

Aus dem Walther Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität München
kommissarischer Vorstand Prof. Dr. P. Eyer

**Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in
Muttermilch, Speichel und Plasma**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manuel Maier
aus
München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Richter

Mitberichterstatter; Prof. Dr. B. Koletzko
Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhard

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2005

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen | IV |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Krebserkrankungen in Deutschland | 1 |
| 1.2 Inhaltsstoffe des Tabakrauchs | 3 |
| 1.2.1 Tabakalkaloide | 5 |
| 1.2.2 Myosmin | 5 |
| 1.2.2.1 Chemische Eigenschaften von Myosmin | 8 |
| 1.2.3 Cotinin | 10 |
| 1.2.3.1 Chemische Eigenschaft von Cotinin | 12 |
| 1.3 Nitrosamine | 12 |
| 1.3.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen | 13 |
| 1.3.2 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA) | 14 |
| 1.4 Biomonitoring | 16 |
| 1.4.1 Anwendung | 16 |
| 1.4.2 Analysen in Biologischen Materialien | 17 |
| 1.4.3 Biologisches Effektmonitoring | 17 |
| 1.4.4 Addukte als Marker | 19 |
| 1.5 Muttermilch | 20 |
| 1.5.1 Zusammensetzung der Muttermilch | 20 |
| 1.5.2 Physikochemische Eigenschaften der Milch | 21 |
| 1.5.3 Milchproduktion | 22 |
| 1.5.4 Übertritt von Stoffen in die Muttermilch | 24 |
| 1.5.5 Milch zu Plasma Verhältnis | 25 |
| 1.5.6 Milch und Biomonitoring | 26 |
| 1.5.6.1 Nicotin und Cotinin in der Muttermilch | 26 |
| 1.6 Speichel | 28 |
| 1.6.1 Zusammensetzung des Speichels | 28 |
| 1.6.2 Übertritt von Stoffen in den Speichel | 28 |
| 1.6.3 Speichel und Biomonitoring | 29 |
| 1.6.4 Speichelgewinnung | 30 |
| 1.7 GC-MS | 30 |
| 1.7.1 Fragmentierung von Myosmin | 31 |
| 1.7.2 Fragmentierung von Cotinin | 32 |
| 1.8 Zielsetzung der Arbeit | 34 |
| 2 MATERIAL UND METHODE | 35 |
| 2.1 Material | 35 |
| 2.1.1 Geräte | 35 |
| 2.1.2 Materialien | 36 |
| 2.1.3 Chemikalien | 37 |
| 2.1.4 Radiochemikalien | 38 |
| 2.1.5 Lösungen und Reagenzien | 38 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2 | Methode | 40 |
| 2.2.1 | Bestimmung des Octanol-Wasser Koeffizienten von Myosmin | 40 |
| 2.2.2 | Muttermilch | 40 |
| 2.2.2.1 | Probennahme und Lagerung der Milchproben | 40 |
| 2.2.2.2 | Probenvorbereitung | 40 |
| 2.2.2.3 | Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Muttermilch | 41 |
| 2.2.2.4 | Bestimmung des Fettgehaltes der Milchproben | 43 |
| 2.2.3 | Speichel | 43 |
| 2.2.3.1 | Probengewinnung und Lagerung | 43 |
| 2.2.3.2 | Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Speichel | 43 |
| 2.2.3.3 | Fastenversuch | 44 |
| 2.2.3.4 | Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Plasma | 44 |
| 2.2.3.4.1 | Bestimmung des Speichel zu Plasma Verhältnis von Myosmin | 44 |
| 2.3 | GC-MS Analysen | 44 |
| 2.3.1 | Gaschromatographie-Massenspektroskopie | 44 |
| 2.3.1.1 | Nachweis charakteristischer Fragmente im Single Ion Monitoring (SIM) Modus | 45 |
| 2.3.1.2 | Berechnung des Gehalts an Myosmin und Cotinin | 46 |
| 2.3.2 | Validierung | 47 |
| 2.3.2.1 | GC-MS Anlage | 47 |
| 2.3.2.1.1 | Repeatability der GC-MS Anlage | 47 |
| 2.3.2.1.2 | Geräteempfindlichkeit | 47 |
| 2.3.2.1.3 | Kalibrierkurve von Myosmin mit Zusatz von d ₄ -Myosmin | 47 |
| 2.3.2.1.4 | Überprüfung der Linearität von Myosmin- und d ₄ -Myosmin-Nachweis | 49 |
| 2.3.2.2 | Muttermilchanalyse | 49 |
| 2.3.2.2.1 | Kalibrierkurven für d ₄ -Myosmin und d ₃ -Cotinin nach Durchlaufen des Analysenganges | 50 |
| 2.3.2.2.2 | Absolute Wiederfindung und Wiederholbarkeit (within day) | 50 |
| 2.3.2.2.3 | Reproduzierbarkeit der Methode (day to day) | 51 |
| 2.3.2.3 | Speichelanalyse | 51 |
| 2.3.2.3.1 | Kalibrierkurve für d ₄ -Myosmin und d ₃ -Cotinin nach Durchlaufen des Analysenganges | 51 |
| 2.3.2.3.2 | Absolute Wiederfindung und Wiederholbarkeit (within day) | 53 |
| 2.3.2.3.3 | Reproduzierbarkeit der Methode (day to day) | 53 |
| 2.3.2.4 | Plasmaanalyse | 53 |
| 2.3.2.4.1 | Wiederfindung von d ₄ -Myosmin und d ₃ -Cotinin aus Plasma | 53 |
| 2.3.3 | Wiederfindung von ³ H-Myosmin bei Muttermilchanalysen | 53 |
| 2.3.4 | Statistik | 54 |
| 3 | ERGEBNISSE | 55 |
| 3.1 | Bestimmung des Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten | 55 |
| 3.2 | Methoden | 55 |
| 3.2.1 | Extraktion und Aufreinigung von Myosmin aus Muttermilch | 55 |
| 3.2.2 | Wahl der analytischen Säulen | 60 |
| 3.2.3 | Repeatability der GC-MS Anlage | 61 |
| 3.2.3.1 | Bestimmung von Linearität und Nachweisempfindlichkeit | 62 |
| 3.2.3.2 | Kalibrierkurve von Myosmin mit Zusatz von d ₄ -Myosmin | 62 |
| 3.2.3.3 | Überprüfung der Linearität von Myosmin und d ₄ -Myosmin | 65 |
| 3.2.3.4 | Temperaturprogramm | 65 |
| 3.2.4 | Identifizierung von Myosmin in Muttermilch | 66 |
| 3.2.4.1 | Fragmentierung von Cotinin | 69 |
| 3.2.5 | Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Muttermilch | 71 |
| 3.2.5.1 | Wiederfindung von d ₄ -Myosmin | 71 |
| 3.2.5.2 | Wiederfindung von d ₃ -Cotinin | 72 |
| 3.2.5.3 | Linearität und Nachweisgrenze | 73 |
| 3.2.6 | Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Speichel | 73 |
| 3.2.6.1 | Wiederfindung von d ₄ -Myosmin | 74 |
| 3.2.6.2 | Wiederfindung von d ₃ -Cotinin | 75 |
| 3.2.6.3 | Linearität und Nachweisgrenze | 76 |
| 3.2.7 | Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Plasma | 77 |
| 3.2.7.1 | Wiederfindung von d ₄ -Myosmin und d ₃ -Cotinin | 77 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3 | Myosmin in Milch | 77 |
| 3.3.1 | Kuhmilch | 78 |
| 3.3.2 | Muttermilch | 78 |
| 3.3.2.1 | Fragebogen | 78 |
| 3.3.2.2 | Myosmin in Muttermilch | 79 |
| 3.3.2.3 | Myosmingehalt in der Muttermilch in Abhängigkeit des Fettgehaltes | 79 |
| 3.3.2.4 | Abhängig des Myosmingehalts in der Muttermilch vom pH-Wert | 80 |
| 3.3.2.5 | Abhängigkeit der Myosmin- und Cotininkonzentrationen in der Muttermilch vom Rauchstatus | 80 |
| 3.4 | Myosmin in Speichelproben | 82 |
| 3.4.1 | Fragebogen | 82 |
| 3.4.2 | Myosmin in Speichel | 82 |
| 3.4.3 | Fastenversuch | 85 |
| 3.4.4 | Bestimmung von Myosmin in Plasma und Speichel | 88 |
| 3.4.5 | Berechnung des S/P Verhältnis | 92 |
| 4 | DISKUSSION | 94 |
| 4.1 | Grundlagen der Wirkstoffextraktion aus Milch | 95 |
| 4.1.1 | Weitere mögliche Analysenmethoden | 98 |
| 4.2 | Bewertung der Analysenmethode anhand von Muttermilch- und Speichelproben | 98 |
| 4.2.1 | Andere Tabakalkaloide und Nicotinamid | 100 |
| 4.3 | Bestimmung des Octanol/Wasser Koeffizienten (logP) von Myosmin | 100 |
| 4.4 | Bestimmung des Creamatokritwertes | 101 |
| 4.5 | Myosminkonzentrationen in der Muttermilch | 102 |
| 4.6 | Myosminkonzentrationen im Speichel | 104 |
| 4.7 | Berechnung und Aussagen des Speichel zu Plasma Verhältnisses zur Myosminbelastung | 105 |
| 4.8 | Toxikologische Bedeutung der Myosminbelastung | 108 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 110 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 113 |
| 7 | ANHANG | 126 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| 3OH Cotinin | 3'-Hydroxycotinin |
| A | Ampere |
| amu | atom mass unit, Atommasseneinheiten |
| BAT | Biologische Arbeitsstoff Toleranz |
| CI | chemische Ionisation |
| cpm | counts per minute |
| CYP | Cytochrom P450 |
| d | Tag |
| Da | Dalton |
| DCM | Dichlormethan |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure |
| DPM | Disintegrations per minute |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| ETS | environmental tobacco smoke |
| GC | Gaschromatograph |
| Hb | Hämoglobin |
| HBM | Human Biomonitoring |
| HCB | Hexachlorbenzol |
| HLB | Hydrophil-Lipophil-Balance |
| HPB | 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon, Ketoalkohol |
| HS | Hauptstromrauch |
| HS-SPME | Headspace Solid Phase Micro Extraction |
| HWZ | Halbwertszeit |
| Hydroxysäure | 4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butansäure |
| I.D. | Innendurchmesser |
| i.p. | intraperitoneal |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| <i>iso</i> -NNAL | 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol |
| <i>iso</i> -NNAC | 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butansäure |
| ISTD | interner Standard |
| Ketosäure | 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure |
| LD ₅₀ | Dosis bei welcher 50% der Versuchstiere überleben |

| | |
|----------------|---|
| LOD | Limit of Detection |
| LOQ | Limit of Quantification |
| Lsg. | Lösung |
| M | Molekulargewicht |
| M ⁺ | Molekülion |
| M/P | Milch zu Plasma Verhältnis |
| MS | Massenspektrometer |
| MYO | Myosmin |
| m/z | Masse zu Ladung Verhältnis |
| N | Anzahl |
| n.d. | nicht detektierbar |
| NAB | <i>N</i> '-Nitrosoanabasin |
| NADPH | Nicotinsäureamidadenindinukleotid-phosphat |
| NAT | <i>N</i> '-Nitrosoanatabin |
| Na-EDTA | Natrium-Ethylendiamintetraacetat |
| NDMA | <i>N</i> -Nitrosodimethylamin |
| NNAL | 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol |
| NNK | nicotine derived nitrosamino ketone = 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon |
| NNN | <i>N</i> '-Nitrosornicotin |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NS | Nebenstromrauch |
| O/W | Octanol zu Wasser |
| organ. | organische |
| p.a. | zur Analyse |
| PAK | Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PP | Polypropylen |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| rpm | rotations per minute |
| R | Rest |
| RT | Raumtemperatur |
| S.D. | Standard Deviation |
| Sek. | Sekunden |
| Std. | Stunden |

| | |
|-----------|---|
| S/P | Speichel zu Plasma Verhältnis |
| s.s. | supra solv, Reinheitsgrad für GC-MS Lösungsmittel |
| SIM | Single Ion Monitoring (= SIR) |
| SPE | Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion |
| TSNA | tabakspezifische Nitrosamine |
| t_R | Retentionszeit |
| $t_{1/2}$ | Halbwertszeit |
| USA | United States of America |
| UK | United Kingdom |
| Zig | Zigaretten |

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen in Deutschland

Krebs stellt heutzutage in Deutschland neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. 1999 wurde für jeden vierten von insgesamt ca. 850000 Todesfällen eine bösartige Krebserkrankung verantwortlich gemacht. Trotz intensiver Forschung und stets verbesserter Therapiemöglichkeiten verstarben 1990 europaweit etwa 26% der Männer und 21% der Frauen an Krebs [1]. Für das Jahr 1996 wurden in Europa mindestens 800 000, in den USA über 550 000 und weltweit etwa 3 Millionen Todesfälle durch maligne Tumoren erwartet [2].

Abbildung 1-1 zeigt die Neuerkrankungen der häufigsten Krebsformen in Deutschland Ende des 2. Jahrtausend, die bei Männern auf ca. 168 500 Fälle und bei Frauen auf ca. 179 000 Fälle geschätzt werden. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 65 und für Frauen bei 67 Jahren.

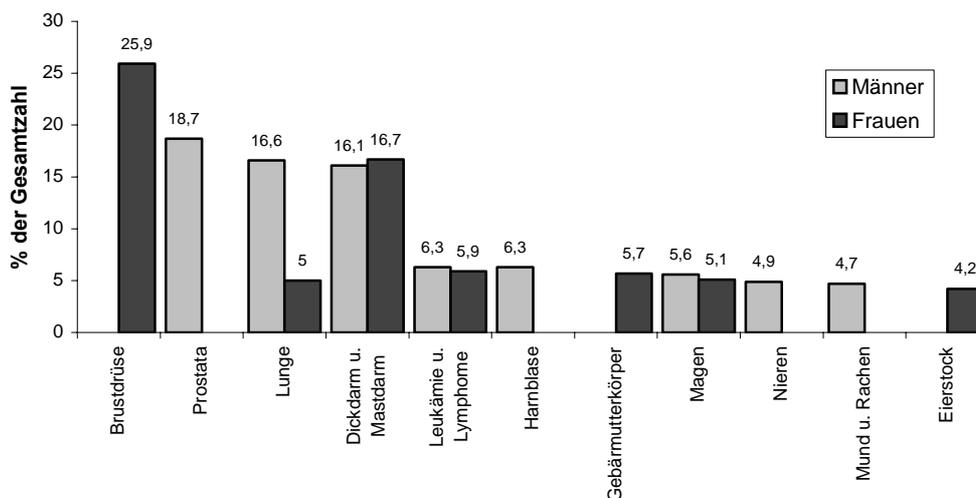


Abbildung 1-1: Neuerkrankungsfälle der häufigsten Krebsformen 1998 in Deutschland

Bei der Erhebung von Daten zur Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen ist neben der Unterscheidung nach Geschlecht auch die Erfassung von Neuerkrankungen gegenüber den Sterbefällen für die Interpretation der Ergebnisse nicht zu vernachlässigen. So ist beim Mann mit 18,7% die Prostata zwar das am häufigsten von bösartigen Tumoren befallene Organ, steht jedoch als Todesursache unter den häufigsten Krebsformen mit 10,5% „nur“ an dritter Stelle. Der Lungenkrebs ging 1998 mit 16,6% in die Statistik der Neuerkrankungen an

Krebs ein, war jedoch unter den Männern mit 26,4% die Krebsform mit der höchsten Sterberate (Abbildung 1-2).

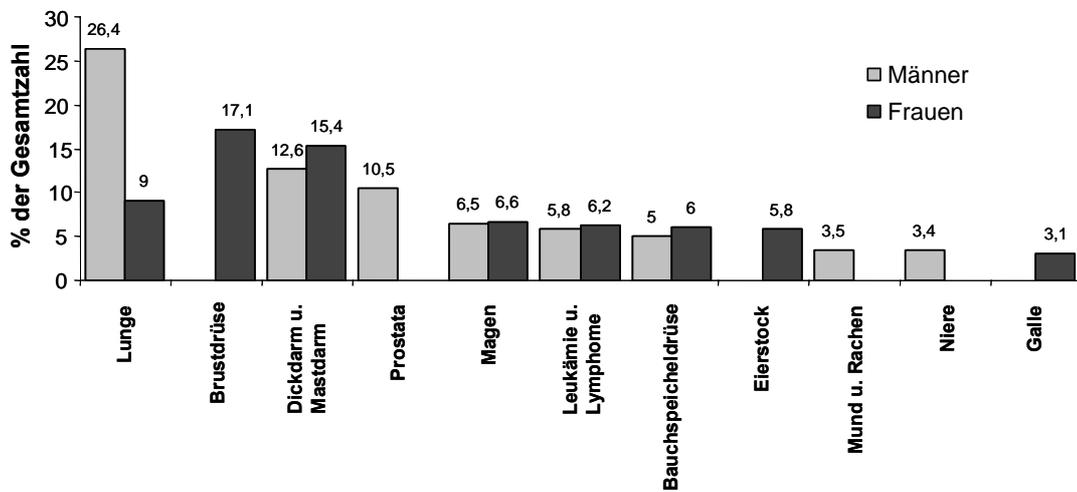


Abbildung 1-2: Tumormortalitätsrate der häufigsten Krebsformen 1998 in Deutschland

Bei der Beurteilung von Krebsrisikofaktoren unterscheidet man grundsätzlich zwischen individuell vermeidbaren Risiken, wie eine ungesunde Lebensweise und nicht beeinflussbaren Größen. Dazu zählen unter anderem genetisch bedingte Krebsrisikofaktoren.

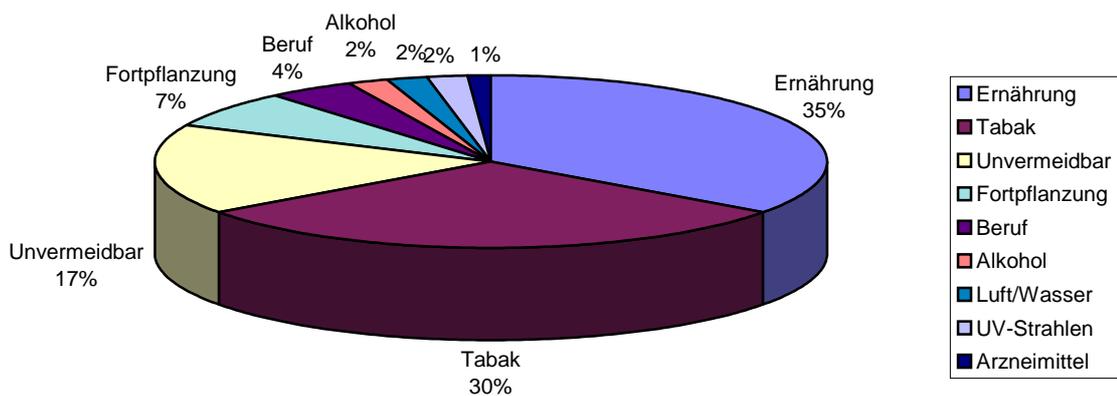


Abbildung 1-3: Risikofaktoren für Krebserkrankungen

Studien über Risikofaktoren für Krebserkrankungen ergaben, dass falsche Ernährungsgewohnheiten und Adipositas sowie der Konsum von Tabak mit jeweils einem Drittel als Hauptursachen für die Entstehung von Krebserkrankungen verantwortlich gemacht werden [3] (Abbildung 1-3). Lungenkrebs zählt zu denjenigen malignen Tumoren, für die der Hauptrisikofaktor schon seit langer Zeit bewiesen ist. Bei 90% der männlichen und 60% der

weiblichen Lungenkrebspatienten ist die Erkrankung auf das Rauchen zurückzuführen. Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, steigt mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Dauer des Rauchens, sowie der Inhalationstiefe. Während die Inzidenz bei Männern in Deutschland seit Mitte der 80er Jahre rückläufig ist, steigt diese bei den Frauen kontinuierlich an.

Trotz der Vielzahl an Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten, zählt der Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstig verlaufenden Krebserkrankungen. Die relative Überlebensrate ist mit etwa 9% bei Männern schlechter als bei Frauen (17%). Ein Lungenkrebspatient in Deutschland hat einen Verlust an Lebenserwartung von durchschnittlich 12 bis 13 Jahren zu erwarten (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

1.2 Inhaltsstoffe des Tabakrauchs

Beim Rauchen von Zigaretten, Zigarren und Pfeifentabak unterscheidet man, wie in Abbildung 1-4 dargestellt, zwischen dem Hauptstromrauch (HS) und dem Nebenstromrauch (NS).

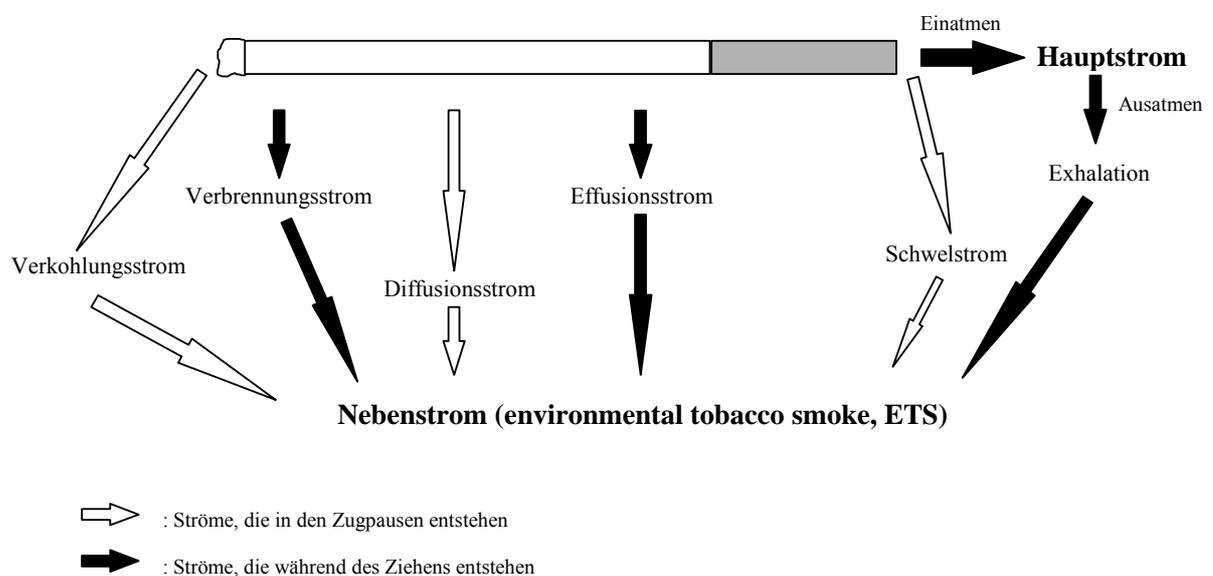


Abbildung 1-4: Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette [4]

Der Hauptstromrauch entsteht unter Verbrennung bei 700 bis 900 °C in der Glühzone der Zigarette unter Einwirkung großer Mengen Sauerstoff durch den Zug des Rauchers und wird von diesem größtenteils inhaliert. Der Nebenstromrauch wird im gleichen Bereich unter geringerer Hitze (400 bis 600 °C) und in Sauerstoffarmut während der Zugpause gebildet. Er

passiert nur in geringen Mengen den Filter der Zigarette. Aus den unterschiedlichen Bedingungen während der Verbrennung resultieren zwei sehr unterschiedliche Stoffgemische. Wir unterscheiden hier die gasförmige Phase mit den flüchtigen Substanzen wie Benzol, Vinylchlorid oder Acrolein, und die Partikelphase, den „Teer“, in dem sich die halb- und nichtflüchtigen Stoffe, beispielsweise Alkaloide (auch das Nicotin), aromatische Amine oder polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK) befinden. Man schätzt die Gesamtzahl der vorhandenen Verbindungen auf 3 900 bis 12 000, wobei bisher über 3 000 Verbindungen isoliert und identifiziert wurden [5,6]. Darunter befinden sich organspezifische Kanzerogene, Cokanzerogene, sowie Promotoren und Inhibitoren der Tumorgenese [7-9]. Einige der wichtigsten Kanzerogene im HS und NS sind in Tabelle 1-1 dargestellt. Der environmental tobacco smoke (ETS), also der Tabakrauch in der Raumluft, welcher sich zu 85% aus NS und zu 15% aus exhalierendem HS zusammensetzt, belastet nicht nur den Passivraucher, sondern auch den Raucher selbst. Obwohl der NS die Kanzerogene in Folge der unvollständigeren Verbrennung in bis zu 130-facher Konzentration des HS enthält, ist die Aufnahme gefährlicher Stoffe durch die schnelle Verdünnung mit der Raumluft und durch Alterungsprozesse deutlich geringer als beim Raucher. Die Beurteilung des Gefahrenpotenzials des ETS ist schwierig und wird kontrovers geführt [10-13].

Tabelle 1-1: Kanzerogene in HS und NS von Zigaretten

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

¹NNK = nicotine derived nitrosamino ketone

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

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Exposition des Menschen mit ETS und einer gehäuften Wahrscheinlichkeit an Lungenkrebs zu erkranken, untersucht. Wenn auch die Mehrzahl der Studien ein geringfügig erhöhtes Risiko für Nichtraucher ergeben hat, so lässt sich der Zusammenhang statistisch nicht sicher beweisen [14,15]. Daher sollte die ETS-Belastung nur als ein Faktor neben der Ernährung und allgemeinen Lebensgewohnheiten für die Aufnahme genotoxischer Substanzen, wie Benzol, PAK, aromatischer Amine und den TSNA verstanden werden [16]. Das größte kanzerogene Potenzial im Tabakrauch wird den Substanzgruppen der PAK und den TSNA zugeschrieben [17].

1.2.1 Tabakalkaloide

Alkaloide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Als Funktionen werden ihnen im allgemeinen der Fraß- bzw. Insektenschutz, osmotische Inaktivierung und Entgiftung nachgesagt [18]. Die wichtigsten Vertreter der Alkaloide bei der Tabakpflanze (*Nicotiana ssp.*) sind Nicotin, Nornicotin, Anabasin und Anatabin (Abbildung 1-5). Nach Ernte und Fermentation enthält der Rohtabak je nach Sorte 5 bis 180 mg/g Nicotin. Die Gehalte für Nornicotin und Anatabin belaufen sich auf 2 mg/g bzw. 1 mg/g [19,20].

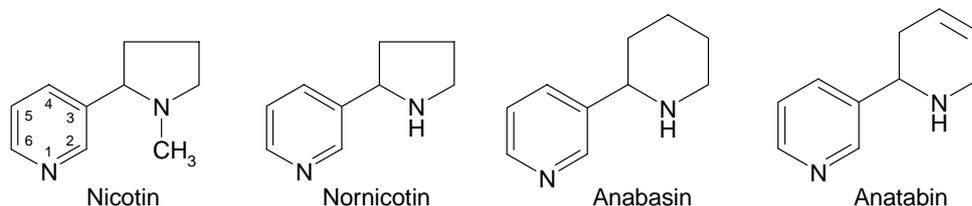


Abbildung 1-5: Strukturen von Tabakalkaloiden

1.2.2 Myosmin

Neben Nicotin gehört Myosmin zu den ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloiden. Bereits 1933 wurde es aus Zigarrenrauch isoliert und nur wenige Jahre später gelang die Strukturaufklärung [21]. Durch Dehydrogenierung von Nicotin bei 570 °C konnte dann 1944 Myosmin gewonnen werden. In der heranwachsenden Pflanze ist Nicotin ebenfalls das Ausgangsprodukt für Myosmin. Zunächst wird Nicotin zu Nornicotin demethyliert. Durch Dehydrogenierung von Nornicotin wird Myosmin gebildet, welches in weiteren Folgereaktionen zu Nicotinsäure abgebaut wird (Abbildung 1-6) [22,23].

jedoch als Quellen für die tabakunabhängige Myosmin-Belastung der Weltbevölkerung vernachlässigt werden. Erste Ergebnisse für eine wesentlich weitere Verbreitung von Myosmin lieferten die Ergebnisse von Zwickenpflug aus unserer Arbeitsgruppe. In verschiedenen Proben von Erd- und Haselnüssen konnte Myosmin in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 ng/g nachgewiesen werden [33]. Mit dem Verzehr von 100 g Nüssen nimmt der Mensch zwischen 0,02 und 0,20 µg zu sich. Diese Belastung liegt in der gleichen Größenordnung wie die durch ETS. In den daraufhin untersuchten Grundnahrungsmitteln wie Reis, Weizen, Mais und Kartoffel wurde Myosmin ebenfalls in ppb-Mengen gefunden [34].

Tabelle 1-2: Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [33,34]

| 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 | | |

Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über untersuchte Nahrungsmittel und deren Myosminkonzentrationen. Außer in den aufgelisteten Quellen pflanzlichen Ursprungs konnte Myosmin auch in Milchprodukten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stellen die Bezeichnung tabakspezifisches Alkaloid für Myosmin in Frage. Es scheint vielmehr, dass es sich dabei um ein nicht ausschließlich tabakspezifisches Alkaloid handelt.

1.2.2.1 Chemische Eigenschaften von Myosmin

Die Summenformel von Myosmin lautet $C_6H_{10}N_2$, das Molekulargewicht beträgt 146,19 und der pK_a Wert liegt bei $7,81 \pm 0,2$. [SciFinder 2004, <http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR>]. Myosmin ist nicht wasserdampflich und sein Schmelzpunkt liegt zwischen $39\text{ }^\circ\text{C}$ und $42\text{ }^\circ\text{C}$. Das Absorptionsmaximum im Infrarotbereich liegt bei $\nu_{C=N} = 1618\text{ cm}^{-1}$ [35-37], das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung befindet sich in 95% Ethanol bei $\lambda_{\text{max}} = 234\text{ nm}$ [38].

In einer wässrigen Hydroxylamin-Lösung reagiert Myosmin als Carbonyl-Komponente. Dieses lässt auf ein reversibles Hydrolysegleichgewicht in wässriger Lösung schließen (Abbildung 1-7) [39]. Anhand von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ließ sich das pH-abhängige Gleichgewicht belegen. Im sauren pH-Bereich liegt fast ausschließlich die offenkettige Aminoketonform vor, wohingegen im neutralen und alkalischen Milieu die geschlossene Ringform überwiegt. In Pufferlösungen mit physiologischem pH Wert von 7,4 befindet sich nur 1% des Myosmins in offenkettiger Form [40].

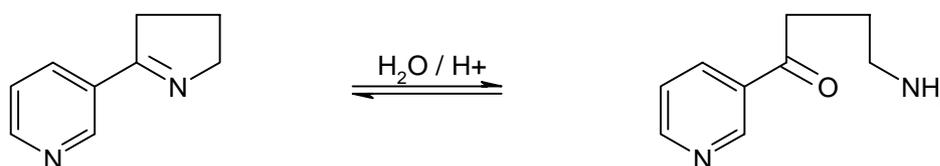


Abbildung 1-7: Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin

Verglichen mit Nicotin, dessen tödliche Dosis für den Menschen auf 40 - 60 mg geschätzt wird, ist Myosmin weit weniger toxisch. Der LD_{50} -Wert beträgt für Ratten zwischen 190 mg/kg (i.p.) und 1875 mg/kg (oral) [4,41]. Für L-Nicotin liegt die LD_{50} für Ratten bei 50 mg/kg (oral) und bei 14,5 mg/kg (i.p.) [<http://www.sigmaldrich.com>]. Die akute Toxizität von Myosmin ist damit für Ratten 10-fach geringer verglichen mit der von Nicotin. In einem

Versuch wurde Mäusen über einen Zeitraum von 50 Wochen täglich 0,5 mg Myosmin verabreicht. Diese Dosis überlebten 76% der Versuchsgruppe gegenüber 98% der Kontrollgruppe. Aussagen zu den Todesursachen fehlen in dem Abstract, eine ausführliche Publikation des Versuches konnte nicht gefunden werden [42]. Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* *polA*⁺/*polA*⁻ beobachtet werden [43]. In humanen Lymphozyten und Mucosazellen der Nasenschleimhaut erzeugt Myosmin eindeutig DNA Schäden, die mit dem Comet Assay nachgewiesen wurden [44].

Die Nitrosierung von Myosmin wurde erstmalig in einer Veröffentlichung von Zwickenpflug [45] detailliert beschrieben. Er untersuchte die direkte Nitrosierung von Myosmin mit N₂O₃ in Pufferlösungen der pH-Werte 5,5, 7,5 und 9. Es resultierte ein Reaktionsgemisch, welches in Abhängigkeit vom pH-Milieu zu unterschiedlichen Anteilen aus NNN und dem Ketoalkohol 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) bestand. Diese Nitrosierungsprodukte konnten von Zwickenpflug außerdem in humanem Magensaft nach Zusatz von NaNO₂ nachgewiesen werden. Eine Erklärung liefert das zuvor beschriebene reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Unter sauren Bedingungen hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketonform, und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, welches wahrscheinlich in situ zum Ketoalkohol zerfällt. Höhere pH-Werte begünstigen dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins. Weitere ausführliche Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Myosminnitrosierung mit radioaktiv markiertem Myosmin zeigten jedoch überraschenderweise auch eine Zunahme der NNN-Bildung bei pH-Werten unter 2. Hier wurde sogar mehr NNN als HPB gebildet [46]. Für die Bildung reaktiver Zwischenprodukte erscheint der direkte Weg zum Ketoalkohol von besonderer Bedeutung zu sein. Während das NNN zur Bildung reaktiver Produkte eine metabolische Aktivierung benötigt, entsteht das HPB bei der Nitrosierung von Myosmin direkt über eine instabile Zwischenstufe (Abbildung 1-8). Das hierbei wahrscheinlich auftretende reaktive Diazohydroxid, ist als starkes Elektrophil in der Lage, nicht nur mit Wasser zum HPB, sondern auch mit zellulären Makromolekülen kovalente Bindungen einzugehen. Dies wurde mit radioaktiv markiertem Myosmin in Nitrosierungsansätzen in Gegenwart von Kalbsthymus-DNA nachgewiesen [46].

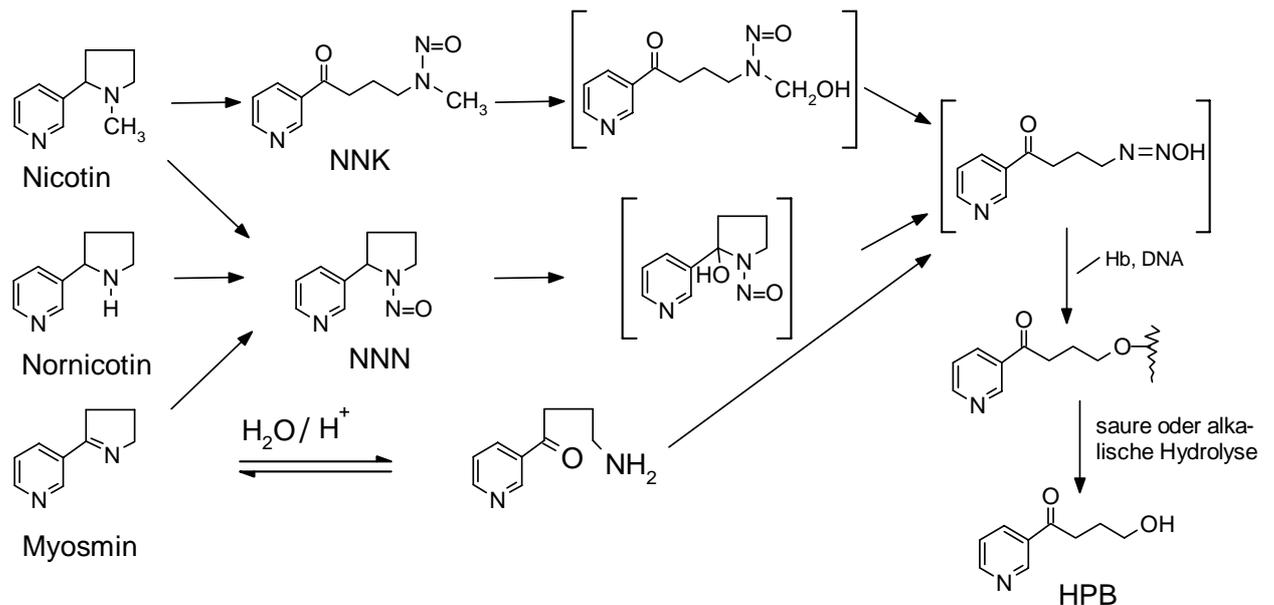


Abbildung 1-8: Beitrag von Myosmin zur Entstehung von HPB freisetzenden Addukten
(reaktive Zwischenstufen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet)

1.2.3 Cotinin

Cotinin und *trans*-3-Hydroxycotinin sind die Hauptmetaboliten von Nicotin (Abbildung 1-9). Die Konzentrationen beider Metaboliten können in Blut, Speichel, Urin, in Muttermilch gemessen werden. Aufgrund der längeren Halbwertszeit ($t_{1/2}$) im Plasma von Cotinin von durchschnittlich 17-18 Std. im Vergleich zu Nicotin mit $t_{1/2} = 2-3$ Std. können Rauchbelastungen über einen längeren Zeitraum besser erfasst werden. Mittels der gemessenen Mengen kann eine Einteilung in Raucher und Nicht- bzw. Passivraucher erfolgen. Cotinin stellt somit einen spezifischen Biomarker für die Rauchbelastung dar. Eine zusätzliche Belastung über die Nahrung kann durch Nicotinhaltige Lebensmittel, z.B. Auberginen, Tomaten, Kartoffeln und Schwarztee erfolgen [30]. Die aufgenommenen Nicotinmengen und daraus entstandenes Cotinin verfälscht die ETS-bedingten Cotininwerte jedoch kaum.

Um eine Unterscheidung bezüglich des Rauchstatus vornehmen zu können müssen Grenzwerte (cutoff-Werte) festgelegt werden. Diese sind in Abhängigkeit der Probenmatrix für Cotinin in Tabelle 1-3 dargestellt.

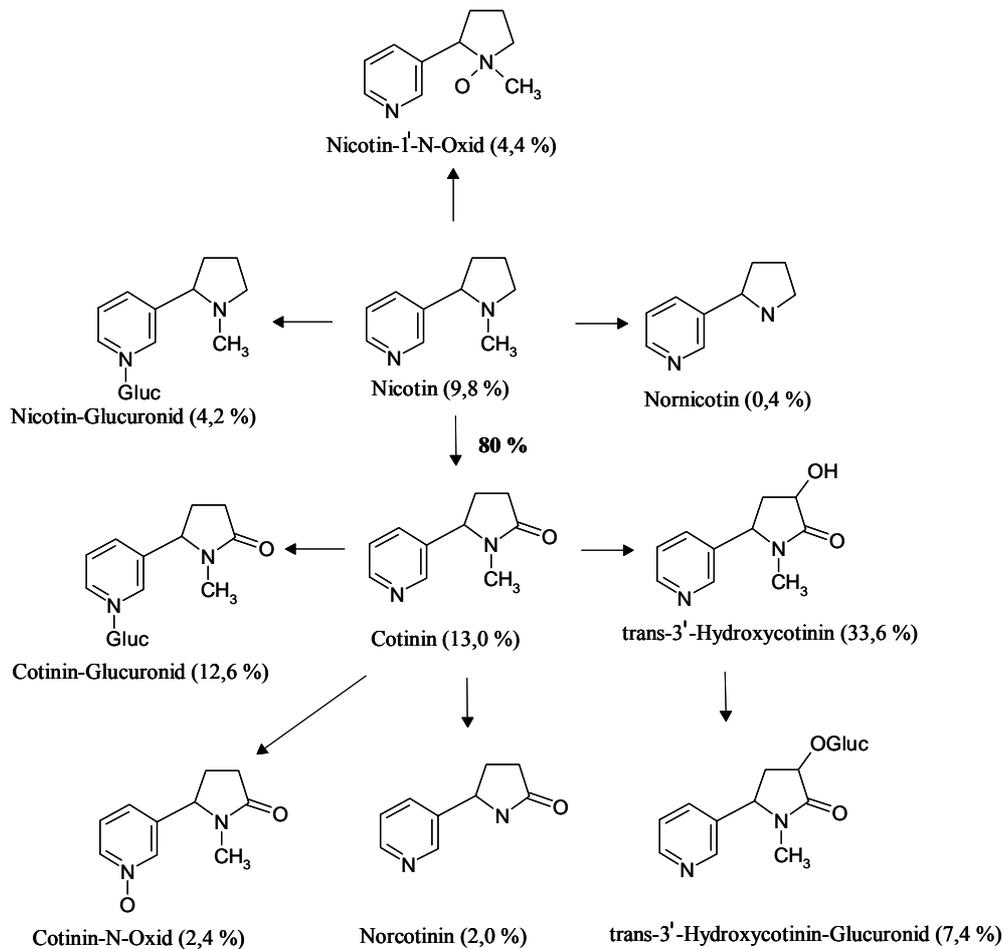


Abbildung 1-9: Hauptmetaboliten von Nicotin beim Menschen. Die in Klammer angegebenen Prozente entsprechen den Mengen, welche im Urin ausgeschieden werden, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Nicotin.

Tabelle 1-3: Cotininkonzentrationen in Plasma, Urin und Speichel mit entsprechenden cutoff-Werten für die Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern

| Cotinin (ng/mL) | Nichtraucher | Passivraucher | Raucher | cutoff | Lit. |
|---------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------|
| Plasma /Serum | 0,1 - 0,8 | 0,4 - 2,0 | 200 - 300 | 10 - 20 | [47] |
| Urin | 1 - 10 | 8 - 25 | 1300 - 1700 | 60 - 120 | [47] |
| Urin Schwangere | < 25 | 25 - 400 | > 400 | | [48] |
| Speichel | < 5 | 5 - 10 | > 100 | | [49] |
| Speichel Schwangere | < 4,5 | | > 92 | 14 - 28 | [50] |

Die Festlegung eines cutoff-Wertes für die Unterscheidung zwischen Raucher und Nichtraucher anhand der Cotinin-Konzentration im Speichel variiert von Studie zu Studie.

Die meisten Werte liegen zwischen 10 und 44 ng/mL. Etter *et al.* [51] gibt den cutoff bei einer Cotininkonzentration von 7-13 ng/mL an.

Eine Unterscheidung des Rauchstatus bei Muttermilchproben aufgrund der gemessenen Cotininkonzentrationen ist in der Literatur nicht beschrieben, man kann jedoch bei Rauchern eine Einteilung nach der Anzahl gerauchter Zigaretten vornehmen (siehe 1.5.6.1).

1.2.3.1 Chemische Eigenschaft von Cotinin

Die Summenformel von Cotinin lautet $C_{10}H_{12}N_2O$, das Molekulargewicht beträgt 176,22 und der pK_a Wert liegt bei $4,72 \pm 0,2$ [SciFinder 2004, <http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR>]. Der Siedepunkt liegt zwischen 170 °C und 175 °C. Das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung befindet sich in 95% Ethanol bei $\lambda_{max} = 260$ nm [52]. Das Absorptionsmaximum im Infrarotbereich liegt bei $\nu_{C=O}$ im Bereich von 1570-1600 cm^{-1} [53]. Toxikologisch gesehen ist Cotinin im Vergleich zu Nicotin von untergeordnetem Interesse [54].

1.3 Nitrosamine

Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure (Abbildung 1-10). Unter Einwirkung von Stickoxiden nitrosieren primäre und sekundäre Amine wiederum unabhängig von der Basizität des Amins (Machholz und Lewerenz, 1989) [55]. Die eigentliche Reaktion erfolgt dabei über das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenide. Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich die Ausbeute über den Anteil des aktiven Nitrosierungagens steuern. Das Ausbeuteoptimum befindet sich im Bereich eines pH-Werts von 3,0 bis 3,5. Ein niedrigerer pH-Wert würde zu einer Protonierung des Stickstoffs des sekundären Amins zum Iminiumion führen und eine Reaktion mit nitrosierenden Substanzen behindern. pH-Werte jenseits von 5 hingegen unterbinden weitgehend die säurekatalysierte Nitrosierung.

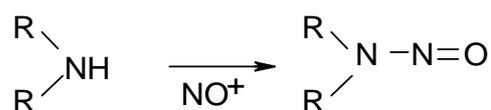


Abbildung 1-10: Vereinfachtes Schema der Nitrosierung

1.3.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen

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

Es ist prinzipiell davon auszugehen, dass Amine im menschlichen Organismus durch endogene Nitrosierung dieselben Nitrosamine bilden, die sich auch *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen darstellen lassen. Eine chemische Nitrosierung findet beispielsweise im sauren pH-Milieu des Magens statt, wenn Amine als nitrosierbare Vorstufen und Nitrit oder Stickoxide vorhanden sind. Der Nitritgehalt im Magen lässt sich hauptsächlich auf Nitrat zurückführen, welches mit der Nahrung aufgenommen wurde. Dieses wird vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu 25% mit Hilfe eines Anionen-Transportsystems in den Speichel abgesondert [56-58]. Eine bakterienvermittelte Nitrosierung findet zum Beispiel über die Bakterien der Mundhöhle statt, die mehr als 20% des Speichelnitrats, also 5% der aufgenommenen Menge, zu Nitrit reduzieren. Dieses wird nahezu komplett mit dem Speichel geschluckt und stellt so die Hauptquelle (80%) für Nitrit im Magen dar [58,59]. Eine nicht unerhebliche exogene Nitritquelle besteht in der Aufnahme von gepökeltem Fleisch oder Fisch. Die durchschnittliche Nitritkonzentration eines nüchternen Menschen liegt im Magensaft bei pH-Werten kleiner als 5 im Bereich von 0,1 bis 2,6 μM und erreicht bei pH-Werten größer 5 Konzentrationen von 26 bis 54 μM [60]. Dieses Nitrit wird allerdings beim Gesunden durch aktive Sekretion von Ascorbinsäure über Redoxreaktionen ständig abgebaut [61,62]. Ein hoher pH-Wert des Magensaftes deutet auf einen achlorhydrischen Magen hin, welcher optimale Bedingungen für das Wachstum von Darmbakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus spp.* bietet. Diese Bakterien sind in der Lage, größere Mengen Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Sie katalysieren unter Mitwirkung eines molybdänhaltigen Enzyms die Synthese von Nitrosaminen auch bei höheren pH-Werten [63-65].

Ein Entzündungsgeschehen kann ebenfalls für die endogene Bildung von Nitrosaminen verantwortlich sein. Entzündungszellen in Organen mit chronischer Infektion oder Entzündung können Stickoxide bilden. Im Rahmen der Immunstimulation werden diese durch Makrophagen und Neutrophile induziert. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion der endständige Guanidino-Stickstoff des L-Arginins zu Citrullin oxidiert und dabei NO freigesetzt. Dieses dient als Vasodilatator in den Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch in großem Überschuss produziert wird,

reagiert der überwiegende Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien N_2O_3 und N_2O_4 [66-68].

Eine Blasen- oder Harnwegsinfektion durch bestimmte Bakterien, die ihrerseits Nitrosierungspotenzial besitzen, kann eine zusätzliche Nitrosaminexposition bewirken [69].

Die bedeutendsten Quellen für die **exogene Nitrosaminbelastung** stellen nach dem Rauchen, Tabakschnupfen und -kauen [9] die Nahrungsmittel, Kosmetika und die berufsbedingte Exposition dar [70]. In Nahrungsmitteln stellt das starke Kanzerogen *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) den größten Anteil, außerdem sind *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin von Bedeutung. Neben diesen flüchtigen Nitrosaminen finden sich ferner auch wenig bis nicht kanzerogene, nichtflüchtige Nitrosamine, beispielsweise *N*-Nitrososarcosin, *N*-Nitrosoprolin und *N*-Nitrosothiazolidincarbonensäure in Lebensmitteln.

1.3.2 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 7 tabakspezifische Nitrosamine, die durch die Nitrosierung der Tabakalkaloide entstehen, im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert worden, das *N*-Nitrosornicotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), *N*-Nitrosoanatabin (NAT), *N*-Nitrosoanabasin (NAB), 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (*iso*-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC).

