Deutsches Krebsforschungszentrum

Stiftung des öffentlichen Rechts

Untersuchungen zur Risikobeurteilung von Schnupftabak

Dr. B. Pfundstein

Betreuung: Prof. Dr. R. Preussmann / Dr. B. Spiegelhalder

Forschungsschwerpunkt Krebsrisikofaktoren und Krebsprävention

Abteilung Umweltcarcinogene (0325)

Untersuchungszeitraum: Januar 1993 - August 1993

Zusammenfassung

Verbindungen, die eine Bedeutung für ein mögliches Krebsrisiko von Schnupftabak besitzen, stellen die tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) dar, insbesondere NNN (N-Nitrosonornikotin) und NNK (4-Methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon). Der mittlere TSNA-Gehalt der untersuchten deutschen Schnupftabakproben (n = 8) beträgt 2.5 mg/kg NNN, 0.6 mg/kg NNK und 1.1 mg/kg NAT/NAB (N-Nitrosoanatabin/N-Nitrosoanabasin). Die tägliche Aufnahme der TSNA bei Gebrauch von Schnupftabak ist ähnlich der Exposition von Rauchern (20 Zigaretten /Tag), wenn vergleichbare Nikotinmengen pro Tag zugrunde gelegt werden. Allerdings können durch das Fehlen der Stickoxid- und Kohlenmonoxidexposition als wesentlich limitierenden Faktoren des Rauchens bei dem Konsum von Schnupftabak wesentlich höhere Nikotin- und damit auch TSNA Mengen aufgenommen werden. Das Nasengewebe als primärer Expositionsort bei der Verwendung von Schnupftabak enthält ein Enzymsystem, das die Nitrosamine zu den eigentlichen, im Tierversuch wirksamen Carcinogenen metabolisiert. Neuere Studien zeigen eine Inhibierung des Enzymsystems durch einen Überschuß an Nikotin, der im Tabak vorhanden ist. Inwieweit dies auch auf den Nitrosaminmetabolismus in der menschlichen Nasenschleimhaut zutrifft, ist noch unbekannt. Im Gegensatz zum Zigaretten- und Mundtabakkonsum existieren bisher keine eindeutigen epidemiologischen Studien zur Korrelation zwischen der nasalen Anwendung von Schnupftabak und der Entstehung von Krebs. Somit kann eine Krebsentstehung durch Verwendung von Schnupfttabak zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder ausgeschlossen noch belegt werden.

Summary

Tobacco specific nitrosamines (TSNA), especially N-nitrosonornicotine (NNN) and 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone-(NNK) are the major risk factors in carcinogenesis of nasal snuff. The mean concentrations of TSNA in the analysed nasal snuff samples from Germany (n = 8) are 2.5 mg/kg NNN, 0.6 mg/kg NNK and 1.1 mg/kg NAT/NAB (N-nitrosoanatabine / N-nitrosoanabasine), respectively. Risk evaluation based on an equal amount of nicotine uptake showed similar TSNA exposure of nasal snuff users as compared to cigarette smokers (20 cigarettes/day). In contrast to smokers nasal snuff users are not exposed to factors limiting the tobacco consumption like nitrogen oxide or carbon monoxide and therefore can take up much higher levels of nicotine and consequently of TSNA. The enzyme system, responsible for the metabolism of TSNA to ultimate carcinogens, is widespread in the nasal tissue. Recent studies show an inhibiting effect of nicotine on the enzyme system but the relevance for human nasal cavity is not known yet. In contrast to smokers and users of other smokeless tobacco like oral snuff there are no epidemiological studies with a correlation of nasal snuff use and cancer in the area of interest (western countries). Thus a cancer risk from the use of nasal snuff can neither be excluded nor proved at present .

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeines 3

2. Carcinogene Verbindungen im Snuff 3

3. Bildung der TSNA 4

4. Carcinogenität der TSNA 5

5. Gehalte von nicht-flüchtigen und flüchtigen Nitrosaminen in Snuff aus der Literatur und den untersuchten Schnupftabakproben 6

6. TSNA-Gehalte der untersuchten Schnupftabakproben im Vergleich mit Daten aus der Literatur 10

7. Aufnahme der TSNA über Snuff 16

7.1. Nasale Absorption von Nikotin 16

7.2. Berechnungen zur Aufnahme der TSNA über Schnupftabak 17

7.3. Vergleich mit Aufnahmedaten aus der Literatur 20

8. Metabolismus der TSNA unter dem Aspekt der nasalen Applikation 21

9. Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf ein mögliches Krebsrisiko 25

10. Analytik 28

10.1. Vorbereitung der Proben 28

10.2. Analytik der tabakspezifischen Nitrosamine 28

10.3. Bestimmung der nicht-flüchtigen Nitrosamine 29

10.4. Nitrat/Nitrit-Bestimmung 30

11. Literatur 31

1. Allgemeines

Schnupftabak ist ein rauchloses Tabakprodukt, das in der Nase angewendet wird. Die englische Übersetzung für Schnupftabak, die auch im Deutschen verwendet wird, ist Snuff. Im englischen und schwedischen Sprachraum versteht man unter dem Begriff "Snuff" meist Mundtabak, auch "oral snuff", genannt, da die Verwendung von Schnupftabak oder "nasal snuff" in den entsprechenden Ländern so gut wie nicht verbreitet ist. Eine weitere Unterscheidung in der Verwendung des Begriffs Snuff bezieht sich auf den Feuchtigkeitsgehalt der rauchlosen Tabake. Die sogenannten "moist snuffs" besitzen meist einen Feuchtigkeitsgehalt zwischen 20-50%, während der "dry snuff" zwischen 4-6% Feuchtigkeit enthält (Brunnemann *et al.* 1987). Moist und dry Snuff können als Mundtabak verwendet werden, wobei hierbei der Tabak zwischen Unterlippe und Zahnfleisch, oder zwischen Zahnfleisch und Mundschleimhaut geklemmt wird und bis zu einer halben Stunde dort verbleibt. Diese orale Anwendung des Snuffs wird als "snuff dipping" bezeichnet. In England und Deutschland ist dagegen eine Verwendung des Snuffs in der Nase ("sniffing") üblich. Dabei wird eine Prise Schnupftabak in die Nase eingeführt und nach kurzer Verweildauer von ca. 3-5 min. über ein Taschentuch wieder entfernt.

Je nach Herstellungsland besitzen die Snuffsorten sehr unterschiedliche Zusammensetzung. In Europa wird hauptsächlich gebeizter Tabak, der mit Aromastoffen versetzt wird, hergestellt. Sonnengetrockneter Tabak mit pulverisiertem, gelöschtem Kalk (Khaini tobacco) wird in Indien und Saudi Arabien, sonnengetrockneter Tabak mit Asche verschiedener Pflanzen in Afrika, und fermentierter Tabak mit gelöschtem Kalk, Asche oder Öl in Afghanistan, der UdSSR und im Iran verwendet (Brunnemann *et al.* 1987).

2. Carcinogene Verbindungen im Snuff

Die meisten Untersuchungen über Snuff erstrecken sich auf den amerikanischen Markt und den dort erhältlichen "dry" und "moist" Snuff. Carcinogene Verbindungen, die im Snuff identifiziert wurden, sind polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, ^{210}Po, flüchtige Aldehyde, wie Formaldehyd, Acetaldehyd und Crotonaldehyd, sowie N-Nitrosoverbindungen (Hoffmann *et al.* 1987; Hoffmann *et al.* 1986).

An polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen konnten Hoffmann *et al.* (1987) in moist Snuff im Mittel 15 ng/g (dry wt) und in dry Snuff durchschnittlich 30 ng/g (dry wt) Benzo(a)pyren nachweisen. Diese Konzentrationen entsprechen der geräucherter Lebensmittel und werden auf bestimmte Herstellungsverfahren (wie flue-curing oder fire-curing) zurückgeführt. Im Vergleich dazu konnten im Partikelfilter des Hauptstromrauchs einer Zigarette 12 verschiedene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in einer Konzentration von insgesamt 292 ng/Zigarette und in der Gasphase 7.5 ng/Zigarette nachgewiesen werden. Im Nebenstromrauch ist die Konzentration der PAK´s um das 10-fache erhöht und erreicht am Partikelfilter damit Konzentrationen bis zu 6 µg/Zigarette (Grimmer *et al.* 1987). Allein an Benzo(a)pyren wurde im Hauptstromrauch einer Zigarette zwischen 3 und 40 ng, im Nebenstromrauch 40-80 ng ermittelt. Daraus wurde eine Aufnahme von Benzo(a)pyren über 20 Zigaretten in 8 Stunden zu 67 - 568 ng geschätzt (Kaiserman und Rickert, 1992).

Der Gehalt an ^{210}Po zwischen 0.16 und 1.22 pCi/g dry Snuff wird von den oben genannten Autoren als Risikofaktor in Bezug auf die orale Carcinogenese des Snuffs angesehen. Bei der täglichen, oralen Anwendung von 10 g Snuff ist man einer α-Strahlung von 0.9-6.7 pCi von ^{210}Po ausgesetzt, was den über Lebensmittel geschätzte täglich aufgenommene Anteil von 1.6 pCi wesentlich überschreitet (Hoffmann *et al.* 1987).

An flüchtigen Aldehyden konnten die Autoren Formaldehyd in Konzentration von 2-7 µg/g, Acetaldehyd 1.4-7 µg/g und Crotonaldehyd 0.2- 2.4 µg/g (dry wt) nachweisen (Hoffmann *et al.* 1987).

Unter den Nitrosaminen konnten in rauchlosen Tabakprodukten flüchtige Nitrosamine, nicht-flüchtige Nitrosamine und die sogenannten tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA) nachgewiesen werden. Da die TSNA innerhalb der Nitrosoverbindungen sowie im Vergleich zu den übrigen, oben aufgeführten Substanzen mengenmäßig im Schnupftabak absolut überwiegen, geht man davon aus, daß diese Verbindungen hauptsächlich für eine mögliche carcinogene Wirkung des Snuffs verantwortlich gemacht werden können.

3. Bildung der TSNA

In grünem Tabak können keine TSNA nachgewiesen werden. Sie entstehen während des Trocknungs- bzw. Fermentierungsprozesses bei der Tabakverarbeitung.

