

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.–Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt im  
Walther–Straub–Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig–Maximilians–Universität München  
(Prof. Dr. Elmar Richter)

---

# **Vorkommen des Tabakalkaloids Myosmin bei Wiederkäuern**

---

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

von  
Verena Maria Patterer  
aus Lienz

München 2011

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Ammer
Korreferent/en:	Univ. Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

## **Meinen Eltern**

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Abkürzungen</b> .....	IV
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	2
<b>2.1 Tabakalkaloide</b> .....	2
2.1.1 Myosmin	3
2.1.1.1 Vorkommen	3
2.1.1.2 Synthese von Myosmin	7
2.1.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften	8
2.1.1.4 Toxikokinetik	9
2.1.1.5 Toxizität	12
2.1.2 Nicotin	13
2.1.3 Cotinin	16
<b>2.2 Nitrosamine</b> .....	16
2.2.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen	17
2.2.2 Toxizität und Entgiftung von Nitrosaminen	18
2.2.3 Tabakspezifische Nitrosamine	18
2.2.4 Nitrosierung von Myosmin	19
2.2.5 Peroxidierung von Myosmin	20
2.2.6 Bedeutung von TSNA und Myosmin für den Ösophaguskrebs	21
<b>2.3 Milch</b> .....	23
2.3.1 Milch als Lebensmittel	23
2.3.2 Anatomisch-histologischer Aufbau der Milchdrüse	23
2.3.3 physikalisch chemische Eigenschaften der Milch	25
2.3.4 Übertritt von Stoffen in die Milch	26
2.3.5 Zusammensetzung der Milch	29
2.3.5.1 Nicotin und Cotinin in der Muttermilch	32
2.3.5.2 Myosmin in der Muttermilch	33
<b>2.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	35
<b>3 Material und Methoden</b> .....	36
<b>3.1 Geräte</b> .....	36
3.1.1 GC/MS-Geräte und Zubehör	36
3.1.2 Sonstige Geräte und Zubehör	36
<b>3.2 Material</b> .....	37
3.2.1 Einweggefäße und Zubehör	37
3.2.2 Pipetten und Zubehör	37
3.2.3 Festphasenextraktion	37
<b>3.3 Chemikalien</b> .....	38
3.3.1 Herstellung der Reagenzien	38

<b>3.4</b>	<b>Methoden</b> .....	39
3.4.1	Futter- und Pansensaftanalysen	39
3.4.1.1	Probengewinnung	39
3.4.1.2	Festphasenextraktion	41
3.4.1.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion	43
3.4.1.4	Überführung in Hexan	43
3.4.2	Plasma- und Urinalysen	44
3.4.2.1	Probengewinnung	44
3.4.2.2	Extraktion	45
3.4.3	Hornanalysen	45
3.4.3.1	Probengewinnung und Vorbereitung	45
3.4.3.2	Flüssig-flüssig-Extraktion und Überführung in Hexan	46
<b>3.5</b>	<b>GC/MS-Analyse</b> .....	46
3.5.1	Prinzip der GC	46
3.5.2	GC Bedingungen	47
3.5.3	Prinzip der MS	48
3.5.4	MS-Bedingungen	50
3.5.5	Berechnung der Konzentration von Myosmin, Cotinin und Nicotin	50
<b>3.6</b>	<b>Validierung der Methode</b> .....	51
3.6.1	Material und Herstellung der Verdünnungsreihe	51
3.6.2	Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	52
3.6.3	Präzision	52
3.6.3.1	Messpräzision und Tagespräzision (within day)	53
3.6.3.2	Wochenpräzision (between day)	54
3.6.4	Linearität	54
3.6.5	Wiederfindungsrate	55
<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	57
<b>4.1</b>	<b>Analytik</b> .....	57
<b>4.2</b>	<b>Myosmin in Futtermitteln</b> .....	59
4.2.1	Maissilage	60
4.2.2	Grassilage	61
4.2.3	Heu	61
4.2.4	Grascobs	62
4.2.5	Maisschrot	63
4.2.6	Wintergerstenschrot	64
4.2.7	Sojaschrot	64
4.2.8	Zuckerrübenschnitzel	64
4.2.9	Zusammenhang des Myosmin- und Nicotinvorkommens in Futtermitteln	66
<b>4.3</b>	<b>Myosmin in Pansensaftproben</b> .....	66
<b>4.4</b>	<b>Myosmin in Blutproben</b> .....	68
4.4.1	Rinderplasma	68
4.4.2	Schafplasma	69
<b>4.5</b>	<b>Myosmin in Urin</b> .....	71
<b>4.6</b>	<b>Myosmin Hornproben</b> .....	72
<b>4.7</b>	<b>Myosmin- und Nicotinvorkommen beim Rind</b> .....	74

---

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	75
<b>5.1</b>	<b>Myosmin in Futtermitteln</b> .....	75
<b>5.2</b>	<b>Myosmin in Pansensaft</b> .....	78
<b>5.3</b>	<b>Myosmin in Plasma</b> .....	79
<b>5.4</b>	<b>Myosmin in Urin</b> .....	81
<b>5.5</b>	<b>Myosmin in Klauenhorn</b> .....	81
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	82
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	84
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	96
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	99
	<b>Danksagung</b> .....	100

## Abkürzungen

AC	alternating current
AUC	area under the curve
D	Tag
Da	Dalton
DC	direct current
DDE	Dichlordiphenyldichlorethylen
DDT	Dichlorodiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronen-Stoß-Ionisation
ETS	environmental tobacco smoke
eV	Elektronenvolt
FAB	fast atom bombardment
i. v.	intravenös
GC	Gaschromatographie
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit
GIT	Gastrointestinaltrakt
HPB	4-Hydroxy-(3-pyridyl)-1-butanon
HPLC	high performance liquid chromatography
HWZ	Halbwertszeit
iso-NNAC	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure
iso-NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
ISTD	interner Standard
K <sub>OW</sub>	Octanol-Wasser-Koeffizient K
LD	laser detection
LD <sub>50</sub>	Dosis, bei der 50% der Versuchstiere überleben
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
Lsg.	Lösung
M	Molekulargewicht
min	Minute
M/P	Milch zu Plasma Verhältnis
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
NAB	N-Nitrosoanabasin
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid-phosphat

---

NAT	<i>N</i> -Nitrosoanatabin
n.d.	nicht detektierbar
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (nicotine derived nitrosamino ketone)
NNN	<i>N</i> -Nitrosonornicotin
NPN	Nichtprotein-Stickstoff
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD	polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
p. i.	post injectionem
R	Rest (in chemischen Formeln)
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
SE	Standard error
SIM	single ion monitoring (= SIR)
S/P	Speichel zu Plasma Verhältnis
SPE	solid phase extraction, Festphasenextraktion
Std.	Stunden
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
V	Volt

# 1 Einleitung

1933 untersuchten *A. Wenusch* und *R. Schöller* [1] die Zusammensetzung des Tabakrauchs, wobei sie Destillate des Zigarrenrauchs auskristallisierten und mit Pikrinsäure versetzten. Nach Zugabe von Natriumhydroxid und einigen Tropfen Wasser bemerkten sie einen stark an Mäuse erinnernden Geruch, was sie dazu veranlasste, die zugrunde liegende Base mit dem Namen *Myosmin* (griechisch *myo*: Maus, Muskel) zu versehen. Ihnen gelang es jedoch weder in Rohtabak noch in Tabakerzeugnissen Myosmin nachzuweisen, woraus sie schlossen, dass es in der Glutzone der Zigarre während des Rauchprozesses aus freiem Nicotin entstehe. Da nur alkalische Tabaksorten auch freies Nicotin im Rauch enthalten und nicht alles Nicotin als Salz an den Rauch abgeben, enthielten somit auch nur diese Myosmin. Aufgrund seines Geruchs sollte Myosmin für das charakteristische Gesamtaroma der Zigarre verantwortlich sein und auch nur in Zigarren, nicht aber in Zigaretten auftreten.

Die Isolierung und Identifizierung von Myosmin mittels Papierchromatographie in Tabakerzeugnissen gelang schließlich in den 1950er Jahren [2]. Erst weitere zwei Jahrzehnte später konnten *Kisaki* und *Tamaki* [3] die Substanz auch in den Tabakpflanzen *Nicotiana glutinosa* und *Nicotiana tabacum* nachweisen.

Folglich wurde Myosmin den tabakspezifischen Alkaloiden zugeordnet, war aber wegen seines quantitativ geringeren Vorkommens und auch wegen seiner geringeren Potenz weitaus seltener Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung als andere Tabakalkaloide.

Seit *Zwickenpflug et al.* [4] 1998 Myosmin jedoch in Nüssen und *Tyroller et al.* [5;6] in weiteren pflanzlichen Nahrungsmitteln, wie einigen Getreidesorten, bestimmten Früchten, aber auch in tierischen Lebensmitteln wie Milch und Sahne entdeckten, war das ursprünglich als tabakspezifisch eingestufte Alkaloid aus einem völlig neuem Blickwinkel zu betrachten. In weiteren Studien von *Maier et al.* [7;8] und *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] wurde deutlich gezeigt, dass der Unterschied der Myosmingehalte in Muttermilch, Speichel, Plasma und auch in Zehennägeln zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu gering ist, um Tabakkonsum als Hauptquelle von Myosmin zu betrachten.

In diesem Zusammenhang sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Kenntnisse zum Vorkommen von Myosmin erhalten werden.

Da Myosmin bereits in der Muttermilch [7] wie auch in Trinkmilch und Sahne [5] nachgewiesen wurde, sollten nun am Beispiel des Wiederkäuers Quellen von Myosmin im Futter von Rindern vor der Nahrungsaufnahme untersucht werden und der Myosmingehalt folgend in Pansensaft-, Plasma- und Urinproben bestimmt werden. Als Langzeitmarker sollte in Hornanalysen von Rinderklauen die Bestimmung von Cotinin erfolgen. Zudem wurden auch Plasmaproben von Schafen auf Myosmin untersucht.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Tabakalkaloide

Alkaloide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die vermutlich dem Fraß- bzw. Insektenschutz, der osmotischen Inaktivierung und der Entgiftung dienen [11]. Tabakalkaloide sind im Tabak vorkommende  $\beta$ -substituierte Pyridine. Sie stellen einen wesentlichen Faktor für die Rauchqualität dar [12].

Die wichtigsten Vertreter der Alkaloide in der Tabakpflanze (*Nicotiana spp.*) sind Nicotin, Nornicotin, Anabasin und Anatabin (Abb. 1) [13]. Nach ihrer Ernte und Fermentation enthalten die verschiedenen Tabaksorten abhängig von Pflanzenart, Anbauweise, Reifungsgrad und Einsatz von Düngemitteln 5 bis 180 mg/g Nicotin, das in den meisten Tabakpflanzen als Hauptalkaloid vorkommt. In seltenen Fällen, wie beispielsweise in *N. glauca* ist Anabasin das Hauptalkaloid. Nornicotin und Anatabin sind durchschnittlich in Mengen von 2 mg/g beziehungsweise 1 mg/g enthalten [14].

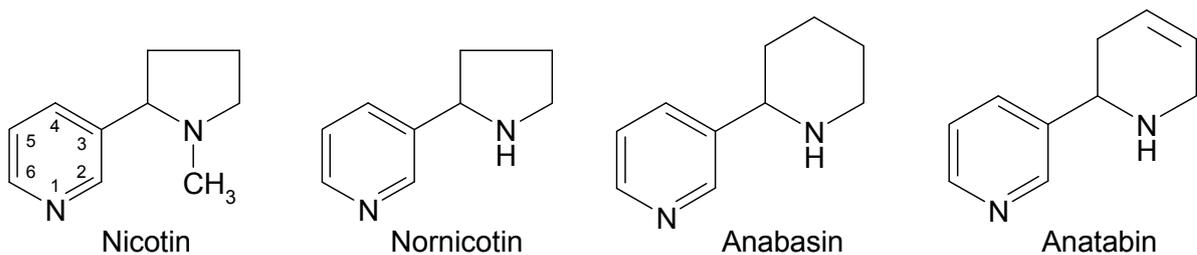


Abbildung 1: Strukturen von Tabakalkaloiden

Nebenalkaloide treten dagegen in weitaus geringeren Konzentrationen auf und stellen im Wesentlichen Produkte des Nicotinmetabolismus dar (Abb. 2).

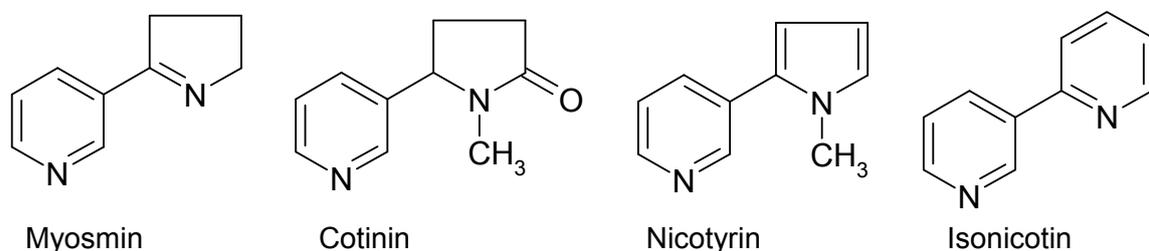


Abbildung 2: Nebenalkaloide des Tabaks

## 2.1.1 Myosmin

### 2.1.1.1 Vorkommen

Die Verteilung von Myosmin in der **Tabakpflanze** wurde von *Féjer-Kossey* [15;16] mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Zwar erfolgte zu diesem Zeitpunkt noch keine Quantifizierung, aber aufgrund der Bandenmuster war erkennbar, dass in Extrakten von Blüten und Knospen von *N. tabacum* und *N. glauca* relativ große Mengen von Myosmin vorhanden waren. Um sicherzustellen, dass Myosmin nicht erst durch Fermentierungsprozesse entsteht, wurden die Untersuchungen am Tag der Probennahme nach der Trocknung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt.

Die erste quantitative Analyse gelang *Sisler* [17]. Er konnte in *N. tabacum* 0,93 bis 1,2 mg Myosmin/g Tabak nachweisen. In weiteren Studien wurde gaschromatographisch gezeigt, dass auch einige andere *Nicotiana* Arten variable Anteile von Myosmin enthielten, aber nur sofern diese aus dem Gewächshaus stammten. Der Gesamtalkaloidgehalt schwankte und war generell in Freilandpflanzen höher [13]. Dass die Myosminkonzentration in den einzelnen Organen von *N. tabacum* und *N. rustica* variiert, wurde in einer zweidimensionalen GC/MS–Analyse gezeigt (Tab. 1).

Tabelle 1: Myosminkonzentrationen von *N. tabacum* und *N. rustica* ( $\mu\text{g/g}$  Feuchtgewicht) [18]

Pflanzenorgan	Myosmin	Cotinin
<b>Blatt (Hauptgut)</b>	0,96	1,87
<b>Blatt (Nebengut)</b>	0,62	1,33
<b>Stängel</b>	0,19	1,30
<b>Wurzel</b>	0,14	0,56

Die erste erfolgreiche Trennung von 24 Pyridinderivaten in **Tabakerzeugnissen** gelang *Tso und Jeffrey* [2] 1952 durch Flüssigextraktion und folgende Papierchromatographie. Die Quantifizierung führte allerdings zu unrealistisch hohen Myosminwerten von 1.400  $\mu\text{g/g}$  Tabak. In den Tabaksorten Maryland, Virginia und Burley (mittlerer und unterer Blattstand) schwankten Myosmingehalte von 9-38,3  $\mu\text{g/g}$  [19]. Ein höherer Myosminanteil von 0,59  $\mu\text{g/g}$  ist im Perique Tabak, einem seltenen dunklen, luftgetrockneten und anaerob fermentierten Würztobak enthalten [20].

In Schnupftobak liegen die Myosminkonzentrationen bei ca. 0,0001 bis 0,004% des Feuchtgewichts [21;22].

Mittels Rauchkammeranalysen ist es möglich, Myosmingehalte im **Tabakrauch** zu ermitteln. Diese betragen bei der Untersuchung verschiedener Zigarettensorten zwischen 13 und

33 µg/Zigarette im Hauptstromrauch, beziehungsweise 73 bis 224 µg/Zigarette im Nebenstromrauch [23]. Die Luft eines Raumes, in dem geraucht wird, enthält ungefähr 0,04 bis 0,185 µg/m<sup>3</sup> Myosmin [24]. Daraus ergibt sich für einen erwachsenen Menschen bei einem Atemaustauschvolumen von 20 m<sup>3</sup>/Tag und unter Annahme einer zu Nicotin vergleichbaren 70%-igen Inhalation des Alkaloids aus dem ETS eine tägliche Passivrauchbelastung von 0,06 bis 2,6 µg Myosmin [25].

Das Vorkommen von Myosmin ist aber nicht auf Tabak begrenzt. So fand man das Alkaloid auch in weiteren Pflanzen, wie Papaya (*Carica papaya*) [26], wo zudem auch Nicotin und Cotinin identifiziert wurden. In diesem Zusammenhang steht die Vermutung, dass Myosmin auch die insektizide Wirkung hat, welche für Nicotin und dessen strukturell verwandte Alkaloide bereits bekannt ist [27]. Des Weiteren ist Myosmin, wie auch Nicotin, Nornicotin und Cotinin in Nachtjasmin (*Cestrum nocturnum*) vorhanden. In Tagjasmin (*Cestrum diurnum*) dagegen konnte Myosmin nicht nachgewiesen werden [28].

In der australischen Pflanze *Duboisia hopwoodii*, die wie der Tabak und der Jasmin ebenfalls zur Familie der *Solanaceae* gehört und die wegen ihrer narkotisierenden Wirkung von den Aborigines gekaut wird, war Myosmin ebenfalls zu finden, wobei das Alkaloid im Gegensatz zur Tabakpflanze hier vor allem in den Wurzeln zu finden war. Auch Nornicotin und Nicotin konnten nachgewiesen werden [29].

Ernteameisen (*Messor spp.*) besitzen zwei verschiedene Arten von exkretorischen Drüsen. Während die Dufourdrüse, eine akzessorische Drüse des Giftapparates, vor allem Alkane und Alkene mit 12 bis 23 C-Atomen in variabler Zusammensetzung zur Kommunikation innerhalb einer Ameisenkolonie produziert, dienen Giftdrüsen der Abwehr. In diesen Drüsen konnten *Brand und Mpuru* [30] gaschromatographisch Tabakalkaloide, im Wesentlichen Anabasein als Hauptanteil, nachweisen. Myosmin konnte von *Cruz-Lopez et al.* [31] in den Giftdrüsen von *M. arenarius* nachgewiesen werden. Dies wurde von *Co et al.* [32] bestätigt, die zusätzlich bei der Analyse ganzer Ameisen der Spezies *M. cephalotes* den N-Formylester von Myosmin als eine der Hauptkomponenten der Tabakalkaloide identifizieren konnten.

1998 entdeckten *Zwickenpflug et al.* [33] Myosmin in Hasel- und Erdnüssen in Mengen von 0,2 bis 2,0 ng/g via GC-MS. Da keine möglichen Vorstufen des Myosmins nach *Bush et al.* [11] gefunden werden konnten, war davon auszugehen, dass hier erstmals eine Myosminquelle unabhängig von Nicotin gefunden worden war. Nur kurze Zeit später konnte in der selben Arbeitsgruppe in weiteren **Nahrungsmitteln** das Vorkommen von Myosmin bestätigt werden [5;6]. Die Untersuchungen orientierten sich hierbei an den natürlichen Verzehrbedingungen. So wurden beispielsweise Kartoffeln in gekochter Form analysiert und das Kochwasser ebenfalls untersucht (Tab. 2).

Tabelle 2: Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [5]

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

Grobe Schätzungen, die auf dem jährlichen Pro-Kopf-Konsum der auf Myosmin untersuchten Lebensmittel beruhen [5;6], lassen eine Myosminaufnahme von 497 µg/Jahr erwarten. Da hier aber weder unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten noch bislang unentdeckte Myosminquellen berücksichtigt sind, könnte die Belastung des menschlichen Organismus aus Lebensmitteln noch höher sein.

Die Untersuchungen von *Maier et al.* [7;8] zu Myosmin in **Körperflüssigkeiten** von Menschen erfolgten in Kombination mit der Schätzung der Myosminbelastung aufgrund von Ernährungsgewohnheiten und des Rauchstatus. Um letzteren zu bestimmen, wurde zudem Cotinin gemessen, welches beim Menschen einen spezifischen Biomarker für die Nicotinbelastung darstellt [25].

In der Muttermilch von Nichtraucherinnen lagen die Myosminkonzentrationen bei  $0,30 \pm 0,19$  ng/ml. Bei einer Passivraucherin und einer Raucherin lag diese bei 1,34 ng/ml. Cotinin war bei den Nichtraucherinnen dagegen nicht nachweisbar.

Im Speichel divergierten die Cotininkonzentrationen stark, die Myosminkonzentrationen schwankten dagegen nur sehr gering. Für Nichtraucher lagen sie bei  $1,58 \pm 1,67$  ng/ml für Passivraucher bei  $1,89 \pm 0,35$  ng/ml und für Raucher bei  $1,87 \pm 1,01$  ng/ml.

Bei einem Nichtraucher nahm im Rahmen eines Fastenversuchs die Myosminkonzentration mit dem Aussetzen der Nahrungsaufnahme an Tag 3 deutlich ab, ein Anstieg blieb allerdings mit Wiederaufnahme von Nahrung an Tag 7 innerhalb der folgenden Woche aus (Abb. 3). Cotinin war nur in 4 von 12 Proben nachweisbar und lag unter 1,5 ng/ml.

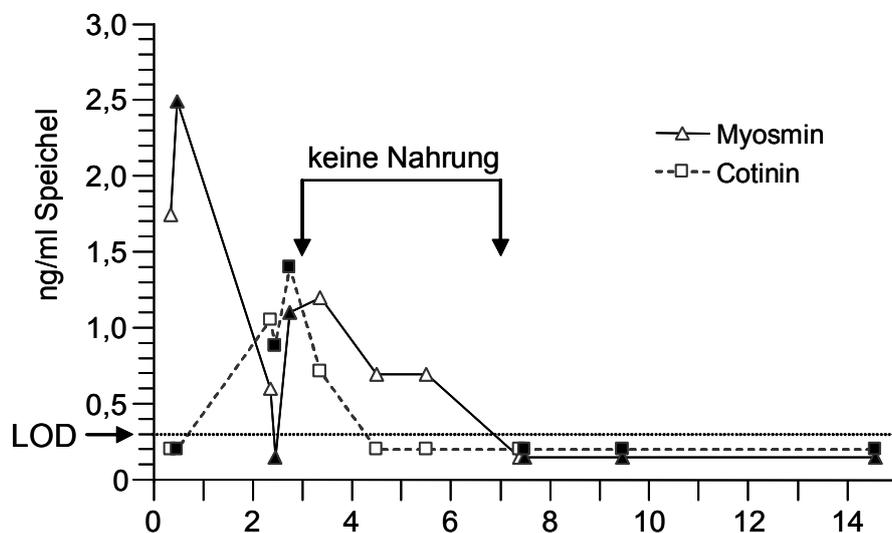


Abbildung 3 : Myosmin und Cotinin im Speichel während des Diätversuchs: Vor und nach der Nahrungsaufnahme genommene Proben sind durch leere bzw. gefüllte Symbole dargestellt; Werte unterhalb der Linie (LOD) liegen unter der Nachweisgrenze. [7]

Außerdem wurden an zwei verschiedenen Tagen zur jeweils gleichen Zeit Speichel- und Plasmaproben gewonnen und auf ihren Myosmingehalt untersucht sowie deren pH Werte bestimmt. Das zu erwartende S/P-Verhältnis, basierend auf pH und  $pK_a$  Werten, korrelierte dabei gut mit den experimentell ermittelten Werten.

Die höchste von Maier [7] gefundene Myosminkonzentration im Plasma betrug 5,5 ng/ml. Geht man davon aus, dass beim Menschen das Verteilungsvolumen von Myosmin dem von Nicotin ähnlich ist (siehe Kapitel 2.1.1.4.), lässt sich daraus eine Aufnahme von mindestens 2 mg Myosmin abschätzen, denn nach oraler Gabe von 2 mg Nicotin an 62 Probanden wurde von Dempsey et al. [34] im Mittel eine maximale Plasmakonzentration von 4,7 ng/ml gemessen. Diese geschätzte Aufnahmemenge liegt weit über der von Tyroller et al. [5;6] geschätzten täglichen Gesamtaufnahme von etwa 1,3 µg Myosmin.

Im Rahmen der Dissertation von *Schütte-Borkovec* [9] wurden zu verschiedenen Zeiten vor und nach einem gemeinsamen Essen Speichelproben von 8 Probanden gewonnen und auf Myosmin untersucht (Abb. 4). Aliquote der Mahlzeit, die aus Putenfleisch mit Bulgur, Sahnesoße und Gewürzen bestand, wurden püriert und ebenfalls auf Myosmin untersucht. Der Myosmingehalt des Mittagessens war mit 13,5 ng/g deutlich höher als die von *Tyroller et al.* [5;6] bestimmten Werte für einzelne Nahrungsmittel. Trotzdem erreichten die Myosminkonzentrationen im Speichel nach dem Mittagessen nicht den Durchschnittswert, der in den Morgenproben nach individuellem Frühstück gemessen wurde (Abb. 4).

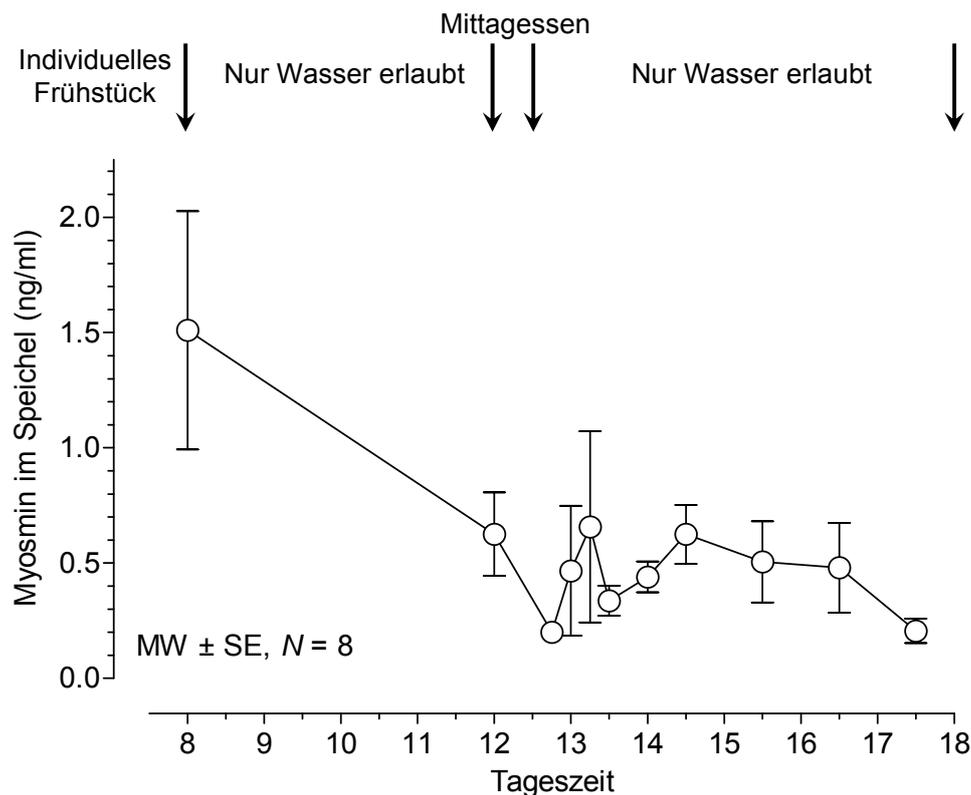


Abbildung 4: Myosmin im Speichel von 8 Probanden (3 Männer und 5 Frauen, 3 Raucher und 5 Nichtraucher) vor und nach einem gemeinsamen Mittagessen [9].

Weitere Messungen von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Plasma, Speichel und Zehennägeln von Rauchern und Nichtrauchern durch *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] haben bestätigt, dass signifikante zusätzliche Quellen neben dem Tabak für Myosmin existieren müssen.

### 2.1.1.2 Synthese von Myosmin

Nicotin wird vor allem in der Wurzel unter Beteiligung von Aminosäuren gebildet und anschließend in die Blätter der Tabakpflanze transportiert [35]. Hier entsteht während der Alterung in einer irreversiblen Reaktion durch Demethylierung aus Nicotin Nornicotin [36], welches weiter zu Myosmin dehydrogeniert (Abb. 4) [3;37]. Auch diese Bildung ist irreversibel. So konnten nach der Gabe von  $^{14}\text{C}$ -Nornicotin nach acht Tagen noch 55% der Radioaktivität



### 2.1.1.4 Toxikokinetik

Die Toxikokinetik ist das Teilgebiet der Toxikologie, das sich mit der zeitlichen Änderung der Konzentration eines Giftstoffes im Organismus befasst. In autoradiographischen Untersuchungen an Ratten konnten erste Hinweise zur Verteilung, Bindung und Ausscheidung von Myosmin erhalten werden [46;47].

Die Ganzkörperautoradiographie wurde parallel je an pigmentierten (Long-Evans) und unpigmentierten (Fischer F344) Ratten durchgeführt. Dabei wurde ihnen radioaktiv markiertes Myosmin injiziert und zwar entweder

$$5\text{-}^3\text{H}: 1,4 \mu\text{g}/\text{kg} = 8,49 \text{ MBq}/\text{kg} \text{ oder } 2\text{'-}^{14}\text{C}: 0,27 \text{ mg}/\text{kg} = 3,74 \text{ MBq}/\text{kg}.$$

Nach 6 und 15 min, einer, 4 und 24 Std. wurden die Ratten durch CO<sub>2</sub>-Asphyxiation getötet und tiefgefroren. Zur qualitativen und quantitativen Analyse wurden histologische Sagittalschnitte angefertigt. Um die Bindungsfähigkeit von Myosmin im Gewebe zu ermitteln, wurde ein Teil der Schnitte seriell mit Lösungsmitteln und Wasser behandelt. Zusätzlich wurden Urin und Fäces der Ratten, die 4 und 24 Stunden post injectionem getötet wurden, im Stoffwechsellkäfig gesammelt [46;47].

#### Verteilung

Nach der i. v. Injektion des radioaktiven Myosmins verteilte es sich schnell über die Blutbahn in die meisten Organe. Somit ist es fähig, zelluläre Membranen zu überwinden und sich im extra- und intrazellulären Raum anzureichern. Es reichert sich hier, wie andere basische Substanzen, in Magenfundus, Speichel- und Tränendrüse, Nase (v. a. in Epithelien, die saures Sekret produzieren), Präputium, akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie im distalen Ösophagus an und hat eine hohe Affinität zu Melanin in pigmentierten Haaren und Retina.

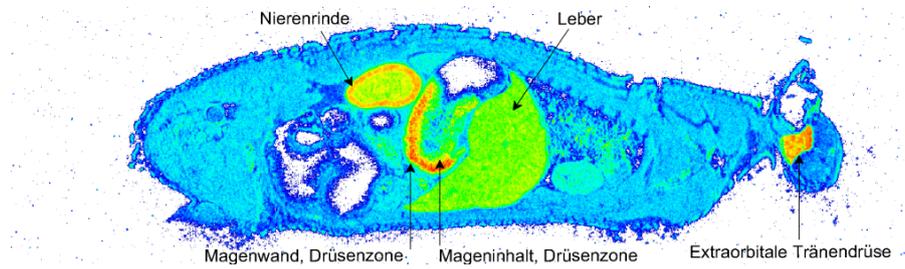
Tabelle 3: Verteilung des radioaktiv markierten Myosmins [47]

6 – 60 min p. i.	4 Std. p. i.	24 Std. p. i.
Anreicherung in: Geschlechts-, Harderschen-, Tränen- und Speicheldrüsen, Leber, Melanin, Nierenrinde, Ösophagus, Drüsenmagenwand	Anreicherung in: Ösophagus, akzessorischen Geschlechtsdrüsen  Abnahme in: anderen vorher genannten Organen	Anreicherung in: Melanin, Präputialdrüse

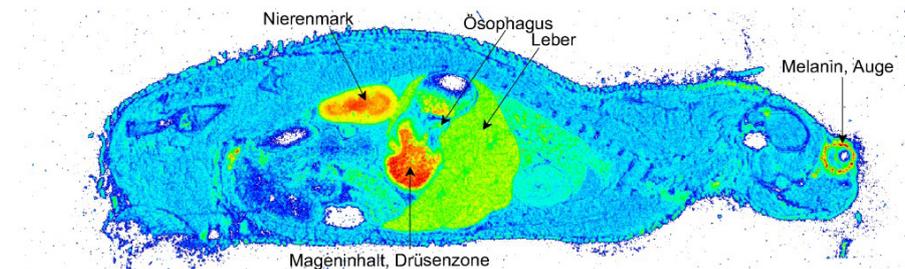
Trotz der bei der Autoradiographie gesehenen Sezernierung von Myosmin-assoziiierter Radioaktivität in den Magen und durch die Speichel- und Tränendrüsen wurde die meiste Radioaktivität über die Nieren ausgeschieden. Einer Kinetik erster Ordnung folgend, nahm

die Radioaktivität in den meisten Organen zwischen 15 min und 24 Std. rasch ab. Die HWZ lag zwischen 0,4 Std. in der Speicheldrüse und 1,2 Std. im Melanin der Haut [46;47].

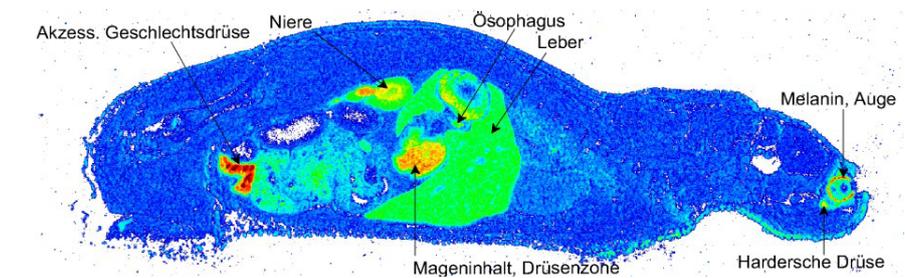
**Nach 6 Minuten:**



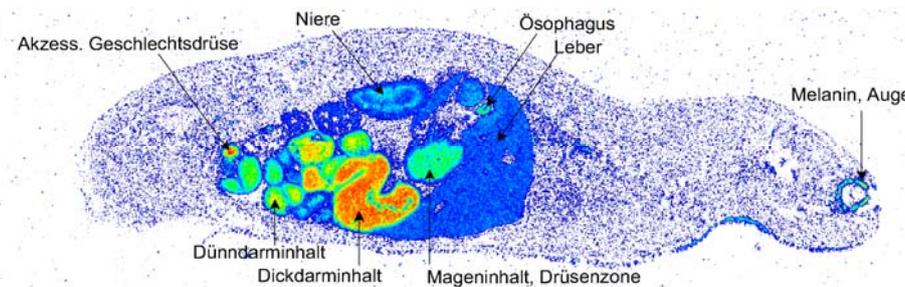
**Nach 15 Minuten:**



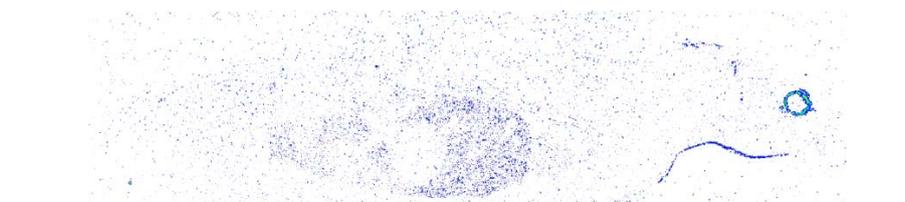
**Nach 1 Stunde:**



**Nach 4 Stunden:**



**Nach 24 Stunden:**



Blutstandards mit von links nach rechts abnehmender Radioaktivitätsmenge

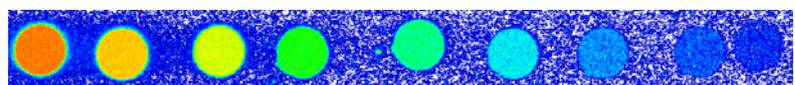


Abbildung 7: Autoradiogramme 0,1 bis 24 Stunden nach Applikation von <sup>14</sup>C-Myosmin [47]

### Ausscheidung

Versuche an Wistarratten, welchen Tritium markiertes Myosmin in Apfelstückchen oral verabreicht wurde, zeigten, dass der Hauptteil der Ausscheidung über die Nieren stattfand. Innerhalb von 24 Std. wurden 72% und 15% der Dosis über den Urin und die Fäces eliminiert. Nach fast 48 Std. konnte die gesamte Radioaktivitätsmenge in Urin und Fäces wieder gefunden werden [48].

Hauptmetaboliten von Myosmin waren Ketosäure mit 50-63% und 3-Pyridylelessigsäure mit 20-26%. Einen Überblick über die Myosminmetaboliten im Rattenurin gibt Abbildung 8.

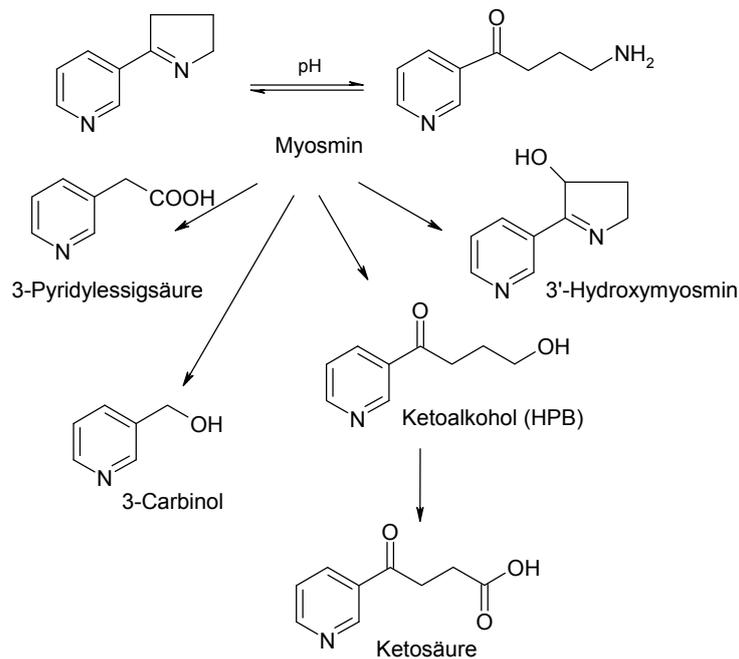


Abbildung 8: Metaboliten von Myosmin (Rattenurin) [48]

Um mehr über den subakuten Metabolismus von Myosmin zu erfahren, wurde Fischer Ratten über 4 Wochen Myosmin und NNN über das Trinkwasser in einer Konzentration, die vergleichbar mit der menschlichen Exposition über den ETS und über Nahrungs-bedingte Myosminaufnahme ist, appliziert. Zur genauen Bestimmung der Metaboliten wurden einigen Ratten wesentlich höhere Dosen verfüttert. Zudem wurde am letzten Tag ein Apfelstück mit Tritium markiertem Myosmin verfüttert [49]. Die Radioaktivität wurde in Urin und Fäzesproben, die in definierten Zeitabständen gesammelt wurden, und in Vollblut gemessen.