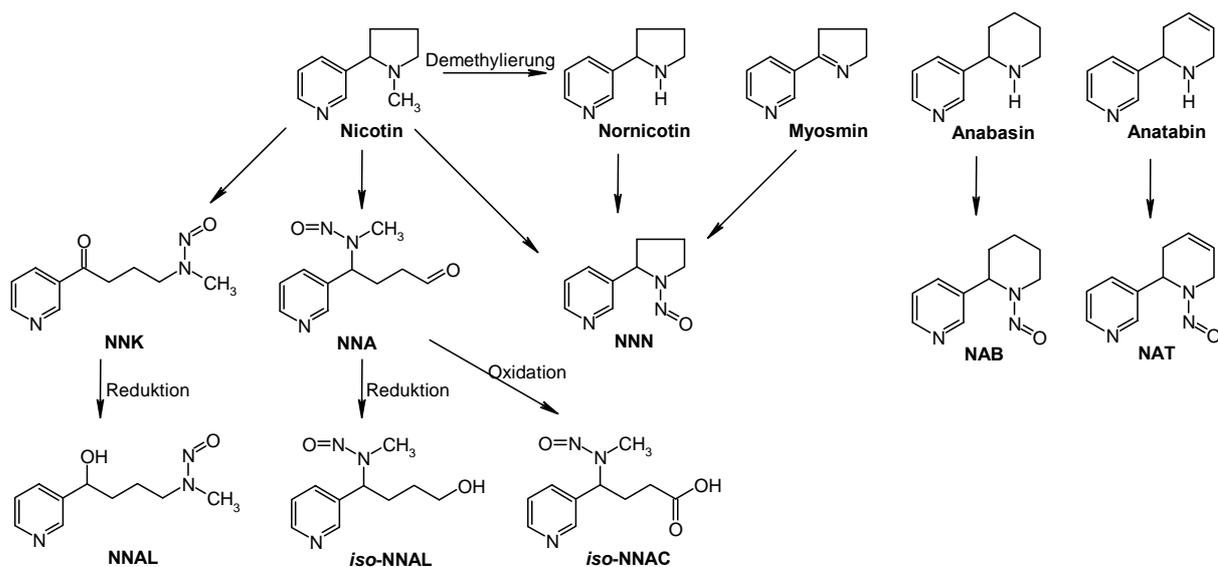


Abbildung 1-11: Bildung der TSNA (in Abwandlung nach Hoffmann et al. [71])

Die grünen, jungen Blätter der Tabakpflanze enthalten geringe Spuren an Nitrosaminen, der maßgebliche Teil jedoch entsteht beim Trocknen und Fermentieren der Blätter, sowie während der Alterung des Tabaks [72-74]. Der Nicotingehalt der Tabakblätter beträgt circa 1% bis 8%, selten bis zu 15%. Der Anteil an Nitrosaminen im Tabak ist etwa um den Faktor 3 000 bis 300 000 kleiner.

NNN entsteht hauptsächlich durch die Nitrosierung von Nornicotin, in geringerem Ausmaß durch Nitrosierung von Nicotin-N-oxid [75,76]. Neuesten Untersuchungen zufolge [45,46] kann auch Myosmin sehr effektiv zu NNN nitrosiert werden. Den Hauptentstehungsweg von NNK bildet vermutlich der mikrobielle Abbau von Nicotin-N-oxid zu Pseudooxynicotin, welches schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird [77]. Die enzymatische Reduktion der Ketogruppe bei NNK führt zu einem weiteren Nitrosamin, dem NNAL. NAT und NAB entstehen analog zu NNN durch direkte Nitrosierung der Tabakalkaloide Anatabin und Anabasin.

Von allen tabakspezifischen Nitrosaminen konnte NNA bisher nicht im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert werden. Wegen der hohen Reaktivität der Aldehydgruppe geht man von einer raschen Weiterreaktion zu *iso*-NNAC und *iso*-NNAL aus [78].

Der Gehalt an Nitrosaminen ist abhängig von der Alkaloid- und Nitratkonzentration in den Tabakblättern, sowie von den Prozessbedingungen der einzelnen Herstellungsstufen [74,79,80]. Auch die gewählten Bedingungen bei der Fermentierung fallen ins Gewicht. Daher finden sich beispielsweise besonders hohe Nitrosamingehalte im Schnupftabak [81]. Einen Überblick über die Konzentrationen der bedeutsamsten TSNA in diversen Tabakprodukten liefert Tabelle 1-4.

Tabelle 1-4: TSNA-Konzentrationen in Tabakprodukten der USA und UK [81,82]

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

1.4 **Biomonitoring**

Der Mensch ist tagtäglich in fast allen Lebensbereichen unterschiedlichsten Arten von Fremdstoffen ausgesetzt. Die Erfassung von Expositionsdaten in Form der Konzentration des Fremdstoffes und seiner Metaboliten, die man durch die Analyse von Zellen, Gewebe und Körperflüssigkeiten des Menschen erhält, wird als Biomonitoring bezeichnet [83]. Zum Schutze der menschlichen Gesundheit wurde in einem ersten Schritt die Konzentration bestimmter Chemikalien in der Umwelt gemessen. Sie spiegelt die **Äußere Exposition** wieder. Um damit eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen abzuschätzen musste von einer direkten Beziehung zur aufgenommenen Menge ausgegangen werden. Dieser Zusammenhang ist jedoch oftmals nicht gegeben. Während bei diesem sogenannten Monitoring wichtige Aspekte wie Resorption, Metabolismus, Pharmakokinetik und Verteilung des Stoffes im Individuum vernachlässigt werden, fließen diese beim Biomonitoring in die Untersuchung der jeweils relevanten Stoffe, seiner Metaboliten oder seiner *in vivo* Reaktionsprodukte im Körper mit ein. Man begann somit die **Innere Exposition** zu bestimmen. Sie entspricht der tatsächlich aufgenommenen Menge eines Stoffes. Mittels Bestimmung der Target-Dose wurde die biologisch wirksame Dosis berücksichtigt. Diese kann bei akut wirksamen Stoffen die Blutkonzentration sein, bei genotoxischen Stoffen die Konzentration des reaktionsfähiger Metaboliten, die z.B. mit der DNA reagiert haben.

Die durch Exposition ausgelösten Schäden können einerseits dosisunabhängig die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung erhöhen, andererseits kann die Schwere der Schädigung dosisabhängig erfolgen. In diesen Fällen spricht man vom stochastischen Effekt. Bei dem deterministischen Effekt tritt der Schaden ab einer bestimmten Empfindlichkeit auf.

Je nach Halbwertszeit der Substanzen können unterschiedliche Expositionszeiträume betrachtet werden. Allgemein gilt, je länger die Halbwertszeit desto mehr rückt die längerfristige Belastung in den Vordergrund.

1.4.1 **Anwendung**

Die Zusammenhänge zwischen Exposition und Gesundheitsschäden können seit der Weiterentwicklung analytischer Methoden besser verstanden werden. Dies ist auf die nun mögliche Bestimmung nicht nur der Muttersubstanzen und ihrer Metaboliten, sondern auch von DNA- und Proteinaddukten und deren Abbauprodukten zurückzuführen. Im Bereich des Human Biomonitoring wurden in Deutschland für die Allgemeinbevölkerung Grenzwerte für untersuchte Substanzen veröffentlicht. Der HBM Wert I ist der niedriger angesetzte

Kontrollwert, der HBM Wert II der höhere Interventionswert [84]. Für die Belastung am Arbeitsplatz gibt es als Grenzwerte die Biologischen Arbeitsstoff Toleranz (BAT) Werte, bei deren Einhaltung eine Gefährdung am Arbeitsplatz ausgeschlossen werden kann [85].

1.4.2 Analysen in Biologischen Materialien

Am häufigsten werden für die Expositionsmessungen Urin und Blut herangezogen, wobei letzteres den Nachteil der invasiven Probennahme hat. Gewebeproben sind meist nicht verfügbar. Für spezielle Fragestellungen können auch Haare und Exkrete wie Speichel und Muttermilch verwendet werden. So kann bei Haaranalysen, je nach Haarlänge, ein bestimmter Zeitraum überprüft werden. Diesen Vorteil macht man sich z.B. bei dem Nachweis von illegalen Drogen und Dopingsubstanzen zu nutze [86]. Auch Nicotin und Cotinin können mittels Haaranalyse nachgewiesen werden [87,88], dabei ist jedoch eine gründliche Vorreinigung der Haarprobe nötig, um äußerlich angelagertes Nicotin zu entfernen. Die Untersuchung von Muttermilch eignet sich hauptsächlich zur Abschätzung der Belastung gestillter Säuglinge.

1.4.3 Biologisches Effektmonitoring

Der mittels Biomonitoring erfasste Parameter wird, als **Biomarker** bezeichnet. Je nachdem ob das Ausmaß, der Effekt oder die individuelle Empfindlichkeit gegenüber der Exposition beurteilt werden soll, unterscheidet man drei Gruppen von Biomarkern.

Während die **Biomarker der Dosis**, ausschließlich Auskunft über die durch die Exposition entstandene Belastung geben, spiegeln die **Biomarker der Wirkung** und die **Biomarker der Empfindlichkeit** die Auswirkung der Substanzen auf den Organismus wider (Tabelle 1-5) [89,90]. Durch die Messung der internen Dosis können Aussagen über die gesamte Menge eines Fremdstoffes, die vom Organismus aufgenommen wird, gemacht werden. Hierzu werden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten und deren Reaktionsprodukte in Körperflüssigkeiten oder Geweben bestimmt. Der Biomarker der biologisch effektiven Dosis gibt die Beanspruchung des Individuums (z.B. in Form von DNA-Modifikationen) wieder, liefert also individuelle Informationen. Als Biomarker der Wirkung können durch Fremdstoffe im Organismus hervorgerufene Schäden wie Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausch und Mutationen gesehen werden [91,92]. Biomarker der Empfindlichkeit berücksichtigen die unterschiedliche Suszeptibilität der Individuen, die meist durch abweichende Enzymaktivität hervorgerufen wird. Bei zahlreichen Enzymsystemen, die die

Aktivierung oder Entgiftung eines Fremdstoffes katalysieren, liegt ein Polymorphismus vor. Abhängig von den entsprechenden Enzymaktivitäten überwiegen dann Giftungs- oder Entgiftungsreaktionen. Marker, welche die Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressorgen bestimmen, sollen ermitteln, ob ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung besteht, und werden als Biomarker der Empfindlichkeit bezeichnet.

Tabelle 1-5: Einteilung der Biomarker nach den messbaren Endpunkten im Metabolismus des Fremdstoffes

| | |
|---|---|
| <p>Biomarker der Dosis</p> | <p>a) <u>interne Dosis</u> Konzentration des Fremdstoffes oder seiner Metaboliten in Körperflüssigkeiten, Geweben, Exkrementen</p> <p>b) <u>biologisch effektive Dosis</u> Menge der aktivierten Substanz, die mit kritischen Zielmolekülen wie DNA reagiert hat: Proteinaddukte, DNA-Addukte</p> |
| <p>Biomarker der Wirkung</p> | <p>frühe biologische Effekte z.B. Chromosomenveränderungen, Mutationen</p> |
| <p>Biomarker der Empfindlichkeit</p> | <p>a) Nachweis von Onkogenen und Tumorsuppressorgen b) Bestimmung der Enzymaktivität bei Polymorphismus</p> |

Mit Hilfe der Biomarker gelingt der Brückenschlag zwischen epidemiologischen Erkenntnissen und dem Wissen aus Tierversuchen (Abbildung 1-12). Als Beispiel sei die Belastung von Rauchern mit aromatischen Aminen genannt. Die Epidemiologie liefert zunächst nur die Erkenntnis, dass Raucher gegenüber Nichtrauchern ein erhöhtes Blasenkrebsrisiko haben [93]. Aus der Arbeitsmedizin wissen wir, dass der Umgang mit aromatischen Aminen ein erhöhtes Risiko mit sich bringt, an Blasenkrebs zu erkranken [94]. In Tierversuchen hat man nicht nur diejenigen aromatischen Amine dingfest gemacht, die eine kanzerogene Wirkung entfalten, sondern auch in Dosis-Wirkungsstudien Relationen zwischen der Dosis und dem

Tumorrisiko einerseits und zwischen der Dosis und Biomarkern, in diesem Falle DNA-Addukte und Hämoglobinaddukte, andererseits bestimmt [95,96]. In zahlreichen Biomonitoringstudien wurde schließlich gezeigt, dass Raucher erheblich höhere Belastungen mit diesen Aminaddukten haben als Nichtraucher [97]. Aus den Erkenntnissen der Epidemiologie, der Tierversuche und des Biomonitorings war es möglich eine wissenschaftlich begründete Risikobewertung der Belastung mit dem aromatischen Amin 4-Aminobiphenyl vorzunehmen [98].

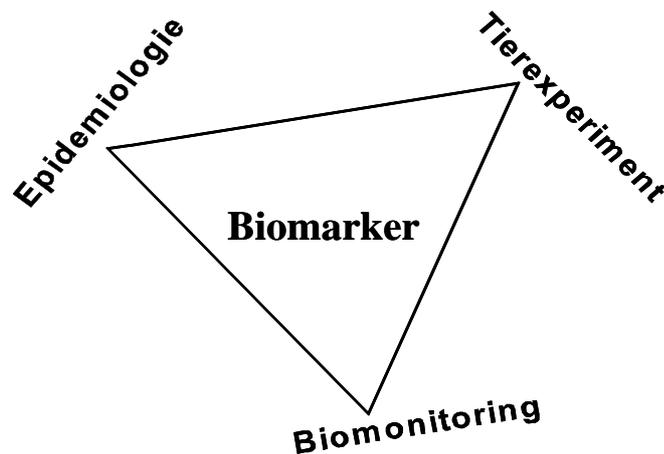


Abbildung 1-12: Zusammenhänge des Biomonitorings

1.4.4 Addukte als Marker

Sind Substanzen in der Lage mit Hämoglobin Addukte zu bilden, so können diese nach Abspaltung gemessen werden. Die meisten Addukte sind *in vivo* stabil und aufgrund der 120-tägigen Lebensdauer von Erythrozyten ist es beim Menschen möglich die durchschnittliche Belastung über einen Zeitraum von 3-4 Monaten zu betrachten. Zur Bestimmung wird das gebildete Addukt meist chemisch oder enzymatisch abgespalten. Nach Abtrennung der Proteine kann das Spaltprodukt dann mit geeigneten Methoden quantifiziert werden [95].

Die Betrachtung der Belastung über einen kürzeren Zeitraum ist durch Bestimmung der Serumalbuminaddukte möglich. Albumin hat eine HWZ von nur 19 Tagen, die Bindung einzelner Stoffe an Albumin kann aber deutlich höher sein als jene an Hämoglobin [95].

Reaktionsfähige Zwischenprodukte binden auch kovalent an die DNA. Diese Reaktion ist oftmals der erste Schritt der Tumorentstehung durch genotoxische Kanzerogene. Das ³²P-Post-labeling ist die derzeit empfindlichste Methode um DNA-Addukte zu bestimmen [99]. Dabei wird die DNA zu den einzelnen Nukleotiden verdaut, die adduktbeladenen Nukleotide angereichert, mit γ -³²P-ATP radioaktiv markiert und nach chromatographischer Trennung

gemessen. Analog zu den Hb-Addukten können die gebundenen Substanzen/Metaboliten aber auch nach Abspaltung gemessen werden. Addukte können von der DNA aber auch wie von den Proteinen hydrolytisch gespalten und danach z.B. mit GC-MS gemessen werden [100].

Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Hb- und DNA-Addukte wohl am besten die innere Exposition widerspiegeln.

1.5 Muttermilch

1.5.1 Zusammensetzung der Muttermilch

Die Muttermilch stellt eine der komplexesten Körperflüssigkeiten dar. Sie setzt sich zusammen aus Wasser, Kohlenhydraten, Milchfett, Milchproteinen, Mineralien, Vitaminen, Immunglobulinen und anderen Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren.

Die Kohlenhydrate bestehen zum Großteil aus Laktose. Aufgrund ihrer osmotischen Aktivität ist sie für den Wassergehalt in der Milch verantwortlich. Die Laktose ist nicht sehr süß und wird im Magen des Säuglings durch das Enzym Lactase in Glucose und Galactose gespalten. Weitere Kohlenhydrate sind Amino- und Phosphatzucker sowie bis zu 50 verschiedene neutrale und saure Oligosaccharide. Untersuchungen haben ergeben, dass der Laktosegehalt nach 60 Tagen Stillen nahezu unverändert bleibt. Zudem ist Laktose für die Aufrechterhaltung der isoosmotischen Eigenschaften der Milch gegenüber dem Plasma verantwortlich [101].

Mit 98% sind Triglyceride der Hauptbestandteil der komplexen Milchfettzusammensetzung [102]. Dabei sind drei Fettsäuren mit den Hydroxygruppen des Glycerins verestert. Milchfett ist mit 40-55% [103] der Hauptenergielieferant für das Neugeborene. In der Milch liegt das Fett in Form von Fetttropfen, die von einer amphiphilen Lipiddoppelschicht umgeben sind. Diese Membran dient gleichzeitig der Stabilisierung der Fetttropfen in der wässrigen Außenphase. Zudem enthalten die Milchlipide die essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolensäure (18:2n-6) und α -Linolensäure (18:3n-3). Der durchschnittliche Fettgehalt liegt bei 3,8 - 3,9 g/100 mL [102]. Die Zusammensetzung der Fettsäuren bestimmt die Eigenschaften der Milchfette. Man kann je nach Zusammensetzung drei Phasen unterscheiden. Die Milch von Tag 1-5 wird als Colostrum bezeichnet, Übergangsmilch wird von Tag 6-15 und ausgereifte Milch ab Tag 16 gebildet [102]. Neueren Angaben zufolge sollten diese Bezeichnungen jedoch gegen Stunden, Tage und Wochen ausgetauscht werden [104]. Aufgrund der geringeren Dichte der Fette erhält man nach Zentrifugieren eine Fettschicht auf der Milch.

Kaseine stellen mit drei bis vier Unterformen die Hauptgruppe der Milchproteine dar. In der Milch kommen sie in Micellenform vor, welche neben Kasein im Inneren der Micelle noch Wasser und Calcium- und Phosphorsalze enthalten. Im Vergleich zu Rohmilch ist der Kaseingehalt der Muttermilch gering. Weitere Vertreter der Proteine sind α - und β -Lactalbumin, Immunglobuline und Serumalbumin. Zudem sind noch Enzyme, Hormone und Wachstumsfaktoren enthalten.

1.5.2 Physikochemische Eigenschaften der Milch

Muttermilch weist eine sehr komplexe Struktur auf. Es liegen drei verschiedene Lösungsformen nebeneinander vor. In der Wasserphase sind die Milchfette in Form einer Öl in Wasser Emulsion emulgiert [103]. Die Größe der Fetttropfen beträgt 0,1-10 μm , die Dichte 0,92 g/mL. Die Kaseinmicellen bilden eine kolloidale Suspension in der Wasserphase. Die Micellen sind zwischen 10 und 300 nm groß, ihre Dichte beträgt 1,11 g/mL. In der wässrigen Phase in Lösung befinden sich wiederum Laktose, Mineralien und Salze.

Der pH Wert ist mit 6,8-6,9 geringer als der des Plasmas. Aufgrund der Laktosekonzentration ist die Milch isoosmotisch zum Plasma. Die spezifische Dichte von Muttermilch liegt bei 1,031 g/mL [103].

Muttermilch enthält im Vergleich zu Rohmilch der Kuh weniger Eiweiß, mehr Kohlenhydrate und etwas mehr Fett (Tabelle 1-6). Der Eiweißanteil der Muttermilch beträgt weniger als die Hälfte, ist aber durch einen höheren Anteil an Molkenproteinen und geringeren Anteil an Kasein für den Säugling besser verdaulich.

Tabelle 1-6: Vergleich der Zusammensetzung von Muttermilch mit Rohmilch der Kuh, von WL Hurley (<http://www.classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/topicareas>)

| Inhaltstoff | Muttermilch | Rohmilch |
|-----------------------------|--------------------|-----------------|
| Kohlenhydrate (g/dl) | | |
| Laktose | 7,3 | 4,0 |
| Oligosaccharide | 1,2 | 0,1 |
| Proteine (g/dl) | | |
| Kaseine | 0,2 | 2,7 |
| α -Lactalbumin | 0,2 | 0,1 |
| Lactoferrin | 0,2 | Spuren |
| Sekretorisches IgA | 0,2 | 0,003 |
| β -Lactoglobulin | kein | 0,36 |
| Milch Lipide (%) | | |
| Triglyceride | 4,0 | 4,0 |
| Phospholipide | 0,04 | 0,04 |
| Mineralien (mM) | | |
| Natrium | 5,0 | 15 |
| Kalium | 15,0 | 45 |
| Chlorid | 15,0 | 35 |
| Calcium | 8,0 | 30 |
| Magnesium | 1,4 | 4,0 |

1.5.3 Milchproduktion

Bis 36 Std. nach der Geburt wird Colostrumflüssigkeit gebildet. Sie ist sehr reichhaltig an sIgA und Lactoferrin. Danach beginnt bis Tag 5 eine konstante Zunahme vieler Milchbestandteile, sowie eine Volumenzunahme von 50 mL/Tag auf 500 mL/Tag. Lactoferrin und sIgA nehmen in diesem Zeitraum wieder ab. Nach 6 Monaten beträgt die durchschnittliche Milchmenge 750 ml/Tag [104]. Zudem treten Änderungen des Milchfettgehaltes in Abhängigkeit von der Tageszeit auf (Abbildung 1-13) [105].

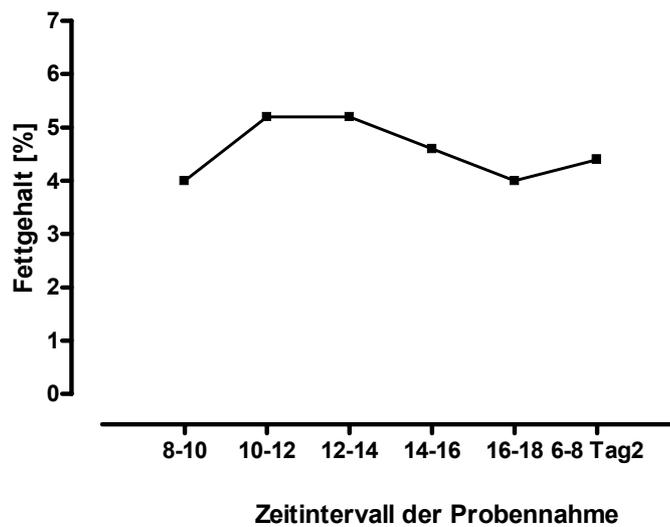


Abbildung 1-13: Fettgehalt der Muttermilch in Abhängigkeit der Tageszeit. Zur Bestimmung des Milchfettgehaltes wurden im Zeitraum von 6 bis 18 Uhr im Intervall von 2 Stunden Proben genommen. Der durchschnittliche Lipidgehalt über 24 Stunden beträgt 4,2%, die Tagesproben schwanken jedoch von 4,0% bis 5,2% [105].

Der Lipidgehalt verändert sich aber auch während des Stillens. Er liegt zu Beginn bei 2-3% und steigt während des Stillens bis auf 8-12% an (Abbildung 1-14). Dies ist auf ein Einsetzen der Lipidsynthese mit Beginn des Milchsaugens zurückzuführen. Proteine und Laktose unterliegen nur geringen Schwankungen. Die zu Beginn abgegebene Milch wird auch als Vormilch, die zum Schluss abgegebene Milch als Nachmilch bezeichnet.

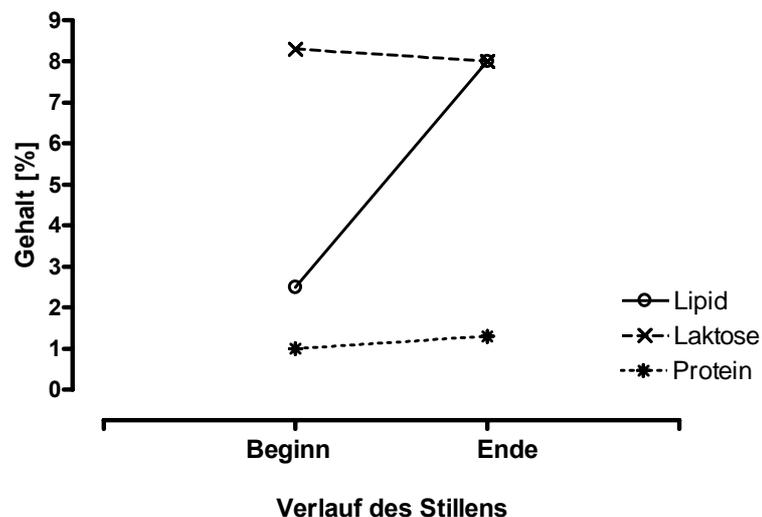


Abbildung 1-14: Änderungen der Zusammensetzung der Muttermilch während des Stillens [105].

1.5.4 Übertritt von Stoffen in die Muttermilch

Der Übertritt von Stoffen wie z.B. Schadstoffen oder Arzneimitteln hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, welche im folgendem kurz erläutert werden sollen.

Während Tag 4 bis 10 postpartum sind die Abstände zwischen den Alveolarzellen der Milchdrüsen noch geweitet (Weg V in Abbildung 1-15). Dies ermöglicht einen Übertritt mütterlicher Lymphozyten und Immunglobuline in die Muttermilch, aber auch Schadstoffe und Arzneimittel können in diesem Zeitraum nahezu ungehindert in die Milch diffundieren.

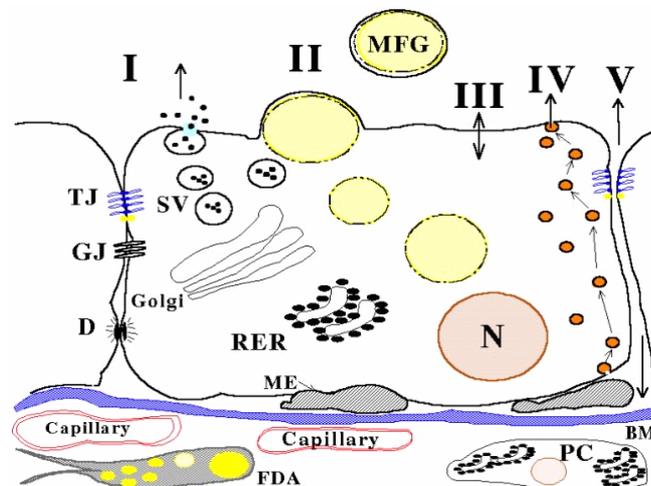


Abbildung 1-15 Alveolarzellen der milchproduzierenden Milchdrüse [106]

N, nucleus; TJ, tight junction; GJ, gap junction; D, desmosome; SV, secretory vesicle; FDA, fat-depleted adipocyte; PC, plasma cell; BM, basement membrane; ME, cross section through process of myoepithelial cell; MFG, milk fat globule; RER, rough endoplasmic reticulum. Secretory pathways I (exocytosis), II (milk fat secretion), III (apical transport), IV (transcytosis) and V (paracellular pathway).

Nach 10 Tagen schließen sich die Spalten und der Übertritt für Fremdstoffe auf diesem Weg wird erschwert. Zudem gibt es in der Brustdrüse einen aktiven und einen passiven Transport von Stoffen aus dem Blut in die Milch und umgekehrt. Die Konzentration der Wirkstoffe in der Muttermilch hängt maßgeblich von ihrer Konzentration im mütterlichen Blutplasma ab. Dabei kann nur freier Wirkstoff in die Milch übertreten, nicht hingegen proteingebundener Wirkstoff (Abbildung 1-16).

Aufgrund des niedrigeren pH Wertes der Milch gegenüber dem Plasma können schwach basische Stoffe mit einem $pK_a > 7,2$ nach Übertritt in die Milch aufgrund des Ionenfallenprinzips dort akkumulieren. Lipophile Stoffe reichern sich stärker in der Milch an als hydrophile Substanzen. Diese Zusammenhänge sind ebenfalls in Abbildung 1-16 veranschaulicht.

Bis zu einem Molekulargewicht von 300 Da ist der Übertritt leicht möglich, er wird ab einem Molekulargewicht von 600 Da sehr unwahrscheinlich, wenn nicht spezifische Transportmechanismen benutzt werden.

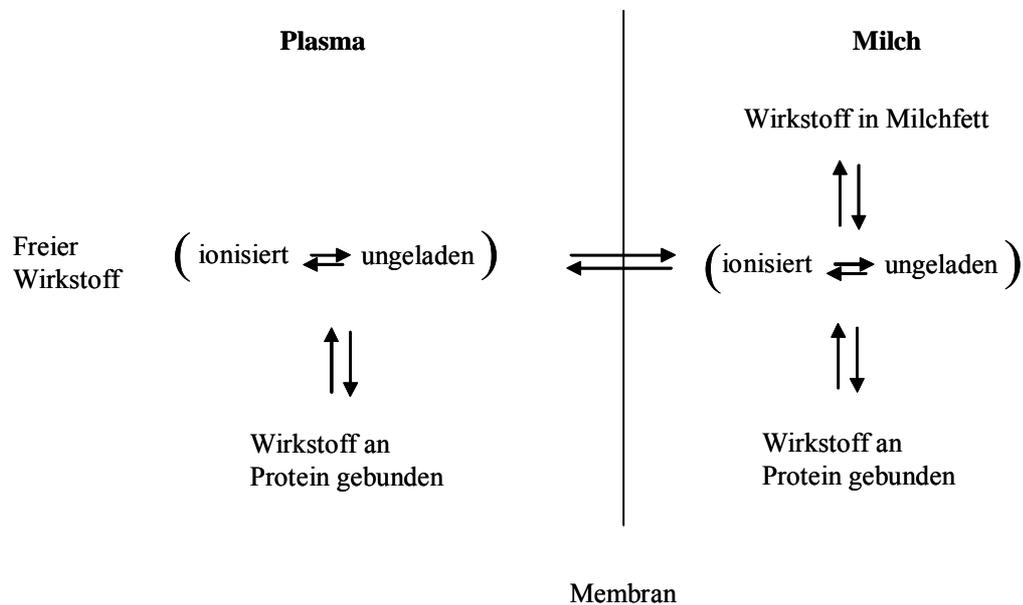


Abbildung 1-16: Schematische Verteilung von Wirkstoffen in Milch und Plasma [107]

1.5.5 Milch zu Plasma Verhältnis

Neben den oben genannten Voraussetzungen, die ein Stoff haben muss, um in die Muttermilch überzugehen, kann der Übertritt auch mit dem Milch zu Plasma Verhältnis, dem M/P Wert, angegeben werden. Anhaltspunkte für den Übertritt erhält man auch mittels des Membran-Diffusions-Modells durch Korrelation des logP mit dem logM/P [108]. Dabei geht man aber wohl bei der Bestimmung des logP 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 Milchlipid/Plasma Verhältnis bestimmen. Luck et al. [109] geben für Nicotin und Cotinin ein Milch/Plasma Verhältnis von $2,92 \pm 1,09$ und $0,78 \pm 0,19$ an. Somit ist die Anreicherung von Nicotin in der Milch stärker als die von Cotinin. Für Nicotin wurden M/P Werte in Abhängigkeit des pH Wertes der Milch bestimmt. Bei einem pH der Milch von 7,4 beträgt der M/P Wert 1,0 da dieser dem Plasma pH Wert von 7,42 entspricht. Mit sinkendem pH Wert der Milch steigt der M/P Wert (Tabelle 1-7).

Tabelle 1-7 Milch/Plasma Verhältnisse für Nicotin (pKa 7,8) bei verschiedenen Milch pH Werten bei einem Plasma pH von 7,42 nach Luck *et al.* [109]

| 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 |

1.5.6 Milch und Biomonitoring

Neben den oben schon erwähnten endogenen Substanzen (Nährstoffe, Vitamine und Mineralstoffe) werden auch exogene Stoffe mit der Milch ausgeschieden [110]. Dabei kann man zwei Gruppen unterscheiden. Zum einen die freiwillig aufgenommenen exogenen Stoffe wie Arzneimittel, Alkohol oder illegale Drogen, zum anderen die unfreiwillig aufgenommenen Substanzen wie Umweltgifte und Pflanzenschutzmittel. Ihre Aufnahme kann entweder oral erfolgen, aber auch durch Inhalation, z.B. von Zigarettenrauch und über die Haut. Während des Stillens kann es zu einer Umverteilung von lipophilen Substanzen aus dem Fettgewebe in die Muttermilch kommen.

Zu den unfreiwillig aufgenommenen exogenen Substanzen zählen auch aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe aus dem Tabakrauch [110]. Cotinin wird als Biomarker unter anderem herangezogen um die Rauchbelastung des Kindes über die Muttermilch abzuschätzen. Untersuchungen bezüglich des Nicotin- und Cotiningehaltes der Muttermilch wurden von Luck und Nau [111], LaKind *et al.*[49] und Page-Sharp *et al.* [112] durchgeführt.

1.5.6.1 Nicotin und Cotinin in der Muttermilch

In der Studie von Dahlström *et al.*, [113] wurden bei Raucherinnen vor dem Rauchen in der Muttermilch Nicotin- und Cotininkonzentrationen von 5,16 µg/L bzw. 112 µg/L gemessen. Diese Werte steigen nach dem Rauchen auf 55 µg/L für Nicotin und 136 µg/L für Cotinin an.

Luck und Nau [109] untersuchten den Nicotin- und Cotiningehalt bei rauchenden Müttern in Abhängigkeit der Anzahl gerauchter Zigaretten, sowie deren Tageszeit bedingte Änderung (Tabelle 1-8).

Tabelle 1-8: Konzentration von Nicotin und Cotinin in der Muttermilch in Abhängigkeit von der Anzahl gerauchter Zigaretten [109]

| Gruppe I (1-10 Zig/Tag) | | Gruppe II (11-20 Zig/Tag) | | Gruppe III (21-40 Zig/Tag) | |
|-------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| Nicotin (ng/mL) | Cotinin (ng/mL) | Nicotin (ng/mL) | Cotinin (ng/mL) | Nicotin (ng/mL) | Cotinin (ng/mL) |
| 18 ± 16 | 76 ± 33 | 28 ± 21 | 125 ± 60 | 48 ± 25 | 230 ± 62 |

Die Nicotinkonzentrationen sind tagsüber höher als in der Nacht, der Unterschied wird aber mit zunehmender Zigarettenzahl geringer. Aufgrund der längeren Halbwertszeit von Cotinin schwanken die Werte für diesen Nicotinmetaboliten im 24 Std. Intervall kaum.

Die Halbwertszeit für Nicotin in Muttermilch wird mit 97 ± 20 min angegeben und ist somit geringfügig länger als die im Plasma mit 81 ± 9 min [111]. Die Halbwertszeit für Cotinin hingegen unterscheidet sich nicht im Vergleich zu der im Plasma.

Aufgrund des größeren M/P Verhältnisses von Nicotin reichert sich dieses stärker in der Muttermilch an als Cotinin. Diese Tatsache erklärt sich anhand der chemischen Eigenschaften beider Substanzen. Mit pKa-Werten von $pK_{a1} = 7,8$ und $pK_{a2} = 3,1$ ist Nicotin basischer als Cotinin mit einem $pK_{a1} = 4,5$. Somit liegt Cotinin sowohl im Plasma als auch in der Milch in der nicht ionisierten Form vor [111] (Abbildung 1-16), ein Übertritt in beide Richtungen ist also möglich.

Untersuchungen von Becker *et al.* [114] haben gezeigt, dass bei zwei Wochen alten Kindern der Cotiningehalt im Urin fünf Mal höher liegt, wenn sie von rauchenden Müttern gestillt werden, als wenn diese nicht stillen. Eine Belastung für den Säugling über die Muttermilch ist somit auf jeden Fall stärker über die Muttermilch als über den Passivrauch.

In einer weiteren Studie von Ilett *et al.* [115] wurden Cotinin in Plasma von Müttern und gestillten Kindern gemessen. Drei Gruppen bekamen Nicotinplaster der Dosierung 7, 14 und 21 mg/Tag, eine vierte Gruppe bestand aus Raucherinnen. Die Nicotinkonzentrationen in der Muttermilch stiegen bei den Gruppen mit Pflastern dosisabhängig an. Die Werte bei der Gruppe, welche Plaster mit einem Nikotingehalt von 21 mg erhielten, lagen in der gleichen Größenordnung wie die Werte bei den Raucherinnen. Cotinin wurde im Plasma von Mutter und Kind gemessen. Bei der Gruppe, welche Plaster mit der höchsten Dosierung bekamen,

konnte im Plasma der gestillten Kinder zwischen 9,2% und 18,5% der mütterlichen Cotinin-konzentration gefunden werden.

1.6 Speichel

1.6.1 Zusammensetzung des Speichels

Speichel variiert in seiner Zusammensetzung über den Tag nur gering. Er besteht zu 99% aus Wasser, je 0,3% entfallen auf Proteine und das Glycoprotein Mucin, welches ein Austrocknen der Mundschleimhaut verhindert [116]. Zu den Proteinen zählen unter anderem Albumin, Lysozym, Amylase und die Immunglobuline IgA, IgM und IgG [117,118]. Des Weiteren sind Lactoferrin, Myeloperoxidase, Speichelperoxidase sowie Natrium-, Kalium-, Calcium- und Thiocyanationen enthalten. Somit stellt der Speichel eine weitaus weniger komplexe Matrix dar als die Muttermilch. Der Speichelfluss kann je nach Proband zwischen 0,1 mL/min und mehr als 0,7 mL/min betragen [119]. Die Tagesproduktion beläuft sich auf 500 - 1500 mL. Der pH Wert liegt zwischen 5,6 und 7.

1.6.2 Übertritt von Stoffen in den Speichel

Die Speichelgänge werden durch eine dünne Schicht Epithelzellen vom systemischen Kreislauf getrennt. Stoffe, welche vom Plasma in den Speichel gelangen sollen, müssen die Lipidmembranen dieser Zellen passieren. Der Transport kann durch aktive Sekretion, Diffusion durch Poren oder mittels passiver Diffusion erfolgen. Letztere ist bei den meisten Molekülen mit einem Molekulargewicht von 100 Da und größer die Regel. Um die Lipidmembran passieren zu können müssen die Substanzen eine ausreichende Lipophilie aufweisen. Der pH Wert des Speichels sowie der Speichelfluss sind somit entscheidend für die Anreicherung von Stoffen [120]. Da der Speichel im Vergleich zu Plasma eine sehr geringe Proteinbindung aufweist, beruht die Anreicherung nahezu ausschließlich auf dem Ionenfallen-Prinzip. Aufgrund der Ionisierung ist eine Rückdiffusion der ionisierten wasserlöslichen Substanz nicht mehr möglich. Zeigt eine Substanz starke Proteinbindung im Plasma, so ist für die Konzentration im Speichel nur die freie Form im Plasma maßgebend. Mittels dem Speichel zu Plasma Verhältnis (S/P-Verhältnis) kann die Verteilung einer Substanz zwischen beiden Kompartimenten beschrieben werden.

1.6.3 Speichel und Biomonitoring

Speichel zählt nicht zu den für das Biomonitoring am häufigsten verwendeten Körperflüssigkeiten. Seine leichte, nicht-invasive Gewinnung macht ihn jedoch in einigen Bereichen zu einer brauchbaren Probe. Die Ausscheidung von Stoffen über den Speichel als Eliminationsprozess ist hingegen von untergeordneter Bedeutung, da der Speichel wieder geschluckt wird, und es so zu einer Rückresorption der Stoffe im Magen-Darm-Trakt kommen kann. Da der pH Wert des Speichels normalerweise etwas geringer ist als der des Plasmas, können sich schwach basische Verbindungen auch hier anreichern [121]. Aufgrund des schwankenden pH Wertes des Speichels kann sich das Speichel/Plasma Verhältnis der Substanzen jedoch ändern. Während des Essens kann der pH auf Werte von 5,5 abfallen. Luck und Nau [111] fanden bei diesem pH Wert ein Speichel zu Plasma Verhältnis für Nicotin von 12,7. Dieses hohe Verteilungsverhältnis spricht für eine starke Anreicherung von Nicotin im Speichel. Andererseits kann der pH Wert des Speichels durch Stimulierung, z.B. bei der Probennahme, schnell auf Werte von 7,4 bis 8,0 ansteigen [122], woraus sich andere S/P Verhältnisse ergeben können.

Trotzdem findet man einige Bereiche in denen die Probennahme mittels Speichel mit Erfolg Anwendung findet. Der Rauchstatus lässt sich gut über Cotinin im Speichel bestimmen. Nicotin [88], sowie 3OH-Cotinin, ein Metabolit des Cotinins, ist ebenso nachweisbar [123]. Die Belastung durch ETS bei Nichtrauchern kann mittels Cotinin-Bestimmung im Speichel erfolgen. In einer Studie an Nichtrauchern fand sich eine mittlere Cotinin-Konzentration von 0,65 ng/mL, während bei ETS-ausgesetzten Personen 1,28 ng/mL nachgewiesen wurden. Phillips *et al.* [124] zufolge kann Cotinin als Biomarker für die ETS Belastung herangezogen werden. Die Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern aufgrund der Cotinin-Konzentrationen im Speichel erfordert die Festlegung eines cutoff-Wertes. In der Studie von Etter *et al.* [51] wurde dieser bei einer Speichelkonzentration von 7-13 ng/mL Cotinin angesetzt. In früheren Untersuchungen wurde schon das TSNA NNN in Abhängigkeit gekauter Nicotin-Kaugummi im Speichel in Spuren nachgewiesen [125].

Im Rahmen des Drogenscreening werden im Speichel illegale Substanzen, wie Amphetamine, Cannabis oder Opiate und Kokain, nachgewiesen [126], ebenso wie der Missbrauch von Barbituraten und Benzodiazepinen sowie Alkohol [116,127]. Auch Herbizide wie Atrazin sind bereits im Speichel identifiziert worden [128].

1.6.4 Speichelgewinnung

Zur Stimulierung des Speichelflusses kann vor der Probennahme auf einem Stück Paraffin gekaut werden [129]. Der Speichel wird dann in ein Reagenzglas gespuckt. Hygienischer und effektiver ist die Speichelgewinnung mittels so genannter Salivetten. Dabei kaut der Proband auf einem unbehandelten Watteröllchen bis es mit Speichel durchnässt ist. Er gibt dieses dann in ein Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP) mit gelochtem Zwischenboden. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min kann der Speichel von der Watte abgetrennt werden. Für Speichelproben < 1 mL genügt in der Regel eine Salivette. Für größere Mengen (5-6 mL) müssen je nach Speichelfluss 2-6 Röllchen von den Probanden gekaut werden.

1.7 GC-MS

Die Kopplung von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) erweist sich als effektivste Analyseverfahren für Trennung, Detektion und Charakterisierung von Bestandteilen komplexer organischer Gemische. Der Vorteil in der Kombination beider Geräte liegt in der Untersuchung von flüchtigen bis mittelflüchtigen Substanzen im pg Bereich, in welchem der Massenspektrometer optimale Leistung bringt. Nach der chromatographischen Auftrennung der Substanzen mittels GC erfolgt im MS zuerst die Ionisierung der Substanz. Anhand der Masse, der relative Menge von Molekülonen (M^+) sowie der Fragmentierung kann bei organischen Substanzen direkt auf die Molekülstruktur geschlossen werden [130]. Die früher verwendeten gepackten Säulen sind heute fast komplett durch flexible Fused-Silica-Kapillarsäulen ersetzt worden. Sie besitzen den Vorteil, direkt in die Ionenquelle geführt werden zu können. Bei der Ionisationsweise wird zwischen zwei Arten unterschieden. So kann zum einen Elektronenstoßionisation (EI), zum anderen chemische Ionisation (CI) eingesetzt werden.

Die EI wird durch Beschleunigung von Elektronen aus einem Heizdraht erzeugt. Um eine vollständige Fragmentierung der Moleküle zu erhalten, beträgt die Potentialdifferenz meistens 70 eV. Das dadurch in der Ionenquelle gebildete Radikalkation (**1**) wird Molekülion (M^+) genannt und liefert die Molekülmasse der Substanz (gemessen in Atommasseneinheiten, amu). Durch weitere Fragmentierung entstehen Radikale (**2**) und Neutralteilchen (**3**) (Abbildung 1-17)

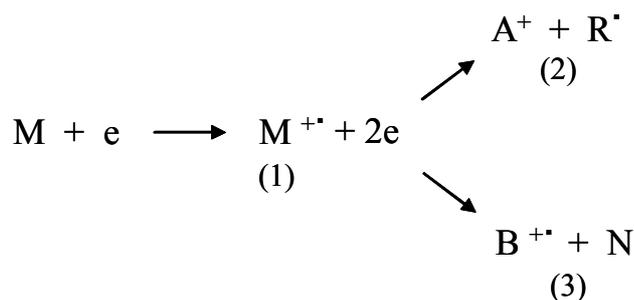


Abbildung 1-17: Die EI erzeugt aus einem Molekül durch Zusammenstoß mit einem Elektron ein Molekülion (M^+), welches durch Abspaltung eines Radikals (R^\bullet) oder eines Neutalmoleküls (N) die Fragmentation A^+ (Kation) oder $\text{B}^{+\bullet}$ (Radikalkation) ergibt.

Einen schonenderen Nachweis bietet die chemische Ionisierung. Sie erzeugt Massenspektren mittels ionischer Reaktion. Dadurch wird hauptsächlich der Molmassenpeak gebildet, eine Fragmentierung findet, im Vergleich zur EI, nahezu nicht statt. Die Übertragung der Elektronen erfolgt über ein in der Ionenquelle zugesetztes Reaktandgas. Prinzipiell kann man zwischen Ionisation mit positiven und negativen Ionen unterscheiden. Die Massenanalysatoren bestimmen die Ionenmasse entsprechend ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z). Neben den am häufigsten verwendeten Quadrupolmassenfiltern werden auch noch Magnetsektorfeldanalysatoren, Ionenfallen und Tandem-Massenspektrometer eingesetzt. Nach Passieren des Massenanalysators werden die, durch die Ionen erzeugten Ströme, im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-17} A, mittels eines Elektronenvervielfachers verstärkt. Die gewonnenen Daten werden danach an einem Computer ausgewertet.

1.7.1 Fragmentierung von Myosmin

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Fragmentierung von Myosmin. Das Massenspektrum besteht aus drei Hauptfragmenten, dem Molekülion (**1**), dem M-1 Fragment (**2**) und dem Basispeak (**4**) bei m/z 118 (M-28) welche in Abbildung 1-18 dargestellt sind. Dieser entsteht durch Abspaltung einer Ethylen-Einheit aus dem Molekülion (**1**). Die Bildung von (**5**) durch Abspaltung des Pyridylringes aus dem Molekülion, wie bei Cotinin, erfolgt nur in geringem Ausmaß [131]. Die Reste R in der Abbildung entsprechen Protonen für Myosmin und Deuteriumionen für den Internen Standard d_4 -Myosmin. Die entsprechenden Fragmente sind in Tabelle 1-9 aufgelistet.