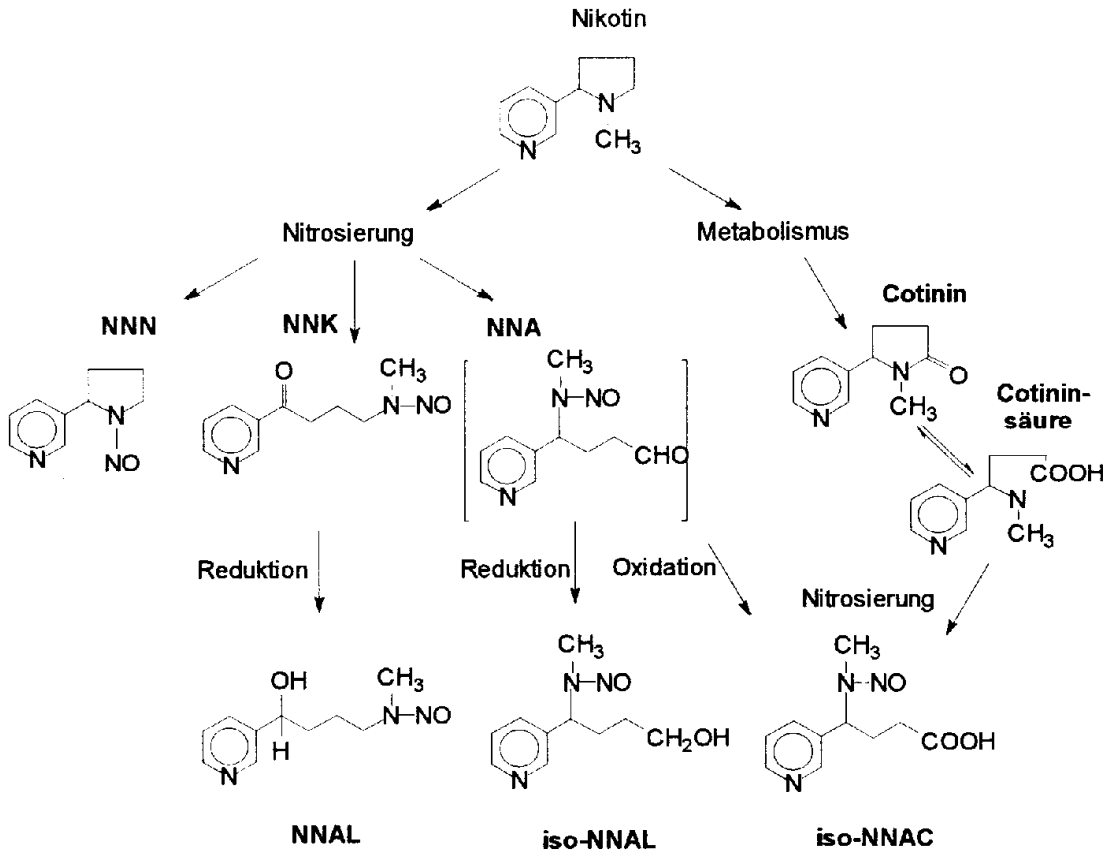


Abbildung 1: Nitrosierungsprodukte von Nikotin

Dabei entsteht bei Nitrosierung von Nikotin Nitrosonornikotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA) , das wegen seiner chemischen Instabilität im Tabak nicht nachweisbar ist. Durch Reduktion von NNK bzw. NNA entstehen die beiden isomeren Alkohole 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (iso-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), die ebenfalls nach Nitrosierung von Nikotin nachgewiesen werden können. Die Oxidation von NNA führt zu iso-NNAC (4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-buttersäure), das auch über eine Nitrosierung von Cotinin bzw. Cotininsäure, den Abbauprodukten des Nikotins, entstehen kann. NNN entsteht zusätzlich außer durch Nitrosierung des Nikotins durch Nitrosierung von Nornikotin. N-Nitrosoanabasin (NAB) und N-Nitrosoanatabin (NAT) stellen die Nitrosierungsprodukte der Tabakalkaloide Anabasin bzw. Anatabin dar.

Der Gehalt der TSNA in Tabak wird durch sehr viele verschiedene Faktoren wie z.B. Tabaksorte, Nitratgehalt, Feuchtigkeit sowie Temperatur beeinflußt. Nach einer Untersuchung von Fischer *et al.* (1985) kann davon ausgegangen werden, daß Nitrat-arme Tabaksorten auch entsprechend geringe Mengen TSNA enthalten (Orient-Tabake), während Nitrat-reiche Tabake größere Mengen TSNA bilden (Burley-Tabake). Als Ausnahmen wurden Virginia-Tabake beobachtet, die bei geringem Nitratgehalt, wenig NNN und große Mengen NNK enthalten. Andere Faktoren, wie der Herstellungsprozeß z.B. sun-cured oder flue-cured spielen ebenfalls eine Rolle. Bei der Lagerung der Tabake konnte Andersen *et al.* (1991) beobachten, daß der Feuchtigkeitsgehalt neben der Temperatur, den größten Einfluß auf eine Bildung der TSNA während der Lagerung der Tabake hat.

4. Carcinogenität der TSNA

NNN, NNK und NNAL haben sich im Tierversuch als starke Carcinogene erwiesen und führen bei Mäusen, Ratten und/oder Hamstern zur Entstehung von benignen und malignen Tumoren der oberen Luftwege, der Lunge und/oder des exokrinen Pankreas (Hecht und Hoffmann, 1989). Der Metabolismus verläuft wie bei den flüchtigen Nitrosaminen über die Aktivierung durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen (Archer, 1989). Bei NAT und iso-NNAC konnte keine carcinogene Wirkung festgestellt werden (Hoffmann *et al.* 1991). NAB verursacht bei Ratten Ösophagus-Tumoren, während über iso-NNAL bisher keine Daten zur Carcinogenität vorliegen.

5. Gehalte von nicht-flüchtigen und flüchtigen Nitrosaminen in Snuff aus der Literatur und den untersuchten Schnupftabakproben

Neben den in den höchsten Konzentrationen vorkommenden tabakspezifischen Nitrosaminen (NNN, NNK, NAT, NAB) können in den rauchlosen Tabakprodukten andere nicht-flüchtige Nitrosamine und flüchtige Nitrosamine nachgewiesen werden.

Nicht-flüchtige Nitrosamine (außer den TSNA), die in Tabakprodukten in geringen Mengen vorkommen, sind unter anderem die nitrosierten Aminosäuren N-Nitrososarcosin (NSAR) und N-Nitrosoprolin (NPRO), die nitrosierten Carbonsäuren 3-(N-Methyl-N-nitroso)-propionsäure (NMPA), 4-(N-Methyl-N-nitroso)-buttersäure (NMBA), N-Nitrosopipercolinsäure (NPIC) und 4-(N-Methyl-N-nitroso-(3-pyridyl))-buttersäure (iso-NNAC) als Oxidationsprodukt von NNA bzw. Nitrosierungsprodukt von Cotinin- und Cotininsäure sowie N-Nitrosodiethanolamin (NDELA). Die Konzentrationen, in denen diese nicht-flüchtigen Nitrosamine in den verschiedenen rauchlosen Tabakprodukten vorkommen, sind in Tabelle 1 angegeben.

N-Nitrosoprolin, das weder carcinogene noch mutagene Eigenschaften aufweist, kommt in den höchsten Konzentrationen in moist (1-20 mg/kg) und dry (4-9 mg/kg) Snuffproben vor. Der Gehalt von NMPA liegt zwischen 1-7 mg/kg in moist und zwischen 2-6 mg/kg in dry Snuffproben. Alle anderen aufgeführten, nicht-flüchtigen Nitrosamine, wie NSAR oder NPIC, kommen nur in geringen Konzentrationen < 1 mg/kg in den rauchlosen Tabakprodukten vor.
Iso-NNAC wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht, da es nur in Konzentrationen < 1 mg/kg nachzuweisen ist und zu den nicht-carcinogenen Nitrosaminen gehört. NDELA gelangt hauptsächlich durch ein Mittel zur Behandlung der Tabaksprößlinge in den Tabak und kommt seit der Identifizierung des Kontaminationsweges ebenfalls nur noch in sehr geringen Konzentrationen vor, so daß es in dieser Untersuchung auch nicht berücksichtigt wurde (Brunnemann und Hoffmann, 1981).
Die Ergebnisse der in dieser Studie untersuchten Schnupftabakproben sind in der Tabelle angegeben und zeigen bei allen nachgewiesenen, nicht-flüchtigen Nitrosaminen einen geringen Gehalt auf. Zur Verdeutlichung der Daten wurden diese in Abbildung 1 berechnet auf Nikotin im Vergleich zu einer moist und einer dry Snuffprobe aus den USA dargestellt. Dabei wird deutlich sichtbar, daß der Gehalt an nicht-flüchtigen Nitrosaminen in den hier untersuchten deutschen Schnupftabaken geringer als in den untersuchten englischen und wesentlich geringer im Vergleich zu den rauchlosen Produkten anderer Länder ist.

Tabelle 1: Gehalte an nicht-flüchtigen Nitrosaminen (mg/kg) in rauchlosen Tabakprodukten aus der Literatur

Produkt	Land	No.	NMPA	NMBA	NPIC	NPRO	NSAR	iso-NNAC	NDELA	Literatur	Bemerkung
moist snuff	Schweden	3				5.3			0.3	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	Schweden	5	1.3	0.07	0.04	1.1	0.02		0.02	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	Canada	2				13			2	Brunnemann *et al.* 1985; Brunnemann *et al.* 1987	wet wt
	England	7	6.9	2.1	0.9	2.3	0.3		0.2	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	USA	5						0.9		Brunnemann *et al.* 1987	wet wt
	USA	6				10			2.3	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	USA	4						2.7		Hoffmann *et al.* 1991; Brunnemann und Hoffmann, 1991	dry wt
	USA	5	4.0	1.0	2	20				Ohshima *et al.* 1985	dry wt
	USA	5	5.5	0.3	0.02	5.6		0.7		Djordjevic *et al.* 1989	dry wt
	USA	3	4.0	0.4			0.2			Djordjevic *et al.* 1993	dry wt
	Schweden	12	2.6	0.1	0.7	8.6				Ohshima *et al.* 1985	dry wt
	Schweden	3						0.1		Hoffmann *et al.* 1991; Brunnemann und Hoffmann, 1991	dry wt
dry snuff	USA	3	5.6	0.6	0.03	8.5		0.3		Djordjevic *et al.* 1989	dry wt
	USA	1						0.1		Brunnemann und Hoffmann, 1991	dry wt
	USA	3						0.1		Brunnemann *et al.* 1987	dry wt
(nasal)	England	5	1.6	0.2	0.1	5.3	0.01		0.01	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
(nasal)	FRG	7	1.6	0.2	0.06	3.6	0.03		0.01	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
Pöschl	FRG	6	1.0	0.1	0.01	1.3	0.02			diese Studie	wet wt
andere	FRG	2	0.8	0.09	n.n.	0.5	0.01			diese Studie	wet wt
englische	UK	3	1.7	0.2	0.02	2.0	0.05			diese Studie	wet wt
plug	Canada	1				0.1			0.1	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
plug	FRG	2				0.6			0.05	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing	USA	1	0.6	0.03	n.n.	0.2		0.01		Djordjevic *et al.* 1989	dry wt
Nass	UDSSR	4				0.04			0.04	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing betel	Indien	4				0.3			0.06	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
scrap tobacco	USA	1				0.5			0.6	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
Kiwam	Indien	10	0.8	0.06	0.08	1	0.014		0.002	Tricker und Preussmann, 1989 b	wet wt
Zarda	Indien	11	2.0	0.2	0.3	2.9	0.05		0.01	Tricker und Preussmann, 1988	wet wt

n.n.: nicht nachgewiesen; NMPA, 3-(Methylnitrosamino)-propionsäure; NMBA 4-(Methylnitrosamino)-buttersäure; NPIC, N-Nitrosopipercolinsäure; NSAR, N-Nitrososarcosin; NPRO, N-Nitrosoprolin; NDELA, N-Nitrosodiethanolamin; iso-NNAC, 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-buttersäure