Die Metabolisierung von Myosmin war schnell und vollständig, sodass im 18 Stunden Urin kein Myosmin mehr gefunden wurde. Als Metaboliten traten alle bisher bekannten Abbauprodukte auf. Wie im akuten dosisabhängigen Metabolismus sind auch hier Ketosäure und Pyridylelessigsäure die Hauptmetaboliten des Myosminstoffwechsels [48;49]. Es konnte aber

gezeigt werden, dass der Anteil von Pyridylessigsäure innerhalb der 4 Wochen abnahm, der Anteil von Ketosäure und HPB dagegen zunahm [49].

Die Ketosäure als einer der Hauptmetaboliten von Myosmin zeigt, dass diese nicht, wie bis dato vermutet, als spezifischer Biomarker der Tabakexposition anzusehen ist [6;48;50].

Für 3'-Hydroxymyosmin kennt man bislang nur den Bildungsweg durch  $\beta$ -Hydroxylierung von Myosmin, sodass dieser Metabolit möglicherweise einen spezifischen Biomarker der Myosminbelastung darstellt.

### **2.1.1.5 Toxizität**

Verglichen mit Nicotin, dessen tödliche Dosis für den Menschen auf 40-60 mg geschätzt wird, ist Myosmin weit weniger toxisch.

In Ratten war die orale LD<sub>50</sub> von Myosmin mit 1875 mg/kg zehnmal geringer als die von Nicotin mit 188 mg/kg. Nach i. p. Gabe war der Unterschied mit 190 gegenüber 30 mg/kg nur etwa halb so groß [51]. Gegenüber Hausfliegen, *Musca domestica* L., war Myosmin nach topischer Applikation mit einer LD<sub>50</sub> von 0,22  $\mu$ mol/Fliege nur noch dreimal schwächer wirksam als Nicotin mit 0,08  $\mu$ mol/Fliege [27].

In einem Trinkwasserversuch an Mäusen wurde den Tieren über 50 Wochen täglich 0,5 mg Myosmin verabreicht. Während in der Kontrollgruppe die Überlebensrate bei 98% lag, belief sich diese in der Versuchsgruppe auf lediglich 76%. Eine kanzerogene Wirkung konnte dabei nicht festgestellt werden; die Tumorraten betrug 36% in der Myosmingruppe und 32% unter den Kontrolltieren [52].

In einem Versuch an Rattenganglien *in vivo* und *in vitro* sollten die Effekte von Myosmin an den cholinergen Rezeptoren beurteilt werden. Hier zeigte Myosmin eine partiell antagonistische Wirkung an muscarinergen und nicotinergen Rezeptoren [53].

Toxische Wirkungen von Myosmin auf die Muskulatur zeigten sich bei der Applikation von 4 mg Myosmin in 50 ml Badlösung an Darm- und Uterusgewebe von Meerschweinchen, wobei es nur am Darm zu Kontraktionen kam [54]. Diese kontrahierenden Wirkungen konnten am isolierten Ileum eines Meerschweinchens von *Clark et al.* [55] bestätigt werden. Sie zeigten Kontraktionen auch am M. Rectus abdominis eines Frosches sowie an den Zwerchfellmuskeln einer Ratte und eines Meerschweinchens. Im Vergleich zu Nicotin betrug die Effekte von Myosmin 0,2-30%.

In diesem Zusammenhang wurden von *Clark et al.* [55] zudem die Auswirkungen von i.v. appliziertem Myosmin mit jenen von anderen Tabakalkaloiden verglichen. Dabei zeigte sich eine Blutdrucksteigerung bei Ratten, die Hemmung des Beuge- und Patellarreflexes von Katzen sowie die Hemmung des Beuge- und Streckreflexes von Hühnern. Das Ausmaß der

Veränderungen schwankte im Vergleich zu Nicotin zwischen <2,5-5%. Die anderen untersuchten Tabakalkaloide verursachten größtenteils stärkere Veränderungen als Myosmin.

Mikrozirkulatorische Effekte von Nicotin und anderen Tabakalkaloiden zeigten *Henrich et al.* [56] an verschiedenen Gefäßen des Skelettmuskels durch intraarterielle Injektion und am perfundierten Mesenterium von Ratten. An letzterem verursachten alle Alkaloide eine Vasokonstriktion der großen Arteriolen und der Venolen. Dabei hatte Nornicotin den stärksten und Myosmin den schwächsten vasotropen Effekt. Am Skelettmuskel verursachte Myosmin in geringen Dosen eine Senkung, in hohen Dosen dagegen eine Steigerung des Blutflusses. Die getesteten Alkaloide, mit Ausnahme von Nornicotin, lösten präkapillar eine Vasokonstriktion, postkapillar eine Vasodilatation aus. Myosmin dagegen führte auch postkapillar zu einer leichten Vasokonstriktion.

Bei Hamstern konnten *Riveles et al.* [57] eine Störung der Fruchtbarkeit durch die negative Beeinflussung der Oozytenaufnahme in den Eileitern, die Hemmung der ziliären Schlagfrequenz und der infundibulären Muskelkontraktion durch nanomolare Konzentrationen von Myosmin zeigen. Einige im Zigarettenrauch vorkommende Pyridine wirkten bereits in picomolaren Konzentrationen. Nicotin und Cotinin waren dagegen nur schwach wirksam.

Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften. Im Testsystem *Escherichia coli poIA<sup>+</sup>/poIA<sup>-</sup>* konnte dagegen die Induktion von DNA-Schäden beobachtet werden [58]. Mit dem Comet-Assay konnte zudem gezeigt werden, dass Myosmin konzentrations- und zeitabhängig DNA Schäden in humanen Lymphozyten und Mucosazellen der Nasenschleimhaut auslöst [59]. In humanen Lymphozyten erhöht Myosmin auch die Mutationsfrequenz im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen [60].

In humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinien war ebenfalls ein genotoxischer Effekt mit dem Comet-Assay nachzuweisen, der sowohl durch Inkubation in saurem Milieu (pH 6 statt 7,4), wie auch durch Zugabe eines NO-Donors (3-Morpholinonydonimin) steigerbar war [61]. Wurden die Zellen mit dem direkt methylierenden *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin inkubiert und anschließend den Zellen in freiem Medium eine Reparaturzeit von 23 Std. gewährt, so gingen die DNA-Schäden in Anwesenheit von Myosmin deutlich geringer zurück. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, ein Suizidenzym, durch Myosmin gehemmt wird, wodurch die Reparaturfähigkeit der Zelle vermindert wird [61].

### 2.1.2 Nicotin

Die Summenformel von Nicotin lautet C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, das Molekulargewicht beträgt 162,23 g/mol und sein pH Wert in wässriger Lösung beläuft sich auf 10,2. Der Siedepunkt liegt bei 247 °C, der Schmelzpunkt bei -79 °C. Nicotin ist eine ölige farblose bis hellgelbe Base mit starken

hygroskopischen Eigenschaften. Wird sie Licht oder Luft ausgesetzt, verfärbt sie sich braun. Die  $pK_a$ -Werte betragen 7,90 und 3,10 [27;41].

Nicotin ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid, das zuerst in der Pflanzenfamilie der *Solanaceae*, zu der unter anderem auch Tomaten, Kartoffeln, Paprika und Auberginen gehören, nachgewiesen wurde [62;63]. Es liegt in der Natur in seiner S-Form vor und wird entweder als S-Nicotin oder (–)-Nicotin bezeichnet [64].

Tabelle 4: Nicotiningehalt in Gemüse [62]

Gemüse	höchster berichteter mittlerer Nicotiningehalt (ng/g)
Blumenkohl	3,8
Aubergine	100,0
Kartoffeln	7,1
Grüne Tomaten	42,8
Rote Tomaten	10,7

In Steinpilzen aus China wurden Nicotinrückstände im Bereich von 1-6 mg/kg gemessen, in Proben aus Osteuropa waren diese zwar geringer, lagen aber oberhalb der analytischen Bestimmungsgrenze von 0,01 mg/kg [65]. *Cavalieri et al.* [66] konnten in Pilzproben, die von regionalen Herstellern stammten, einen Nicotiningehalt von 0,01 bis 0,04 mg/kg, in Trockenpilzproben aus Europa, Asien und Südafrika von <0,1 bis 4,5 mg/kg nachweisen. Ein generell höherer Gehalt in Trockenpilzen konnte aber ausgeschlossen werden.

Die mit Abstand höchsten Nicotiningehalte finden sich in der Tabakpflanze. Sie erreichen in geernteten und fermentierten Roh-tabaken je nach Sorte 5-180 mg/g [14].

Nicotin kann über die Mundhöhle, die Haut und die Lunge, aber auch über die Vesica urinaria oder den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden. Seine Membrandurchlässigkeit ist abhängig vom pH Wert. So liegt Nicotin im Sauren vor allem in ionisierter Form vor und wird nur äußerst langsam absorbiert [67]. Der physiologische pH Wert von etwa 7,4 in den Alveolen und die große Resorptionsfläche ermöglicht eine rasche und effektive Resorption von Nicotin aus dem inhalierten Tabakrauch. Nicotin entschwindet sehr schnell aus dem Blut mit einer Halbwertszeit von 2 bis 3 Stunden beim Menschen [68].

In der Regel werden in der Leber 70 bis 80% des Nicotins durch oxidative Prozesse zu Cotinin abgebaut. Katalysiert wird dieser Abbau primär durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen und anschließend durch cytosolische Aldehydoxidasen. Weitere Wege der Metabolisierung führen durch Demethylierung von Nicotin und Cotinin zu Nornicotin und Norcotinin, durch Hydroxylierung von Cotinin zu trans-3-Hydroxycotinin, welches durch O-Glukuron-

dierung noch wasserlöslicher gemacht wird. Weitere Metaboliten entstehen durch N-Glucuronidierung und durch Abbau der Primärmetaboliten [69].

Abbildung 9 zeigt ein quantitatives Schema des Nicotinmetabolismus. Diese Metaboliten werden in individuell unterschiedlichen Anteilen mit dem Urin ausgeschieden. Ca. 5-15% des Nicotins wird auch unverändert über die Nieren eliminiert, wobei der Anteil an der Gesamtausscheidung stark vom pH-Wert des Urins abhängt [64;69;70]. Beim Menschen wird nur sehr wenig des aufgenommenen Nicotins über die Fäces und eine minimale, quantitativ nicht näher charakterisierte Menge mit dem Schweiß ausgeschieden [69].

In autoradiographischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich Nicotin, ähnlich wie für Myosmin in Kap. 2.1.1.4 dargestellt, in nahezu alle Gewebe verteilt. Hohe Konzentrationen finden sich in melaninhaltigen Geweben. Hervorzuheben ist auch die Sekretion in den Magen und in den Speichel. Die Affinität zu Fettgewebe ist dagegen relativ gering. Nicotin kann die Plazenta passieren und führt bei rauchenden Müttern sogar zu einer stärkeren Anreicherung von Nicotin im Fötus als im Gewebe der Mutter [64].

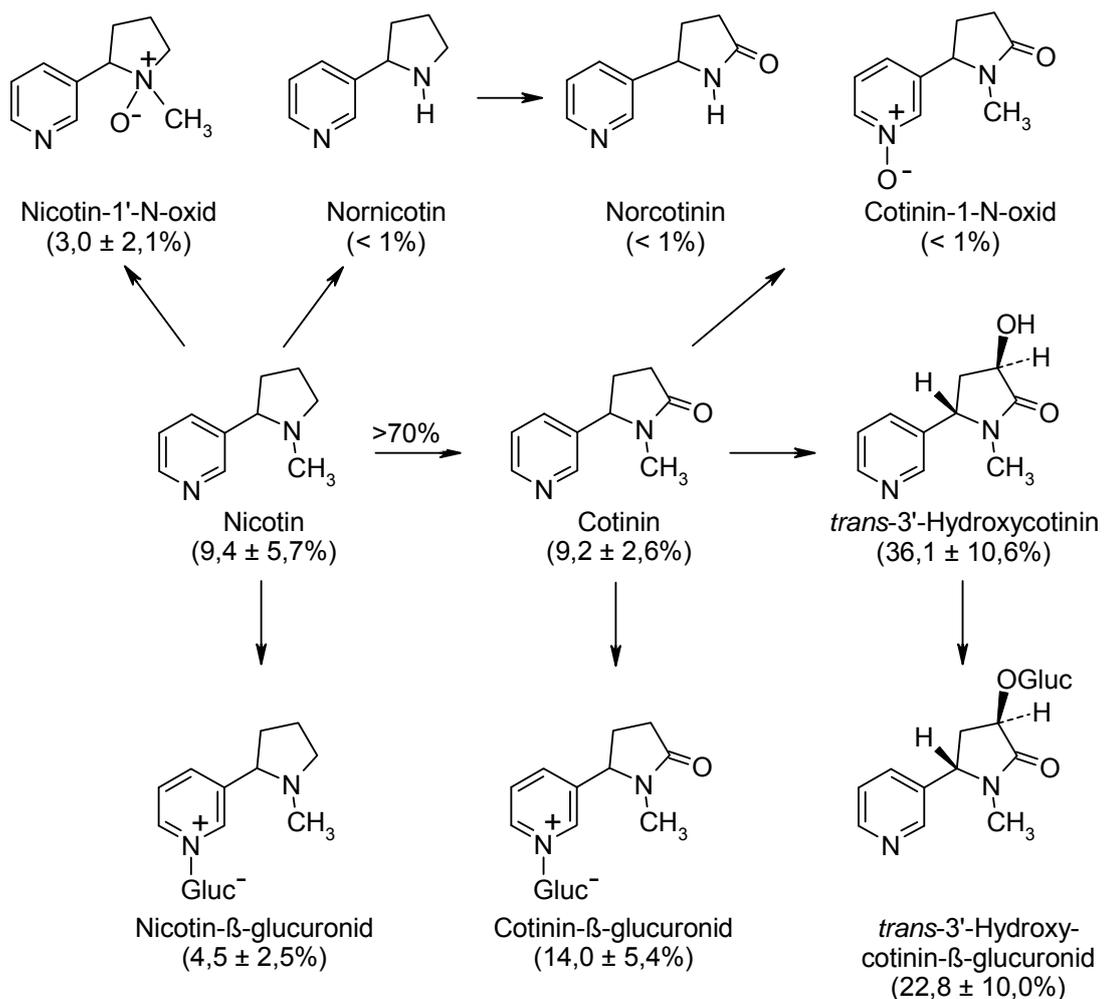


Abbildung 9: Quantitatives Schema der Hauptmetaboliten von Nicotin. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil von Nicotin und seinen Metaboliten im 24-Std.-Urin von Rauchern an (modifiziert nach Richter und Scherer) [64].

In hohen Dosen ist Nicotin akut stark toxisch (siehe auch Kap. 2.1.1.5), wobei die LD<sub>50</sub> unter verschiedenen Tierarten und abhängig von der Applikationsart stark schwankt. Zudem ist Nicotin teratotoxisch, genotoxisch, lungen- und immunotoxisch und verursacht kardiovaskuläre sowie gastrointestinale Erkrankungen [62].

### 2.1.3 Cotinin

Die Summenformel des kristallin hellgelben Cotinins lautet C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O, das Molekulargewicht beträgt 176,22 g/mol und der pK<sub>a</sub> Wert liegt bei 4,37 [27;41]. Es hat einen Schmelzpunkt von 40-42 °C und einen Siedepunkt von 250 °C.

Toxikologisch gesehen ist Cotinin im Vergleich zu Nicotin von untergeordnetem Interesse, die LD<sub>50</sub> ist bei Mäusen mit 2-3 g/kg Körpergewicht über 50-fach geringer als die von Nicotin [71]. Cotinin stellt aber einen spezifischen Biomarker für die Rauchbelastung beim Menschen dar. Neben trans-3-Hydroxycotinin ist Cotinin einer der beiden Hauptmetaboliten von Nicotin (Abb. 9) [25;64]. Obwohl eine zusätzliche Belastung durch Nicotin-haltige Lebensmittel möglich ist (Kap. 2.1.2), werden die bei Passivrauchern messbaren Cotininwerte in Blut, Speichel, Urin, Plasma und Muttermilch durch die alimentäre Aufnahme kaum beeinflusst [7].

## 2.2 Nitrosamine

Nitrosamine entstehen bevorzugt aus sekundären Aminen und salpetriger Säure im sauren Milieu (Abb. 10). Eine Bildung aus primären Aminen, Diaminen und tertiären Aminen ist ebenso möglich.

Unter Einwirkung von Stickoxiden werden primäre und sekundäre Amine unabhängig von der Basizität des Amins nitrosiert [72]. Die eigentliche Reaktion erfolgt dabei über das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenide. Das pH-Milieu des Reaktionsmechanismus ermöglicht eine Steuerung des Anteils des aktiven Nitrosierungsgagens und somit der Ausbeute. Dabei ist eine optimale Ausbeute im Bereich von pH 3,0-3,5 zu erwarten. Abweichungen in stärker saures Milieu würden die Reaktion mit nitrosierenden Substanzen verhindern, da die Protonierung des sekundären Amins am Stickstoffatom zum Iminiumion führte. Höhere pH Werte als 3,5 behindern dagegen maßgeblich die Säure-katalysierte Nitrosierung.

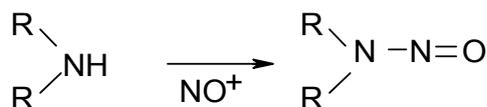


Abbildung 10: Schema der Nitrosierung

### 2.2.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen

Die Nitrosaminbelastung des menschlichen und tierischen Organismus ist sowohl in exogenen Quellen als auch in der endogenen Nitrosierung begründet.

Nitrosamine entstehen vor allem im Magen von Monogastriern. Die Nitrosierung bedarf eines sauren Milieus, wie es im Magen vorzufinden ist. Hier sind Amine als nitrosierbare Vorstufen sowie Nitrit oder Stickoxide vorhanden.

Der Nitritgehalt im Magen lässt sich auf den entero-oralen Nitrat/Nitrit Kreislauf zurückführen. Hierbei wird mit der Nahrung aufgenommenes Nitrat im Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu einem Viertel mit Hilfe eines Anionen-Transportsystems in den Speichel abgesondert. In der Mundhöhle findet daraufhin eine bakterienvermittelte Nitrosierung statt [73;74]. Die Bakterien reduzieren über 20% des Speichelnitrats zu Nitrit, welches wiederum fast vollständig abgeschluckt wird und somit als Nitritquelle im Magen zur Verfügung steht [75].

Bei Wiederkäuern wird Nitrat vor allem in den Vormägen zu Nitrit reduziert, wodurch die Toxizität um ein Zehnfaches steigt. Wegen der raschen Umwandlung von Nitrat zu Nitrit im reduzierenden Milieu des Pansens reagieren Wiederkäuer besonders empfindlich auf eine erhöhte Nitratexposition, welche akute Vergiftungen mit Reizungen der Schleimhäute im GIT und Gewebhypoxie durch Methämoglobinbildung zur Folge hat. Die Gewebhypoxie wird durch vermehrte Bildung von Stickoxiden und die damit einhergehende Vasodilatation noch verstärkt [76].

Entzündungszellen können in entzündeten oder chronisch infizierten Organen Stickoxide bilden. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthetase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion L-Arginin am endständigen Guanidino-Stickstoff zu Citrullin oxidiert. NO wird bei dieser Reaktion freigesetzt und wirkt im physiologischen Zustand als Dilator der Arteriolen. Hier jedoch im Überschuss gebildete Stickoxide reagieren zu einem großen Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den reaktiven Nitrosierungsagenzien  $N_2O_3$  und  $N_2O_4$  [73;77].

Exogen zugeführte Nitrosamine können von Lunge, Haut und GIT resorbiert werden [75]. Als Hauptquelle ist vor allem Tabakkonsum in Form von Rauchen, Schnupfen und Kauen anzusehen [64]. Zudem spielen aber auch Medikamente, Kosmetika, berufsbedingte Exposition [78] und Nahrungsmittel eine wichtige Rolle, wobei bei letzteren gepökelte Fleisch- und Fischwaren besonders hervorzuheben sind, aber auch Bier und Käse mit Nitratzusatz wichtige Nitrosaminquellen darstellen [75].

In Lebensmitteln macht Dimethylnitrosamin, das am stärksten kanzerogen ist, den Hauptteil der Nitrosamine aus. Nitrosopiperidin und Nitrosopyrrolidin, das bei hohen Temperaturen, zum Beispiel beim Braten entsteht, spielen jedoch auch eine Rolle. Durch allgemeine Sen-

kung des Nitrit- und Nitratzusatzes in Fleischwaren, Zusätze von Hemmstoffen wie Ascorbinsäure und Tocopherolen sowie durch Reduzierung des Nitratgehaltes von Gemüse kann sowohl die endogene wie auch die exogene Belastung mit Nitrosaminen gesenkt werden [79].

Bei Wiederkäuern ist die wesentliche Nitrat- und somit Vergiftungsquelle die Speicherung des Nitrats in Futterpflanzen sowie die Kontamination von nitrithaltigen Silierhilfsmitteln oder der sorglose Umgang mit Nitratdüngern [76].

### 2.2.2 Toxizität und Entgiftung von Nitrosaminen

Nitrosamine haben sowohl mutagene als auch kanzerogene Eigenschaften, weshalb ihnen aus Sicht des Verbraucherschutzes eine besondere Bedeutung zugemessen wird. Ausgangspunkt für die genotoxische Wirkung der Nitrosamine ist eine meist durch Cytochrom P450-Enzyme vermittelte Umwandlung zu reaktionsfähigen Zwischenstufen, die zelluläre Makromoleküle alkylieren und unter anderem die DNA durch Adduktbildung schädigen [75;76]. Der Hauptentgiftungsweg besteht in einer Cytochrom P450-abhängigen oxidativen Denitrosierung unter Bildung eines primären Amins, des entsprechenden Aldehyds sowie von NO oder NO<sub>2</sub>. Die entstandenen Aldehyde werden weiter metabolisiert und z.T. als CO<sub>2</sub> abgeatmet [75].

### 2.2.3 Tabakspezifische Nitrosamine

Als tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) werden jene Verbindungen bezeichnet, die durch Nitrosierung der Tabakalkaloide entstehen. Der Anteil von Nitrosaminen in der Tabakpflanze ist 3.000 bis 300.000 Mal kleiner als der von Nicotin. Dieser geringe Anteil von Nitrosaminen im Tabak unterliegt zudem starken Schwankungen. Während die jungen grünen Blätter der Tabakpflanze nur geringe Spuren an Nitrosaminen enthalten, steigt der Anteil durch Trocknung und Fermentation [80-82]. Die TSNA-Gehalte in genussfertigen Tabakwaren sind stark abhängig von den Prozess- und Fermentationsbedingungen bei der Herstellung [81;83-85].

Es wurden bis heute sieben TSNA im Tabak bzw. im Tabakrauch identifiziert (Abb. 11):

#### ***N'-Nitrosonornicotin (NNN):***

Der Hauptsyntheseweg von NNN besteht in der Nitrosierung von Nornicotin. Ein weiterer, wenngleich weniger bedeutsamer Entstehungsweg ist die Nitrosierung von Nicotin-N-oxid [86;87]. Zudem kann auch Myosmin sehr effektiv zu NNN nitrosiert werden [88;89].

#### ***4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)***

Der wichtigste Weg zur Entstehung von NNK ist wahrscheinlich der mikrobielle Abbau von Nicotin-N-oxid zu Pseudooxynicotin, das wiederum schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird [90]. Durch die enzymatische Reduktion der Ketogruppe von NNK entsteht NNAL.



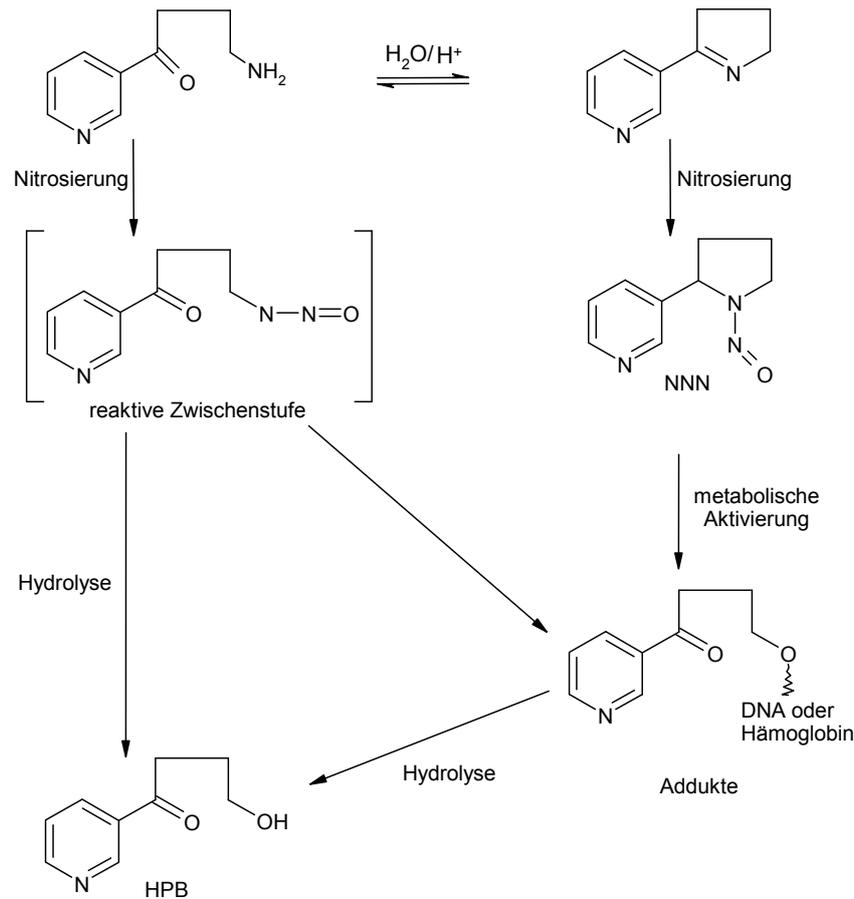


Abbildung 12: pH-abhängige Nitrosierung von Myosmin [89]

Reaktive Zwischenprodukte können direkt über eine instabile Zwischenstufe oder über die Bildung von NNN entstehen, wobei bei letzterem eine metabolische Aktivierung notwendig ist (Abb. 12 und 13). Auf dem direkten Weg tritt vermutlich ein reaktives Diazohydroxid auf. Dieses ist nach Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Myosmin in Nitrosierungsansätzen an Kalbsthymus DNA wahrscheinlich in der Lage, nicht nur mit Wasser zum HPB zu reagieren, sondern auch mit zellulären Makromolekülen kovalente Bindungen einzugehen [88].

*Hecht et al.* [93] bestätigten die Bildung von HPB im sauren Milieu. Bei pH 3,5 konnten sie erstmals 3'-Oximinomyosmin als Reaktionsprodukt nachweisen. NNN konnte dagegen nicht gefunden werden. Möglicherweise wurde es bei pH Werten unter 4 mit 3'-Oximinomyosmin verwechselt. Bei höheren pH Werten ist die Bildung von NNN aus der geschlossenen Myosminform wahrscheinlicher.

### 2.2.5 Peroxidierung von Myosmin

Ein weiterer Aktivierungsweg für Myosmin ist dessen Peroxidierung. Hierfür wurde Myosmin *in vitro* in eine Wasserstoffperoxid- und Essigsäureanhydridmischung gebracht und daraufhin für 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließende HPLC/UV und GC/MS Analysen ergaben unverändertes Myosmin, 3-Pyridylessigsäure, Ketosäure, 3-Pyridylmethanol, HPB und

Nornicotin. *In vivo* ist eine entsprechende Peroxidierung zu erwarten, weswegen eine Adduktbildung nicht nur durch Nitrosierungsvorgänge, sondern auch durch Peroxidierungsreaktionen denkbar ist. [88;94;95]

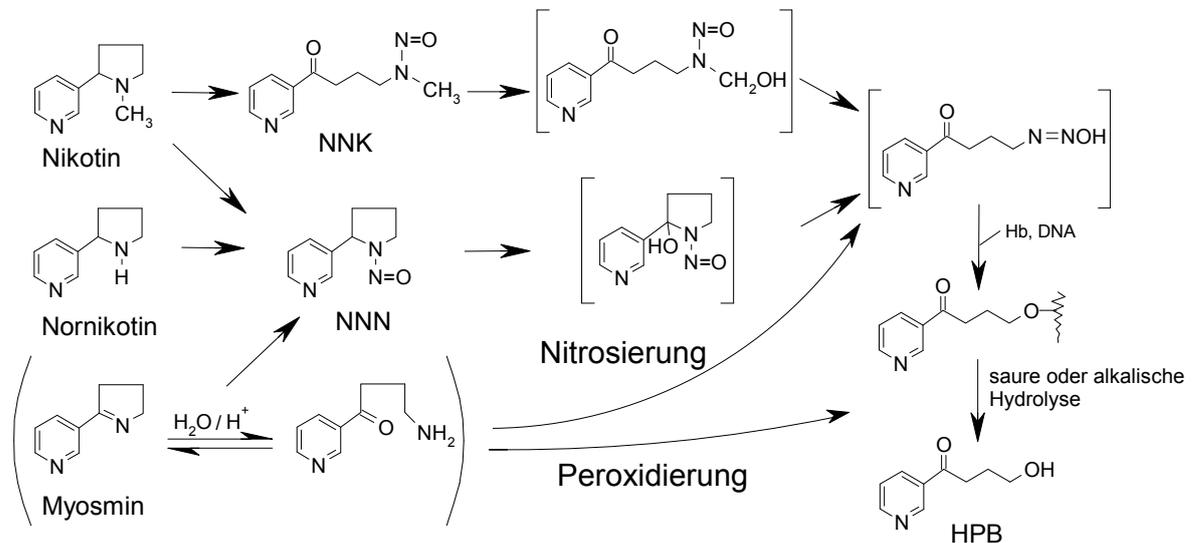


Abbildung 13: Aktivierung von TSNA und Myosmin zu HPB-freisetzenden Addukten [88;94;95]

## 2.2.6 Bedeutung von TSNA und Myosmin für den Ösophaguskrebs

Beim Menschen wird ein Zusammenhang von NNN mit der Entstehung von Ösophaguskrebs vermutet, da dieses Nitrosamin zu den wenigen Substanzen gehört, die im Tierversuch Ösophaguskrebs auslösen [94].

Durch die metabolische Aktivierung von NNN entsteht ein instabiles Diazohydroxid, welches entweder zu HPB hydrolysiert wird oder Biomoleküle wie beispielsweise DNA, RNA oder Hämoglobin alkyliert. Mit DNA werden unterschiedlich stabile Addukte gebildet [96]. Zudem wird durch die Hemmung der O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase die Reparaturkapazität der Zelle geschwächt und demzufolge die Tumorigenese gefördert [97].

Die von *Zwickenpflug* [89] entdeckte Nitrosierung von Myosmin zu NNN war ein erster Hinweis, dass Myosmin bei der Entstehung von Ösophaguskrebs eine Rolle spielen könnte. Wie Abbildung 12 zeigt, ist eine metabolische Aktivierung des Nitrosierungsprodukts im Organismus keine Voraussetzung für die Bindung an DNA und Proteine, da bereits bei der Entstehung von HPB eine instabile Zwischenstufe entsteht, durch die eine solche Bindung ermöglicht wird. Somit kann man unter nitrosierenden Bedingungen in saurem Milieu von einem kanzerogenen Potenzial des Myosmins ausgehen.

*In vitro* Studien mit radioaktiv markiertem Myosmin zeigten unter Nitrosierungsbedingungen eine irreversible Bindung von Radioaktivität an DNA [88]. *Zwickenpflug* und *Tyroller* [98] zeigten die Bildung von HPB nach der Inkubation von Myosmin mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da Wasserstoff-

peroxid auch im Organismus verfügbar ist, könnte diese HPB-Bildung eventuell auch *in vivo* stattfinden. Bei Ratten erzeugte Myosmin HPB abspaltende Addukte mit Hämoglobin und der Ösophagus-DNA, wenngleich das Ausmaß der Adduktbildung nach NNN-Fütterung größer war [99]. Im Gegensatz dazu fanden *Hecht et al.* [93] bei Versuchen an Ratten keine HPB Addukte oberhalb der Nachweisgrenze.

An Menschen, die eines plötzlichen Todes starben, konnten HPB-freisetzende Addukte in der Mucosa von Ösophagus und Cardia gemessen werden. Die Konzentrationen waren hierbei unabhängig von den Rauchgewohnheiten, aber mit zunehmender Adipositas signifikant erhöht, was ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Myosmin am Adenokarzinom des unteren Ösophagus und der Cardia sein könnte [100].

Abbildung 14 zeigt ein Schema der Pathogenese des Barrett-Ösophagus und des Ösophaguskarzinoms. Chronischer Rückfluss von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre wird als GERD (gastroösophageale Refluxkrankheit) bezeichnet. Der niedrige pH Wert und proteolytische Enzyme führen zu Ösophagitis und zur Schädigung des Zellverbandes des Epithelgewebes mit der Folge, dass normales Plattenepithel in Zylinderepithel umgewandelt wird. Durch bisher unbekannte genetische Veränderungen kann es folgend zur Entstehung einer Schleimhaut mit Becherzellen, wie sie vor allem in der Dick- und Dünndarmwand auftritt, kommen. Es handelt sich hierbei um den Barrett-Ösophagus, eine intestinalen Metaplasie, die über die Stufen einer Dysplasie zum Adenokarzinom führen kann [101;102].

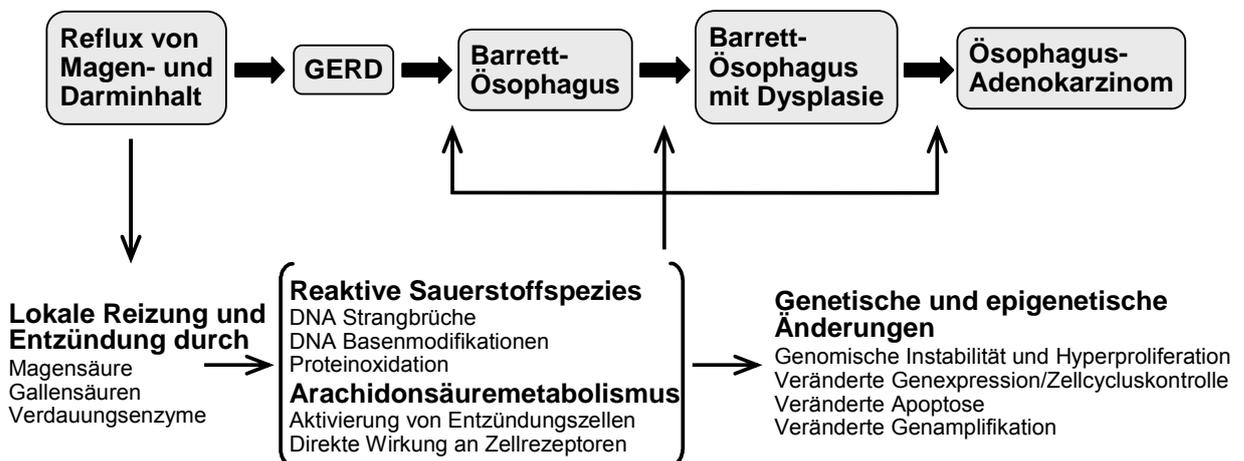


Abbildung 14: Mechanismen, die zur Entstehung eines Adenokarzinoms im Ösophagus führen (nach *Chen et al.* [103])

*Olliver et al.* [104] konnten bei Patienten dieser Erkrankung mit Hilfe des Comet-Assays eine erhöhte Rate von DNA-Schäden gegenüber normalem Plattenepithel und Gewebe des Magens finden.

## 2.3 Milch

### 2.3.1 Milch als Lebensmittel

Milch ist das natürliche Nahrungsmittel für den neugeborenen Säuger und stellt den Übergang von intrauteriner Ernährung zur postnatalen Ernährung sicher. Die Zusammensetzung ist demnach an die Bedürfnisse, Resorptions- und Verdauungsmöglichkeiten der jeweiligen Spezies angepasst und variiert unter den verschiedenen Tierarten stark.

In der Ernährung des Menschen spielt Milch seit Beginn der Domestikation, der Zähmung von Wildtieren sowie der Züchtung und Haltung von Milchrindern eine zentrale Rolle. Verschiedene Verarbeitungstechniken ermöglichen eine breite Nutzung der Milch als Nahrungsmittel [79].

### 2.3.2 Anatomisch-histologischer Aufbau der Milchdrüse

Bei der Milchdrüse handelt es sich um eine modifizierte exokrine, tubuloalveolär zusammengesetzte Schweißdrüse, die nur bei Säugetieren (Mammalia) vorkommt [105,106]. Ein Schema des anatomischen Aufbaus zeigt Abbildung 14:

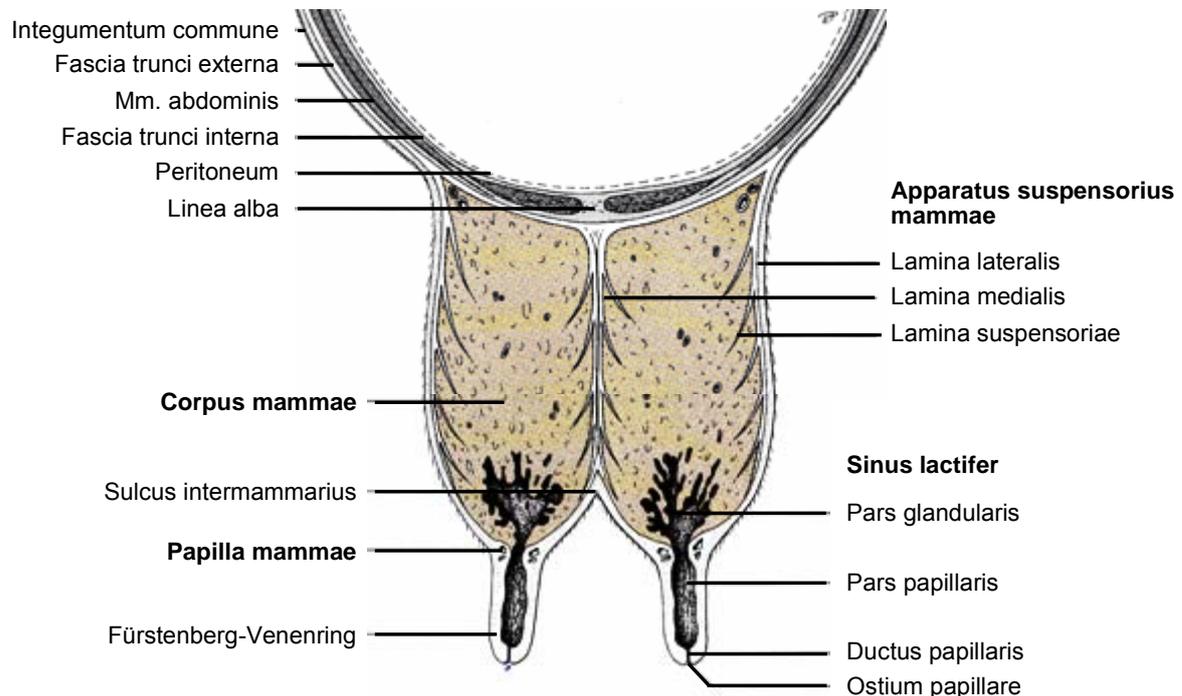


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Milchdrüse und ihres Aufhängeapparates [106]

Die Milchdrüse (Mamma) wird anatomisch in einzelne Milchdrüseneinheiten, die Mammarkomplexe unterteilt. Jeder dieser Mammarkomplexe enthält einen oder mehrere Milchdrüsenkomplexe, die jeweils den Drüsenkörper (Corpus mammae) mit dem eigentlichen Drüsenparenchym (Glandula mammaria) zur Milchsynthese und -sekretion und den dazugehö-

rigen Leitungsbahnen im Interstitium einschließt. Tierartlich unterschiedlich setzt sich der Milchdrüsenkomplex in einem vielfach gekammerten Hohlraumssystem als Ausführungsgangsystem fort, das in der Zitzenöffnung, dem Ostium papillare, endet.