Tabelle 1-9: Fragmente von Myosmin und d₄-Myosmin (vergleiche Abbildung 1-18)

| Substanz | Rest R | Fragment 1 (m/z) | Fragment 2 (m/z) | Fragment 4 (m/z) | Fragment 5 (m/z) |
|-------------------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Myosmin | H | 146 | 145 | 118 | 68 |
| d ₄ -Myosmin | D | 150 | 149 | 122 | 68 |

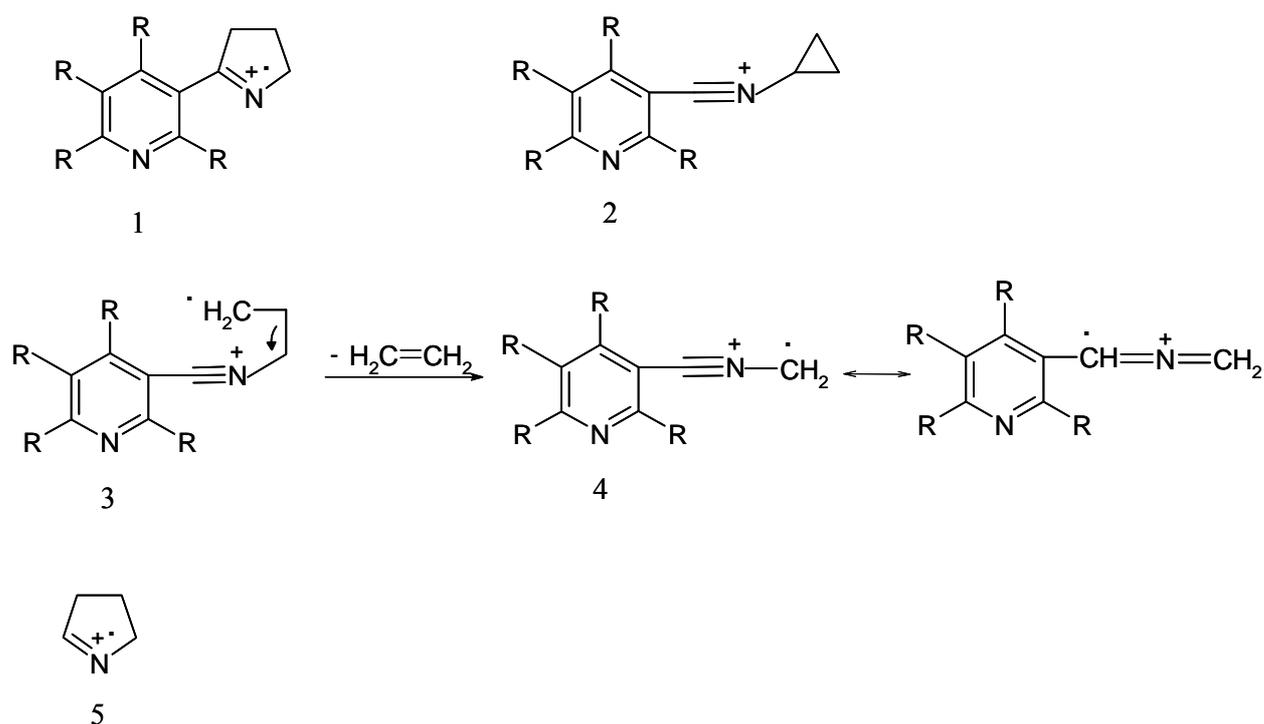


Abbildung 1-18: Fragmente von Myosmin

1.7.2 Fragmentierung von Cotinin

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Fragmentierung von Cotinin. Dieses Massenspektrum besteht nur aus zwei Hauptfragmenten, dem Molekülion (1), und dem Basispeak (2) bei m/z 98. Das Fragment (2) entsteht unter Abspaltung des Pyridylrings bei m/z 176. Zu weniger als 10% entsteht das Fragment (4) durch Protonentransfer und Umlagerung aus dem Molekülion [131] (Abbildung 1-19). Die Reste R in der Abbildung entsprechen Protonen für Cotinin und Deuterium Ionen für den internen Standard d₃-Cotinin. Die entsprechenden Fragmente sind in Tabelle 1-10 aufgelistet.

Tabelle 1-10: Fragmente für Cotinin und d₃-Cotinin (vergleiche Abbildung 1-19)

| Substanz | Rest R | Fragment 1 (m/z) | Fragment 2 (m/z) | Fragment 4 (m/z) |
|-------------------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Cotinin | H | 176 | 98 | 121 |
| d ₃ -Cotinin | D | 179 | 101 | 124 |

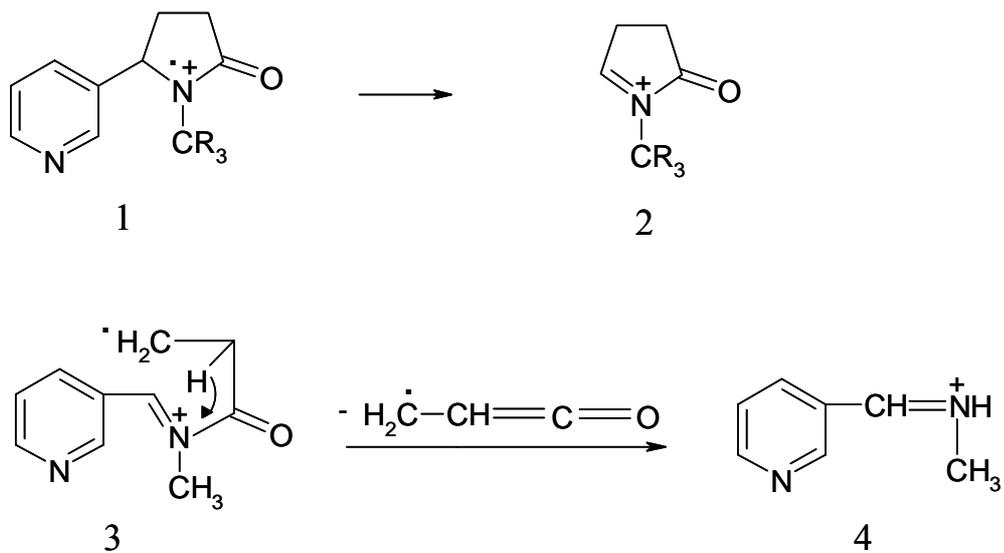


Abbildung 1-19: Fragmente von Cotinin

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Bereits 1972 wurde Myosmin im Rahmen von Stoffwechseluntersuchungen dem Menschen verabreicht [132]. Dabei wurde im Urin kein unverändertes Myosmin gefunden. Spezifische Metaboliten von Myosmin sind bisher nicht entdeckt worden. Zwickenpflug *et al.* [33] und Tyroller *et al.* [34] konnten Myosmin in einer Reihe von Grundnahrungs- und Genussmitteln, sowie in Milch und Sahne nachweisen. Seitdem ist Myosmin nicht mehr als ausschließlich in Tabak vorkommend einzustufen. Damit stellt sich die Frage wie hoch die Myosminbelastung über die Nahrung ist. Abschätzungen konnten bis jetzt nur anhand des durchschnittlichen Verzehrs von Nahrungsmitteln vorgenommen werden [34].

Ziel dieser Arbeit ist es nach Entwicklung einer geeigneten Methode, Myosmin in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu identifizieren und quantifizieren. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Methodenentwicklung zur Isolierung von Myosmin aus Muttermilch und anderen Körperflüssigkeiten.

Mit dieser Methode werden daraufhin folgende Körperflüssigkeiten auf Myosmin untersucht:

Muttermilch

Speichel

Plasma

Besteht die Möglichkeit die Myosminkonzentration auch im Plasma zu bestimmen, soll eine Abschätzung der Myosminaufnahme anhand von Speichel- und Plasmaproben erfolgen.

Im Rahmen einer Fastenkur sollen erste Anhaltspunkte gewonnen werden, ob die gemessene Myosminkonzentration abhängig von der Nahrungsaufnahme ist, oder ob es eventuell auch endogen gebildet werden kann.

2 Material und Methode

2.1 *Material*

2.1.1 Geräte

GC-MS:

GC Serie 8060, Fisons

MS Trio 1000, Fisons

Autosampler AS 800, Fisons

Quelle EI⁺

Software MassLab Version 1.3, Fisons plc.

GC-MS Peripherie:

Vakuumpumpe Edwards High Vacuum Pump E2M8 Two Stage, Edwards High Vacuum Int., Part of BOC Ltd., Crawley, Sussex, England

Kühlwasserbad und Steuereinheit Multitemp 2209, Colora Messtechnik GmbH, Lörrach

β-Counter:

Tri Carb 2500 TR, Packard, Dreieich

WinSpectral 1414, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim

Zentrifugen:

Minizentrifuge Universal 16R, Hettich, Tuttlingen

Minifuge GL, Bachofer, Reutlingen

Sorvall RC5C mit Rotor SS-34, Sorvall Inst. DuPont, Bad Homburg

Vakuum Konzentrator BA-VC 300H, Bachofer, Reutlingen

Hämatokrit Zentrifugenteller

Vortex Rüttler, Heidolph, Kehlheim

Analysenwaage A - 150 - SX, Cobes, Spanien

Magnetrührer Variomag Poly 15, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim

Digital pH Meter InoLab pH Level 1, WTW GmbH, Weilheim

Pipetten von Eppendorf:

Modell: microman 1000, 250, 25 μ L
pipetman 1000, 200, 20, 10 μ L
multipette plus

2.1.2 Materialien

GC-Säulen:

GC-Vorsäule Z-Guard Column Deaktiviert, Phenomenex, Aschaffenburg
L 10 m x ID 0,25 mm

Analytische Säulen

Zebron ZB 50 50% Phenyl-50% Dimethylsiloxanphase, Phenomenex, Aschaffenburg
L 30 m x ID 0,25 mm x df 0,25 μ m, Polaritätsindex 24

DB-5MS 5% Phenyl-95% Dimethylsiloxanphase, J&W, Folsom (CA), USA
L 30 m x ID 0,25 mm x df 0,25 μ m, Polaritätsindex 8

DB 1701 14% Cyanopropylphenyl-86% Methylpolysiloxan, J&W, Folsom (CA),
USA, L 30 m x ID 0,25 mm x df 0,25 μ m, Polaritätsindex 19

Spritzen 10 μ L Spritzen für GC (701N), Hamilton, Darmstadt

Liner Splitless Liner Borsilikat, 5 mm, Bezug über SMS, Idstein

Filament Wolframfilament, 5 Windungen, Bezug über SMS, Idstein

Septen Septa 77, Bezug über SMS, Idstein

Oasis HLB Säulen, 6cc/500 mg, Waters, Frankfurt

BondElut C18 Säulen, 3cc 500 mg, Varian, Frankfurt

Salivette, Watterolle ohne Präparierung, Sarstedt, Nürnberg

Zentrifugeneinsätze 50 mL aus PP, Sorvall, DuPont, Bad Homburg

Zentrifugeneinsätze 16 mL aus PP, Sorvall, DuPont, Bad Homburg

16 mL Zentrifugeneinsätze Adapter PN 00382 für Rotor SS34 Sorvall, DuPont, Bad Homburg

PP Röhrchen 50 mL mit Schraubdeckel und Fuß, Sarstedt, Nürnberg

PP Röhrchen 12 mL mit Schraubdeckel und Fuß, Sarstedt, Nürnberg

40 mL Pyrex-Reagenzgläser mit Gewinde und Deckel, Schott, Mainz

Zentrifugengläser 20 mL und 50 mL, Schott/Duran, Mainz

Pasteurpipetten aus Glas, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Messpipetten aus Glas 10 mL und 20 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

Vollpipette aus Glas 5 mL, Brand GmbH und Co, Wertheim/Main

25 ml Weithalsbechergläser

Messkolben 10, 50 und 100 mL

Bechergläser 25, 50, 100 und 200 mL

Vial 4 mL, Wheaton, USA

Deckel, Teflonbeschichtete Septen, Wheaton, USA

Minivial 1,5 mL, Zinsser Analytics, Frankfurt

Microvial 100 µL, Zinsser Analytics, Frankfurt

Spiralfedern, Alltech, München

Deckel, 8 mm Silikon PTFE Septen für Minivial, Zinsser Analytics, Frankfurt

Sterican Kanülen Gr.1, Braun, Melsungen

Mikro Hämatokrit Kapillaren (L = 75 mm, ID = 1,15 mm), Brand, Weilheim

Magnetrührstäbchen 15 x 6 mm, PTFE, zylindrisch, Brand, Weilheim

Kit, Brand, Weilheim

Schublehre, Mitutoyo, Japan

Neutralit pH-Indikatorpapier pH 5,5 - 9,0, Merck, Darmstadt

Schleifpapier Micromesh 4000 und 8000 20,3 x 15,4 cm, Micro Surface Finishing Products Inc., Wilton, IO, USA

2.1.3 Chemikalien

d₄-Myosmin, TRC, Toronto, Kanada,

Als Lösung von 7,7µg/mL in Dichlormethan von ABF zur Verfügung gestellt

d₃-Cotinin TRC, Toronto, Kanada

Myosmin

synthetisiert von Dr. W. Zwickelpflug am Walther-Straub-Institut der LMU, München

Cotinin, Sigma, Frankfurt

Zinksulfat (ZnSO₄), Merck, Darmstadt

Natriumsulfat, wasserfrei (Na₂SO₄), Merck, Darmstadt

Triethylamine, Merck, Darmstadt

Ameisensäure p.a., Merck, Darmstadt

NaOH rotuli p.a., Merck, Darmstadt

Schwefelsäure Konz., Merck, Darmstadt

Salzsäure Konz., p.a, Merck, Darmstadt

Nicotinamid, Merck, Darmstadt

LS-Cocktail, Ultima Gold XR, Packard, Groningen, Niederlande

Hexachlorbenzol (HCB), Merck, Darmstadt

Grob-Test-Mix, Phenomenex, Aschaffenburg

Lecksuchspray, Firma SMS, Idstein

Hexan p.a, Merck, Darmstadt

Acetonitril p.a, Merck, Darmstadt

Methanol p.a, Merck, Darmstadt

Dichlormethan p.a., Merck, Darmstadt

Ethylacetat p.a., Merck, Darmstadt

Chloroform p.a., Merck, Darmstadt

Diethylether p.a, Merck, Darmstadt

2-Octanol p.a, Merck, Darmstadt

Methanol Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

n-Hexan Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

Dichlormethan Supra Solv für GC, Merck, Darmstadt

LiChrosolv Wasser für die Chromatographie, Merck, Darmstadt

Wasser deionisiert aus der Hausanlage

Gas: Helium Qualität 5.0

Stickstoff Qualität 4.6

2.1.4 Radiochemikalien

³H-Myosmin spez. Aktivität 24 Ci/mmol in ethanolische Lösung, Hartmann Analytik, Braunschweig

2.1.5 Lösungen und Reagenzien

Phosphatpuffer 2 mL eines Phosphatpuffer pH 7,2 200 mM wird mit 198 mL (pH 7,2; 2 mM) dest. Wasser verdünnt.

4 N NaOH 40 g Natriumhydroxid rotuli werden mit 250 mL Wasser verdünnt.

| | |
|---|--|
| 6 N Schwefelsäure | Es werden 80 mL konzentrierte Schwefelsäure mit 420 mL Wasser verdünnt. |
| Hexan-Diethylether (90/10 v/v) | In einem geeichten 50 mL Messkolben mit Schliff werden 45 mL Hexan p.a und 5 mL Diethylether p.a gemischt. |
| Methanol-Wasser (90/10 v/v) | In einem geeichten 20 mL Reagenzglas mit Schliff werden 18 mL Methanol s.s. und 2 mL dest. Wasser gemischt. |
| ³ H-Myosmin Lösung | Es werden 10 µL ³ H-Myosmin mit 990 µL dest. Wasser verdünnt. |
| ³ H-Myosmin Lösung für O/W Koeffizient (siehe 2.2.1) | 33 µL einer wässrigen ³ H-Myosmin-Verdünnung der Aktivität 30404 dpm/µL werden 200 mL Phosphatpuffer pH 7,2 zugesetzt. |
| ³ H-Myosmin Lösung (für Reduzierungsversuche) | Zu 30 mL Dichlormethan werden 20 µL ³ H-Myosmin zugesetzt. 2 mL dieser Lösung haben eine Aktivität von 17022 dpm. |
| Verdünnung Myosmin | Es werden 10,014 mg in einem 100 mL Messkolben in 100 mL Wasser gelöst. Diese Lösung wird in einem 10 mL Messkolben 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Endkonzentration beträgt 10,0 µg/mL |
| Verdünnung Cotinin | Eine wässrige Lösung der Konzentration 0,0176 g/mL wird mit den entsprechenden Messkolben erst 1:100, dann 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. Die Endkonzentration beträgt 17,6 µg/mL |
| d ₄ -Myosmin | Als Stammlösung wird eine d ₄ -Myosmin Lösung in Dichlormethan der Konzentration 77 µg/mL hergestellt. 7,7 mg werden in einem 100 mL Messkolben eingewogen und mit Dichlormethan aufgefüllt. |
| Verdünnung d ₄ -Myosmin (ISTD) | Es werden 1 Milliliter Ansätze hergestellt. Dazu werden 100 µL der Stammlösung mit 900 µL Dichlormethan s.s. verdünnt. Die Endkonzentration beträgt 7,7 µg/mL. |
| d ₃ -Cotinin | 4,5 mg d ₃ -Cotinin werden in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit Dichlormethan aufgefüllt. Aliquots von 2 mL dieser Lösung werden in 4 mL Schraubgefäße umgefüllt (90 µg d ₃ -Cotinin) und zur Trockene eingeengt. |
| Verdünnung d ₃ -Cotinin (ISTD) | Ein Schraubgefäß mit 90 µg d ₃ -Cotinin wird bei Bedarf mit 1 mL Dichlormethan s.s gefüllt. Danach werden 100 µL dieser Lösung mit 900 µL Dichlormethan s.s. verdünnt. Die Endkonzentration beträgt 9 µg/mL. |

2.2 **Methode**

2.2.1 **Bestimmung des Octanol-Wasser Koeffizienten von Myosmin**

Die Bestimmung erfolgt wie von Lützhøf *et al.* [133] beschrieben. In einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff befinden sich ein Magnetrührstäbchen, 200 mL Phosphatpuffer pH 7,2 [108] und 50 mL n-Octanol. Dabei ist darauf zu achten, dass das Octanol so vorsichtig zugegeben wird, dass es oben auf der Wasserphase bleibt, und sich mit dieser nicht mischt. Der Rührer wird dann auf ca. 100 rpm eingestellt, sodass sich an der Phasengrenze ein Trichter von ein cm Tiefe bildet. Der Erlenmeyerkolben wird mit einem Schliffstopfen verschlossen und die beiden Phasen über Nacht bis zur Einstellung eines Gleichgewichts gerührt. Dann gibt man mit einer Pasteurpipette die ^3H -Myosmin-Lösung durch die Octanolphase hindurch in die Wasserphase (Puffer pH 7,2). Nach weiteren 24 Stunden Rühren werden aus beiden Phasen Proben genommen und im β -Counter vermessen. Der pH Wert der wässrigen Phase wird nochmals gemessen und mit dem zu Beginn bestimmten pH Wert verglichen.

2.2.2 **Muttermilch**

2.2.2.1 **Probennahme und Lagerung der Milchproben**

Die Milchproben für die Muttermilchstudie wurden im Klinikum Großhadern auf der Neonatologie-Station mit Zustimmung von Prof. Schulze gesammelt. Die Proben wurden bei gesunden Probandinnen während des Stillens mit einer Milchpumpe abgepumpt. Informationen über die Mütter wie Alter, Ernährungsgewohnheiten und Rauchstatus, sowie Zeitpunkt der Probennahme, wurden in einem Fragebogen abgefragt (siehe Anhang). Natürlich hatte bei der Probennahme das Wohl des Kindes absolute Priorität. Folglich wurde nur eine Einzelprobe genommen, wenn ausgeschlossen werden konnte, dass dem Kind daraus ein Nachteil entstehen könnte. Die Proben wurden im Krankenhaus sofort in Milupa Milchgläschen bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.2.2 **Probenvorbereitung**

Die Milch wird in einem Wasserbad auf $38\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Mit einer warmen 20 mL Messpipette wird 20 mL Probe in ein 25 mL Becherglas gegeben. Als interner Standard werden $7,8\text{ }\mu\text{L}$ d_4 -Myosmin und $6,8\text{ }\mu\text{L}$ d_3 -Cotinin in Dichlormethan zugesetzt. Dies entspricht jeweils 30 ng des internen Standards je 10 mL Probe. Nach 15 Minuten mischen wird

mit einer ebenfalls warmen 10 mL Messpipette die Hälfte der Probe in ein zweites 25 mL Becherglas überführt. Beiden Proben wird je 2 mL 6 N Schwefelsäure zugesetzt, sie werden abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt. Danach werden die Proben noch für zwei Stunden in einen 50 °C warmen Trockenschrank gestellt.

2.2.2.3 Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Muttermilch

Nach Entnahme der Proben aus dem Trockenschrank werden sie in 50 mL Polypropylen (PP) Zentrifugenröhrchen umgefüllt und, nach Abkühlen im Kühlraum, in der Sorvall RC5C mit Einsatz SS-34 bei 20 000 rpm (49 500 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Niederschlag enthält gefällte Proteine, das Fett bildet eine Schicht auf der Probe. Danach wird die wässrige Phase mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein 40 mL *Borax* Reagenzglas überführt. Es folgen nun zwei Vorreinigungen mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion. Im ersten Schritt wird die saure wässrige Phase mit 10 mL einer Mischung Hexan:Diethylether (90:10 v/v) ausgeschüttelt. Nach Umfüllen in Zentrifugengläser wird die Mischung in der Kendro Zentrifuge 5 Minuten bei 5000 rpm (1700 x g) zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wird wieder mit Pasteurpipetten abgenommen und in die gespülten 40 mL Reagenzgläser gefüllt. Nun erfolgt eine Extraktion mit 10 mL Dichlormethan. Diese Mischung wird ebenfalls 5 Minuten unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Danach wird der wässrig saure Überstand über eine, mit Methanol und Wasser konditionierte, 500 mg / 3 mL C18 BondElut-Säule gegeben. Der Durchlauf wird aufgefangen, mit 4 N Natronlauge auf pH 11 bis 12 eingestellt und 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die alkalische Lösung wird nun über eine konditionierte 500 mg/6ccm Oasis HLB Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit einem Säulenvolumen destillierten Wassers und Trocknen durch Zentrifugation bei 5000 rpm wird Myosmin mit 3 mL einer Mischung aus Methanol s.s.: Wasser (90:10 v/v) in ein 4 mL Wheaton Glas eluiert. Aus diesem Glas wird nun das Methanol bei 50 °C mit Stickstoff abgeblasen. Man verwendet dazu eine eigens dafür hergestellte Abblasvorrichtung, bestehend aus Aluminiumblock mit 24 passenden Bohrungen und Plexiglasdeckel, welcher den Stickstoff gleichmäßig auf die Gefäße verteilt. Der wässrige Rückstand wird mit einer 1000 µL Eppendorfpipette in ein 2 mL Eppendorfcup überführt. Mit zwei mal 500 µL Dichlormethan wird Myosmin extrahiert. Die Dichlormethanextrakte werden in einem 1 mL Zinsser Minivial vereint. Restwasser wird mit wasserfreiem Natriumsulfat entfernt.

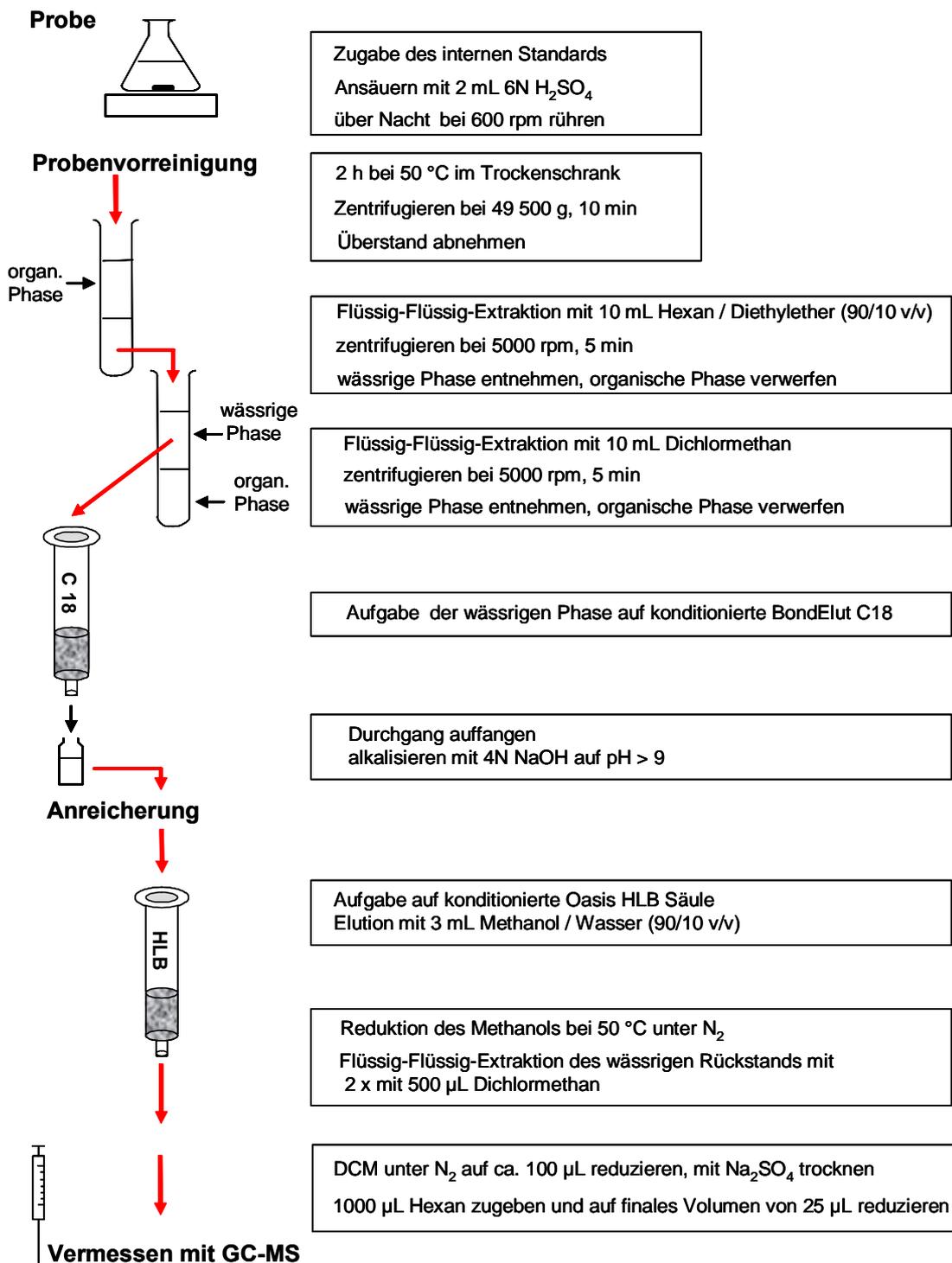


Abbildung 2-20: Schema der Extraktion und Anreicherung von Myosmin aus Muttermilch

Danach wird in diesem Vial das Dichlormethan bei 50 °C mit Stickstoff auf ca. 100 µL reduziert und mit 1000 µL Hexan verdünnt. Auf einem Vortex Mischer wird die Probe gut gemischt und das Hexan ebenfalls mit Stickstoff der Qualität 4.6 auf ein Volumen von 25 µL

reduziert. Dieses wird mit einem 25 µL Pipetman in ein Microvial überführt, welches mittels Feder in ein Minivial eingesetzt wird. Verschlossen wird das Microvial mit einem gelochten Deckel und einseitig teflonbeschichteten Silikonseptum. Der Ablauf der Extraktion und Anreicherung ist in Abbildung 2-20 schematisch dargestellt.

2.2.2.4 Bestimmung des Fettgehaltes der Milchproben

Zur Bestimmung des Fettgehaltes eignet sich die Creamatokrit Methode [104]. Dazu wird 50 µL Milch in Kapillarröhrchen gegeben, an einem Ende abgedichtet und für 15 min bei 1200 x g in einem Haematokrit-Zentrifugeneinsatz zentrifugiert. Danach werden mit einer Schublehre die Länge der Fettschicht und die Gesamtlänge der Milchsäule gemessen. Der Fettgehalt wird entsprechend Formel 2-1 in % der Gesamtlänge angegeben.

$$\text{Formel 2-1} \quad \text{Fettgehalt (\%)} = \frac{\text{Fettschicht (mm)} \cdot 100}{\text{Gesamtlänge (mm)}}$$

$$\text{Über die Beziehung} \quad \frac{\text{Creamatokrit (\%)} - 0,59}{1,46}$$

kann man den Fettgehalt auch in mg/mL angeben.

2.2.3 Speichel

2.2.3.1 Probengewinnung und Lagerung

Die Speichelproben wurden von freiwilligen Probanden im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie genommen. Die Ernährungsgewohnheiten wurden mittels Fragebogen erfasst. Außerdem wurde nach Art der letzten Mahlzeit und dem Zeitabstand bis zur Probennahme gefragt. In einer Zentrifuge wird bei 1200 rpm für 10 min der Speichel aus den Watteröllchen zentrifugiert. Das Volumen der Probe wird in einem skalierten 20 mL Reagenzglas mit Schliff gemessen und der pH Wert bestimmt. In einem 12 mL PP-Röhrchen werden die Proben bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2 Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Speichel

Nach Auftauen der Proben wird für die Doppelbestimmung jeweils ein Aliquot von 2 mL Speichel mit dest. Wasser auf 5 mL verdünnt. Diese lässt man Zugabe von internem Standard (6,8 µL d₄-Myosmin c=7,7 ng/µL und 6,8 µL d₃-Cotinin c=9,0 ng/µL) und 2 mL 6 N

Schwefelsäure über Nacht auf einem Magnetrührer bei 650 rpm rühren. In 40 mL *Borax* Reagenzgläsern mit Schraubverschluss wird zur Abtrennung lipophiler Verunreinigungen erst mit 5 mL Hexan:Diethylether (90:10 v/v), dann mit 5 mL Dichlormethan extrahiert. Die mit 4 N Natronlauge alkalisierte wässrige Lösung wird dann entsprechend der Methode für Muttermilch über eine konditionierte HLB Säule gegeben und nach Trocknen der Säule mit 3 mL Methanol s.s.: Wasser (90:10 v/v) in ein 4 mL Probenfläschchen eluiert. Die folgenden Schritte zur Anreicherung, Konzentrierung und Vorbereitung zur GC-MS Analyse von Myosmin erfolgen analog der Muttermilch Methode.

2.2.3.3 Fastenversuch

Im Rahmen einer Fastenkur eines Probanden werden Speichelproben vor Beginn, während und nach der Diät genommen. Ziel dieses Versuches ist eventuelle Schwankungen der Myosminkonzentration in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahmen zu bestimmen. Die Probennahmen erfolgt mittels vier Salivetten, vor und nach den Mahlzeiten, bzw. in der Fastenzeit mit reiner Wasseraufnahme. Die Speichelproben werden entsprechend der Methode unter 2.2.3.2 aufgearbeitet.

2.2.3.4 Isolierung und Anreicherung von Myosmin aus Plasma

Das in Na-EDTA Röhrchen abgefüllte Vollblut wird sofort bei 4 °C mit 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das so in den Röhrchen gewonnene Plasma wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und zu einer Probe vereint. Danach erfolgt die Aufreinigung entsprechend der Milchaufreinigung wie unter 2.2.2.3 beschrieben.

2.2.3.4.1 Bestimmung des Speichel zu Plasma Verhältnis von Myosmin

Bei zeitgleich genommenen Plasma- und Speichelproben werden die Myosminkonzentrationen bestimmt, und daraus das Speichel zu Plasma (S/P) Verhältnis berechnet.

2.3 GC-MS Analysen

2.3.1 Gaschromatographie-Massenspektroskopie

Es wird ein Gaschromatograph der Serie 8060 der Firma Fisons verwendet, an welchen ein Trio 1000 Quadrupol Massenspektrometers, ebenfalls der Firma Fisons, angeschlossen ist.

Die Probenaufgabe erfolgt im splitless Verfahren, bei welchem das Rückventil 1 min geöffnet bleibt.

Für die Methodenentwicklung wurden Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität verwendet. Die Proben werden letztlich auf der relativ unpolaren DB5-MS Säule vermessen. Als Trägergas fungiert Helium der Qualität 5.0 mit einem konstanten Druck von 12 psi.

Gemessen wird unter EI^+ -Bedingungen. Die dafür benötigten Elektronen werden mit einem Wolframfilament bei 70 eV erzeugt. Der Multiplier wird auf 350 V eingestellt, die Temperatur des Injektionsblocks und der Quelle betragen 200 °C, die des Transferliners 250 °C. Die Dwell time beträgt 60 ms, der Inter-Channel delay 30 ms.

Für die Vermessung der Muttermilchproben wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet (Abbildung 2-21):

- 1 min bei 50 °C halten
- Heizen mit 15 °C/min bis 170 °C
- Heizen mit 7,5 °C/min bis 210 °C
- Heizen mit 15 °C/min bis 300 °C
- 5 min bei 300 °C halten

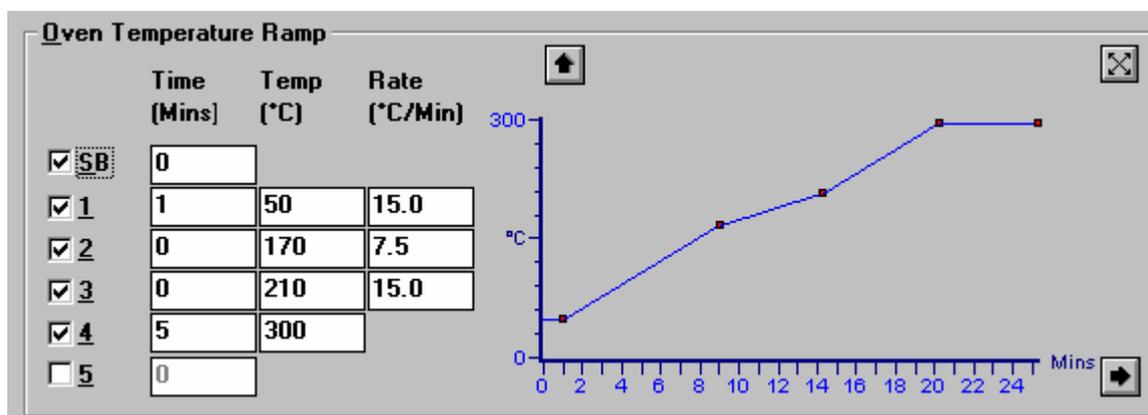


Abbildung 2-21: Verlauf des GC Temperaturprogramms

2.3.1.1 Nachweis charakteristischer Fragmente im Single Ion Monitoring (SIM) Modus

Aus der 25 µL Hexan Lösung wird zur Bestimmung des Myosmin- und Cotiningehalts 1 µL in den Gaschromatographen eingespritzt und im Anschluss mittels Massenspektrometrie bestimmt. Nach Überprüfen der für Myosmin typischen Fragmente im Scan-Modus über den Bereich von m/z 50-350 wird, der höheren Empfindlichkeit wegen, im SIM (Single Ion Monitoring) Modus Myosmin und Cotinin in der Muttermilch identifiziert und quantifiziert.

Zur Quantifizierung dienen die zwei Hauptfragmente der Substanzen bzw. der deuterierten internen Standards. Bei dem verwendeten MS-Programm werden zwei zeitlich getrennte Messbereiche mit unterschiedlichen Massen definiert (Tabelle 2-11).

Tabelle 2-11: Zeitfenster der zwei SIM Aufnahmen, sowie Retentionszeiten der zu vermessenden Substanzen auf einer DB5-MS Säule

| Substanz | Aufgenommenes Zeitintervall (min) | Retentionszeit (min) ¹ | Fragmente (m/z) |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Myosmin | 8,0 bis 11,5 | 10,084 - 10,097 | 118, 146 |
| d ₄ -Myosmin | | 10,055 - 10,075 | 122, 150 |
| Cotinin | 11,6 bis 18,0 | 13,211 - 13,230 | 98, 176 |
| d ₃ -Cotinin | | 13,195 - 13,205 | 101, 179 |

¹ Retentionszeiten können je nach Säulenlänge geringfügig variieren

2.3.1.2 Berechnung des Gehalts an Myosmin und Cotinin

Um die Menge Substanz in der Muttermilch zu bestimmen, wird die Fläche des entsprechenden Ions, wie in Formel 2-2 beschrieben, durch die Fläche des internen Standards (ISTD) geteilt und mit den Verhältnissen der Molekulargewichte ($M_{\text{Substanz}}/M_{\text{ISTD}}$) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Dieser Wert wird durch die Menge an eingesetzter Muttermilch (mL) dividiert. Dadurch erhält man den Wert für die Menge Myosmin bzw. Cotinin in ng/mL. Die Formel 2-2 veranschaulicht den Rechenweg für die Berechnung von Myosmin.

$$\text{Formel 2-2} \quad \text{Myosmin} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{(\text{Fläche}_{\text{MYO}} - \text{Blindwert}) \cdot M_{\text{MYO}} \cdot \text{absoluteMenge}_{\text{d}_4\text{-MYO}}}{(\text{Fläche}_{\text{d}_4\text{-MYO}} - \text{Blindwert}) \cdot M_{\text{d}_4\text{-MYO}} \cdot \text{Menge}_{\text{Muttermilch}} (\text{mL})}$$

Auch die Konzentrationen der Speichelproben werden, nach Austausch des Milchvolumens gegen das Volumen der Speichelproben, entsprechend dieser Gleichung berechnet.

2.3.2 Validierung

2.3.2.1 GC-MS Anlage

2.3.2.1.1 Repeatability der GC-MS Anlage

Es wird eine Lösung der Konzentration $c = 0,625 \text{ ng}/\mu\text{L}$ Myosmin in Dichlormethan hergestellt. Von dieser Lösung wird sechs Mal ein μL eingespritzt und auf den Massenspektren m/z 118 und m/z 146 vermessen.

2.3.2.1.2 Geräteempfindlichkeit

Mit Myosmin wird eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Stammlösung A-1 der Konzentration $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ Myosmin in Dichlormethan erstellt (Tabelle 2-12). Davon werden, in aufsteigender Reihenfolge, jeweils ein μL mittels GC-MS vermessen.

2.3.2.1.3 Kalibrierkurve von Myosmin mit Zusatz von d_4 -Myosmin

Aus einer Stammlösung der Konzentration $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ Myosmin in Dichlormethan wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, welcher eine konstante Menge d_4 -Myosmin (77 ng in $10 \mu\text{L}$) zugesetzt wird. Die Myosmin-Konzentrationen der einzelnen Lösungen betragen entsprechend der Tabelle 2-13 $0,156$ bis $5,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$, welche durch 1:1 Verdünnungen ausgehend von einer Stammlösung mit $10,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ hergestellt werden. Zu jeweils $70 \mu\text{L}$ dieser Lösungen werden $10 \mu\text{L}$ d_4 -Myosmin-Lösung der Konzentration $7,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ zugesetzt. Die finalen Konzentrationen in $80 \mu\text{L}$ sind der Tabelle 2-13 zu entnehmen. Beginnend mit der niedrigsten Konzentration B-7 bis Lösung B-2 werden jeweils ein μL mit GC-MS vermessen. Mit Hilfe des konstanten Zusatzes von d_4 -Myosmin können eventuelle Schwankungen des Injektionsvolumens berücksichtigt werden.

Tabelle 2-12: Myosmin-Verdünnungsreihe der zur Bestimmung der Geräteempfindlichkeit

| Ausgangs- lösung | Volumen (μL) | Menge Myosmin (ng) | Verdünnen mit DCM (μL) | Konzentration (ng/ μL) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|--|---------------------------------------|
| A-1 | 1000,0 | 1000,0 | 0,0 | 1,00 |
| A-2 | 700,0 Lsg. A-1 | 700,0 | 175,0 | 0,80 |
| A-3 | 575,0 Lsg. A-2 | 460,0 | 191,7 | 0,60 |
| A-4 | 466,7 Lsg. A-3 | 280,0 | 233,3 | 0,40 |
| A-5 | 400,0 Lsg. A-4 | 160,0 | 400,0 | 0,20 |
| A-6 | 500,0 Lsg. A-5 | 100,0 | 500,0 | 0,10 |
| A-7 | 700,0 Lsg. A-6 | 70,0 | 175,0 | 0,08 |
| A-8 | 575,0 Lsg. A-7 | 46,0 | 191,7 | 0,06 |
| A-9 | 466,7 Lsg. A-8 | 28,0 | 233,3 | 0,04 |
| A-10 | 400,0 Lsg. A-9 | 16,0 | 400,0 | 0,02 |

Tabelle 2-13: Verdünnung der Myosminlösungen mit konstantem Zusatz von d_4 -Myosmin

| Lösung | Konzentration Myosmin (ng/ μL) | Volumen der Myosminlösung (μL) | Volumen des d_4 -Myosmin Standard (μL) | Konzentration (ng/ μL) | |
|------------|--|---|---|------------------------------------|----------------|
| | | | | Myosmin | d_4 -Myosmin |
| <i>B-1</i> | <i>10,0</i> | <i>70,0</i> | <i>10,0</i> | <i>8,750</i> | <i>0,963</i> |
| B-2 | 5,000 | 70,0 | 10,0 | 4,375 | 0,963 |
| B-3 | 2,500 | 70,0 | 10,0 | 2,188 | 0,963 |
| B-4 | 1,250 | 70,0 | 10,0 | 1,094 | 0,963 |
| B-5 | 0,625 | 70,0 | 10,0 | 0,547 | 0,963 |
| B-6 | 0,313 | 70,0 | 10,0 | 0,273 | 0,963 |
| B-7 | 0,156 | 70,0 | 10,0 | 0,137 | 0,963 |

2.3.2.1.4 Überprüfung der Linearität von Myosmin- und d₄-Myosmin-Nachweis

Neben dem Flächenvergleich bei Lösung B-4 aus Tabelle 2-13 werden noch Kalibrierkurven der beiden Substanzen verglichen. Dazu werden aus Stammlösungen mit jeweils 2,0 ng/μL Myosmin bzw. d₄-Myosmin Verdünnungsreihen von 20 pg/μL bis 2,0 ng/μL hergestellt und mit GC-MS vermessen. Die Verdünnungen erfolgen entsprechend dem unter 2.3.2.1.2 beschriebenen Verfahren. Vermessen werden jedoch nur die in Tabelle 2-14 durch Fettschrift hervorgehobenen Lösungen.

Tabelle 2-14: Verdünnungsreihe von Myosmin und d₄-Myosmin

| Ausgangs- lösung | Volumen (μL) | Menge (ng) | Verdünnen mit DCM (μL) | Konzentration (ng/μL) |
|---------------------|-----------------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| C-1 | 1000,0 | 2000,0 | 0,0 | 2,0 |
| C-2 | 620,0 | 1240,0 | 620,0 | 1,0 |
| C-3 | 860,0 | 860,0 | 215,0 | 0,80 |
| C-4 | 695,0 | 556,0 | 231,7 | 0,60 |
| C-5 | 546,7 | 328,0 | 273,3 | 0,40 |
| C-6 | 440,0 | 176,0 | 440,0 | 0,20 |
| C-7 | 500,0 | 100,0 | 500,0 | 0,10 |
| C-8 | 620,0 | 62,0 | 155,0 | 0,08 |
| C-9 | 395,0 | 31,6 | 395,0 | 0,04 |
| C-10 | 410,0 | 16,4 | 410,0 | 0,02 |

2.3.2.2 Muttermilchanalyse

Als Richtlinie für die Methodvalidierung dient die Arbeit von Needham [134]. Die Richtigkeit der Methode kann entweder über den Vergleich mit einer Standardmethode erfolgen, oder aber durch Zusatz verschiedener Standardkonzentrationen, der so genannten Standard-Additionsmethode.

Die Genauigkeit wird mit Überprüfung der Wiederholbarkeit (within day) und Reproduzierbarkeit (day to day) bestimmt. Die qualitative Genauigkeit beschreibt die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten, die quantitative Genauigkeit diejenige der Peakflächen [130].

Zur Überprüfung der Linearität wird aus einem Milchpool eine Verdünnungsreihe erstellt. Die gemessenen Werte sollten in linearem Zusammenhang zu den Konzentrationen stehen. Das Limit of Quantification (LOQ) sowie das Detektionslimit (LOD) werden bestimmt. Werte unterhalb des Detektionslimits werden mit n.d. (nicht detektierbar) angegeben. Die Wiederfindung soll aus einem gepoolten Probenansatz erfolgen.

Da man nicht davon ausgehen kann dass die Milchproben frei von Myosmin sind, wird die Methode mit den zugesetzten Standards d_4 -Myosmin und d_3 -Cotinin entsprechend der oben erwähnten Standardadditionsmethode überprüft.

2.3.2.2.1 Kalibrierkurven für d_4 -Myosmin und d_3 -Cotinin nach Durchlaufen des Analysenganges

Es werden Kalibrierkurven für d_4 -Myosmin und d_3 -Cotinin nach Durchlaufen des Analysenganges erstellt, um die Linearität der Methode aus der Matrix zu überprüfen. Dazu werden Muttermilchproben einer Spenderin gepoolt, so dass ein Volumen von 200 mL zur Verfügung steht. Es werden Doppelbestimmungen bei 6 Konzentrationen durchgeführt. Bei einem Probenvolumen von 10 mL Milch werden steigende Mengen der internen Standards d_4 -Myosmin und d_3 -Cotinin zugesetzt, um die Konzentrationen von 0,25 bis 10,0 ng/mL zu erreichen (Tabelle 2-15).

2.3.2.2.2 Absolute Wiederfindung und Wiederholbarkeit (within day)

Es werden 4 Muttermilchproben mit jeweils 1 ng/mL d_4 -Myosmin angesetzt und entsprechend der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die absolute Wiederfindung, und die Wiederholbarkeit werden aus dieser Serie berechnet. Mittels Vergleich der Retentionszeiten kann auch die qualitative Genauigkeit angegeben werden.

Tabelle 2-15: Verdünnungsreihe für d₄-Myosmin und d₃-Cotinin aus dem gepoolten Muttermilchansatz einer Spenderin

| Lösung | Proben- volumen (mL) | Konzentration (ng/mL) d ₄ -Myosmin / d ₃ -Cotinin | Menge (ng) | Zusatz d ₄ -Myosmin Standard(μL) | Zusatz d ₃ -Cotinin Standard (μL) |
|--------|-------------------------|--|---------------|--|---|
| M-1 | 20,0 | 0,25 | 5,0 | 6,5 | 5,6 |
| M-2 | 20,0 | 0,50 | 10,0 | 13,0 | 11,2 |
| M-3 | 20,0 | 1,00 | 20,0 | 26,0 | 22,4 |
| M-4 | 20,0 | 2,50 | 50,0 | 65,0 | 55,6 |
| M-5 | 20,0 | 5,00 | 100,0 | 130,0 | 111,2 |
| M-6 | 20,0 | 10,00 | 200,0 | 260,0 | 222,4 |

2.3.2.2.3 Reproduzierbarkeit der Methode (day to day)

Zur Kontrolle der Day to Day Variationen werden 10 Proben zu je 10 mL mit 2 ng/mL d₄-Myosmin entsprechend Tabelle 2-16 versetzt und in einen Zeitraum von 50 Tagen aufgearbeitet. Die erhaltenen Flächen werden mit dem jeweiligen Tagesstandard korrigiert und die Schwankungen berechnet.

Tabelle 2-16: Ansatz der Milchproben für die Bestimmung der Tagesschwankung

| Volumen (mL) | Standard d ₄ -Myosmin c = (7,7 ng/μL) | |
|--------------|--|-----------------------|
| | Zusatz (μL) | Konzentration (ng/mL) |
| 120 (pool) | 31,2 | 2,0 |

2.3.2.3 Speichelanalyse

2.3.2.3.1 Kalibrierkurve für d₄-Myosmin und d₃-Cotinin nach Durchlaufen des Analysenganges

Es werden drei Standardlösungen mit den Konzentrationen 1,0, 0,5 und 0,05 ng/μL für beide Substanzen hergestellt. Die Konzentration der Stammlösungen betragen für d₄-Myosmin 7,7 ng/μL und für d₃-Cotinin 9,0 ng/μL. Die drei Verdünnungen werden entsprechend den Angaben in Tabelle 2-17 durch Verdünnung mit Dichlormethan s.s. hergestellt.

Tabelle 2-17: Verdünnung von Standardlösungen von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin

| Standard | Volumen Stammlösung (µL) | Volumen (µL) | Konzentration (ng/µL) | Zusatz DCM (µL) | Gesamt-volumen (µL) | Konzentration (ng/µL) |
|-------------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| D-1 | | | | | | |
| d ₄ -Myosmin | 15,6 | 29,2 | 4,1 | 90,8 | 120,0 | 1,0 |
| d ₃ -Cotinin | 13,6 | | 4,2 | | | 1,0 |
| D-2 | | | | | | |
| Lsg. D-1 | | 40,0 | 1,0 | 40,0 | 80,0 | 0,5 |
| D-3 | | | | | | |
| Lsg. D-2 | | 40,0 | 0,5 | 360,0 | 400,0 | 0,05 |

Die Linearität der Methode wird ebenfalls aus der Matrix überprüft. Speichelproben zweier Spender werden gepoolt, so dass ein Volumen von 100 mL zur Verfügung steht. Aus diesem Pool werden die Proben für Wiederfindung, Linearität und Reproduzierbarkeit entnommen. Es werden Doppelbestimmungen bei sechs Konzentrationen durchgeführt. Bei einem Probenvolumen von 2,0 mL Speichel werden die Konzentrationen von 0,125 bis 5,0 ng/mL für d₄-Myosmin sowie für d₃-Cotinin zugesetzt. Das Probenvolumen in Tabelle 2-18 entspricht dem doppelten Ansatz. Für die Aufbereitung wird es zuvor auf zwei Proben aufgeteilt.