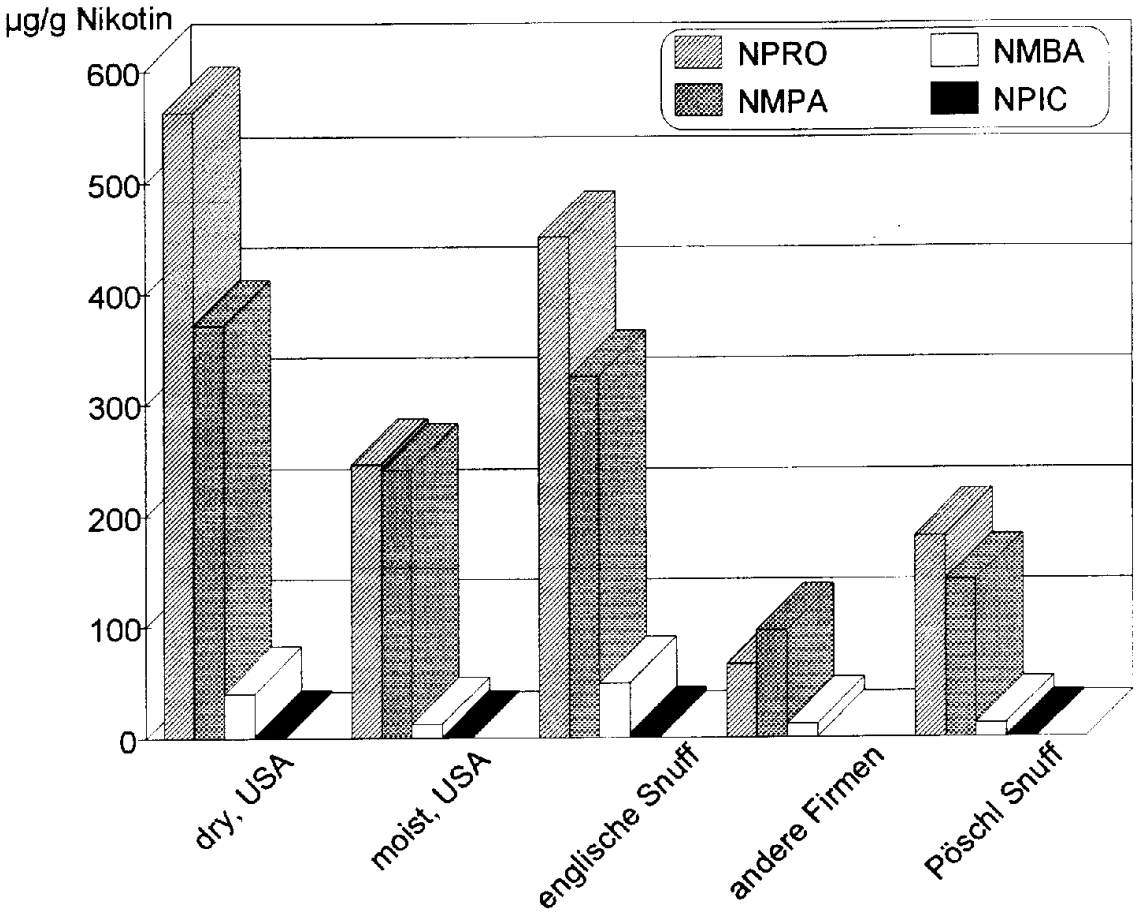


Abbildung 2: Nicht-flüchtige Nitrosamine in den untersuchten Snuffproben und in einer moist und dry Snuffprobe aus den USA (Djordjevic et al. *1989).*

Flüchtige Nitrosamine können nur in ganz geringen Mengen, < 0.5 mg/kg in rauchlosen Tabakprodukten nachgewiesen werden und spielen daher für die Beurteilung eines eventuellen Krebsrisikos eine untergeordnete Rolle. Zur Vollständigkeit der Literaturdaten wurde der durchschnittliche Gehalt der in der Literatur aufgeführten flüchtigen Nitrosamine in rauchlosen Tabakprodukten in Tabelle 2 angegeben. Als flüchtige Nitrosamine können NDMA (N-Nitrosodimethylamin), NEMA (N-Nitrosoethylmethylamin), NPYR (N-Nitrosopyrrolidin), NPIP (N-Nitrosopiperidin), NMOR (N-Nitrosomorpholin) und NDPA (N-Nitrosodipropylamin) in den verschiedenen Tabakprodukten nachgewiesen werden. Das am häufigsten und in den höchsten Konzentrationen detektierte flüchtige Nitrosamin in Snuffproben ist NPYR (1 - 330 µg/kg). Es kann über Decarboxylierung von NPRO, das ebenfalls in den höchsten Konzentrationen vorkommende nicht-flüchtige Nitrosamin (siehe oben), entstehen. NDMA kann ebenso in fast allen Tabakprodukten nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Gehalt liegt zwischen 1 und 130 µg/kg Tabak. Über wachsbeschichtete Verpackungen oder durch entsprechend kontaminierte Aromastoffe kann NMOR (bzw. das Vorläuferamin Morpholin) in die Tabakprodukte gelangen. Die durchschnittliche Konzentration schwankt zwischen 1 und 410 µg NMOR/kg Tabak. Die weiteren flüchtigen Nitrosamine wie NPIP, NEMA und NDPA können nur in geringen Konzentrationen (< 0.05 µg/kg) in den rauchlosen Tabakprodukten nachgewiesen werden, wobei NEMA und NDPA nur in den Studien von Tricker *et al.* (1989 a); 1989 b); 1988) identifiziert wurden.

Tabelle 2: Gehalte an flüchtigen Nitrosaminen (µg/kg) in rauchlosen Tabakprodukten aus der Literatur

Produkt	Land	No.	NDMA	NPIP	NPYR	NMOR	NEMA	NDPA	Literatur	Bemerkung
moist snuff	Schweden	32	0.7	0.02	5	0.07			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Schweden	3	n.n.		18	3			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	Schweden	5	1.5	n.n.	5	1	n.n.		Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	England	7	40	20	270	0.5	1.5		Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	Norwegen	2	129	9	182	33			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Canada	2	48		329	27			Brunnemann *et al.* 1985; Brunnemann *et al.* 1987	wet wt
	USA	2	1	n.n.	1	n.n.			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	USA	6	38		90	15			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	Schweden	3	56		56				Hoffmann *et al.* 1991	dry wt
	Schweden	5	25		52	11.0			Hoffmann *et al.* 1984	dry wt
	USA	5	88		118	413			Hoffmann *et al.* 1984	dry wt
	USA	5	37		49	1.7			Hoffmann *et al.* 1987	dry wt
	USA	4	37		117				Hoffmann *et al.* 1991	dry wt
dry snuff	USA	3	11		119	17			Hoffmann *et al.* 1987	dry wt
(nasal)	England	5	25		58		2	1	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
(nasal)	FRG	7	16		31		1	0.2	Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
plug	Canada	1	n.n.		n.n.	n.n.			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	FRG	2	n.n.		n.n.	n.n.			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing	Schweden	4	0.2	n.n.	1.6	0.4			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Dänemark	6	n.n.	16	n.n.	0.03			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	USA	6	64	n.n.	0.8	1			Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
nass	UDSSR	4	n.n.		4.2	n.n.			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing betel	Indien	4	0.1		2.6	n.n.			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
loose-leaf or scrap tobacco	USA	1	4.1		n.n.	n.n.			Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
Kiwam	Indien	10	14	0.9	51		0.6		Tricker und Preussmann, 1989 b	wet wt
Zarda	Indien	11	11	0.3	100	n.n.	1.0		Tricker und Preussmann, 1988	wet wt

n.n. = nicht nachgewiesen

6. TSNA-Gehalte der untersuchten Schnupftabakproben im Vergleich mit Daten aus der Literatur

Zur Beurteilung der Nitrosamingehalte der Snuffproben wurden Daten von rauchlosen Tabakprodukten und Hauptstromrauch von Zigaretten aus der Literatur herangezogen. Bei den rauchlosen Tabakprodukten konnten Daten für moist und dry Snuff sowie zu speziellen Tabakprodukten verschiedener Länder (Nass/ UdSSR; Kiwan/Zarda/Masheri/Indien; Naswar/Pakistan; Toomback/Sudan) ermittelt werden (siehe Tabelle 3). Innerhalb der verschiedenen Snuffsorten wurden die gefundenen Werte nach Ländern und Trockengewichts-bzw. Naßgewichtsbezug geordnet.

In Bezug auf den Feuchtigkeitsgehalt der Proben liegt der deutsche und englische Schnupftabak mit 10-20 % Feuchte zwischen dem moist Snuffproben (20-60 % Feuchte) und den dry Snuffproben, die zwischen 5-15 % Feuchtigkeit enthalten. Der Nikotingehalt ist sehr starken Schwankungen unterworfen und liegt bei den moist und dry Snuffproben zwischen 3-50 mg/g. Die hier untersuchten Proben weisen einen Nikotingehalt zwischen 5-24 mg/g auf. Der Nitratgehalt der Snuffs liegt bei den Proben der Literatur zwischen 0.5-6 % bezogen auf das Naßgewicht und entspricht damit dem der hier untersuchten Proben (Brunnemann *et al.* 1987; Link *et al.* 1992; Brunnemann *et al.* 1985; Djordjevic *et al.* 1989).

Unter den in der Tabelle aufgeführten TSNA ist in der Regel NNN in den höchsten Konzentration in den verschiedenen Snuffsorten vertreten, gefolgt von NAT/NAB, die meist gemeinsam bestimmt werden, und NNK. Auffallend sind die hohen Schwankungsbreiten in der Konzentration der jeweiligen Nitrosamine in den Snuffproben. Im Vergleich zu den Literaturdaten und insbesondere zu einer früheren Untersuchung von Schnupftabak von Tricker *et al.* (1989) konnten in den untersuchten deutschen und englischen Proben geringere TSNA Konzentrationen nachgewiesen werden. Ähnlich geringe Gehalte von NNN, NNK und NAT/NAB zeigen einige Untersuchungen von moist Snuff aus Schweden (Osterdahl und Slorach, 1983; Brunnemann *et al.* 1985) und den USA (Osterdahl und Slorach, 1983). Sämtliche Literaturdaten über dry Snuff weisen wesentliche höhere Gehalte der TSNA auf. Im Mittel zeigen moist und dry Snuffproben zwischen 3-64 mg NNN /kg und 0.03-9 mg NNK/kg. Bei den untersuchten Proben liegt der NNN-Gehalt im Mittel zwischen 2 und 4 mg/kg, während die mittlere Konzentration von NNK < 1 mg/kg ist. NAT/NAB, die in dieser Studie gemeinsam bestimmt wurden, konnten in einer mittleren Konzentration von 1 mg/kg im Schnupftabak nachgewiesen werden. In der Literatur werden sehr verschiedene Werte zwischen 2-161 mg/kg aufgeführt.