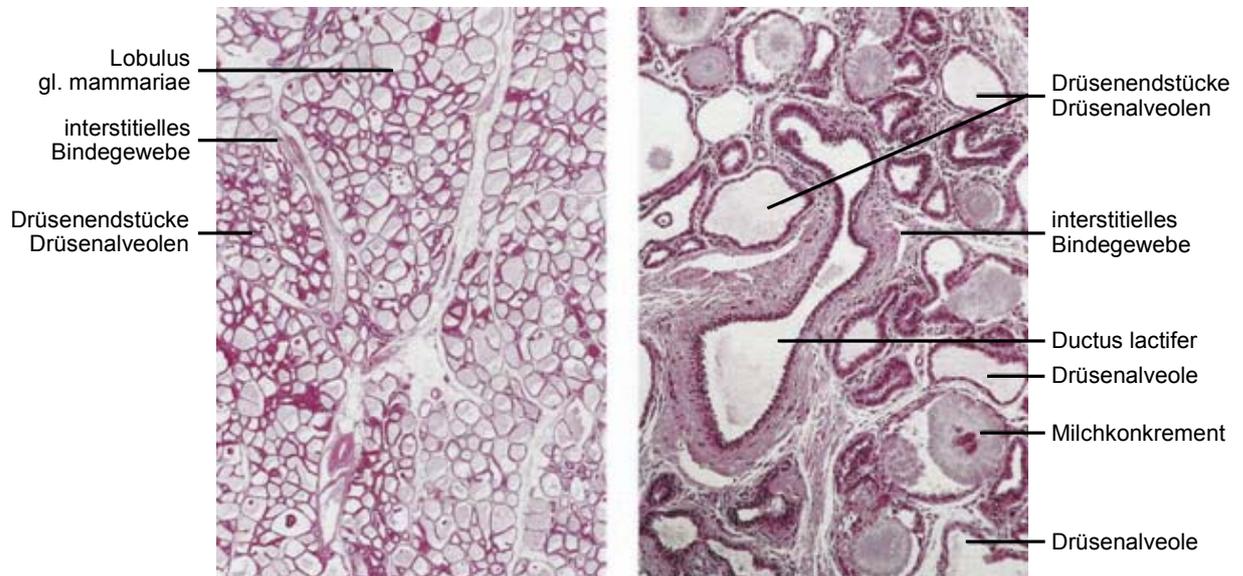


Abbildung 16: Histologische Schnitte durch das Parenchym einer Milchdrüse des Rindes [106]

Das Drüsenparenchym lässt sich in verschiedene Abschnitte gliedern (Abb. 16):

Drüsenendstücke (Drüsenalveolen): Hier wird die Milch gebildet. Drüsenalveolen sind mit einem einschichtigen isoprismatischen Epithel ausgekleidet. Wie es typisch für Stapeldrüsen ist, sind mehrere solcher Alveolen zu Milchdrüsenläppchen zusammengefasst, die durch Bindegewebssepten mit Nerven und Gefäßen voneinander getrennt sind. Die Drüsengänge mehrerer Milchdrüsenläppchen münden in die Milchdrüsenlappen, die durch dickere Bindegewebszüge getrennt sind.

Milchgänge (Ductus lactiferi): Sie nehmen die Milch aus den Milchdrüsenlappen auf und bilden das Gangsystem zum Transport der Milch. Das Gangsystem mündet in die Milchzisterne. Milchgänge sind mit einem geschichteten isoprismatischen Epithel ausgekleidet.

Milchzisterne (Sinus lactiferi): Hier wird die Milch gesammelt. Dabei wird eine proximale Pars glandularis sinus lactiferi und eine distal gelegene Pars papillaris sinus lactiferi unterschieden.

Die Grenze zwischen Drüsenteil und Zitzenteil bildet ein Venenplexus, der Fürstenberg-Venenring. Eine Schleimhautfalte, die Fürstenberg-Rosette, markiert die Grenze zwischen Zitzenteil und Strichkanal (Ductus papillaris) [106].



Sinus lactifer

Pars glandularia

Pars papillaris

Ductus papillaris Abbildung 17: Sagittalschnitt durch die Zitze eines Rindes [106]

### 2.3.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Milch

Milch ist ein polydisperses Drüsensekret mit dem Dispersionsmittel Wasser und den dispergierten Struktureinheiten. Das Milchsekret lässt sich in drei Phasen gliedern:

#### molekular-disperse Phase:

Laktose, anorganische/organische Salze, kleine Proteine, nicht aggregierte Molkeproteine, Mineralstoffe und einige andere Inhaltsstoffe sind echt gelöst im Wasser der Milch.

#### kolloid-disperse Phase:

Caseine der Proteinfraction treten als Caseinmicellen (Durchmesser 0,02-0,6 µm in der Kuhmilch) auf. Sie werden hauptsächlich von Calciumsalzen des Caseins gebildet.

#### grob-disperse Phase:

Milchfett ist in Fettkügelchen, die von einer Lipoproteinmembran umgeben sind, im Wasser emulgiert (Durchmesser 0,1-10 µm in der Kuhmilch).

Außerdem kommen Lipoproteinpartikel, die beispielsweise aus Resten von Zellmembranen oder Mikrovilli bestehen, und somatische Zellen, vor allem Leukozyten, vor.

Als *Milchplasma* bezeichnet man Milch nach Entzug von Fettkügelchen. Werden zudem die Caseinmicellen entfernt, spricht man von *Milchserum*. Als *Serumproteine* werden nichtmicelläre Proteine bezeichnet.

Die weißliche bis weißlich-gelbe Farbe der Milch ist bedingt durch die Streuung und Absorption des Lichts an Fetttropfchen und Proteinmicellen, die gelbliche bis gelblich-grüne Farbe durch Carotin der Fettphase und Riboflavin der wässrigen Phase. Der Geschmack ist mild süßlich, der Geruch ist eigentümlich unspezifisch.



setzt wird und zur Kontraktion der Myoepithelzellen der Alveolen führt. So wird die Milch aus den Alveolen in die Milchgänge und die Zisterne verbracht (Abb. 19).

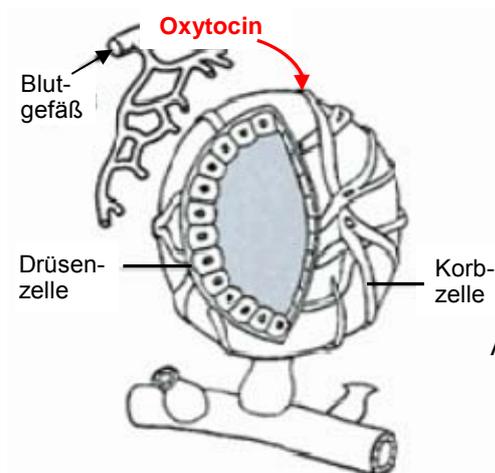


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Alveole im Euter des Rindes [109]

Tabelle 5: Übersicht über die Haupttrouten einer Sekretion von Milchbestandteilen durch das Epithel der Milchdrüse [109]

Bezeichnung	Verlauf	In Anspruch genommen von
Membran-Route	Substanzen passieren die apikale Membran, Substanzen aus dem Blut zusätzlich die basolaterale Membran	Wasser
Golgi-Route	Stoffe werden zum Golgi-Apparat transportiert/vom Golgi-Apparat abgegeben und durch Exocytose in die Milch sezerniert	Caseine, Molkeproteine, Lactose, Citrat, Calcium
Milchfett-Route	Milchfettkügelchen umgeben von ihrer Milchfettkügelchenmembran werden von der Spitze der sekretorischen Zellen abgegeben	Milchfett, fettlösliche Hormone, Vitamine, Arzneimittel, unbekannte Wachstumsfaktoren, Leptin
Transcytose	Transport von Vesikeln unter Beteiligung verschiedener Organellen, in einigen Fällen Ausschleusung via Golgi-Route	Immunglobuline während der Kolostrumbildung, Transferrin, Prolactin
Parazelluläre Route*	Übertritt aus der interstitiellen Flüssigkeit über tight junctions in die Milch	Laktose, Kalium

\* Fehlt während der Laktation, tritt auf während der Trächtigkeit und bei Mastitis, bei einigen Tierarten auch während der Laktation. Beim Trockenstellen von Ziegen und Kühen bedingt die Akkumulation der Milch im Euter eine Verminderung der sekretorischen und metabolischen Aktivität und erhöht die Permeabilität der tight junctions.

Die Konzentrationen von Wirkstoffen in der Milch sind abhängig von den Konzentrationen im Plasma des Muttertieres. Prinzipiell ist der Übertritt von Stoffen bis zu einem Molekulargewicht von 300 Da leicht möglich. Ab 600 Da müssen spezifische Transportmechanismen, wie sie in Tabelle 5 dargestellt sind, benutzt werden.

Die Blut-Milch-Schranke verhält sich als Lipoidmembran. Sie kann nur durch unionisierte und somit lipidlösliche Stoffe überwunden werden.

Einen wichtigen Einflussfaktor stellt auch der pH Wert dar. So ist die Milch mit einem pH Wert von ca. 6,5 stärker sauer als das Plasma mit einem pH Wert von 7,4, wodurch es zu einer Anreicherung von schwach basischen Substanzen mit einem  $pK_a > 7,2$  in der Milch kommt. Die Anreicherung lipophiler, basischer Substanzen in der Milch lässt sich durch das Ionenfallenprinzip erklären (Abb. 20).

Generell kann nur freier Wirkstoff, nicht aber Protein gebundener Wirkstoff die Blut-Milch-Schranke überwinden [76;110;111].

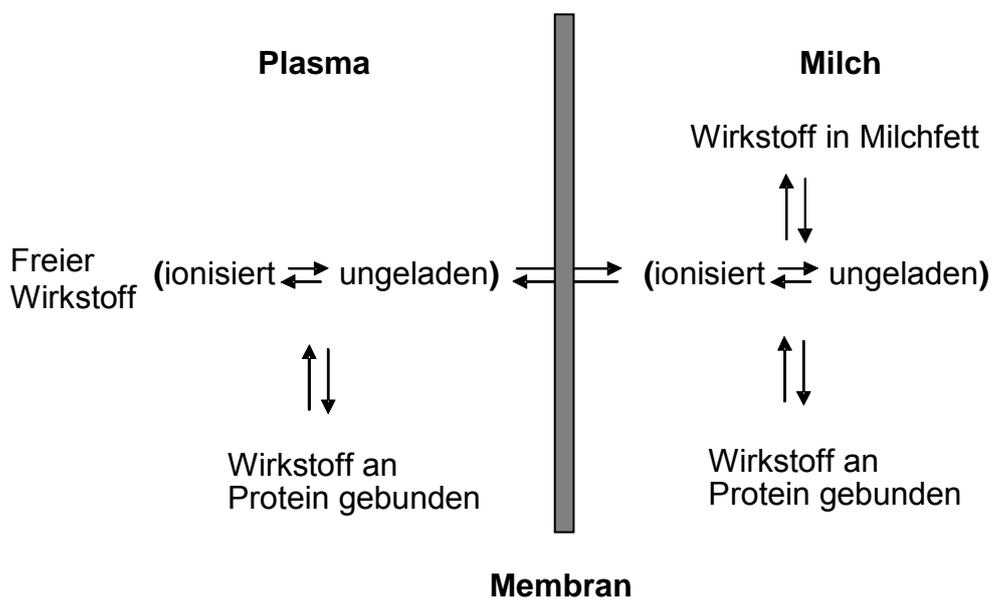


Abbildung 20: Schematische Verteilung von Wirkstoffen in Milch und Plasma [111].

Quantitative Aussagen zum Übertritt von Substanzen in die Milch lassen sich mit der so genannten Milch-Plasma-Relation, dem M/P-Wert, treffen. Bei identischen Konzentrationen in Milch und Plasma ist der Quotient 1. Bei den meisten Pharmaka liegt er unter 1 [112].

Eine Orientierung für dieses Verhältnis erhält man mittels des Membran-Diffusions-Modells, da der  $\log P$  mit dem  $\log M/P$  korreliert [113]. Dabei geht man aber wohl bei der Bestimmung des  $\log P$  von einer rein wässrigen Lösung aus. Bestimmt man den Octanol-Wasser-Koeffizienten  $K_{OW}$  unter Verwendung eines Puffersystems mit pH 7,2 als wässrige Phase, so kann man das Milchlippid/Plasma Verhältnis bestimmen.

Luck *et al.* [114] geben für Nicotin ein Milch/Plasma Verhältnis von  $2,92 \pm 1,09$  und für Cotinin einen Quotienten von  $0,78 \pm 0,19$  an.

Wegen des größeren M/P-Verhältnisses reichert sich Nicotin im Vergleich zu Cotinin in der Muttermilch stärker an, denn Cotinin ( $pK_a = 4,5$ ) ist im Vergleich zu Nicotin ( $pK_{a1} = 7,8$  und  $pK_{a2} = 3,1$ ) weniger basisch. Demzufolge liegt Cotinin in beiden Matrices in nicht ionisierter Form vor und kann somit in beide Richtungen diffundieren [115].

Für Nicotin wurde zudem die Beeinflussung dieses Verhältnisses durch den pH Wert untersucht, mit dem Ergebnis, das mit sinkendem pH Wert der Milch das M/P-Verhältnis steigt (Tab. 6). Bei gleichem pH von Milch und Plasma war auch der M/P-Wert = 1.

Tabelle 6: Milch/Plasma-Verhältnisse für Nicotin ( $pK_a = 7,8$ ) bei verschiedenen Milch pH Werten und einem Plasma pH von 7,42 nach *Luck et al.* [114]

pH Wert der Milch	M/P - Verhältnis
6,4	7,43
6,5	5,95
6,6	4,78
6,7	3,84
6,8	3,13
6,9	2,54
7,0	2,07
7,1	1,71
7,2	1,41
7,3	1,18
7,4	1,00

### 2.3.5 Zusammensetzung der Milch

Die Zusammensetzung der Milch variiert nicht nur unter den verschiedenen Säugerspezies, sondern unterliegt noch weiteren Einflussfaktoren. Beim Wiederkäuer spielen vor allem die Rasse, das Laktationsstadium, das Alter der Tiere, der Ernährungsstatus sowie die Jahreszeit und die Eutergesundheit eine wesentliche Rolle für die Zusammensetzung der Milch. Abbildung 19 gibt einen allgemeinen Überblick über die Bestandteile der Milch.

Das Kolostrum ist im Allgemeinen wasserärmer und reicher an Proteinen, Salzen und Vitaminen. Eine besondere Bedeutung spielt hier die Proteinfraction: Globuline enthalten maternale Antikörper, die in den ersten Lebensstunden unverdaut die Darmwand des Neugeborenen überwinden können, so direkt ins Blut gelangen und eine passive Immunisierung gewährleisten. Daneben enthält vor allem das Erstkolostrum verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren in stark erhöhter Konzentration, die für die Entwicklung der Milchdrüse und des gastrointestinalen Systems des Säuglings von Bedeutung sind [107;116].

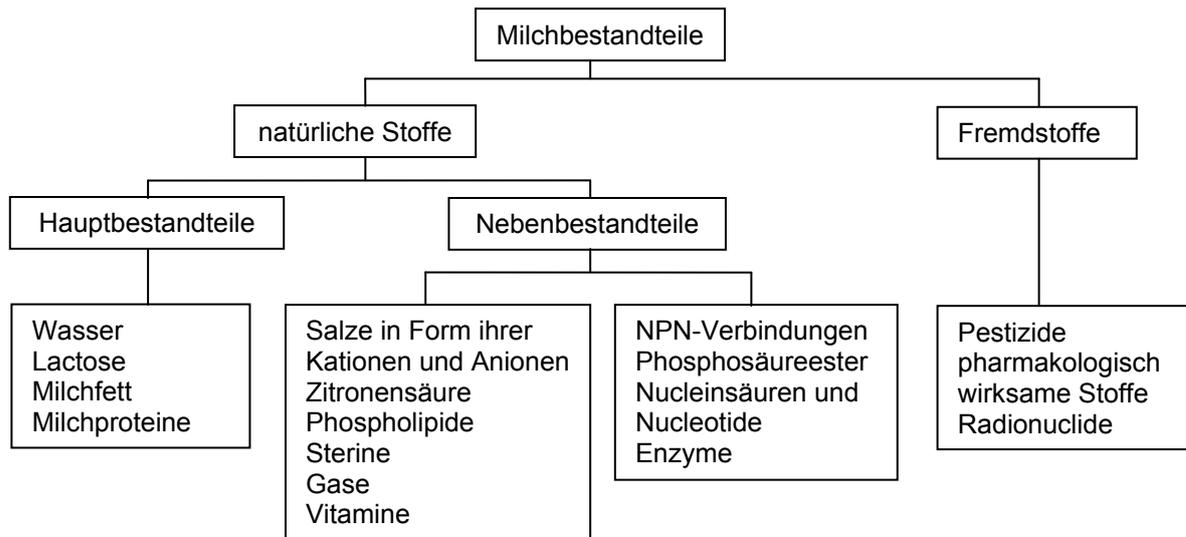


Abbildung 21: Bestandteile der Milch [117].

Die reife Kuhmilch besteht bis zu 88% aus Wasser [117], welches als Lösungsmittel dient. Lactose ist osmotisch äußerst aktiv und führt zum Eintritt von Wasser in die Vesikel, woraufhin es als Vesikelinhalt aus der Alveolarzelle austritt [116].

Milchfett ist der wichtigste Energieträger der Milch. Im Milchfett sind aber auch fettlösliche Vitamine und Carotinoide enthalten [109]. Beim Wiederkäuer besteht es zur Hälfte aus kurzen bis mittellangen Fettsäuren ( $C_4$ - $C_{16}$ ), zur anderen Hälfte aus langen Fettsäuren ( $\geq C_{18}$ ). Ca. 40% der Fettsäuren sind ungesättigt. Langkettige Fettsäuren stammen aus dem Abbau von Nahrungsfett oder körpereigenem Depotfett. Sie werden als Chylomikronen, ihrer Transportform mit dem Blut in das Milchdrüsengewebe überführt, dort in freie Fettsäuren gespalten und stehen so der Milchfettbildung zur Verfügung. Kurzkettige Fettsäuren werden dagegen vom Drüsenepithel aus Essigsäure *de novo* synthetisiert. Sie werden mit Glycerin zu Triglyceriden verestert, als Fettkügelchen zusammengefasst und so in das Alveolarlumen abgegeben [116]. Die Fettkügelchen der Milch (0,1-15  $\mu\text{m}$  Durchmesser) werden von einer doppel-schichtigen Membran umgeben. Die innere Schicht besteht aus Triacylglyceriden, die äußere aus Proteinen, vor allem Phospholipiden, Cerebrosiden, Gangliosiden und Cholesterin. Hierdurch wird einerseits das Aufrahmen der Milch vermindert und andererseits der enzymatische Abbau der Triacylglyceride durch Lipasen verzögert [109]. Beim Rind schwankt der Fettanteil der Milch zwischen 3 und 6% [117].

Milchproteine dienen dem Neugeborenen als Quelle für Aminosäuren. Die Hauptproteinfraktion bilden Caseine (82% in Kuhmilch) und Milchserumproteine (Molkeproteine). Zudem kommen sie noch in Form von Enzymen, Lactoferrin, Proteose-Peptonen und als Bestandteil der Membran von Milchfettkügelchen vor [109]. Caseine werden von Drüsenepithelzellen aus Aminosäuren des Blutplasmas synthetisiert und liegen größtenteils in Form von Micellen vor,

wo sie mit verschiedenen Ionen kolloidal verbunden sind. Die Molkeproteine  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\beta$ -Laktoglobulin, eventuell auch Laktoferrin und Transferrin, werden vom Alveolarepithel selbst aufgebaut, während Immunglobuline und Serumalbumin direkt aus dem Blutplasma stammen [116]. Der Eiweißanteil beträgt 3,2-3,6% [117].

Laktose ist das maßgebliche Kohlenhydrat in der Milch und kommt in einer Konzentration von 4,8-5,0% vor. Andere Kohlenhydrate sind nur in Spuren vorhanden [117]. Laktose wird im Drüsenepithel aus Glucose und Galaktose gebildet, wobei die Glucose aus dem Blutplasma stammt und die Galaktose in den Epithelzellen aus Glucose gewonnen wird [116].

Mineralstoffe, Salze und Vitamine entstammen dem Blut und werden über die Drüsenepithelzellen ins Alveolarlumen sezerniert [116]. Vitamin A wird aus den Futtercarotinen gebildet. Vitamin D<sub>3</sub> entsteht aus 7-Dehydrocholesterol in der Haut unter Einfluss von ultraviolettem Licht. Vitamin E kommt in der Kuhmilch vor allem als  $\alpha$ -Tocopherol vor. Das im Tierkörper *de novo* synthetisierte Vitamin C wird beim Erhitzen der Milch weitestgehend zerstört. In der Ernährung des Menschen spielt Kuhmilch zudem eine wichtige Rolle bei der Deckung des Bedarfs an Vitamin B [109].

Im Vergleich zu Blutplasma enthält Milch weniger Chlorid und Natrium. Kalium, Calcium und Magnesium sind dagegen in höheren Konzentrationen vorhanden. Da die Milch im Vergleich zum Drüsenzellinhalt einen Überschuss an positiven Ladungen enthält, muss die intrazelluläre Kaliumkonzentration über eine  $K^+/Na^+$ -ATPase und intrazelluläres Phosphor im  $Na^+-P_i$ -Cotransport an der basolateralen Membran hoch gehalten werden.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  können entlang des Konzentrationsgradienten bzw. des elektrischen Gradienten die apikale Membran über Kanäle passieren, wobei für Chlorid auch die basolaterale Membran permeabel ist.  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  und Citrat können die apikale Membran nur durch sekretorische Vesikel überwinden und werden so in die Milch sezerniert. In der Milch sind dann 68% des Calciums und 74% des Phosphats mit den Micellen assoziiert [109].

Milchzellen (somatische Zellen) entstammen entweder dem Blut oder dem Eutergewebe. In der reifen Milch eutergesunder Rinder sind zwischen 20000 und 300000 Zellen/ml vorhanden. Hierbei handelt es sich zur Hälfte um polymorphkernige Leukocyten, zur anderen Hälfte um Makrophagen, B- und T-Lymphocyten. In geringem Ausmaß sind auch Epithelzellen zu finden. Bei akuten Euterinfektionen kann der Anteil der polymorphkernigen Leukozyten bis zu 95% betragen. Die laut Milchgüteverordnung maximal zulässige Zellzahl liegt bei 400000 Zellen/ml und stellt ein wesentliches Kriterium der Milchqualität dar [109].

Auch unerwünschte Stoffe können über die Milchdrüse in die Milch gelangen. So können aus der Nahrungskette beispielsweise polychlorierte Biphenyle (PCB), DDT und dessen Metabolit DDE, chlorierte Dibenzodioxine und -furane (PCDD und PCDF), Mykotoxine, Phthalate, toxische Metalle und Radionuklide übertreten. Auch Rückstände der Verabreichung von

Antibiotika, Antiparasitika und Hormonen als Tierarzneimittel sowie Herbizide und Fungizide aus der Futtermittelproduktion können in die Milch sezerniert werden [109;118;119].

Beim Menschen wird die Ausscheidung exogener Stoffe in die Milch besonders kritisch betrachtet. Neben freiwillig aufgenommenen Stoffen, wie Arzneimitteln, Alkohol oder Drogen, werden Menschen auch unwillkürlich aufgenommene Substanzen, wie z.B. die zuvor genannten Umweltgifte und Pflanzenschutzmittel, sowie eine Vielzahl von Stoffen aus dem Tabakrauch in die Milch abgegeben [120]. Cotinin wird unter anderem als Biomarker für die Rauchbelastung des Kindes über die Muttermilch herangezogen.

### 2.3.6 Nicotin und Cotinin in der Muttermilch

*Dahlström et al.* [121] konnten in der Muttermilch von Raucherinnen das Vorkommen von Nicotin und Cotinin nachweisen. Bereits vor dem Rauchen lagen die Werte bei 5,16 µg/l für Nicotin bzw. 112 µg/l für Cotinin. Nach dem Rauchen stiegen die Werte an, sodass die Nicotinkonzentration 55 µg/l, die Cotininkonzentration 136 µg/l betrug. Der M/P-Wert des Nicotins nach dem Rauchen betrug 2,9, der des Cotinins 1,2. Es zeigten sich auch beim Passivrauchen und beim Konsum von Schnupftabak Korrelationen zwischen den Rauchgewohnheiten und der Nicotinkonzentration in der Muttermilch, wobei mit zunehmendem Abstand zur Nicotinexposition der Mutter die Konzentration in der Muttermilch abnimmt (Abb. 22) [122].

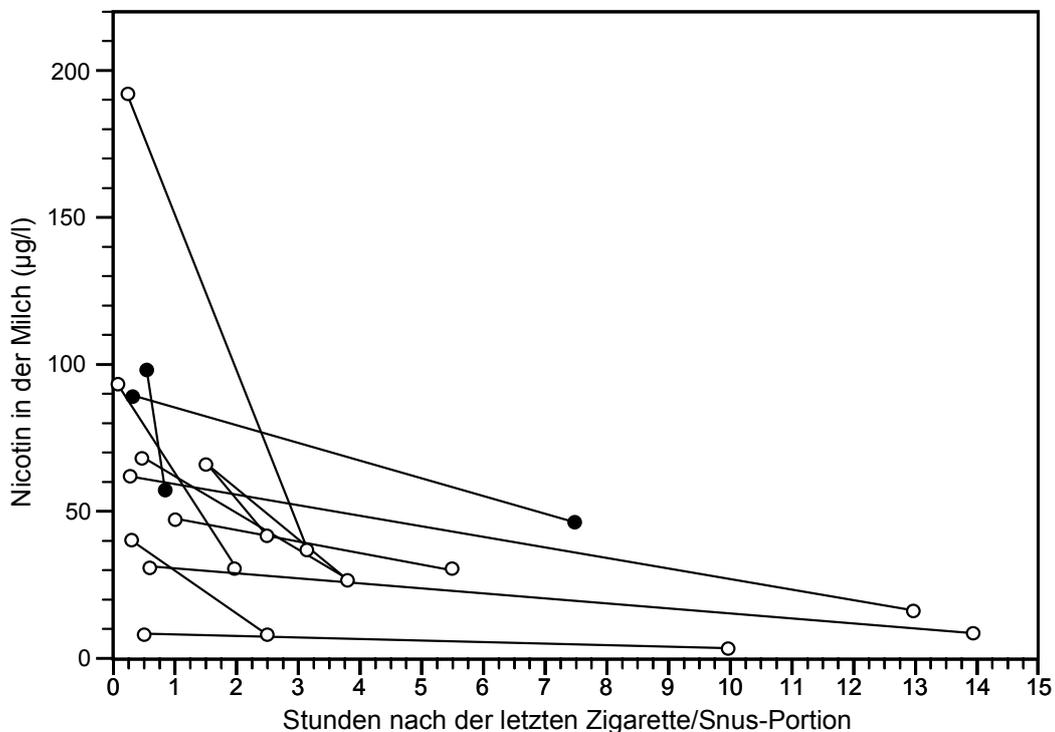


Abbildung 22: Nicotinkonzentrationen in der Milch in Abhängigkeit vom Zeitabstand zwischen dem Rauchen (o) oder Schnupfen (●) und dem Stillen (modifiziert nach *Dahlström et al.* [122]).

*Luck und Nau* [123] verglichen die Nicotin- und Cotininkonzentrationen in der Muttermilch mit dem Ausmaß der Rauchbelastung. In der Gruppe der Probandinnen, die maximal 10 Zigaretten täglich rauchten, lag die mittlere Nicotinbelastung bei  $18 \pm 16$  ng/ml, die des Cotinins bei  $76 \pm 33$  ng/ml. In der Gruppe, die über 10 Zigaretten, aber höchstens 20 Zigaretten rauchten, beliefen sich die Werte für Nicotin auf  $28 \pm 21$ , für Cotinin auf  $125 \pm 60$  ng/ml. Die mittleren Nicotin- und Cotininkonzentrationen der Mütter, die 21 bis 40 Zigaretten täglich rauchten, betrugen  $48 \pm 25$  und  $230 \pm 62$  ng/ml. Im selben Versuch zeigte sich auch, dass sich tageszeitliche Schwankungen der Nicotinkonzentrationen in der Muttermilch erkennen ließen, wobei die Werte in der Nacht abnahmen. Die Differenzen wurden aber mit zunehmender Rauchbelastung geringer. Da Cotinin wesentlich langsamer abgebaut wird, waren dessen Konzentrationen relativ konstant.

In einer weiteren Arbeit verglichen *Luck und Nau* [114] die Halbwertszeit für Nicotin in Muttermilch und Plasma, wobei diese mit  $t_{1/2} = 97 \pm 20$  min in der Muttermilch geringfügig länger als im Plasma ( $t_{1/2} = 81 \pm 9$  min) war.

*Ilett et al.* [124] verglichen die Nicotin- und Cotininkonzentrationen in der Milch rauchender Mütter mit den Konzentrationen bei Applikation von Nicotinplastern. Der mittlere Zigarettenkonsum der rauchenden Mütter betrug 17 Zigaretten/d. Dosierungen der Nicotinplaster variierten in den verschiedenen Gruppen mit 21 mg/d, 14 mg/d und 7 mg/d. Der mit HPLC gemessene Nicotin- und Cotiningehalt der Milch unterschied sich bei täglicher Anwendung von Pflastern mit 21 mg Nicotin kaum von dem der Raucherinnen. Niedriger dosierte Pflaster verursachten jedoch signifikant geringere Konzentrationen. So war die Exposition der Kinder von Müttern, die Pflaster mit 7 mg Nicotin applizierten, um 70% niedriger als bei Anwendung der Pflaster mit 21 mg Nicotin oder nach Zigarettenkonsum.

### 2.3.7 Myosmin in der Muttermilch

*Maier et al.* [7;8] zeigten den Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten und den Myosminkonzentrationen in Muttermilch und Speichel. Für den Nachweis mittels GC-MS waren mehrere Flüssig-flüssig- und Festphasenextraktionsschritte und der Einsatz eines deuterierten internen Standards nötig.

In 13 von 23 untersuchten Muttermilchproben konnten nachweisbare Mengen von Myosmin gemessen werden. Bei 10 Proben lag der Gehalt unter dem LOQ von 0,2 ng/ml.

Die Myosminkonzentrationen betrugen bei den Nichtraucherinnen ( $n = 17$ )  $0,17 \pm 0,12$  ng/ml, bei den Passivraucherinnen ( $n = 5$ )  $0,30 \pm 0,19$  ng/ml und bei der einzigen Raucherin 1,34 ng/ml. Cotinin war nur bei Passivraucherinnen und der Raucherin nachweisbar und betrug  $1,37 \pm 2,09$  ng/ml bzw. 97,1 ng/ml (Abb. 22).

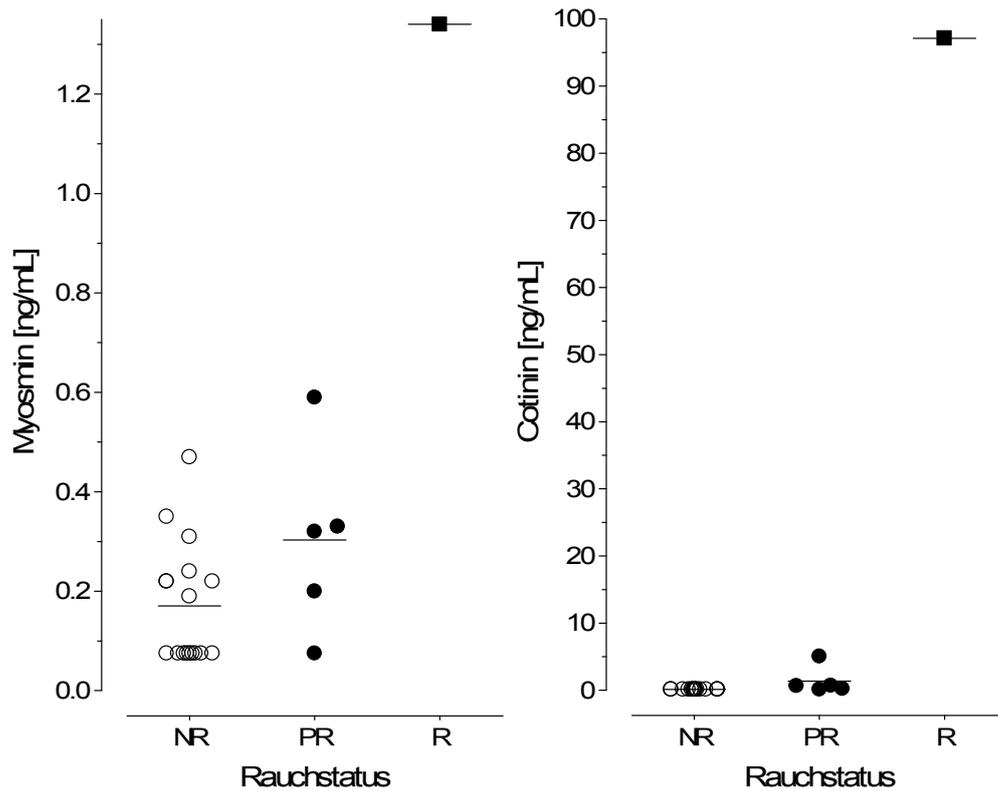


Abbildung 23: Konzentrationen von Myosmin (links) und Cotinin (rechts) in Muttermilch nach Rauchstatus (NR = Nichtraucher; PR = Passivraucher; R = Raucher) mit Angabe des Mittelwertes [7]

Maier [7] konnte auch zeigen, dass der Myosmingehalt der Muttermilch in den 11 positiven Proben der Nichtraucherinnen in Abhängigkeit vom pH Wert abnahm. Diese Abnahme erreicht aber keine Signifikanz (Abb. 23).

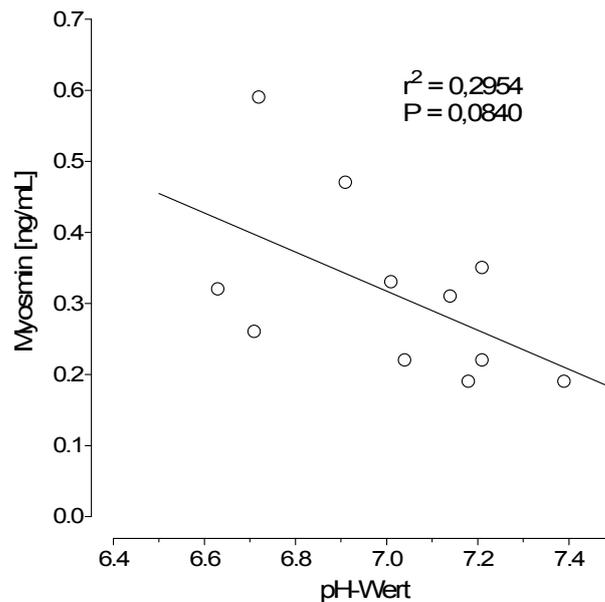


Abbildung 24: Abhängigkeit der Myosminkonzentration in der Muttermilch von Nichtraucherinnen vom pH Wert  $r^2 = 0,2954$  ( $p = 0,084$ ) [7]

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Tabakalkaloid Myosmin wurde in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln nachgewiesen. Dabei handelte es sich nicht nur um pflanzliche Lebensmittel, sondern auch um Trinkmilch und Sahne. Auch in der Muttermilch, in Plasma, Speichel und Zehennägeln wurde Myosmin selbst bei Nichtraucherinnen mit keiner nachweisbaren Passivrauchbelastung gefunden. Seither kann Myosmin nicht länger als tabakspezifisches Alkaloid betrachtet werden [4;5;8;10].

Im Gegensatz zur Muttermilch lassen sich Tabak und Tabakrauch als Quellen für das Auftreten von Myosmin in Trinkmilch mit Sicherheit ausschließen. Darum sollten in der vorliegenden Arbeit Quellen für das Vorkommen von Myosmin in der Kuhmilch untersucht werden und so Hinweise gewonnen werden, ob es sich etwa um Kontaminationen durch technologische Prozesse oder die *de novo* Synthese im tierischen Organismus handeln könnte oder ob Futtermittel als Ursprung für den Myosmingehalt in Trinkmilch und Sahne in Frage kommen.

Neben der Messung der Myosminkonzentration sollten zudem Nicotin- und Cotininmengen miterfasst werden und so mögliche Zusammenhänge zum Vorkommen der Tabakalkaloide geknüpft werden, denn in der Tabakpflanze entstammt Myosmin ausschließlich dem Nicotinabbau.

Zu diesem Zweck sollte aus Futterproben verschiedener landwirtschaftlicher Betriebe zunächst der Gehalt von Myosmin, zusätzlich aber auch die Konzentrationen von Nicotin und Cotinin, bestimmt werden.

Anschließend sollte der Weg der Nahrung durch die Aufarbeitung und Messung von Pansen-saftproben laktierender Milchkühe weiter verfolgt werden.

Die Analyse von Plasma- und Urinproben von Milchkühen folgten im nächsten Schritt.