Tabelle 2-18: Verdünnungsreihe für d₄-Myosmin und d₃-Cotinin aus dem gepoolten Speichel zweier Spender

| Lösung | Proben-volumen (mL) | Konzentration (ng/mL) d ₄ -Myosmin / d ₃ -Cotinin | Menge (ng) | Konzentration Standard (ng/µL) | Zusatz Standard (µL) |
|--------|---------------------|--|------------|--------------------------------|----------------------|
| S-1 | 4,0 | 0,125 | 0,5 | 0,05 | 10,0 |
| S-2 | 4,0 | 0,25 | 1,0 | 0,05 | 20,0 |
| S-3 | 4,0 | 0,5 | 2,0 | 0,05 | 40,0 |
| S-4 | 4,0 | 1,0 | 4,0 | 0,5 | 8,0 |
| S-5 | 4,0 | 2,0 | 8,0 | 0,5 | 16,0 |
| S-6 | 4,0 | 5,0 | 20,0 | 1,0 | 20,0 |

2.3.2.3.2 Absolute Wiederfindung und Wiederholbarkeit (within day)

Es werden 5 Speichelproben (je 2 mL) jeweils 2 ng der beiden internen Standards zugesetzt und entsprechend der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Einerseits wird die absolute Wiederfindung, andererseits auch die Wiederholbarkeit berechnet, sowie die qualitative Genauigkeit angegeben.

2.3.2.3.3 Reproduzierbarkeit der Methode (day to day)

Um die Schwankungen von Tag zu Tag (day to day) in einem kürzeren Zeitraum kontrollieren zu können, werden an drei Tagen drei Proben entsprechend den obigen Angaben in einen Zeitraum von 10 Tagen aufgearbeitet. Die erhaltenen Flächen werden mit dem jeweiligen Tagesstandard korrigiert und die Schwankungen berechnet (Tabelle 2-19).

Tabelle 2-19: Ansatz für Reproduzierbarkeit und Wiederfindung (N=5), sowie Tagesschwankungen (N=9) aus Speichelanalysen

| Probe | Probenvolumen (mL) | Konzentration (ng/mL) d ₄ -Myosmin / d ₃ -Cotinin | Menge (ng) | Konzentration Standard (ng/μL) | Zusatz Standard (μL) |
|------------|--------------------|--|------------|--------------------------------|----------------------|
| Wdf. | 10,0 | 1,0 | 10,0 | 1,0 (D-1) | 10,0 |
| Day to Day | 18,0 | 1,0 | 18,0 | 1,0 (D-1) | 18,0 |

2.3.2.4 Plasmaanalyse

2.3.2.4.1 Wiederfindung von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin aus Plasma

Einer gepoolten 6 mL Plasmaprobe werden 12 ng d₄-Myosmin und d₃-Cotinin zugesetzt und danach auf drei Proben je 2 mL aufgeteilt. Diese Proben werden entsprechend der Vorschrift für Muttermilch aufgearbeitet und die Wiederfindung bestimmt.

2.3.3 Wiederfindung von ³H-Myosmin bei Muttermilchanalysen

Im Rahmen der Methodenentwicklung wird zur Überprüfung der Verluste den Milchproben ³H-Myosmin zugesetzt. Als Ausgangslösung dient eine Verdünnung von ³H-Myosmin in Wasser (siehe auch 2.1.5). Durch Vermessen von Aliquots der einzelnen Fraktionen können die Verluste berechnet werden.

Zur Vermessung der radioaktiven Proben werden entsprechende Mengen mit 10 mL Szintillationscocktail Ultima Gold XR gemischt. Nach gründlichem Mischen werden sie im Szintillationszähler vermessen.

2.3.4 Statistik

Zur Berechnung der Absolutwerte, sowie der Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (S.D. = standard deviation), Standardabweichung vom Mittelwert und der Mediane wurden die Programme Microsoft Excel 2002 (Microsoft, Seattle, USA) und WinSTAT für EXCEL (Greulich Software, Staufen) sowie das Programm GraphPad Prism V.4.01 (GraphPad Inc., San Diego, USA) verwendet. Mit letzterem wurden auch die linearen Regressionen berechnet. Dabei wurde die Quadratsumme aller Messpaare ohne Gewichtung minimiert.

Für die Berechnung der Mittelwerte werden Proben unterhalb des LOD mit einbezogen. Für diese Proben wird der Wert des jeweiligen halben LOD eingesetzt.

Soweit nicht anders angegeben werden die Ergebnisse als Mittelwerte mit S.D., bei Doppelbestimmungen als Mittelwerte mit der Schwankung um den Mittelwert angegeben, die Anpassung der berechneten Werte der linearen Regression an die Messwerte mit dem Bestimmtheitsmaß r^2 , dessen Quadratwurzel r den Korrelationskoeffizienten darstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten

Nachdem in der Literatur nur Angaben von berechneten Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten von Myosmin zu finden waren, wurde mit Hilfe von ^3H -markiertem Myosmin die Verteilung zwischen Octanol und Wasser bestimmt. Wegen der pH-abhängigen Ionisierung und/oder der Ringöffnung von Myosmin und der damit verbundenen unterschiedlichen Wasserlöslichkeit wurde ein Phosphatpuffer mit genau kontrolliertem pH-Wert von 7,2 anstelle von Wasser verwendet. Zudem entspricht dieses Verhältnis dem Milchlipid/Plasma Verhältnis. Entsprechend der Versuchsbeschreibung wurden nach 24 Stunden jeweils drei Proben jeder Phase (5 mL Puffer bzw. 3 mL Octanol) entnommen und mit 10 mL Szintillatorcocktail gemischt und im β -Counter vermessen. Mittels der berechneten Radioaktivität (dpm/mL) (Tabelle 3-20) kann der Verteilungskoeffizient berechnet werden.

Tabelle 3-20: Dreifachbestimmung von Myosmin in Wasser und 2-Octanol. Mittelwerten \pm SD

| | Mittelwert (dpm) Puffer pH 7,2 | Mittelwert (dpm) Octanol |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Probenzahl N=3 | 3547 \pm 18 | 18921 \pm 57 |
| dpm/mL | 709 \pm 4 | 6328 \pm 19 |

Für Myosmin berechnet sich ein D_{ow} von 8,9, nach Logarithmieren erhält man den $\log P$, welcher 0,95 beträgt. Im Vergleich dazu liegt $\log P$ für Nicotin, entsprechend dem Sicherheitsdatenblatt der Firma Fluka, bei 1,17 (www.sigma-aldrich.com).

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion und Aufreinigung von Myosmin aus Muttermilch

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde eine erste Serie von Muttermilchproben entsprechend der Methode von Tyroller *et al.*[34] zur Isolierung von Myosmin aus Lebensmitteln aufbereitet. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten auf das Vorkommen von Myosmin hin. Da die Wiederfindung des Standards jedoch stark schwankte, sollten zusätzliche Aufreinigungsschritte überprüft werden. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Schritte kurz eingegangen werden.

Die zu Beginn durchgeführten Versuche mit H-Milch und Vollmilch von der Kuh führten im Hinblick auf die Aufreinigung von Muttermilch zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Dagegen lieferten die nachfolgend beschriebenen Versuche mit unbehandelter Rohmilch der Kuh gute Ansätze. Die Anwendung von Filtrationen, bzw. die Ultrafiltration mit Vivaspin Röhren führte zu keiner deutlichen Verbesserung. Während der Überprüfung von Verlusten mit Hilfe von ^3H -Myosmin stellte man bei der Elution von den C18 BondElut-Säulen Verluste von durchschnittlich 50% fest (Tabelle 3-21).

Tabelle 3-21: Wiederfindung von ^3H -Myosmin aus wässriger Lösung von C18 BondElut-Säulen (3cc/200mg)

| N | Zugabe | Radioaktivität (dpm) | | Wiederfindung (%) | |
|---|--------|--|------------------------------------|-------------------|------------|
| | | Wiederfindung im Durchgang (MW mit SD) | Wiederfindung im Eluat (MW mit SD) | Durchgang | Eluat |
| 6 | 29038 | 141 ± 16 | 14230 ± 1102 | 0,4 | 49,0 ± 7,7 |

Da an dem Prinzip der Festphasenextraktion festgehalten werden sollte, wurde auf Empfehlung von Prof. Boos, Institut für klinische Chemie in Großhadern, eine SPE Säule der Firma Waters getestet. Die OASIS HLB (Hydrophil-Lipophil Balance) Säule basiert auf einer Copolymerphase bestehend aus N-Vinylpyrrolidon und Divinylbenzol. Sie ist als Alternative zu den Kartuschen mit C18 modifiziertem Kieselgel entwickelt worden. Die Wiederfindung von Myosmin nach Elution mit Chloroform:Methanol (90:10 v/v) von der HLB Säule 6cc/500mg betrug 73%.

Auch bei der Überprüfung der Lösungsmittelreduktion wurden Verluste festgestellt. So war das Abziehen des Lösungsmittels in einer Vakuumzentrifuge immer mit deutlichen Verlusten behaftet. Auch das langsame Abdampfen der Lösungsmittel über Nacht bei Raumtemperatur führte zu höheren Verlusten.

Diese konnten durch Umstellen von Chloroform:Methanol (90:10 v/v) auf Dichlormethan als Elutionsmittel, sowie dessen nicht vollständige Reduzierung unter Stickstoff bei 50 °C auf 50 µL reduziert werden (Tabelle 3-22).

Tabelle 3-22: Vergleich der Wiederfindung von ³H-Myosmin nach Reduktion des Lösungsmittels bei Raumtemperatur (RT) und mit N₂

| Reduzieren des Lösungsmittels | N | Radioaktivität (dpm) | | Wiederfindung (%) |
|-------------------------------|---|----------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Zugabe | Wiederfindung (MW mit SD) | |
| Reduzieren mit N ₂ | 6 | 17022 | 15258 ± 522 | 89,6 ± 3,2 |
| Einengen über Nacht bei RT | 6 | 17022 | 10536 ± 2504 | 61,9 ± 23,8 |

Zu diesem Zeitpunkt wurde beschlossen auch Cotinin als Marker für die Rauchbelastung mitzubestimmen. Da es für Nicotin und Cotinin Methoden zur Isolierung aus der Muttermilch gab, wurden diese Ansätze hinsichtlich Ihrer Brauchbarkeit für die Myosminisolierung überprüft. Dabei wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Luck und Nau [111] ionisieren die Substanzen zuerst durch Ansäuern der Probe und extrahieren die lipophilen Substanzen mit Hexan. Der Ansatz von Dahlström [113] beginnt mit Alkalisierung der Proben und Extraktion von Analyten und Lipid mit Dichlormethan. Aus der organischen Phase wird dann die Substanz wässrig sauer zurückextrahiert.

Letzterer Ansatz (Tabelle 3-23, Ansatz 1), sowie in Kombination mit der HLB Säule (Tabelle 3-23, Ansatz 2), lieferten in Vorversuchen mit jeweils 19 mL Rohmilch brauchbare Wiederfindungen von über 60% für Myosmin.

Tabelle 3-23: Wiederfindung von ³H-Myosmin mit der Methode von Dahlström *et al.* (Ansatz 1) und in Kombination mit Anreicherung über Oasis HLB Säule (Ansatz 2)

| Ansatz | Radioaktivität (dpm) | | Wiederfindung (%) |
|--------|----------------------|----------------|-------------------|
| | Zugesetzt | Wiedergefunden | |
| 1 | 42819 | 30263 | 74,0 |
| 2 | 42998 | 26532 | 61,7 |

Mit diesen Aufreinigungsschritten und den Wiederfindungsraten hätte die Methode auf Muttermilch umgestellt werden können. Probleme traten dann allerdings nach Vermessen mehrerer Proben an der GC-MS auf. Es war ein schneller Verlust an Empfindlichkeit fest-

zustellen. Auffallend waren zu diesem Zeitpunkt weißliche Ablagerungen im Liner, sowie ein schnelles Verschmutzen der Quelle. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass noch nicht abgetrennte Lipide das System sowie die analytische Säule belegten.

Daraufhin wurde gezielt in Veröffentlichungen der Lipidanalytik nach Möglichkeiten gesucht, diese mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion oder durch Festphasenextraktion abzutrennen. In dem Review von Ruiz-Gutierrez und Perez-Camino *et al.* [135] sowie der Arbeit von Jensen *et al.* [136] werden verschiedene Möglichkeiten der Abtrennung von Lipidklassen mittels unterschiedlicher SPE Säulen, bzw. durch Flüssig-Flüssig-Extraktion beschrieben. Da diese Schritte nicht eins zu eins auf die bestehende Myosminmethode umgesetzt werden konnten, wurden sie in teilweise veränderter Form wie folgt übernommen.

Anstelle der alkalischen Extraktion mit Dichlormethan wurde die Probe zunächst angesäuert und über Nacht gerührt. Das Erwärmen auf 50 °C für 2 Stunden bewirkte eine bessere Proteinfällung bei der anschließenden Zentrifugation bei 18000 rpm. Danach wurden die restlichen Lipide in zwei Schritten extrahiert. Zuerst mit einer Mischung aus Hexan:Diethylether (90:10 v/v), anschließend mit Dichlormethan. Bei einem pH Wert von 1 bleibt Myosmin nahezu verlustfrei in der wässrigen Phase.

Eine weitere Aufreinigung brachte die Extraktion mit einer Silica C18 Säule bei pH 1. Da Myosmin immer noch in ionisierter Form vorlag, dürfe es von der Säule kaum zurückgehalten werden, die Säuregruppen der Fettsäuren sind unter diesen Bedingungen protoniert, d.h. lipophil und binden somit an das Säulenmaterial. Tatsächlich fanden sich 85% des eingesetzten Myosmins im Durchgang (Tabelle 3-24).

Tabelle 3-24: Wiederfindung von ³H-Myosmin bei pH 1 aus wässriger Lösung von C18 BondElut-Säulen (3cc/200mg)

| N | Radioaktivität (dpm) | | Wiederfindung (%) |
|---|----------------------|----------------------------|-------------------|
| | Zugesetzt | Wiedergefunden (MW mit SD) | |
| 3 | 138384 | 34837 ± 330 | 84,0 ± 0,8 |

Nach Alkalisieren auf pH > 9 und Zentrifugieren wurde Myosmin mittels der HLB Säule angereichert. Diese Schritte führten zu einer deutlich reineren Probe. Ablagerungen im Liner traten nicht mehr auf.

Zuletzt musste noch Dichlormethan gegen ein anderes Lösungsmittel ersetzt werden. Es eignet sich aufgrund des niedrigen Siedepunktes von 41 °C nicht, um bei der Gaschromatographie im splitless Verfahren eingesetzt zu werden. Bei dieser Technik muss das Lösungsmittel am Säulenanfang nochmals kondensieren, um eine optimale Peaktrennung zu erhalten. Hexan mit einem Siedepunkt von 69 °C erfüllt diese Bedingungen bei einer Säulen-anfangstemperatur vom 50 °C optimal.

Für die Extraktion hat DCM den Vorteil, dass sich das Volumen mit nur geringen Verlusten an Myosmin auf ein Volumen von 50 µL reduzieren lässt. Dieses reduzierte Volumen wird mit 1 mL Hexan versetzt und abermals reduziert, bis es mit einer, auf 25 µL eingestellten microman Pipette, genau abgenommen werden kann. Ein Vergleich der im GC-MS gemessenen Flächen beider reduzierter Proben gegen eine nicht reduzierte Dichlormethan-Probe ergab einen Flächenverlust von weniger als 5%. Nach diesem positiven Vorversuch wurde die Überführung in Hexan mit nochmals drei Ansätzen überprüft (Abbildung 3-22). Die Flächen der Fragmente m/z 118 und m/z 146 wurden verglichen und die Schwankung berechnet.

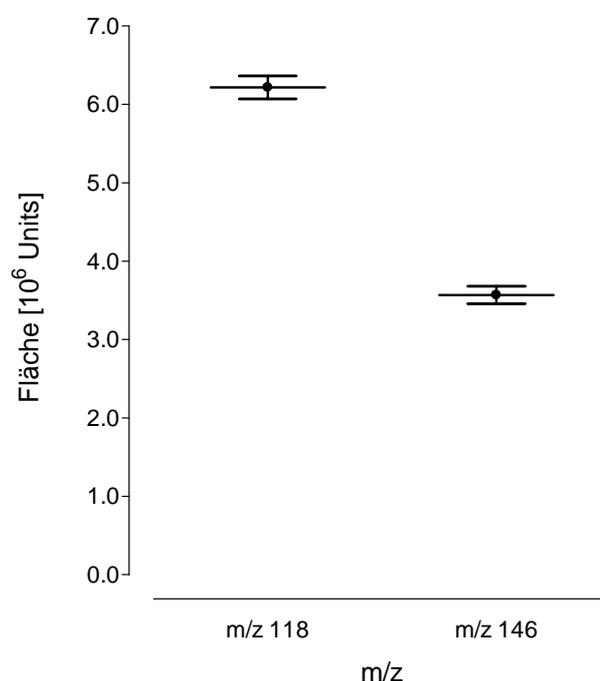


Abbildung 3-22: Überführen von Myosmin aus DCM in Hexan (N=3, MW mit SD in %): m/z 118: 6216204 (± 2,4%), m/z 146: 3568326 (± 3,1%)

Die Versuche, Myosmin mit GC-tauglichen Lösungsmitteln wie Ethylacetat oder Hexan direkt von der HLB Säule zu eluieren, zeigten alle eine zu geringe Wiederfindung. Somit musste das oben beschriebene aufwendigere Verfahren beibehalten werden.

3.2.2 Wahl der analytischen Säulen

In der Literatur findet man verschiedene Angaben bezüglich der verwendeten analytischen Säulen für die Bestimmung von Tabakalkaloiden (Tabelle 3-25). So werden zum einen Säulen verschiedener Hersteller mit einer Polarität entsprechend der DB5-MS Säule verwendet [137,138], zum anderen werden die unpolaren Säulen DB1-MS [88] und HP Ultra 1 Säulen [139] eingesetzt. Diese Säulen unterscheiden sich in der prozentualen Zusammensetzung der Filmkomponenten Dimethylpolysiloxan und (Phenyl)-methylpolysiloxan. Die Filmzusammensetzung der DB 1701 besteht aus den Komponenten Dimethyl-polysiloxan und (Cyanopropylphenyl)-methylpolysiloxan. Die Wahl der Säule scheint auch maßgeblich von der Probenmatrix abzuhängen.

Tabelle 3-25: Übersicht Probenmatrix und verwendete GC-Säulen

| Substanz | Matrix | Säule | Literatur |
|--------------------|------------------|------------|-----------|
| Nicotin | Haare | HP 5 | [137] |
| Nicotinmetaboliten | Urin | HP Ultra 1 | [139] |
| Nicotin, Cotinin | Urin, Speichel | DB1-MS | [88] |
| Nicotin, Cotinin | Plasma | DB 5 | [138] |
| Nicotin | Zigarettenfilter | DB 1701 | [140] |

In Vorversuchen wurden verschiedene analytische Säulen unterschiedlicher Polarität mit 30 Meter Länge, einem Innendurchmesser von 0,25 Millimeter und einer Filmdicke von 0,25 μm getestet. Die Zebron ZB 50 von Phenomenex zeigte bei dem Myosminpeak ein stärkeres Tailing als die DB5-MS. Zudem ließ die Trennleistung dieser Säule schneller nach als die der DB5-MS. Bei der DB 1701 gab es eine deutlich größere Überlagerung mit Blindwerten. Deshalb wurde letztlich für die Probenvermessung die DB5-MS Säule verwendet (Abbildung 3-23).

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde auch eine Vorsäule verwendet. Dabei handelt es sich um eine unbelegte, deaktivierte Säule der Firma Phenomenex mit 10 Meter Länge und einem Innendurchmesser von 0,2 Millimeter. Die Reinheit der Chromatogramme konnte durch das Vorschalten dieser Säule nicht verbessert werden. Selbst mit einer verkürzten

Vorsäule kam es jedoch zu einer deutlichen Peakverbreiterung, woraufhin keine weiteren Versuche mit Vorsäulen durchgeführt wurden.

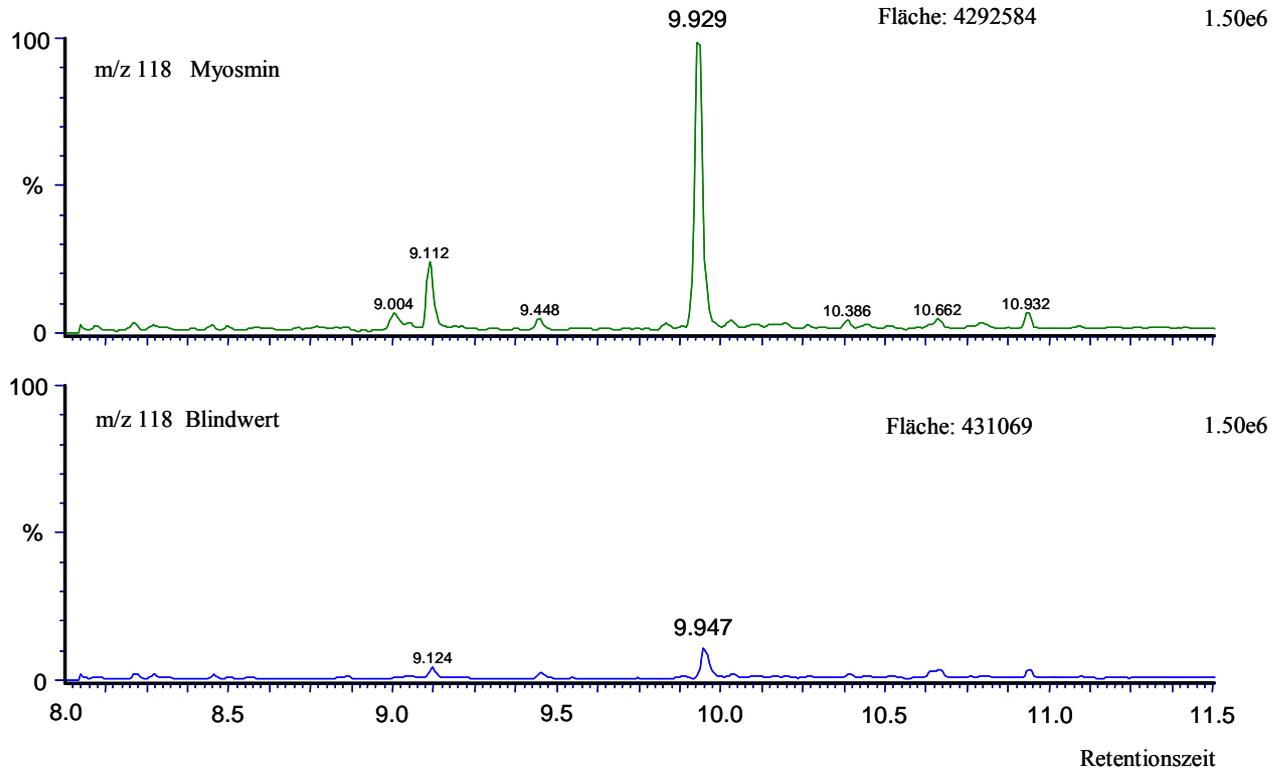


Abbildung 3-23: Chromatogramme einer Speichelprobe mit eines Wasserblindwertes aufgenommen im SIM. Dargestellt sind die Peaks auf der Massenspur des Basispeaks (m/z 118) von Myosmin (t_R 9,929 min), auf welcher auch quantifiziert wird.

3.2.3 Repeatability der GC-MS Anlage

Aus einer DCM-Lösung der Konzentration $0,625 \text{ ng}/\mu\text{L}$ Myosmin wurde sechs Mal ein Mikroliter eingespritzt und auf den Massenspuren m/z 118 und m/z 146 vermessen. Die Fläche der Massen m/z 118 und 146 schwankte um 5,12% bzw. um 5,52%. Durch Teilen der Fläche des Peaks der Masse m/z 146 durch den Basispeak der Masse m/z 118 erhält man die Fragmentierung. Diese zeigt einen relativen Fehler von 2,38% (Tabelle 3-26).

Tabelle 3-26: Übersicht Repeatability der GC-MS Anlage, bestimmt mit Myosmin (N=6)

| Substanz | Myosmin | | |
|-------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | m/z 118 | m/z 146 | Verhältnis 146/118 |
| Flächeneinheiten [] | 11887369 ± 608145 | 5629812 ± 310838 | 0,47 ± 0,011 |
| Menge (ng) | 0,582 - 0,663 | 0,606 - 0,693 | |
| rel. Wiederfindung (%) | 93,2 - 106,1 | 92,9 - 106,3 | |
| Abweichung vom Mittelwert (%) | 5,1 | 5,5 | 0,2 |
| C.I. (α=0,05) (%) | 5,4 | 5,8 | 0,2 |
| Retentionszeit [min] | | 9,44 ± 0,019 | |
| Abweichung vom Mittelwert (%) | | 0,2 | |
| C.I. (α=0,05) (%) | | 0,2 | |

3.2.3.1 Bestimmung von Linearität und Nachweisempfindlichkeit

Mit Myosmin wird eine Verdünnungsreihe von 1 ng/μL bis 20 pg/μL in Dichlormethan erstellt und vermessen. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,9977 (Abbildung 3-24). 20 pg/μL konnten noch mit einem S/N von 4 zu 1 quantifiziert werden.

Die Geräteempfindlichkeit hängt auch stark von dem Zustand des GC-MS-Systems ab. Das Alter des Filaments, Ablagerungen in Liner und Quelle, sowie Positionierung der Säule in der Quelle haben Einfluss auf die Geräteempfindlichkeit. Zur Überprüfung der aktuellen Nachweisempfindlichkeit wird täglich ein Standard vermessen. Nach Einbau oder Wartung einer Säule werden zudem ein Grob-Test Mix sowie ein Hexachlorbenzol-Standard vermessen.

3.2.3.2 Kalibrierkurve von Myosmin mit Zusatz von d₄-Myosmin

Einer Verdünnungsreihe von Myosmin in DCM von 0,156 bis 5,0 ng/μL wurde eine konstante Konzentration von d₄-Myosmin, 0,963 ng/μL, zugesetzt. Mit dem Zusatz können eventuelle Schwankungen des Injektionsvolumens berücksichtigt werden. Das Bestimmtheitsmaß verbessert sich von r²=0,9906, nach Korrektur mit d₄-Myosmin auf r²= 0,9960.

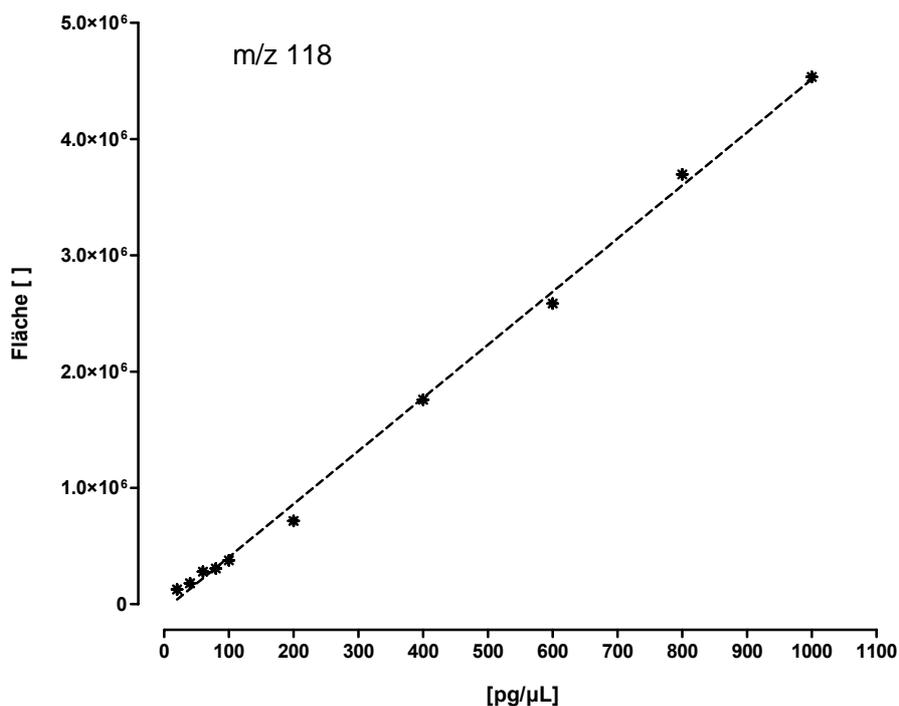


Abbildung 3-24: Kalibrierkurve von Myosmin (20 bis 1000 pg/μL) zur Bestimmung von Linearität und Nachweisempfindlichkeit. Der Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,9977$ ($p < 0,0001$)

Bei diesem Versuch wird auch die Peakfläche von Myosmin und d₄-Myosmin bei der Konzentration 1,0 ng/μL verglichen. Dazu wird der Wert für Myosmin aus der Konzentration 1,094 ng/μL berechnet, der für d₄-Myosmin aus der Konzentration 0,963 ng/μL. Die berechneten Werte variieren um 5,9% (Tabelle 3-27).

Tabelle 3-27: Umrechnung der gemessenen Flächen von Myosmin und d₄-Myosmin auf Flächen bei einer Konzentration von 1 ng/μL und deren Mittelwert

| Konzentration (ng/μL) | Fläche Myosmin | Fläche d ₄ -Myosmin | Abweichung vom Mittelwert (%) |
|-----------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 0,963 | 4081678 | | |
| 1,094 | | 3305561 | |
| Berechnet | | | |
| 1,0 | 3730967 | 3432566 | ± 5,9 |

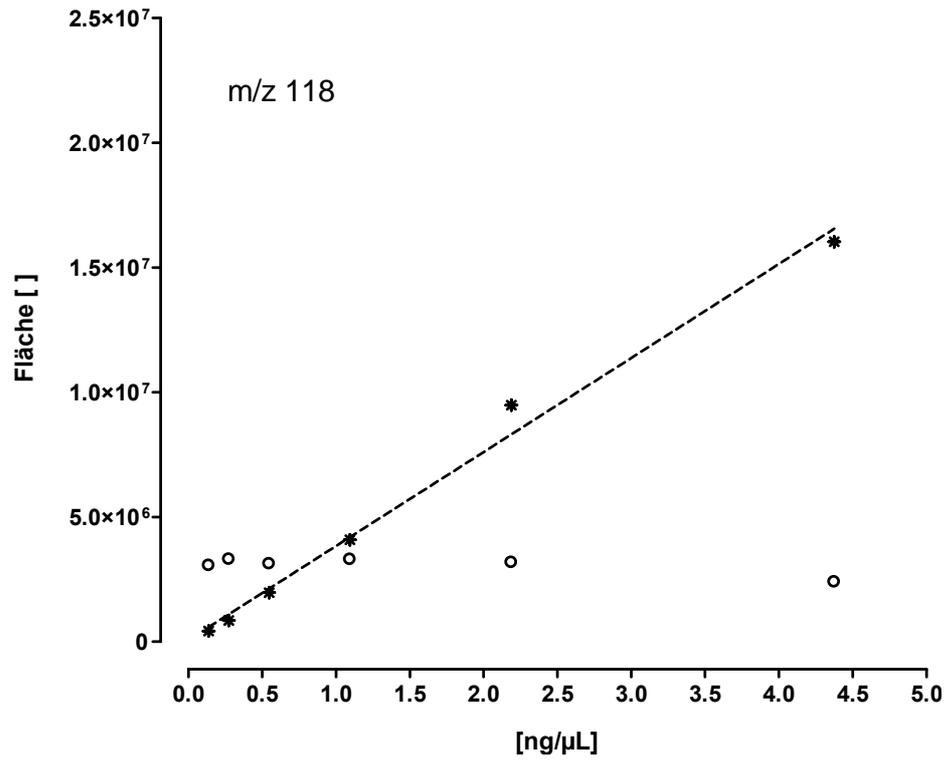


Abbildung 3-25: Kalibrierkurve mit Myosmin (0,156 bis 5,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$) unter Zusatz von jeweils 0,963 $\text{ng}/\mu\text{L}$ d_4 -Myosmin; $r^2 = 0,9906$

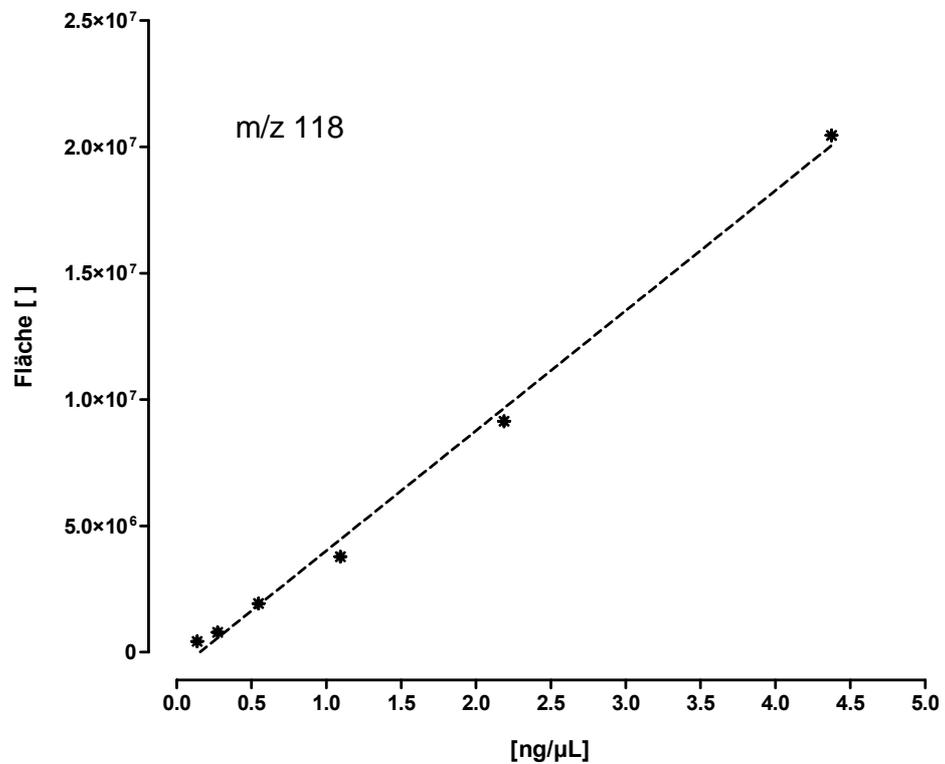


Abbildung 3-26: Kalibrierkurve mit Myosmin (0,156 bis 5,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$) nach Korrektur mit d_4 -Myosmin; $r^2 = 0,9960$

3.2.3.3 Überprüfung der Linearität von Myosmin und d₄-Myosmin

Neben dem Flächenvergleich in Tabelle 3-27 werden noch Kalibrierkurven beider Substanzen verglichen. Dazu wird aus einer Mischung gleicher Teile beider Substanzen eine Verdünnungsreihe von 20 pg/μL bis 2,0 ng/μL hergestellt und mit GC-MS vermessen.

Für beide ist die Linearität gegeben, für Myosmin sowie für d₄-Myosmin erhält man einen Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,9982$. Das Verhältnis der Steigungen Myosmin / d₄-Myosmin beträgt 1,11.

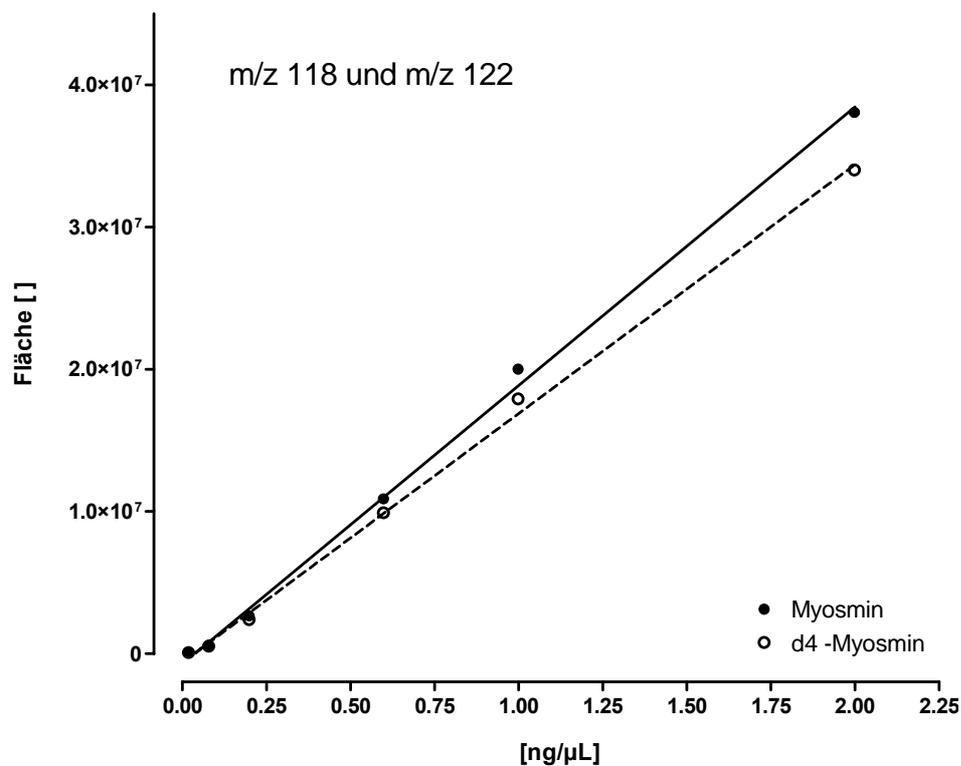
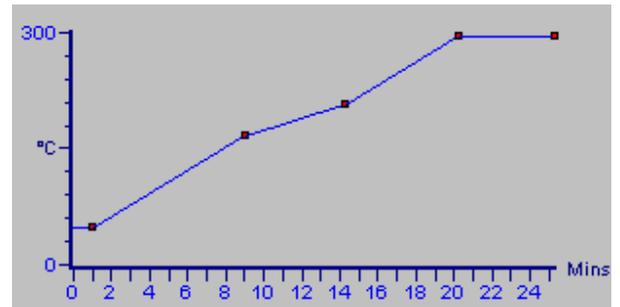
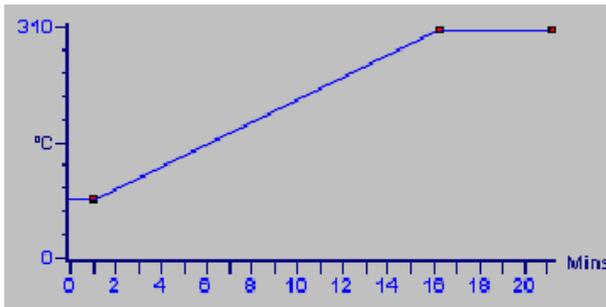


Abbildung 3-27: Kalibrierkurve von Myosmin und d₄-Myosmin (je 20 - 2000 pg/μL); Das Bestimmtheitsmass beträgt jeweils $r^2 = 0,9982$, $p (< 0,0001)$

3.2.3.4 Temperaturprogramm

Zur besseren Auftrennung der Peaks wurde das Temperaturprogramm optimiert. Anfangs verlief das Temperaturprogramm wie folgt

| | | |
|---------------------------------|------|----------------------------------|
| 1 min bei 80 °C halten | dann | 1 min bei 60 °C halten |
| Heizen mit 15 °C/min bis 310 °C | | Heizen mit 15 °C/min bis 170 °C |
| 5 min bei 310 °C halten | | Heizen mit 7,5 °C/min bis 210 °C |
| | | Heizen mit 15 °C/min bis 300 °C |
| | | 5 min bei 300 °C halten |



Das Reduzieren der Heizrate von 15 °C auf 7,5 °C im Temperaturbereich von 170 bis 210 °C führte zu einer besseren Auftrennung der Peaks, ohne die nachteiligen Effekte einer Peakverbreiterung.

3.2.4 Identifizierung von Myosmin in Muttermilch

Zur Identifizierung von Myosmin werden die Muttermilchproben im SIM Modus auf den fünf für Myosmin charakteristischen Massenspuren vermessen. Nach der Verbesserung der Probenaufreinigung konnte damit Myosmin in der Muttermilch eindeutig identifiziert werden (Abbildung 3-28). Das erhaltene Fragmentierungsmuster (Abbildung 3-29) entspricht dem aufgenommenen Referenzspektrum von Myosmin (Abbildung 3-30). Zudem wird das Spektrum mit einem Standardspektrum der MassLab Computerdatenbank verglichen (Abbildung 3-32). Auch hier stimmen die Spektren überein, es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Spektren gerätebedingt geringfügig unterschiedliche Fragmentierungsverhältnisse aufweisen können. Übereinstimmung zeigt auch der Vergleich von d₄-Myosmin und Myosmin bezüglich der Retentionszeit. Das Referenzspektrum des internen Standards ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

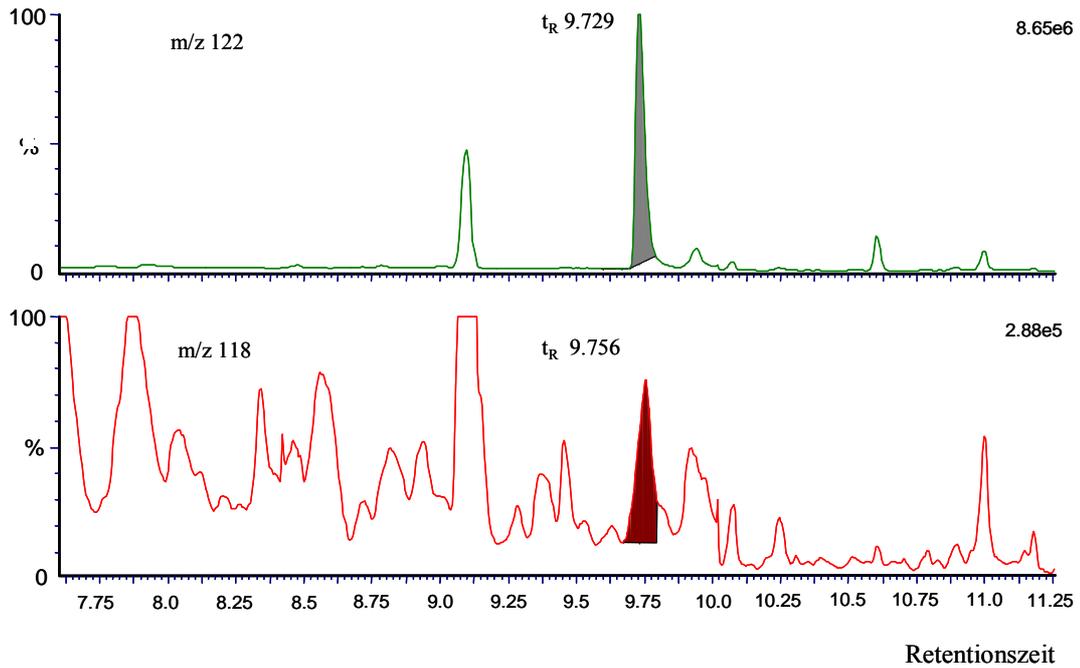


Abbildung 3-28: Myosmin unten, (m/z 118) und d_4 -Myosmin oben, (m/z 122) extrahiert aus 15 mL Muttermilch. Die Konzentration von Myosmin beträgt 0,54 ng/mL

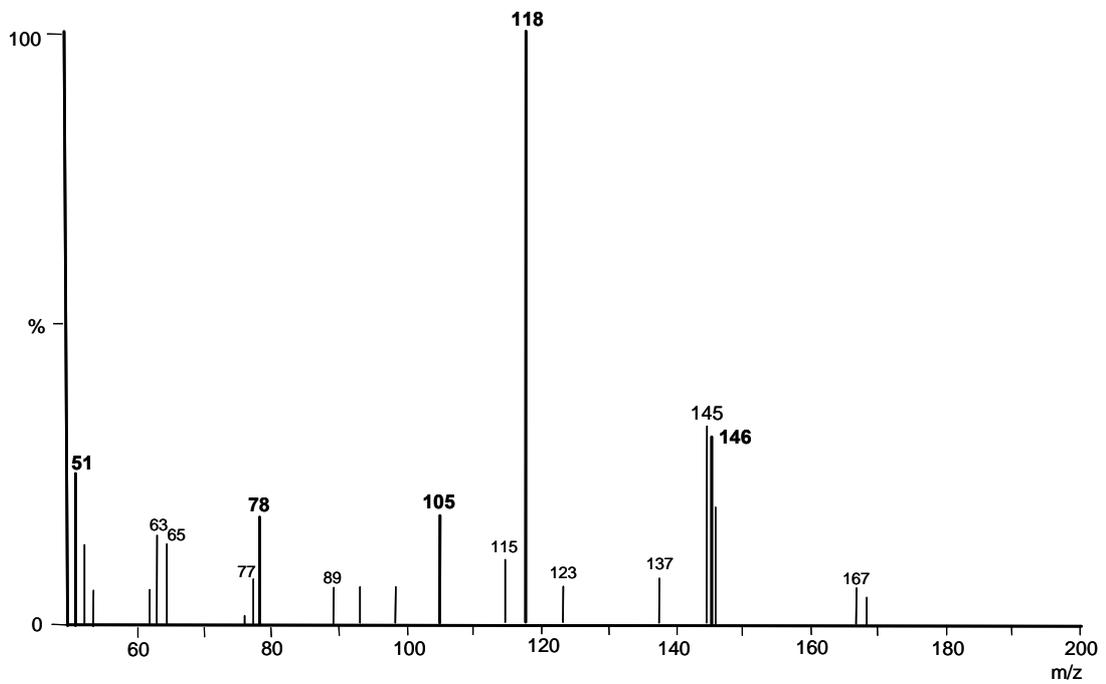


Abbildung 3-29: Massenspektrum von Myosmin aus einer Muttermilchprobe aufgenommen in Fullscan von m/z 50-200 bei 70eV (Spektrum bearbeitet, Original siehe Anhang)

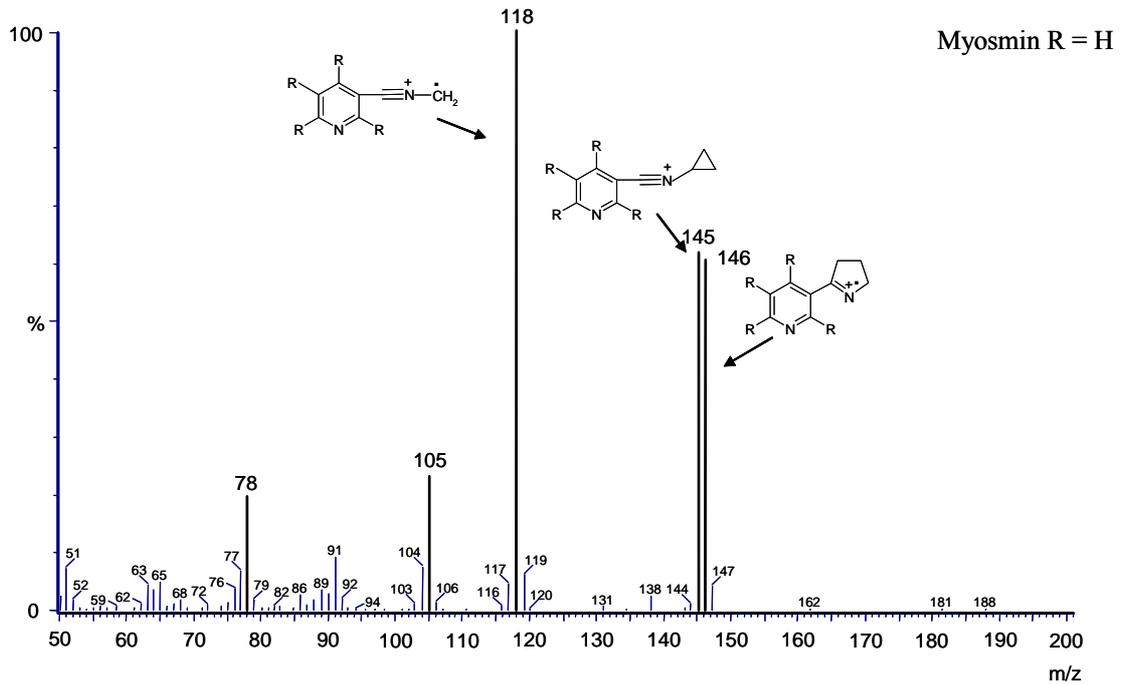


Abbildung 3-30: Massenspektrum von Myosmin, aufgenommen aus einer Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70eV