Tabelle 3: TSNA-GEHALTE (mg/kg) in rauchlosen Tabakprodukten aus der Literatur im Vergleich zu analysierten Daten dieser Studie

Produkt	Land	No.	NNN	NNK	NAT/NAB	TSNA total	(min-max)	Literatur	Bemerkung
moist snuff	Schweden	32	4	0.8	2.7	7.3	(6.3-10)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Schweden	3	4	1.0	2.1	6.8	(5.8-7.5)	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	Schweden	5	3	0.8	2.6:			Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	England	6	4	2.8				Tricker *et al.* 1989	wet wt
	England	7	23	5	28			Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
	Norwegen	2	23	3.3	15	39	(26-51)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Canada	2	64	4.5	165	234	(228-240)	Brunnemann *et al.* 1985; 1987	wet wt
	USA	6	10	1.0	15	27	(5-66)	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	USA	2	2	0.3	1.2	3	(2.5-3.7)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	USA	1	4	3.2	5.1			Prokopczyk *et al.* 1992	wet wt
	USA	6	5.8	2.9				Chamberlain *et al.* 1988	wet wt
	Indien	6	1	0.03				Tricker *et al.* 1989	wet wt
	USA	5	15	3.2	15	33	(1-80)	Hoffmann *et al.* 1984	dry wt
	USA	5	27	1.3	58	86	(10-288)	Hoffmann *et al.* 1987	dry wt
	USA	4	15	5.7	15	36	(8-94)	Hoffmann *et al.* 1991; Brunnemann *et al.* 1991	dry wt
	USA	5	42	3.1	56			Brunnemann *et al.* 1987	dry wt
	USA	2	12	1.8	3.1			Hoffmann *et al.* 1988	dry wt
	USA	5	8	0.7	7.2	16	(6.3-25)	Djordjevic *et al.* 1989	dry wt
	USA	3	6	1.1	5.3			Djordjevic *et al.* 1993	dry wt
	Dänemark	3	6	4	4	13.9	(1.4-8)	Hoffmann und Adams, 1981	dry wt
	FRG	2	6	1.5	4	12.1	(1.5-7)	Hoffmann und Adams, 1981	dry wt
	Schweden	5	5	1.1	1.8	7.5	(4.2-9.4)	Hoffmann *et al.* 1984	dry wt
	Schweden	3	5	1.6	3			Hoffmann *et al.* 1991; Brunnemann und Hoffmann, 1991	dry wt
dry snuff	USA	3	26	2.7	13	41	(25-51)	Djordjevic *et al.* 1989	dry wt
	USA	3	34	9	31	73	(31-111)	Adams *et al.* 1987	dry wt
	USA	3	48	8	26			Adams *et al.* 1987	dry wt
	USA	1	11	0.9	13			Brunnemann und Hoffmann, 1991	
(nasal)	England	5	7.7	2	3.2			Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
(nasal)	FRG	7	8	3	3.1			Tricker und Preussmann, 1989 a	wet wt
nasal snuff	**Pöschl**	6	2.8	0.6	1.1	4.5	(0.4-5.4)	diese Studie	wet wt
	andere	2	1.6	0.5	1.1	2.2	(0.5-1.2)	diese Studie	wet wt
	England	3	3.7	0.9	1.8	4.6	(0.6-6,2)	diese Studie	wet wt

Fortsetzung Tabelle 3b: TSNA-Gehalte in mg/kg für weitere rauchlose Tabakprodukte und besondere Snuffsorten

Produkt	Land	No.	NNN	NNK	NAT/NAB	TSNA total	(min-max)	Literatur	Bemerkung
plug	Canada	1	2.1	0.2	1.7	4		Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
	FRG	2	1.8	0.04	0.4	2.3	(1.8-2.7)	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing	Schweden	4	3.4	n.D.	4	2.0	(1.1-3)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	Dänemark	8	0.8	0.04	1.2	2.0	(0.5-4.4)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	USA	6	1	n.D.	0.07	2.0	(0.1-7.8)	Osterdahl und Slorach, 1983	wet wt
	USA	1	1.5	0.1	0.7	2.3		Djordjevic *et al.* 1989; Brunnemann und Hoffmann, 1991	dry wt
	USA	4	2.4	0.6				Chamberlain *et al.* 1988	
Nass	UDSSR	4	0.3	0.07	0.1	0.5	(0.2-1)	Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
Toomback	Sudan	20	1130	2310	300			Idris *et al.* 1991	dry wt
loose-leaf / scrap tobacco	USA	1	0.7	0.4	2.4	3.5		Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
chewing betel	Indien	4	0.6	0.2	0.5	1.2		Brunnemann *et al.* 1985	wet wt
Kiwam	Indien	10	4.3	0.6	4.5			Tricker und Preussmann, 1989 b	wet wt
Zarda	Indien	11	13.4	13.4	16			Tricker und Preussmann, 1988	wet wt
Pan masala with zarda	Indien	7	0.2	n.d.				Tricker und Preussmann, 1992	wet wt
masheri	Indien	3	1.7	0.4				Tricker und Preussmann, 1992	wet wt
Naswar	Pakistan	3	1	0.6				Tricker und Preussmann, 1992	wet wt

Der Vergleich der hier ermittelten Daten mit anderen rauchlosen Tabakprodukten ist besser im Zusammenhang mit dem Nikotingehalt der Proben zu beurteilen, da davon ausgegangen werden kann, daß der Gebrauch der Produkte wesentlich von der Zufuhr des Nikotins bestimmt wird. In diesem Zusammenhang wurden die ermittelten TSNA-Gehalte der Proben in µg bezogen auf 1 g Nikotin berechnet. Unter Proben, die einen vergleichbaren Nitrosamingehalt aufweisen (z.B. Löwenprise und Gawith Apricot Snuff), aber unterschiedlich hohe Nikotingehalte haben, zeigen diejenigen mit einem hohen Nikotinanteil (Löwenprise) geringere Nitrosaminwerte auf. Soweit in der Literatur die Nikotingehalte angegeben waren, wurden einige Literaturdaten über den TSNA-Gehalt von moist und dry Snuff auf den angegebenen Nikotingehalt der Proben berechnet. Die Daten sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt und verdeutlichen erhebliche Unterschiede bei den verschiedenen Snuffsorten. Insbesondere der dry Snuff aus den USA weist wesentlich höhere NNN-Gehalte bezogen auf Nikotin auf als in den untersuchten deutschen und englischen Schnupftabaken zu finden sind.

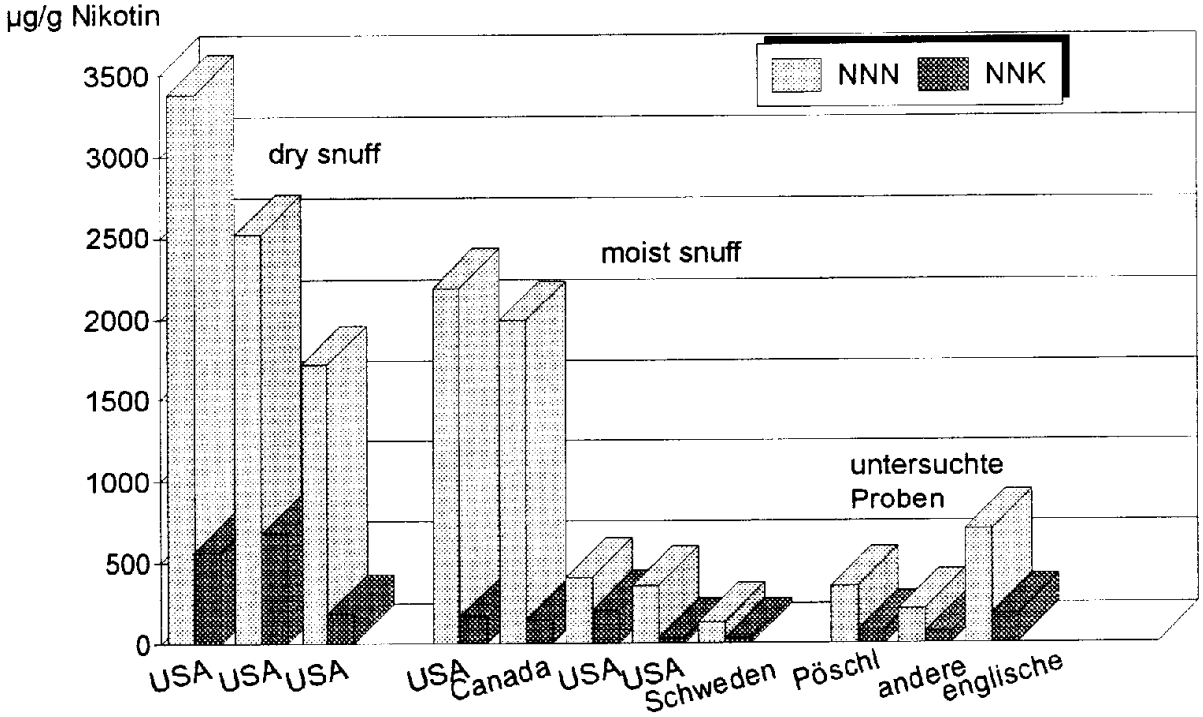


Abbildung 3: NNN- und NNK-Gehalte bezogen auf Nikotin in moist Snuff, dry Snuff und untersuchten Schnupftabakproben (Referenzen: Brunnemann et al. *1987; Adams* et al. *1987; Djordjevic* et al. *1989; Brunnemann* et al. *1985; Djordjevic* et al. *1989)*

Neben den als Snuff bezeichneten rauchlosen Tabakprodukten wurden in Tabelle 3b ebenfalls TSNA-Gehalte für Kautabak und exotische Tabaksorten aus anderen Ländern, die ebenfalls hauptsächlich oral verwendet werden, aufgeführt. Im Vergleich zu den meisten moist und dry Snuffproben werden im Kautabak geringere TSNA-Gehalte beobachtet, wobei insbesondere geringe NNK-Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf den hier untersuchten Schnupftabak enthält der Kautabak geringere Mengen der drei aufgeführten TSNA. Unter den besonderen rauchlosen Tabakprodukten anderer Länder zeigt vor allem Toomback aus

dem Sudan extrem hohe TSNA-Gehalte, die mit den üblichen Snuffproben nicht vergleichbar sind. Die Daten sind aufgeführt, um zu verdeutlichen, daß eventuell vorhandene Daten über das Krebsrisiko von rauchlosen Tabakprodukten aus anderen Ländern immer im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Tabakprodukte gesehen werden muß.