Durch Hornanalysen von Rinderklauen sollte auch die Langzeitexposition von Myosmin erfasst werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

##### 3.1.1 GC/MS-Geräte und Zubehör

Spritze	Microliter Syringes 701N, 10 µm (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)
Injektor	Split/Splitless-Injektor (splitless), Temperatur 220 °C
GC	Fisons Serie 8060 (Fisons Instruments, Manchester, UK)
Trennsäule	DB-5ms, (5% Phenyl)-methylpolysiloxanphase, 30 m, ID 0,25 mm, Film 0,25 µm, Polaritätsindex 8 (J&W Inc. Scientific, Folsom, USA)
Trärgas	Helium 5.0, Säulenknopfdruck 80 kPa (Linde AG, Werksgruppe technische Gase, Höllriegelskreuth)
Kopplung	Transferlinie 220 °C
MS	TRIO 1000 Benchtop GC/MS (Fisons Instruments)
Quellenmodus	EI <sup>+</sup> , Temperatur 200 °C, Wolframfilament, Elektronenenergie 70 eV
Software	MassLab <sup>®</sup> Version 1.4 (Finnigan, Manchester, UK)
Vakuumpumpe	Edwards High Vakuum Pump E2M2 Two Stage (Crawley, Sussex, UK)
Kühler	Kühlmobil (Van der Heijden Labortechnik GmbH, Dörentrup)

##### 3.1.2 Sonstige Geräte und Zubehör

Reagenzschüttler	Vortex-Genie <sup>®</sup> 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA)
Präzisionswaage	XS 205 DualRange Analytical Balance (Mettler Toledo International Inc., USA)
Stickstoff–Abblasvorrichtung	Feinmechanikwerkstatt des Walther Straub-Instituts
festinstallierte Vakuumpumpe	VNC 1 (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim)
Anlage für Reinstwasser	Millipak <sup>®</sup> Express (Millipore GmbH, Schwalbach)
Zentrifugen	Hettich Zentrifugen Universal 16 R und Micro 22 R (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
Trockenschrank	Heraeus Function Line, mit Temperaturregler Kelvitron <sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr Premium (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss)
Zeitmesser	Model No. TR118 (Oregon Scientific GmbH, Neu Isenburg)
Mörser	Mörser 182/730 mit Stößel 181/90, (Rosenthal Technik AG, Selb)
Saugflasche	

Filternutsche mit passenden Gummikoni	Duran <sup>®</sup> 500 ml (Schott Jenaer-Glas GmbH, Mainz)
Filterpapier	Morgan Technical Ceramics W. Haldenwanger (Technische Keramik GmbH & Co. KG, Waldkraiburg)
	S&S Rundfilter, zugeschnitten aus Ø 150 mm (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel)

## 3.2 Material

### 3.2.1 Einweggefäße und Zubehör

Schraubgefäße	Falcon <sup>®</sup> 50 ml konisches Röhrchen, Polystyrol (Becton Dickinson Labware, USA)
	15 ml Röhrchen mit Schraubverschluss, natur (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht)
Monovetten	EDTA Monovetten mit Kanülen (Sarstedt)
Eppendorf- Cups	Eppendorf <sup>®</sup> Reaktionsgefäße mit Deckel und Graduierung 2 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Wheaton-Gläser	Volumen 1,5 ml und 4,0 ml mit Schraubdeckel und Teflondichtung (Chromatographie Handel Müller)
Einsätze für Wheaton-Gläser	Minivials 100 µl (Chromatographie Handel Müller)
Einmalkanülen	Einmal-Injektions-Kanüle 100 Sterican <sup>®</sup> ; Ø 0,9x40 mm, 20Gx1½" (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Messkolben	Glas, 100 ml, 250 ml, 500 ml (Brand GmbH & Co KG, Wertheim)
Einmalhandschuhe	Vasco <sup>®</sup> Sensitive (B. Braun Melsungen AG)

### 3.2.2 Pipetten und Zubehör

Glaspipetten	Pasteurpipetten 150 mm (VWR International GmbH, Darmstadt)
Einmalpipetten	Falcon <sup>®</sup> 10 ml und 5 ml serologische Pipette mit Stöpsel, aus Polystyrol, steril (Becton Dickinson Labware)
Laborpipetten	Pipetman 200, 1000 und 5000 µl (Gilson Inc., Middleton, USA)
	Microman: 10, 25, 100, 250 und 1000 µl (Gilson Inc.)
Pipettenspitzen	Für o.g. Pipetten (Gilson Inc.)

### 3.2.3 Festphasenextraktion

Solid Phase Extraction (SPE)-Säulen	Strata <sup>™</sup> X-C 33 µ, Cation Mixed-Mode Polymeric Sorbent 60 mg/3 ml (Phenomenex <sup>®</sup> Inc., Aschaffenburg)
SPE-Hähne	Luer Stopcocks (Varian Inc., Santa Clara, USA)
SPE-Vakuumkammer	VAC-ELUT <sup>™</sup> (Agilent Technologies, Waldbronn)
Festinstallierte Vakuumpumpe	VNC1 (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim)

### Strata-X-C-Säulen

Strata-X-C-Säulen besitzen durch die Sulfonsäure- und Styrodivinylbenzolgruppen in ihrem Mischphasenpolymer (Abb. 25) sowohl Eigenschaften eines starken Kationenaustauschers als auch die einer Reversed Phase, wodurch basische Substanzen gut gebunden werden können.

Die Festphase der Säule muss konditioniert werden, um eine gute Wiederfindung der spezifisch gebunden Analyten aus beliebigen Matrices trotz der vielen Reinigungsschritte zu gewährleisten.

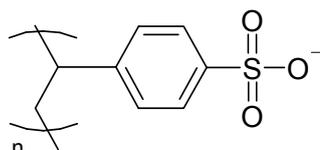


Abbildung 25: Struktur der Strata-X-C-Säulen

## 3.3 Chemikalien

Ammoniak-Lösung	25%, reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
D <sub>3</sub> -Cotinin	Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada
D <sub>4</sub> -Myosmin	Toronto Research Chemicals
D <sub>3</sub> -Nicotin	Toronto Research Chemicals
Dichlormethan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Supra Solv <sup>®</sup> für GC (Merck)
Eisessig	100% wasserfrei (Merck)
n-Hexan	Supra Solv <sup>®</sup> für GC (Merck)
Methanol	Supra Solv <sup>®</sup> für GC (Merck)
Natriumhydroxid Micropills	NaOH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma Aldrich)
Reinstwasser	H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> aus hauseigener Milliporanlage
Salzsäure	rauchend 37%, HCl <sub>conc</sub> (Merck)

### 3.3.1 Herstellung der Reagenzien

- **0,1 mol/l Essigsäure:**  
0,556 ml Eisessig ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auffüllen
- **1 mol/l HCl:**  
8,33 ml HCl<sub>conc</sub> (37%) ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auffüllen
- **1 mol/l NaOH:**  
4,0 g Natriumhydroxid in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> lösen

- **4 mol/l NaOH:**  
16,0 g Natriumhydroxid in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> lösen
- **4 mol/l Salzsäure**  
3,33 ml 37%ige Salzsäure ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auffüllen
- **5%ige NH<sub>3</sub>-Lösung in 70%igem Methanol (Elutionslösung):**  
18 ml 25%ige NH<sub>3</sub>-Lösung mit 50,4 ml Methanol und 21,6 ml H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> mischen
- **Interner Standard:**  
D<sub>4</sub>-Myosmin-Lösung: c = 10 ng/μl  
D<sub>3</sub>-Nicotin-Lösung: c = 50 ng/μl  
D<sub>3</sub>-Cotinin-Lösung: c = 11,5 ng/μl

50 μl der D<sub>4</sub>-Myosmin-Lösung, 10 μl der D<sub>3</sub>-Nicotin-Lösung und 150 μl der D<sub>3</sub>-Cotinin-Lösung werden mit 790 μl Dichlormethan gemischt, sodass eine Lösung mit folgenden Konzentrationen der internen Standards entsteht:

D <sub>4</sub> -Myosmin-Lösung:	c = 0,5 ng/μl
D <sub>3</sub> -Nicotin-Lösung:	c = 0,5 ng/μl
D <sub>3</sub> -Cotinin-Lösung:	c = 1,725 ng/μl

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Futter- und Pansensaftanalysen

#### 3.4.1.1 Probengewinnung

Die Futterproben stammten von Bauernhöfen aus den Regionen Schwaben und Oberbayern. Sie wurden von Hand entnommen und in Frischebeutel verbracht. Alle Proben wurden innerhalb eines Tages eingefroren, bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt und erst unmittelbar vor der weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur aufgetaut.

#### Maissilage

Die Maissilage wurde zuerst mit einer Schere auf eine Größe von circa 1x3 mm zerkleinert und anschließend gemörsert. Pro 50 ml Flasche wurden 7,0 g der Probe mit 30 ml 0,1 mol/l Essigsäure gemischt und über Nacht im Wärmeschrank bei 52 °C verdaut. Am nächsten Morgen wurden die Flaschen bei 4 °C und 4000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände vorsichtig in eine Filtervorrichtung mit Saugflasche und Vakuum abgegossen. Je 32 ml des erhaltenen Filtrats wurden in 50 ml Schraubgefäße überführt.

#### Grassilage

Es wurden Grassilageproben von zwei Höfen analysiert. Dabei wurden die Grashalme der Silage in etwa 1x5 mm große Stücke geschnitten und davon 30 g in eine 250 ml Glasflasche eingewogen. Dann versetzte man in einem Ansatz die Grassilage mit 190 ml, im zweiten An-

satz mit 150 ml 0,1 mol/l Essigsäure, sodass die Grassilage vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Im Wärmeschrank wurden die Proben bei 52 °C über Nacht verdaut und am darauf folgenden Morgen mit Vakuum über eine Saugflasche filtriert. Je 40 ml des Filtrats wurden in drei 50 ml Schraubgefäße überführt.

#### Heu

Das Heu wurde mit einer Schere auf eine Halmlänge von ca. 3 mm gekürzt und davon 30 g in einer Glasflasche mit 235 ml 0,1 mol/l Essigsäure versetzt. Nach dem Verdau im Brutschrank bei 52 °C über Nacht wurde durch Vakuumfiltration über eine Saugflasche die Probenflüssigkeit gewonnen. Davon wurden jeweils 37 ml in 50 ml Schraubflaschen verbracht.

#### Grascobs

30 g Grascobs wurden in einer 200 ml Glasflasche mit 240 ml 0,1 mol/l Essigsäure versetzt und mit einem Spatel verrührt, sodass sich die Cobs auflösten. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 52 °C im Wärmeschrank. Am nächsten Morgen wurde über eine Saugflasche mit Vakuum filtriert. Je 40 ml des Filtrats wurde in 50 ml Schraubgefäße überführt.

#### Rübenschnitzel

In einem Schraubgefäß wurden 30 g Zuckerrübenschnitzel in 250 ml 0,1 mol/l Essigsäure aufgeweicht und über Nacht im Brutschrank bei 52 °C aufbewahrt. Anschließend wurde die Flüssigkeit in eine Filtervorrichtung mit Vakuum abgegossen. Die Zuckerschnitzel wurden auf dem Keramikfilter zusätzlich mit einem Stößel ausgepresst und die austretende Flüssigkeit durch das angeschlossene Vakuum abgesaugt. Von der erhaltenen Flüssigkeit wurden Probenportionen zu je 40 ml in 50 ml Schraubgefäße abgefüllt.

#### Maisschrot

Zu 45 g Maisschrot wurden in einer Schraubflasche 300 ml 0,1 mol/l Essigsäure gegeben. Nach dem Verdau über Nacht bei 52 °C wurden die Proben zwei Mal unter Vakuum in eine Saugflasche filtriert und jeweils 40 ml des Filtrats in eine 50 ml Schraubflasche überführt.

#### Sojaschrot

30 g Sojaschrot wurden in eine Schraubflasche eingewogen und mit 100 ml 0,1 mol/l Essigsäure versetzt. Über Nacht verdaute die Probe bei 52 °C im Wärmeschrank. Am darauf folgenden Morgen wurden die ungelösten Bestandteile des Sojaschrots in eine Saugflasche, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde in Proben von je 13 ml aufgeteilt.

#### Wintergerstenschrot

Es wurden 30 g des Wintergerstenschrots in einem Schraubgefäß mit 130 ml 0,1 molarer Essigsäure gemischt und über Nacht im Wärmeschrank bei 52 °C verdaut. Am nächsten

Morgen wurde die Probe mit Hilfe einer Saugflasche unter Vakuum filtriert und je 40 ml der Flüssigkeit in Schraubflaschen verbracht.

Die Pansensaftproben wurden von der Klinik für Wiederkäuer der LMU bereitgestellt. Nach dem Auftauen wurden je 20 ml Pansensaft mit 25 ml 0,1 mol/l Essigsäure versetzt und über Nacht bei 52 °C im Wärmeschrank verdaut. Anschließend wurden sie bei 4 °C und 4000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in eine Filtervorrichtung mit Saugflasche und Vakuum abgossen. 20 ml des Filtrats wurden in 50 ml Schraubgefäße überführt.

Alle erhaltenen Proben wurden, sofern sie nicht unmittelbar untersucht wurden, bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

### 3.4.1.2 Festphasenextraktion

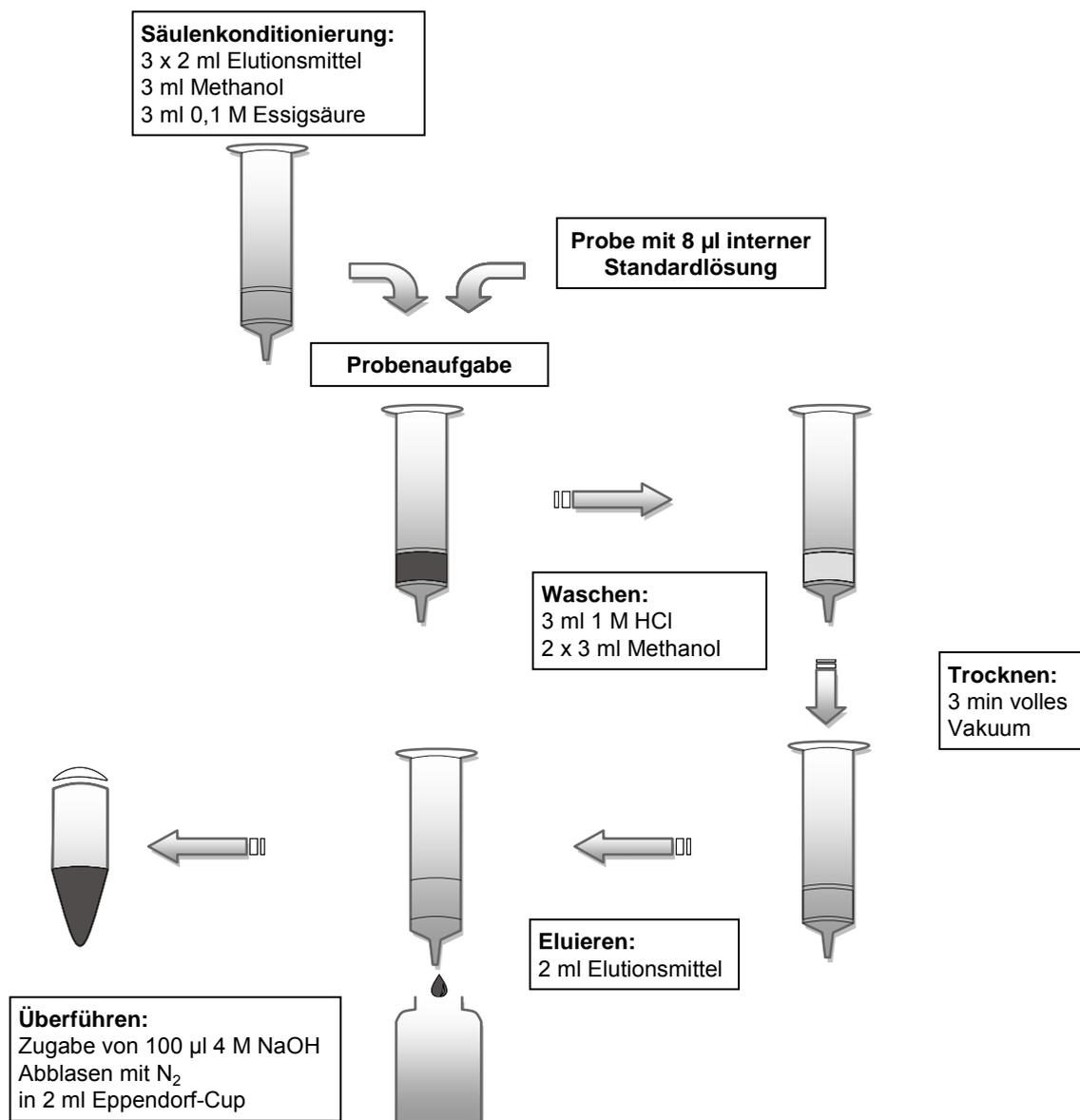


Abbildung 26: Festphasenextraktion

### Probenvorbereitung

Alle Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und zur eindeutigen Identifizierung mit einer laborinternen Nummer versehen. Es wurden jeweils 8 µl der internen Standardlösung zugegeben und anschließend eventuell vorhandenes denaturiertes Protein bei 4000 rpm und 4 °C 10 Minuten abzentrifugiert.

### Säulenkonditionierung

Die Strata XC Säulen wurden über Hähne mit Luer-Aufsatz auf einer Vakuumkammer angebracht, die wiederum über eine Wulff'sche Flasche mit einer Vakuumpumpe verbunden war.

Daraufhin konnten die Säulen für die folgende Festphasenextraktion konditioniert werden. Hierfür wurden zuerst dreimal 2 ml einer frisch hergestellten 5%igen NH<sub>3</sub>-Lösung in Methanol, die als Elutionslösung dienen sollte, und anschließend 3 ml Methanol auf die Säulen aufgetragen. Die Flussrate während der Konditionierung betrug 1-2 ml/min.

Nach dem equilibrieren mit 3 ml einer 0,1 M Essigsäure bei einer Flussrate von 1-1,5 ml/min konnten die Proben aufgegeben werden.

### Probenaufgabe

Mit Hilfe von Pasteurpipetten wurden die vorbereiteten Proben nun auf die Säulen aufgetragen. Die Flussrate war abhängig von der jeweiligen Probenmenge und Probenart, wobei die Kontaktzeit zwischen Probe und Säule nie unter 15 min betrug. Sowohl bei der Säulenkonditionierung und -equilibrierung als auch beim Aufgeben der Probe war ein Austrocknen der Säulen unbedingt zu vermeiden.

### Reinigung

Im darauf folgenden Schritt wurden 3 ml 1 N HCl in die leeren Probengefäße gegeben und anschließend auf die Säulen aufgetragen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 3 ml Methanol bei einer Flussrate von 0,5-2 ml/min wurden die Säulen drei Minuten unter vollem Vakuum (circa 120 mbar) getrocknet.

### Elution

Die getrockneten Säulen wurden anschließend mit den Hähnen von der Vakuumkammer entfernt und an einer Elutionsvorrichtung angebracht. Kanülen wurden auf die zweite Seite der Hähne gesteckt und führten in das Lumen von 4 ml Wheatongläschen, in welche 100 µl einer 4 N Natronlauge vorgelegt waren. Nun konnten 2 ml der Elutionsflüssigkeit auf die Säulen aufgetragen werden. Die nach dem Durchlaufen in der Säule verbliebene Elutionsflüssigkeit wurde mithilfe von Pressluft in die entsprechenden Gläschen gedrückt.

### 3.4.1.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

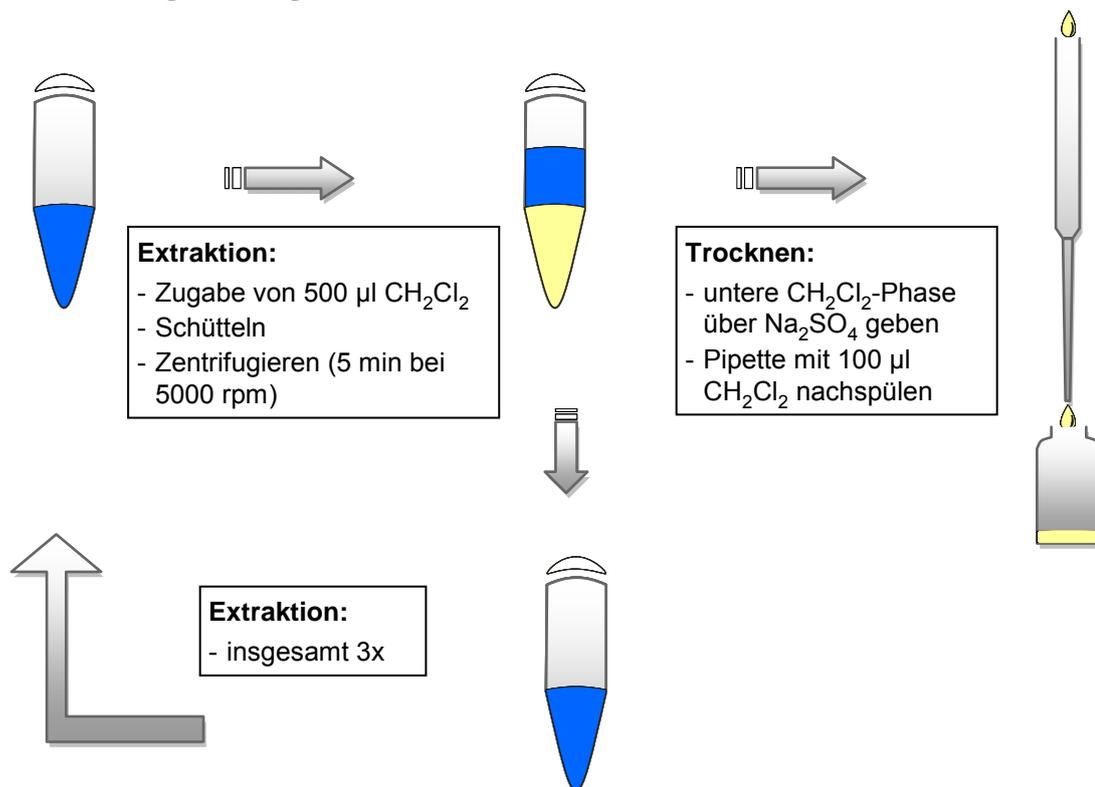


Abbildung 27: Flüssig-Flüssig-Extraktion

In der Ablasevorrichtung wurden Methanol und Ammoniak mit Stickstoff abgeblasen und die erhaltene wässrige Phase vollständig in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt.

Die nun leeren Wheaton-Gläschen wurden mit 500 µl Dichlormethan gespült und der Inhalt nach 30 Sekunden langem Vortexen ebenso in die Eppendorf-Cups verbracht. Daraufhin wurden die beiden zusammengeführten Phasen zuerst 2 Minuten lang manuell geschüttelt und anschließend bei 5000 rpm und 4 °C fünf Minuten lang zentrifugiert.

Eine Pasteurpipette wurde mit Watte gestopft, mit ca. 500 mg getrocknetem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gefüllt und mit 500 µl Dichlormethan gespült. Die unteren Phasen der zentrifugierten Proben wurden jeweils mit einer 250 µl Direktverdrängerpipette über die Pasteurpipetten gegeben und in neuen 1,5 ml Wheatongläschen aufgefangen.

Nach zweimaligem Wiederholen dieses Vorgangs wurde zur vollständigen Überführung des Lösungsmittels in das Glas die Pasteur-Pipette mit 100 µl Dichlormethan gespült und das restliche Dichlormethan mit Pressluft in das Glas gedrückt.

### 3.4.1.4 Überführung in Hexan

Die getrocknete organische Phase wurde mit Stickstoff in der Ablasevorrichtung auf etwa 100 µl eingengt und anschließend mit 1 ml n-Hexan aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe erneut mit Stickstoff eingengt, mit dem Ziel, ein Restvolumen von exakt 20 µl

zu erhalten. Dabei war ein Austrocknen der Probe unbedingt zu vermeiden, da es hierdurch zu erheblichen Verlusten der Analyten kommen kann.

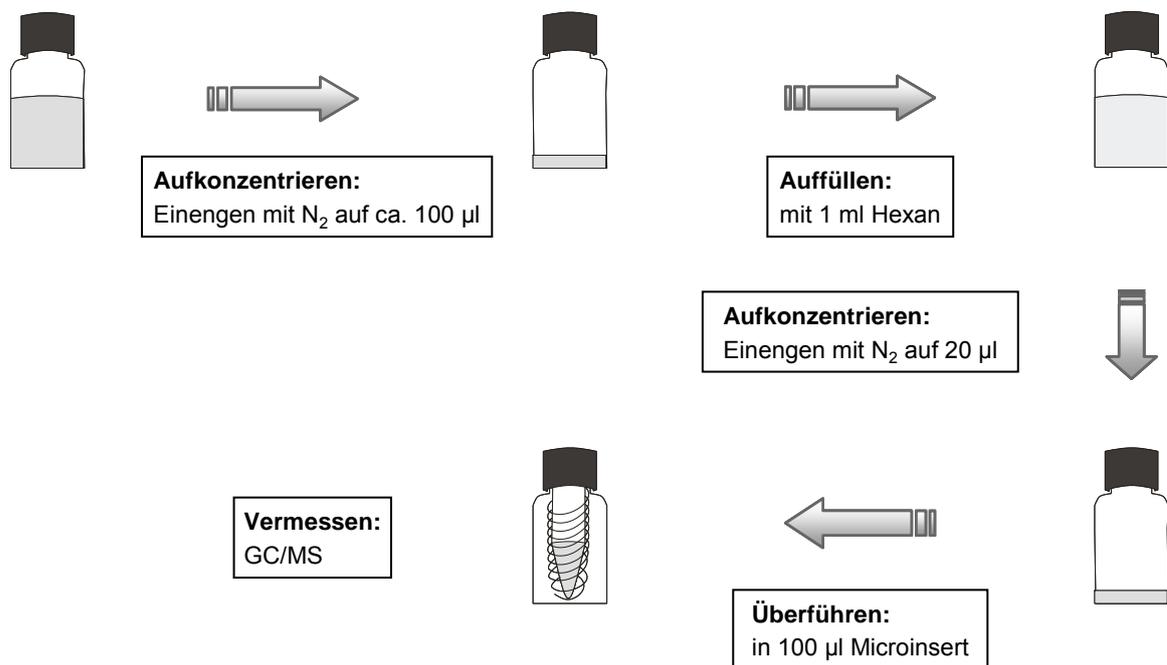


Abbildung 28: Überführung der Proben in Hexan

Das Volumen wurde mit Hilfe einer Pipette kontrolliert, gegebenenfalls durch weiteres Abblasen mit Stickstoff oder Auffüllen mit Hexan genau auf 20 µl eingestellt und letztlich in ein 100 µl Microinsert überführt.

### 3.4.2 Plasma- und Urinalysen

#### 3.4.2.1 Probengewinnung

##### Plasma

Im schwäbischen Landkreis Günzburg wurden jeweils drei laktierende Milchkühe von drei verschiedenen Bauernhöfen beprobt. Hierzu wurden aus der Vena coccygea media 10 ml Blut mit Hilfe von EDTA Monovetten entnommen. Die Blutproben wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen bei 4 °C und 4000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand in 15 ml Röhren mit Schraubverschluss überführt und mit einer Nummer codiert, die Hof, Proband und Probenart umfasste. Proben, die nicht direkt im Anschluss analysiert wurden, lagerten im Gefrierschrank bei -20 °C.

Zudem wurden in Zusammenarbeit mit dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub 12 Blutproben von Schafen aus der Vena jugularis externa gewonnen und im dortigen Labor zentrifugiert, das überstehende Plasma abpipettiert und eingefroren.

### Urin

An zwei Höfen konnte von insgesamt 3 Probanden Spontanurin gewonnen werden. Dieser wurde direkt in 50 ml Schraubgefäßen aufgefangen, mit dem internen Code versehen und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der nicht sofort untersuchte Anteil wurde bei -20 °C eingefroren.

### **3.4.2.2 Extraktion**

#### Probenvorbereitung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden je 2 ml der Plasmaproben in neue 15 ml Röhrchen überführt, mit 8 µl des internen Standards versetzt und mit 4 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt. Darauf wurde durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm und 4 °C eventuell denaturiertes Protein abgetrennt.

Die nachfolgenden Schritte der **Festphasenextraktion** (Säulenconditionierung, Probenaufgabe, Reinigung und Elution), die **Flüssig-Flüssig-Extraktion** und die **Überführung in Hexan** erfolgten wie in den Kap. 3.4.1.2-4 beschrieben, wobei die Flussraten bei der Probenaufgabe relativ konstant 0,5-0,7 ml/min betrug.

### **3.4.3 Hornanalysen**

#### **3.4.3.1 Probengewinnung und Vorbereitung**

##### Probengewinnung

Die Hornproben stammten von Rinderklauen aus der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim. Diese waren tiefgekühlt und wurden zur Probenentnahme aufgetaut.

Die circa 1 cm<sup>2</sup> großen und 2 mm dicken Hornstücke wurden in 15 ml Röhrchen verbracht, verschlossen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

##### Probenvorbereitung

Die Teilproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und von jeder Probe 25 bis 35 mg in ein Eppendorf-Tube eingewogen. Für die spätere Mengenbestimmung wurde die genaue Einwaage notiert.

Durch Zugabe von 2 ml Dichlormethan wurden die Proben gewaschen. Nach 90 bis 120 min pipettierte man das Dichlormethan ab, trocknete die Probe anschließend mit Hilfe von Stickstoff und vervollständigte die Trocknung durch zehnmütiges Verweilen der Proben im Brutschrank bei 50 °C.

##### Verdauung

Die gewaschenen und getrockneten Proben wurden mit 0,5 ml einer 1 M NaOH-Lösung vollständig bedeckt. Die Eppendorf-Tubes wurden verschlossen und im Trockenschrank bei

80 °C über Nacht inkubiert. Um den Verschluss der Cups sicherzustellen, wurden diese doppelt mit Tesafilm verklebt.

### **3.4.3.2 Flüssig-flüssig-Extraktion und Überführung in Hexan**

Die Proben wurden aus dem Trockenschrank genommen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

In der Zwischenzeit wurden mit Watte gestopfte und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> befüllte Pasteurpipetten mit 500 µl Dichlormethan gespült und anschließend jeweils in ein Wheaton-Glas eingesetzt.

Die Proben wurden mit je 8 µl der Standardlösung versetzt, gevortext und mit 500 µl Dichlormethan aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben zwei Minuten lang manuell ausgeschüttelt und für fünf Minuten bei 4 °C mit 5000 rpm zentrifugiert.

Das weitere Vorgehen erfolgte exakt wie in den Kap. 3.4.1.3-4 beschrieben.

## **3.5 GC/MS-Analyse**

Bei der Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie werden Substanzen zuerst mithilfe einer gasförmigen mobilen Phase und einer flüssigen oder festen stationären Phase aufgetrennt. Im Spektrometer zerfallen dann die Moleküle in einzelne Fragmente, die anschließend detektiert werden können. Diese Fragmentmuster sind so spezifisch für jede einzelne Substanz, dass sie zu deren Identifikation dienen können.

Die GC/MS ist somit eine Methode, die eine Strukturidentifizierung und quantitative Analyse von sehr komplexen Stoffgemischen erlaubt.

### **3.5.1 Prinzip der GC**

Über verschiedene Injektionsverfahren wird im Injektor die flüssige Probe in den gasförmigen Zustand überführt und mit dem Trägergas (mobile Phase) auf die Säule transportiert.

Das klassische Injektionsverfahren ist die heiße Probenaufgabe. Lösemittel und Probe werden in auf 200 bis 300°C beheizte Injektoren dosiert, verdampfen hier und mischen sich mit dem eingespeisten Trägergas. Je nach teilweisem oder vollständigem Transfer der Lösemittel-/Probeanteile in das Trennsystem lässt sich die Splitinjektion von der splittlosen Injektion oder Totalaufgabe unterscheiden. Bei der Splitinjektion verlässt der größere variable Teil den Injektor durch ein Splitventil. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Totalaufgabetechnik die Dosierung in den heißen Injektor bei geschlossenem Ventil.

Wird die Probe in flüssiger Form auf den Kapillarsäuleneingang (On-Column-Injektion) oder alternativ in einen speziell konstruierten Verdampfer injiziert, spricht man von einem kalten Injektionsverfahren. Hier erfolgt das Hochheizen des Injektors erst nachdem die Spritzen-

nadel nicht mehr in der Injektionszone liegt und die Probe wird verdampft. Dafür stehen temperaturprogrammierte Systeme (PTV, programmed temperature vaporizer) zur Verfügung.

Die Trennung der Substanzen erfolgt im Gasstrom während der Passage durch Säulen, die sich in einem programmierbar beheizten Ofen befinden und in denen die Substanzen je nach ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften unterschiedlich mit dem Füllmaterial interagieren und damit zu verschiedenen Retentionszeiten die Säulen verlassen. Als Trennsäulen lassen sich gepackte Säulen und Kapillarsäulen unterscheiden, wobei bei letzteren im Gegensatz zu gepackten Säulen die Trennphase nur als Wandbeschichtung vorliegt und somit wegen des geringeren Widerstands größere Säulenlängen von 15 bis 150 m möglich sind. Gepackte Säulen sind dagegen nur 0,5 bis 4 m lang. Als Trennphasen dienen meist hochsiedende Harze/Öle mit unterschiedlicher Polarität.

Zum Nachweis der Substanzen nach der Elution von der Säule werden verschiedene Detektoren wie Flammenionisationsdetektoren, Elektroneneinfangdetektoren oder Wärmeleitfähigkeitsdetektoren verwendet. Bei der GC/MS-Kopplung kommt der Massenspektrometrie die Aufgabe des Substanznachweises zu.

### 3.5.2 GC Bedingungen

Zur Trennung der verschiedenen Substanzen wurden aus dem Microinsert 1 µl der auf 20 µl eingeeengten Hexanlösung in den Gaschromatographen im Splitless Verfahren eingespritzt. Dabei lag die Injektortemperatur bei 220 °C.

Als Trägergas wurde Helium mit einem Säulenknopfdruck von 80 kPa eingesetzt und als Trennsäule eine polare Kapillarsäule verwendet.

Die Temperatur der Transferline (Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer) wurde auf 220 °C festgelegt.

Tabelle 7: Temperaturprogramm für den Säulenofen

Zeit bzw. Rate	Temperatur
1 min	50 °C halten
mit 15 °C/min	auf 170 °C
mit 7,5 °C/min	auf 210 °C
mit 15 °C/min	auf 300 °C
5 min	300 °C halten

### 3.5.3 Prinzip der MS

Über den Probeneinlass wird die Probe in das Spektrometer gebracht, wobei der Druckunterschied zwischen Atmosphärendruck und Hochvakuum überwunden und das Vakuum in der Ionenquelle aufrechterhalten werden muss, da die Fragmente nicht durch Luft- oder Gas-moleküle gebremst werden dürfen. Zudem muss die Überführung der Proben verlustfrei von-statten gehen.

Das Hochvakuumsystem besteht aus der Kombination einer Vorvakuumpumpe, die ein Vakuum von weniger als 1 mbar erzeugt, mit einem Hochvakuumpumpsystem, wofür haupt-sächlich Diffusions- und Turbomolekularpumpen verwendet werden. Nur so kann gewähr-leistet werden, dass Kollisionen von Ionen miteinander oder mit ungeladenen Molekülen von der Ionisationsquelle bis zum Elektronenvervielfacher nicht vorkommen.

Der Eintrag kann bei gasförmigen Proben mithilfe einer Spritze durch ein Silikonseptum erfol-gen; feste Proben werden über eine Schleuse in die Probenkammer gebracht, dort an-schließend erhitzt und verdampft.

Bei der Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) ist der Gaschromatograph nur das Trennsystem, während die GC/MS-Kopplung, auch „GC/MS-Interface“ oder „Transferline“ genannt, das eigentliche Einlasssystem darstellt.

Diese Kopplung kann über einen direkten Anschluss der Trennkapillare an die Ionenquelle, über eine offene Kopplung mit einer Restriktionskapillare zwischen Ionenquelle und Ausgang der Trennkapillare (Heliumspülung) oder durch Separatortechniken, wie dem klassischen Jet-Separator, erfolgen. Letztere werden zwischen Trennsäule und MS geschaltet um die Trägergas-Last selektiv zu verringern und sind mit Ausnahme von GC-Methoden, die auch heute noch auf gepackten Säulen mit Flussraten um 10 mL/min beruhen, kaum mehr in Ver-wendung.

In der Ionenquelle findet die Molekülionisierung statt. Die gebildeten Ionen werden zeitgleich beschleunigt und zu einem Ionenstrahl fokussiert. Die Art der Ionisierung bestimmt die Art der Fragmentierung und somit das Bild des Massenspektrums. Bei der Elektronenstoss-Ioni-sation („electron impact“, EI) werden Moleküle mit Elektronen beschossen, wodurch aus den getroffenen Molekülen wiederum ein Elektron herausgeschlagen wird und somit instabile positiv geladene Moleküle entstehen, die schnell in positiv geladene Fragmente zerfallen. Die chemische Ionisierung erfolgt durch ein zweites Reaktandgas in der Ionisierungskam-mer. Die Elektronen des primären Elektronenstrahls treffen dann vor allem auf diese Gas-moleküle, es entstehen verschiedene Ionen und Radikale, die mit den Probenmolekülen re-agieren und diese ionisieren. Feste Stoffe lassen sich auch mit Laserstrahlen („laser-desorp-

tion“, LD) oder mit einem Strahl beschleunigter Atome (fast atom bombardment, FAB) ionisieren.

Die positiv geladenen Teilchen werden nun im elektrischen Feld auf die negativ geladene Platte eines Kondensators beschleunigt. Alle Teilchen erhalten somit die gleiche Energiezufuhr. Die Geschwindigkeit ihrer Fortbewegung hängt dann von ihrem Gewicht ab.

Die magnetische Fokussierung nutzt die Ablenkung der Teilchen in einem starken Magnetfeld. Eine zusätzliche elektrische Fokussierung, zum Beispiel bei Sektorfeld-Massenspektrometern, trennt die Ionen durch eine Ablenkung im elektrischen Feld, sodass eine ungenaue Beschleunigung ausgeglichen wird. Diese Kombination findet man bei hochauflösenden Massenspektrometern.

Neben dem magnetischen Feld kann auch ein Quadrupol-Feld zwischen vier parallelen Metallstäben zur Trennung genutzt werden. Eine geringe Gleichspannung von wenigen Volt zieht die Elektronen aus der Ionisationsquelle in den Quadrupol. Zusätzlich werden die Stäbe mit einem Gleichspannungsanteil („DC, direct current“) und einem Wechselspannungsanteil („AC, alternating current“) von einigen tausend Volt versorgt. Die so entstandenen elektrischen Wechselfelder versetzen die Ionen in eine komplizierte Schwingungsbewegung, die sich mit der Flugrichtung durch den Quadrupol überlagert. Nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis können bei einem gegebenen DC/AC-Spannungsverhältnis passieren. Durch kontinuierliche Variation dieser Gleichspannung kann man Ionen verschiedener Masse nacheinander im empfindlichen Detektor hinter dem Quadrupol registrierenden.

Neben den Quadrupol-Massenspektrometern werden noch Ionenfallen, Flugzeitmassenspektrometer und die Fourier Transform Massenspektrometrie basierend auf der Ionen-Cyclotron-Resonanz (ICR) verwendet.

Beim Auftreffen eines Ions auf einen Draht fließt nur ein kleiner Strom, weshalb empfindliche Detektoren und Verstärker nötig sind, um diese Signale im Computer in das Massenspektrum umzusetzen. Es werden Sekundärelektronenvervielfacher, Continuous Electron Multiplier (CEM oder Channeltron) und Photomultiplier verwendet. Allen gemeinsam ist ein Kaskadenprinzip, durch das eine Verstärkung um den Faktor  $10^5$  bis  $10^7$  erzielt werden kann: Geladene Teilchen treffen auf die erste Dynode beziehungsweise auf den Anfang des Channeltron. Auf der Dynode werden dadurch wieder etwa zwei Elektronen gelöst, die dann auf eine zweite Dynode treffen und dort ebenso durchschnittlich zwei Elektronen lösen. Eine Verstärkung ist aber nur in einem Ausmaß sinnvoll, in dem die durch den Verstärker erzeugten thermischen Elektronen und somit das Detektorrauschen geringer sind als das verstärkte Ionenstromsignal.

Es ist nicht möglich, negativ geladene Ionen von einem SEV/CEM direkt zu erfassen, da diese von der Dynode abgestoßen werden. Fotomultiplier-Detektorsysteme, bestehend aus einer Konversionsdynode, einer Phosphorplatte und dem Detektorsystem, können auf diesen Dynoden negativ geladene Teilchen bilden, diese auf die Phosphorplatte beschleunigen, dort in Lichtimpulse umwandeln und mithilfe des Photomultipliers registrieren.

### 3.5.4 MS-Bedingungen

Im Massenspektrometer wurden die Analyten und deren interne Standards durch Elektronenstoßionisation (EI+) fragmentiert. Hierfür diente ein Wolframfilament bei 70 eV und einer Quellentemperatur von 200 °C.

Die Identifikation und Quantifizierung erfolgte im Single Ion Monitoring (SIM) Modus. Dabei wird nicht das Vollspektrum des fragmentierten Analyten, sondern nur dessen (hier zwei) charakteristische Hauptfragmente gemessen, wodurch die Empfindlichkeit erheblich gesteigert wird. Es wurden dafür zwei zeitlich getrennte Messbereiche mit unterschiedlichen Massen definiert.