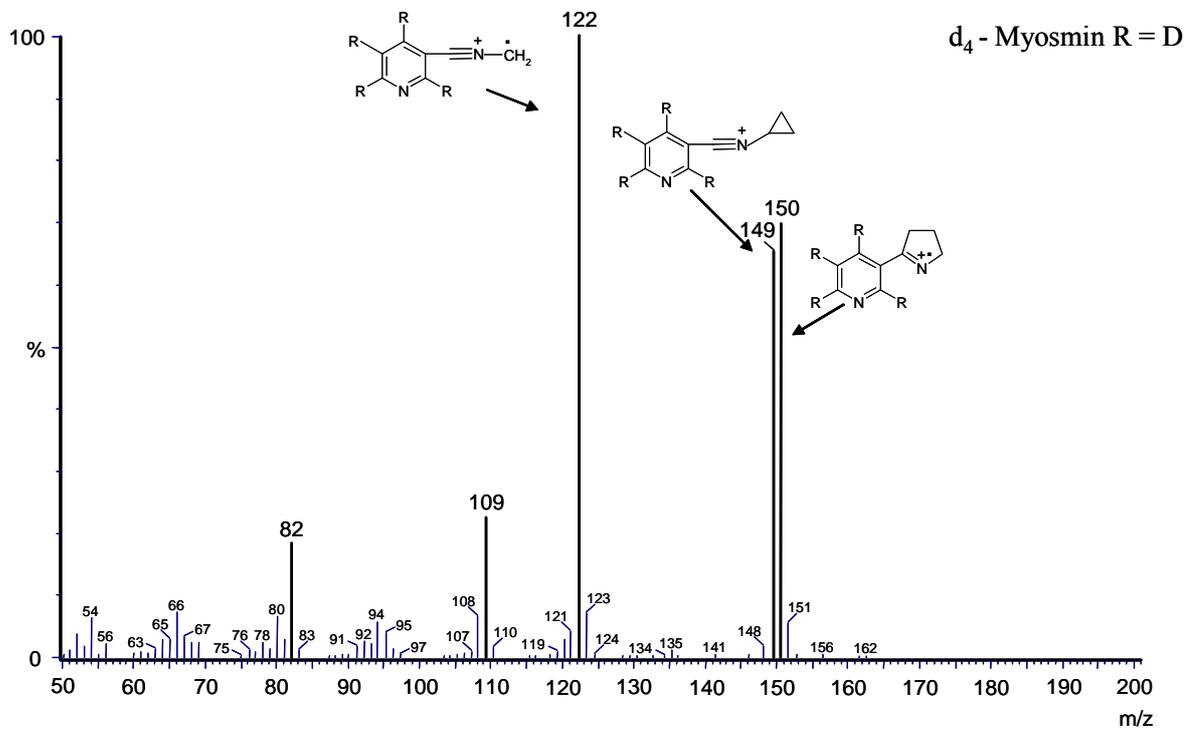


Abbildung 3-31: Massenspektrum von d_4 -Myosmin, aufgenommen aus Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70eV

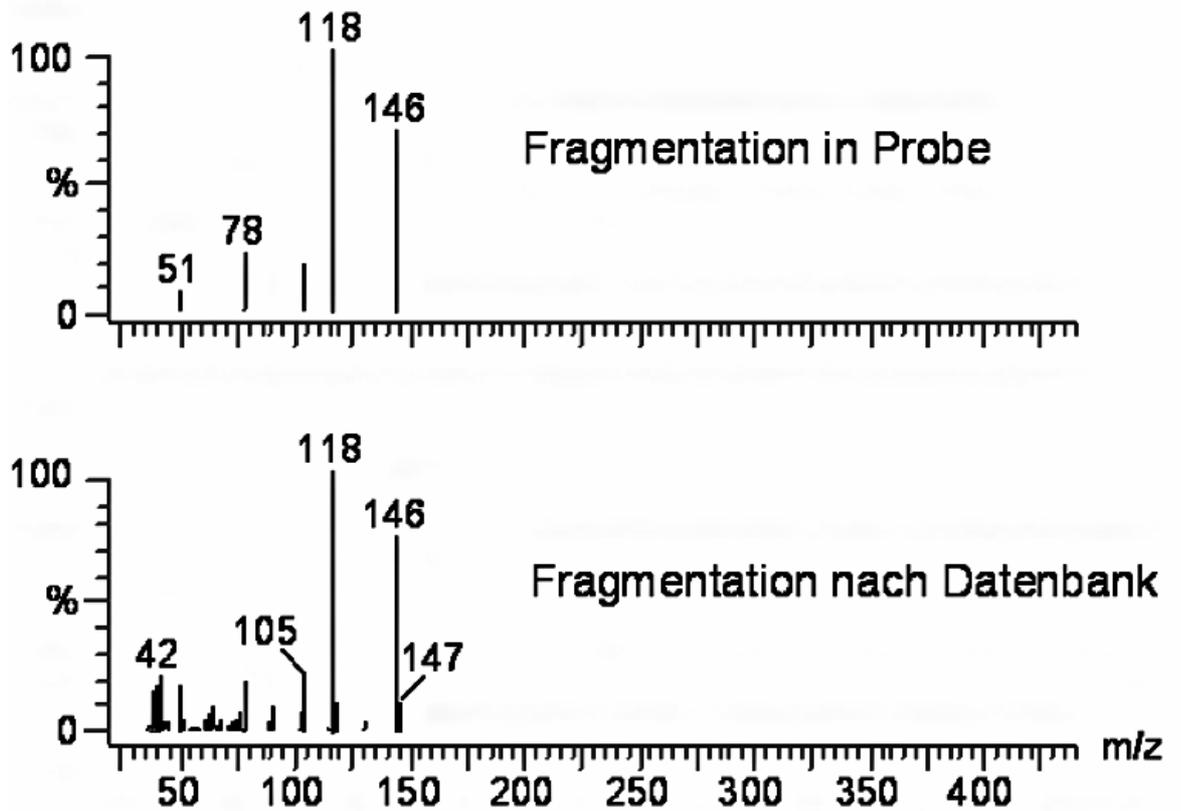


Abbildung 3-32: Vergleich Myosminspektrum aus der Muttermilch gegen Referenzspektrum der MassLab Datenbank, NIST 8918: Pyridin,3-(3,4-Dihydro-2H-Pyrrol-5-yl)

3.2.4.1 Fragmentierung von Cotinin

Unter den gleichen GC-MS Bedingungen wird auch jeweils ein Massenspektrum von Cotinin (Abbildung 3-33) und d_3 -Cotinin (Abbildung 3-34) aus Referenzlösungen aufgenommen. Diese Spektren dienen zum Vergleich mit Spektren, welche bei Cotininbelasteten Proben aufgenommen wurden.

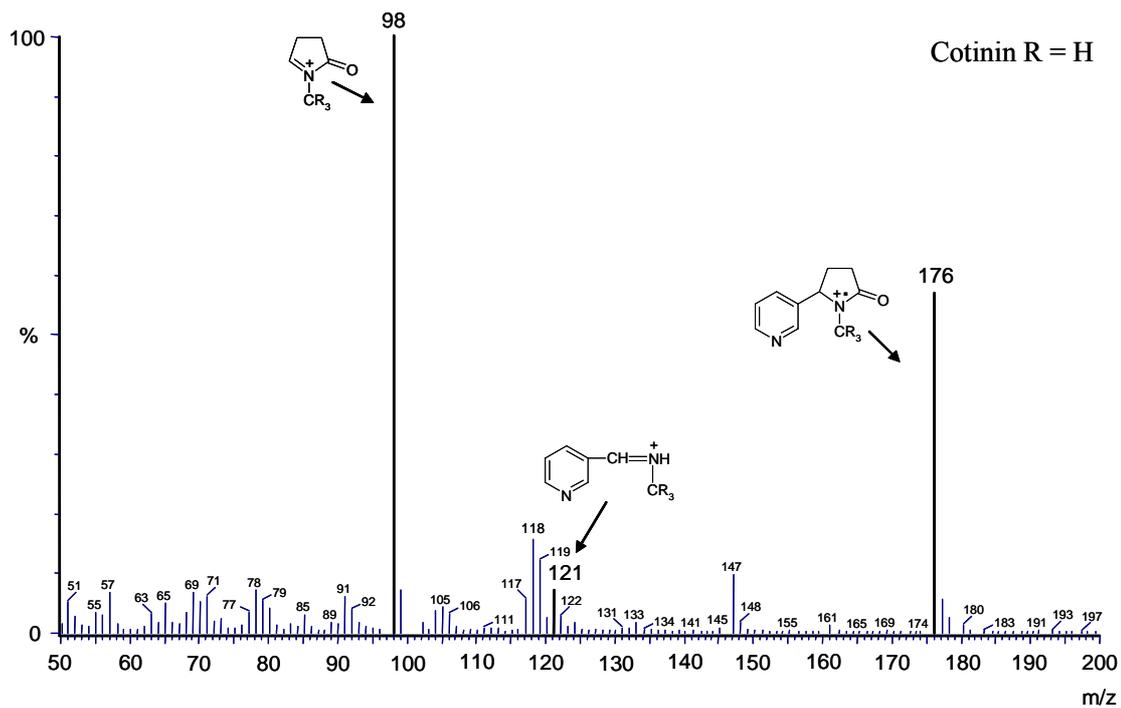


Abbildung 3-33: Massenspektrum von Cotinin, aufgenommen aus Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70eV

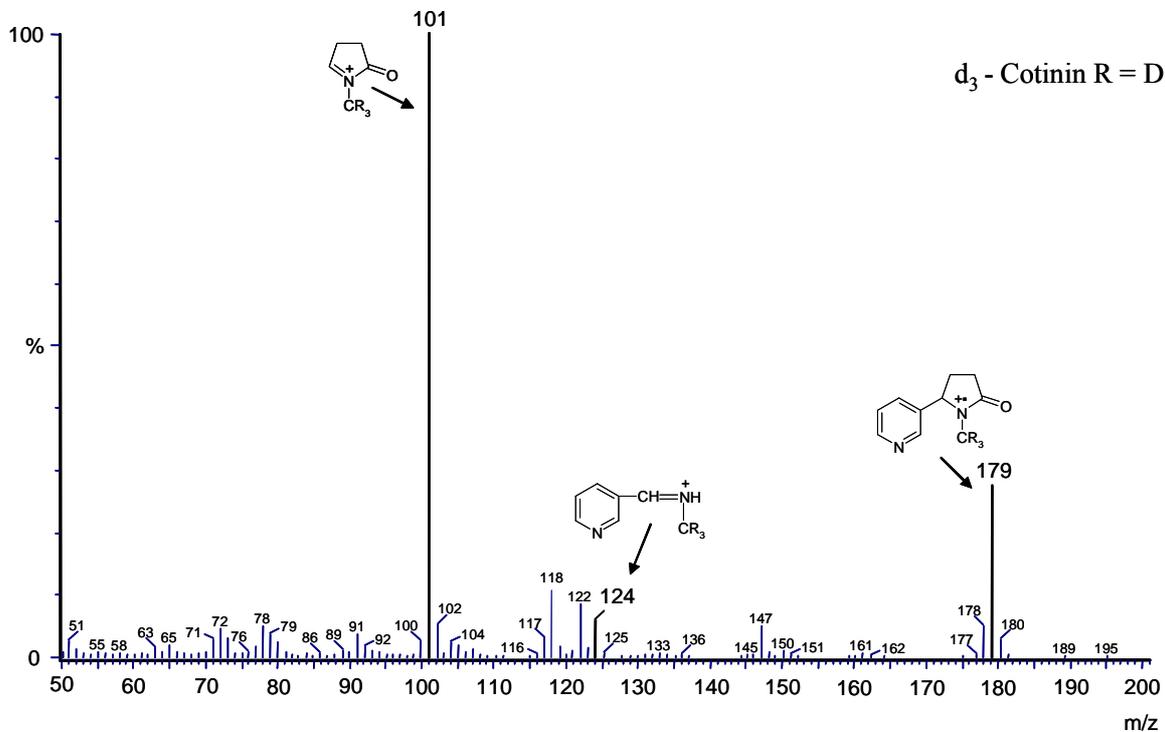


Abbildung 3-34: Massenspektrum von d_3 -Cotinin, aufgenommen aus Standardlösung im Fullscan von m/z 50-200 bei 70 eV

3.2.5 Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Muttermilch

3.2.5.1 Wiederfindung von d_4 -Myosmin

Die Wiederfindung bei einer zugesetzten Menge von 1 ng internem Standard je Milliliter Probe liegt, bei einem Probenvolumen von 10 mL, durchschnittlich bei 65,3% (Tabelle 3-28).

Tabelle 3-28: Wiederfindung von d_4 -Myosmin (10 ng) aus Muttermilchproben (10 mL, N=4)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 6,4 | 6,53 | 1,18 | 5,36 - 7,88 |
| (%) | 64,5 | 65,0 | 18,0 | 82 – 121 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

Die Wiederholbarkeit von vier Messungen an einem Tag schwankt 18% um den Mittelwert. Die Ergebnisse für die Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen sind in Tabelle 3-28 dargestellt. Um einen Vergleich der Werte untereinander zu ermöglichen, wurden die gemessenen Flächen mit den Flächen des Tagesstandards auf 1 normiert. Die Schwankung liegt bei fast 33% (Tabelle 3-29).

Tabelle 3-29: Tagesschwankungen von d_4 -Myosmin bei der Analyse von 10 Muttermilchproben, aufgearbeitet über einen Zeitraum von 50 Tagen

| Probenzahl | Median | Mittelwert | Relative S.D. |
|------------|--------|------------|---------------|
| N=10 | 0,78 | 0,76 | 34,4% |

Die qualitative Genauigkeit, welche die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten beschreibt, beträgt für d_4 -Myosmin 0,15%, die Retentionszeiten liegen im Mittel bei 10,210 Minuten. Diese Werte sind auf einer neuen, 30 m langen, noch ungekürzten DB5-MS Säule entstanden.

Die Schwankungen der mittels des internen Standards berechneten Myosmin- und Cotinin-konzentrationen fallen hingegen geringer aus. Sie liegen größtenteils im Bereich von 5-10% (Tabelle 3-30).

Tabelle 3-30 Myosmingehalt in Speichelproben; Mittelwert von Doppelbestimmungen und Schwankung um den Mittelwert und relativer Fehler (%)

| Rauchstatus | Myosmin | Cotinin |
|---------------|--------------------|--------------------|
| Nichtraucher | 0,35 ± 0,03 (8,6) | n.d. |
| | 0,24 ± 0,005 (2,1) | n.d. |
| Passivraucher | 0,58 ± 0,01 (1,7) | n.d. |
| | 0,33 ± 0,08 (24,2) | 0,79 ± 0,03 (3,8) |
| Raucher | 1,34 ± 0,075 (5,6) | 97,12 ± 0,13 (0,4) |

3.2.5.2 Wiederfindung von d_3 -Cotinin

Betrachtet man die Wiederfindung für d_3 -Cotinin, welches ebenfalls in einer Konzentration von 1 ng/mL zugesetzt wurde, so ist diese mit 45,5% (Tabelle 3-31) im Mittel geringer als die für den internen Standard für Myosmin.

Tabelle 3-31: Wiederfindung von d_3 -Cotinin (10 ng) aus Muttermilchproben (10 mL, N=4)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 4,6 | 4,55 | 0,84 | 3,56 - 5,34 |
| (%) | 46,1 | 45,5 | 18,4 | 80 – 117 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

Die Wiederholbarkeit von vier Messungen schwankt 18,4% um den Mittelwert. Die qualitative Genauigkeit für d_3 -Cotinin beträgt 0,31%, die Retentionszeiten liegen im Mittel bei 13,410 Minuten. Diese Werte sind ebenfalls auf einer neuen, 30 m langen, noch ungekürzten DB5-MS Säule entstanden.

3.2.5.3 Linearität und Nachweisgrenze

Die Bestimmtheitsmaße beider Verdünnungsreihen (Abbildung 3-35) liegen bei $r^2 = 0,9834$ für den internen Standard von Myosmin, sowie bei $r^2 = 0,9820$ für deuteriertes Cotinin. Myosmin kann bis zu einer Konzentration von 0,20 ng/mL mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von größer drei quantifiziert werden. Das LOQ für Cotinin liegt mit 0,5 ng/mL geringfügig höher. Das LOD liegt bei 0,15 ng/mL für Myosmin bzw. 0,3 ng/mL für Cotinin.

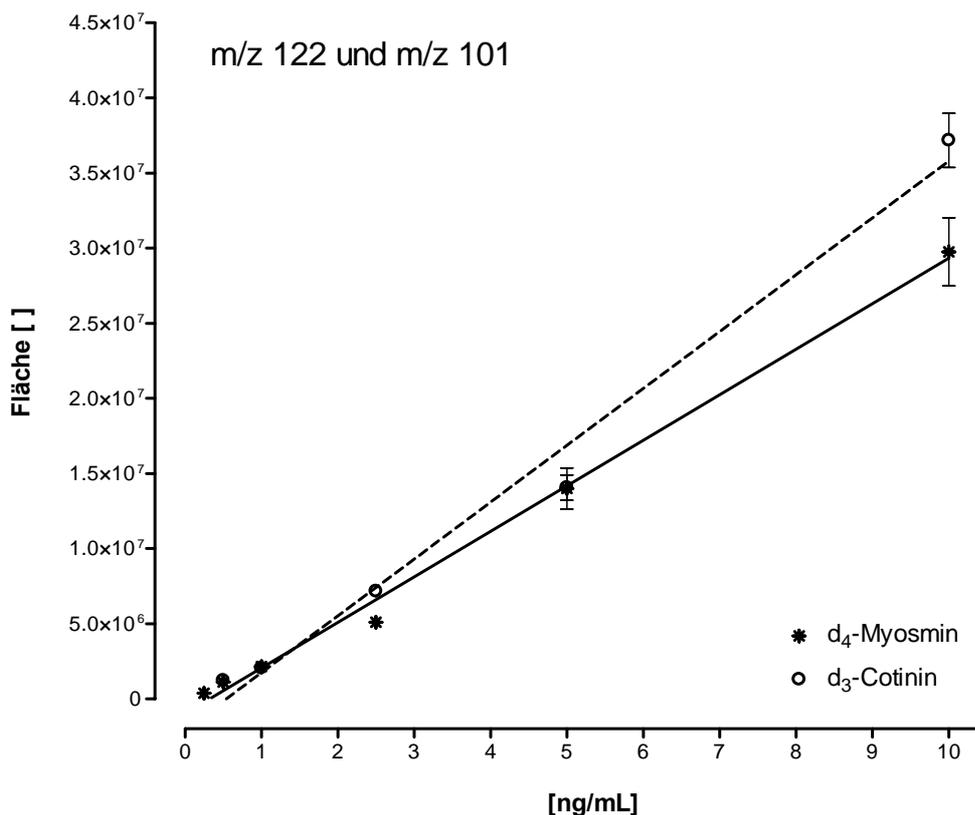


Abbildung 3-35: Kalibrierkurven für d₄-Myosmin (m/122) und d₃-Cotinin (m/z 101) aus Muttermilch nach Durchlaufen eines Analysengangs. im Bereich von 0,25 bis 10 ng/mL. LOQ für Myosmin 0,20 ng/mL, für Cotinin 0,5 ng/mL

3.2.6 Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Speichel

Die Speichelaufbereitung erfolgte mit einer geringfügig modifizierten Muttermilchmethode. Nach den Flüssig-Flüssigextraktionen unter wässrig sauren Bedingungen wird der Aufreinigungsschritt mittels C18 BondElut Säule ausgelassen, da geringere lipophile Verunreinigungen zu erwarten waren.

Die Überprüfung von Linearität, Genauigkeit, Wiederfindung und Wiederholbarkeit brachten bessere Ergebnisse als bei der Muttermilch.

3.2.6.1 Wiederfindung von d_4 -Myosmin

Die Wiederfindung bei einer zugesetzten Menge von 1 ng internem Standard je Milliliter Probe liegt, bei einem Probenvolumen von 2 mL, bei durchschnittlich 77,0% (Tabelle 3-32).

Tabelle 3-32: Wiederfindung von d_4 -Myosmin (2 ng) aus Speichelproben (2 mL, N=5)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 1,57 | 1,54 | 0,1 | 1,39 - 1,63 |
| (%) | 78,6 | 77,0 | 6,5 | 90 – 106 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

Die Wiederholbarkeit von fünf Messungen schwankt 6,5% um den Mittelwert. Die Ergebnisse für die Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen wurden, der Vergleichbarkeit halber, mittels Tagesstandard auf 1 normiert. Die Schwankungen liegen lediglich bei 9,6% (Tabelle 3-33).

Tabelle 3-33: Tagesschwankungen von d_4 -Myosmin bei der Analyse von 9 Speichelproben, aufgearbeitet innerhalb von 10 Tagen in 3 Serien je 3 Proben

| Probenzahl | Median | Mittelwert | Relative S.D. |
|------------------|-------------|-------------|---------------|
| Serie I, N=3 | | 0,74 | 9,7% |
| Serie II, N=3 | | 0,87 | 6,1% |
| Serie III, N=3 | | 0,76 | 2,6% |
| Serie I-III, N=9 | 0,77 | 0,79 | 9,6% |

Die qualitative Genauigkeit, welche die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten beschreibt, beträgt für d_4 -Myosmin 0,15%, die Retentionszeiten liegen im Mittel bei 10,210 Minuten. Diese Werte sind auf einer neuen, 30 m langen, noch ungekürzten DB5-MS Säule entstanden.

Die Schwankungen der mittels internen Standards berechneten Myosmin- und Cotininkonzentrationen sind kleiner. Sie liegen bei fast allen Messungen unterhalb 5% (Tabelle 3-34).

Tabelle 3-34 Myosmingehalt in Speichelproben; Mittelwert von Doppelbestimmungen und Schwankung um den Mittelwert und relativer Fehler (%)

| Rauchstatus | Myosmin | Cotinin |
|---------------|-------------------|--------------------|
| Nichtraucher | 1,36 ± 0,02 (1,8) | n.d. |
| | 5,33 ± 0,02 (0,3) | n.d. |
| Passivraucher | 1,63 ± 0,08 (4,9) | 3,50 ± 0,02 (0,7) |
| | 2,13 ± 0,03 (1,5) | 0,81 ± 0,03 (3,1) |
| Raucher | 1,32 ± 0,04 (2,7) | 56,09 ± 0,39 (0,4) |
| | 3,49 ± 0,06 (1,9) | 132,2 ± 1,77 (1,3) |

3.2.6.2 Wiederfindung von d_3 -Cotinin

Betrachtet man die Wiederfindung für d_3 -Cotinin in Speichel, welches ebenfalls in einer Konzentration von 1 ng/mL zugesetzt wurde, so ist diese mit 60,0% (Tabelle 3-35) im Mittel geringer als die für d_4 -Myosmin.

Tabelle 3-35: Wiederfindung von d_3 -Cotinin (2 ng) aus Speichelproben (2 mL, N=5)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 1,30 | 1,20 | 0,2 | 0,85 - 1,34 |
| (%) | 65,1 | 60,0 | 17,0 | 70 – 112 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

Die Wiederholbarkeit von fünf Messungen schwankt um 17,0% um den Mittelwert. Die qualitative Genauigkeit für d_3 -Cotinin beträgt 0,31%, die Retentionszeiten liegen im Mittel bei 13,410 Minuten. Diese Werte sind ebenfalls auf einer neuen, 30 m langen, noch ungekürzten DB5-MS Säule entstanden.

3.2.6.3 Linearität und Nachweisgrenze

Die Bestimmtheitsmaße beider Verdünnungsreihen (Abbildung 3-36) liegen bei $r^2 = 0,9838$ für den internen Standard von Myosmin, sowie bei $r^2 = 0,9870$ für deuteriertes Cotinin. d_4 -Myosmin und d_3 -Cotinin können bis zu einer Konzentration von 0,20 ng/mL, bzw. 0,5 ng/mL mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von größer drei quantifiziert werden. In Tabelle 3-36 sind die prozentualen Fehler der Doppelbestimmungen bei fünf Konzentrationen angegeben. Das LOQ für Myosmin liegt bei 0,5 ng/mL, bzw. bei 0,75 ng/mL. Das LOD beträgt 0,3 ng/mL für Myosmin, 0,5 ng/mL für Cotinin.

Tabelle 3-36: Prozentualer Fehler der Doppelbestimmungen aus Speichel bei Konzentrationen von 0,25 bis 5,0 ng/mL

| Konzentration (ng/mL) | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 |
|-----------------------|------|------|------|-------|------|
| d_4 -Myosmin | 0,1% | 6,3% | 4,2% | 4,3% | 6,2% |
| d_3 -Cotinin | 3,3% | 3,5% | 2,2% | 10,1% | 7,5% |

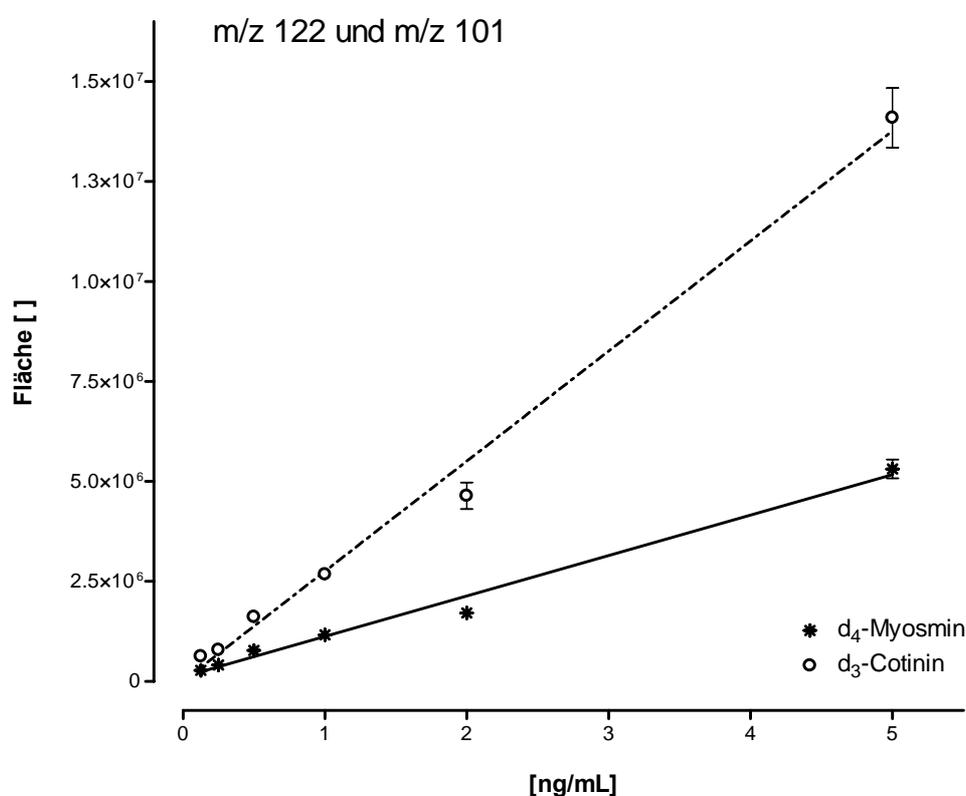


Abbildung 3-36: Kalibrierkurven für d_4 -Myosmin (m/z 122) und d_3 -Cotinin (m/z 101) aus Speichel nach Durchlaufen eines Analysengangs. im Bereich 0,125 bis 5 ng/mL. LOQ für d_4 -Myosmin 0,20 ng/mL, für d_3 -Cotinin 0,5 ng/mL

3.2.7 Methode zur Bestimmung von Myosmin aus Plasma

3.2.7.1 Wiederfindung von *d*₄-Myosmin und *d*₃-Cotinin

Im Rahmen der Überprüfung der Muttermilchmethode zur Aufreinigung von Plasma wird gepooltes Plasma unbekannter Spender getestet. Nach brauchbaren Ergebnissen wird die Wiederfindung für *d*₄-Myosmin und *d*₃-Cotinin überprüft. Sie liegt bei 94% für *d*₄-Myosmin bei 72% für *d*₃-Cotinin (Tabelle 3-16 und 3-17).

Tabelle 3-37 Wiederfindung von *d*₄-Myosmin (4 ng) aus Plasmaproben (2 mL, N=3)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 3,82 | 3,79 | 0,1 | 3,66 – 3,89 |
| (%) | 95 | 94 | 3,0 | 97 – 103 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

Tabelle 3-38 Wiederfindung von *d*₃-Cotinin (4 ng) aus Plasmaproben (2 mL, N=3)

| | Median | Mittelwert | S.D. | Range |
|------|--------|------------|------|-----------------------|
| (ng) | 3,02 | 2,89 | 0,2 | 2,62 – 3,02 |
| (%) | 76 | 72 | 7,8 | 91 – 105 ¹ |

¹ relative Wiederfindung bezogen auf den Mittelwert, welcher als 100% Wert gesetzt wurde.

3.3 Myosmin in Milch

Die Verwendung von hochauflösenden GC-MS Geräten unter Verwendung von Isotopenstandards erfüllt zur Zeit die Anforderungen an Spezifität, Genauigkeit und Richtigkeit wohl am besten [134]. Der Vorteil der Verwendung von Isotopenstandards ist begründet durch ein der Ausgangssubstanz identisches chemisches Verhalten. Ist der Probe der ISTD zugesetzt, können somit Verluste während der Aufbereitung und Schwankungen der Nachweisempfindlichkeit sowie der Retentionszeit im GC-MS automatisch korrigiert werden.

3.3.1 Kuhmilch

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde Myosmin in der Kuhmilch in Spuren detektiert. Die gemessenen Konzentrationen befinden sich im Bereich von 0,1 bis 0,15 ng/mL. Diese Konzentrationen liegen jedoch unterhalb des LOQ und sind somit nur als grobe Richtwerte zu sehen.

3.3.2 Muttermilch

3.3.2.1 Fragebogen

Im Rahmen der Studie wurden 23 Muttermilchproben untersucht (Tabelle 3-39). Das Alter der Mütter lag im Mittel bei 32 Jahren (21-36 Jahre). Das Durchschnittsalter der Kinder lag bei 32 Tagen (11-68 Tage), die durchschnittliche Stilldauer somit bei einem Monat. Alle Probanden zeigten anhand der abgefragten Ernährungsgewohnheiten eine ausgewogene Ernährung. Passivrauchbelastung zu Hause oder am Arbeitsplatz war bei 5 Personen gegeben, eine Probandin war Raucherin, eine weitere Raucher-Probe wurde ohne Fragebogen abgegeben, konnte aber über die Cotininwerte eindeutig als solche eingestuft werden.

Tabelle 3-39: Demographische Daten der Probanden der Muttermilchstudie (N=23) und Angaben laut Fragebogen

| | Anzahl | Angaben | Keine Angaben | Mittelwert | Range |
|--------------------------|--------|---------|---------------|------------|---------|
| Fragebogen | | N=16 | N=7 | | |
| Alter der Mutter (Jahre) | | N=16 | N=7 | 32 | 21 - 36 |
| Alter des Kindes (Tage) | | N=13 | N=10 | 32,5 | 11 – 68 |
| Rauchstatus | | N=15 | N=8 | | |
| Nichtraucher | N=16 | N=10 | N=6 | | |
| Passivraucher | N=5 | N=4 | N=1 | | |
| Raucher | N=2 | N=1 | N=1 | | |

3.3.2.2 *Myosmin in Muttermilch*

In 13 von 23 Proben wurde Myosmin nachgewiesen und quantifiziert, bei 10 Proben lag der Gehalt unter dem LOQ von 0,2 ng/mL (Tabelle 3-40).

Tabelle 3-40: Durchschnittlicher Myosmingehalt bei 23 Muttermilchproben (ng/mL).

| N | Mittelwert ± S.D. | Median | Range |
|-----------------|-------------------|--------|-------------|
| 23 ^a | 0,25 ± 0,27 | 0,20 | n.d. - 1,34 |

^a Für die Proben unterhalb des LOD wurde 0,075 ng/mL eingesetzt

3.3.2.3 *Myosmingehalt in der Muttermilch in Abhängigkeit des Fettgehaltes*

Durch Bestimmung des Fettgehaltes der Muttermilch kann abgeschätzt werden, zu welchem Zeitpunkt die Probennahme erfolgt ist. Die meisten Proben zeigten einen Fettgehalt von 4-6%, nur einmal lag der Fettgehalt unter 4%, was auf eine Vormilch-Probe schließen lassen könnte. Die Proben mit einem Fettgehalt über 7,5% könnten Nachmilch-Proben sein. Da keine Daten bezüglich der genauen Myosminaufnahme vorliegen, kann man die gemessenen Myosminkonzentration nicht mit dem Fettgehalt korrelieren, es scheint jedoch keine vermehrte Anreicherung im Milchfett vorzuliegen (Abbildung 3-37).

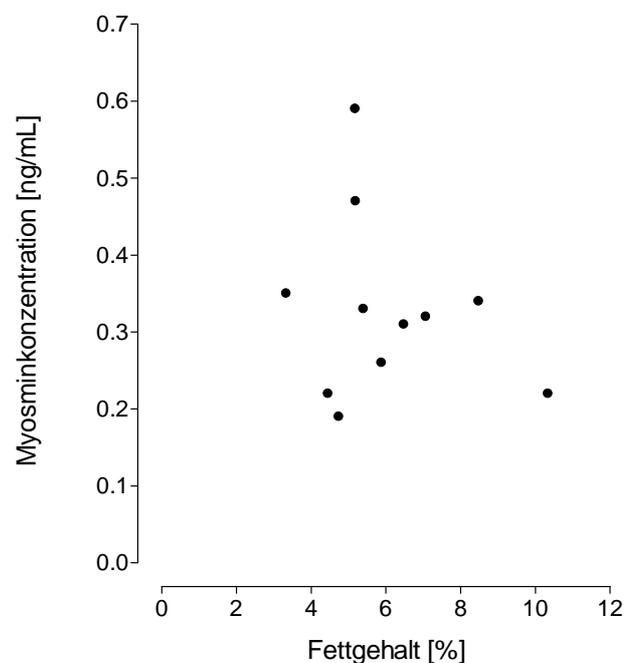


Abbildung 3-37: Myosminkonzentrationen von Nichtraucherinnen und Passivraucherinnen in der Muttermilch in Abhängigkeit vom Fettgehalt

3.3.2.4 *Abhängig des Myosmingehalts in der Muttermilch vom pH-Wert*

Zu Beginn einer jeden Analyse wurde der pH Wert der Milchproben gemessen. Bei den 11 positiven Proben der Nichtraucherinnen zeigt sich eine Abnahme der Konzentration mit steigendem pH Wert, die aber nicht Signifikanz erreicht ($p = 0,084$) (Abbildung 3-38).

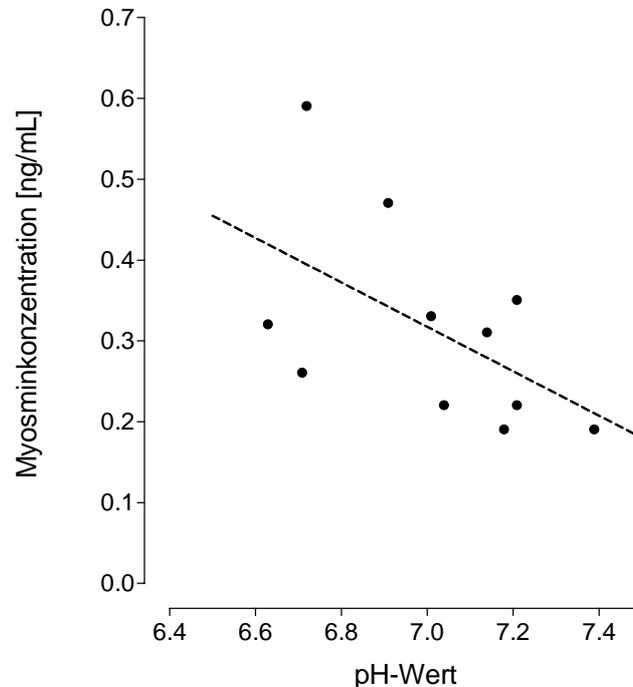


Abbildung 3-38: Myosminkonzentrationen von Nichtraucher und Passivraucher in der Muttermilch in Abhängigkeit des pH Wertes, $r^2 = 0,2954$ ($p=0,084$)

3.3.2.5 *Abhängigkeit der Myosmin- und Cotininkonzentrationen in der Muttermilch vom Rauchstatus*

Die gemessenen Myosminkonzentrationen werden, entsprechend den Angaben im Fragebogen in Nichtraucher-, Passivraucher- und Raucher-Gruppen eingeteilt. Die Angaben werden mittels Bestimmung der Cotiningehalte überprüft. In der Gruppe der Passivraucher sind Passivrauchbelastung am Arbeitsplatz bzw. zu Hause zusammengefasst. Die Werte sind in Abbildung 3-39 dargestellt.

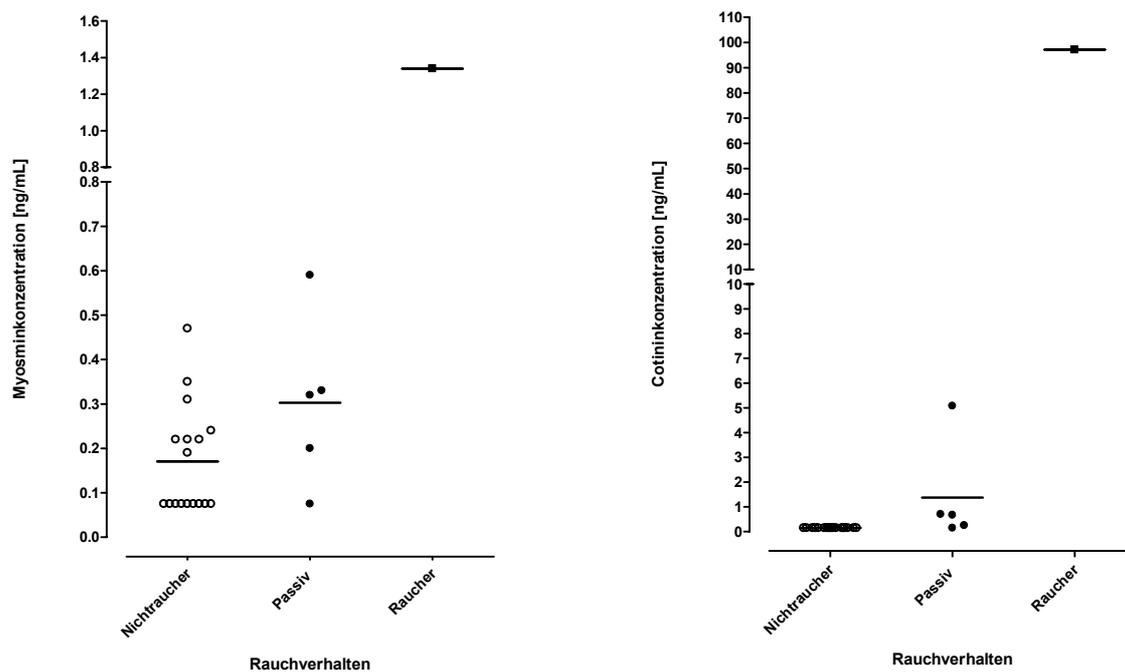


Abbildung 3-39: Myosminkonzentrationen (links) und Cotininkonzentrationen (rechts) in Muttermilch nach Rauchstatus mit Angabe des Mittelwertes

Tabelle 3-41: Myosmin- und Cotiningehalt (ng/mL) in Muttermilch in Abhängigkeit des Rauchstatus; Mittelwert \pm S.D. (Range)

| Rauchstatus | N | Myosmin | Cotinin |
|---------------|----|--|--|
| Nichtraucher | 17 | $0,17 \pm 0,12$ ¹ (n.d. – 0,47) | n.d. |
| Passivraucher | 5 | $0,30 \pm 0,19$ ² (n.d. – 0,59) | $1,37 \pm 2,09$ ³ (n.d. – 5,08) |
| Raucher | 1 | 1,34 (1,34) | 97,12 (97,12) |

1 für 8 Proben unterhalb des LOD wurde 0,075 ng/mL eingesetzt

2 für 1 Probe unterhalb des LOD wurde 0,075 ng/mL eingesetzt

3 für 1 Probe unterhalb des LOD wurde 0,15 ng/mL eingesetzt

Die in Tabelle 3-41 vorgenommene Einteilung entsprechend dem Rauchstatus laut Fragebogen konnte durch die Cotininwerte bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete eine Frau, die Passivrauchbelastung angab, bei der aber kein Cotinin nachzuweisen war. Sie wurde den Nichtraucherinnen zugeteilt. Eine weitere Probandin gab an, eine Zigarette am Tag zu

rauchen, wonach sie der Gruppe der Raucher zugeordnet werden müsste. Der Cotininwert von 5,08 ng/mL entspricht jedoch eher der einer Passivrauchbelastung. Sie wurde daraufhin der Gruppe der Passivraucher zugeordnet.

Der Myosmingehalt der Raucherprobe liegt mit 1,34 ng/mL um den Faktor 4 höher als der bei Passivrauchbelasteten Proben, welche wiederum in der gleichen Größenordnung wie Nicht-raucher-Proben liegen.

3.4 Myosmin in Speichelproben

3.4.1 Fragebogen

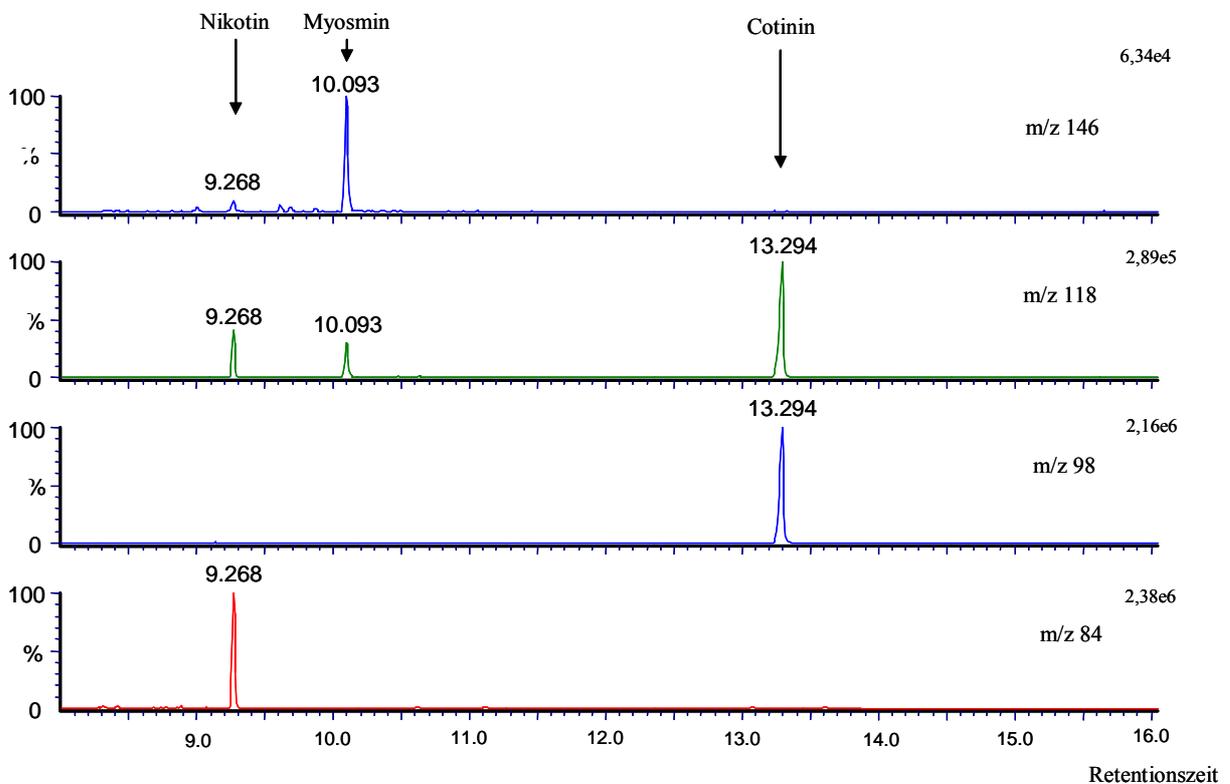
Die Speichelproben wurden von Mitarbeitern des Walther Straub-Institutes gesammelt. Von 15 der 22 Probanden wurde ein Fragebogen ausgefüllt. Alle Probanden zeigten anhand der abgefragten Ernährungsgewohnheiten eine weitgehend ausgewogene Ernährung. 14 Personen waren Nichtraucher, Passivrauchbelastung zu Hause oder am Arbeitsplatz war bei zwei Personen gegeben, sechs Probanden waren Raucher und bei 7 Probanden wurden keine Angaben zur Rauchbelastung gemacht (Tabelle 3-42).

3.4.2 Myosmin in Speichel

In der Abbildung 3-40 ist das Chromatogramm einer Raucherprobe abgebildet. Nicotin wird bei seinem Basispeak auf der Massenspur m/z 84, Cotinin mit seinem Basispeak auf der Massenspur m/z 98 und Myosmin bei seinem Basis- sowie Molekülpeak bei m/z 118 und 146 gemessen. Nicotin und Cotinin zeigen beide auf der Massenspur m/z 118 ebenfalls Peaks, welche den Basispeak von Myosmin in Intensität übertreffen.

Tabelle 3-42: Demographische Daten der Probanden der Speichelstudie (N=22) und Angaben laut Fragebogen

| | | Anzahl | Angaben | Keine Angaben | Mittelwert | Range |
|-------------------------|---|--------|---------|---------------|------------|-------------|
| Fragebogen | | | N=15 | N=7 | | |
| Alter (Jahren) | | | | | 32,5 | 23 - 53 |
| Geschlecht | m | N=6 | | | | |
| | w | N=16 | | | | |
| Zeitabstand (Stunden) | | | | | 4,0 | 1,0 - 15,25 |
| Mahlzeit zu Probennahme | | | | | | |
| Rauchstatus | | | | | | |
| Nichtraucher | | N=14 | N=9 | N=5 | | |
| Passivraucher | | N=2 | N=1 | N=1 | | |
| Raucher | | N=6 | N=5 | N=1 | | |

**Abbildung 3-40: Nicotin (t_R 9,268 min), Myosmin (t_R 10,093 min) und Cotinin (t_R 13,294 min) aus der Speichelprobe eines Rauchers, aufgenommen im Fullscann. Die Signalintensitäten sind oben rechts bei jeder Massenspur angegeben.**

Bei 16 Proben konnte Myosmin nachgewiesen und quantifiziert werden, 6 Proben lagen unter dem LOQ von 0,5 ng/mL Speichel (Tabelle 3-43).

Tabelle 3-43: Durchschnittliche Myosmingehalt in 22 Speichelproben (ng/mL)

| N | Mittelwert ± S.D. | Median | Range |
|-----------------|-------------------|--------|-------------|
| 22 ^a | 1,80 ± 1,44 | 1,61 | n.d. - 5,33 |

^a Für Werte unter LOD wurde 0,15 ng/mL eingesetzt

Entsprechend den in der Einleitung angegebenen cutoff Werten für Cotinin in Speichel 1.2.3 erfolgt eine Einteilung entsprechend dem Rauchstatus (Tabelle 3-44).