Neben den aufgeführten Daten sind in der Literatur Mengenangaben zu dem Gehalt von rauchlosen Tabakprodukten an iso-NNAL (4-N-Methylnitrosamino-4-(3-pyridyl)-butanal) zu finden. Als Reduktionsprodukt des NNK konnte es in sehr geringen Konzentrationen in moist Snuffproben aus Schweden, England, USA und Indien (0.02-0.08 mg/kg) und dry Snuffproben aus den USA und England (0.1-0.7 mg/kg) identifiziert werden (Hoffmann *et al.* 1987; Tricker und Preussmann, 1989 a; Tricker *et al.* 1989). In deutschem Schnupftabak konnte es in der Studie von Tricker *et al.* (1989) in einer mittleren Konzentration von 0.06 mg/kg nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Konzentrationen und dem fehlenden Nachweis einer eventuellen Carcinogenität dieses Nitrosamins wurde es bei der vorliegenden Untersuchung nicht bestimmt.

Zur vergleichenden Risikobeurteilung der analysierten TSNA-Gehalte der rauchlosen Tabakprodukte wurden bekannte Daten des TSNA-Gehaltes vom Hauptstromrauch von Zigaretten des deutschen Marktes gegenübergestellt. Dabei wurden unter den Filterzigaretten Daten zu American Blend und Blend Zigaretten und unter den filterlosen Zigaretten Daten zu Dark- und Blendsorten, die am weitesten verbreitet sind, ausgewählt (Fischer *et al.* 1989). In dieser Gegenüberstellung wird unter dem TSNA-Gehalt die Summe von NNK und NNN verstanden, da diese beiden Nitrosamine für die Carcinogenität die entscheidende Rolle spielen. Die TSNA-Gehalte wurden für die Schnupftabake und für den Hauptstromrauch bezogen auf den Nikotingehalt berechnet und in der folgenden Abbildung dargestellt.

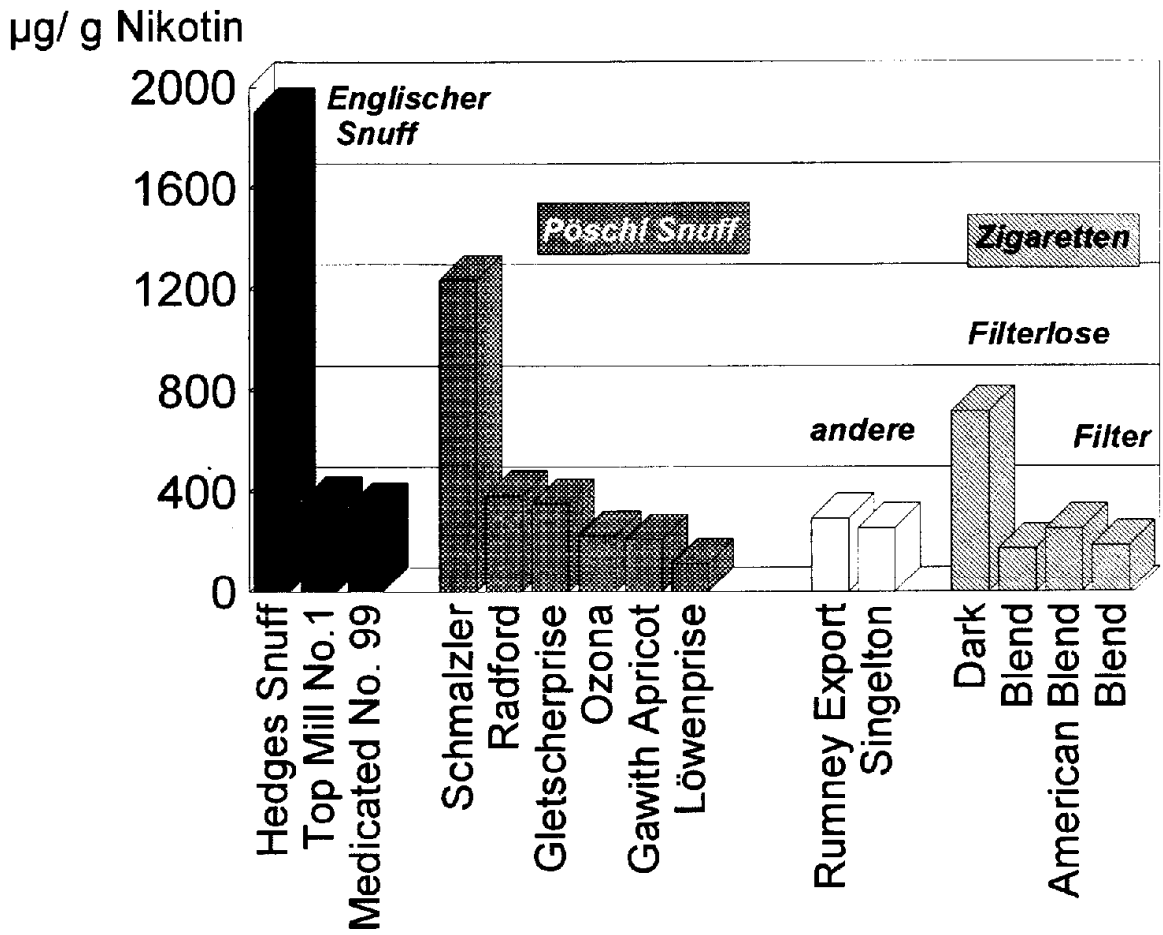


Abbildung 4: TSNA-Gehalt (NNN und NNK) der untersuchten rauchlosen Tabakprodukte und des Hauptstromrauchs von filterlosen und Filterzigaretten des deutschen Marktes (Fischer et al. *1989) bezogen auf den Gehalt an Nikotin*

Im Hauptstromrauch von Blend und American Blend Filterzigaretten sowie von filterlosen Blendzigaretten sind demnach bezogen auf den Nikotingehalt ähnliche TSNA-Gehalte wie in den meisten untersuchten Schnupftabakproben. Ausnahmen sind unter den untersuchten englischen Schnupftabaken der Hedges Snuff, der bei sehr geringem Nikotingehalt (0.5% dry wt) extrem hohe TSNA-Mengen (9347 µg/kg dry wt) aufweist und unter den deutschen Schnupftabaken der Schmalzler, der bei ebenfalls geringem Nikotingehalt (0.6% dry wt) im Vergleich zu den anderen Snuffsorten hohe TSNA-Gehalte (7044 µg/kg dry wt) zeigt. Dadurch werden in diesen rauchlosen Tabakprodukten im Verhältnis zum Nikotin höhere TSNA-Mengen erreicht als im Hauptstromrauch schwarzer filterloser Zigaretten.

7. Aufnahme der TSNA über Snuff

7.1. Nasale Absorption von Nikotin

Der Berechnung der täglichen Aufnahme der TSNA über den Schnupftabak liegt die Annahme zugrunde, daß die TSNA-Aufnahme in der Nase der Absorption von Nikotin entspricht. Die Nikotinabsorption durch die Nasenschleimhaut wurde in zahlreichen Studien untersucht (Tabelle 4). Dabei konnte festgestellt werden, daß nach Applikation des Nikotins in der Nase eine sehr schnelle Absorption erfolgt und nach den ersten 10 min die höchsten Plasmakonzentrationen gemessen werden können. Setzt man die Nikotinaufnahme über eine Zigarette zu 100%, so werden nach Russell *et al.* (1983) über eine wässrige Nikotinlösung mit pH=5 in der Nase 75% des Nikotins absorbiert, während über ein Nikotinkaugummi nur 43% aufgenommen werden. Im Vergleich zu einer i.v. Injektion von Nikotin werden nach Johnson *et al.* (1991) über eine wässrige Lösung in der Nase zwischen 60-70% des Nikotins absorbiert. Dabei wurde eine wässrige Lösung von Nikotin mit neutralem pH-Wert eingesetzt. Ein Einfluß des pH-Werts auf die nasale Absorption des Nikotins konnte bei Ratten nachgewiesen werden. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Absorption zu, da durch Reizung der Nasenschleimhaut eine bessere Durchblutung erzielt wird und ein größerer Anteil des Nikotins in der undissoziierten Form vorliegt (Olsson *et al.* 1991). Die hier untersuchten Schnupftabake der Firma Pöschl liegen im pH-Wert zwischen 7.4 - 9.1, die drei englischen Schupftabake > pH=9. Durch die höheren pH-Werte der Schnupftabake ist die Absorption des Nikotins und damit auch der TSNA verbessert.

Tabelle 4: Vergleich der Absorption von Nikotin

Applikation	Nikotin-gehalt (mg)	Höchste Plasma-konzentration von Nikotin (ng/ml)		Referenz
Zigarette	1.4	26 ng/ml nach 7.5 min	100 %	Russell *et al.* (1983)
wässrige Lsg.in der Nase (pH=5)	2	14 ng/ml nach 7.5 min	75 %	
Kaugummi	2	8 ng/ml nach 30 min	43 %	
i.v.	0.7	14 ng/ml	100 %	Johnson *et al.* (1991)
wässrige Lösung in der Nase (pH = 7)	1	8 ng/ml nach 12 min	60-70 %	
Nasenspray	1	8 ng/ml nach 12 min	58 %	
Snuff, oral (2 g)		15 ng/ml nach 30 min (10 ng/ml nach 10 min)		Holm *et al.* (1992)
Nasenspray	2	11.8 ng/ml nach 5 min		Sutherland *et al.* (1992)
Nasenaerosol	2	10.5 ng/ml nach 5 min		
Schnupftabak		21.1 ng/ml nach 5 min		Russell *et al.* (1980)

Ein Einfluß des Applikationsmediums, wie Lösung, Spray oder Aerosol, auf die nasale Apsorption von Nikotin konnte in den verschiedenen Studien nicht festgestellt werden. Im Vergleich zur Aufnahme des Nikotins über die Mundhöhle ist die Absorption über die Nase etwas schneller. Insgesamt werden bei regelmäßiger Aufnahme von Nikotin über die Nase ähnliche Plasma-Nikotinkonzentrationen erreicht wie bei Zigarettenrauchern oder der regelmäßigen Verwendung von Mundtabaken. Ein

Vergleich verschiedener mittlerer Plasma-Nikotinkonzentrationen von Rauchern, Schnupfern und Konsumenten von Mundtabaken ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Plasma-Nikotin-Werte von Rauchern, Schnupfern und Konsumenten von Mundtabaken aus Russell et al. *1981* und *Holm* et al. *1992*

	n	**Mittlere Plasma-Nikotin-Konzentrationen (ng/ml)**		
Zigarettenraucher	136	36.2	(6-76)	2 min nach Zigarette (im Mittel 30.5 Zigaretten/ d)
tägl. Schnupfer (nasal)	11	35.2	(9-72)	6-15 min nach Schnupfen
tägl. Snuff dipper (oral)	27	36.6		5-15 min nach Anwendung
Zigarettenraucher	35	36.7		1 min nach Zigarette (im Mittel 17 Zigaretten/d)

Für die Beurteilung von Schnupftabaken ist von Bedeutung, daß die Nikotinaufnahme über die Nase von großen individuellen Unterschieden geprägt ist. Der oben dargestellte Vergleich der mittleren Plasma-Nikotinkonzentrationen wurde bei regelmäßigen Schnupfern, Rauchern und Konsumenten von Mundtabaken durchgeführt, da gelegentliche und einmalige Schnupfer weniger Nikotin absorbieren können (Russell *et al.* 1981).