Tabelle 8: Zeitfenster der verschiedenen SIM Aufnahmen

Zeitintervall	Retentionszeit	Substanz
Zwischen 6 min und 11,5 min:	m/z 118	Myosmin
	m/z 122	D <sub>4</sub> -Myosmin
	m/z 84	Nicotin
	m/z 87	D <sub>3</sub> -Nicotin
Zwischen 11,5 min und 18 min	m/z 98	Cotinin
	m/z 101	für D <sub>3</sub> -Cotinin.

Die Trennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis der verschiedenen Fragmente erfolgte im Quadrupol-Feld, woraufhin die Fragmente am Detektor auf eine Phosphorplatte trafen. Der hier eingefügte Photomultiplier mit 400 V führt zu einem elektrischen Signal, das mit Hilfe einer Computersoftware aufgenommen wurde. Die Dwell-Time betrug für alle Ionen 0,06 Sekunden.

### 3.5.5 Berechnung der Konzentration von Myosmin, Cotinin und Nicotin

Aus dem Chromatogramm konnten sich mithilfe einer Computersoftware Flächen für die Fragmente der jeweiligen Analyten berechnen lassen.

Zur anschließenden Berechnung der Konzentrationen von Myosmin, Nicotin, Cotinin und der Substanzen des deuterierten Standards in den unterschiedlichen Probenmatrices wurde folgende Formel herangezogen:

$$Myos\ min\ [ng / ml] = \frac{(Fläche_{MYO} - Blindwert) \cdot M_{MYO} \cdot absolute\ Menge_{D_4 - MYO}}{(Fläche_{D_4 - MYO} - Blindwert) \cdot M_{D_4 - MYO} \cdot Menge\ Probe\ (ml / mg)}$$

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

Nach Formel 1 wurde die Fläche des Ions durch die Fläche des entsprechenden internen Standards geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ( $M_{Analyt}/M_{ISTD}$ ) sowie der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Der erhaltene Wert wurde anschließend durch die eingesetzte Probenmenge (ml bzw. mg) dividiert. Die enthaltene Menge wird so in ng/ml bzw. in ng/mg erhalten. Eventuell vorhandene Blindwerte wurden bei der Berechnung berücksichtigt, indem deren Flächen von den Flächen der entsprechenden Analyten abgezogen wurden.

### 3.6 Validierung der Methode

Die Validierung einer Analysemethode dient als wichtiger Bestandteil der Qualitätssicherung. Dabei soll der formelle und dokumentierte Nachweis erbracht werden, dass eine ausgewählte Methode geeignet ist, eine bestimmte spezifische Aufgabe zu erfüllen.

Die Leistungsparameter der Validierung, wie beispielsweise Richtigkeit, Präzision, Linearität, Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate sind abhängig von der Art der analytischen Methode und von ihrem Einsatzzweck.

Das Verfahren der Validierung von Tabakalkaloiden wurde in der Dissertation von *Schütte-Borkovec* [9] für Plasma-, Horn- und Speichelproben bereits ausführlich beschrieben und publiziert. Die Validierung dieser Arbeit wird nachfolgend kurz wiedergegeben.

#### 3.6.1 Material und Herstellung der Verdünnungsreihe

Zur Validierung der **Plasmaextraktion** wurde statt humanen Plasmas Kälberserum verwendet.

Hierfür wurden Verdünnungsreihen folgender Konzentrationen hergestellt.

D<sub>0</sub>-Myosmin:

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

D<sub>0</sub>-Nicotin und D<sub>0</sub>-Cotinin:

0,2 ng, 0,5 ng, 0,8 ng, 1,0 ng, 1,5 ng, 2,0 ng, 2,5 ng, 3,0 ng, 5,0 ng pro ml Plasma

Anstelle von **Hornproben** wurde synthetisch hergestelltes Keratin verwendet.

Die Verdünnungsreihen bestanden aus folgenden Konzentrationen:

D<sub>0</sub>-Myosmin:

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, 2,0 pg pro mg Keratin

D<sub>0</sub>-Cotinin und D<sub>0</sub>-Nicotin:

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, 5,0 pg pro mg Keratin

Wegen der geringeren Empfindlichkeit der Methode für Nicotin und Cotinin wurden deren Konzentrationen sowohl für die Validierung der Plasmaextraktion als auch für die der Hornanalyse höher angesetzt.

### 3.6.2 Berechnung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Als **Nachweisgrenze** (*LOD, limit of detection*) wird die Konzentration bezeichnet, die qualitativ noch erfasst werden kann. Die **Bestimmungsgrenze** (*LOQ, limit of quantification*) ist dagegen die Konzentration, die zur quantitativen Erfassung verwendet werden kann, da sie die für die Methode vorgegebenen Anforderungen an die Präzision noch erfüllt.

Als Vorlage für die Bestimmung der Nachweisgrenze diente bei allen Analyten die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 [125]. Man verwendete hierfür erneut die Verdünnungsreihen nach Kap. 3.6.1.

Die Nachweisgrenze ist die Konzentration, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) bei 1 zu 3 liegt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei einem S/N von 1 zu 6.

Tabelle 9: Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen (ng/ml) der Tabakalkaloide im Plasma

Substanz	Myosmin	Cotinin
Nachweisgrenze	0,0012	0,05
Bestimmungsgrenze	0,0035	0,16

Tabelle 10: Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen (ng/g) der Tabakalkaloide in Keratin

Substanz	Myosmin	Cotinin	Nicotin
Nachweisgrenze	0,01	0,035	0,021
Bestimmungsgrenze	0,03	0,107	0,062

### 3.6.3 Präzision

Die Präzision ist ein Kriterium zur qualitativen Beurteilung eines Messverfahrens und beschreibt die Stabilität des Messgeräts und der Methode. Sie wird durch wiederholtes Messen

unter gleichen Parametern mit demselben Messgerät und der gleichen Methode ermittelt. Von den erhaltenen Ergebnissen wird der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

Die Validierung der Analytik wurde mit Kälberserum stellvertretend für Plasma beziehungsweise mit synthetisch hergestelltem Keratin stellvertretend für Hornproben durchgeführt.

### 3.6.3.1 Messpräzision und Tagespräzision (within day)

Zur Bestimmung der Messpräzision wurde eine Standardlösung sechs Mal hintereinander vermessen.

Um die Tagespräzision zu ermitteln wurden die Proben entsprechend dem Protokoll, welches auch für das Horn aus Rinderklauen galt, aufgearbeitet. Alle Proben wurden mit dem zugehörigen Standard der Konzentrationen vgl. 6.3.1 versehen. Je 1 µl der Proben wurde in die GC/MS eingespritzt und vermessen. Dabei wurde neben den Abweichungen der Flächeneinheiten auch die Konzentration des jeweiligen D<sub>0</sub>-Analyten bestimmt, da auch diese Werte immer im gleichen Bereich liegen sollten.

Tabelle 11: Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum (MW ± SD, n = 6)

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

Tabelle 12: Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, (MW ± SD, n = 6)

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

### 3.6.3.2 Wochenpräzision (between day)

Der einzige Unterschied zur Erfassung der Tagespräzision besteht darin, dass die Proben der gleichen Ausgangsmatrix hier über sechs Wochen aufgearbeitet wurden.

Tabelle 13: Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel (MW  $\pm$  SD, n = 6)

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

Tabelle 14: Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel (MW  $\pm$  SD, n = 6)

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

### 3.6.4 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden die in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Standardverdünnungsreihen verwendet. Im doppeltem Ansatz und ohne vorherige Aufarbeitung der Proben wurden alle drei Analyten gemessen.

Die Linearität lässt sich dann aus der Regression der Geraden ermitteln.

Die Linearität wurde durch Berechnung der Bestimmtheitsmaße ( $r^2$ ) angegeben, welche 0,97 bis 0,99 betragen.

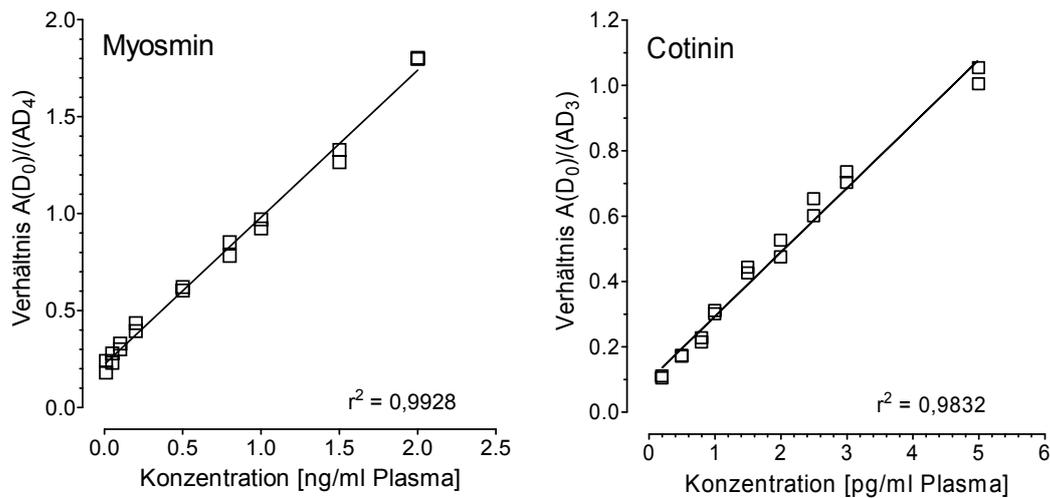


Abbildung 29: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin und Cotinin für Plasma

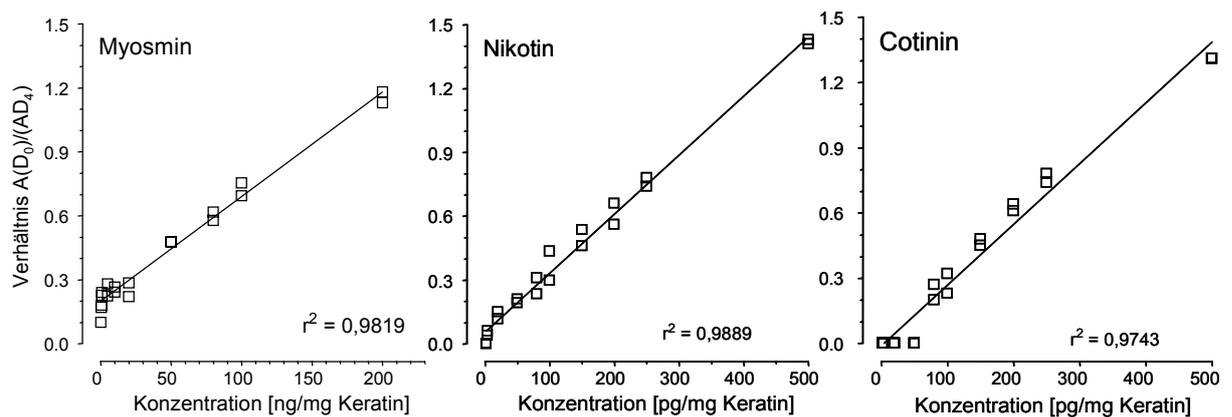


Abbildung 30: Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin, Cotinin und Nicotin für Keratin

### 3.6.5 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindung kann bestimmt werden, indem man die Geraden vergleicht, die ohne Aufarbeitung einerseits und nach Durchlaufen des gesamten Analyseprotokolls andererseits entstehen.

Tabelle 15: Wiederfindung des internen Standards aus Kälberserum und Keratin (MW ± SD, n = 9)

Substanz	Myosmin	Cotinin	Nicotin
Wiederfindung im Plasma (%)	102 ± 3,59	98,02 ± 11,480	97,37 ± 6,6
Wiederfindung in Hornproben (%)	92,59 ± 10,03		91,11 ± 12,4

### 3.7 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Datenkalkulationsprogramms Excel 2003 SP3 (Microsoft, Seattle, USA) wurden die Ergebnisse gesammelt und aus den Basisdaten die Absolutwerte berechnet. Diese wurden anschließend anhand von Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) analysiert. Es wurden hierbei Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD, standard deviation), Standardabweichungen vom Mittelwert (SE, standard error) und die Medianwerte berechnet.

Werte unterhalb der Nachweisgrenze (LOD) wurden mit dem Wert Null gleichgesetzt. Werte, die zwischen dem LOD und der Bestimmungsgrenze (LOQ) lagen, wurden mit der Hälfte des LOQs in die Berechnung einbezogen.

Zum statistischen Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurde, den Bedingungen entsprechend, der ungepaarte t-Test herangezogen. Sollten mehrere Gruppen verglichen werden, wurde der ANOVA-Test angewandt. Voraussetzung für die Tests ist eine Normalverteilung, welche mit dem Anpassungstest nach Kolmogorov-Smirnov überprüft wurde. Dieser eignet sich für kontinuierliche Daten kleiner Stichproben.

Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman Rank Test. Der Parameter  $r$  stellt den Korrelationskoeffizienten dar.

Abbildungen, in denen statistische Analysen wiedergegeben werden, wurden mit GraphPad Prism erstellt. Soweit nicht anders vermerkt, werden die einzelnen Ergebnisse und der Mittelwert dargestellt.

Die Ergebnisse der Pansensaftproben sind als Boxplot dargestellt. Hierbei entsprechen die außerhalb der Box vertikal angeordneten Spannweitenlinien (Whisker) den 5. und 95. Perzentilen. Die unteren und oberen Grenzlinien der Box markieren die 25. bzw. 75. Perzentile. Demzufolge liegt die Hälfte der Messwerte innerhalb, die andere Hälfte der Messwerte außerhalb des Rechtecks. Die waagrechte Linie innerhalb der Box entspricht dem Median der jeweiligen Variablen.

Die Ergebnisse der Futtermittelproben sind als Säulendiagramm dargestellt. Dabei werden Nicotin- und Myosminkonzentrationen jeder Futtersorte in einem Balken dargestellt. Die obere Begrenzung des schwarzen Teils entspricht dem Mittelwert der Myosminbestimmung, die des grauen Anteils dem Mittelwert der Nicotinbestimmung. Die Werte über den Säulen beschreiben den Gehalt von Myosmin im Vergleich zu Nicotin (= 100%).

Die Ergebnisse der Urinanalysen sowie die Abbildungen des Myosmin- und Nicotinvorkommens beim Rind werden ebenfalls als Säulendiagramme dargestellt, wobei der obere Rand der Säule den Mittelwert angibt. Die oberen Grenzlinien der Säulen zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analytik

Im Massenspektrometer zerfällt Myosmin durch Elektronenbeschuss in seine charakteristischen Hauptfragmente  $m/z$  146, 145 und 118 (Abb. 31). Das Hauptfragment des Nicotins befindet sich bei  $m/z$  84, weitere Fragmente liegen bei  $m/z$  119 und 133 (Abb. 32). Cotinin zerfällt in die Fragmente  $m/z$  98, 119, 118 und 147 (Abb. 33).

Demzufolge werden die Analyten bei ihren Basispeaks auf der Massenspur  $m/z$  118 für Myosmin,  $m/z$  84 für Nicotin und  $m/z$  98 für Cotinin gemessen. Die zugehörigen internen deuterierten Standards werden auf den Massenspuren  $m/z$  122 für Myosmin,  $m/z$  87 für Nicotin und  $m/z$  101 für Cotinin gemessen. Nicotin und Cotinin sowie deren deuterierte Standards zeigen auf den Massenspuren  $m/z$  118 bzw. 122 ebenfalls Peaks. Die Intensität dieser Peaks übertrifft sogar die des Myosmins.

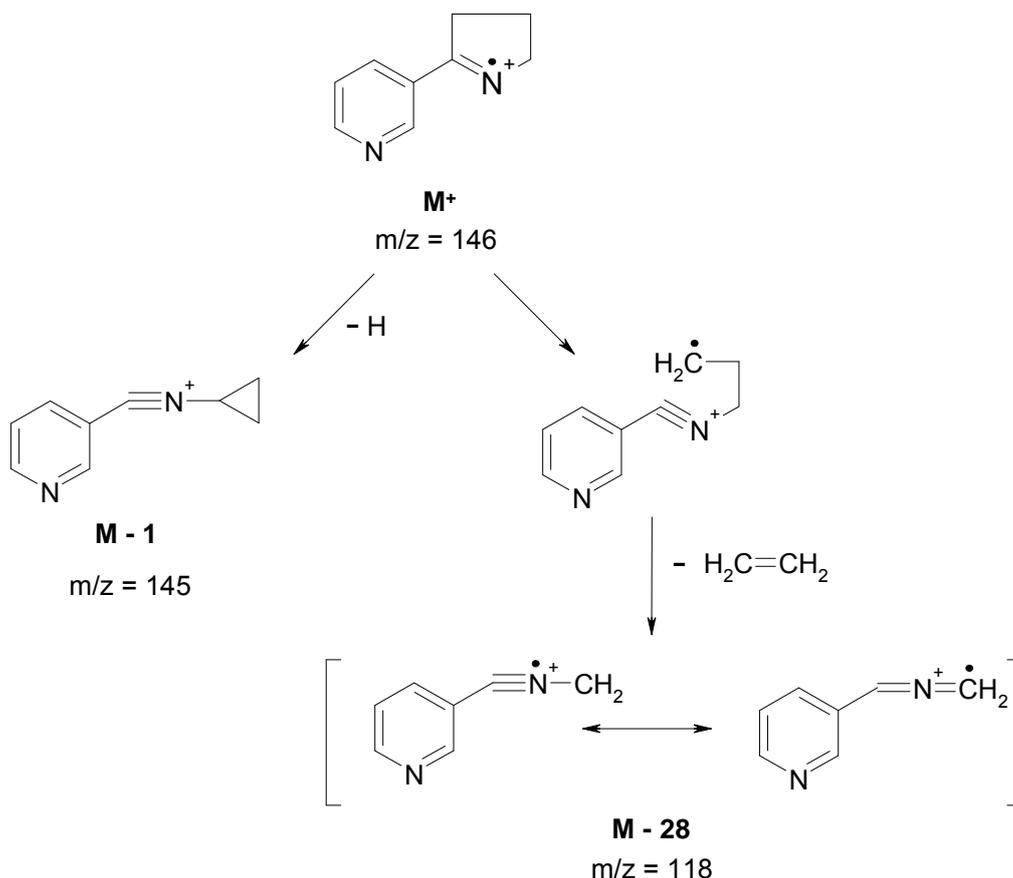


Abbildung 31: Hauptfragmente von Myosmin

Um eventuell vorhandene Blindwerte zu erfassen und bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wurde bei jedem Analysengang eine Leerwertprobe den Aufreinigungsschritten unterzogen und diese mittels GC/MS untersucht. Gegebenenfalls konnte so die AUC des Blindwertes von der AUC des entsprechenden Alkaloids abgezogen werden.

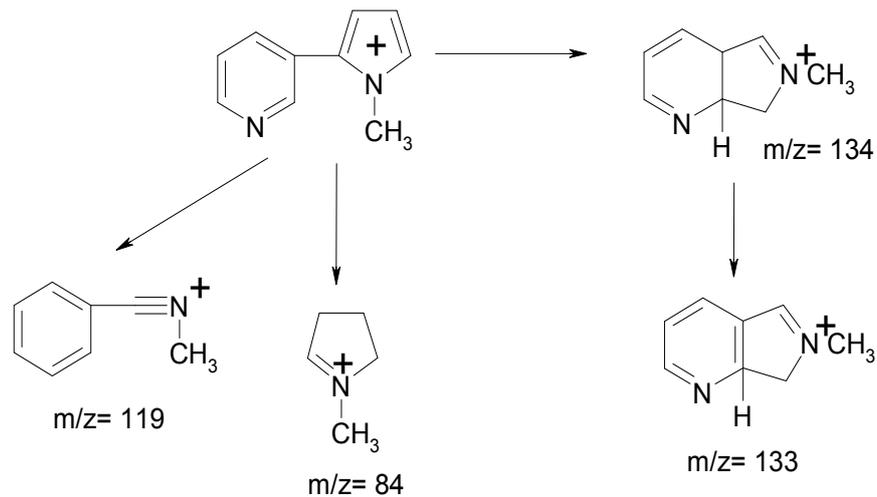


Abbildung 32: Hauptfragmente von Nicotin

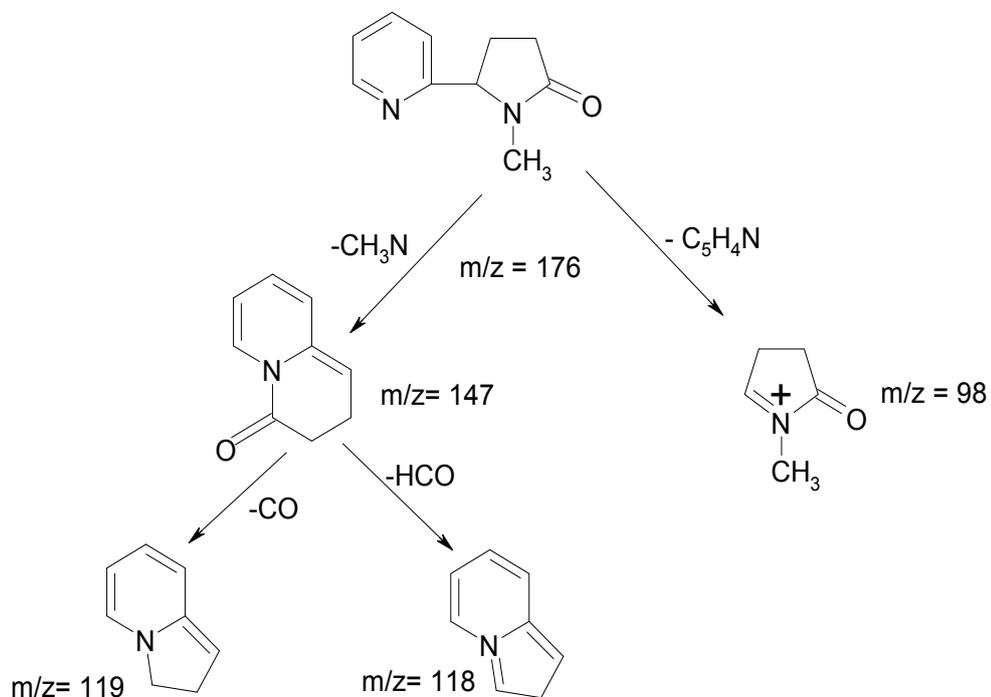


Abbildung 33: Hauptfragmente von Cotinin

Isotopenstandards unterscheiden sich in ihrem chemischen Verhalten nicht von der Ausgangssubstanz. So können mit ihrem Einsatz Verluste während der Aufbereitung und Schwankungen der Nachweisempfindlichkeit korrigiert werden.

Des Weiteren diene die Verwendung des ISTD der exakten Lokalisierung der Retentionszeiten, da gerätebedingte Schwankungen existieren. Zudem werden erfahrungsgemäß trotz effektiver Aufreinigung des Probenmaterials unerwünschte Futtermittelbestandteile nicht entfernt, die folglich zu einer verzögerten Elution der Analyten von der GC-Säule führen können. Sollten in den folgenden Messungen Peaks der Analyten vorhanden sein, so liegen diese im Chromatogramm in der Regel zeitlich direkt nach dem Peak des entsprechenden deuterier-

ten Standards. Da die Methode bereits etabliert war, wurden die Messungen ausschließlich im SIM-Modus durchgeführt.

Abbildung 34 zeigt Chromatogramme von Myosmin, Cotinin und Nicotin des wässrigen Standards.

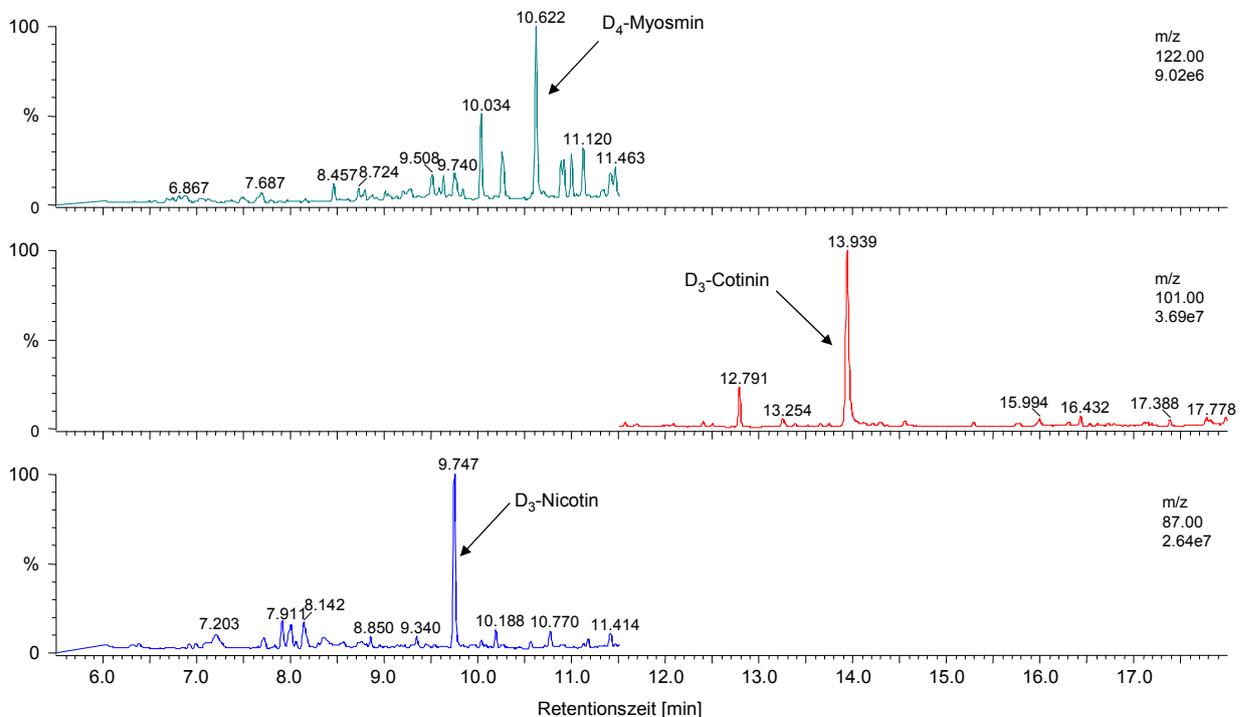


Abbildung 34: Chromatogramme einer wässrigen Standardprobe (aufgenommen im SIM-Modus)  
Dargestellt sind Peaks auf den Massenspuren von D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122), D<sub>3</sub>-Cotinin (m/z 101) und D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 98).  
Die Retentionszeiten betragen für D<sub>4</sub>-Myosmin 10,622 min, für D<sub>3</sub>-Cotinin 13,939 min und für D<sub>3</sub>-Nicotin 9,747 min.

## 4.2 Myosmin in Futtermitteln

Im Rahmen der Studie wurden verschiedene Futtermittel untersucht. Sie stammten aus insgesamt vier verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben der Regierungsbezirke Oberbayern und Schwaben. Alle Landwirte gaben an, dass sämtliche Futtermittel aus eigener Herstellung stammten und von ihnen selbst regelmäßig zur Fütterung eingesetzt werden.

Es wurde versucht, eine große Bandbreite häufig verwendeter Futtermittel zu untersuchen, sodass nach Auswertung der Messergebnisse Futter in seiner Gesamtheit als Quelle für Myosmin in Trinkmilch und Sahne diskutiert werden kann.

Die Proben wurden händisch entnommen, wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht von randständigen Bereichen der Aufbewahrungseinheiten stammten. So sollte die Wahrscheinlichkeit von futterfremden Bestandteilen oder Veränderungen, die durch äußere Einflüsse zustande kommen, minimiert werden.

Die Messungen wurden jeweils dreifach unter Zusatz der deuterierten internen Standards durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Analysen der verschiedenen Futtermittel sind in Tabelle 16 zusammengefasst:

Tabelle 16: Konzentrationen von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Futtermitteln (ng/g)

Futtermittel	Myosmin	Nicotin	Cotinin
Maissilage	0,06	2,28	nicht auswertbar
Grassilage	n. d.	1,35	nicht auswertbar
Heu	0,27	4,43	0,41
Grascobs	0,76	nicht auswertbar	nicht auswertbar
Maisschrot	0,16	1,59	0,42
Wintergerstenschrot	0,05	0,73	n. d.
Sojaschrot	0,15	1,31	n. d.
Zuckerrübenschnitzel	0,76	1,07	n. d.

#### 4.2.1 Maissilage

In Maissilage waren 0,06 ng/g Myosmin (Abb. 35) und 2,28 ng/g Nicotin (Abb. 36) enthalten. Mit dem angewandten Verfahren konnten anhand der Chromatogramme keine sicheren Aussagen über das Vorkommen von Cotinin in Maissilage getroffen werden, da der Kurvenverlauf keine eindeutige Peakzuordnung erlaubte.

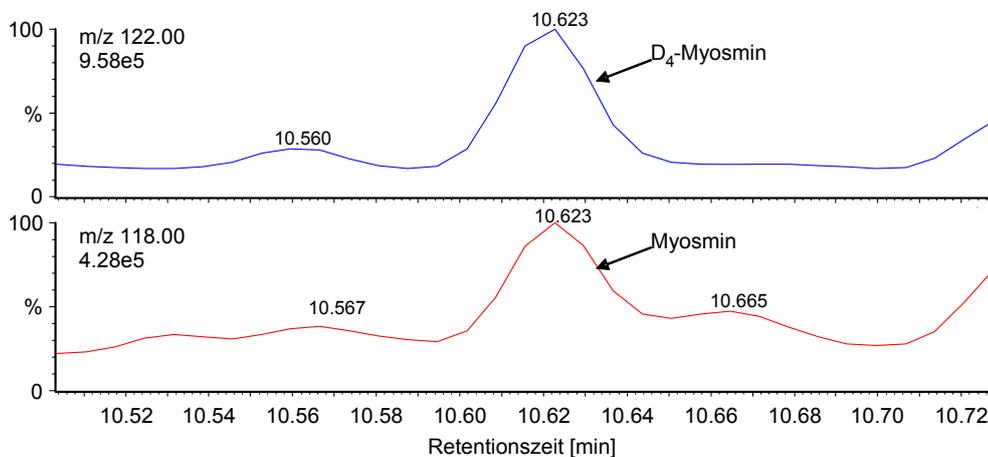


Abbildung 35: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,04 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 7,50 g Maissilage.

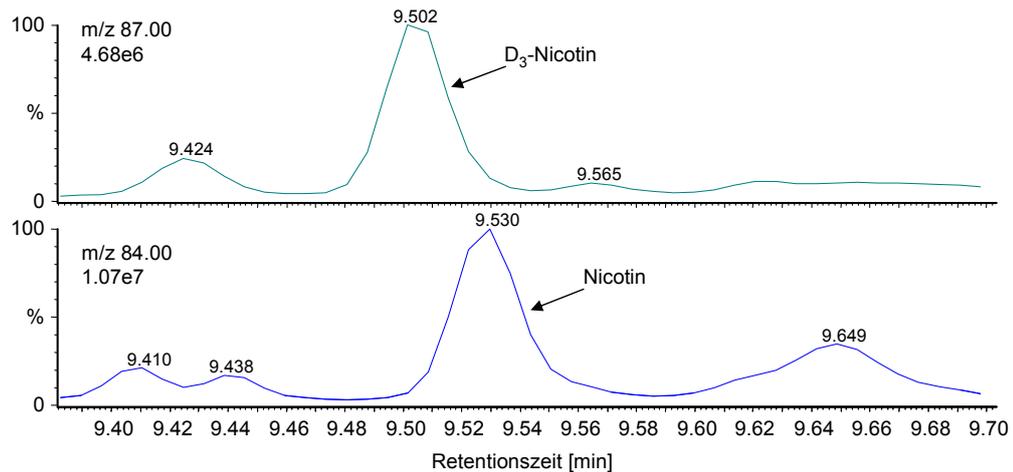


Abbildung 36: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und, 1,80 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 7,50 g Maissilage.

#### 4.2.2 Grassilage

In Grassilage konnte kein Myosmin gefunden werden. Dagegen ließ sich für Nicotin eine durchschnittliche Konzentration von 1,35 ng/g berechnen (Abb. 37). Die Chromatogramme der Cotininbestimmung waren nicht auswertbar (vgl. Kap. 4.2.1).

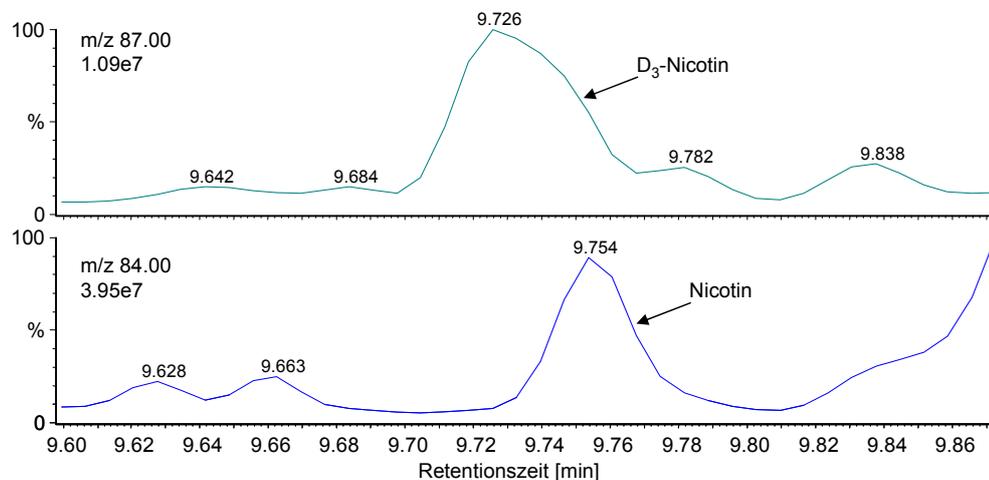


Abbildung 37: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und 1,68 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 6,30 g Grassilage.

#### 4.2.3 Heu

In den Heuproben waren im Mittel Konzentrationen von 0,27 ng Myosmin/g und 4,43 ng Nicotin/g (Abb. 38) enthalten. Zur Cotininbestimmung konnten nur zwei Chromatogramme verwendet werden, woraus sich ein Mittelwert von 0,41 ng/g berechnen ließ.

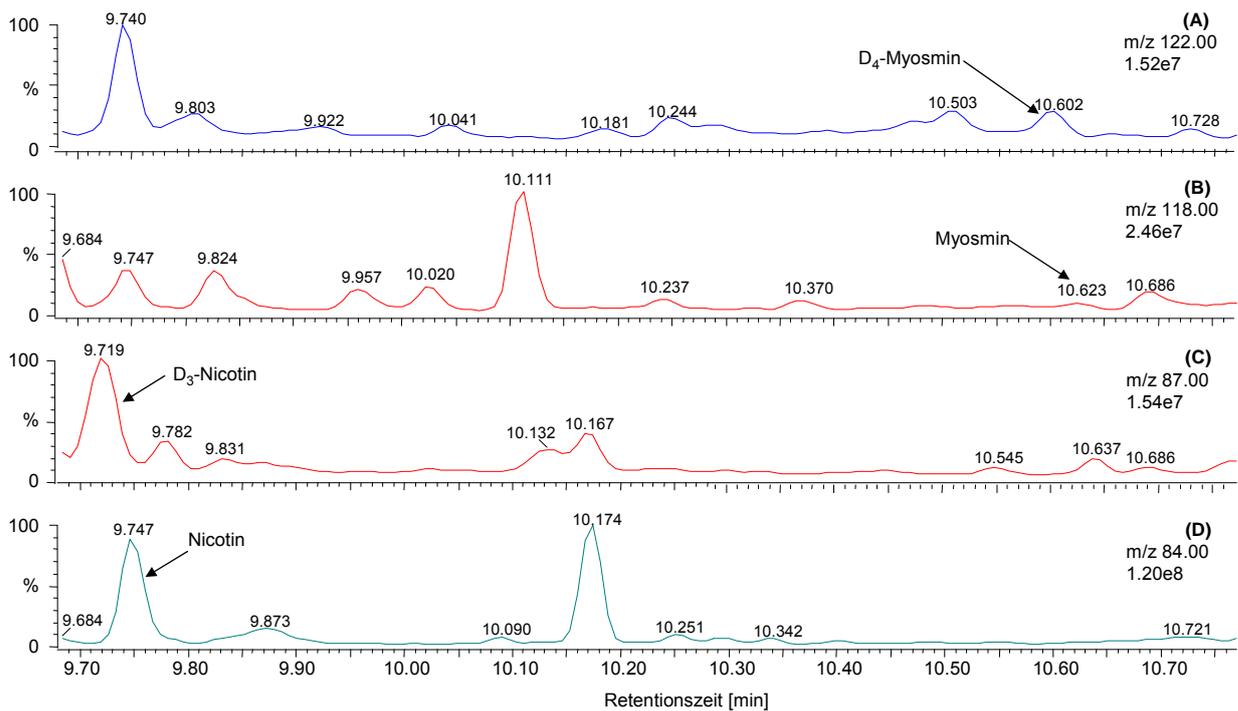


Abbildung 38: (A) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122), (B) 0,27 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und 6,62 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 4,70 g Heu.

#### 4.2.4 Grascobs

Die durchschnittliche Myosminkonzentration der Grascobs betrug 0,76 ng/g (Abb. 39). Die Chromatogramme von Nicotin und Cotinin waren aufgrund von Peaküberlagerungen nicht auswertbar.

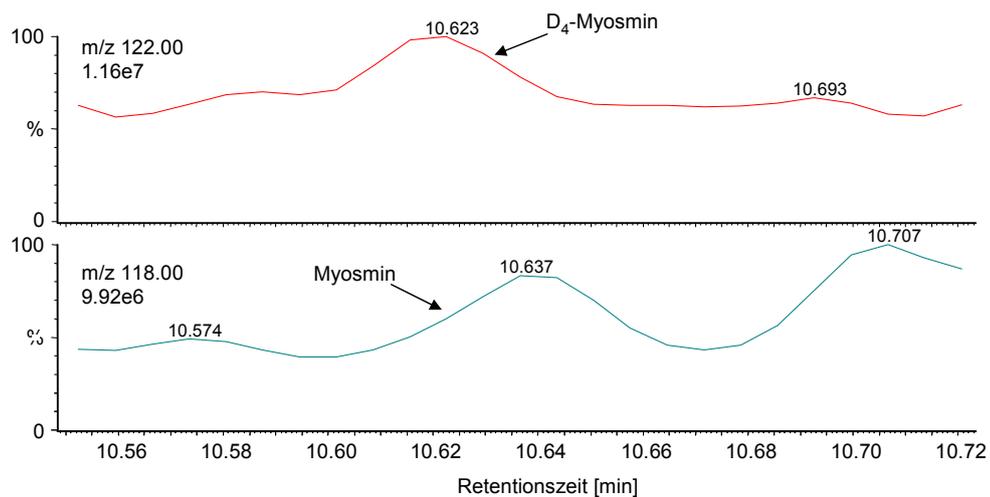


Abbildung 39: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,70 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 5,00 g Grascobs.

#### 4.2.5 Maisschrot

In Maisschrot konnten Myosmin (Abb. 40) und Nicotin (Abb. 41) in mittleren Konzentrationen von 0,16 bzw. 1,59 ng/g gemessen werden. In zwei der drei Proben war Cotinin enthalten. So belief sich die durchschnittliche Cotininkonzentration auf 0,42 ng/g (Abb. 42).