Tabelle 3-44: Übersicht Myosmin- und Cotiningehalt im Speichel in Abhängigkeit vom Rauchstatus; Mittelwert ± SD (Range)

| Rauchstatus | N | Myosmin | Cotinin |
|---------------|----|---------------------------------------|--|
| Nichtraucher | 14 | 1,58 ± 1,67 ¹ (n.d – 5,33) | 0,46 ± 0,37 ² (0,25 – 1,37) |
| Passivraucher | 2 | 1,89 ± 0,35 (1,64 – 2,13) | 2,15 ± 1,89 (0,81 – 3,48) |
| Raucher | 6 | 1,87 ± 1,01 (0,99 – 3,49) | 71,55 ± 41,81 (10,36 – 132,3) |

¹ Für die Proben unterhalb des LOD wurde 0,15 ng/mL eingesetzt

² Für die Proben unterhalb des LOD wurde 0,25 ng/mL eingesetzt

Die graphische Darstellung der Werte, eingeteilt nach Rauchstatus, zeigt keine signifikanten Unterschiede der Myosminkonzentrationen bei den drei Gruppen, die Cotininkonzentrationen sind bei der Rauchergruppe jedoch um den Faktor 10 bis 15 größer als bei Passivrauchern (Abbildung 3-41)

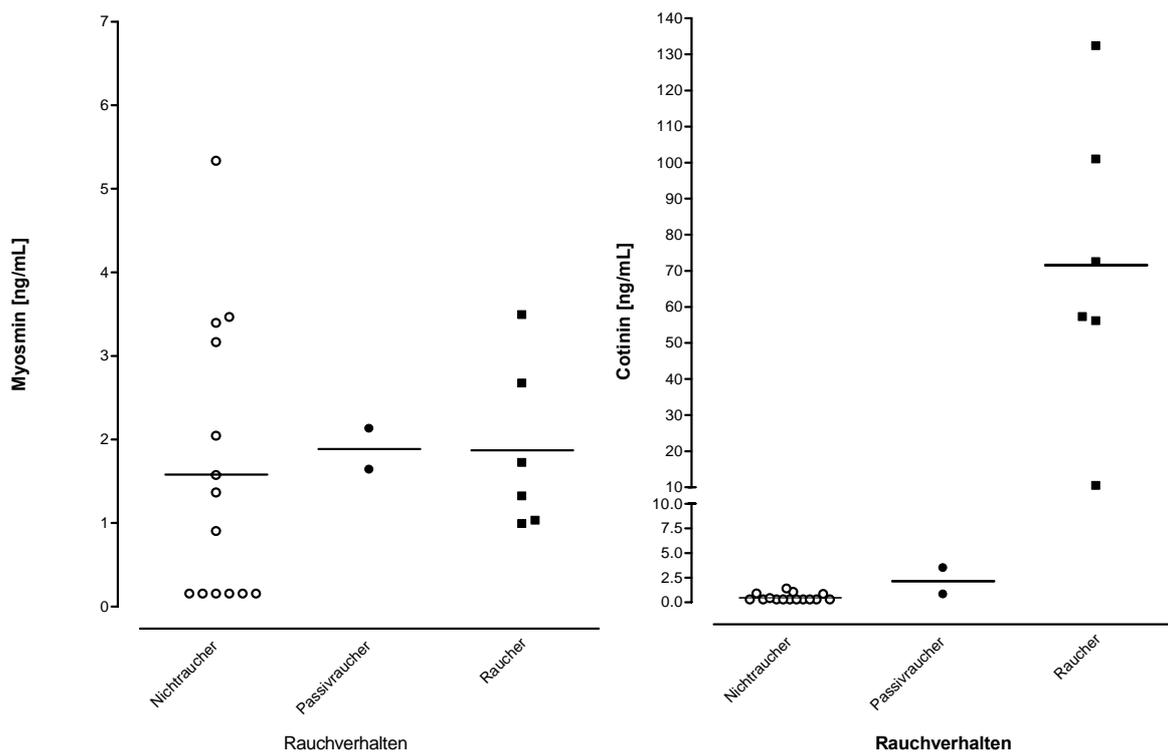


Abbildung 3-41: Myosmin- (links) und Cotininkonzentrationen (rechts) im Speichel in Abhängigkeit vom Rauchstatus mit Mittelwert.

3.4.3 Fastenversuch

Während des Diätversuchs wurden Speichel- und teilweise auch Plasmaproben genommen. Zeitpunkt, sowie Art der Probe und Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme sind in Tabelle 3-45 dargestellt.

Die Myosminkonzentrationen sind in Tabelle 3-46 aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass im Zeitraum vor dem Fasten die Proben, welche nach dem Frühstück genommen wurden Myosmin enthielten, in den vor dem Frühstück genommenen Proben hingegen deutlich weniger Myosmin nachweisbar war. Mit Beginn der Fastenphase ist eine Abnahme der Myosminkonzentration erkennbar. Nach Beendigung der Diätphase liegen die Myosminkonzentrationen mit 0,4 ng/mL knapp unter dem LOQ, ein deutlicher Anstieg blieb aber aus. Die gemessenen Cotininwerte lassen auf keine nennenswerte Rauchbelastung zurück schließen.

Tabelle 3-45: Übersicht Probennahme vor und während der Diät

| Probe | Datum | Uhrzeit | Speichel | Plasma | Zeitabstand letzte Mahlzeit | Bemerkung |
|-------|------------|---------|----------|--------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 | 03.11.2003 | 7.00 | x | | Vor Frühstück | |
| 2 | | 10.00 | x | x | 2 Std. nach Frühstück | |
| 3 | 05.11.2003 | 7.15 | x | | Vor Frühstück | |
| 4 | | 9.30 | x | | 2 Std. nach Frühstück | |
| 5 | | 17.00 | x | | | Keine weitere Nahrung ab 17.00 |
| 6 | 06.11.2003 | 7.30 | x | | | keine Nahrung |
| 7 | 07.11.2003 | 11.00 | x | | | |
| 8 | 08.11.2003 | 10.30 | x | | | |
| 9 | 10.11.2003 | 7.30 | x | | Vor Frühstück | letzte Probe Nüchtern |
| 10 | | 9.50 | x | | 2 Std. nach Frühstück | |
| 11 | 12.11.2003 | 9.30 | x | | 2 Std. nach Frühstück | |
| 12 | 17.11.2003 | 11.30 | x | x | 3,5 Std. nach Frühstück | |

In der vor der Diät genommen Plasmaprobe konnte Myosmin nicht quantifiziert werden. Die nach der Diät genommen Plasmaprobe wurde nicht aufgearbeitet, da schon in der Speichelprobe das Myosmin unter dem LOQ lag.

Tabelle 3-46: Übersicht der im Speichel gemessenen Myosminkonzentrationen (ng/mL) des Diätversuches (n.d. = nicht detektierbar)

| Probe | Zeitpunkt Probennahme | Myosmin | Cotinin |
|-------|-------------------------|------------------|------------------|
| | | Speichel (ng/mL) | Speichel (ng/mL) |
| 1 | Vor Frühstück | 1,75 | n.d. |
| 2 | 2 Std. nach Frühstück | 2,50 | n.d. |
| 3 | Vor Frühstück | 0,60 | 1,05 |
| 4 | 2 Std. nach Frühstück | n.d. | 0,88 |
| 5 | Letzte Probe vor Diät | 1,10 | 1,4 |
| 6 | Diät | 1,20 | 0,72 |
| 7 | Diät | 0,70 | n.d. |
| 8 | Diät | 0,70 | n.d. |
| 9 | Vor Frühstück | n.d. | n.d. |
| 10 | 2 Std. nach Frühstück | n.d. | n.d. |
| 11 | 2 Std. nach Frühstück | n.d. | n.d. |
| 12 | 3,5 Std. nach Frühstück | n.d. | n.d. |

In Abbildung 3-42 sind die Myosminkonzentrationen im Speichel in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Probennahmen dargestellt.

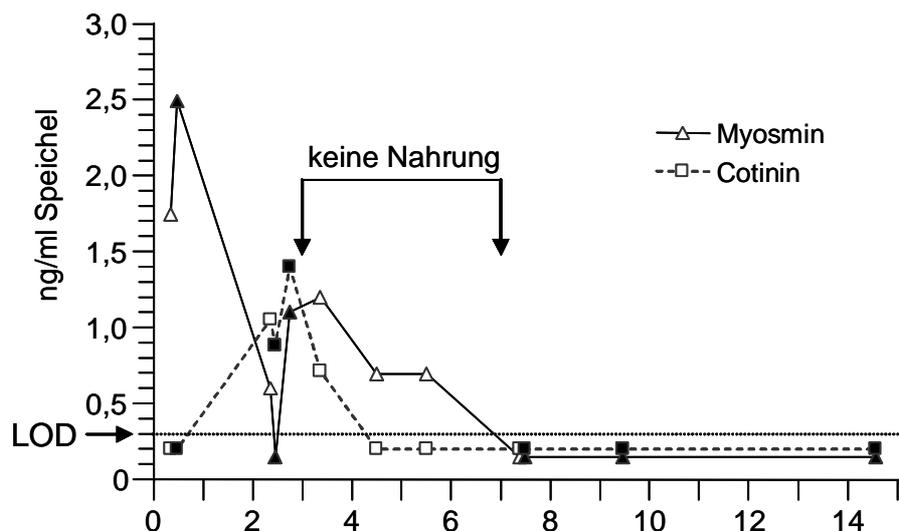


Abbildung 3-42: Myosmin und Cotinin im Speichel während des Diätversuches, Vor der Nahrungsaufnahme genommene Proben sind durch leere Symbole, nach der Nahrungsaufnahme genommene Proben durch gefüllte Symbole dargestellt; Werte unterhalb der Linie (LOD) liegen unter der Nachweisgrenze

3.4.4 Bestimmung von Myosmin in Plasma und Speichel

Zeitgleich genommene Plasma- und Speichelproben werden auf Myosmin und Cotinin untersucht. Da nur theoretische Anhaltspunkte für Plasmakonzentrationen von Myosmin vorliegen, wird in diesem Fall die Plasmaprobe mit einem Volumen von 6 mL als Einzelprobe aufgearbeitet. Die entsprechende Speichelprobe wird ebenso aufgearbeitet. Um das Speichel/Plasma Verhältnisses berechnen zu können, wird der pH Wert der vereinten Speichelprobe sofort nach dem Zentrifugieren der Salivetten gemessen. Er beträgt 7,31. Der Plasma pH-Wert wird mit 7,41 der Literatur entnommen, da das Blut in Na-EDTA Röhrchen abgenommen wurde, welches zu einer Verfälschung des gemessenen pH Wertes führen kann. Im Plasma lassen sich 1,48 ng/mL im Speichel 1,89 ng/mL nachweisen (Tabelle 3-47).

Tabelle 3-47 Myosmin- und Cotiningehalt (ng/mL) sowie pH Wert der Speichel- und Plasmaprobe (Einfachbestimmung)

| Probe | Volumen (mL) | pH-Wert | Myosmin (ng/mL) | Cotinin (ng/mL) |
|----------|--------------|---------|-----------------|-----------------|
| Plasma | 6,0 | 7,41 | 1,48 | n.d. |
| Speichel | 7,0 | 7,31 | 1,89 | n.d. |

Eine Woche später wird nach einer zweiten Probennahme von Plasma und Speichel jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Plasmavolumen beträgt dabei 2,0 mL je Probe, das Volumen der Speichelproben liegt bei jeweils 3,0 mL. Die Myosminkonzentration im Plasma beträgt 5,56 ng/mL, die im Speichel 4,66 ng/mL (Tabelle 3-48).

Tabelle 3-48: Myosmin- und Cotiningehalt (ng/mL), sowie pH Wert der Speichel- und Plasmaprobe (Doppelbestimmung)

| Probe | Volumen (mL) | pH-Wert | Myosmin (ng/mL) | Cotinin (ng/mL) |
|----------|--------------|---------|-----------------|-----------------|
| Plasma | 2,0 | 7,41 | 5,56 | n.d. |
| Speichel | 3,0 | 7,44 | 4,66 | n.d. |

Aufgrund der hohen Konzentrationen konnte bei diesen Messungen Myosmin sowohl im Speichel als auch im Plasma jeweils im SIM auf den charakteristischen Massen, sowie im

Fullscan über den Massenbereich 50-200 identifiziert werden. Die aufgenommenen Chromatogramme und die dazugehörigen Massenspektren sind in Abbildung 3-43 bis Abbildung 3-48 dargestellt.

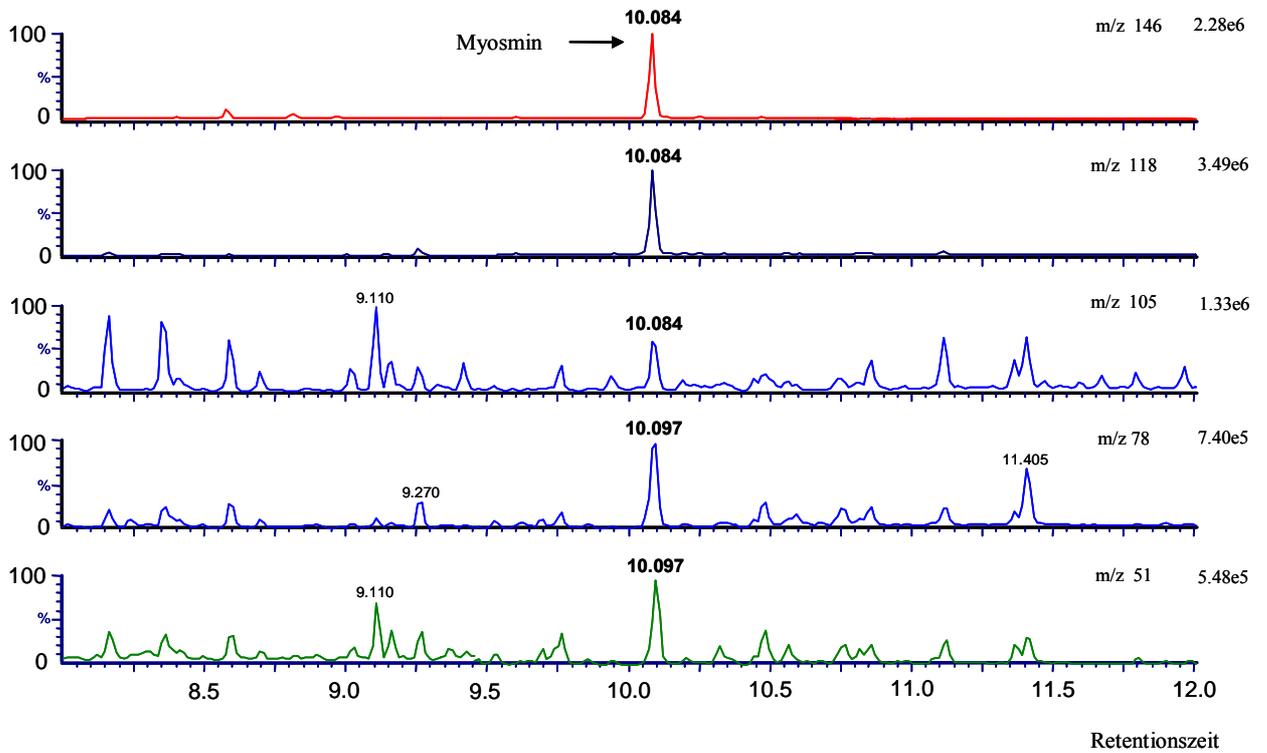


Abbildung 3-43: Myosmin im Plasma vermessen im SIM Modus auf den Massenspektren m/z 51, 78, 105, 118 und 146. Die Retentionszeit beträgt 10,084 Minuten.

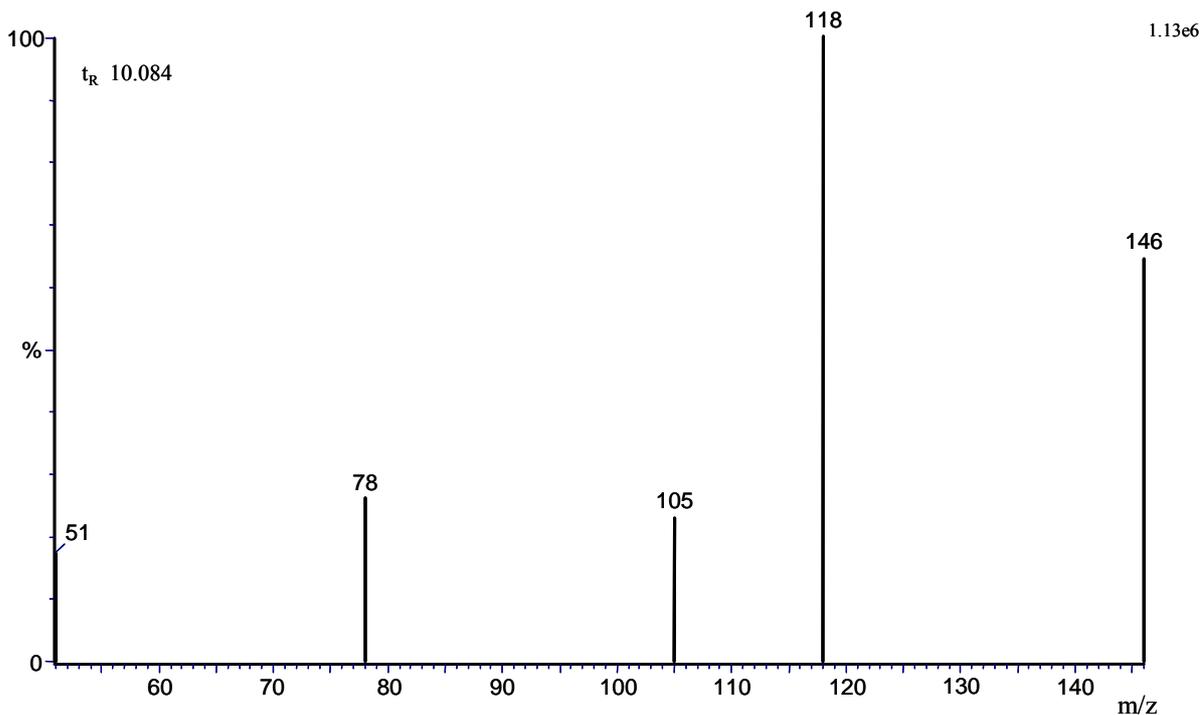


Abbildung 3-44: Fragmentierung von Myosmin im Plasma, aufgenommen im SIM Modus (m/z 51, 78, 105, 118, 146), 70eV

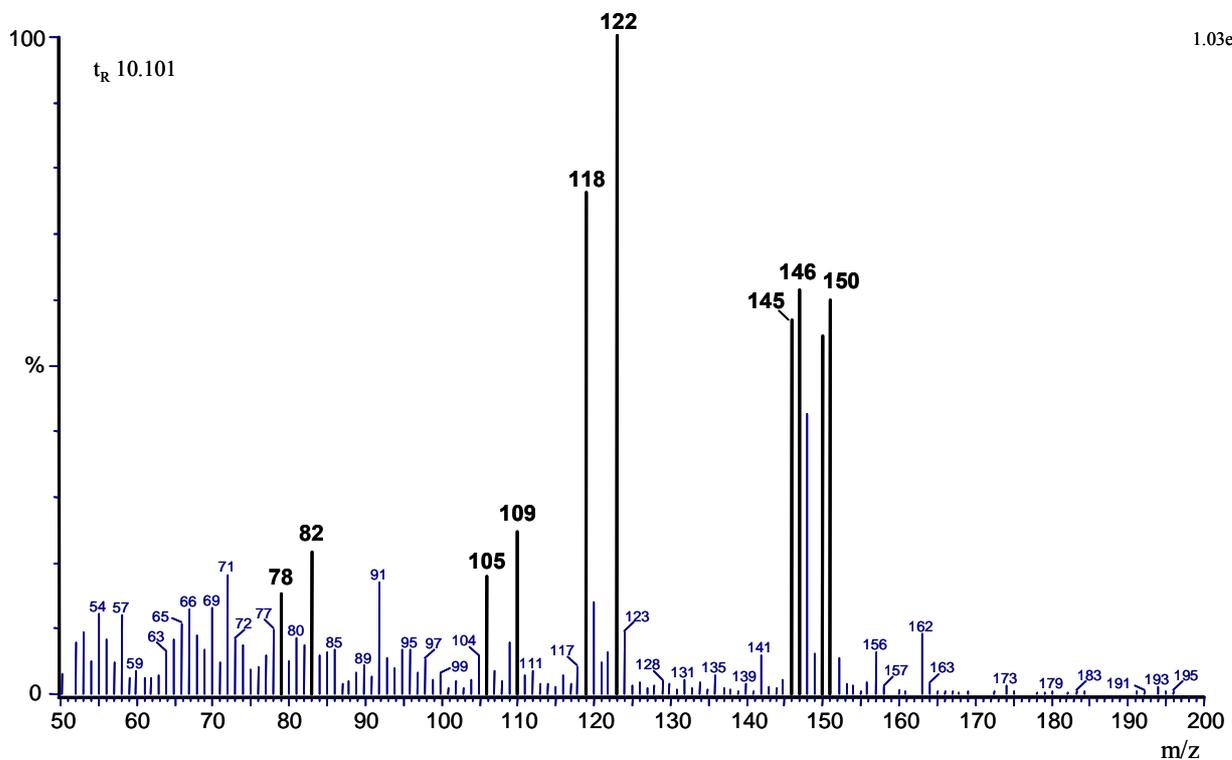


Abbildung 3-45: Fragmentierung von Myosmin und d_4 -Myosmin im Plasma, aufgenommen im Fullscan Modus (m/z 50-200), 70eV

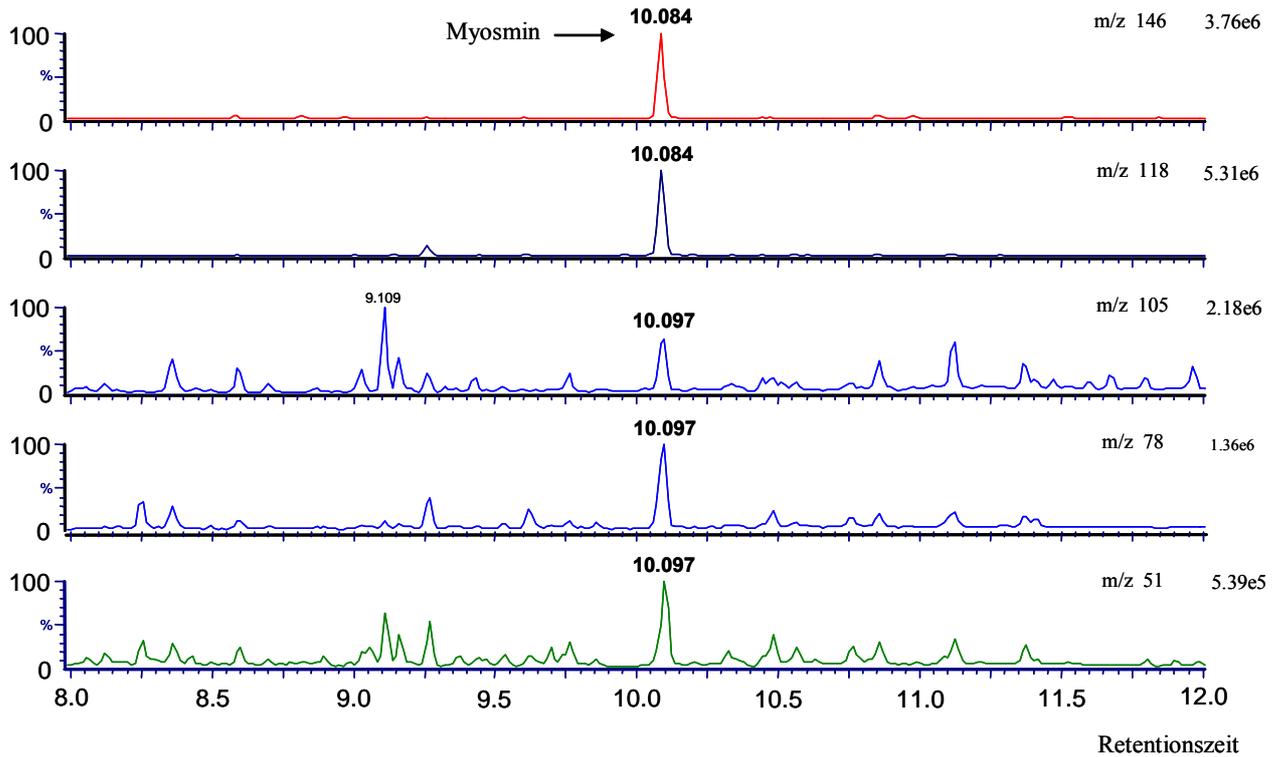


Abbildung 3-46: Myosmin im Speichel vermessen im SIM Modus auf den Massenspuren m/z 51, 78, 105, 118 und 146. Die Retentionszeit beträgt 10,084 Minuten.

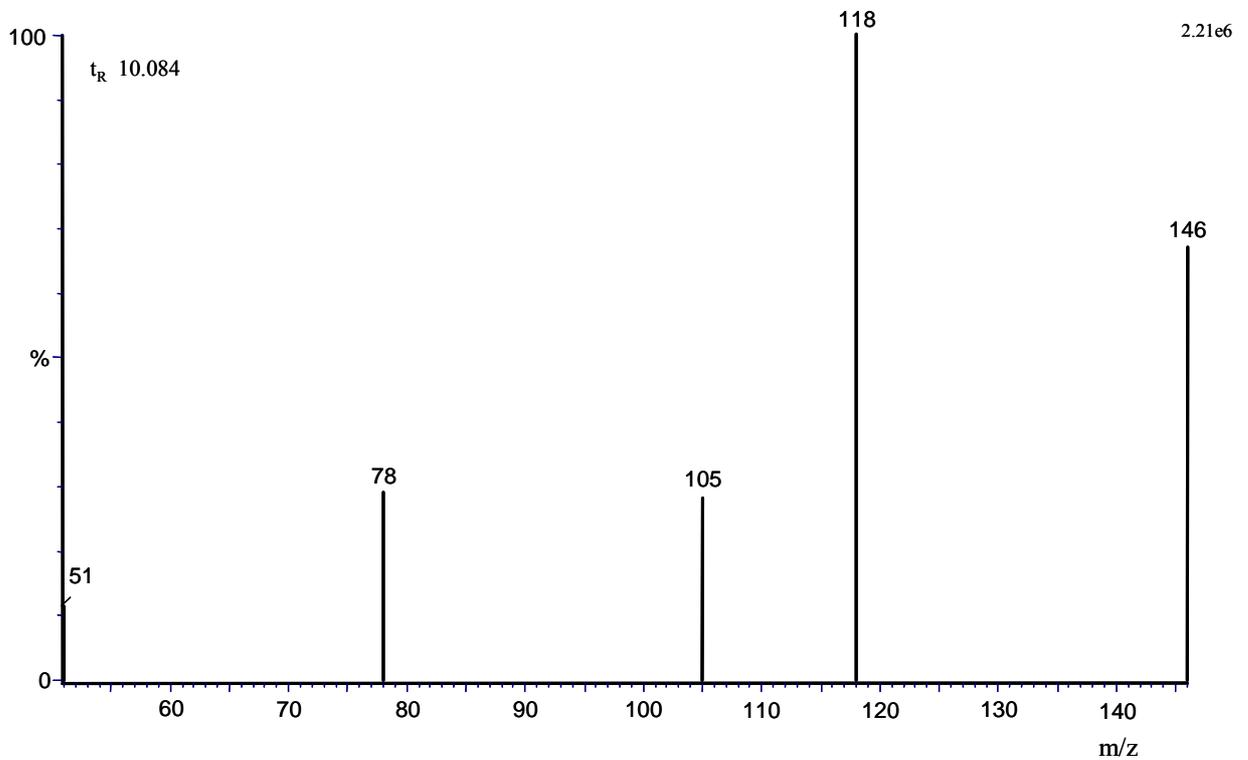


Abbildung 3-47: Fragmentierung von Myosmin im Speichel, aufgenommen im SIM Modus (m/z 51, 78, 105, 118, 146), 70eV

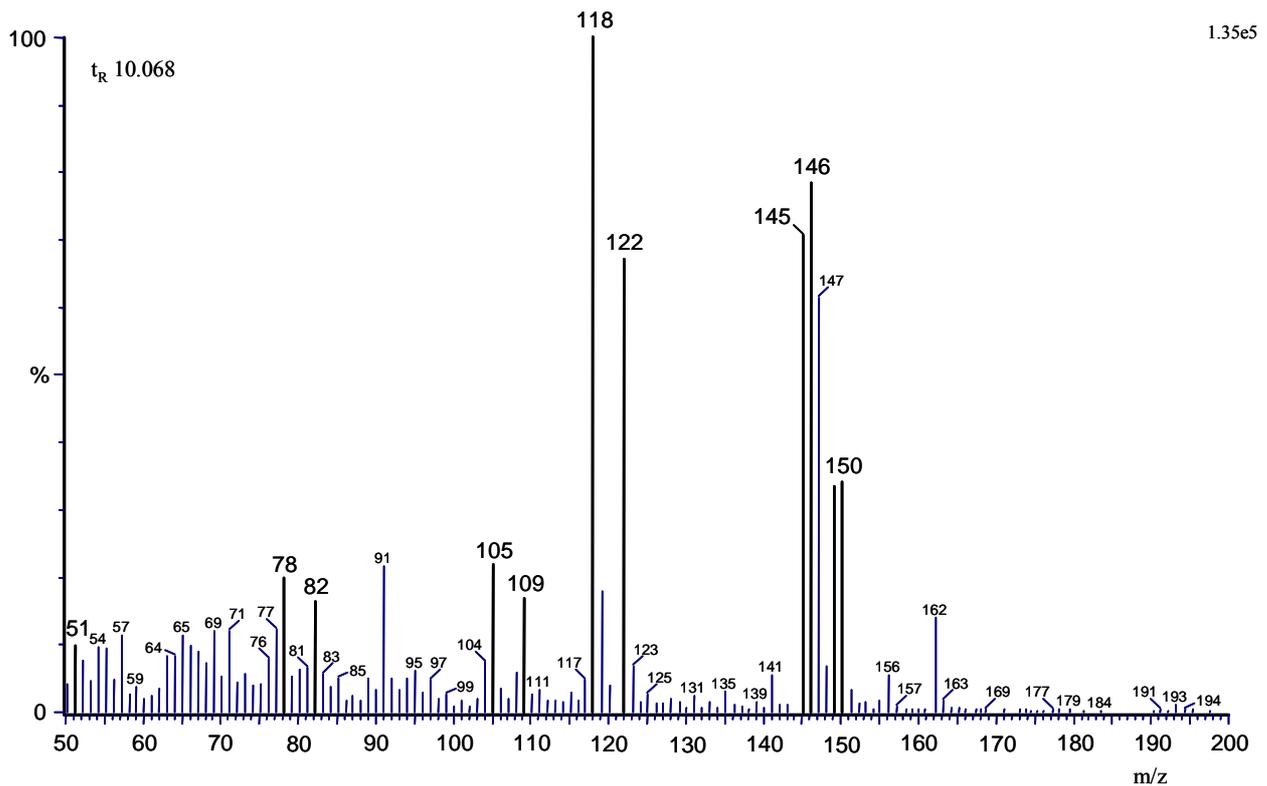


Abbildung 3-48: Fragmentierung von Myosmin und d₄-Myosmin im Speichel, aufgenommen im Fullscan Modus (m/z 50-200),70eV

3.4.5 Berechnung des S/P Verhältnis

Anhand der gemessenen Daten wird das Speichel zu Plasma Verteilungsverhältnis berechnet. Grundlage für die theoretische Berechnung ist die Henderson-Hasselbach-Gleichung [120]. Für basische Verbindungen wird Formel 3-3 herangezogen. Die Faktoren f_p und f_s berücksichtigen die Proteinbindung im Plasma bzw. im Speichel. Sie werden bei den Berechnungen jeweils mit dem Wert 1 eingesetzt, da bis jetzt keine Daten für die Proteinbindung von Myosmin vorliegen. Aufgrund der Daten für Nicotin und Cotinin ist jedoch mit keiner erhöhten Proteinbindung zu rechnen (siehe. 4.7).

Formel 3-3 Base:
$$\frac{S}{P} = \frac{1 + 10^{(pK_a - pH_s)} \cdot f_p}{1 + 10^{(pK_a - pH_p)} \cdot f_s}$$

Setzt man nun den pH Wert des Speichel mit pH_s 7,44, den Plasma pH Wert mit pH_p 7,41 und den pK_a Wert für Myosmin mit pK_a (MYO) 7,8 in Formel 3-3 ein, so berechnet sich ein S/P Verhältnis von 0,95 (Formel 3-4).

$$\text{Formel 3-4} \quad \frac{S}{P} = \frac{1+10^{(7,8-7,44)}}{1+10^{(7,8-7,41)}} = \frac{1+10^{(0,36)}}{1+10^{(0,39)}} = \frac{3,29}{3,45} = \mathbf{0,95}$$

Aus den experimentell bestimmten Daten ergibt sich ein S/P Verhältnis von 0,84 bei der Doppelbestimmung (Tabelle 3-48).

Berechnet man das S/P Verhältnis für die pH Verhältnisse der Einfachbestimmung (Tabelle 3-47), dann ergibt sich für den Speichel pH_s von 7,31 ein theoretisches Verhältnis von 1,18. Das experimentell bestimmte Verhältnis liegt mit 1,28 geringfügig höher.

4 Diskussion

Tabakrauch ist eine Hauptquelle für die Belastung des Menschen mit Nitrosaminen [71]. Von den sieben tabakspezifischen Nitrosaminen (TSNA) besitzen *N*-Nitrosornicotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) das eindeutig höchste kanzerogene Potential. Ihre wichtigsten Zielorgane umfassen Lunge, Ösophagus und Pankreas [141]. Während NNK ausschließlich bei der Nitrosierung von Nicotin entsteht, wird NNN zusätzlich durch Nitrosierung von Nornicotin und Myosmin gebildet [45,142,143]. Die durch eine Cytochrom P450 Monoxygenase vermittelte Aktivierung der beiden TSNA führt zu einer reaktiven Zwischenstufe, die an DNA und Proteine wie z.B. Hämoglobin binden kann (Abbildung 1-8). Bei der Hydrolyse dieser Addukte wird 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) freigesetzt. Hämoglobinaddukte, die HPB freisetzen, wurden als spezifische Biomarker für eine Belastung mit TSNA aus Tabak und Tabakrauch vorgeschlagen. Mehrere unabhängige Studien zeigen jedoch, dass sich die HPB-Addukte beim Raucher und Nichtraucher nur um das Zwei- bis Dreifache unterscheiden [144-147]. Da sich andere Biomarker für die Tabakrauchbelastung wie Cotinin und NNAL, die Hauptmetaboliten von Nicotin bzw. NNK, beim Raucher und Nichtraucher um mindestens den Faktor 100 unterscheiden [30,148,149], sollte eine Differenz in der gleichen Größenordnung auch für die HPB-Addukte zu erwarten sein. Aus diesem Grund wurden weitere tabakunabhängige Quellen für die HPB-Addukte postuliert [150]. Eine hohe Hintergrundbelastung, die aus anderen Quellen stammt, könnte den geringen Unterschied zwischen Raucher und Nichtraucher erklären. Die zusätzliche Belastung mit Tabakrauch würde beim Raucher dann nicht mehr stark ins Gewicht fallen.

Bisher war das Tabakalkaloid Myosmin von geringerem Interesse, weil es verglichen mit Nicotin und Nornicotin nur in geringen Mengen in Tabak und Tabakrauch gefunden wird [28,151-153]. In Studien zur Belastung von Nichtrauchern mit Tabakrauch wurde es häufig als Marker eingesetzt, weshalb ausführliche Daten zur Konzentration von Myosmin im ETS vorliegen [29,154-158]. In unserem Arbeitskreis wurde gezeigt, dass sich das Vorkommen von Myosmin nicht nur auf den Tabak beschränkt. Das Alkaloid wurde in Nüssen [33], in einer Reihe von Grundnahrungsmitteln, sowie wie in Obst, Gemüse und Milch [34] in ppb-Mengen detektiert. Die Aufnahme von Myosmin über die Nahrung wurde als mindestens gleichwertig zu einer starken Passivrauchbelastung geschätzt [34].

Myosmin wird unter Bedingungen, wie sie im Magensaft vorliegen, innerhalb weniger Stunden nahezu vollständig nitrosiert. Die Nitrosierung ist abhängig vom pH Wert und

besonders effektiv in Bereich zwischen pH 2 und 5 [46]. Unter diesen Bedingungen war HPB das Hauptprodukt (60-75%), während bei pH 1 dreimal mehr NNN (16%), verglichen mit HPB (5%), gebildet wurde. Die Bildung von HPB erfolgt über ein instabiles hochreaktives Intermediat, welches nicht nur mit Wasser abreagiert, sondern auch Proteine und DNA angreift. Die DNA-Bindung von radioaktivem Myosmin wurde *in vitro* unter Nitrosierungsbedingungen nachgewiesen [46]. Ein HPB-abspaltendes Addukt wurde schließlich am Hämoglobin und an der DNA von Ösophagus und Leber Myosmin-behandelter Ratten gefunden [159]. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Myosmin unter Nitrosierungsbedingungen ein genotoxisches Potential besitzt.

Da Myosmin im Urin nicht unverändert ausgeschieden wird und noch kein spezifischer Metabolit identifiziert wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit die Myosminbelastung des Menschen in geeigneten Körpersekreten untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse von Tyroller *et al.* [34], der Myosmin in Trinkmilch und Sahne fand, wurde zunächst die Muttermilch als geeignetes Sekret ausgewählt. Die Ähnlichkeit von Myosmin zu Nicotin und Cotinin [30,160] und Ergebnisse einer Doktorarbeit im Arbeitskreis zur Verteilung von Myosmin in der Ratte [161], bei welcher eine starke Anreicherung auch in den Speicheldrüsen beobachtet wurde, führten dann zu der Überlegung, den Speichel als leichter zugängliches und analytisch weniger problematisches Sekret in die Untersuchungen einzubeziehen.

4.1 Grundlagen der Wirkstoffextraktion aus Milch

Startet man eine Literaturrecherche über Wirkstoffextraktion aus Muttermilch, so ist festzustellen, dass deutlich weniger Literatur zu diesem Thema zu finden ist, als zu Plasma oder Urin. Dennoch gibt es einige Arbeiten welche sich mit den prinzipiellen Möglichkeiten der Wirkstoffextraktion beschäftigen. Moors *et al.* [162] vergleichen in ihrem Artikel Methoden der Festphasenextraktion mit der Flüssig-Flüssig Extraktion. Im Bereich der Festphasenextraktion favorisieren sie C18 Säulen vor den Cyanopropylsäulen. Sie zeigen auch, dass mit dieser Methode aus wässrigen Lösungen Wiederfindungen von größtenteils 85-95% erzielt werden. Extrahiert man unter gleichen Bedingungen die Stoffe jedoch aus Milch, liegen die Wiederfindungen nach Zusatz von 50 ng/mL bis 1 µg/mL nur zwischen 50-95%. Da der zu erwartende Konzentrationsbereich für Myosmin um den Faktor 10 geringer ist, muss dies bei der Bewertung der Wiederfindung berücksichtigt werden. Die Autoren weisen auf die Problematik möglicher Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen der SPE Säulchen hin, die es zu berücksichtigen gilt.

Rossi *et al.*, [163] beschreiben in ihrem Artikel die Möglichkeiten der Ultrafiltration, bzw. Dialyse, der Proteinfällung sowie Flüssig-Flüssig Extraktion und SPE. Bei der beschriebenen Proteinfällung zum Nachweis eines Cephalosporins liegt die Nachweisgrenze jedoch lediglich bei 625 ng/mL. Den Vorteil der Flüssig-Flüssig Extraktion sehen sie in dem breiten Spektrum an Lösungsmittel-Mischungen, welche optimal auf den Wirkstoff zugeschnitten werden können. Auch erwähnen sie die Notwendigkeit einer wässrigen Rückextraktion des Wirkstoffes aus der organischen Lösungsmittelphase, sowie die Möglichkeit einer Lipidextraktion mit Hexan, wenn der Wirkstoff ionisiert vorliegt. Die Extraktion lipophiler Stoffe erfordert das Zerstören der Fetttropfen durch Zugabe von Methanol. Zusammenfassend sehen sie in der Festphasen- und Flüssig-Flüssig Extraktion die besseren Möglichkeiten der Probenvorreinigung und Analytenanreicherung als in der Dialyse oder Proteinfällung.

Einige Schritte sollen nun im Rahmen der Methodenentwicklung anhand von Myosmin diskutiert werden, da die Methode primär für diese Substanz entwickelt, bzw. optimiert wurde. Das gleichzeitig bestimmte Cotinin verhält sich bezüglich der Phasenverteilung in ionisierter und neutraler Form ähnlich wie Myosmin, die absolute Wiederfindung ist im Vergleich jedoch geringer. Nachdem Cotinin nur der Überprüfung der Angaben zum Rauchstatus dient, und die größeren Verluste über den internen Standard korrigiert werden können, war die Wiederfindung noch akzeptabel.

Bei den ersten Versuchen wurde handelsübliche H-Milch und Vollmilch der Kuh als Matrix verwendet. Da während des Herstellungsprozesses die Fette homogenisiert werden, ist ein Abzentrifugieren nicht möglich, diese Milch als Matrix für die Entwicklung einer Methode für Muttermilch somit ungeeignet. Für weitere Vorversuche wurde unbehandelte Rohmilch der Kuh eingesetzt. Sie entspricht der Muttermilch bezüglich der unbehandelten Fette besser. Aufgrund des fast 10-mal höheren Kaseingehalts (Tabelle 1-6) treten jedoch bei den ersten Abtrennungen mittels Zentrifugation Verluste auf. Mit einzelnen Muttermilchproben wurden die mittels Rohmilchversuchen erarbeiteten Aufreinigungsschritte auf ihre Brauchbarkeit hin überprüft. Die gängigen Fettextraktionen wie Folch- oder Bligh and Dyer-Extraktion hatten den Nachteil, dass den hier verwendeten Mischungen organischer Lösungsmittel immer Methanol zugesetzt war. Da sich Myosmin jedoch gut in Methanol löst, könnte es zu einem Verschleppen zwischen der organischen und der Wasserphase kommen. Zudem müsste Methanol vor einer SPE Anreicherung weitgehend entfernt werden, weil es sonst schon als Elutionsmittel wirken könnte.

Die Methoden von Dahlström *et al.* [113], wie auch die von Luck und Nau [109,111] zeigten brauchbare Wiederfindungen, der schnelle Verlust an Messempfindlichkeit der GC-MS nach Vermessen weniger Proben machte aber eine weitere Vorreinigung nötig. Diese Problematik wurde auch von Dmitrovic *et al.* beschrieben. Anreicherung des Analyten nicht abgetrennte Lipide können in der GC-MS Anlage zu einer raschen Abnahme der Empfindlichkeit führen [164]. Sie können sich in der Kapillarsäule anreichern und somit deren Trennleistung beeinträchtigen und ihre Lebensdauer deutlich verkürzen. Zudem führen sie zu Ablagerungen in der Ionenquelle, was ein häufigeres Reinigen mit allen Konsequenzen zur Folge hat. Bei einem durchschnittlichen Fettgehalt von 5% sind 50 mg Fett im Milliliter Milch vorhanden. Dies ist sehr viel angesichts der geringen Mengen im pg bis ng Bereich, die noch mit GC-MS nachgewiesen werden können. Eine gründliche Fettabtrennung ist deswegen unerlässlich.

Durch Ansäuern der Milchprobe und Zentrifugieren bei 20 000 rpm (49 500 x g) können Milchfett und ausgefallene Proteine schon fast komplett abgetrennt werden. Noch verbliebene Rückstände werden dann mittels Flüssig-Flüssig Extraktion weiter reduziert.

Da das Milchfett größtenteils aus Triglyceriden besteht, eignet sich eine Mischung von Hexan:Diethylether (90:10 v/v) um restliche Lipide zu extrahieren [135]. Nach einer Flüssig-Flüssig Extraktion mit dieser Mischung werden mit Dichlormethan in einem zweiten Schritt die noch verbliebenen polareren Lipide abgetrennt. Die Anreicherung von Myosmin bei pH 7 mit einer C18 Säule hat bei der Milchanalytik zur Folge, dass immer noch vorhandene Lipide in ungeladener Form vorliegen können und sich ebenfalls anreichern. Die Anreicherung von Lipiden mit diesem Verfahren wird auch von Ruiz-Guiterrez und Perez-Camino [135] beschrieben. Eine Elution mit Chloroform, wie sie von Tyroller *et al.* [34] zur Isolierung von Myosmin aus Lebensmitteln durchgeführt wurde, führt dann zu einer Coelution von angereichertem Lipid und Myosmin, welche folglich auch gemeinsam in das GC-MS System eingebracht werden.

Den Effekt der Lipidanreicherung macht man sich zunutze, wenn die Probe auf pH 1 angesäuert wird. Die Lipide liegen unter diesen Bedingungen protoniert, also ungeladen vor, Myosmin hingegen, aufgrund seines Hydrolysegleichgewichtes, protoniert in der offenkettigen Aminoketon Form. Somit zeigt es im Gegensatz zu den Lipiden nahezu keine Affinität zu dem Säulenmaterial, und kann so von diesen getrennt werden. Ein vergleichbares Vorgehen wurde nachträglich auch in einer Arbeit gefunden, bei welcher das Halluzinogen Psilocin von störender Pilzmatrix getrennt wird [165]. Eine vollständige Extraktion von komplexen

Triglyceriden ist mit diesem Schritt zwar nicht möglich [135], da ein Grossteil der Milchfette aber vorher abgetrennt wurde, eignet er sich zur weiteren entscheidenden Reinigung.

Auch wenn die vorgeschalteten Reinigungsschritte einzeln keine vollständige Abtrennung der Milchfette bewirken können, so sind sie doch, in ihrer Gesamtheit gesehen, eine effektive Kombination. Betrachtet man den Glasliner im Injektionsblock der GC-Anlage nach mehrfacher Injektion von Proben, die mit diesen erweiterten Schritten aufgereinigt wurden, so sind keine Ablagerungen mehr zu sehen.

Bei der Anreicherung von Myosmin mittels der Oasis HLB Säule werden noch in Lösung befindliche Salze abgetrennt. Die nach der Elution folgenden Schritte zur Überführung von Myosmin in Hexan mögen aufwendig erscheinen, erlauben aber ein Vermessen der Substanz unter den geforderten Bedingungen für eine splitless Injektion.

4.1.1 Weitere mögliche Analysemethoden

Bei der Auswahl der Analysemethoden wurden neben den oben beschriebenen Möglichkeiten noch andere Wege in Betracht gezogen Myosmin, aus der komplexen Milchmatrix zu isolieren. Eine elegante Möglichkeit wäre Myosmin, entsprechend Nicotin, mittels Wasserdampfdestillation von der Milch abzutrennen. Da Myosmin jedoch nicht wasserdampfflüchtig ist [166] eignet sich diese Methode nicht. Somit kommt auch eine Headspace-SPME-GC-MS Methode, wie sie für Nicotin, Amphetamine und andere Rauschmittel beschrieben wird, für Myosmin nicht in Frage [137]. Das Verfahren der Molecularly Imprinted SPE (MISPE) wurde von Mullett *et al.* auch für die Nicotinbestimmung in Tabak entwickelt. Um die spezifische Bindung von Nikotin zu belegen, wurde Myosmin auf die MI Säule gegeben und lediglich eine Bindung von 30% gemessen [167]. Somit konnte diese Säule nicht direkt übernommen werden.

4.2 Bewertung der Analysemethoden anhand von Muttermilch- und Speichelproben

Die für Muttermilch erstellte Methode ist angesichts der komplexen Matrix und den geringen Mengen an Myosmin als durchaus brauchbar zu bewerten. Aufgrund der Verwendung eines internen Standards können eventuell auftretende Matrixeffekte auf die Wiederfindung bei den einzelnen Proben weitgehend korrigiert werden [168]. Die Schwankungen der Reproduzierbarkeit (day to day) könnten unter anderem auf die schwankenden Fettgehalte zurückge-

führt werden. Auch wenn die Messwerte der Doppelbestimmungen teilweise abweichen, so sind die mittels ISTD berechneten Ergebnisse mit deutlich geringeren Fehlern behaftet. Von den 13 positiv getesteten Proben schwanken die Messwerte im Durchschnitt 14,3% um den Mittelwert, die berechneten Myosminkonzentrationen hingegen nur noch um 9,4%. Das LOQ für Myosmin liegt mit 0,2 ng/mL Muttermilch in der Größenordnung wie das für Nicotin [111,113].