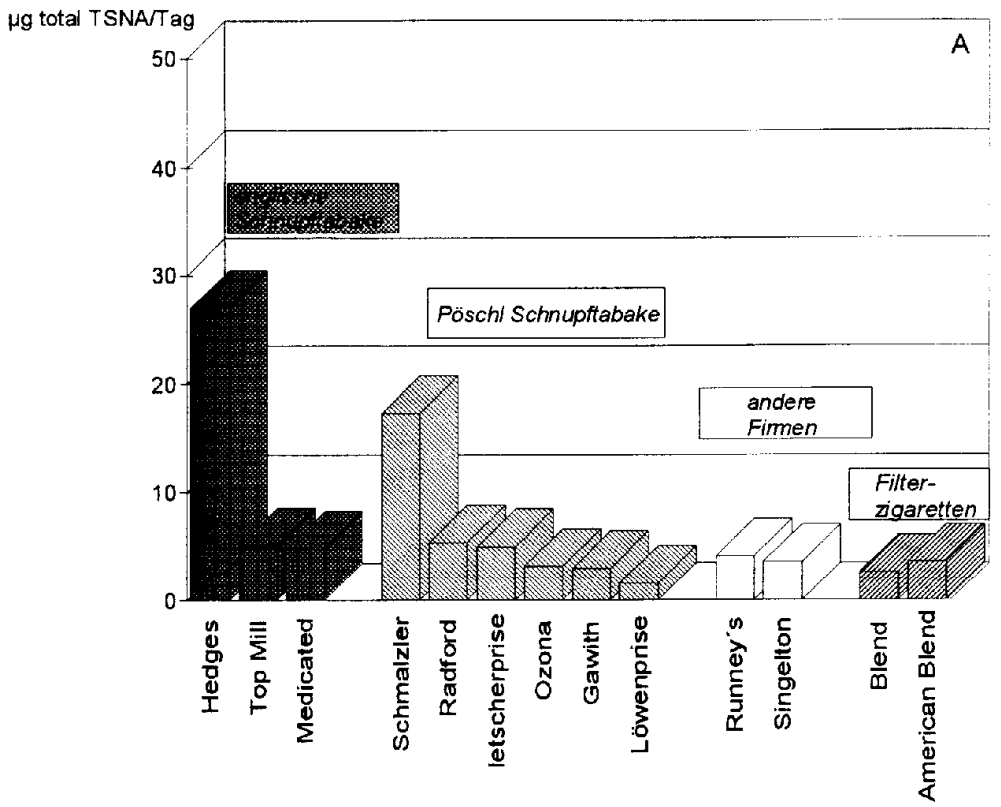
7.2. Berechnungen zur Aufnahme der TSNA über Schnupftabak

Die Berechnung der Aufnahme der TSNA über den Schnupftabak wurde mit zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt:

a) Berechnung über die Nikotinaufnahme in Vergleich zu Rauchern

b) Berechnung über die Snuffmengen, die sich aus der durchgeführten Verbraucherstudie ergaben.

a) Die tägliche Nikotinaufnahme von durchschnittlichen Rauchern, denen ein Konsum von 20 Zigaretten pro Tag zugrunde gelegt wird, beträgt bei Filterzigaretten (Blend/American Blend) ca. 14 mg Nikotin pro Tag, bei filterlosen Zigaretten (Dark/Blend) 25 mg Nikotin pro Tag (Fischer *et al.* 1989). Da nach Russell *et al.* (1983) im Vergleich zum Rauchen bei der Nikotinaufnahme über die Nase nur 75% des Nikotins resorbiert werden, wurde, um die gleiche Nikotinaufnahme pro Tag wie Raucher zu erreichen, zunächst die dafür benötigte Snuffmenge berechnet. Um eine tägliche Aufnahme von 14 mg Nikotin zu erreichen, müssen dabei im Durchschnitt 2 g der Pöschl Snuffproben konsumiert werden, für 25 mg Nikotin pro Tag im Mittel entsprechend 3.6 g Snuff. Die TSNA-Aufnahme über die verschiedenen Snuffproben wurde daraufhin für so festgestellten Snuffmengen pro Tag berechnet. Der Vergleich mit der Aufnahme der TSNA über Zigaretten ist in Abbildung 5 dargestellt.



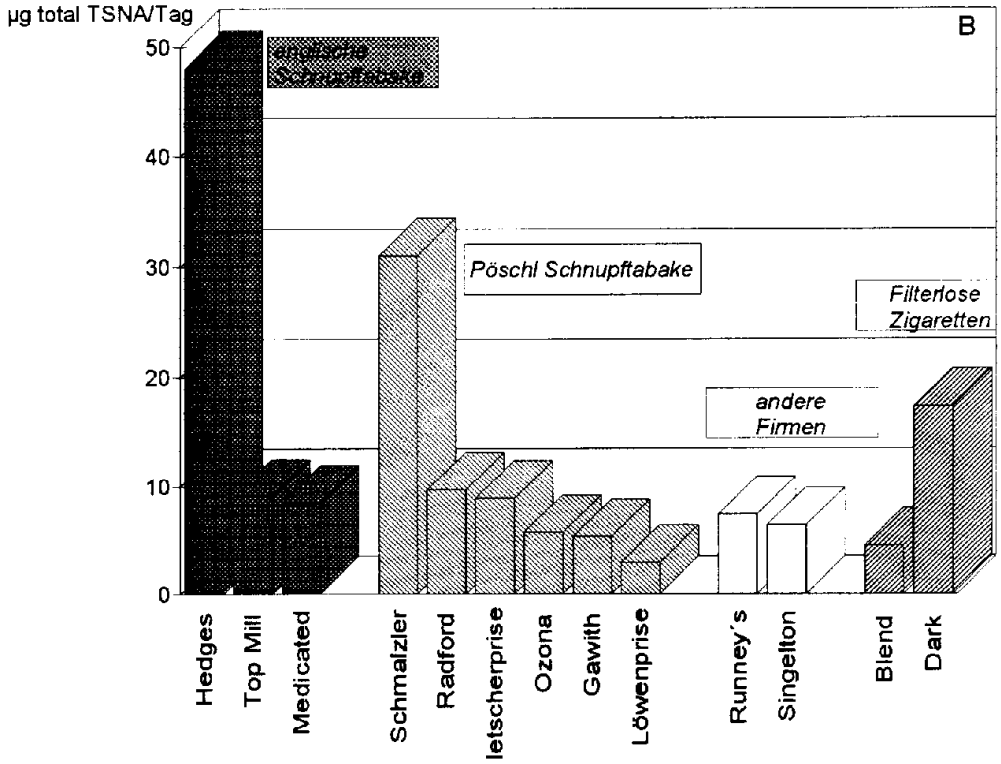


Abbildung 5: Vergleich der Aufnahme der TSNA (NNN+NNK) über Schnupftabak und Zigaretten
A: Vergleich zu Filterzigaretten bei einer täglichen Aufnahme von 14 mg Nikotin
B: Vergleich zu filterlosen Zigaretten bei einer täglichen Aufnahme von 25 mg Nikotin

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, wird bei dieser Berechnungsgrundlage über den Snuff etwa gleich viel NNN und NNK aufgenommen wie über den Genuß von 20 Zigaretten pro Tag.

b) Berechnung über die Snuffmengen, die sich aus der durchgeführten Verbraucherstudie ergaben

Über eine Verbraucherstudie im Rahmen eines Gewinnspiels wurde ermittelt, wieviel Schnupftabak pro Tag geschnupft wird. Von 125 Befragten nehmen dabei 47 % 10-20 g Snuff pro Tag (siehe Tabelle 6). Diese Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit dem Gewinnspiel beurteilt werden, da ein Teil der Verbraucher den Konsum wahrscheinlich höher einschätzt, um die Gewinnchancen zu erhöhen. Beim täglichen Verbrauch von 10 g Snuff werden je nach Marke zwischen 50 mg (Schmalzler) und 206 mg (Löwenprise) Nikotin in die Nase eingeführt. Bei einer Aufnahme von 75 % des Nikotins entspricht dies 38-155 mg Nikotin/ Tag, wofür ein Raucher von Filterzigaretten 54-220 Zigaretten oder 2-11 Päckchen, ein Raucher filterloser schwarzer Zigaretten 32-120 Zigaretten oder 2-6 Päckchen am Tag verbrauchen müßte. Die Mengen an Nikotin und TSNA (NNN+NNK) die beim Konsum von 10 g Snuff von den Schnupfern aufgenommen würden, sind im Vergleich zu den unter a) vorgestellten Daten in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 6: Ergebnis der Verbraucherstudie

% der Befragten	Menge Schnupftabak/Tag
6 %	< 10 g Snuff / Tag
29 %	10 g Snuff / Tag
18 %	20 g Snuff / Tag
12 %	30 g Snuff / Tag
9 %	40 g Snuff / Tag
18 %	> 40 g
9 %	ohne Angabe

Tabelle 7: Nikotin und TSNA Aufnahme bei 10 g Snuff täglich bzw. TNSA Aufnahme bei 14 mg Nikotin jeweils unter Berücksichtigung, daß nach Russell et al. (1983) nur 75% aufgenommen werden

Probe	**Nikotin (mg/Tag) bei 10 g Snuff**	**NNN + NNK (µg/Tag) bei 10 g Snuff**	**NNN+ NNK (µg/Tag) bei Aufnahme von 14 mg Nikotin/Tag**	**Snuffmenge (g/Tag)**
Löwenprise	206	18	2	0.9
Gawith Apricot	120	19	3	1.6
Ozona	116	20	3	1.6
Radford Snuff	86	25	5	2.2
Gletscherprise	85	22	5	2.2
Schmalzler	52	48	17	3.6
Singletons Snuff	81	15	4	2.3
Rumney´s Export	79	17	4	2.4
Medicated No. 99	95	24	5	2.0
Hedges Snuff	41	59	27	4.5
Top Mill No. 1	76	21	5	2.5

Die Aufnahme des Snuffs ist im Vergleich zur Zigarette nur von der gewünschten Nikotinaufnahme des Konsumenten abhängig. Limitierende Faktoren der Zigarette, wie Stickoxidkonzentration oder Kohlenmonoxidaufnahme durch den Rauch, die es dem Raucher nicht ermöglichen viel mehr als 2 Schachteln pro Tag zu konsumieren, sind bei den rauchlosen Tabakprodukten nicht gegeben. Deshalb konnten auch von Russell *et al.* (1981) bei einem britischen Champion-Schnupfer eine Nikotinkonzentration von 129 ng/ml Plasma als bisher noch nie beobachtete Höchstkonzentration gemessen werden. Die in der erwähnten Studie erreichten Höchstkonzentrationen bei starken Rauchern lagen dagegen nur bei 77 ng Nikotin / ml Plasma. Auch bei Konsumenten von Mundtabaken wird eine höhere Nikotinaufnahme als bei Rauchern festgestellt und diskutiert, daß dies neben der längeren Absorptionsmöglichkeit aus den Mundtabaken auch am Fehlen der simultanen Exposition mit Kohlenmonoxid liegen kann (Huhtasaari *et al.* 1992; Bolinder *et al.* 1992). Es ist somit sehr schwierig eine durchschnittliche Konsummenge von Schnupftabak (z.b. 5-10 g) zur Berechnung der Exposition mit TSNA zugrundezulegen. Im Zusammenhang mit dem Vergleich der Exposition mit cancerogenen Stoffen über den Zigarettenkonsum erscheint es sinnvoll, von einer definierten Aufnahme von Nikotin (wie unter a) bearbeitet) auszugehen. Ein Vergleich von Mundtabaken und Schnupftabak ist problematisch, da bei Mundtabaken zu viele unbekannte Faktoren wie endogene Nitrosierung, längere Exposition und Verschlucken der Speichellösung eine Rolle spielen.