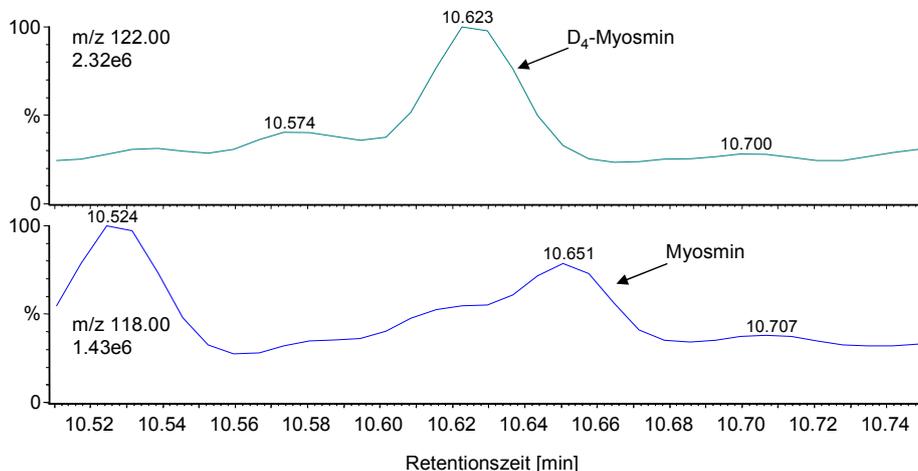


Abbildung 40: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,26 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.

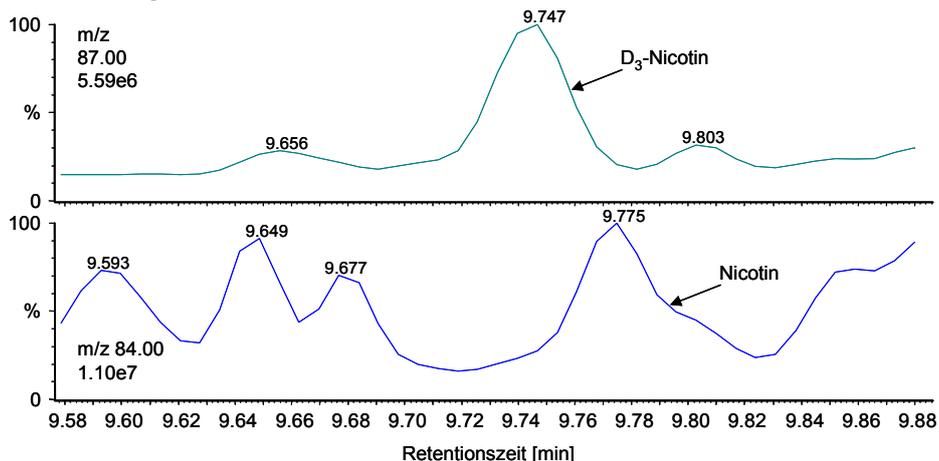


Abbildung 41: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und 1,63 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.

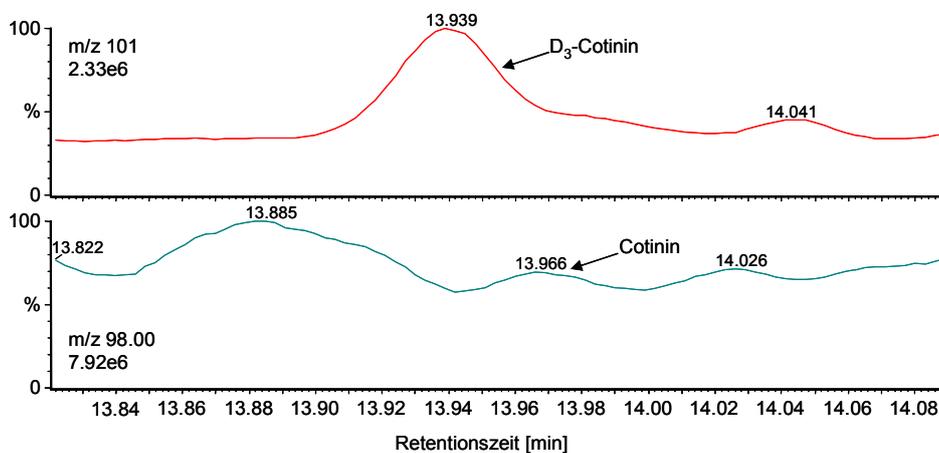


Abbildung 42: D<sub>3</sub>-Cotinin (oben, m/z 101) und 0,90 ng/g Cotinin (unten, m/z 98), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.

#### 4.2.6 Wintergerstenschrot

In Wintergerstenschrot waren ausschließlich Myosmin mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,05 ng/g und Nicotin mit 0,73 ng/g nachweisbar (Abb. 43 und 44).

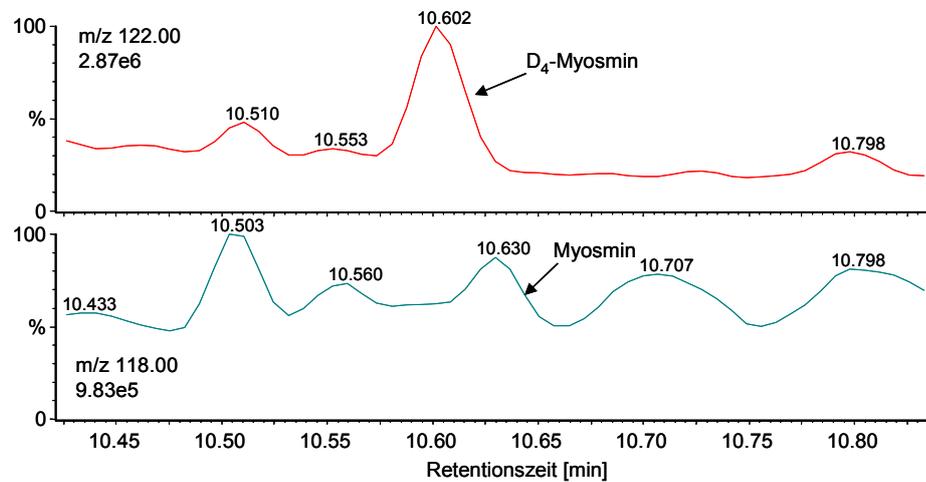


Abbildung 43: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,06 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 9,20 g Wintergerstenschrot.

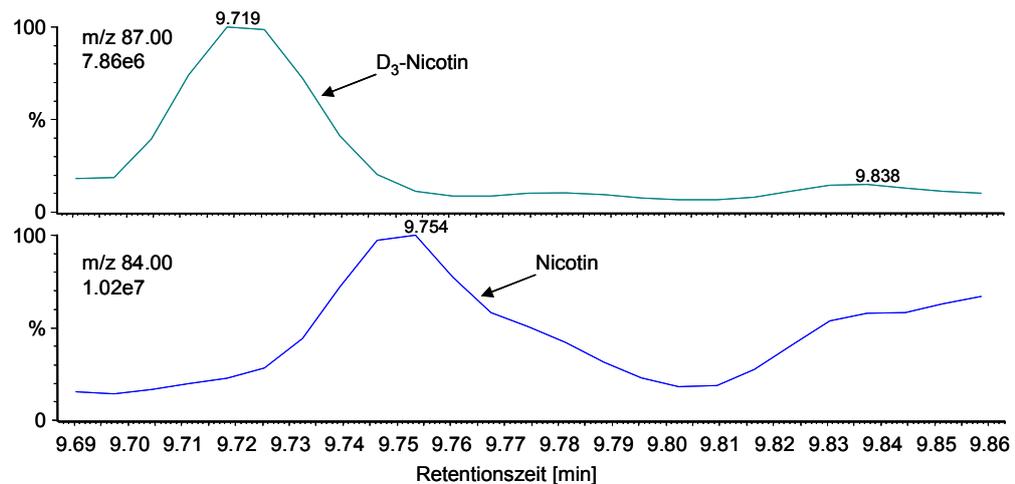


Abbildung 44: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und 1,01 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 9,20 g Wintergerstenschrot.

#### 4.2.7 Sojaschrot

In Sojaschrot wurden Myosmingehalte von durchschnittlich 0,15 ng/g und Nicotingehalte von 1,31 ng/g (Abb. 45) gemessen. Die Proben enthielten kein nachweisbares Cotinin.

#### 4.2.8 Zuckerrübenschitzel

Der Myosmingehalt in Zuckerrübenschitzeln betrug im Mittel 0,76 ng/g, der des Nicotins 1,07 ng/g (Abb. 46). Cotinin war nicht nachzuweisen.

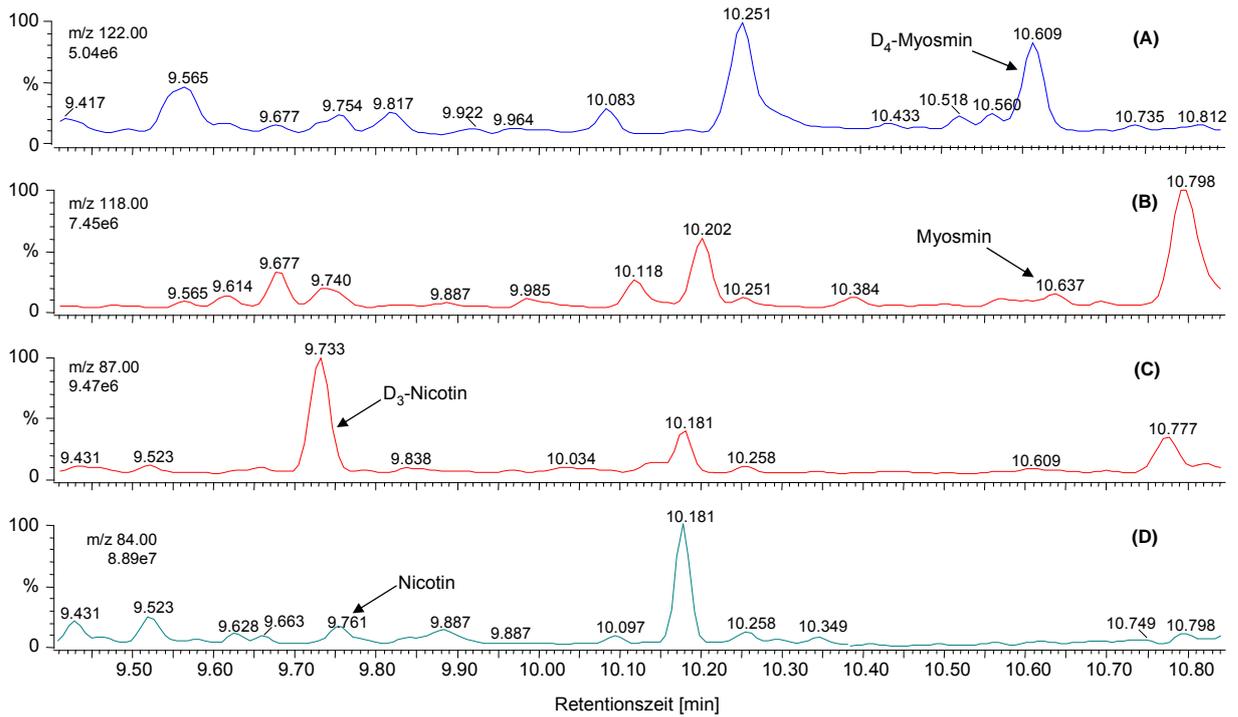


Abbildung 45: (A) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122), (B) 0,16 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und (D) 1,52 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 3,90 g Sojaschrot.

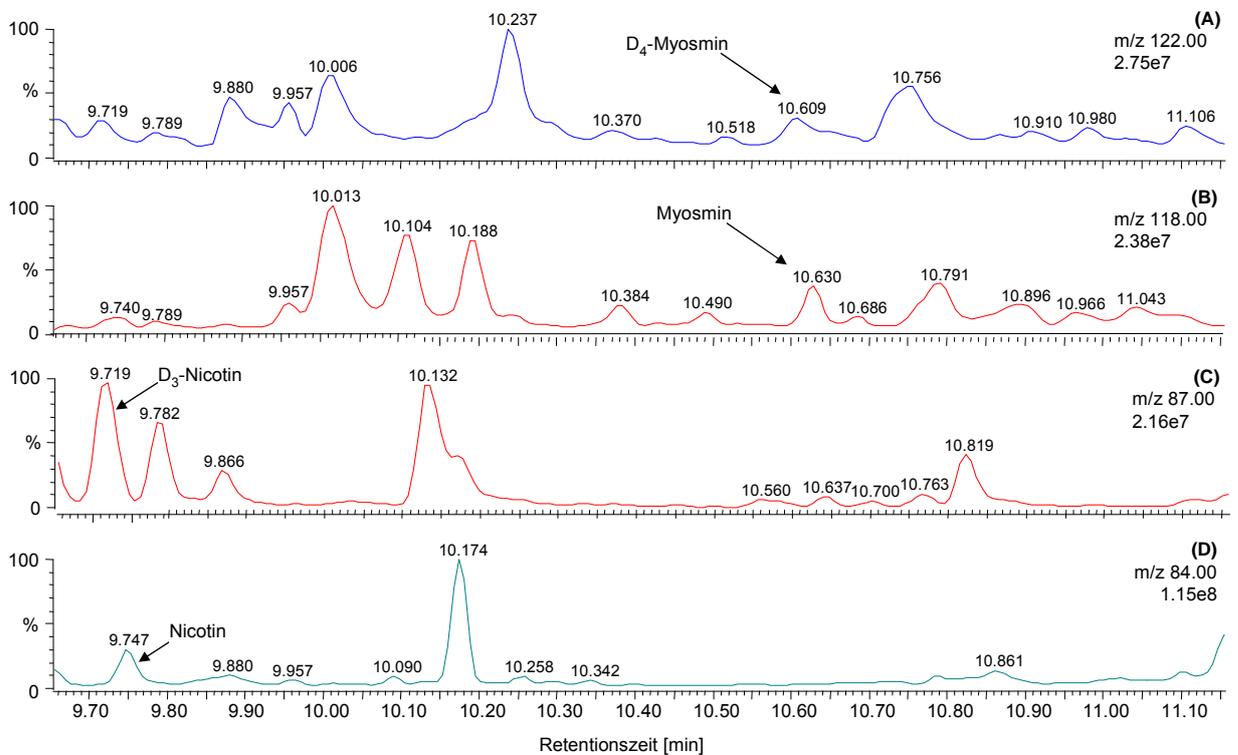


Abbildung 46: (A) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122), (B) 0,91 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und (D) 0,97 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 4,80 g Zuckerrübenschnitzeln.

#### 4.2.9 Zusammenhang des Myosmin- und Nicotinvorkommens in Futtermitteln

In keinem der untersuchten Futtermittel trat Myosmin ohne Nicotin auf (Abb. 47). In Zuckerrüben war Myosmin mit einem überdurchschnittlich hohem Anteil von 71% im Vergleich zu Nicotin (= 100%) vertreten. In Silage war dagegen der Anteil mit 2,6% bei Maissilage vergleichsweise gering, in Grassilage war kein Myosmin nachweisbar. Die Anteile in den restlichen myosminhaltigen Futtermitteln lagen alle in einer ähnlichen Größenordnung im Vergleich zu Nicotin mit 6,1% in Heu, 6,8% in Wintergerste, 10,1% in Maisschrot und 11,5% in Sojaschrot.

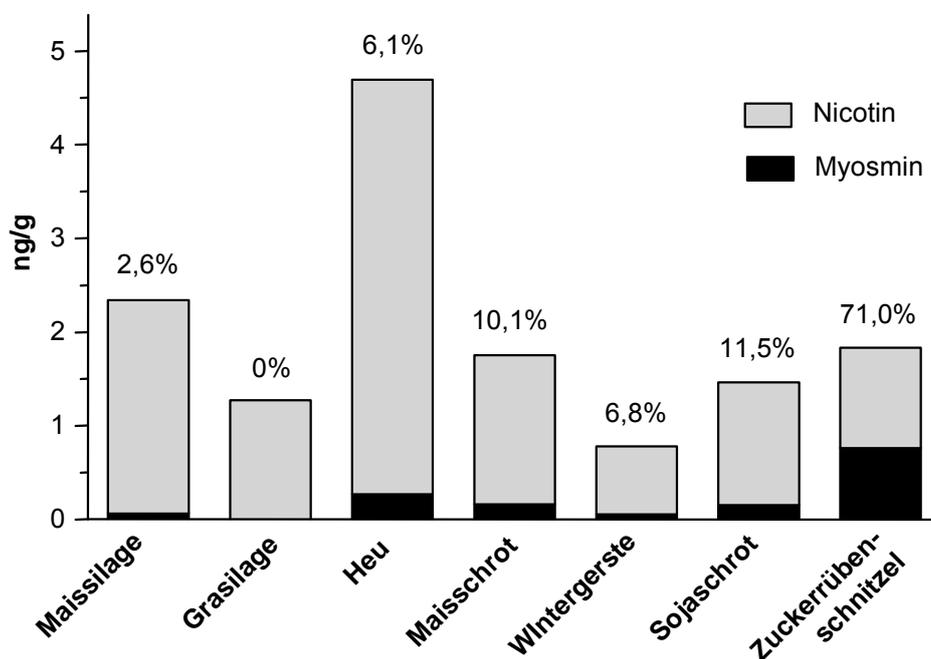


Abbildung 47: Vergleich der Myosmin- und Nicotiningehalte in verschiedenen Futtermitteln. Die Werte über den Säulen beschreiben den Myosmingehalt im Vergleich zu Nicotin (= 100%).

#### 4.3 Myosmin in Pansensaftproben

Es wurden Pansensaftproben von 12 Rindern untersucht. Die Proben wurden in der Klinik für Wiederkäuer der LMU in Oberschleißheim im Rahmen der tierärztlichen Untersuchung gewonnen. Zwei Proben stammten von trockenstehenden Kühen. Die laktierenden Kühe befanden sich 4 Tage bis 5 Monate post partum. Je nach Probenmenge wurden die Analysen doppelt oder dreifach durchgeführt.

Es konnte sowohl Myosmin als auch Nicotin in den Proben nachgewiesen werden (Abb. 48). Dabei betrug die durchschnittliche Myosminmenge 0,10 ng/ml ( $p = 0,054$ ). Der Median lag bei 0,07 ng/ml mit einer Standardabweichung von 0,07. Der mittlere Nicotiningehalt lag bei

0,31 ng/ml ( $p = 0,002$ ), der Median bei 0,24 ng/ml. Die Standardabweichung betrug 0,24 (Abb. 48).

Cotinin trat nur in einer Pansensaftprobe mit 0,04 ng/ml auf. In den anderen 11 Proben waren keine Cotininpeaks in den Chromatogrammen zu erkennen.

Zwischen Myosmin und Nicotin in Pansensaft besteht eine signifikante Korrelation (Abb. 51).

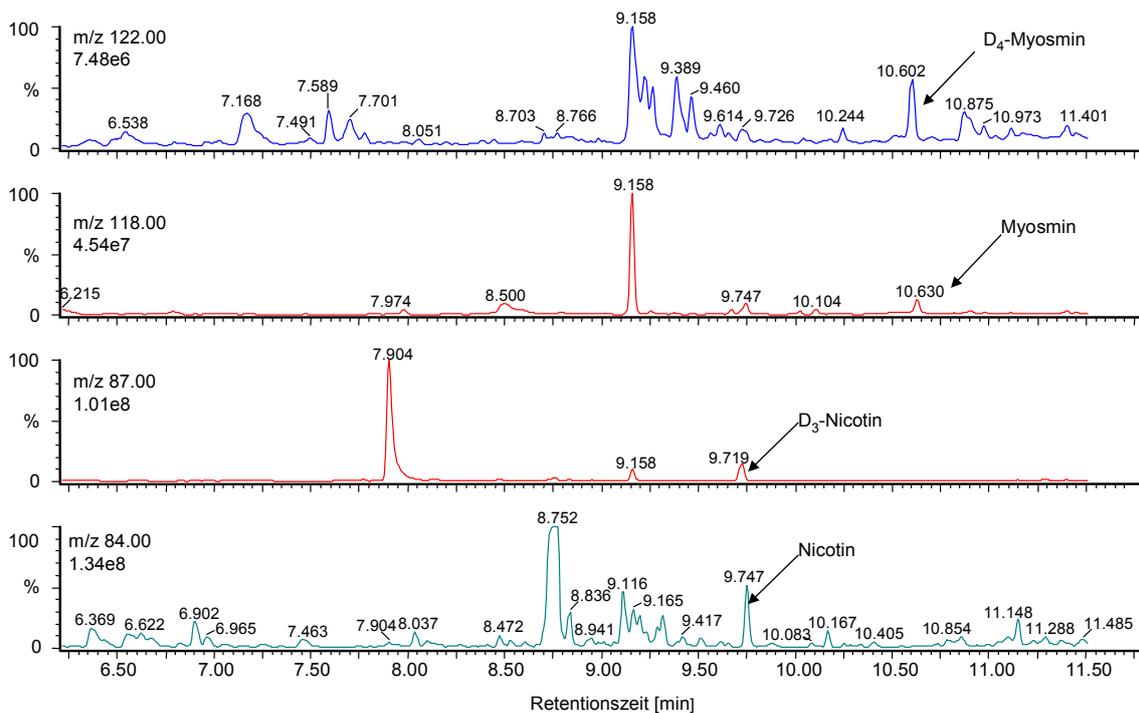


Abbildung 48: (A) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122), (B) 0,28 ng/ml Myosmin (m/z 118), (C) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und (D) 1,12 ng/ml Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 20 ml Pansensaft.

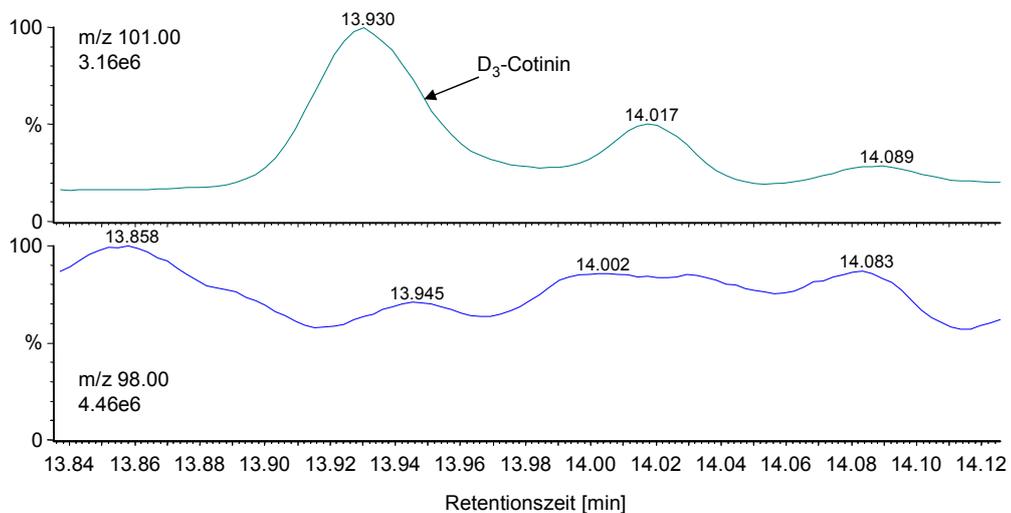


Abbildung 49: D<sub>3</sub>-Cotinin oben (m/z 101) und Cotinin unten (m/z 98), extrahiert aus 20 ml Pansensaft. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren.

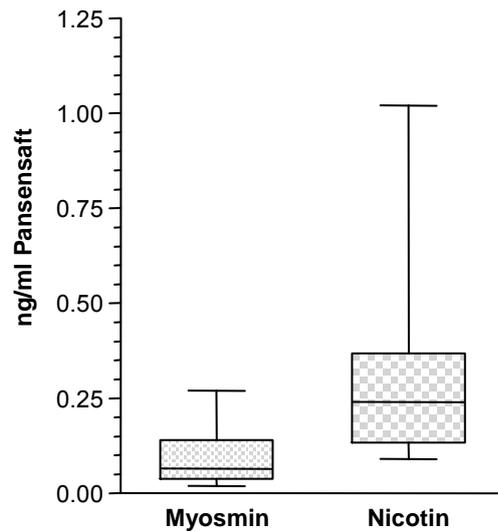


Abbildung 50: Myosmin- und Nicotinkonzentrationen in 12 Pansensaftproben.

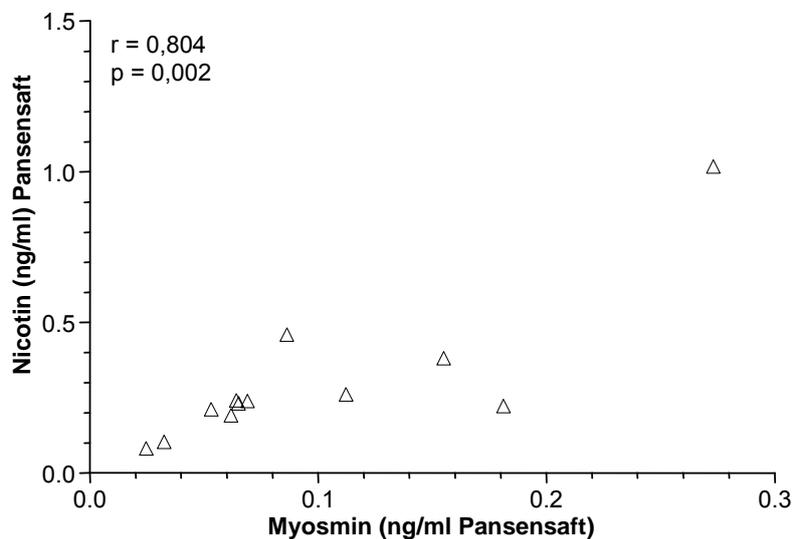


Abbildung 51: Korrelation von Myosmin mit Nicotin in Pansensaft. Die Werte zeigen das Ergebnis des Spearman Rank Tests

## 4.4 Myosmin in Blutproben

In den Abbildungen 53-55 sind Chromatogramme der Plasmaproben von Rindern und Schafen gegenübergestellt.

### 4.4.1 Rinderplasma

In jedem der 3 landwirtschaftlichen Betriebe, von welchen die Futterproben (Kap. 4.2) stammten, wurden jeweils 2 Blutproben von gesunden laktierenden Milchkühen zur Myosmin-, Nicotin- und Cotininbestimmung gewonnen.

Myosmin konnte in allen Plasmaproben nachgewiesen werden mit einer Konzentration von  $0,12 \pm 0,06$  ng/ml. Cotinin war nur in 3 von 6 Proben zu identifizieren mit  $0,16 \pm 0,20$  ng/ml (Abb. 52, links). Nicotin war in keiner Probe enthalten.

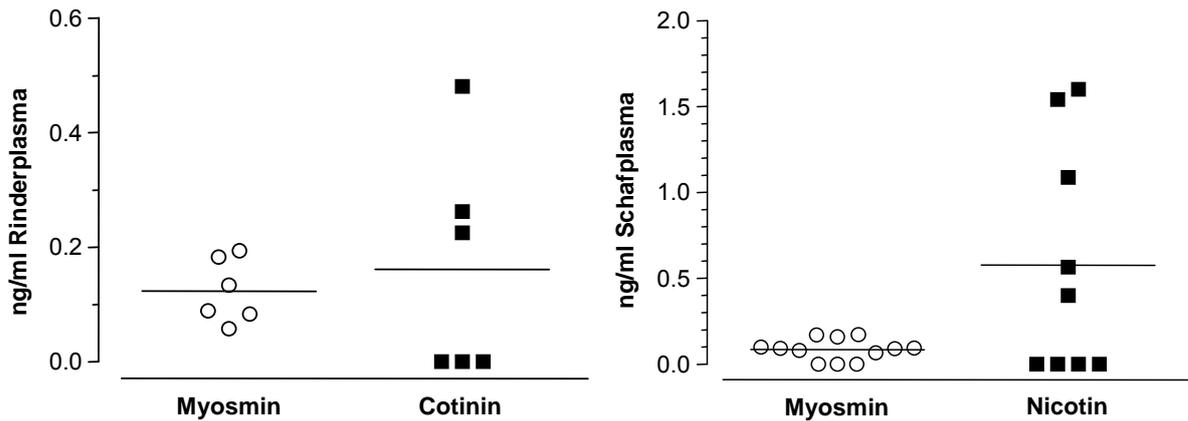


Abbildung 52: Konzentrationen und Mittelwert von Myosmin und Cotinin in Plasma von Rindern (links) und Schafen (rechts).

#### 4.4.2 Schafplasma

In 9 von 12 Plasmaproben einer Wanderschafherde wurde Myosmin in einer Konzentration von  $0,09 \pm 0,06$  ng/ml nachgewiesen. Der Unterschied zwischen der Myosminkonzentration in Schaf- und Rinderplasma war nicht signifikant.

Nicotin war in 3 Chromatogrammen wegen Überlagerungen nicht auswertbar. In 6 der restlichen 9 Proben konnte Nicotin identifiziert werden mit  $0,58 \pm 0,67$  ng/ml.

Cotinin war in keinem der Chromatogramme nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 (rechts) zusammengefasst.

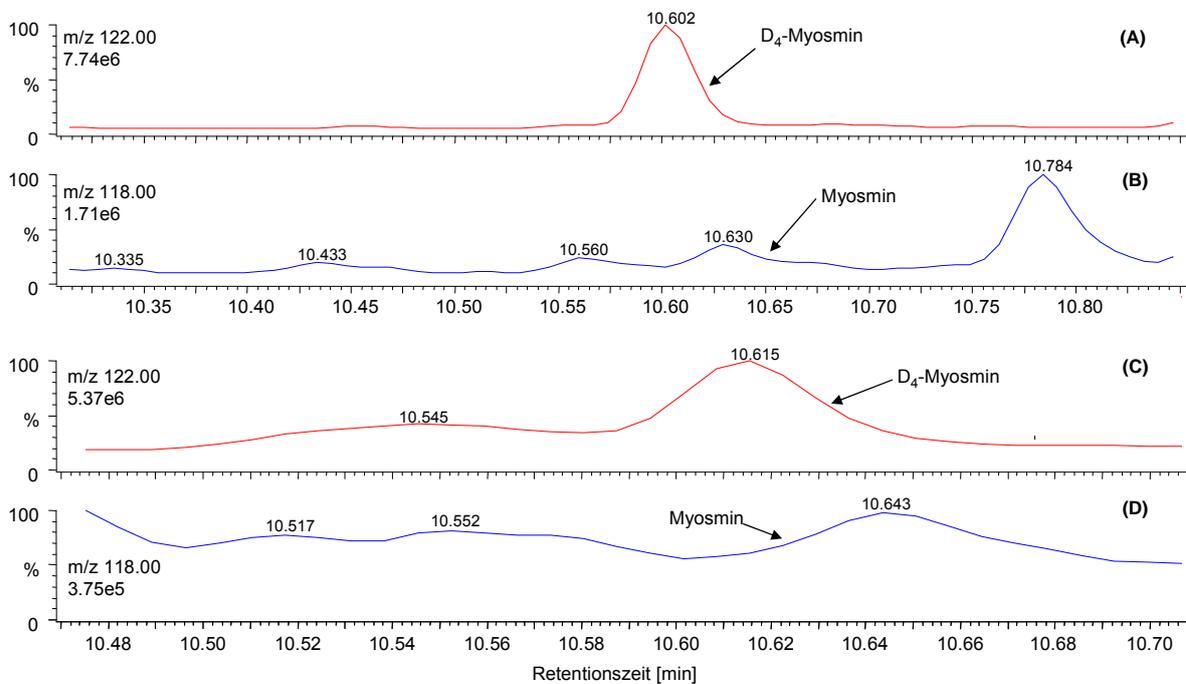


Abbildung 53: (A) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122) und (B) 0,08 ng/ml Myosmin (m/z 118), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. (C) D<sub>4</sub>-Myosmin (m/z 122) und (D) 0,09 ng/ml Myosmin (m/z 118), extrahiert aus 2,0 ml Schafplasma.

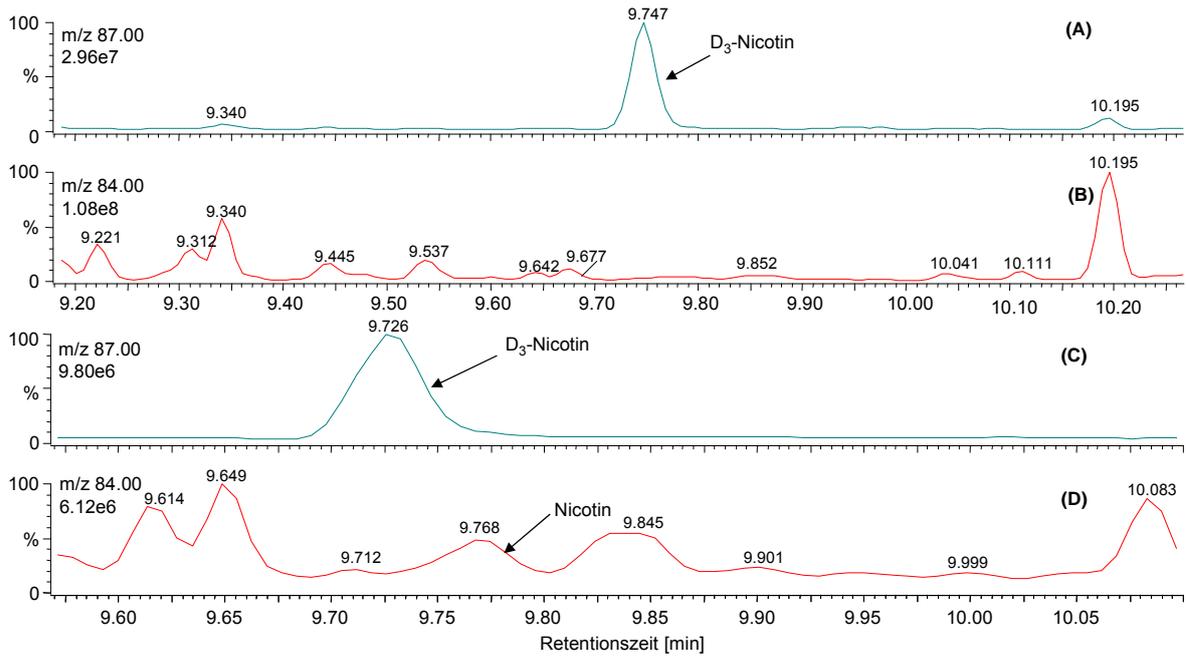


Abbildung 54: (A) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und (B) Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. In der Probe war kein Nicotin zu identifizieren. (C) D<sub>3</sub>-Nicotin (m/z 87) und (D) 0,62 ng/ml Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 1,8 ml Schafplasma.

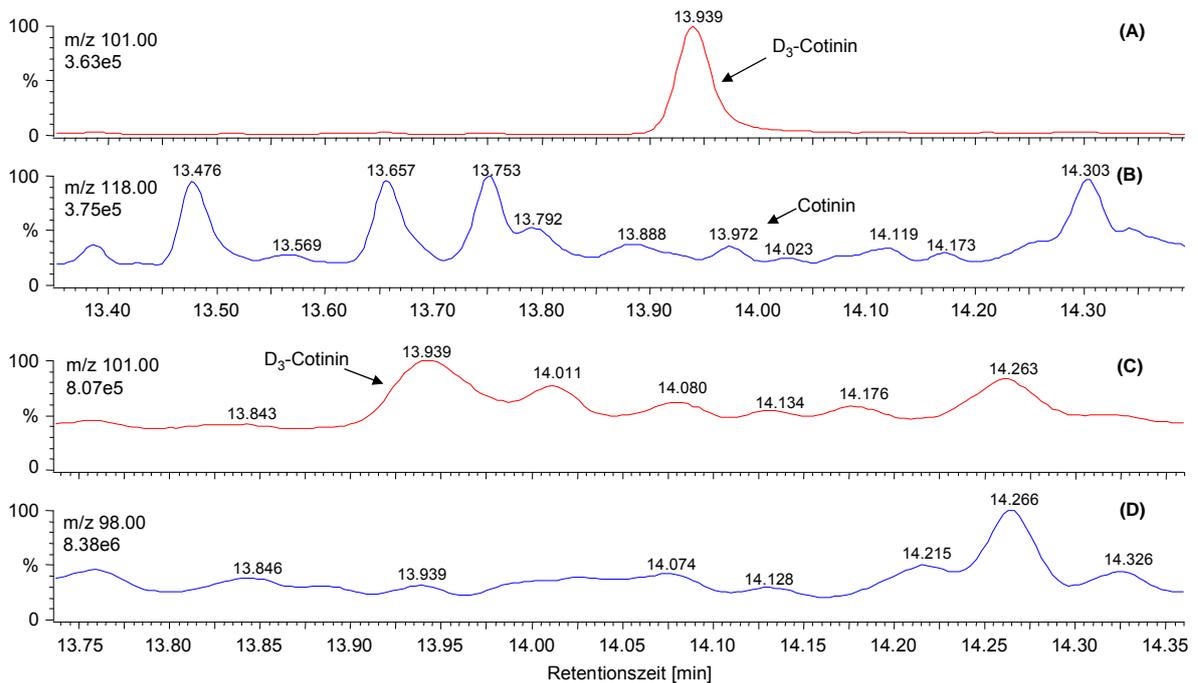


Abbildung 55: (A) D<sub>3</sub>-Cotinin (m/z 98) und (B) 0,09 ng/ml Cotinin (m/z 101), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. (C) D<sub>3</sub>-Cotinin (m/z 98) und (D) Cotinin (m/z 101), extrahiert aus 1,6 ml Schafplasma. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren.

## 4.5 Myosmin in Urin

Es wurde Spontanurin von 5 laktierenden Milchkühen aus den in Kapitel 4.2 erwähnten Betrieben gesammelt. Myosmin war in 4 von 5 Proben nachweisbar mit einer Konzentration von  $0,04 \pm 0,03$  ng/ml.

Nicotin und Cotinin waren nur in 2 der 5 Proben zu identifizieren, wiesen aber in den positiv getesteten Proben weit höhere Konzentrationen auf als Myosmin. Daraus ergaben sich mittlere Werte von  $0,24 \pm 0,38$  ng/ml Nicotin und  $0,35 \pm 0,50$  ng/ml für Cotinin (Abb. 56).

Die Abbildungen 57-59 zeigen Chromatogramme einer Urinprobe, in der nur Myosmin, nicht aber Nicotin und Cotinin nachgewiesen werden konnte.

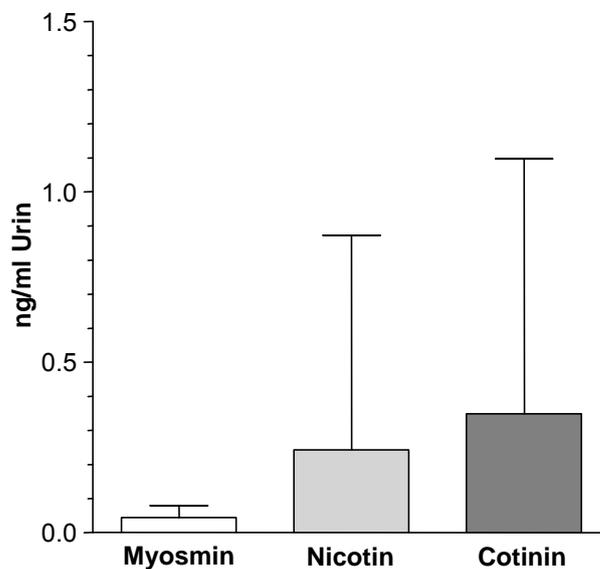


Abbildung 56: Myosmin-, Nicotin- und Cotiningehalt (ng/g) in Urin. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml.