Sollten weitere Untersuchungen von Myosmin in Muttermilch durchgeführt werden, müsste der Einfluss des Fettgehaltes auf die Wiederfindung genauer überprüft werden, da dieser einen sehr variablen Faktor in der Milch darstellt.

Dass die Methode mit einer Matrix ohne nennenswerte Fettbelastung deutlich bessere Ergebnisse liefert, zeigte sich bei der Validierung der Methode mit Speichel. Da diese Probenmatrix weniger komplex ist, können Vorreinigungsschritte wie Proteinfällung bei 50 °C, sowie Lipidabtrennung mit C18 Säule bei pH 1 ausgelassen werden. Die Schwankungen der Wiederholbarkeit und der Reproduzierbarkeit liegen im Bereich von 5-10% und auch die Präzision der Methode steigt (Abbildung 4-49).

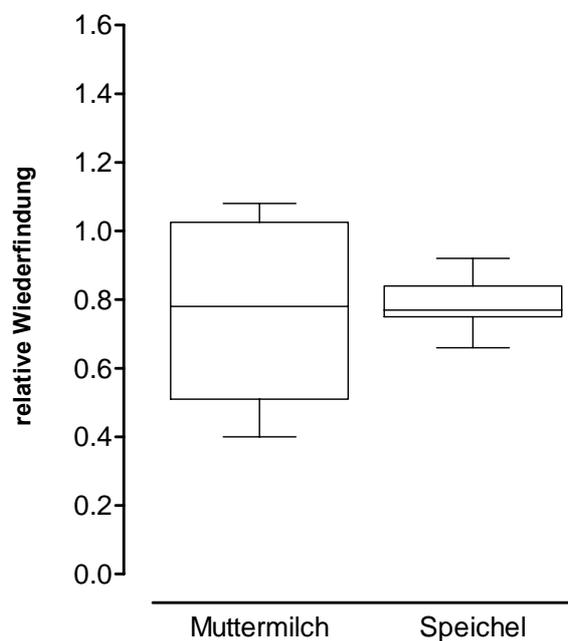


Abbildung 4-49 Reproduzierbarkeit der Myosminbestimmung in Muttermilch (N=10, Median 0,78, Schwankung um den Mittelwert 34%) und in Speichel (N=9, Median 0,77, Schwankung um den Mittelwert 9,6%)

4.2.1 Andere Tabakalkaloide und Nicotinamid

Die Methode erwies sich auch für Cotinin geeignet und kann sicherlich auch auf andere Tabakalkaloide wie Nicotin, Anabasin und Anatabin übertragen werden. Außerdem konnte in allen Milchproben ein deutlich auftretender Peak identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Nicotinamid (Vitamin B3) [Daten nicht gezeigt]. Aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zu Nicotin und Myosmin ließ es sich mit dieser Methode ebenfalls extrahieren. Dies bestätigt die Brauchbarkeit der Methode für den Nachweis von substituierten Pyridinderivate aus biologischen Proben. Das Vorkommen von Nicotinamid in der Muttermilch ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden (Übersicht bei Jensen [169]). Durch Aufarbeiten einer wässrigen d₄-Myosmin Lösung entsprechend der Muttermilchvorschrift konnte gezeigt werden, dass Nicotinamid nicht während der Aufarbeitung aus Myosmin entsteht.

4.3 Bestimmung des Octanol/Wasser Koeffizienten (logP) von Myosmin

Die Verteilung zwischen Milch und Plasma kann aufgrund der logP Werte der Substanzen abgeschätzt werden [108]. Dabei geht man aber wohl von einer rein wässrigen Lösung aus, bei welcher die in der Milch enthaltenen Lipide nicht berücksichtigt werden. Ein Vergleich der Werte bei pH 7 zeigt für Myosmin einen ähnlichen Wert wie für Cotinin (Tabelle 4-49).

Die Bestimmung des logP zwischen Octanol und Phosphatpuffer pH 7,2 ermöglicht die Verteilung zwischen Milchlipid und Plasma abzuschätzen [108]. Dieser experimentell bestimmte logP von Myosmin beträgt 0,95. Daraus ergibt sich ein Wert von 8,9 welcher dem K_{OC} bei einem pH Wert von 7,2 entspricht. Für Myosmin wird ein theoretischer Wert von 2,47 bei pH 7 angegeben (Tabelle 4-49). Da sich der Ionisierungsgrad von Myosmin aufgrund seiner Eigenschaft als schwache Base (pK_a 7,8) in diesem pH Bereich schon bei geringen pH Änderungen verändert, könnte der gemessene Wert durchaus in dieser Größenordnung liegen.

Betrachtet man den Range der von Luck und Nau bestimmten M/P Werte für Nicotin und Cotinin [111], so fällt auf, dass der für Cotinin geringeren Schwankungen unterliegt als der von Nicotin. Dies ist auf den pK_a Werte der Substanzen zurückzuführen. Somit ist es schwierig ein M/P Verhältnis für Myosmin vorherzusagen. Für Myosmin könnten somit auch Schwankungen, abhängig vom pH der Muttermilch, erwartet werden.

Tabelle 4-49 Vergleich von logP, K_{OC}, M/P und pKa der Substanzen Myosmin, Nicotin und Cotinin

| Substanz | logP ^a | K _{OC} (pH 7) ^a | K _{OC} (pH 8) ^a | M/P (Range) | pKa ^a |
|----------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Myosmin | -0,208 ± 0,524 | 2,47 | 11,2 | | 7,8 ± 0,2 |
| Nicotin | 0,720 ± 0,259 | 5,37 | 29,3 | 2,92 ^b (1,4-6,0) | 8,0 ± 0,2 |
| Cotinin | -0,228 ± 0,380 | 17,8 | 17,9 | 0,78 ^b (0,6-1,2) | 4,7 ± 0,2 |

^a Werte berechnete in den Datenblättern von Scifinder mittels Programm ACD Solaris V4.67

^b Experimentell bestimmt durch Milch und Plasmauntersuchungen [111]

Unter physiologischen Bedingungen liegt nur 1% von Myosmin in der ringoffenen Amino-
ketonform vor [39].

4.4 Bestimmung des Creamatokritwertes

Die Bestimmung des Fettgehaltes der Milchproben erfolgte mit der Creamatokritmethode. Andere Methoden der Fettgehaltbestimmung basierend auf Flüssig-Flüssig Extraktionen, z.B. die Roesse-Gottlieb-Methode und Modifikationen der Folch- und der Radin-Methode [104], sehen eine gravimetrische Bestimmung des Fettgehalts vor. Dies wäre für unsere Zwecke, angesichts der geringen zum Einsatz kommenden Mengen von Milch zu aufwändig gewesen.

Der von Jensen [104] angestellte Vergleich der Bestimmung der Fettgehalte mittels der Creamatokrit-Methode mit den oben genannten Methoden, bei welchem die Rose-Gottlieb Methode als Standardverfahren diente, bestätigt deren Brauchbarkeit (Tabelle 4-50).

Tabelle 4-50 Vergleich der Fettgehalte von Humanmilch Proben bestimmt mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden [104]

| Fettgehalt (%) mit folgenden Analysenmethode | | | | |
|--|-----------------|------------|------------|--------------|
| Milchvolumen (mL) | Roesse-Gottlieb | Mod. Folch | Dry Column | Creamatokrit |
| 9 | 1.61 | 1.70 | 1.49 | 1.45 |
| 10 | 1.58 | 1.61 | 1.44 | 1.44 |
| 11 | 3.16 | 3.13 | 1.37 | 3.57 |
| 12 | 3.33 | 3.08 | 3.58 | 3.85 |

4.5 Myosminkonzentrationen in der Muttermilch

Die Muttermilchproben wurden zum Teil auf der Neonatologiestation des Klinikums Großhadern (Prof. Schulze) gesammelt, ein Teil wurde von Müttern welche schon zu Hause waren gespendet. Das Durchschnittsalter der Mütter lag bei 32 Jahren (21-36 Jahre), die Angaben laut Ernährungsfragebogen ließen auf eine durchschnittliche Ernährung schließen. Eine Mutter gab an, während des Krankenhausaufenthaltes eine Zigarette am Tag zu rauchen, eine zweite Mutter rauchte während der Stillzeit weiter, Angaben mittels Fragebogen wurden in diesem Fall jedoch leider nicht gemacht.

Die Myosminkonzentrationen liegen bei den Nichtraucherinnen im Mittel bei 0,17 ng/mL (n.d.-0,47 ng/mL), bei den Passivraucherinnen bei 0,30 ng/mL (n.d.-0,59 ng/mL). Die Muttermilch der Raucherin war mit 1,34 ng/mL deutlicher mit Myosmin belastet. Cotinin konnte bei den Passivraucherinnen in Konzentrationen von 1,37 ng/mL (n.d.-5,08 ng/mL), bei der Raucherin in einer Konzentration von 97,1 ng/mL gemessen werden. Entsprechend der Einteilung von Luck und Nau [109] entspricht das bei der Raucherin einem Zigarettenkonsum von 11-20 Zigaretten am Tag.

Bei einer durchschnittlichen Milchproduktion von 750 mL/d [136] lassen sich Myosminmenge in der Muttermilch bei Nichtraucherinnen von 128 ng (56-353 ng) berechnen. Bei Passivraucherinnen liegen die Mengen mit bis zu 227 ng (56-443 ng) in der gleichen Größenordnung, wohingegen bei der Raucherin die Myosminmenge mit 1005 ng um den Faktor 4 größer ist. Entsprechend Nicotin ist auch bei Myosmin, einer schwachen Base, die Konzentration in der Milch maßgeblich von deren pH Wert abhängig. In lipophiler Form bei einem Plasma pH 7,4 kann Myosmin ungehindert die Membran passieren, bei niedrigeren pH Werten kommt es dann aufgrund des Ionenfallenprinzips zu einer Protonierung der Substanz und somit zu einer Anreicherung. Diese Tatsache hat sich bei unseren Messungen bestätigt. Vergleicht man die Myosminkonzentrationen mit den pH Werten der Proben, so ist eine, wenn auch noch nicht signifikante, Korrelation zu erkennen. Bei der kleinen Fallzahl und der unklaren Herkunft der Myosminbelastung ist dies jedoch von eingeschränkter Aussagekraft.

Untersuchungen von Stoffen in der Muttermilch wurden vermehrt in den 80er Jahren durchgeführt [170]. Einige Konzentrationen sollen zum Vergleich den gefundenen Myosmin-Mengen gegenübergestellt werden. Phenobarbital wurde in der Größe von 0,17 µg/mL in der Milch gefunden. Für Theophyllin wurde ein M/P von 0,61-0,87 bestimmt. Bei einer Plasmakonzentration von 6,8 ng/mL wurden 4 ng/mL in der Muttermilch gefunden. Bei einem M/P Verhältnis von 0,45 fand man 0,58 µg/mL im Plasma, der Wert in der Muttermilch lag bei

0,26 µg/mL. In einer weiteren Studie wurden, nach einer Einmaldosis von 200 mg, die Konzentrationen von Koffein und den Metaboliten Theobromin und Theophyllin in Milch und Serum gemessen. Sie lagen für Koffein bei 5,5 mg/mL im Serum und 4,5µg/mL im Plasma. Die entsprechenden Konzentrationen für Theobromin und Theophyllin lagen bei 0,8 bzw. 0,7 µg/mL und 0,15 bzw. 0,09 µg/mL [171]. Aromatische Amine können im ppb Bereich in der Muttermilch gefunden werden. Die Mengen an Anilin, *o*-Toluidin und *N*-Methylanilin liegen für Raucher bei 0,21, 0,04 bzw. 0,44 ng/mL, für Nichtraucher bei 0,4, 0,05 und 0,58 ng/mL [172]. PhIP, ein Vertreter der heterocyclischen Amine mit mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften, wurde in der Milch mit 59 pg/mL nachgewiesen [173]. Polychlorierte Biphenyle werden in ppm-Mengen, polychlorierte Dibenzop-dioxine und -furane in ppt- bis ppb-Mengen [174-177] gefunden.

Für die zu Myosmin strukturell verwandten Substanzen Nicotin und Cotinin wurden die Konzentrationen sowohl in Plasma als auch in der Muttermilch bestimmt. Nicotin konnte, in Abhängigkeit vom Rauchverhalten, in Konzentrationen von 1-28 ng/mL im Plasma, bzw. 2-62 ng/mL in der Milch gefunden werden. Der Hauptmetabolit Cotinin liegt im Bereich von 16-330 ng/mL im Plasma bzw. 12-222 ng/mL in der Milch vor [111].

Im Rahmen der Schwangerschaft treten teilweise deutliche Veränderungen unter anderem bei Aufnahme und Elimination, Verteilungsvolumen sowie Metabolismus auf [178]. Die in Muttermilch gewonnenen Anhaltspunkte bezüglich der Myosminbelastung sind somit nicht auf die allgemeine Bevölkerung zu übertragen. Für das in dieser Arbeit gesetzte Ziel des grundsätzlichen Nachweises von Myosmin in Muttermilch, konnte jede Art von Muttermilchprobe verwendet werden [179]. Für weitere eingehende Untersuchungen zur Abhängigkeit von Nahrung und Rauchen müsste die Probennahme genau festgelegt werden, da von Schwankungen zwischen Tageszeiten, Vor- und Nachmilch, Probennahme (Abpumpen von Hand oder Milchpumpe) und sogar zwischen rechter und linker Brust berichtet wurde [136].

Zudem wurde von einem gesteigerten Metabolismus von Nicotin und Cotinin bei Schwangeren berichtet. Er ist auf eine schnellere Oxidation durch CYP 2A6 sowie eine schnellere Glucuronidierung zurückzuführen [180]. Dies führt zu einer kürzeren Halbwertszeit von Nicotin und Cotinin. Ob dies auch bei Myosmin eine Rolle spielt, kann derzeit nicht beantwortet werden, weil über den Metabolismus und die Ausscheidung noch zu wenig bekannt ist. Im Unterschied zu Nicotin und Cotinin kann Myosmin auch über nitrosative und peroxidative Wege abgebaut werden. Dabei entstehen reaktive Zwischenstufen, von denen das HPB-freisetzende Hämoglobin- und DNA-Addukt aus Tierversuchen bekannt ist. Ob

Myosmin auch *in situ* in den Milchgängen aktiviert und dort zu entsprechenden Addukten führen kann, müsste in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

4.6 Myosminkonzentrationen im Speichel

In einer weiteren Serie wurden Speichelproben untersucht. Von den 22 Probanden waren 16 weiblich, Durchschnittsalter 32,6 Jahre (23-52), 6 männlich, Durchschnittsalter 32,4 Jahre (22-53). Im Vergleich zu der Muttermilchserie sind in dieser Probandengruppe 6 Raucher (27,3%) enthalten. Die Auswertung der Fragebögen zeigt ein ähnliches Bild wie bei der Muttermilch Serie. Auch in diesem Fall liegt eine durchschnittliche Ernährung vor.

Bei den 22 getesteten Proben lag die Myosminkonzentration, unabhängig vom Rauchstatus, bei durchschnittlich 1,80 ng/mL. Nach einer Unterteilung dieser Proben entsprechend dem Rauchstatus beträgt die Konzentration bei Nichtrauchern 1,58 ng/mL, bei Passivrauchern 1,89 ng/mL und bei Rauchern 1,87 ng/mL. Die entsprechenden Cotininkonzentrationen betragen 0,46, 2,15 bzw. 71,55 ng/mL. Bei der Gruppe der Nichtraucher konnte in 6 Fällen kein Myosmin nachgewiesen werden.

Die Bestimmung von Speichelkonzentrationen ist für eine Reihe von anderen Stoffen üblich [122]. Ausgewählte Beispiele sollen hier zum Vergleich mit Myosmin aufgeführt werden. Substanzen, welche unter den pH-Bedingungen des Plasmas weitgehend nichtionisiert vorliegen zeigen konstante S/P Verhältnisse. So beträgt die Konzentration von Phenytoin bei einem S/P von 0,13 im Mittel 3,2 µg/mL (0,7-5,6 µg/mL), die von Antipyrin bei einem S/P von 0,92 im Mittel 7,1 µg/mL (1,7-12,6 µg/mL) und die von Phenobarbital bei einem S/P von 0,41 im Mittel 15,1 µg/mL (0,9-29,2 µg/mL) [122]. Schwankendere Konzentrationen werden bei Stoffen beobachtet, welche bei dem Plasma pH großteils ionisiert sind. Die S/P Verhältnisse von Propranolol liegen im Bereich von 0,18 bis 2,63. Die Speichelkonzentrationen können entsprechend im Bereich von 86,7 ng/mL (14,9-158,4 ng/mL) bis 1266,3 ng/mL (218,3-2314,4 ng/mL) liegen [122]. Für Chlorpropamid liegt das S/P Verhältnis im Bereich von 0,009 bis 0,026, die mittleren Speichelkonzentrationen schwanken zwischen 0,9 µg/mL (0,3-1,4 µg/mL) und 2,5 µg/mL (1,0-1,4 µg/mL) [122]. Substanzen mit starker Proteinbindung weisen sehr geringe S/P Verhältnisse auf. Für Diazepam, mit einer Proteinbindung von 96-99%, ist das S/P Verhältnis nur 0,029 und Konzentrationen von 3,5 ng/mL (1-6 ng/mL) messbar [126]. Für Kokain können, je nach Applikation deutlich unterschiedliche S/P Verhältnisse auftreten. Fünf Minuten nach i.v Gabe von 25 mg Kokain beträgt die

Speichelkonzentration 530 ng/mL (S/P 3,3). 5 min nach intranasaler Gabe von 42 mg liegt sie bei 58250 ng (S/P 13239) [126].

Bei einer Gabe von 5, 10 und 20 mg Cotinin wurden im Plasma 93, 197 bzw. 345 ng/mL und im Speichel 163, 391 bzw. 532 ng/mL gefunden [181].

Betrachtet man diese Konzentrationsbereiche, so liegt Myosmin mit durchschnittlich 1,8 ng/mL im unteren Konzentrationsbereich. Man muss jedoch berücksichtigen, dass bei den Arzneistoffen deutlich größere Mengen aufgenommen werden (10-720 mg) als man für Myosmin schätzt (siehe 4.7).

Die bei 8 Proben gemessenen Speichel pH Werte lagen alle im Bereich von $7,8 \pm 0,2$. Dies kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass unter Stimulation der Speichel pH schnell auf Werte von pH 7-8 ansteigen kann [120,122]. Des Weiteren ist es schwierig, den exakten Speichel pH zu bestimmen, da durch CO₂-Kontakt innerhalb kurzer Zeit der pH Wert steigt. Die einzige Möglichkeit, diesen Fehler gering zu halten, ist eine sofortige Messung des pH Wertes nach Zentrifugieren der Proben. Bei längerer Lagerung ist zu überlegen, ob die Probe unter Stickstoffbegasung zu lagern ist.

4.7 Berechnung und Aussagen des Speichel zu Plasma Verhältnisses zur Myosminbelastung

Ebenso wie bei der Muttermilch ist der pH Wert des Speichels entscheidend für den Übertritt von Myosmin aus dem Plasma. Werte im pH Bereich von 5 können bei schwachen Basen sehr schnell zu einer 200 fachen Anreicherung im Speichel führen, wie die Daten in Tabelle 4-51 für das Kokain zeigen.

Tabelle 4-51 S/P Verhältnisse für Kokain (pKa = 8,6) unter Annahme eines Plasma pH von 7,4; Daten von Hackel et al.[182]

| Kokain in Speichel | |
|--------------------|----------------|
| pH Wert Speichel | S/P Verhältnis |
| 5,0 | 237,03 |
| 6,0 | 23,76 |
| 6,8 | 3,82 |
| 7,0 | 2,43 |
| 7,4 | 1,00 |
| 7,8 | 0,44 |

Durch gleichzeitige Abnahme von Plasma- und Speichelproben eines männlichen Probanden konnten erste Anhaltspunkte bezüglich des Speichel zu Plasma Verhältnisses von Myosmin gewonnen werden. Bei der ersten Probe war im Plasma 1,48 ng/mL, im Speichel 1,89 ng/mL nachweisbar. Das daraus berechnete S/P Verhältnis beträgt 1,28. Berechnet man das theoretische S/P Verhältnis für den Speichel pH von 7,31 (Formel 3-3), so beträgt es 1,18. Der Plasma pH wird zur Berechnung mit 7,41 der Literatur entnommen, da die Blutprobe in Na-EDTA beschichteten Röhrchen gesammelt wurde, was zu einer Verfälschung des pH Wertes führt.

Bei der zweiten Probe betrug der Speichel pH 7,44. Aus den Konzentrationen von 4,66 ng/mL im Speichel, bzw. 5,56 ng/mL im Plasma ergab sich ein S/P Verhältnis von 0,84, während die Berechnung des theoretischen S/P über die pH Werte ein Verhältnis von 0,95 ergab.

Die Plasmaproteinbindung von Nicotin und Cotinin beträgt lediglich 5 bzw. 3% [126]. Man kann deshalb davon ausgehen, dass auch Myosmin nur gering an Plasmaproteine gebunden wird und eine Proteinbindung in dieser Größenordnung für die Berechnungen des S/P Verhältnisses keine Rolle spielt.

Beide Messungen unterstützen die Hypothese, dass sich Myosmin hinsichtlich der Verteilung zwischen Plasma und Speichel wie eine schwache Base verhält.

Unternimmt man den Versuch, aus den Speichelwerten auf die Konzentration im Plasma und auf die Körperbelastung mit Myosmin zu schließen, dann müssen einige Faktoren berücksichtigt werden. Der erste Faktor ist der Zeitpunkt der Probennahme. Als erstes muss ausgeschlossen werden, dass es bei Proben, welche zeitnah nach der Mahlzeit genommen werden, zu einer Kontamination durch in der Mundhöhle abgelagertem Myosmin kommt. Dies kann man durch Einhalten eines zeitlichen Sicherheitsabstands und durch gründliches Spülen der Mundhöhle mit Wasser vor der Probennahme vermeiden. Der zeitliche Abstand von der Nahrungsaufnahme sollte standardisiert werden, um Proben mit einer möglichst hohen Konzentration zu erhalten. Aufgrund des sauren pH Wertes des Magens ist anzunehmen, dass die Myosmin nicht dort, sondern erst unter alkalischeren Bedingungen im Darm aufgenommen wird. Somit ist die Resorption auch von der Passagezeit durch den Magen abhängig. Die Speichelproben wurden in der Regel 3-4 Stunden nach Nahrungsaufnahme genommen. Genauere Untersuchungen bezüglich des Resorptionsprofils müssten mit deuteriummarkiertem Myosmin durchgeführt werden.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist die Abhängigkeit des S/P Verhältnisses von den pH Werten im Plasma und im Speichel. Mucklow *et al.* [122] berichtet von einem Speichel pH

Anstieg von 5,5 auf 7,9 nach starkem Speichelfluss. Ein erhöhter Speichelfluss ist aufgrund der Probennahme mittels Salivette durchaus gegeben und da die gemessenen pH Werte im Bereich von 7,8 lagen, ist die Vermutung nahe liegend, dass ein solcher Anstieg stattfand. Die von Rose *et al.* bestimmte Nicotinkonzentration im Speichel ist gegenüber der Plasmakonzentration um den Faktor 8 erhöht [183]. Bei diesen Messungen betrug der pH Wert des Speichels durchschnittlich 6,6. Luck und Nau sprechen in ihrer Arbeit sogar von einem S/P Verhältnis für Nicotin von 12,7 bei einem Speichel pH von 5,5 [111]. In der Regel haben schwach basische Verbindungen mit einem $pK_a > 5,5$, zu welchen Myosmin auch zählt, ein S/P Verhältnis von > 1 [182]. Diese Tatsachen bestätigen, dass schwache Basen aufgrund ihres pH abhängigen S/P Verhältnisses die am schwierigsten zu bewertenden Substanzen für ein Speichelmonitoring darstellen [116,120].

Für die Abschätzung der Gesamtbelastung mit Myosmin fehlen schließlich noch Angaben zur Pharmakokinetik. Bisher ist weder das Verteilungsvolumen noch die Clearance von Myosmin bestimmt worden. Solange diese Daten nicht vorliegen, basiert jede Schätzung auf Analogieschlüssen zu Daten von anderen Tabakalkaloiden, die wesentlich besser untersucht wurden. Dies ist für Cotinin und Nicotin der Fall [184-188]. Nicotin reichert sich aufgrund seines höheren pK_a Werts deutlich stärker im Speichel an, Cotinin dagegen etwas weniger als Myosmin. Nicotin hat mit 1,8-3,2 L/kg auch ein höheres Verteilungsvolumen als Cotinin (0,8 L/kg). Die Clearance von Myosmin sollte nach unseren Ergebnissen mit Ratten [161,189] eher im Bereich derjenigen von Nicotin als von Cotinin liegen [190].

Die zum Zeitpunkt der Probennahme im Körper vorhandene Menge an Myosmin kann deshalb nur grob abgeschätzt werden. Für eine durchschnittliche Speichelkonzentration von 2,4 ng/mL (Mittelwert aus positiv getesteten Proben), bei einem Durchschnittsgewicht von 70 kg, einem S/P Verhältnis von 0,58 (berechnet für den Speichel pH von 7,8) und einem Verteilungsvolumen zwischen 0,8 L/kg (wie für Cotinin) und maximal 3,2 L/kg (wie für Nicotin), kommt man zu einer schätzungsweise im Körper vorhandenen Menge, die zwischen 232 und 927 μg liegt. Legt man die beiden Messwerte für Plasma aus dem Fastenversuch zugrunde (Tabellen 3-47 und 3-48), dann kommt man für den Probanden mit einem Körpergewicht von 85 kg auf Werte die zwischen 101 und 1512 μg liegen.

Es besteht, auch wenn man die niedrigsten Schätzwerte heranzieht, eine große Diskrepanz zu den Daten aus der Arbeit von Tyroller *et al.* [34]. Ausgehend von den Myosminkonzentrationen in verschiedenen Lebensmitteln kommt er auf Grundlage des statistischen Warenkorb nur zu einer mittleren Tagesaufnahme von 1,3 μg . Es muss also weitere bedeutsamere

Quellen für Myosmin geben. Ein Grossteil der Genussmittel wie z.B. Kaffee und Schokolade ist noch nicht untersucht worden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Myosmin aus noch nicht bekannten, in der Nahrung vorhandenen Vorstufen im Körper gebildet wird. Die endogene Myosminbildung aus körpereigenen Stoffen wurde ebenfalls in Betracht gezogen. Die vorliegenden Ergebnisse mit Rückgang des Myosmins während absoluten Fastens lässt diese Möglichkeit jedoch als eher unwahrscheinlich erscheinen. Unsere Daten zeigen auch deutlich, dass das Rauchen nur unwesentlich zur Myosminbelastung beiträgt. Es gibt keinerlei Korrelation zwischen den Myosmin- und den Cotininkonzentrationen im Speichel und die Werte liegen bei den Nichtrauchern in der gleichen Größenordnung wie bei den Rauchern (Abbildung 3-42, Tabelle 3-14).

4.8 Toxikologische Bedeutung der Myosminbelastung

Zur Toxizität von Myosmin liegen nur sehr wenige Daten in der Literatur vor. Die geringen Mengen, die in Speichel und Muttermilch gefunden wurden, haben angesichts der geringen akuten Toxizität von Myosmin sicher keine unmittelbaren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit. Aufgrund der Genotoxizität von Myosmin, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anhand von DNA-Veränderungen gezeigt wurden [44,46,159], ist eine Langzeitwirkung von Myosmin nicht auszuschließen.

Das Vorhandensein von Myosmin im Speichel kann als Erklärung für die hohen HPB freisetzenden DNA-Addukte dienen, die von Hölzle *et al.* [191] im Übergangsbereich Ösophagus/Magen gefunden wurden. Auch diese waren unabhängig vom Rauchstatus. Aufgrund neuerer Arbeiten der Forschungsgruppe von McColl [61,62,192,193] ist in diesem Bereich die Kapazität zur endogenen Nitrosierung am höchsten. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nitrosierung in entzündeten Geweben durch Peroxynitrit. Dies ist besonders beim Barrett-Syndrom gegeben. Dieselben DNA-Addukte sind in der Mundhöhle noch nicht untersucht worden. Es muss in diesem Bereich aber auch die Möglichkeit nicht nur einer entzündlichen, sondern auch einer bakteriell katalysierten Nitrosierung von Myosmin in Betracht gezogen werden. Auch sollte untersucht werden, ob in der Brustdrüse ebenfalls HPB freisetzende DNA-Addukte gebildet werden. Bei all diesen Betrachtungen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass DNA-Addukte per se noch nichts über ein Krebsrisiko aussagen. Angesichts der unklaren Ätiologie des in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegenen Adenocarcinoms des unteren Ösophagus [194-197], sollte jedoch die Möglichkeit, dass DNA-Schäden durch

Myosmin die notwendige, wenn auch alleine nicht ausreichende Initiation im komplexen Geschehen der Tumorigenese liefert, nicht außer Betracht gelassen werden.

In weiteren Untersuchungen mit einer hochempfindlichen GC-MS Methode sollen nun die Zusammenhänge zwischen HPB freisetzenden DNA-Addukten der Ösophagsmucosa durch tabakspezifische Nitrosamine und durch Myosmin, aufgenommen über Lebensmittel, geklärt werden. Die Belastung mit Myosmin, sowie die Bestimmung des Rauchstatus mittels Cotinin können dabei anhand von Speichelproben und soweit verfügbar auch Plasmaproben überprüft und mit den DNA-Addukten korreliert werden.

5 Zusammenfassung

Myosmin zählt wie Nicotin und Nornicotin zu den Tabakalkaloiden. Es ist jedoch weit weniger erforscht als diese, so dass über die biologischen Eigenschaften kaum Informationen vorliegen. Das Vorkommen des Myosmins beschränkt sich nicht allein auf den Tabak. In unserem Arbeitskreis wurde es auch in Nüssen, Mandeln, Reis, Mais und Kakao nachgewiesen, wobei die Gehalte im unteren ppb-Bereich lagen [33,34]. Zwickenpflug [45] beschrieb die Bildung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) und N-Nitrosornicotin (NNN) durch Nitrosierung von Myosmin in Pufferlösungen unter Magensaftbedingungen. NNN ist ein im Tierversuch nachgewiesenes Kanzerogen, das bei Ratten Tumoren im Nasenraum und Ösophagus verursacht. HPB entsteht im Stoffwechsel des NNN aus einer reaktiven Zwischenstufe, die neben der Reaktion mit Wasser auch Addukte mit DNA und Proteinen eingehen kann. Myosmin zeigte in der Autoradiographie mit Ratten unter anderem eine starke Anreicherung in der Speicheldrüse [161]. Ein spezifischer Metabolit im Urin wurde für Myosmin bis jetzt noch nicht identifiziert.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Abschätzung der Belastung des Menschen mit Myosmin in Abhängigkeit der Ernährungsgewohnheiten und dem Rauchverhalten. Dies erfolgte durch Bestimmung von Myosmin in Körperflüssigkeiten wie Muttermilch, Speichel und Plasma.

Zuerst musste eine geeignete Analysenmethode für die Muttermilchanalytik entwickelt werden, welche danach auch auf Tauglichkeit für Speichel- und Plasmauntersuchungen überprüft wurde.

Ein wesentlicher Schritt bei der Muttermilchanalytik war die Probenvorreinigung. Mit ihr mussten das Fett und die Proteine nahezu vollständig abgetrennt werden. Nach Ansäuern auf pH 1 und Erwärmen auf 50 °C für zwei Stunden konnten Proteine abzentrifugiert werden. In weiteren Schritten, bestehend aus einer Kombination aus Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion mittels C-18 BondElut Säulen wurden Lipide abgetrennt. Dieses Verfahren lieferte gute Ergebnisse. Für die Anreicherung von Myosmin wurde eine OASIS HLB Säule verwendet. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte mittels GC-MS. Diese Methode wurde auch für die Untersuchung von Plasmaproben angewandt. Unter Auslassen zweier Vorreinigungsschritte zeigte die Methode auch gute Ergebnisse bei der Untersuchung von Speichelproben.

Bei der Muttermilchanalytik lag die Wiederfindung für d₄-Myosmin bei 65,0 ± 18,0%. Auch wenn die Tagesschwankung des internen Standards bei 34% liegt, so schwanken die berechneten Myosminkonzentrationen großteils nur um 5-10% um den Mittelwert. Für d₃-Cotinin

beträgt die Wiederfindung $45,5 \pm 18,7\%$. Diese relativ großen Schwankungen in der Analytik sind auf die komplexe Milchmatrix und die geringen nachzuweisenden Mengen zurückzuführen. Das LOD für Myosmin liegt bei $0,15 \text{ ng/mL}$, das LOQ bei $0,20 \text{ ng/mL}$. Für Cotinin liegt das LOD bei $0,3 \text{ ng/mL}$ das LOQ bei $0,5 \text{ ng/mL}$.

Bessere Ergebnisse liefert die Methode für Speichel. Die Wiederfindung für d₄-Myosmin liegt bei $77,0 \pm 6,5\%$, die Tagesschwankungen bei $9,6\%$. Die Schwankungen der berechneten Myosminkonzentrationen um den Mittelwert liegen unter 5% . Für d₃-Cotinin beträgt die Wiederfindung $60 \pm 17\%$. Das LOD für Myosmin liegt bei $0,3 \text{ ng/mL}$, das LOQ bei $0,50 \text{ ng/mL}$. Für Cotinin liegt das LOD bei $0,5 \text{ ng/mL}$ das LOQ bei $0,75 \text{ ng/mL}$. Für die Plasmaanalytik liegt die Wiederfindung für d₄-Myosmin bei $94 \pm 3\%$, für d₃-Cotinin bei $72 \pm 7,8\%$.

Die Myosminkonzentrationen in den Muttermilchproben (N=23) liegen, abhängig vom Rauchstatus, bei Nichtraucherinnen (N=17) bei $0,17 \pm 0,12 \text{ ng/mL}$ (n.d.–0,47), bei Passivraucherinnen (N=5) bei $0,30 \pm 0,19 \text{ ng/mL}$ (n.d.–0,59) und bei einer Raucherin bei $1,34 \text{ ng/mL}$. Cotinin liegt bei allen Nichtraucherinnen unter der Nachweisgrenze. Bei den Passivraucherinnen beträgt die Konzentration bei $1,37 \pm 2,09 \text{ ng/mL}$ (n.d.–5,08) und bei der Raucherin $97,12 \text{ ng/mL}$.

Im Speichel (N=22) liegen die Myosminkonzentrationen, ebenfalls in Abhängigkeit des Rauchstatus, für Nichtraucher (N=14) bei $1,58 \pm 1,67 \text{ ng/mL}$ (n.d.–5,33), für Passivraucher (N=2) bei $1,89 \pm 0,35 \text{ ng/mL}$ (1,64–2,13) und für Raucher (N=6) bei $1,87 \pm 1,01 \text{ ng/mL}$ (0,99–3,49). Cotinin kann für Nichtraucher in einer Konzentration von $0,46 \pm 0,37 \text{ ng/mL}$ (0,25–1,37) gemessen werden, bei den Passivrauchern liegt diese bei $2,15 \pm 1,89 \text{ ng/mL}$ (0,81–3,48) und für Raucher bei $71,55 \pm 41,81 \text{ ng/mL}$ (10,36–132,3).

Im Rahmen einer Fastenkur nimmt bei einem Nichtraucher die Myosminkonzentration mit Reduktion der Nahrungsaufnahme deutlich ab, allerdings bleibt ein Anstieg mit Wiederaufnahme von Nahrung aus innerhalb von einer Woche aus. Cotinin ist nur in 4 von 12 Proben nachweisbar und liegt unter $1,5 \text{ ng/mL}$

Bei zwei an verschiedenen Tagen zeitgleich genommenen Speichel und Plasmaproben wird ein S/P Verhältnis in Abhängigkeit des pH Wertes von $0,84$ bzw. $1,24$ bestimmt. Die experimentell bestimmten Verhältnisse korrelieren dabei gut mit den theoretisch berechneten Werten, basierend auf pH und pKa Werten. Aus beiden Plasmawerten ($1,48$ und $5,56 \text{ ng Myosmin pro mL}$) errechnet sich, unter Annahme eines beim Menschen ähnlichen Verteilungsvolumens von Myosmin und Nikotin, eine Gesamtbelastung des Körpers zum Zeitpunkt der Messung

von 0,2 bis 1,5 mg. Dies ist mindestens zwei Größenordnungen mehr als die von Tyroller *et al.* [34] geschätzte tägliche Gesamtaufnahme von 1,3 µg Myosmin.

Die Myosminkonzentrationen im Speichel korrelieren weder mit dem selbst berichteten Rauchstatus der Probanden, noch mit den Cotininwerten. Geht man von der Möglichkeit einer Nitrosierung im unteren Ösophagus aus, dann bestätigen diese Ergebnisse die ebenfalls vom Rauchstatus unabhängigen hohen Werte für HPB-freisetzende DNA-Addukte in diesem Bereich [191].

In weiteren Untersuchungen mit einer hochempfindlichen GC-MS Methode sollen nun HPB-freisetzende DNA-Addukten in der Ösophagusmucosa bestimmt und Zusammenhänge zwischen dem pathologisch-histologischen Status und der Belastung durch tabakspezifische Nitrosamine über den Tabakgenuss bzw. durch Myosmin über die Nahrung aufgeklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Geddes M Balzi D Tomatis L (1994) Progress in the fight against cancer in EC countries: changes in mortality rates, 1970-90. *Eur J Cancer Prev* 3:31-44
2. Willett WC Colditz GA Mueller NE (1996) Strategien zur Krebsprävention. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 5:34-40
3. Doll R (1996) Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis* 17:177-184
4. Anon (1995) *Römpp Chemie Lexikon*, CD 1.0. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
5. Hoffmann D Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50:307-364
6. Wynder EL Hoffmann D (1994) Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. *Cancer Res* 54:5284-5295
7. Anon (1986) *Tobacco Smoking*. Lyon: IARC
8. Hoffmann D Rivenson A Chung F-L Hecht SS (1991) Relevance of nicotine-derived N-nitrosamines in tobacco carcinogenesis. in: *Effects of Nicotine on Biological Systems. Advances in Pharmacological Sciences*; pp 89-101; eds.: Adlkofer F Thureau K; Basel/Boston/Berlin: Birkhäuser Verlag
9. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. in: *Lehrbuch der Toxikologie*; Ch 35 pp 897-918; eds.: Marquardt H Schäfer SG; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
10. Marquardt H (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". *DGPT Mitt* 19:64-65
11. Richter E (1996) Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". *DGPT Mitt* 19:65-66
12. Witschi H Espiritu I Peake JL Wu K Maronpot RR Pinkerton KE (1997) The carcinogenicity of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis* 18:575-586
13. Anon. (1997) Passivrauchen am Arbeitsplatz. in: *Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*; ed.: DFG; Weinheim, Germany: VCH-Wiley
14. Nilsson R (1996) Environmental tobacco smoke and lung cancer: a reappraisal. *Ecotoxicol Environ Safety* 34:2-17
15. Enstrom JE Kabat GC (2003) Environmental tobacco smoke and tobacco related mortality in a prospective study of Californians, 1960-98. *Br Med J* 326:1057-1061
16. Scherer G Richter E (1997) Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum Exp Toxicol* 16:449-459
17. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Rev Cancer* 3:733-744

18. Bush LP Fannin FF Chelvarajan RL Burton HR (1993) Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. in: Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion; Ch 1 pp 1-30; eds.: Gorrod JW Wahren J; London: Chapman & Hall
19. Franke W (1992) Naturpflanzenkunde. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
20. Rundlöf T Olsson E Wiernik A Back S Aune M Johansson L Wahlberg I (2000) Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of *N*-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. *J Agric Food Chem* 48:4381-4388
21. Johnstone RAW Plimmer JR (1959) The chemical constituents of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 59:885-936
22. Kisaki T Tamaki E (1966) Phytochemical studies of the tobacco alkaloids. X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotary changes in tobacco plants. *Phytochemistry* 5:293-300
23. Leete E Chedekel MR (1972) Aberrant syntheses in higher plants. II. Aberrant formation of (-)-*N*-methylanabasine from *N*-methyl-D1-piperdeinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochemistry* 11:2751-2756
24. Mundy BP Larsen BR McKenzie LF Braden G (1972) A convenient synthesis of myosmine. *J Org Chem* 37:1635-1636
25. Leete E Chedekel MR (1972) The aberrant formation of (-)-*N*-methylanabasine from *N*-methyl-piperidinium chloride in *Nicotiana Tabacum* and *N. Glauca*. *Phytochemistry* 11:2751-2756
26. Tso TC Jeffrey RN (1953) Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in Maryland tobacco. *Arch Biochem Biophys* 43:269-285
27. Sisler EC (1969) Determination of myosmine with *o*-aminobenzaldehyde. *Anal Biochem* 31:183-188
28. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr Tabakforsch Int* 12:199-209
29. Jenkins RA Palausky MA Counts RW Guerin MR Dindal AB Bayne CK (1996) Determination of personal exposure of non-smokers to environmental tobacco smoke in the United States. *Lung Cancer* 14:S195-S213
30. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
31. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
32. Lydon J Duke SO (2004) The Potential of Pesticides from Plants. in: Herbes, Spices, and Medical Plants; Ch Vol. 4 pp 1-41; Anon
33. Zwickelpflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J Agric Food Chem* 46:2703-2706

34. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J Agric Food Chem* 50:4909-4915
35. Brandänge S Lindblom L (1976) *N*-Vinyl as *N*-H protection group. A convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem Scand* 30:39
36. Witkop B (1954) Infrared diagnosis of the hydrochlorides of organic bases. II. The structure of myosmine. *Am Chem Soc* 76:5597-5599
37. Korte F Schulze-Steinen H-J (1962) Umlagerung von α -Aroyl-pyrrolidonen in konz. Salzsäure zu Pyrrolinderivaten. *Chem Ber* 95:2444-2452
38. Swain ML Eisner A Woodward CF Brice BA (1949) Ultraviolet absorption spectra of nicotine, nornicotine and some of their derivatives. *J Am Chem Soc* 71:1341-1345
39. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem Scand Ser B* 37:643-644
40. Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J Org Chem* 54:4462-4468
41. Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc Soc Exp Biol Med* 63:423-424
42. French FA Freedlander BL Furst A (1957) *Proc Am Assoc Cancer Res* 2:205
43. Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101:39-43
44. Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwickenpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192:171-177
45. Zwickenpflug W (2000) *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosonornicotine). *J Agric Food Chem* 48:392-394
46. Wilp J Zwickenpflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Toxicol* 40:1223-1228
47. Scherer G Meger-Kossien I (2000) Cotinine. in: *Analyses of hazardous substances in biological materials*; pp 171-189; ed.: Greim H; Volume 7; D-69469 Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH
48. Tyrpien K Bodzek P Manka G (2001) Application of planar chromatography to the determination of cotinine in urine of active and passive smoking pregnant women. *Biomed Chromatogr* 15:50-55
49. LaKind JS Jenkins RA Naiman DQ Ginevan ME Graves CG Tardiff RG (1999) Use of environmental tobacco smoke constituents as markers for exposure. *Risk Anal* 19:359-373
50. Owen L McNeill A (2001) Saliva cotinine as indicator of cigarette smoking in pregnant women. *Addiction* 96:1001-1006

51. Etter J-F Duc TV Perneger TV (2000) Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol* 151:251-258
52. Werle E Schievelbein H (1961) Tabellen zur Toxikologie, Pharmakologie und Chemie von Inhaltsstoffen des Tabaks und des Tabakrauchs. 2. Mitteilung. *Arzneimittelforsch* 11:1149-1157
53. Borden JT Man A Scott DA Liu K-Z (2003) Tobacco-induced alterations to the Fourier-transform infrared spectrum of serum. *J Mol Med* 81:788-794
54. Benowitz NL (1996) Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:597-613
55. Machholz R Lewerenz HJ (1989) *Lebensmitteltoxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
56. Spiegelhalder B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Chem Toxicol* 14:545-548
57. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 14:549-552
58. Anon (1981) *The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds*. Washington DC: National Academy of Sciences National Press
59. Eisenbrand G (1981) *N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
60. Xu GP Reed PI (1993) N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. *Carcinogenesis* 14:2547-2551
61. Iijima K Henry E Moriya A Wirz A Kelman AW McColl KEL (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 122:1248-1257
62. Moriya A Grant J Mowat C Williams C Carswell A Preston T Anderson S Iijima K McColl KEL (2002) In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand J Gastroenterol* 37:253-261
63. Walters CL Hill MJ Rudell WSJ (1978) Gastric juice nitrite. Its source and relationship to hydrogen ion concentration. *Environmental aspects of N-nitroso compounds*. *IARC Sci Publ* 19:279-288
64. Koehl W Eisenbrand G (1999) *N-nitroso compounds*. in: *Toxicology*; eds.: Marquardt H Schäfer S Mc Clellan R Welsch F; San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto: Academic Press
65. Jarosz M Dzieniszewski J Dabrowska-Ufniarz E Wartanowicz M Ziemiński S (2000) Tobacco smoking and vitamin C concentration in gastric juice in healthy subjects and patients with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Cancer Prev* 9:423-428

66. Mirvish SS (1995) Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 93:17-48
67. Vermeer, I.T.M. Nitrate exposure and endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans Department of Health Risk and Analytical Toxicology, Maastricht University, Netherlands; 2000;
68. Vermeer ITM Moonen EJC Dallinga JW Kleinjans JCS van Maanen JMS (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res* 428:353-361
69. Tricker AR (1996) Excretion of *N*-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of urinary tract. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl):95-99
70. Eisenbrand G Fuchs A Koehl W (1996) *N*-Nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl 1):41-46
71. Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 41:1-52
72. Andersen RA Burton HR Fleming PD Hamilton-Kemp TR (1989) Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res* 49:5895-5900
73. Djordjevic MV Gay LS Bush LP Chaplin JF (1989) Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J Agric Food Chem* 37:752-756
74. Nestor TB Gentry JS Peele DM Riddick MG Conner BT Edwards ME (2003) Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. *Beitr Tabakforsch Int* 20:467-475
75. Mirvish SS (1975) Formation of *N*-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vitro occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31:325-351
76. Klimisch HJ Stadler L (1976) Investigations of *N*-nitrosornicotine from nicotine-*N'*-oxide. *Talanta* 23:614-616
77. Caldwell WS Greene JM Dobson GP deBethizy JD (1993) Intra-gastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann NY Acad Sci USA* 686:213-228
78. Hoffmann D Amin S Brunnemann KD Prokopczyk B Rivenson A Hecht SS (1990) Tobacco-specific *N*-nitrosamines: analysis, bioassays and biochemical studies. in: *N-Nitroso Compounds. Biology and Chemistry*; pp 59-79; eds.: Bhide SV Rao KVK; New Delhi: Omega Sci Publ
79. Brunnemann KD Hoffmann D (1991) Analytical studies on tobacco-specific *N*-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit Rev Toxicol* 21:235-240
80. Tso TC (1990) Tobacco-specific *N*-nitrosamines. in: *Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant*; pp 467-486; ed.: Tso TC; Beltsville MD USA: Ideal Inc.