7.3. Vergleich mit Aufnahmedaten aus der Literatur

In einer Studie von Tricker *et al.* (1992) wurde die TSNA Exposition durch rauchlose Tabakprodukte verschiedener Länder verglichen. Dabei wurde für England und Deutschland ein Schnupftabakkonsum von 2 g/Tag zugrunde gelegt. Für orale Anwendung von Tabaken wurde für England ein Konsum von 4.5 g/Tag, für Indien 5 g/Tag und Schweden 15.9 g/Tag (Osterdahl und Slorach, 1983) angegeben. In amerikanischen Studien über den Verbrauch von Mundtabaken werden jeweils 10 g als tägliche Aufnahme vorausgesetzt. In Tabelle 8 sind diese Daten im Vergleich zu den in dieser Studie ermittelten Werten aufgeführt, wobei ein täglicher Verbrauch von 2 g Snuff und 10 g Snuff als Berechnungsgrundlagen verwendet wurden.

Tabelle 8: Mittlere tägliche Exposition mit NNN und NNK durch verschiedene Snuffsorten im Vergleich zu Daten aus der Literatur

Land	Gebrauch (g/Tag)	Tägliche Nitrosaminbelastung (µg/Tag) NNN	NNK	Referenz
nasal (UK)	2	15	4	(Tricker und Preussmann, 1992)
nasal (FRG)	2	16	6	(Tricker und Preussmann, 1992)
oral (UK)	4.5	8	6	(Tricker und Preussmann, 1992)
oral (moist snuff, Schweden)	15.9	53	13	(Tricker und Preussmann, 1992)
oral (Zarda, Indien)	5	67	20	(Tricker und Preussmann, 1992)
oral, dry (USA)	10	340	90	(Adams *et al.* 1987)
oral, moist (USA)	10	83	25	(Hoffmann *et al.* 1984)
Pöschl	2	6	1	diese Studie
andere Firmen	2	3	1	diese Studie
englische Snuffs	2	7	2	diese Studie
Pöschl	10	29	6	diese Studie
andere Firmen	10	17	5	diese Studie
englische Snuffs	10	37	9	diese Studie

Da in dieser Studie im Vergleich zu früheren Schnupftabakuntersuchungen geringere TSNA-Gehalte ermittelt wurden, ist natürlich auch die errechnete mittlere täglich verfügbare Menge an TSNA geringer.

8. Metabolismus der TSNA unter dem Aspekt der nasalen Applikation

Der Metabolismus der TSNA verläuft wie bei den flüchtigen Nitrosaminen über α-Hydroxylierung durch mikrosomale P-450-abhängige-Monooxygenasen (Hecht und Hoffmann, 1988; Hoffmann und Hecht, 1985). Dabei entstehen α-Hydroxy-nitrosamine, die unter Aldehydabspaltung in Diazohydroxide übergehen. Diese können als Elektrophile mit nucleophilen Zentren der Biomoleküle (DNA) zu stabilen Addukten reagieren, so daß gentoxische Effekte ausgelöst werden können. Die Reaktion kann direkt oder über den Zerfall des Diazohydroxids zu einem Carbeniumion als ultimalem Carcinogen erfolgen. In Abbildung 6 ist die α-C-Hydroxylierung von NNN und NNK, die in der 2´- und 5´-Position stattfinden kann, skizziert. Metabolisierungsprodukte, die in *in vitro* Gewebekulturen als ungebundene Metabolite nachgewiesen werden konnten, sind unter anderem 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butanal (Ketoaldehyd), 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butanol (Ketoalkohol oder HPB), 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-buttersäure (Ketosäure), 4-Hydroxy-(3-pyridyl)-buttersäure (Hydroxysäure) und 4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butanol (Brittebo *et al.* 1983).

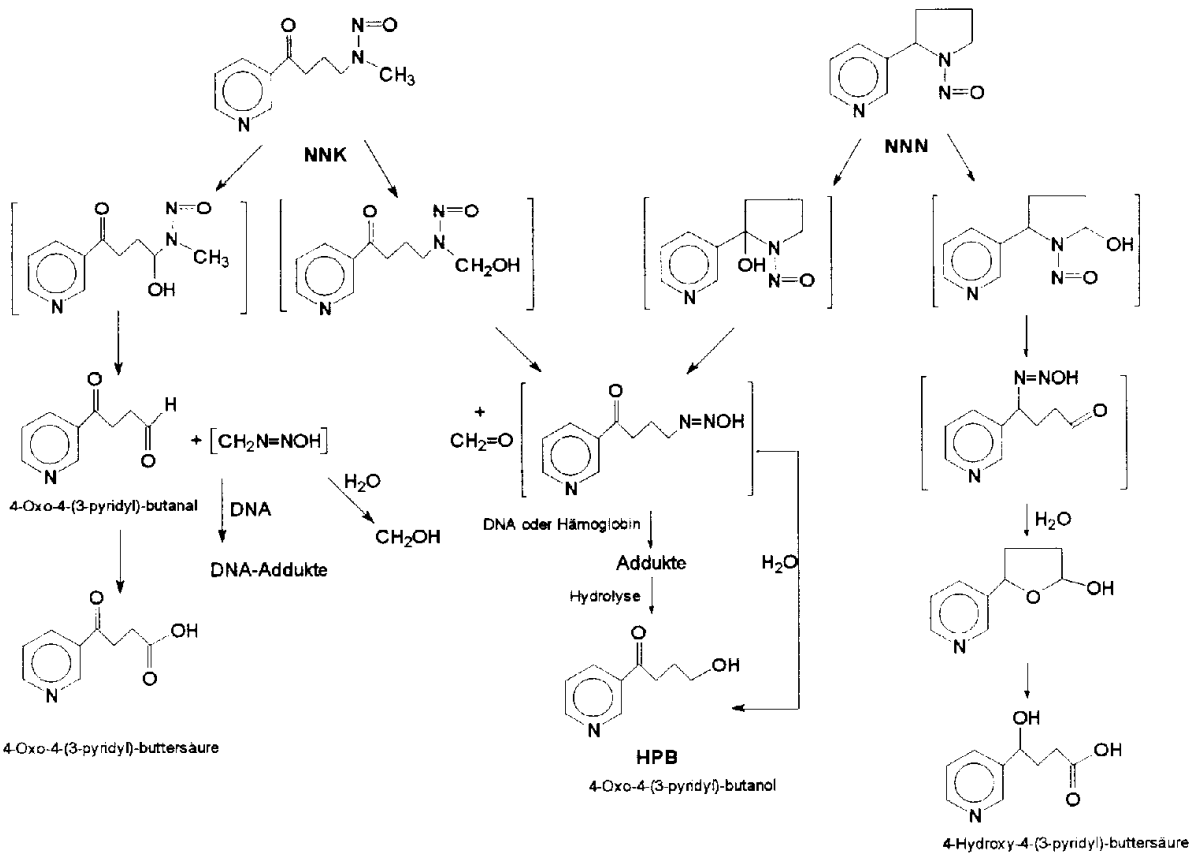


Abbildung 6: Einige Metaboliten der α-C-Hydoxylierung von NNN und NNK

In Bezug auf die in dieser Studie untersuchten Schnupftabake ist der Metabolismus der TSNA in der Nasenschleimhaut von Relevanz. Hierzu konnte in zahlreichen Tierstudien festgestellt werden, daß NNN und NNK, die für die Carcinogenität von Bedeutung sind, von der Nasenschleimhaut effizient umgesetzt werden können (Brittebo *et al.* 1983; Van Benthem *et al.* 1991; Castonguay *et al.* 1985).

In vitro Kulturen der Nasenschleimhaut von F344 Ratten zeigten eine hohe Aktivität im Metabolismus von NNN und NNK zu hydroxylierten Substanzen, die ins Kulturmedium abgegeben werden (Brittebo *et al.* 1983). Untersuchungen der Umsetzung von NNK mit Nasenmikrosomen von Spague-Dawley Ratten ergaben ebenfalls die α -Hydroxylierung als hauptsächlichen Abbauweg, d.h. die Bildung des Ketoalkohols und Ketoaldehyds, und eine Reaktionsrate die gegenüber Lungenmikrosomen 200-fach erhöht ist (Smith *et al.* 1992). Spezifische Isoenzyme der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen mit hoher Aktivität sind nach den Autoren für die hohe Umsetzungsrate in der Nase verantwortlich (Guo *et al.* 1992; Smith *et al.* 1992). Nach oraler Gabe von NNK an Ratten (F344) zeigte die Nasenmucosa im Vergleich zur Leber eine 3- bis 4-fach höhere Alkylierungssrate d.h. Gehalt an O^6-Methylguanin (Belinsky *et al.* 1986). In Audioradiographiestudien an Ratten konnte nach i.v. Gabe von markiertem NNN und NNK die Radioaktivität hauptsächlich im respirativen und epithelialen Nasengewebe der Ratten nachgewiesen werden (Brittebo *et al.* 1983).
Affen zeigen ebenfalls eine hohe Metabolisierungsrate von NNN und NNK, wobei der Gehalt an gebundenen Metaboliten von [2´-^{14}C]NNN in der Nase ca. 1.5-fach höher im Vergleich zur Leber ist (Castonguay *et al.* 1985).

In Mikrosomen von olfaktorischem und respiratorischem Nasengewebe von Hasen konnte ebenfalls eine spezifische Aktivität zur Bildung des Ketoaldehyds und Ketoalkohols von NNK nachgewiesen werden. Die Aktivität der α-Hydroxylierung ist etwas geringer als in Rattenmikrosomen und das Metabolitenmuster um NNN-N-oxid im Vergleich zu Ratten erweitert (Hong *et al.* 1992).
Eine Carcinogenitätsstudie von NNN in Nerzen als Nicht-Nager-Spezies zeigte nach subcutaner Applikation ausschließlich die Ausbildung von Tumoren in der Nasenhöhle der Tiere, wodurch sie als Modellsysteme für Nasencarcinogenität geeignet sind (Koppang *et al.* 1992).