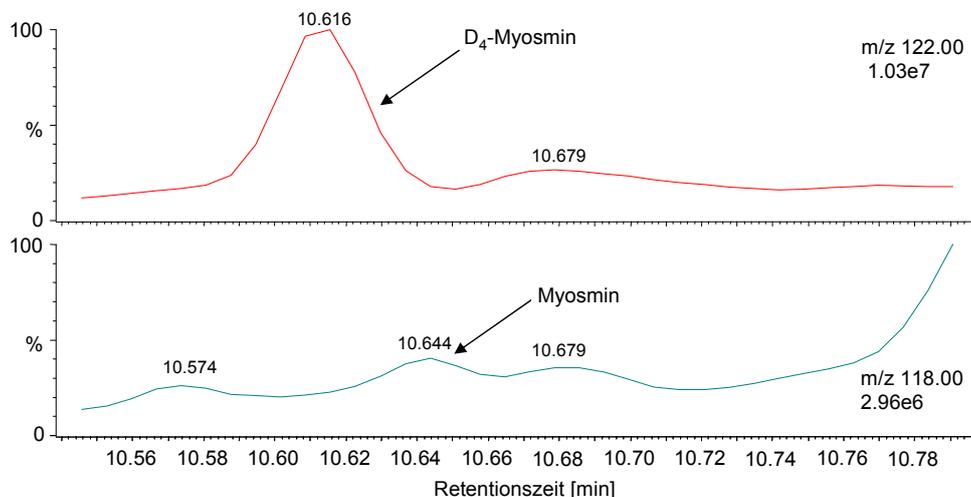


Abbildung 57: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,08 ng/ml Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 2 ml Urin.

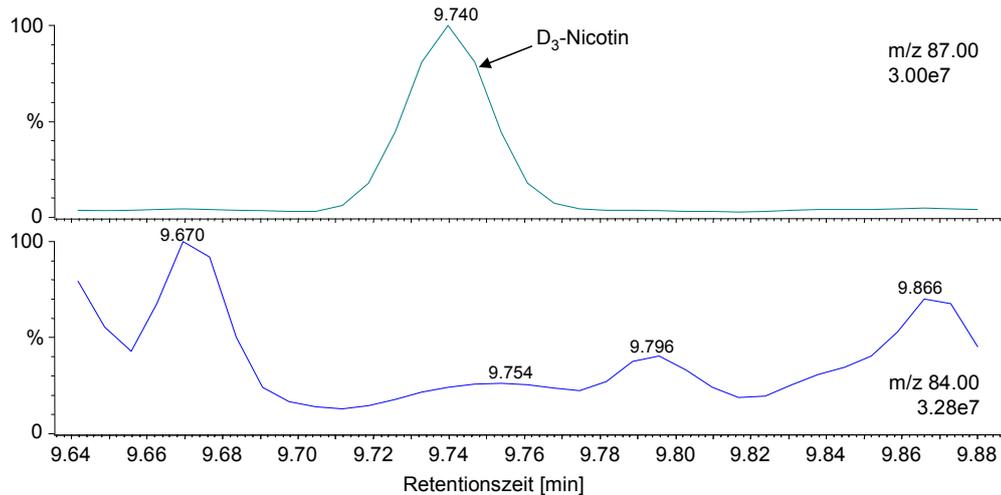


Abbildung 58: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 2 ml Urin. Es konnte kein Nicotin identifiziert werden.

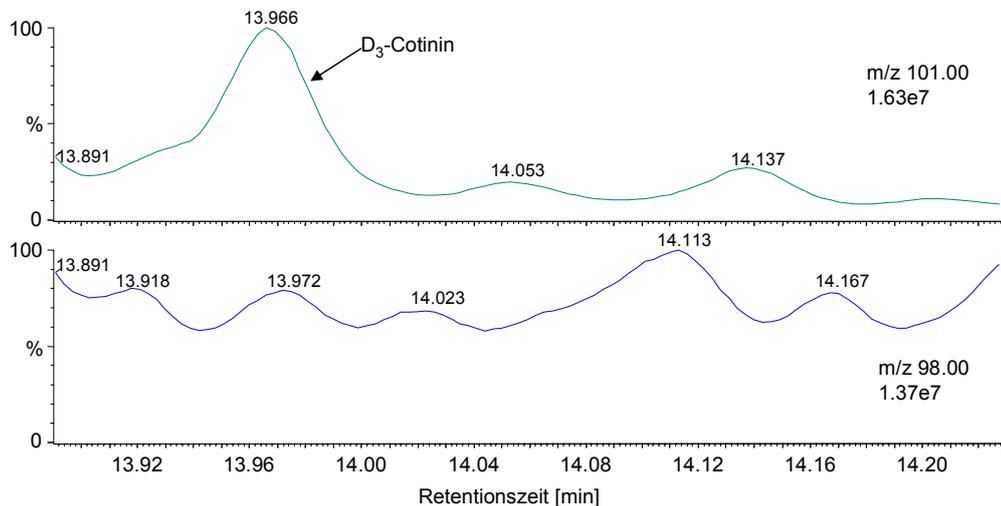


Abbildung 59: D<sub>3</sub>-Cotinin (oben, m/z 101) und Cotinin (unten, m/z 98), extrahiert aus 2 ml Urin. Es konnte kein Cotinin identifiziert werden.

## 4.6 Myosmin in Hornproben

Zur Bestimmung von Myosmin, Nicotin und Cotinin im Klauenhorn von Rindern wurden Proben von 5 verschiedenen Tieren gesammelt. Diese stammten von tiefgefrorenen Rinderbeinen, welche von der Klinik für Wiederkäuer der LMU zu Verfügung gestellt wurden. Nähere Daten zu den Tieren lagen nicht vor.

Myosmin konnte nur in einer der Proben identifiziert werden (Abb. 60). Der Wert lag jedoch unter der Nachweisgrenze (LOD). In jedem der 5 Chromatogramme zeigten sich auf der Nicotinspur entsprechende Peaks, wobei auch hier alle Werte unter der Nachweisgrenze lagen (Abb. 61). Cotinin war in keiner der Proben zu identifizieren (Abb. 61).

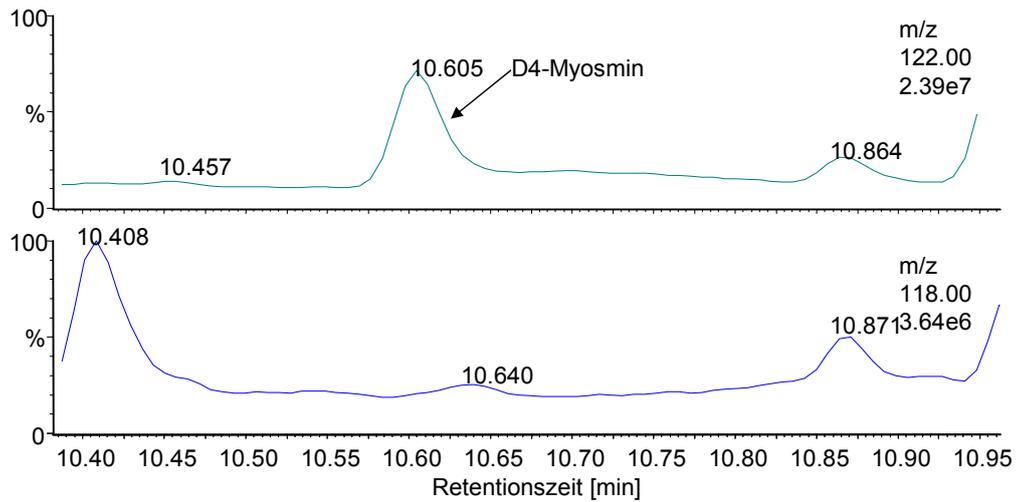


Abbildung 60: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. Die Fläche des Myosminpeaks liegt unter dem LOD.

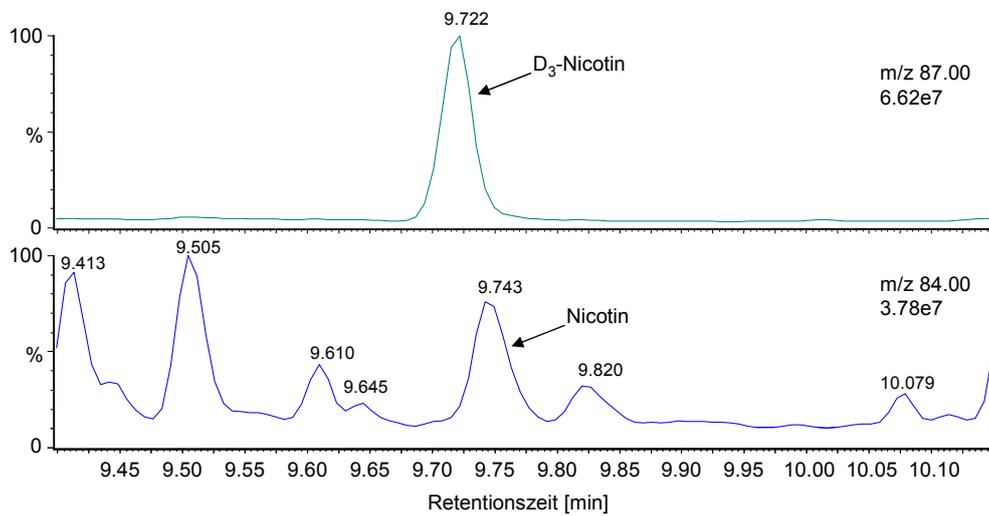


Abbildung 61: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 122) und 1,01 ng/g Nicotin (unten, (m/z 118)), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. Der Wert für Nicotin liegt unter dem LOQ.

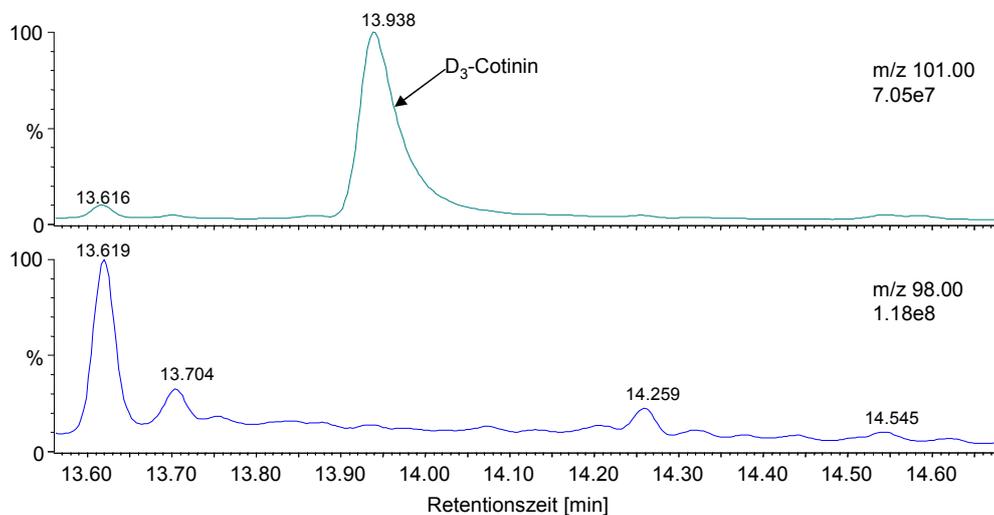


Abbildung 62: D<sub>3</sub>-Cotinin (oben, m/z 122) und Cotinin (unten, m/z 118), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren.

#### 4.7 Myosmin- und Nicotinvorkommen beim Rind

Myosmin konnte beim Rind in Pansensaft, Plasma und Urin nachgewiesen werden. Dabei schwankten die Werte im Pansensaft am stärksten, weniger im Plasma und am geringsten im Urin. Die höchsten mittleren Myosminkonzentrationen konnten im Plasma gemessen werden, die niedrigsten im Urin (Abb. 63). Die Unterschiede erreichten aber keine Signifikanz.

Nicotin war in Pansensaft, nicht aber im Plasma nachzuweisen (Abb. 64). Im Horn der Rinderklauen war weder Nicotin noch Myosmin eindeutig nachweisbar. Alle Werte lagen unter der Nachweisgrenze (LOQ) von 0,030 und 0,062 ng/g für Myosmin bzw. Nicotin.

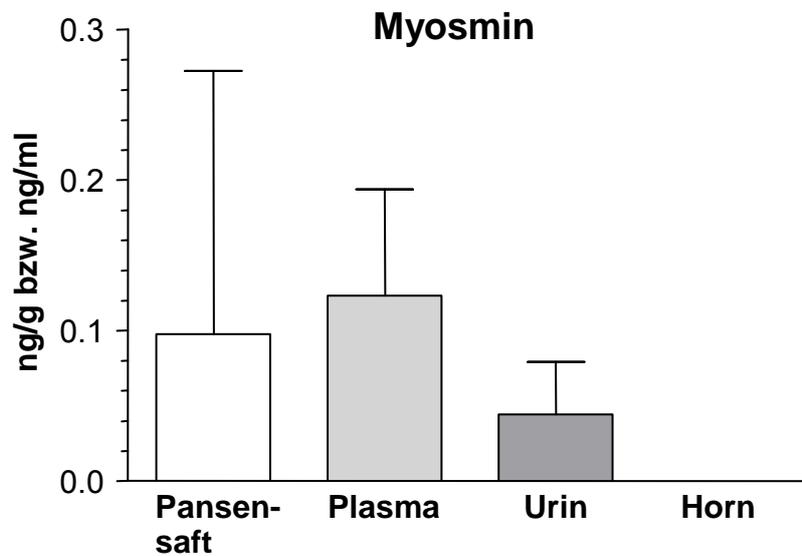


Abbildung 63: Myosmingehalt (ng/g bzw. ng/ml) beim Rind. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml.

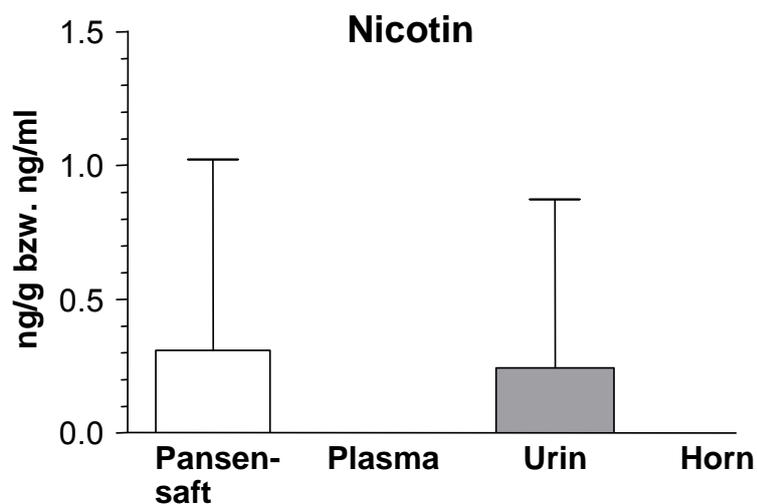


Abbildung 64: Nicotiningehalt (ng/g bzw. ng/ml) beim Rind. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml.

## 5 Diskussion

### 5.1 Myosmin in Futtermitteln

*Zwickenpflug et al.* [4] konnten nachweisen, dass Myosmin in Nüssen und Nussprodukten unabhängig von Tabak auftritt. Weitere Myosminquellen identifizierten *Tyroller et al.* [5;6] bei der Untersuchung einer großen Bandbreite an Lebensmitteln. Somit kann davon ausgegangen werden, dass noch unbekannt pflanzliche Quellen von Myosmin existieren.

*Tyroller et al.* [5;6] zeigten, dass auch Sahne Myosmin enthält, *Maier et al.* [7;8] identifizierten später Spuren von Myosmin auch in Kuhmilch. In derselben Arbeit untersuchte er die Myosminkonzentration in Muttermilch und deren Abhängigkeit vom Rauchverhalten. Dabei war Myosmin auch in der Milch nichtrauchender Mütter nachzuweisen. Eine mögliche Herkunft stellt die menschliche Nahrung dar.

Auch beim Rind ist Tabakexposition als Myosminquelle für Sahne und Kuhmilch auszuschließen. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit Myosmin in Futtermitteln bestimmt werden, um festzustellen, ob auch beim Rind nahrungsbedingte Myosminzufuhr als Ursache für das Vorkommen des Alkaloids in Kuhmilch und folglich in Sahne denkbar wäre.

Es wurde hierfür ein Spektrum an Futtermitteln gewählt, wie es tatsächlich von drei milchproduzierenden landwirtschaftlichen Betrieben, die über Molkereien ihr Produkt in den Handel bringen, zur Rinderfütterung eingesetzt wird.

Das von *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] entwickelte Aufreinigungs- und Analyseverfahren wurde auf alle Matrices angewandt. Die Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  118 und  $m/z$  122 für die Bestimmung von  $D_0$ -Myosmin und  $D_4$ -Myosmin zeigten charakteristische Verläufe und ließen sich eindeutig interpretieren. Die Graphen der Massenspuren  $m/z$  84 und  $m/z$  87 lieferten deutliche Peaks zur Bestimmung der Nicotinkonzentration. Lediglich bei der Untersuchung auf Nicotin in Grascobs überlagerten sich Peaks im Bereich der zu erwartenden Retentionszeit des Nicotins, sodass eine Quantifizierung nicht möglich war. Diese Messungen wurden nicht gewertet. Größere Schwierigkeiten bereitete das Aufreinigungs- und Analyseverfahren bei der Bestimmung des Cotinins. Aufgrund eines völlig untypischen Aussehens der Chromatogramme konnte eine Aussage über das Vorkommen von Cotinin weder in Mais- und Grassilage noch in Grascobs getroffen werden. Da auf Messungen im SCAN-Modus verzichtet wurde, flossen nur solche Chromatogramme in die Ergebnisse ein, die eindeutig interpretierbare Kurvenverläufe zeigten. Die Graphen, die nicht diesen Anforderungen entsprachen, wurden nicht gewertet.

Von den 8 Futtermitteln, die der Analyse unterzogen wurden, konnte in 7 Myosmin nachgewiesen werden. Lediglich in Grassilage war kein Myosmin zu identifizieren werden. Auch in Maissilage konnte es nur in Konzentrationen von 0,06 ng/g nachgewiesen werden.

Heu und Grascobs sowie Grassilage stellen eine heterogene Biomasse aus Grünlandpflanzen (Gräser, Kräuter, Leguminosen) dar [126]. Der Myosmingehalt in diesen Futtermitteln ist somit nicht einer bestimmten Pflanze, sondern der Bandbreite von Pflanzen, die auf einer Wiese wachsen, zuzuordnen. Die Wiese als Halbkulturform wird, im Gegensatz zur Weide, regelmäßig gemäht und nicht zum Grasen der Tiere genutzt [126]. Die Artenvielfalt ist maßgeblich beeinflusst von der Häufigkeit der Mahd. Dennoch wachsen hier vor allem krautartige Pflanzen und Süßgräser. Auch Weizen Reis und Mais, welche von *Tyroller et al.* [5;6] bereits positiv auf Myosmin untersucht wurden, gehören zur Pflanzenfamilie der Süßgräser. Ob Myosmin in dieser Pflanzenfamilie generell vertreten ist, bedarf weiteren Untersuchungen.

Maisschrot enthielt 0,16 ng/g Myosmin, in frischem Mais konnten *Tyroller et al.* [5;6] Myosmin in einer Konzentration von 0,48-1,60 ng/g nachweisen.

Da im Gegensatz zu Silage Heu mit 0,27 ng/g und Grascobs mit 0,76 ng/g im Vergleich zu anderen Futterproben relativ hohe Myosmingehalte aufwiesen und auch Mais Myosmin enthält, ist es denkbar, dass Myosmin in der Silage reduziert wird oder dass das angewandte Verfahren auf diese spezielle Matrix nicht optimal anwendbar ist.

Soja ist der Pflanzenfamilie der Schmetterlingsblütler zuzuordnen. Sojaschrot als Futtermittelzusatz für die Milchkühe enthielt 0,15 ng/g Myosmin. Mit einem Myosmingehalt von 0,2-2,0 ng/g in Erdnüssen wiesen auch *Zwickenpflug et al.* [4] in dieser Familie Myosmin nach.

Unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Futtermitteln wurden die höchsten Myosminkonzentrationen (neben Grascobs) in Rübenschnitzeln bestimmt. Rübenschnitzel sind klein geschnittene Zuckerrüben, die frisch hergestellt werden können oder aber industriell getrocknet und lagerfähig aufbereitet werden. Außerdem sind sie ein Nebenprodukt der Zuckerherstellung [126]. Zuckerrüben gehören zur Unterfamilie der Gänsefußgewächse. Hierzu zählt auch Spinat, in dem *Tyroller et al.* [5,6] kein Myosmin identifizieren konnten. Allerdings ist zu beachten, dass bei Spinat zwischen Wurzelspinat und Blattspinat unterschieden werden muss. Während ersterer mit Wurzeln in den Handel kommt, wird Blattspinat ohne diese verzehrt. *Tyroller et al.* [5,6] untersuchten Blattspinat. Rübenschnitzel bestehen dagegen nur aus dem Wurzelteil der Pflanze und enthielten in der untersuchten Probe Myosmin in einer Konzentration von 0,76 ng/g. Ob bei diesen Pflanzen ein Unterschied im Myosminvorkommen zwischen Wurzeln und Blättern besteht, bleibt durch weitere Untersuchungen, unter anderem der verschiedenen Organe von Zuckerrüben oder Spinat, zu klären.

Insgesamt liegen die Myosminkonzentrationen aber näher an den von *Tyroller et al.* [5;6] gemessenen Myosminmengen in Nahrungsmitteln als an den Ergebnissen von *Schütte-Borkovec et al.* [9], die mit 124 ng Myosmin/g Schweinefutter 75-300 Mal höher einzustufen sind.

Die Synthese von Myosmin in der Pflanze ist bislang nicht völlig geklärt. In der Tabakpflanze ist Myosmin ein Folgeprodukt des Abbaus von Nicotin. Aus dem Demethylierungsprodukt Nornicotin entsteht irreversibel Myosmin durch Dehydrogenierung [38;127]. Als *Zwickenpflug et al.* [2] in Hasel- und Erdnüssen via GC/MS Myosmin nachwies, wurde das gleichzeitige Vorkommen von Nicotin nicht mit untersucht. Aufgrund der ihnen damals vorliegenden Literatur ging man davon aus, dass Nicotin nur in der Familie der Nachtschattengewächse, *Solanaceae*, vorkommt. Deshalb postulierte man, dass es für Myosmin in Nüssen und in den später von *Tyroller et al.* [5;6] untersuchten zahlreichen Nahrungsmitteln von weiteren Pflanzenfamilien einen alternativen Bildungsweg unabhängig von Nicotin geben muss. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da in keinem untersuchten Futtermittel Myosmin ohne Nicotin auftrat.

Neben der Tabakpflanze wurde Myosmin auch gemeinsam mit Nicotin in den Nachtschattengewächsen *Cestrum nocturnum* [28] und *Duboisia hopwoodii* [29] nachgewiesen. *Tyroller et al.* [5;6] fügten dieser Liste Kartoffeln und Tomaten hinzu. Bereits 1968 berichteten *Smalberger et al.* [26] aber auch vom gemeinsamen Auftreten von Myosmin und Nicotin in *Carica Papaya* [9], die nicht zu der Pflanzenfamilie der *Solanaceae* gehört. Mit dem viel beachteten Vorkommen von Nicotin in Pilzen [65;66] wurde mittlerweile gezeigt, dass das Alkaloid sogar außerhalb des Pflanzenreichs synthetisiert wird.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine weite Verbreitung von Nicotin bestätigt werden. Zwar wurden in Heu mit 4,43 ng/g die höchsten Nicotinkonzentrationen gemessen, was wegen der heterogenen Struktur, die auch in Grassilage vorliegt, auf möglicherweise enthaltene Nachtschattengewächse zurückzuführen sein könnte. Nicotin war aber auch in Mais, Soja, Wintergerste und Zuckerrüben nachweisbar, also in Pflanzen, die allesamt nicht der Familie der *Solanaceae* angehören. Die Zuordnung von Nicotin zu bestimmten Pflanzenfamilien bedarf dringend weiterer Untersuchungen.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zum Myosmin- und Nicotiningehalt in Futtermitteln (Abb. 47) zeigt, dass die Myosminkonzentrationen 10-20-fach niedriger sind als jene von Nicotin. Dies ist ein geringerer Unterschied als in den meisten Tabakpflanzen. Es gibt jedoch Ausnahmen, wie etwa der Perique-Tabak mit einer höheren Demethylierungskapazität für Nicotin. Aus dem gebildeten Nornicotin entsteht hier in der Folge auch mehr Myosmin als bei den heute üblicherweise verwendeten Tabaksorten [20]. Nachdem über die Biosynthese und den Abbau von Nicotin in anderen Pflanzen als Tabak so gut wie nichts bekannt ist, kann

über die Herkunft von Myosmin in den Futterpflanzen keine wissenschaftlich fundierte Aussage gemacht werden.

## 5.2 Myosmin in Pansensaft

Neben der These, dass Myosmin in Muttermilch durch nahrungsbedingte Myosminaufnahme vorkommt, wäre es theoretisch ebenso möglich, dass es endogen aus unbekanntem Vorläufer in der Nahrung synthetisiert wird. Aus diesem Grund verfolgte man den Weg der Ingesta weiter.

Um die Ergebnisse der Pansensaftproben beurteilen zu können, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es sich bei diesem Probenmaterial nicht lediglich um zerkleinertes Futter im Verdauungstrakt des Rindes handelt, sondern dass die aufgenommene Nahrung vielen Einflüssen unterliegt, die sich aus dem speziellen Verdauungssystem des Wiederkäuers ergeben. Somit kann der Myosmingehalt der Pansensaftproben von durchschnittlich 0,10 ng/ml nicht einfach als mittlere Myosminzufuhr über die Nahrung interpretiert werden.

Die Futtergrundlage der Unterordnung Ruminantia bilden Gräser. Trotz der hohen Bestandteile an Pflanzenfasern, wie beispielsweise Cellulose, Hemicellulose, Lignin oder Pektin und des geringen Proteinanteils älterer Gräser, ist es unter den Säugetieren allein dem Wiederkäuer möglich, dieses Futter effektiv zu nutzen. Die  $\beta$ -glycosidische Bindung im Cellulosemolekül, die die Glucosemonomere verbindet, kann von anderen Säugetieren mangels cellulolytischer Enzyme nicht gespalten werden. Wiederkäuer besitzen ein Vormagensystem und Fermentationskammern im Dickdarm, in welchen Protozoen, Bakterien und Pilze das Futter unter anaeroben Bedingungen aufschließen. Die Bakterienpopulation wird maßgeblich von anaeroben Keimen gebildet. Sauerstoffverwertende Bakterien stellen ein anaerobes Milieu und ein negatives Redoxpotenzial im Vormagensystem sicher, welches sich auf Myosmin und Nicotin auswirken könnte [109].

Die mikrobielle Besiedelung bildet eine symbiotische Beziehung, in der das Wirtstier den Mikroorganismen eine konstante Temperatur und Substrat bereitstellt, das Fließgleichgewicht durch Speichelsekretion sicherstellt und den Flüssigkeits- bzw. Partikelumsatz erhält. Die Mikroorganismen stellen dagegen dem Wirtstier durch Fermentations- und Syntheseleistungen wichtige Nährstoffe in Form von kurzkettigen Fettsäuren, mikrobiellem Protein, essentiellen und nichtessentiellen Aminosäuren und wasserlöslichen Vitaminen bereit [109].

Der Fermentierungsprozess setzt eine lange Verweildauer der Ingesta im Vormagensystem voraus. Durch Inkubation von frischem Pansensaft bei Körpertemperatur könnten Hinweise gewonnen werden, inwiefern sich mikrobielle Einflüsse auf den Myosmingehalt im Pansensaft auswirken.

Durch Fermentierung von Kohlenhydraten entstehen kurzkettige Fettsäuren (SCFA). Die Säuren werden gepuffert durch Bicarbonat, welches zusammen mit Phosphat im Speichel des Wiederkäuers in besonders hohen Konzentrationen vorkommt. Der Speichel wird beim Rind in Mengen von bis zu 180 l/d sezerniert [106]. Eine zu rasche Futterumstellung in Richtung leicht fermentierbarer Kohlenhydrate kann zu einer Pansenacidose führen. Ein Missverhältnis der Futterration in Richtung Proteingehalt führt durch ein relativ zu hohes Stickstoffangebot zu einer Pansenalkalose. Stehen diese Futterkomponenten im Gleichgewicht, liegt der pH Wert der Vormagenflüssigkeit physiologisch bei 5,5-7,0 [109].

Bei einem pH Wert von 6,8 liegt Myosmin nur zu 1% in der offenkettigen Form vor. Allerdings steigt mit sinkendem pH Wert der Anteil der offenkettigen Form und somit der Grad der Hydrophilie [43;44]. Da die Art des Futters Auswirkungen auf den pH Wert des Panseninhalts und damit auf die Lipidlöslichkeit von Myosmin hat, könnte sie so auch die Resorptionskapazität von Myosmin beeinflussen und neben der Myosminzufuhr auch eine Rolle für den Myosmingehalt im Plasma spielen. Solange aber keine Erkenntnisse über die genauen gastrointestinalen Resorptionsvorgänge vorliegen, kann über diesen Zusammenhang nur spekuliert werden.

Myosmin war in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Pansensaft vorhanden. Dies würde sich mit den Konzentrationen in den untersuchten Futtermitteln vereinbaren lassen. Um aber genauere Aussagen zu erhalten, müsste in einem Fütterungsversuch Myosmin zuerst in der Nahrung quantifiziert werden und anschließend der Pansensaft in zeit- und pH-abhängigen Messungen untersucht werden.

Nicotin ist mit 0,31 ng/ml im Vergleich zu den Futtermitteln in geringeren Konzentrationen vertreten. Ob sein Abbau möglicherweise bereits im Rindervormagen vonstatten geht und ob gegebenenfalls dort der Metabolisierungsweg des Nicotins dem Abbauweg in der Leber entspricht, bedarf weiterer Forschung.

### 5.3 Myosmin in Plasma

Den Beitrag der Fütterung zum Myosmingehalt im Plasma von Schweinen zeigte *Schütte-Borkovec* [9] in ihrer Dissertation. Gegenüber nüchternen Schweinen, bei denen das Blut im Rahmen der Schlachtung gewonnen wurde, war die Myosminkonzentration bei Schweinen, bei denen das Blut 1 Stunde nach Beginn der Fütterung gewonnen wurde, von durchschnittlich 0,066 ng/ml um das 7,5-fache auf 0,497 ng/ml erhöht. Das Schweinefutter enthielt 124 ng Myosmin/g.

Trotz des im Vergleich zu dem Schweinefutter weitaus geringeren Myosmingehalts der untersuchten Futtermittel und der Tatsache, dass die Blutabnahme bei den Rindern vor der Fütterung erfolgte, lag der Myosmingehalt im Plasma der Rinder bei 0,12 ng/ml. Die

Plasmawerte können aber dennoch nicht direkt mit denen nüchterner Schweine oder Menschen verglichen werden, da aufgrund der gastrointestinalen Besonderheiten der Wiederkäuer, insbesondere dem Wiederkäuen selbst, im Vergleich zu Mensch und Schwein völlig andere zeitliche Verläufe vorherrschen und durch den portionsweisen Weiterschub der Ingesta aus dem Vormagen Resorptionsvorgänge auch noch einige Zeit nach der Futteraufnahme stattfinden.

Die Plasmakonzentration befindet sich in der gleichen Größenordnung wie die Myosminkonzentrationen im Pansensaft. Um aber Schlussfolgerungen über die Resorptionsrate zu ziehen, müssten die Myosminkonzentrationen in Pansensaft und Plasma bei einer größeren Anzahl von Tieren gleichzeitig und zu verschiedenen Zeiten vor und nach der Fütterung gemessen werden. Die vorliegenden Versuchsbedingungen haben diesbezüglich keine Aussagekraft.

Die mittleren Konzentrationen von Myosmin im Plasma von Schafen unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Rinder. Ein größerer Unterschied trat bei den Ergebnissen der Nicotin- und Cotininbestimmungen auf. Während Nicotin nur im Schafplasma auftrat, war Cotinin beim Schaf in keiner, beim Rind in 2 von 6 Plasmaproben nachweisbar.

Auch in Schweineplasma konnte *Schütte-Borkovec* [9] kein Cotinin finden. Sie folgerte daraus, dass im Schweinefutter kein Nicotin in vergleichbarer Menge wie Myosmin vorhanden sein konnte. Demzufolge müsste die Myosminbildung in den Futterpflanzen nicht über den Abbau von Nicotin zu Nornicotin mit anschließender Dehydrogenierung, sondern über einen alternativen, bisher unbekannte Biosyntheseweg unabhängig von einer primären Nicotinbildung laufen.

Dem stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegenüber, die zeigen, dass Myosmin in allen untersuchten Futterpflanzen gemeinsam mit Nicotin vorkommt und auch noch meist in deutlich geringerer Konzentration. Die Wahrscheinlichkeit eines nicotinunabhängigen Syntheseweges von Myosmin konnte somit nicht bestätigt werden. Schwer verständlich ist in diesem Zusammenhang aber, warum trotz höherer Nicotin- als Myosminaufnahme mit dem Futter im Blut der Nutztiere Cotinin kaum nachweisbar war. Beim Menschen führt selbst eine geringe Nicotinbelastung wie z.B. durch das Passivrauchen immer zu messbaren Cotininkonzentrationen im Plasma [69]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Nicotin insbesondere bei den hier in Frage kommenden niedrigen Konzentrationen keiner dem Menschen vergleichbaren Toxikokinetik unterliegt. Eine andere Erklärung wäre eine endogene Myosminbildung, die schon beim Menschen wegen der Diskrepanz der mit der Nahrung aufgenommenen und der im Plasma gemessenen Myosminkonzentrationen diskutiert wurde (siehe Kap. 2.1.1.1). Fehlende Informationen zur Toxikokinetik von Myosmin sowohl beim Menschen als auch den

hier untersuchten Nutztieren machen theoretische Berechnungen zu nötigen Aufnahmemengen des Myosmins in Relation zu den gemessenen Plasmakonzentrationen spekulativ.

Hierfür und für die Erklärung der tierartlichen Unterschiede hinsichtlich der Nicotin- und Cotininkonzentrationen im Plasma bedarf es weiterer Untersuchungen.

#### **5.4 Myosmin in Urin**

In den bisherigen Untersuchungen im Arbeitskreis von Richter und Zwickenpflug hatte es keinen Hinweis auf eine Ausscheidung von unverändertem Myosmin im Urin von Ratten gegeben [6;48]. Diese Ergebnisse beruhten auf Versuchen mit radioaktiven Myosmin und Nachweis von Myosmin und seiner Metaboliten nach Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit einem on-line Radioaktivitätsdetektor. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen aber, dass Myosmin durchaus mit der verwendeten hochempfindlichen GC/MS-Methode im Urin nachgewiesen werden kann. In 4 von 5 Rinderurinproben wurde Myosmin mit einer mittleren Konzentration von 0,04 ng/ml gefunden. Eine Bestätigung findet dieses Ergebnis durch weitere Untersuchungen im Arbeitskreis, die gezeigt haben, dass auch im menschlichen Urin Myosmin nachgewiesen werden kann (Eggert, persönliche Mitteilung).

#### **5.5 Myosmin in Klauenhorn**

Basierend auf Berichten von *Al-Delaimy et al.* [128;129] führten erste Untersuchungen von *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] zum Nachweis von Myosmin neben Nicotin und Cotinin in Zehennägeln von Menschen. Während Cotinin nur in Nägeln von Rauchern nachweisbar war, konnte Myosmin und Nicotin sowohl bei einem Teil der Nichtraucher als auch bei fast allen Rauchern bestimmt werden. Der weitaus geringere Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern bei Myosmin (3,1-fach) im Vergleich zum Nicotin (15-fach) wurde als Hinweis auf zusätzliche Belastungsquellen unabhängig von Tabak und Tabakrauch gewertet. Seitdem wird in unserer Forschungsgruppe regelmäßig der Nicotin- und Cotiningehalt in Zehennägeln bestimmt, um Probanden entsprechend ihres Rauchstatus einzustufen.

Das von *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] entwickelte Aufreinigungs- und Analyseverfahren wurde auch an Klauenhorn von 5 tief gefrorenen Rinderbeinen durchgeführt. Wie zu erwarten war, konnte kein Cotinin identifiziert werden. Die Nichtraucherwerte von *Schütte-Borkovec et al.* [9;10] für Nicotin mit  $0,132 \pm 0,082$  ng/mg und Myosmin mit  $0,021 \pm 0,15$  ng/mg wurden allerdings im Klauenhorn der Rindern nicht erreicht. Die Chromatogramme ergaben zwar Hinweise auf das Vorhandensein der beiden Alkaloide (Abb. 60 und 61), die gemessenen Werte lagen aber alle unter der Nachweisgrenze.

## 6 Zusammenfassung

Myosmin war eines der ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloide. Aufgrund seiner im Vergleich zu Nicotin geringeren akuten Toxizität und seiner geringen Affinität zu Nicotinrezeptoren war es jedoch kaum Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. In unserem Arbeitskreis gelang der Nachweis von Myosmin in einer Reihe von Nahrungsmitteln und seiner weiten Verbreitung im menschlichen Körper. Auch bei nüchternen Schweinen war eine Grundbelastung des Plasmas nachweisbar.

Nachdem Myosmin auch unabhängig von Nicotin auftrat, vermutete man, dass das Vorkommen des Alkaloids mit der Aufnahme über die Nahrung zu erklären ist. Eine weitere Möglichkeit stellte die Synthese aus Vorläufern in der Nahrung oder die Synthese aus körpereigenen Stoffen dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte Myosmin in der Nahrungskette am Beispiel Rind nachverfolgt werden. So wurde die Konzentration des Alkaloids zuerst in 8 verschiedenen Futtermitteln und anschließend in Pansensaft, Plasma und Urin sowie in Horn von Rinderklauen mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS) bestimmt. In Kuhmilch war Myosmin bereits im Arbeitskreis in Spuren nachgewiesen worden, Sahne enthielt Myosminkonzentrationen von bis zu 6,26 ng/g. Auch beim Menschen lagen bereits Daten über die Gehalte des Alkaloids in Speichel, Plasma, Zehennägeln und Muttermilch vor. In der vorliegenden Arbeit wurden, neben Myosmin, Nicotin und Cotinin stets mitbestimmt.

Die Ergebnisse der Myosmin, Nicotin- und Cotininmessungen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die im Arbeitskreis bereits etablierten **Aufreinigungs- und Analysemethoden** wurden auf alle Matrices erfolgreich angewandt. Lediglich die Cotininbestimmung in Silage und Grascobs sowie die Nicotinbestimmung in Grascobs lieferten wegen Überlagerungen in den GC/MS-Chromatogrammen keine eindeutigen Ergebnisse.
- Myosmin war mit Ausnahme von Grassilage in allen **Futtermittelsorten** (n = 3) nachzuweisen:

Die höchsten Myosminkonzentrationen enthielten Grascobs und Zuckerrübenschnitzel mit je 0,76 ng/g. Der Gehalt des Alkaloids im Heu betrug 0,27 ng/g. Maisschrot wies eine Myosminkonzentration von 0,16 ng/g, Sojaschrot von 0,15 ng/g auf. Die geringsten Mengen wurden in Maissilage mit 0,06 ng/g und Wintergerstenschrot mit 0,05 ng/g nachgewiesen.

