräten und die stets geduldigen Erläuterungen zu chemischen Fragen. Er stand mir, zusammen mit Frau Anne-Kathrin Heling, immer mit Rat und vor allem Tat zur Seite.

Bei Frau Oehlmann möchte ich mich für die Einführung in die Laborarbeit und den angenehmen, entspannten Laboralltag bedanken. Ein großer Dank gilt auch Brigitte Mayerhofer, die mich immer tatkräftig unterstützt, viel Arbeit abgenommen und vor allem mit einer Engelsgeduld diese Arbeit korrekturgelesen hat.

Insgesamt danke ich dem kompletten Team, das mich sehr freundlich aufgenommen und immer unterstützt hat.

Der größte Dank allerdings gilt meinem Mann und meiner Familie, die immer für mich da waren und ohne deren Unterstützung mein langer Ausbildungsweg und diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wären.