81. Hecht SS Hoffmann D (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 8:273-294
82. Wahlberg I Wiernik A Christakopoulos A Johansson L (2000) Tobacco-specific nitrosamines. A multidisciplinary research area. *Agro-Food Ind* 10:23-28
83. Zwirner-Baier I Neumann HG (1994) Biomonitoring of aromatic amines IV: use of hemoglobin adducts to demonstrate the bio-availability of cleavage products from diarylide azo pigments in vivo. *Arch Toxicol* 68:8-14
84. Marquardt H Schäfer SG (2004) *Lehrbuch der Toxikologie. 2*; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsges.mbH
85. Anon (2003) MAK- und BAT-Wert-Liste. Mitteilung 39; Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69451 Weinheim, Germany
86. Müller KR (2000) *Progress in Hair Analysis for Illegal Drugs. 1*; Köln, Germany: Bundesinstitut für Sportwissenschaften
87. Pichini S Altieri I Pellegrini M Pacifici R Zuccaro P (1997) Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci Int* 84:243-252
88. Torano JS van Kan HJ (2003) Simultaneous determination of the tobacco smoke uptake parameters nicotine, cotinine and thiocyanate in urine, saliva and hair, using gas chromatography-mass spectrometry for characterisation of smoking status of recently exposed subjects. *Analyst* 128:838-843
89. Henderson RF Bechtold WE Bond JA Sun JD (1989) The use of biological markers in toxicology. *Crit Rev Toxicol* 20:65-82
90. Perera F Mayer J Santella RM Brenner D Jeffrey A Latriano L Smith S Warburton D Young TL Tsai WY Hemminki K Brandt-Rauf P (1991) Biologic markers in risk assessment for environmental carcinogens. *Environ Health Perspect* 90:247-254
91. Berlin A Draper M Hemminki K Vainio H (1984) Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. *IARC Sci Publ* 59:325-427
92. Bridges BA Butterworth BE Weinstein IB (1982) Indicators of genotoxic exposure. *Banbury Report* 13:277-558
93. Vineis P (1994) Epidemiology of cancer from exposure to arylamines. *Environ Health Perspect* 102(Suppl.6):7-10
94. Case RAM Hosker ME McDonald DB Pearson JT (1954) Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, -naphthylamine, and b-naphthylamine. *Br J Ind Med* 11:75-104
95. Skipper PL Tannenbaum SR (1990) Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11:507-518
96. Neumann HG Birner G Kowallik P Schutze D Zwirner-Baier I (1993) Hemoglobin adducts of N-substituted aryl compounds in exposure control and risk assessment. *Environ Health Perspect* 99:65-69

97. Richter E Branner B (2002) Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J Chromatogr B* 778:49-62
98. Poirier MC Beland FA (1997) Aromatic amine DNA adduct formation in chronically-exposed mice: considerations for human comparison. *Mutat Res* 376:177-184
99. Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053-1074
100. Giese RW (1997) Detection of DNA adducts by electron capture mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 10:255-270
101. Wack RP Lien EL Taft D Roscelli JD (1997) Electrolyte composition of human breast milk beyond the early postpartum period. *Nutrition* 13:774-777
102. Koletzko B Rodriguez-Palmero M Demmelmair H Fidler N Jensen R Sauerwald T (2001) Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev* 65 Suppl:S3-S18
103. Jensen RG Lammi-Keefe CJ Koletzko B (1997) Representative sampling of human milk and the extraction of the fat for analysis of environmental lipophilic contaminants. *Toxicol Environ Chem* 62:229-247
104. Jensen RG (1996) The lipids in human milk. *Progr Lipid Res* 35:53-92
105. Lovelady CA Dewey KG Picciano MF Dermer A (2002) Guidelines for collection of human milk samples for monitoring and research of environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A* 65:1881-1891
106. McManaman JL Neville MC (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev* 55:629-641
107. Fleishaker JC (2003) Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Adv Drug Deliv Rev* 55:643-652
108. Agatonovic-Kustrin S Tucker IG Zecevic M Zivanovic LJ (2000) Prediction of drug transfer into human milk from theoretically derived descriptors. *Anal Chim Acta* 418:181-195
109. Luck W 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
110. LaKind JS Birnbach N Borgert CJ Sonawane BR Tully MR 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
111. Luck W Nau H (1984) Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. *Br J Clin Pharmacol* 18:9-15
112. Page-Sharp M Hale TW Hackett LP Kristensen JH Ilett KF (2003) Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 796:173-180
113. Dahlström A Lundell B Curvall M Thapper L (1990) Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand* 79:142-147

114. Becker AB Manfreda J Ferguson AC Dimich-Ward H Watson WT Chan-Yeung M (1999) Breast-feeding and environmental tobacco smoke exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153:689-691
115. Ilett KF Hale TW Page-Sharp M Kristensen JH Kohan R Hackett LP (2003) Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk. *Clin Pharmacol Ther* 74:516-524
116. Kidwell DA Holland JC Athanaselis S (1998) Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B* 713:111-135
117. Rantonen PJ Meurman JH (2000) Correlations between total protein, lysozyme, immunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. *Acta Odontol Scand* 58:160-165
118. Turner RJ Sugiya H (2002) Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis* 8:3-11
119. Rantonen PJ Meurman JH (1998) Viscosity of whole saliva. *Acta Odontol Scand* 56:210-214
120. Jusko WJ Milsap RL (1993) Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. *Ann NY Acad Sci USA* 694:36-47
121. Derendorf H Garrett ER (1987) *Pharmakokinetik - Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
122. Mucklow JC Bending MR Kahn GC Dollery CT (1978) Drug concentration in saliva. *Clin Pharmacol Ther* 24:563-570
123. Bentley MC Abrar M Kelk M Cook J Phillips K (1999) Validation of an assay for the determination of cotinine and 3-hydroxycotinine in human saliva using automated solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* 723:185-194
124. Phillips K Bentley MC Abrar M Howard DA Cook J (1999) Low level saliva cotinine determination and its application as a biomarker for environmental tobacco smoke exposure. *Hum Exp Toxicol* 18:291-296
125. Österdahl B-G (1990) The migration of tobacco-specific nitrosamines into the saliva of chewers of nicotine-containing chewing gum. *Food Chem Toxicol* 28:619-622
126. Cone EJ (1993) Saliva testing for drugs of abuse. *Ann NY Acad Sci USA* 694:91-127
127. Behrendorff I Steentoft A (2003) Medicinal and illegal drugs among Danish car drivers. *Accid Anal Prev* 35:851-860
128. Denovan LA Lu C Hines CJ Fenske RA (2000) Saliva biomonitoring of atrazine exposure among herbicide applicators. *Int Arch Occup Environ Health* 73:457-462
129. Lenander-Lumikari M Ihalin R Lähteenoja H (2000) Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. *Arch Oral Biol* 45:347-354
130. Baugh PJ (1997) *Gaschromatographie - Eine anwenderorientierte Darstellung*. Braunschweig/Wiesbaden, Germany: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsges.mBH

131. Duffield AM Budzikiewicz H Djerassi C (1965) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXII. A study of the fragmentation process of some tobacco alkaloids. *J Am Chem Soc* 87:2926-2932
132. Beckett AH Gorrod JW Jenner P (1971) A possible relation between pKa1 and lipid solubility and the amounts excreted in urine of some tobacco alkaloids given to man. *J Pharm Pharmacol* 24:115-120
133. Lützhof H-C Vaes WH Freidig AP Halling-Sorensen B Hermens JL (2000) 1-Octanol/water distribution coefficient of oxolinic acid: influence of pH and its relation to the interaction with dissolved organic carbon. *Chemosphere* 40:711-714
134. Needham LL Ryan JJ Fürst P (2002) Guidelines for analysis of human milk for environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A* 65:1893-1908
135. Ruiz-Gutiérrez V Pérez-Camino MC (2000) Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J Chromatogr A* 885:321-341
136. Jensen RG Lammi-Keefe CJ Koletzko B (1996) Representative sampling of human milk and the extraction of the fat for analysis of environmental lipophilic contaminants. *Toxicological and Environmental Chemistry* 62:229-247
137. Gentili S Torresi A Marsili R Chiarotti M Macchia T (2002) Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 780:183-192
138. Jacob P Wu S Yu L Benowitz NL (2000) Simultaneous determination of mecamylamine, nicotine, and cotinine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 23:653-661
139. Tyrpien K Wielkoszynski T Janoszka B Dobosz C Bodzek D Steplewski Z (2000) Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites. *J Chromatogr A* 870:29-38
140. Wu W Ashley DL Watson CH (2002) Determination of nicotine and other minor alkaloids in international cigarettes by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 74:4878-4884
141. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
142. Klus H Kuhn H (1982) Verteilung verschiedener Tabakrauchbestandteile auf Haupt- und Nebenstromrauch (Eine Übersicht). *Beitr Tabakforsch Int* 11:229-265
143. Carmella SG Borukhova A Desai D Hecht SS (1997) Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite. *Carcinogenesis* 18:587-592
144. Atawodi SE Lea S Nyberg F Mukeria A Constantinescu V Ahrens W Brueske-Hohlfeld I Fortes C Boffetta P Friesen MD (1998) 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:817-821

145. Branner B Kutzer C Zwickenpflug W Scherer G Heller W-D Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and non-smoking women. *Biomarkers* 3:35-47
146. Carmella SG Kagan SS Kagan M Foiles PG Palladino G Quart AM Quart E Hecht SS (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff-dippers, smokers, and non-smokers. *Cancer Res* 50:5438-5445
147. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts - aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin Investig* 72:364-371
148. Carmella SG Akerkar S Hecht SS (1993) Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res* 53:721-724
149. Meger M Meger-Kossien I Riedel K Scherer G (2000) Biomonitoring of environmental tobacco smoke (ETS)-related exposure to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Biomarkers* 5:33-45
150. Richter E (1996) Haemoglobin adducts of N-nitroso compounds. *Eur J Cancer Prev* 5:115-119
151. Burton HR Dye NK Bush LP (1992) Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue .1. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. *J Agric Food Chem* 40:1050-1055
152. Brunnemann KD Qi J Hoffmann D (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem Toxicol* 40:1699-1703
153. Piade JJ Hoffmann D (1980) Chemical studies on tobacco smoke LXVII. Quantitative determination of alkaloids in tobacco by liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 3:1505-1515
154. Jenkins RA Palausky A Counts RW Bayne CK Dindal AB Guerin MR (1996) Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J Expos Anal Environ Epidemiol* 6:473-502
155. Nelson PR Conrad FW Kelly SP Maiolo KC Richardson JD Ogden MW (1997) Composition of environmental tobacco smoke (ETS) from international cigarettes and determination of ETS-RSP: particulate marker ratios. *Environ Int* 23:47-52
156. Martin P Heavner DL Nelson PR Maiolo KC Risner CH Simmons PS Morgan WT Ogden MW (1997) Environmental tobacco smoke (ETS): a market cigarette study. *Environ Int* 23:75-90
157. Nelson PR Kelly SP Conrad FW (1998) Studies of environmental tobacco smoke generated by different cigarettes. *J Air & Waste Manage Assoc* 48:336-344
158. Nelson PR Conrad FW Kelly SP Maiolo KC Richardson JD Ogden MW (2000) Composition of environmental tobacco smoke (ETS) from international cigarettes - Part II: nine country follow-up. *Environ Int* 24:251-257
159. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and N'-nitrosornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl.1):R140

160. Teneggi V Squassante L Iavarone L Milleri S Bye A Gomeni R (2002) Correlation and predictive performances of saliva and plasma nicotine concentration on tobacco withdrawal-induced craving. *Br J Clin Pharmacol* 54:407-414
161. Glas S (2003) Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
162. Moors M Massart DL (1991) Evaluation of solid-phase extraction of basic drugs from human milk. *J Pharm Biomed Anal* 9:129-139
163. Rossi DT Wright DS (1997) Analytical considerations for trace determinations of drugs in breast milk. *J Pharm Biomed Anal* 15:495-504
164. Dmitrovic J Chan SC (2002) Determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry after sample clean-up by solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 778:147-155
165. Pufahl M (2004) Festphasen-Extraktion von Psilocin aus halluzinogenen Pilzen. *Inspirations Varian* :6-7
166. Ciolino LA Turner JA McCauley HA Smallwood AW Yi TY (1999) Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products. *J Chromatogr A* 852:451-463
167. Mullett WM Lai EPC Sellergren B (1999) Determination of nicotine in tobacco by molecularly imprinted solid phase extraction with differential pulsed elution. *Anal Commun* 36:217-220
168. Matuszewski BK Constanzer ML Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75:3019-3030
169. Jensen RG (1995) *Handbook of Milk Composition*. San Diego: Academic Press
170. Wilson JT Brown RD Cherek DR Dailey JW Hilman B Jobe PC Manno BR Manno JE Redetzki HM Stewart JJ (1980) Drug excretion in human breast milk: principles, pharmacokinetics and projected consequences. *Clin Pharmacokinet* 5:1-66
171. Oo CY Burgio DE Kuhn RC Desai N McNamara PJ (1995) Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios. *Pharm Res* 12:313-316
172. DeBruin LS Pawliszyn JB Josephy PD (1999) Detection of monocyclic aromatic amines, possible mammary carcinogens, in human milk. *Chem Res Toxicol* 12:78-82
173. DeBruin LS Martos PA Josephy PD (2001) Detection of PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine) in the milk of healthy women. *Chem Res Toxicol* 14:1523-1528
174. Noren K Sjobvall J (1987) Analysis of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in human milk by extraction with the lipophilic gel Lipidex 5000. *J Chromatogr* 422:103-115
175. Rogan WJ (1996) Pollutants in breast milk. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150:981-990

176. Schade G Heinzow B (1998) Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in Northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Sci Total Environ* 215:31-39
177. Patandin S Koopman-Esseboom C de Ridder MAJ Weisglas-Kuperus N Sauer PJJ (1998) Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr Res* 44:538-545
178. Dawes M Chowienczyk PJ (2001) Pharmacokinetics in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 15:819-826
179. Jensen RG Lammi-Keefe CJ Koletzko B (2001) Consumption of lipophilic contaminants in human milk by infants: quantities are usually incorrect. *Adv Exp Med Biol* 501:541-545
180. Dempsey D Jacob P Benowitz NL (2002) Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. *J Pharmacol Exp Ther* 301:594-598
181. Curvall M Elwin C-E Kazemi-Vala E Warholm C Enzell CR (1990) The pharmacokinetics of cotinine in plasma and saliva from non-smoking healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 38:281-287
182. Haeckel R (1993) Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. *Ann NY Acad Sci USA* 694:128-142
183. Rose JE Levin ED Benowitz N (1993) Saliva nicotine as an index of plasma levels in nicotine skin patch users. *Ther Drug Monit* 15:431-435
184. Benowitz NL Jacob P (1994) Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther* 56:483-493
185. Benowitz NL Jacob P Perez-Stable E (1996) CYP2D6 phenotype and the metabolism of nicotine and cotinine. *Pharmacogenetics* 6:239-242
186. Benowitz NL Jacob P (1993) Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetics in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 53:316-323
187. Zins BJ Sandborn WJ Mays DC Lawson GM Mckinney JA Tremaine WJ Mahoney DW Zinsmeister AR Hurt RD Offord KP Lipsky JJ (1997) Pharmacokinetics of nicotine tartrate after single-dose liquid enema, oral, and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 37:426-436
188. Gourlay SG Benowitz NL Forbes A Mcneil JJ (1997) Determinants of plasma concentrations of nicotine and cotinine during cigarette smoking and transdermal nicotine treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 51:407-414
189. Zwickenspflug W Tyroller S Richter E (2003) Metabolism of myosmine in rats. *Proc Am Ass Cancer Res* 44 (2nd ed.):80-81
190. Gorrod JW (1999) Biotransformation of nicotine in mammalian systems. in: *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*; Ch 3 pp 45-67; eds.: Gorrod JW Jacob P; Amsterdam: Elsevier Science B.V.

191. Hölzle D Schlöbe D Richter E Ostermeier-Hatz D von Meyer L Tricker AR (2003) 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (HPB)-releasing DNA adducts in lung, esophagus and cardia of sudden death victims. *Proc Am Ass Cancer Res* 44 (2nd ed.):1281-1282
192. Iijima K Grant J McElroy K Fyfe V Preston T McColl KEL (2003) Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers. *Carcinogenesis* 24:1951-1960
193. Iijima K Fyfe V McColl KEL (2003) Studies of nitric oxide generation from salivary nitrite in human gastric juice. *Scand J Gastroenterol* 38:246-252
194. Bollschweiler E Wolfgarten E Gutschow C Hölscher AH (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 92:549-555
195. Stein HJ Feith M Siewert JR (2000) Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol* 9:35-41
196. Mayne ST Navarro SA (2002) Diet, obesity and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans. *J Nutr* 132:3467S-3470S
197. Falk GW (2002) Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 122:1569-1591

7 Anhang

Einverständniserklärung A-1

Liebe Eltern,

wir gratulieren Ihnen zu Ihrem Kind und wünschen Ihnen und Ihrem Kind alles Gute!

Wir werden uns bemühen, den Aufenthalt im Krankenhaus so zu gestalten, dass es für Ihr Kind später keine Rolle mehr spielt, so früh zur Welt gekommen zu sein. Die Ernährung mit Muttermilch in diesem Zeitraum ist von besonderer Bedeutung. Die Muttermilch enthält Stoffe, welche für die Entwicklung des Kindes wichtig sind. Sie kann aber zudem Zusatzstoffe enthalten, welche je nach Lebensgewohnheiten der Mutter (Ernährung, Einnahme von Medikamenten, Genuss von Alkohol, usw.) variieren können. Auch diese Substanzen können an das Neugeborene weitergegeben werden.

Im Rahmen einer Pilotstudie über Inhaltstoffe in der Muttermilch wollen wir diese Zusatzstoffe in Abhängigkeit von der Lebensgewohnheit der Mutter untersuchen. Dabei interessieren uns in dieser Studie die Ernährungsgewohnheiten, sowie das Rauchverhalten. Die Auswirkungen der zu erwartenden Zusatzstoffe auf die menschliche Gesundheit sind noch nicht hinreichend erforscht. Derzeit gibt es keine Hinweise auf schädliche Wirkungen.

Sollten Sie im Rahmen des Milchabpumpens bereit sein, uns 20–30 mL Milch zu überlassen, ohne dabei die Ernährung Ihres Kindes zu beeinträchtigen, wären wir Ihnen sehr dankbar.

Um eine Einteilung der Proben vornehmen zu können, wäre es für uns sehr hilfreich, wenn Sie den beigefügten Fragebogen ausfüllen könnten. Alle Daten und Angaben werden natürlich streng vertraulich behandelt.

Diese Erklärung kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Konsequenzen für Ihr Kind widerrufen werden. Es entstehen Ihnen oder Ihrem Kind keine Nachteile, wenn Sie nicht an der Untersuchung teilnehmen. Bei offenen Fragen wenden Sie sich bitte jederzeit an Ihren Stationsarzt oder an die Studienbetreuer.

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich mich einverstanden an der Studie teilzunehmen

München, den _____
Unterschrift der Mutter

München, den _____
Unterschrift des Stationsarztes

Studienbetreuung:

Prof. Dr. E. Richter, Walther Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Nußbaumstraße 26, 80336 München, Tel.: 089-5160-7216

Protokoll A-2**Milchaufbereitung**

| Datum | Probe | Beschreibung |
|-------|-------|--------------|
| | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |

Milch nach auftauen auf 38-40 °C erwärmen und in Glasgefäß, auch ca. 40°C; gut mischen

| Vorgang | soll | Probe | | | |
|-------------------------------------|--|-------|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Probe abfüllen | 10 ml | | | | |
| ISTD zusetzen | d ₄ -Myosmin u. d ₃ -Cotinin | | | | |
| rühren | 15 min | | | | |
| Konz H ₂ SO ₄ | 2 ml | | | | |
| rühren H+P poly 15 / 650 rpm | über Nacht | Start | | | |
| | | Ende | | | |
| 2 Std. Trockenschrank 50°C | | | | | |

Probenvorbereitung

Milch wieder auf 38-40 °C erwärmen, Fett vom Rührfisch lösen, dann umfüllen

| | | | | | |
|--|--------------------|--|--|--|--|
| Umfüllen in Zentrifugenröhrchen | | | | | |
| Zentrifugieren RC5C / Rotor SS-34 | 20000 rpm / 10 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| wässrige Phase waschen | | | | | |
| Hexan:Diethylether (p.a.) v/v 90:10 | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| DCM (p.a.) | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |

| SPE | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|--|--|--|
| C-18 Bond Elut Säule 500 mg | | | | | |
| Konditionieren je 1 Vol. | MeOH (Supra Solv) / H ₂ O | | | | |

| | | | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|--|--|
| Probe über C-18 Säule Durchgang auffangen | | | | | |
| pH einstellen >9 | 4 N NaOH | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 5 min | | | | |
| SPE | | | | | |
| OASIS HLB Säule 500 mg | | | | | |
| Konditionieren je 1 Vol. | MeOH (Supra Solv) / H ₂ O | | | | |
| Probe über HLB Säule | | | | | |
| Durchgang verwerfen | | | | | |
| Eluieren mit MeOH: H ₂ O (S.S.) 90:10 | 3mL | | | | |
| Unter N ₂ MeOH abblasen | Alublock ca. 50°C | | | | |
| Rest Wasser mit DCM extrahieren (Supra Solv) | 2 x 500µL | | | | |
| DCM unter N ₂ (40°C) reduzieren | ca. 50 µL | | | | |
| Zugabe von Hexan (Supra Solv) | 1000 µL | | | | |
| Hexan unter N ₂ (50°C) reduzieren | 25 µL | | | | |

| | | | | | |
|------------------------|------|--|--|--|--|
| GC-MS | | | | | |
| Einspritzvolumen in GC | 1 µl | | | | |

| Probe | GC file | MS file |
|-------|---------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Bemerkung

| |
|--|
| |
|--|

| |
|------------------------------|
| Bestimmung Fettgehalt |
|------------------------------|

| | |
|---------------|------------------------|
| Milchvolumen: | 50 μ L |
| Rotor | 9200 rpm /12 min |
| Auswertung : | mit Schublehre ablesen |

| Röhrchen | L ges (mm) | L Fett (mm) | Gehalt (%) |
|------------|------------|-------------|------------|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | | | |
| Mittelwert | | | _____ |
| STABW | | | _____ |
| S.D. (%) | | | _____ |

pH – Wert: _____

Auswertung

Files: _____

Protokoll A-3**Plasmaaufbereitung**

| Datum | Probe | Beschreibung |
|-------|-------|--------------|
| | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |

| Vorgang | Probe | | | | |
|-------------------------------------|--|-------|---|---|---|
| | soll | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Probe abfüllen | 10 ml | | | | |
| ISTD zusetzen | d ₄ -Myosmin u. d ₃ -Cotinin | | | | |
| rühren | 15 min | | | | |
| Konz H ₂ SO ₄ | 2 ml | | | | |
| rühren H+P poly 15 / 650 rpm | über Nacht | Start | | | |
| | | Ende | | | |
| 2 Std. Trockenschrank 50°C | | | | | |

Probenvorbereitung

| | | | | | |
|--|--------------------|--|--|--|--|
| Umfüllen in Zentrifugenröhrchen | | | | | |
| Zentrifugieren RC5C / Rotor SS-34 | 20000 rpm / 10 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| wässrige Phase waschen | | | | | |
| Hexan:Diethylether (p.a.) 90:10 | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| DCM (p.a.) | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 sek | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |

| SPE | | | | | |
|---|--------------------------------------|--|--|--|--|
| C-18 Bond Elut Säule 500 mg | | | | | |
| Konditionieren je 1 Vol. | MeOH (Supra Solv) / H ₂ O | | | | |
| Probe über C-18 Säule Durchgang auffangen | | | | | |
| pH einstellen >9 | 4 N NaOH | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 5 min | | | | |
| SPE | | | | | |
| OASIS HLB Säule 500 mg | | | | | |
| Konditionieren je 1 Vol. | MeOH (Supra Solv) / H ₂ O | | | | |
| Probe über HLB Säule | | | | | |
| Durchgang verwerfen | | | | | |
| Eluieren mit MeOH: H ₂ O (S.S) 90:10 | 3 mL | | | | |
| Unter N ₂ MeOH abblasen | Alublock ca. 50°C | | | | |
| Rest Wasser mit DCM extrahieren (S.S) | 2 x 800µL | | | | |
| DCM unter N ₂ (40°C) reduzieren | ca. 50 µL | | | | |
| Zugabe von Hexan (Supra Solv) | 1000 µL | | | | |
| Hexan unter N ₂ (50°C) reduzieren | 25 µL | | | | |

| GC-MS | | | | | |
|------------------------|------|--|--|--|--|
| Einspritzvolumen in GC | 1 µL | | | | |

| Probe | GC file | MS file |
|--------------|----------------|----------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Bemerkung

| |
|--|
| |
|--|

Protokoll A-4**Speichelaufbereitung**

| Datum | Probe | Beschreibung |
|-------|-------|--------------|
| | 1 | |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |

Mundstücke von 4-6 Salivetten nacheinander kauen. Danach bei 4500 rpm für 10 min zentrifugieren. Volumen mit Reagenzglas mit 20 mL- Skalierung bestimmen. pH-Wert bestimmen, dann mit Wasser auf 5 mL auffüllen.

| Vorgang | | Probe | | | |
|-------------------------------------|--|-------|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | soll | | | | |
| Volumen Bestimmen | ml | | | | |
| pH Wert | | | | | |
| ISTD zusetzen | d ₄ -Myosmin u. d ₃ -Cotinin | | | | |
| rühren | 15 min | | | | |
| Konz H ₂ SO ₄ | 2 ml | | | | |
| rühren H+P poly 15 / 650 rpm | über Nacht Start Ende | | | | |

Probenvorbereitung

| | | | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|--|--|
| Umfüllen in Zentrifugenröhrchen | | | | | |
| Zentrifugieren RC5C / Rotor SS-34 | 20000 rpm / 10 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| wässrige Phase waschen | | | | | |
| Hexan:Diethylether (p.a.) v/v 90:10 | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| DCM (p.a.) | 10 mL | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 2 min | | | | |
| wässrige Phase mit Pasteurpipette abziehen | | | | | |
| pH einstellen >9 | 4 N NaOH | | | | |
| vortexen | 2 x 30 Sek. | | | | |
| Zentrifugieren Minifuge GL | 4000 rpm / 5 min | | | | |
| SPE | | | | | |
| OASIS HLB Säule 500 mg | | | | | |
| Konditionieren je 1 Vol. | MeOH (Supra Solv) / H ₂ O | | | | |

| | | | | | |
|---|-------------------|--|--|--|--|
| Probe über HLB Säule | | | | | |
| Durchgang verwerfen | | | | | |
| Eluieren mit MeOH: H ₂ O (Supra Solv) 90:10 | 3 mL | | | | |
| Unter N ₂ MeOH abblasen | Alublock ca. 50°C | | | | |
| Rest Wasser mit DCM extrahieren (Supra Solv) | 2 x 500µL | | | | |
| DCM unter N ₂ (40°C) reduzieren | ca. 50 µL | | | | |
| Zugabe von Hexan (S.S.) | 1000 µL | | | | |
| Hexan unter N ₂ (50°C) reduzieren | 25 µL | | | | |

| GC-MS | | | | | |
|------------------------|------|--|--|--|--|
| Einspritzvolumen in GC | 1 µL | | | | |

| Probe | GC file | MS file |
|--------------|----------------|----------------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Bemerkung

Auswertung

Files: _____

Fragebogen Muttermilchstudie A-5**Fragebogen**

Alle Angaben werden streng vertraulich behandelt! Bitte Zutreffendes ankreuzen. Für zusätzliche Informationen wären wir Ihnen sehr dankbar.

Name:**Datum:****Alter der Mutter (Jahre):****Proben Nr.:****Alter des Kindes:****Volumen (mL):****Ernährungsgewohnheiten**

| | |
|-----------------|---|
| Gemüse | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Kohlenhydrate | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Milchprodukte | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Obst | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Fleischprodukte | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| Nüsse | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| Schokolade | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |

RaucherstatusRaucher Ja, seit: _____ Nein: Aufgehört seit : _____Wenn Ja: _____ Zigaretten/TagRauchverhalten während der Schwangerschaft: während der Schwangerschaft _____ Zigaretten/Tag in der Stillzeit _____ Zigaretten/Tag

Letzter Zigarette vor dem Stillen _____ (Std. / min)

Wenn Nein:Passivrauchbelastung zu Hause am Arbeitsplatz

Fragebogen Speichelstudie A-6**Fragebogen**

Alle Angaben werden streng vertraulich behandelt! Bitte Zutreffendes ankreuzen. Für zusätzliche Informationen wären wir Ihnen sehr dankbar.

Geschlecht.:**Alter:****Datum:****Probenahme:****Zeit:****Zeitpunkt der letzten Mahlzeit:****Ernährungsgewohnheiten**

| | |
|-----------------|---|
| Gemüse | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Kohlenhydrate | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Milchprodukte | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Obst | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| | Davon besonders: |
| Fleischprodukte | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| Nüsse | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |
| Schokolade | täglich <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Woche <input type="checkbox"/> 1-2 mal / Monat <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> |

Raucherstatus

Raucher Ja, seit: _____ Nein:

Aufgehört seit: _____

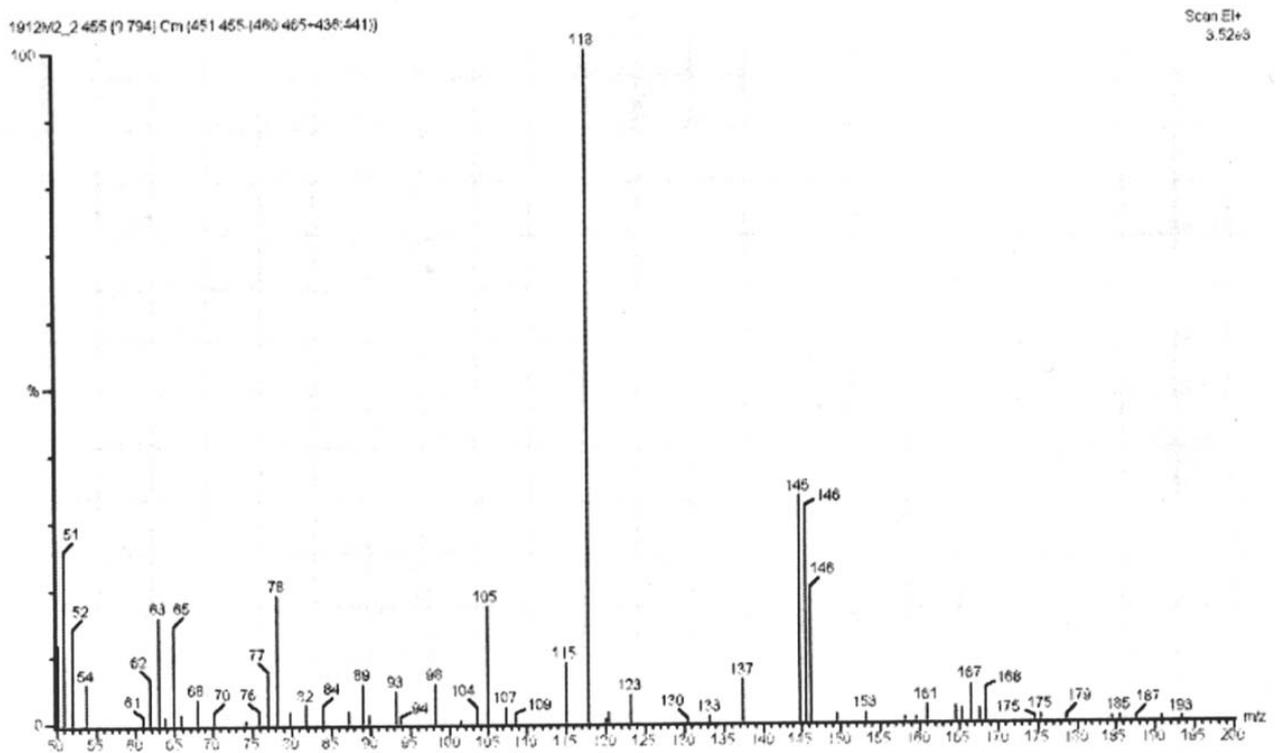
Wenn Ja: _____ Zigaretten/Tag

Wenn Nein:

Passivrauchbelastung

zu Hause

am Arbeitsplatz

Abbildung A-7

Original Fragmentationsverhältnisse von Myosmin in Muttermilch, aus Laborbuch eingescannt, da gesichertes Datenfile nicht zu bearbeiten war. Abbildung 3-8 wurde entsprechend dieser Vorlage mit Microsoft Powerpoint erstellt.

Tabelle A1: Bestimmung der Wiederholbarkeit; Vermessen einer Myosmin Standardlösung der Konzentration 0,625 ng/µL. N=6, Berechnung des Fragmentationsverhältnisses (m/z 146) / (m/z 118)

| Messung | Fläche (m/z 118) | Menge (ng) | Retentionszeit |
|---------|------------------|------------|----------------|
| 1 | 12234603 | 0,64 | 9,455 |
| 2 | 11622721 | 0,61 | 9,443 |
| 3 | 11398549 | 0,60 | 9,455 |
| 4 | 12609947 | 0,66 | 9,420 |
| 5 | 11078239 | 0,58 | 9,432 |
| 6 | 12380152 | 0,65 | 9,408 |
| MW | 11887369 | 0,625 | |

| Messung | Fläche (m/z 146) | Menge (ng) | m/z 146/118 |
|---------|------------------|------------|-------------|
| 1 | 5984308 | 0,69 | 0,49 |
| 2 | 5646420 | 0,65 | 0,49 |
| 3 | 5276143 | 0,61 | 0,46 |
| 4 | 5853356 | 0,68 | 0,46 |
| 5 | 5232674 | 0,61 | 0,47 |
| 6 | 5785968 | 0,67 | 0,47 |
| MW | 5629812 | 0,652 | |

Tabelle A2: Kalibrierkurve durch Vermessen einer Standardverdünnung von Myosmin (Fläche 1)

| Konz (pg/µL) | Fläche 1 Myosmin (m/z 118) | Konz (pg/µL) | Fläche 1 Myosmin (m/z 118) |
|--------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|
| 20,0 | 125798 | 200,0 | 715943 |
| 40,0 | 179089 | 400,0 | 1758371 |
| 60,0 | 279648 | 600,0 | 2584758 |
| 80,0 | 306035 | 800,0 | 3695768 |
| 100,0 | 376066 | 1000,0 | 4534687 |

Tabelle A3: Kalibrierkurve durch Vermessen einer Standardverdünnung von Myosmin (Fläche 1) mit Zusatz einer konstanten Konzentration von 0,963 ng/mL an d₄ Myosmin (Fläche 2)

| Konz (ng/µL) | Fläche 1: Myosmin (m/z 118) | Fläche 2: d ₄ -Myosmin (m/z 122) | Korrektur Myosmin mit d ₄ -Myosmin |
|--------------|-----------------------------|---|--|
| 0,137 | 429416 | 3066059 | 429416 |
| 0,273 | 853253 | 3310812 | 790161 |
| 0,547 | 1969635 | 3130142 | 1929274 |
| 1,094 | 4081678 | 3305561 | 3785870 |
| 2,188 | 9484831 | 3179385 | 9146578 |
| 4,375 | 16031420 | 2403355 | 20451550 |

Tabelle A4: Kalibrierkurve durch Vermessen von Standardverdünnungen mit identischen Konzentrationen an Myosmin (Fläche 1) und d₄ Myosmin (Fläche 2)

| Konz (ng/µL) | Fläche 1: Myosmin (m/z 118) | Fläche 2: d ₄ -Myosmin (m/z 122) |
|--------------|-----------------------------|---|
| 0,02 | 39661 | 39521 |
| 0,08 | 551909 | 486674 |
| 0,20 | 2623218 | 2366977 |
| 0,60 | 10847630 | 9872301 |
| 1,00 | 19973350 | 17888240 |
| 2,00 | 38026500 | 33978790 |

Tabelle A5: Wiederfindung von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin nach durchlaufen eines Analysenganges aus Muttermilch bei einer zugesetzten Menge von 10 ng zu 10 mL gepoolter Probe.

| d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | | d ₃ -Cotinin (m/z 101) | |
|-----------------------------------|---------|----------------|-----------------------------------|---------|
| Messung | Fläche | Retentionszeit | Messung | Fläche |
| 1 | 1217972 | 10,204 | 1 | 1217972 |
| 2 | 1622676 | 10,230 | 2 | 1622676 |
| 3 | 1306632 | 10,195 | 3 | 1306632 |
| 4 | 1789649 | 10,212 | 4 | 1789649 |
| 100% | 2271571 | 10,212 | 100% | 2271571 |

Tabelle A6: Kalibrierkurve von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin erstellt mittels Doppelbestimmung nach durchlaufen eines Analysenganges, Probenvolumen 10 mL Muttermilch.

| ng/mL | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | d ₃ -Cotinin (m/z 101) | |
|-------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|
| | Fläche1 | Fläche 2 | Fläche1 | Fläche 2 |
| 0,125 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 0,25 | 511743 | 232066 | n.d. | n.d. |
| 0,50 | 1085660 | 1140876 | 1173158 | 1291207 |
| 1,00 | 2508761 | 1787124 | 1998281 | 2105147 |
| 2,50 | 4900654 | 5295851 | 7336654 | 7005494 |
| 5,00 | 15369020 | 12625000 | 14905630 | 13230010 |
| 10,00 | 32023300 | 27475540 | 38978750 | 35376500 |

Tabelle A7: Ansatz Probenpool 120 mL Muttermilch, 20 ng d₄-Myosmin und d₃-Cotinin je 10 mL.

| Messung | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | Tagesstandard |
|---------|-----------------------------------|----------------|---------------|
| | Fläche | normiert auf 1 | Fläche |
| 1 | 4094850 | 1,03 | 3983570 |
| 2 | 4215282 | 0,99 | 4260154 |
| 3 | 2510769 | 1,02 | 2463796 |
| 4 | 2892687 | 1,08 | 2681299 |
| 5 | 2156633 | 0,86 | 2493816 |
| 6 | 1796014 | 0,52 | 3432216 |
| 7 | 2261030 | 0,51 | 4411991 |
| 8 | 1321592 | 0,40 | 3342743 |
| 9 | 2435999 | 0,70 | 3492841 |
| 10 | 1908998 | 0,50 | 3846736 |

Tabelle A8: Wiederfindung von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin nach durchlaufen eines Analysenganges aus Speichel bei einer zugesetzten Menge von 2 ng zu 2 mL gepoolter Probe

| Messung | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | d ₃ -Cotinin (m/z 101) | |
|---------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| | Fläche | Retentionszeit | Fläche | Retentionszeit |
| 1 | 776316 | 9,725 | 2258154 | 12,784 |
| 2 | 831546 | 9,719 | 2236269 | 12,784 |
| 3 | 902730 | 9,719 | 2296011 | 12,778 |
| 4 | 910240 | 9,719 | 2051279 | 12,784 |
| 5 | 877593 | 9,725 | 1457312 | 12,784 |
| 100% | 1116474 | 9,725 | 3433008 | 12,784 |

Tabelle A9: Kalibrierkurve von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin erstellt mittels Doppelbestimmung nach durchlaufen eines Analysenganges, Probenvolumen 2 mL Speichel.

| ng/mL | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | d ₃ -Cotinin (m/z 101) | |
|-------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|
| | Fläche1 | Fläche 2 | Fläche1 | Fläche 2 |
| 0,125 | 337217 | 213401 | 639962 | 622190 |
| 0,25 | 411220 | 410551 | 770118 | 807335 |
| 0,50 | 809183 | 740354 | 1574256 | 1653525 |
| 1,00 | 1126720 | 1196103 | 2637641 | 2720166 |
| 2,00 | 1766017 | 1662629 | 4975047 | 4309559 |
| 5,00 | 5077790 | 5546955 | 13350010 | 14837540 |

Tabelle A10: Berechnung der Tagesschwankungen durch Vermessen von je 3 Proben an 3 Tagen. Ansatz Probenpool 18 mL Speichel, 2 ng d₄-Myosmin und d₃-Cotinin je 2mL Probenvolumen.

| Messung | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | Tagesstandard |
|---------|-----------------------------------|----------------|---------------|
| | Fläche | normiert auf 1 | |
| 1-1 | 770595 | 0,66 | 11697640 |
| 1-2 | 886822 | 0,76 | |
| 1-3 | 932285 | 0,80 | |
| 2-1 | 958083 | 0,82 | 19367180 |
| 2-2 | 1079130 | 0,92 | |
| 2-3 | 1001781 | 0,86 | |
| 3-1 | 1424769 | 0,74 | 19367180 |
| 3-2 | 1499752 | 0,77 | |
| 3-3 | 1463853 | 0,76 | |

Tabelle A11: Wiederfindung von d₄-Myosmin und d₃-Cotinin nach durchlaufen eines Analysenganges aus Plasma bei einer zugesetzten Menge von 4 ng zu 2 mL gepoolter Probe

| Messung | d ₄ -Myosmin (m/z 122) | | d ₃ -Cotinin (m/z 101) | |
|---------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| | Fläche | Retentionszeit | Fläche | Retentionszeit |
| 1 | 2114859 | 9,989 | 4267429 | 13,132 |
| 2 | 2030735 | 9,995 | 4917548 | 13,138 |
| 3 | 2154467 | 9,989 | 4914949 | 13,132 |
| 100% | 2217686 | 9,983 | 6500366 | 13,126 |

Tabelle A12: Ergebnisse Muttermilchproben

| Messung | Myosmin | | | Cotinin | | |
|------------------------|------------|------------|-------------|------------------------|------------|--------------|
| | Ergebnis 1 | Ergebnis 2 | Mittelwert | Ergebnis 1 | Ergebnis 2 | Mittelwert |
| Nichtraucherin | | | | Nichtraucherin | | |
| 1 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 2 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 3 | 0,20 | 0,23 | 0,22 | n.d. | n.d. | |
| 4 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 5 | 0,23 | 0,20 | 0,22 | n.d. | n.d. | |
| 6 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 7 | 0,20 | 0,23 | 0,22 | n.d. | n.d. | |
| 8 | 0,46 | 0,47 | 0,47 | n.d. | n.d. | |
| 9 | 0,32 | 0,38 | 0,35 | n.d. | n.d. | |
| 10 | 0,15 | 0,23 | 0,19 | n.d. | n.d. | |
| 11 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 12 | 0,31 | 0,31 | 0,31 | n.d. | n.d. | |
| 13 | 0,23 | 0,24 | 0,24 | n.d. | n.d. | |
| 14 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 15 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 16 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 17 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| Passivraucherin | | | | Passivraucherin | | |
| 18 | 0,24 | 0,15 | 0,20 | 5,26 | 4,91 | 5,09 |
| 19 | n.d. | n.d. | | 0,66 | 0,68 | 0,67 |
| 20 | 0,59 | 0,57 | 0,58 | n.d. | n.d. | |
| 21 | 0,41 | 0,25 | 0,33 | 0,76 | 0,82 | 0,79 |
| 22 | 0,33 | 0,32 | 0,33 | n.d. | n.d. | |
| Raucherin | | | | Raucherin | | |
| 23 | 1,41 | 1,26 | 1,34 | 96,99 | 97,25 | 97,12 |

Tabelle A13: Ergebnisse Diätversuch

| Messung | Myosmin | | | Cotinin | | |
|---------|------------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------|
| | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW |
| 1 | 1,73 | 1,76 | 1,75 | n.d. | n.d. | |
| 2 | 2,41 | 2,58 | 2,50 | n.d. | n.d. | |
| 3 | 0,52 | 0,47 | 0,50 | 1,06 | 1,03 | 1,05 |
| 4 | n.d. | n.d. | | 0,88 | 0,89 | 0,88 |
| 5 | 1,13 | 1,76 | 1,45 | 1,37 | 1,44 | 1,40 |
| 6 | 1,14 | 1,34 | 1,24 | 0,74 | 0,69 | 0,72 |
| 7 | 0,78 | 0,67 | 0,72 | n.d. | n.d. | |
| 8 | 0,65 | 0,67 | 0,66 | n.d. | n.d. | |
| 9 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 10 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 11 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 12 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |

Tabelle A14: Ergebnisse Speichelproben

| Messung | Myosmin | | | Cotinin | | |
|----------------------|------------|-----------|-------------|------------|-----------|---------------|
| | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW |
| Nichtraucher | | | | | | |
| 1 | n.d | n.d | | 0,79 | 0,84 | 0,81 |
| 2 | n.d | n.d | | 1,36 | 1,37 | 1,37 |
| 3 | 3,35 | 3,57 | 3,46 | 1,00 | 1,03 | 1,02 |
| 4 | 3,12 | 3,21 | 3,16 | 0,88 | 0,86 | 0,87 |
| 5 | 3,29 | 3,45 | 3,37 | 0,75 | 0,60 | 0,68 |
| 6 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 7 | n.d. | n.d. | | n.d. | n.d. | |
| 8 | 2,10 | 2,16 | 2,13 | 0,79 | 0,84 | 0,81 |
| 9 | n.d | n.d | | n.d. | n.d. | |
| 10 | n.d | n.d | | n.d. | n.d. | |
| 11 | 3,36 | 3,41 | 3,39 | n.d. | n.d. | |
| 12 | 1,98 | 2,10 | 2,04 | n.d. | n.d. | |
| 13 | 1,57 | 1,56 | 1,57 | n.d. | n.d. | |
| 14 | 5,31 | 5,34 | 5,33 | n.d. | n.d. | |
| Passivraucher | | | | | | |
| 15 | 1,33 | 1,38 | 1,36 | n.d. | n.d. | |
| 16 | 1,55 | 1,71 | 1,63 | 3,48 | 3,53 | 3,50 |
| Raucher | | | | | | |
| 17 | 2,67 | 2,67 | 2,67 | 72,36 | 72,54 | 72,45 |
| 18 | 1,02 | 1,03 | 1,03 | 10,33 | 10,38 | 10,36 |
| 19 | 2,38 | 1,06 | 1,72 | 57,95 | 56,83 | 57,39 |
| 20 | 0,89 | 1,08 | 0,99 | 100,50 | 101,30 | 100,90 |
| 21 | 1,28 | 1,35 | 1,31 | 56,48 | 55,70 | 56,09 |
| 22 | 3,42 | 3,55 | 3,49 | 130,46 | 133,99 | 132,23 |

Tabelle A15: Ergebnisse Speichel- und Plasmauntersuchungen (D=Doppelbestimmung, E=Einzelbestimmung)

| Messung | Myosmin | | | Cotinin | | |
|---------------|------------|-----------|-------------|------------|-----------|----|
| | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW | Ergebnis 1 | Ergebnis2 | MW |
| Speichel (D) | 4,93 | 3,99 | 4,46 | n.d. | n.d. | |
| Plasma (D) | 5,35 | 5,78 | 5,56 | n.d. | n.d. | |
| Speichel (E) | 1,89 | | 1,89 | n.d. | | |
| Plasma (E) | 1,48 | | 1,48 | n.d. | | |

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die jederzeit vorhandene Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem kommissarischen Vorstand des Institutes, Herrn Professor Dr. P. Eyer, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Wolfgang Zwickelpflug danke ich für die anfängliche Einführung in die GC-MS Analytik, sowie die unterhaltsamen Gespräche über Flora und Fauna des Münchner Umlands.

Bei Frau Christiana Oehlmann möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag bedanken, bei Kerstin Gaber für die gemeinsamen Mittagspausen, die Übermittlung von „News“ und die kritische Betrachtung von nicht immer wissenschaftlichen Themen.

Herzlicher Dank gilt allen meinen Kollegen in Arbeitskreis, die mit ihrer Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und ihrem Humor stets für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten. Hier möchte ich mich insbesondere bei Herrn Daniel Hölzle bedanken, der, während seiner Zeit am Institut, immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der größte Dank gilt meiner Familie, ganz besonders natürlich meinen Eltern und meiner Freundin, die mir stets helfend zur Seite standen und mich immer liebevoll begleitet haben.

Lebenslauf

| | | |
|------------------------------|--------------------------|---|
| Name | | Maier |
| Vorname | | Manuel |
| Geboren am | 19.09.1972 | in München |
| <u>Schule:</u> | 1979-1983 | Winthir-Grundschule in München |
| | 1983-1992 | Rupprecht-Gymnasium in München |
| | | Beendet mit Allgemeiner Hochschulreife |
| <u>Zivildienst:</u> | Sept. 1992- Nov. 1993 | Zivildienst bei der Heilpädagogischen Tagesstätte des Caritasverbandes für geistig behinderte Kinder |
| <u>Studium:</u> | 1994-1998 | Studium der Pharmazie an der LMU München |
| | 1998 | 2. Staatsexamen Pharmazie |
| | 1998-1999 | Praktisches Jahr in der Rondell Apotheke und bei der Firma Hexal |
| | 2000 | 3. Staatsexamen Pharmazie Approbation zum Apotheker |
| <u>Berufliche Tätigkeit:</u> | Aug. 2000- Dez. 2001 | beschäftigt bei IDEA Ag, Frankfurter Ring 193a |
| <u>Promotion:</u> | ab Jan 2002 | Anfertigen einer experimentellen Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Richter am Walther-Staub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München |