Nicotin konnte in 7 der 8 Futtermittelsorten nachgewiesen werden. Die Konzentration übertraf die des Myosmins in allen Fällen. So betrug die Nicotinkonzentration in Heu 4,43 ng/g, in Maissilage 2,28 ng/g und in Maisschrot 1,59 ng/g. Die untersuchte

Grassilage enthielt 1,35 ng, das Sojaschrot 1,31 ng Nicotin/g. In Zuckerrübenschnitzeln lag der Nicotiningehalt bei 1,07 ng/g, in Wintergerstenschrot betrug er 0,73 ng/g.

Das gleichzeitige Vorkommen höherer Nicotinmengen im Vergleich zu Myosmin unterstützt nicht die Auffassung, dass im Gegensatz zur Tabakpflanze in den Futterpflanzen Myosmin über einen von Nicotin unabhängigen Syntheseweg gebildet werden muss.

Cotinin konnte nur in Maisschrot mit 0,42 ng/g und in Heu mit 0,41 ng/g nachgewiesen werden.

- **Pansensaftproben** von 12 Rindern ergaben für Myosmin (MW  $\pm$  SD)  $0,10 \pm 0,07$  ng/ml und für Nicotin  $0,31 \pm 0,24$  ng/ml. Cotinin trat nur in einer Pansensaftprobe mit 0,04 ng/ml auf. Im Pansensaft besteht eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von Myosmin und Nicotin (Spearman  $r = 0,804$ ;  $p = 0,002$ ) in.
- In **Rinderplasma** ( $n = 6$ ) trat Myosmin in allen Proben mit einem durchschnittlichen Gehalt (MW  $\pm$  SD) von  $0,12 \pm 0,06$  ng/ml auf. Cotinin war nur in 3 von 6 Proben nachzuweisen, die Konzentration lag bei  $0,16 \pm 0,20$  ng/ml. Nicotin war in keiner Probe zu identifizieren.
- **Schafplasma** ( $n = 12$ ) enthielt dagegen kein Cotinin, aber Nicotin in einer Konzentration (MW  $\pm$  SD) von  $0,58 \pm 0,67$  ng/ml. Die Myosminkonzentration betrug  $0,09 \pm 0,06$  ng/ml und unterschied sich nicht signifikant von der Myosminkonzentration im Rinderplasma.
- Im **Rinderurin** ( $n = 5$ ) war Myosmin (MW  $\pm$  SD) mit  $0,04 \pm 0,03$  ng/ml vertreten. Nur in je 2 Proben konnte Nicotin ( $0,24 \pm 0,38$  ng/ml) und Cotinin ( $0,35 \pm 0,50$  ng/ml) nachgewiesen werden.
- Im **Klauenhorn** von Rindern ( $n = 5$ ) konnte kein Cotinin identifiziert werden. Die in den GC/MS-Chromatogrammen identifizierbaren Myosmin- und Nicotiningehalte lagen unter der Nachweisgrenze.

## 7 Summary

The chemical structure of myosmine has been one of the first being clarified among tobacco alkaloids. Because of its low acute toxicity and the weak affinity to nicotinic receptors, little attention has been paid to myosmine for a long time.

Recently, myosmine has been detected in a great variety of staple foods as well as in human body and fasting pigs in our research group.

With its occurrence largely independent from nicotine in nonsmokers, the major source of myosmine in humans was supposed to be primarily associated with food intake. Another possibility, synthesis of myosmine from precursors in food or endogenous synthesis has also been discussed.

In the present study myosmine was investigated in the food chain using the example of cattle. Therefore myosmine was measured in feeding stuff, in ruminal liquid, plasma and urine as well as in horn of bovine claws by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Traces of myosmine have already been identified in cow's milk and cream contained myosmine at 6.26 ng/g. In humans, the alkaloid has been verified in saliva, plasma, toenails and breast milk. In the present study nicotine and cotinine were determined in addition to myosmine.

The results can be summarized as follows:

- The **purification and analytical method** has already been established in our working group. It was successfully applied to all matrices except for cotinine in grass and corn silage as well as in shredded corn and for nicotine in grass pellets because of interfering noise in the GC/MS chromatograms.
- Myosmine was identified in all kinds of **feeding stuff** (n = 3) other than grass silage.

The highest content of myosmine was detected in grass pellets and sugar beet chips with a concentration of 0.76 ng/g each. Hay contained myosmine at 0.27 ng/g, shredded corn at 0.16 ng/g and shredded soy at 0.15 ng/g. The lowest myosmine concentrations were present in corn silage (0.06 ng/g) and shredded winter barley (0.05 ng/g).

Nicotine could be verified in 7 of 8 kinds of feeding stuff. The concentrations of nicotine outranked the concentrations of myosmine in all cases with 4.43 ng/g in hay, 2.28 ng/g in corn silage, 1.59 ng/g in shredded corn, 1.35 ng/g in grass silage, 1.31 ng/g in shredded soy, 1.07 ng/g in sugar beet chips and 0.73 ng/g in shredded winter barley.

The simultaneous presence of nicotine at higher concentrations than myosmine does not support the hypothesis that myosmine should be synthesized in forage plants by alternative pathways compared to tobacco plants.

Cotinine was only detected in shredded corn at 0.42 ng/g and in hay at 0.41 ng/g.

- In 12 samples of **ruminal liquid** myosmine (mean  $\pm$  SD) amounted to  $0.10 \pm 0.07$  ng/ml and nicotine to  $0.31$  ng/ml. Cotinine could only be identified in one sample at  $0.04$  ng/ml. A significant correlation exists between the concentrations of myosmine and nicotine (Spearman  $r = 0.804$ ;  $p = 0.002$ ).
- Myosmine was detected in all 6 samples of **bovine plasma** (mean  $\pm$  SD) at  $0.12 \pm 0.06$  ng/ml. Cotinine could only be detected in 3 samples ( $0.16 \pm 0.20$  ng/ml) and nicotine could not be found in any sample.
- In contrast to bovine plasma, 12 samples of **sheep plasma** contained no cotinine but nicotine at (mean  $\pm$  SD)  $0.58 \pm 0.67$  ng/ml. The concentration of myosmine was  $0.09 \pm 0.06$  ng/ml which was not significantly different from that in bovine plasma.
- In **bovine urine** ( $n = 5$ ) myosmine (mean  $\pm$  SD) was present at  $0.04 \pm 0.03$  ng/ml. Nicotine ( $0.24 \pm 0.38$  ng/ml) and cotinine ( $0.35 \pm 0.50$  ng/ml) were detectable in only 2 out of the 5 samples each.
- In **horn** of bovine claws ( $n = 5$ ) no cotinine was detectable. The verified peaks for myosmine and nicotine were below the limit of detection.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Wenusch,A. and Schöller,R. (1933) Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Zigarrenrauches. *Fachl.Mitt.Österr.Tabakregie* **2**, 15-19.
2. Tso,T.C. and Jeffrey,R.N. (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in Maryland tobacco. *Arch.Biochem.Biophys.* **43**, 269-285.
3. Kisaki,T. and 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.
4. Zwickenpflug,W., Meger,M. and 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.
5. Tyroller,S., Zwickenpflug,W. and Richter,E. (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. *J.Agric.Food Chem.* **50**, 4909-4915.
6. Tyroller,S. (2004) Untersuchungen zu Vorkommen und Metabolismus von Myosmin und chemopräventive Effekte von verschiedenen Tabakalkaloiden und tabakspezifischen Nitrosaminen auf den Stoffwechsel von *N*-Nitrosornikotin. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU.
7. Maier,M. (2005) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU.
8. Maier,M., Schulze,A. and Richter,E. (2005) Biomonitoring of myosmine in human milk and saliva. *Toxicol.Lett.* **158**, S201-S202.
9. Schütte-Borkovec,K. (2008) Vorkommen und Toxikokinetik von Myosmin in Abhängigkeit von Rauchen und Ernährung. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
10. Schütte-Borkovec,K., Heppel,C.W., Heling,A.-K. and Richter,E. (2009) Analysis of myosmine, cotinine and nicotine in human toenail, plasma and saliva. *Biomarkers* **14**, 278-284.
11. Bush,L.P., Fannin,F.F., Chelvarajan,R.L. and Burton,H.R. (1993) Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. In *Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion* (Gorrod,J.W. and Wahren,J., eds.), pp. 1-30, Chapman & Hall, London
12. Bush,L.P. (1981) Physiology and biosynthesis of tobacco alkaloids. *Rec.Adv.Tobacco Sci.* **7**, 75-106.

13. Sisson,V.A. and Severson,R.F. (1990) Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. Beitr.Tabakforsch.Int. **14**, 327-339.
14. Rundlöf,T., Olsson,E., Wiernik,A. et al. (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.
15. Fejér-Kossey,O. (1972) Myosmine in different organs of tobacco plant. Phytochemistry **11**, 415-416.
16. Fejér-Kossey,O. (1967) Separation of ten tobacco alkaloids by thin-layer chromatography. J.Chromatogr. **31**, 592-593.
17. Sisler,E.C. (1969) Determination of myosmine with o-aminobenzaldehyde. Anal.Biochem. **31**, 183-188.
18. Mönnikes,R.N. (2006) Bestimmung von Myosmin in den Organen der Tabakpflanze mittels comprehensive zweidimensionaler Gaschromatographie. Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Biologie der Universität Wuppertal.
19. Schumacher,J.N. (1984) Flavor composition of Maryland tobacco. Beitr.Tabakforsch.Int. **12**, 271-278.
20. Leffingwell,J.C. and Alford,E.D. (2005) Volatile constituents of Perique tobacco. EJEAFChe **4**, 899-915.
21. Brunnemann,K.D., Qi,J. and Hoffmann,D. (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. Food Chem.Toxicol. **40**, 1699-1703.
22. Sharma,A.K., Prokopczyk,B. and Hoffmann,D. (1991) Supercritical fluid extraction of moist snuff. J.Agric.Food Chem. **39**, 508-510.
23. Sakuma,H., Kusama,M., Yamaguchi,K., Matsuki,T. and Sugawara,S. (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. Beitr.Tabakforsch.Int. **12**, 199-209.
24. Jenkins,R.A., Palausky,M.A., Counts,R.W., Guerin,M.R., Dindal,A.B. and Bayne,C.K. (1996) Determination of personal exposure of non-smokers to environmental tobacco smoke in the United States. Lung Cancer **14**, S195-S213.
25. Benowitz,N.L. (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. Epidemiol.Rev. **18**, 188-204.
26. Smalberger,T.M., Rall,G.J.H. and de Waal,H.L. (1968) Carica papaya alkaloids. Tydskr. Natuurwet. **8**, 156-157.

27. Yamamoto,I., Soeda,Y., Kamimura,H. and Yamamoto,R. (1968) Nicotinoids as an insecticide. VII. Cholinesterase inhibition by nicotinoids and pyridylalkylamines, its significance to mode of action. *Agr.Biol.Chem.* **32**, 1341-1348.
28. Halim,A.F., Collins,R.P. and Berigari,M.S. (1971) Alkaloids produced by *Cestrum nocturnum* and *Cestrum diurnum*. *Planta Med.* **20**, 44-49.
29. Luanratana,O. and Griffin,W.J. (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* **21**, 449-451.
30. Brand,J.M. and Mpuru,S.P. (1993) Dufour's gland and poison gland chemistry of the myrmicine ant, *Messor capensis* (Mayr). *J.Chem.Ecol.* **19**, 1315-1321.
31. Cruz-López,L., Jackson,B.D., Hefetz,A. and Morgan,E.D. (2006) Alkaloids in the venom of *Messor* ants. *Biochem.Syst.Ecol.* **34**, 199-204.
32. Co,J.E., Jones,T.H., Hefetz,A., Tinaut,A. and Snelling,R.R. (2003) The comparative exocrine chemistry of nine Old World species of *Messor* (Formicidae: Myrmicinae). *Biochem.Syst.Ecol.* **31**, 367-373.
33. Zwickenpflug,W., Meger,M. and 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.
34. Dempsey,D., Tutka,P., Jacob,P. et al. (2004) Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin.Pharmacol.Ther.* **76**, 64-72.
35. Leete,E. (1974) Biosynthesis of the minor alkaloids of tobacco. *Bates: 501400361-501400382*. <http://tobaccodocuments.org/bw/1057735.html>
36. Alworth,W.L. and Rapoport,H. (1965) Biosynthesis of the nicotine alkaloids in *Nicotiana glutinosa*. Interrelationship among nicotine, nornicotine, anabasine, and anatabine. *Arch. Biochem.Biophys.* **112**, 45-53.
37. Leete,E., Chedekel,M.R. and Bodem,G.B. (1972) Synthesis of myosmine and nornicotine, using an acyl carbanion equivalent as an intermediate. *J.Org.Chem.* **37**, 4465-4466.
38. Leete,E. (1984) The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. *Beitr.Tabakforsch.Int.* **12**, 113-116.
39. Späth,E., Wenusch,A. and Zajic,E. (1936) Die Konstitution des Myosmins (V. Mitteilung über Tabakbasen). *Ber.Dtsch.Chem.Ges.* **69**, 393-396.

40. Späth,E. and 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. **69**, 757-760.
41. Anon. (2010) Sicherheitsdatenblätter von Sigma-Aldrich.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do> .
42. Korte,F. and Schulze-Steinen,H.-J. (1962) Umlagerung von  $\alpha$ -Aroyl-pyrrolidonen in konz. Salzsäure zu Pyrrolinderivaten. Chem.Ber. **95**, 2444-2452.
43. Brandänge,S. and Rodriguez,B. (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. Acta Chem.Scand.Ser.B **37**, 643-644.
44. Zoltewicz,J.A., Bloom,L.B. and Kem,W.R. (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. J.Org.Chem. **54**, 4462-4468.
45. Haines,P.G., Eisner,A. and Woodward,M. (1945) Chemical reactivity of myosmine. J.Am.Chem.Soc. **67**, 1258-1262.
46. Glas,S. (2003) Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
47. Glas,S., Tyroller,S., Zwickenpflug,W., Steiner,K., Kiefer,G. and 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.
48. Zwickenpflug,W., Tyroller,S. and Richter,E. (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. Drug Metab.Dispos. **33**, 1648-1656.
49. 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.
50. Hecht,S.S., Hatsukami,D.K., Bonilla,L.E. and Hochalter,J.B. (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.
51. Ambrose,A.M. and DeEds,F. (1946) Some comparative observations on *l*-nicotine and myosmine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. **63**, 423-424.

52. French,F.A., Freedlander,B.L. and 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**, 203-204.
53. Schroff,K.-C., Aschhoff,S., Schmitz,O. et al. (2000) Effects of the tobacco alkaloid myosmine at cholinergic receptors of sympathetic ganglia. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. **365 (Suppl. 1)**, R87.
54. Ambrose,A.M. and DeEds,F. (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. **63**, 423-424.
55. Clark,M.S.G., Rand,M.J. and Vanov,S. (1965) Comparison of pharmacological activity of nicotine and related alkaloids occurring in cigarette smoke. Arch.Int.Pharmacodyn. **156**, 363-379.
56. Henrich,H., Hessenauer,A. and Brune,H. (1984) Microcirculatory effects of nicotine and related alkaloids. Klin.Wochenschr. **62 Suppl 2**, 92-100.
57. Riveles,K., Iv,M., Arey,J. and Talbot,P. (2003) Pyridines in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning in picomolar doses. Reprod.Toxicol. **17**, 191-202.
58. Riebe,M., Westphal,K. and Fortnagel,P. (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. Mutat.Res. **101**, 39-43.
59. Kleinsasser,N.H., Wallner,B.C., Harréus,U.A., Zwickenpflug,W. and Richter,E. (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. Toxicology **192**, 171-177.
60. Havla,J.B., Hill,C.E., Abdel-Rahman,S.Z. and Richter,E. (2009) Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay. Food Chem.Toxicol. **47**, 237-241.
61. Vogt,S., Fuchs,K. and Richter,E. (2006) Genotoxic effects of myosmine in human esophageal cell lines. Proc.Am.Ass.Cancer Res. **47**, A3566.
62. Brcic Karaconji,I. (2005) Facts about nicotine toxicity. Arh.Hig.Rada Toksikol. **56**, 363-371.
63. Siegmund,B., Leitner,E. and 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.
64. Richter,E. and Scherer,G. (2004) Aktives und passives Rauchen. In Lehrbuch der Toxikologie (Marquardt,H. and Schäfer,S.G., eds.), pp. 897-918, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany

65. Bundesamt für Risikobewertung. (2009) Nikotin in getrockneten Steinpilzen: Ursache muss geklärt werden. Stellungnahme 009/2009. <http://www.bfr.bund.de>
66. Cavalieri,C., Bolzoni,L. and Bandini,M. (2010) Nicotine determination in mushrooms by LC-MS/MS with preliminary studies on the impact of drying on nicotine formation. *Food Add.Contam.* **27**, 473-477.
67. Yildiz,D. (2004) Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* **43**, 619-632.
68. Zevin,S., Gourlay,S.G. and Benowitz,N.L. (1998) Clinical pharmacology of nicotine. *Clin. Dermatol.* **16**, 557-564.
69. Hukkanen,J., Jacob,P. and Benowitz,N.L. (2005) Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* **57**, 79-115.
70. Tricker,A.R. (2006) Biomarkers derived from nicotine and its metabolites: a review. *Beitr. Tabakforsch.Int.* **22**, 147-175.
71. Riah,O., Dousset,J.-C., Courriere,P., Stigliani,J.-L., Baziard-Mouysset,G. and Belahsen,Y. (1999) Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity. *Toxicol.Lett.* **109**, 21-29.
72. Macholz,R.M. and Lewerenz,H.-J. (1989) *Lebensmitteltoxikologie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
73. Spiegelhalder,B., Eisenbrand,G. and 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.
74. Tannenbaum,S.R., Weisman,M. and Fett,D. (1976) Effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet.Toxicol.* **14**, 549-552.
75. Classen,H.-G., Elias,P.S., Hammes,W.P. and Winter,M. (2011) *Toxikologisch-hygiene-sche Beurteilung von Lebensmittelinhaltsstoffen und Zusatzstoffen*, B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany
76. Frey,H.-H. and Löscher,W. (2007) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany
77. Mirvish,S.S. (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.
78. Eisenbrand,G., Fuchs,A. and Koehl,W. (1996) *N*-Nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *Eur.J.Cancer Prev.* **5 (Suppl 1)**, 41-46.

79. Belitz,H.-D., Grosch,W. and Schieberle,P. (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
80. Andersen,R.A., Burton,H.R., Fleming,P.D. and Hamilton-Kemp,T.R. (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res.* **49**, 5895-5900.
81. Nestor,T.B., Gentry,J.S., Peele,D.M., Riddick,M.G., Conner,B.T. and Edwards,M.E. (2003) Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. *Beitr.Tabakforsch.Int.* **20**, 467-475.
82. Djordjevic,M.V., Gay,L.S., Bush,L.P. and Chaplin,J.F. (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J.Agric.Food Chem.* **37**, 752-756.
83. Brunnemann,K.D. and Hoffmann,D. (1991) Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit.Rev.Toxicol.* **21**, 235-240.
84. Tso,T.C. (1990) Tobacco-specific N-nitrosamines. In *Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant* (Tso,T.C., ed.), pp. 467-486, Ideal Inc., Beltsville MD USA
85. Hecht,S.S. and Hoffmann,D. (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv.* **8**, 273-294.
86. Mirvish,S.S. (1975) Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **31**, 325-351.
87. Klimisch,H.J. and Stadler,L. (1976) Formation of N-nitrosornicotine from nicotine N'-oxide. *Talanta* **23**, 614-616.
88. Wilp,J., Zwickenpflug,W. and Richter,E. (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem.Toxicol.* **40**, 1223-1228.
89. Zwickenpflug,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.
90. Caldwell,W.S., Greene,J.M., Dobson,G.P. and deBethizy,J.D. (1993) Intragastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann.NY Acad. Sci.USA* **686**, 213-228.
91. Hoffmann,D., Amin,S., Brunnemann,K.D., Prokopczyk,B., Rivenson,A. and Hecht,S.S. (1990) Tobacco-specific N-nitrosamines: analysis, bioassays and biochemical studies. In *N-Nitroso Compounds. Biology and Chemistry* (Bhide,S.V. and Rao,K.V.K., eds.), pp. 59-79, Omega Sci Publ, New Delhi

92. Hoffmann,D., Brunnemann,K.D., Prokopczyk,B. and Djordjevic,M.V. (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J.Toxicol.EnvIRON.Health A* **41**, 1-52.
93. Hecht,S.S., Han,S., Kenney,P.M. et al. (2007) Investigation of the reaction of myosmine with sodium nitrite in vitro and in rats. *Chem.Res.Toxicol.* **20**, 543-549.
94. Hecht,S.S. (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem.Res.Toxicol.* **11**, 559-603.
95. Zwickenspflug,W., Tyroller,S. and Richter,E. (2004) Peroxidation of myosmine. *Proc.Am. Ass.Cancer Res.* **45**, A3207.
96. Ziegel,R., Shallop,A., Jones,R. and 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.
97. Peterson,L.A., Liu,X.-K. and Hecht,S.S. (1993) Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O<sup>6</sup>-methylguanine. *Cancer Res.* **53**, 2780-2785.
98. Zwickenspflug,W. and Tyroller,S. (2006) Reaction of the tobacco alkaloid myosmine with hydrogen peroxide. *Chem.Res.Toxicol.* **19**, 150-155.
99. Richter,E., Schlöbe,D., Hölzle,D. and Wilp,J. (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and *N*-nitrosonornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **365 (Suppl.1)**, R140.
100. Hölzle,D., Schlöbe,D., Richter,E., Ostermeier-Hatz,D., von Meyer,L. and Tricker,A.R. (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.
101. Boeckxstaens,G.E.E. (2007) Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **26**, 149-160.
102. Lenglinger,J., Ringhofer,C., Eisler,M. et al. (2006) Diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Eur.Surg.* **38**, 227-243.
103. Chen,X.X. and Yang,C.S. (2001) Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* **22**, 1119-1129.
104. Olliver,J.R., Hardie,L.J., Gong,Y. et al. (2005) Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14**, 620-625.

105. Dyce, K.M., Sack, W.O. and Wensing, C.J.G. (1991) *Anatomie der Haustiere. Lehrbuch für Studium und Praxis*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
106. Bragulla, H. and König, H.E. (2002) *Milchdrüse (Mamma)*. In *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Band II Organe, Kreislauf- und Nervensystem* (König, H.E. and Liebich, H.-G., eds.), pp. 335-344, Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany
107. Krömker, V. (2007) *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*, Parey Verlag bei MVS, Stuttgart, Germany
108. McManaman, J.L. and Neville, M.C. (2003) *Mammary physiology and milk secretion*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 629-641.
109. von Engelhardt, W. and Breves, G. (2005) *Physiologie der Haustiere*, Enke Verlag in MVS, Stuttgart, Germany
110. Ito, S. and Lee, A. (2003) *Drug excretion into breast milk - Overview*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 653-665.
111. Fleishaker, J.C. (2003) *Models and methods for predicting drug transfer into human milk*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 643-652.
112. Oberdisse, E., Hackenthal, E. and Kuschinsky, K. (2001) *Pharmakologie und Toxikologie*, Axel Springer Verlag, Berlin, Germany
113. Agatonovic-Kustrin, S., Tucker, I.G., Zecevic, M. and Zivanovic, L.J. (2000) *Prediction of drug transfer into human milk from theoretically derived descriptors*. *Anal. Chim. Acta* **418**, 181-195.
114. Luck, W. and Nau, H. (1984) *Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **18**, 9-15.
115. Steldinger, R., Luck, W. and Nau, H. (1988) *Half lives of nicotine in milk of smoking mothers: implications for nursing*. *J. Perinat. Med.* **16**, 261-262.
116. Weiß, J., Pabst, W., Strack, K.E. and Granz, S. (2005) *Tierproduktion*, Parey Verlag bei MVS, Stuttgart
117. Töpel, A. (2004) *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel*. In *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel B*. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany
118. Dewailly, É., Ayotte, P., Laliberté, C., Weber, J.-P., Gingras, S. and Nantel, A.J. (1996) *Polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in the breast milk of women in Quebec*. *Am. J. Publ. Health* **86**, 1241-1246.

119. LaKind, J.S., Berlin, C.M. and Naiman, D.Q. (2001) Infant exposure to chemicals in breast milk in the United States: what we need to learn from a breast milk monitoring program. *Environ. Health Perspect.* **109**, 75-88.
120. LaKind, J.S., Birnbach, N., Borgert, C.J., Sonawane, B.R., Tully, M.R. and Friedman, L. (2002) Human milk surveillance and research of environmental chemicals: concepts for consideration in interpreting and presenting study results. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**, 1909-1928.
121. Dahlström, A., Lundell, B., Curvall, M. and Thapper, L. (1990) Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr. Scand.* **79**, 142-147.
122. Dahlström, A., Ebersjö, C. and Lundell, B. (2004) Nicotine exposure in breastfed infants. *Acta Paediatr.* **93**, 810-816.
123. Luck, W. and Nau, H. (1987) Nicotine and cotinine concentrations in the milk of smoking mothers: influence of cigarette consumption and diurnal variation. *Eur. J. Pediatr.* **146**, 21-26.
124. Ilett, K.F., Hale, T.W., Page-Sharp, M., Kristensen, J.H., Kohan, R. and Hackett, L.P. (2003) Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**, 516-524.
125. Anon (1994) DIN 32 645: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung, Beuth Verlag, Berlin, Germany
126. Kamphues, J., Coenen, M. and Kienzle, E. (2004) Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung, Schaper, Hannover
127. Leete, E. and Chedekel, M.R. (1974) Metabolism of nicotine in *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry* **13**, 1853-1859.
128. Al-Delaimy, W.K., Mahoney, G.N., Speizer, F.E. and Willett, W.C. (2002) Toenail nicotine levels as a biomarker of tobacco smoke exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 1400-1404.
129. Al-Delaimy, W.K. and Willett, W.C. (2008) Measurement of tobacco smoke exposure: comparison of toenail nicotine biomarkers and self-reports. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1255-1261.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturen von Tabakalkaloiden .....	- 2 -
Abbildung 2:	Nebenalkaloide des Tabaks .....	- 2 -
Abbildung 3 :	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. [7] .....	- 6 -
Abbildung 4:	Myosmin im Speichel von 8 Probanden (3 Männer und 5 Frauen, 3 Raucher und 5 Nichtraucher) vor und nach einem gemeinsamen Mittagessen [9].....	- 7 -
Abbildung 5:	Biosynthese von Myosmin durch Dehydrogenierung von Nornicotin.....	- 8 -
Abbildung 6:	Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin.....	- 8 -
Abbildung 7:	Autoradiogramme 0,1 bis 24 Stunden nach Applikation von <sup>14</sup> C-Myosmin [47].....	- 10 -
Abbildung 8:	Metaboliten von Myosmin (Rattenurin) [48].....	- 11 -
Abbildung 9:	Quantitatives Schema der Hauptmetaboliten von Nicotin. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil von Nicotin und seinen Metaboliten im 24-Std.-Urin von Rauchern an (modifiziert nach Richter und Scherer) [64]. .....	- 15 -
Abbildung 10:	Schema der Nitrosierung.....	- 16 -
Abbildung 11:	Bildung der TSNA (in Abwandlung nach <i>Hoffmann et al.</i> [92]) .....	- 19 -
Abbildung 12:	pH-abhängige Nitrosierung von Myosmin [89] .....	- 20 -
Abbildung 13:	Aktivierung von TSNA und Myosmin zu HPB-freisetzenden Addukten [88;94;95] .	- 21 -
Abbildung 14:	Mechanismen, die zur Entstehung eines Adenokarzinoms im Ösophagus führen (nach <i>Chen et al.</i> [103]).....	- 22 -
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der Milchdrüse und ihres Aufhängeapparates [106].....	- 23 -
Abbildung 16:	Histologische Schnitte durch das Parenchym einer Milchdrüse des Rindes [106] .	- 24 -
Abbildung 17:	Sagittalschnitt durch die Zitze eines Rindes [106].....	- 25 -
Abbildung 18:	Alveolarzellen der Milch produzierenden Milchdrüse [108].....	- 26 -
Abbildung 19:	Schematische Darstellung einer Alveole im Euter des Rindes [109] .....	- 27 -
Abbildung 20:	Schematische Verteilung von Wirkstoffen in Milch und Plasma [111]. .....	- 28 -
Abbildung 21:	Bestandteile der Milch [117]. .....	- 30 -
Abbildung 22:	Nicotinkonzentrationen in der Milch in Abhängigkeit vom Zeitabstand zwischen dem Rauchen (o) oder Schnupfen (●) und dem Stillen (modifiziert nach <i>Dahlström et al.</i> [122]). .....	- 32 -
Abbildung 23:	Konzentrationen von Myosmin (links) und Cotinin (rechts) in Muttermilch nach Rauchstatus (NR = Nichtraucher; PR = Passivraucher; R = Raucher) mit Angabe des Mittelwertes [7] .....	- 34 -
Abbildung 24:	Abhängigkeit der Myosminkonzentration in der Muttermilch von Nichtrauchern vom pH Wert $r^2 = 0,2954$ ( $p = 0,084$ ) [7].....	- 34 -
Abbildung 25:	Struktur der Strata-X-C-Säulen .....	- 38 -
Abbildung 26:	Festphasenextraktion .....	- 41 -
Abbildung 27:	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	- 43 -
Abbildung 28:	Überführung der Proben in Hexan.....	- 44 -
Abbildung 29:	Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin und Cotinin für Plasma .....	- 55 -
Abbildung 30:	Kalibriergeraden der Verdünnungsreihen (Doppelbestimmung) von Myosmin, Cotinin und Nicotin für Keratin.....	- 55 -

Abbildung 31:	Hauptfragmente von Myosmin.....	- 57 -
Abbildung 32:	Hauptfragmente von Nicotin .....	- 58 -
Abbildung 33:	Hauptfragmente von Cotinin .....	- 58 -
Abbildung 34:	Chromatogramme einer wässrigen Standardprobe (aufgenommen im SIM-Modus) .....	- 59 -
Abbildung 35:	D <sub>4</sub> -Myosmin (oben, m/z 122) und 0,04 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 7,50 g Maissilage.....	- 60 -
Abbildung 36:	D <sub>3</sub> -Nicotin (oben, m/z 87) und, 1,80 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 7,50 g Maissilage.....	- 61 -
Abbildung 37:	D <sub>3</sub> -Nicotin (oben, m/z 87) und 1,68 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 6,30 g Grassilage.....	- 61 -
Abbildung 38:	(A) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122), (B) 0,27 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und 6,62 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 4,70 g Heu.....	- 62 -
Abbildung 39:	D <sub>4</sub> -Myosmin (oben, m/z 122) und 0,70 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 5,00 g Grascobs.....	- 62 -
Abbildung 40:	D <sub>4</sub> -Myosmin (oben, m/z 122) und 0,26 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.....	- 63 -
Abbildung 41:	D <sub>3</sub> -Nicotin (oben, m/z 87) und 1,63 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.....	- 63 -
Abbildung 42:	D <sub>3</sub> -Cotinin (oben, m/z 101) und 0,90 ng/g Cotinin (unten, m/z 98), extrahiert aus 6,00 g Maisschrot.....	- 63 -
Abbildung 43:	D <sub>4</sub> -Myosmin (oben, m/z 122) und 0,06 ng/g Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 9,20 g Wintergerstenschrot.....	- 64 -
Abbildung 44:	D <sub>3</sub> -Nicotin (oben, m/z 87) und 1,01 ng/g Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 9,20 g Wintergerstenschrot.....	- 64 -
Abbildung 45:	(A) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122), (B) 0,16 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und (D) 1,52 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 3,90 g Sojaschrot.....	- 65 -
Abbildung 46:	(A) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122), (B) 0,91 ng/g Myosmin (m/z 118), (C) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und (D) 0,97 ng/g Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 4,80 g Zuckerrübenschnitzeln.....	- 65 -
Abbildung 47:	Vergleich der Myosmin- und Nicotiningehalte in verschiedenen Futtermitteln. Die Werte über den Säulen beschreiben den Myosmingehalt im Vergleich zu Nicotin (= 100%). .....	- 66 -
Abbildung 48:	(A) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122), (B) 0,28 ng/ml Myosmin (m/z 118), (C) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und (D) 1,12 ng/ml Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 20 ml Pansensaft.....	- 67 -
Abbildung 49:	D <sub>3</sub> -Cotinin oben (m/z 101) und Cotinin unten (m/z 98), extrahiert aus 20 ml Pansensaft. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren.....	- 67 -
Abbildung 50:	Myosmin- und Nicotinkonzentrationen in 12 Pansensaftproben.....	- 68 -
Abbildung 51:	Korrelation von Myosmin mit Nicotin in Pansensaft. Die Werte zeigen das Ergebnis des Spearman Rank Tests.....	- 68 -
Abbildung 52:	Konzentrationen und Mittelwert von Myosmin und Cotinin in Plasma von Rindern (links) und Schafen (rechts).....	- 69 -
Abbildung 53:	(A) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122) und (B) 0,08 ng/ml Myosmin (m/z 118), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. (C) D <sub>4</sub> -Myosmin (m/z 122) und (D) 0,09 ng/ml Myosmin (m/z 118), extrahiert aus 2,0 ml Schafplasma.....	- 69 -
Abbildung 54:	(A) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und (B) Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. In der Probe war kein Nicotin zu identifizieren. (C) D <sub>3</sub> -Nicotin (m/z 87) und (D) 0,62 ng/ml Nicotin (m/z 84), extrahiert aus 1,8 ml Schafplasma.....	- 70 -

- Abbildung 55: (A) D<sub>3</sub>-Cotinin (m/z 98) und (B) 0,09 ng/ml Cotinin (m/z 101), extrahiert aus 2 ml Rinderplasma. (C) D<sub>3</sub>-Cotinin (m/z 98) und (D) Cotinin (m/z 101), extrahiert aus 1,6 ml Schafplasma. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren..... - 70 -
- Abbildung 56: Myosmin-, Nicotin- und Cotiningehalt (ng/g) in Urin. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml. .... - 71 -
- Abbildung 57: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und 0,08 ng/ml Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 2 ml Urin..... - 71 -
- Abbildung 58: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 87) und Nicotin (unten, m/z 84), extrahiert aus 2 ml Urin. Es konnte kein Nicotin identifiziert werden. .... - 72 -
- Abbildung 59: D<sub>3</sub>-Cotinin (oben, m/z 101) und Cotinin (unten, m/z 98), extrahiert aus 2 ml Urin. Es konnte kein Cotinin identifiziert werden. .... - 72 -
- Abbildung 60: D<sub>4</sub>-Myosmin (oben, m/z 122) und Myosmin (unten, m/z 118), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. Die Fläche des Myosminpeaks liegt unter dem LOD. .... - 73 -
- Abbildung 61: D<sub>3</sub>-Nicotin (oben, m/z 122) und 1,01 ng/g Nicotin (unten, m/z 118), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. Der Wert für Nicotin liegt unter dem LOQ. .... - 73 -
- Abbildung 62: D<sub>3</sub>-Cotinin (oben, m/z 122) und Cotinin (unten, m/z 118), extrahiert aus 32,2 g Horn einer Rinderklaue. In der Probe war kein Cotinin zu identifizieren..... - 73 -
- Abbildung 63: Myosmingehalt (ng/g bzw. ng/ml) beim Rind. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml. .... - 74 -
- Abbildung 64: Nicotiningehalt (ng/g bzw. ng/ml) beim Rind. Der obere Rand der Box stellt den Mittelwert dar. Die oberen Grenzlinien zeigen die Maxima, die Minima liegen jeweils bei 0 ng/ml. .... - 74 -

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Myosminkonzentrationen von <i>N. tabacum</i> und <i>N. rustica</i> ( $\mu\text{g/g}$ Feuchtgewicht) [18].....	- 3 -
Tabelle 2:	Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [5].....	- 5 -
Tabelle 3:	Verteilung des radioaktiv markierten Myosmins [47] .....	- 9 -
Tabelle 4:	Nicotingehalt in Gemüse [62] .....	- 14 -
Tabelle 5:	Übersicht über die Haupttrouten einer Sekretion von Milchbestandteilen durch das Epithel der Milchdrüse [109].....	- 27 -
Tabelle 6:	Milch/Plasma-Verhältnisse für Nicotin ( $\text{pK}_a = 7,8$ ) bei verschiedenen Milch pH Werten und einem Plasma pH von 7,42 nach Luck <i>et al.</i> [114].....	- 29 -
Tabelle 7:	Temperaturprogramm für den Säulenofen.....	- 47 -
Tabelle 8:	Zeitfenster der verschiedenen SIM Aufnahmen.....	- 50 -
Tabelle 9:	Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen ( $\text{ng/ml}$ ) der Tabakalkaloide im Plasma .....	- 52 -
Tabelle 10:	Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen ( $\text{ng/g}$ ) der Tabakalkaloide in Keratin .....	- 52 -
Tabelle 11:	Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , $n = 6$ ).....	- 53 -
Tabelle 12:	Tagespräzision und Messpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , $n = 6$ ).....	- 53 -
Tabelle 13:	Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Kälberserum, stellvertretend für Plasma und Speichel ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , $n = 6$ ) .....	- 54 -
Tabelle 14:	Wochenpräzision (Werte des internen Standards) aus Keratin, stellvertretend für Zehennägel ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , $n = 6$ ).....	- 54 -
Tabelle 15:	Wiederfindung des internen Standards aus Kälberserum und Keratin ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ , $n = 9$ ) .....	- 55 -
Tabelle 16:	Konzentrationen von Myosmin, Nicotin und Cotinin in Futtermitteln ( $\text{ng/g}$ ) .....	- 60 -

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Richter angefertigt.

Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, ganz besonders danke ich ihm aber für das große Vertrauen, das er in mich setzte, und den damit verbundenen Freiheiten, die er mir gewährte. Ihm danke ich auch für seine allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und seine grenzenlose Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gudermann danke ich als Vorstand des Walther-Straub-Instituts für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ammer für die Übernahme der Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Tiermedizinischen Fakultät der LMU, für die Durchsicht meiner Arbeit und die stets freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Zwickpflug danke ich für die großzügige finanzielle Realisierung meiner Arbeit.

Bei Frau Sabine Mann von der Klinik für Wiederkäuer der LMU in Oberschleißheim bedanke ich mich für ihre unersetzbare Hilfe bei der Beschaffung der Pansensaft- und Hornproben.

Frau Dr. Ursula Domes danke ich sehr für die Bereitstellung und Vorbereitung der Schafplasma- und Hornproben sowie für die immer unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit.

Ein herzliches *Vergelt's Gott* möchte ich an Herrn Benjamin Schobloch und die Landwirte richten, die mir Rindervenen und Futtermittel zur Verfügung stellten.

Ich bedanke mich auch beim gesamten AK Richter für die freundliche Aufnahme, die rat- und tatkräftige Unterstützung und bei Nadine, mit der ich alle Sorgen, die waren, sind und kommen, weglachen kann.

Bei allen meinen Freunden, vor allem bei Carmen, Katha, Jochen und Ralf möchte ich mich bedanken: für eure Ohren, die immer offen sind, für euer Verständnis, wenn ich keine Zeit hatte und vor allem dafür, dass ihr so lange Zeit an meiner Seite seid, egal wie oft wir uns sehen.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie und meinem Freund: für Eure immer vorhandene Unterstützung, Euren Glauben in mich und Euren liebevollen Rückhalt, ohne den nicht nur diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Dir, Michi, danke ich außerdem für Dein grenzenloses Einfühlungsvermögen, für Deine steten Ermutigungen und vor allem dafür, dass Du mir die Gewissheit gibst, dass man gemeinsam alles schaffen kann.