Untersuchungen des Metabolismus von NNN und NNK an menschlichen Gewebekulturen von Ösophagus, Lunge, Trachea und der Nasenhöhle zeigten die Fähigkeit der α-Hydroxylierung dieser Nitrosamine in den Geweben auf, wobei das Ausmaß jedoch um 1/10 bis 1/100 geringer als in Tiergeweben ist. Im Vergleich der einzelnen Gewebe wurde von der Nasenmucosa innerhalb 24 Std. 100% des zugegebenen NNN (10 nmol) metabolisiert, während Trachea und Bronchien nur 1% umsetzten. Auch NNK wird von den Geweben umgesetzt, allerdings beträgt die α-Hydroxylierung weniger als 1% der eingesetzten Menge (Castonguay *et al.* 1983).

Die oben aufgeführten Studien machen deutlich, daß das Nasengewebe als primärer Expositionsort der TSNA aus dem Schnupftabak durchaus in der Lage ist, die Nitrosamine in einem hohen Ausmaß zu ultimalen Carcinogenen zu aktivieren. Eine Möglichkeit, das Ausmaß der Belastung mit TSNA am Menschen direkt zu messen, besteht in der Bestimmung von spezifischen Hämoglobinaddukten, die vor kurzem identifziert wurden (Hecht *et al.* 1991; Carmella *et al.* 1990; Richter *et al.* 1992). Hintergrund dieser Untersuchungen ist der Metabolismus von NNN und NNK über α-Hydroxylierung, der neben Methylierung zu einer Pyridyloxobutylierung der Biomoleküle führen kann. Da Methylierungen von einer Vielzahl von Substanzen ausgelöst werden, sind pyridyloxobutylierte Addukte von Hämoglobin oder DNA als Biomarker geeigneter. Nach milder Basenbehandlung konnte die Freisetzung von 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butanol oder 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) als spezifisches Addukt der tabakspezifischen Nitrosamine aus dem Hämoglobin isoliert werden (siehe Abb.6). Hämoglobinaddukte haben gegenüber DNA-Addukten die Vorteile der leichten Zugänglichkeit, längere Lebenszeit der Erytrozyten und damit die Möglichkeit der Erfassung einer chronischen Exposition und einer guten Korrelation zu DNA-Addukten (Hammond *et al.* 1993).

Die Messung der 4-HPB-Addukte von Rauchern, Nichtrauchern und Konsumenten von Mundtabaken ergab in einer Studie von Carmella *et al.* (1990) unerwartet hohe mittlere Hämoglobinadduktkonzentrationen von 517 fmol HPB/g Hämoglobin bei Anwendern von Mundtabaken im Vergleich zu 80 fmol/g bei Rauchern und 30 fmol/g bei Nichtrauchern. Die Autoren gehen bei Rauchern und Konsumenten von Mundtabak von einer geschätzten Aufnahme von 5 µg/Tag NNN und NNK aus. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Ausmaß und der Dauer der oralen Snuffanwendung bzw. Anzahl der Zigaretten und den HPB-Gehalten festgestellt werden. Als Ursache für die wesentlich höhere Adduktmenge bei Konsumenten von Mundtabaken wird zum einen eine schnelle Bindung der Metabolite an Hämoglobin bei einer oraler Aufnahme und zum anderen eine endogene Nitrosierung von Nikotin und Nornikotin im Magen diskutiert. Eine endogene Nitrosierung von Nikotin kann jedoch nach einer Studie von Tricker *et al.* (1993) an Rauchern und Nichtrauchern ausgeschlossen werden. Zudem wird diskutiert, daß über das Rauchen, nicht aber über die rauchlosen Tabakprodukte, Fremdstoff-metabolisierende Enzyme aktiviert werden, die die

Adduktbildung bei Rauchern durch Detoxifizierungsreaktionen verringern (Carmella *et al.* 1990).

Ähnliche Ergebnisse, die Carmella *et al.* (1990) bei Konsumenten von Mundtabaken erzielte, konnte Richter *et al.* (nichtpublizierte Daten 1993) bei der Untersuchung der HPB-Addukte von Schnupfern, Rauchern und Nichtrauchern feststellen. Im Plasma von Schnupfern wurden im Mittel 425 fmol HPB/g Hämoglobin, bei Rauchern 70 fmol/g und bei Nichtrauchern 37 fmol/g nachgewiesen. Parallel dazu wurden in den verschiedenen Konsumentengruppen auch Hämoglobinaddukte von 4-Aminobiphenyl (4-ABP), einem Blasencarcinogen, nachgewiesen, das auch im wesentlichen auf das **Rauchen** zurückgeführt werden kann (Richter *et al.* 1992). 4-Aminobiphenyl kommt hauptsächlich im Nebenstromrauch (bis zu 143 ng/Zigarette), wenig im Hauptstromrauch (bis zu 5 ng/Zigarette) und nicht in den rauchlosen Tabakprodukten vor (Patrianakos und Hoffmann, 1979). Dabei zeigte sich das erwartete Bild, daß im Plasma der Raucher im Mittel die höchsten Konzentrationen des 4-Aminobiphenyladdukts von 132 pg/g Hämoglobin nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich dazu konnten im Plasma von Nichtrauchern 29 pg/g und von Schnupfern nur 15 pg Addukt/g Hämoglobin detektiert werden. Die höheren Adduktgehalte von 4-Aminobiphenyl der Nichtraucher gegenüber Schnupfern kann mit einer höheren Exposition der Nichtraucher zu Tabakrauch in der Umgebung, sogenanntem ETS (= environmental tobacco smoke) zusammenhängen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, daß die 4-Aminobiphenyl-Adduktmenge mit steigender Exposition zu ETS ebenfalls ansteigt (im Mittel <0.5 µg/m^3 Nikotin/Woche = 15 pg 4-ABP-Addukt/g Hämoglobin; im Mittel ≥2 µg/m^3 Nikotin /Woche = 26 pg/g) (Hammond *et al.* 1993). Die sehr geringen HPB-Adduktgehalte von Rauchern gegenüber Schnupfern wird von Richter *et al.* mit der Hypothese diskutiert, daß in der Lunge der Metabolismus der TSNA durch Nikotin selektiv gehemmt wird. Erste Versuche an Ratten mit NNK und einem 500-fachen Überschuß an Nikotin bestätigen diese Hemmung, jedoch nur bei subcutaner Gabe, d.h. bei einem first-pass Metabolismus in der Lunge. Allerdings konnte in diesem Zusammenhang Hong *et al.* (1992) zeigen, daß Nikotin die α-Hydroxylierung von NNK durch Cytochrom-P-450-Isoenzym NMa kompetitiv hemmt. Dieses Isoenzym konnte auch in olfactorischen und respiratorischen Mikrosomen von Hasen nachgewiesen werden, so daß eine hemmende Wirkung von Nikotin in der Nase nicht ausgeschlossen werden kann. Die hohen HPB-Adduktgehalte im Plasma der Schnupfer können unter Umständen auf die hohe Umsatzrate der TSNA in der Nase zurückzuführen sein. Zudem können die geringeren Werte bei Rauchern auf inhibierende Effekte von Substanzen im Tabakrauch zurückgeführt werden.

9. Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf ein mögliches Krebsrisiko

Verbindungen, die eine Bedeutung für ein mögliches Krebsrisiko von Schnupftabak besitzen, stellen die tabakspezifischen Nitrosamine (TSNA), insbesondere NNN und NNK dar.
Die mittlere tägliche Exposition eines regelmäßigen Schnupfers mit diesen Carcinogenen ist mit der mittleren Belastung eines Rauchers (20 Zigaretten / Tag) vergleichbar. Bei dieser Aussage ist allerdings zu berücksichtigen, daß der mittlere tägliche Konsum von Schnupfern schwer zu erfassen ist. Durch das Fehlen der Stickoxid- und Kohlenmonoxidexposition als wesentlich limitierenden Faktor des Rauchens ist der Konsum von Schnupftabak und damit die Aufnahme von Nikotin bei Schnupfern stark von dem individuellen Konsumentenverhalten abhängig und kann fast unbegrenzt in die Höhe getrieben werden. So konnte Russell *et al.* (1981) im Plasma eines britischen Schnupfers Höchstkonzentrationen von Nikotin von 129 ng/ml nachweisen, während bei regelmäßigen Rauchern nur bis zu 77 ng Nikotin/ml Plasma detektiert wurden. Die ebenfalls erhöhte Nikotinaufnahme von Mundtabakkonsumenten wird auch auf das Fehlen der simultanen Exposition mit Kohlenmonoxid zurückgeführt, wobei hier jedoch die längere Absorptionsmöglichkeit des Nikotins eine größere Rolle spielt (Huhtasaari *et al.* 1992; Bolinder *et al.* 1992). Da die Nikotinaufnahme mit der Aufnahme der TSNA aus dem Schnupftabak gleichgestellt ist, kann im Einzelfall von wesentlich höheren TSNA-Belastungen bei Schnupfern ausgegangen werden.
Als Folge der höheren Nikotinaufnahme konnte in einer "Cross-sectional-Studie" in Schweden eine Prävalenz zu erhöhtem Blutdruck bei rauchlosen Tabakkonsumenten im Vergleich zu Rauchern und "Tabak-freien" Personen aufgezeigt werden (Bolinder *et al.* 1992). In der erwähnten Studie werden allerdings unter rauchlosen Tabakkonsumenten vor allem Anwender der Mundtabake verstanden, da mit Ausnahme von Deutschland und England der nasale Gebrauch des Snuffs nur wenig verbreitet ist.
Die über den Schnupftabak aufgenommenen tabakspezifischen Nitrosamine müssen als Präcarcinogene mit Hilfe von Enzymsystemen zu den eigentlichen ultimalen Carcinogenen aktiviert werden. Wie aus den verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien (siehe Kapitel 8) hervorgeht, scheinen die Voraussetzungen zur Aktivierung der Nitrosamine zu carcinogenen Verbindungen in den Nasengeweben besonders gut gewährleistet zu sein (Reed, 1993). Dies kann unter anderem durch die Studie von Richter *et al.* belegt werden. Dabei konnten im Plasma von regelmäßigen Schnupfern wesentlich mehr tabakspezifische Hämoglobinaddukte als bei Rauchern nachgewiesen werden. Eine hohe Metabolisierungsrate der Stoffe nach nasaler Applikation zeigt sich auch durch die höheren Plasma-Cotininkonzentrationen von Schnupfern im Vergleich zu Rauchern. Cotinin stellt ein Abbauprodukt des Nikotins dar und konnte im Plasma von Schnupfern im Mittel in 23% höherer Konzentration als bei Rauchern nachgewiesen werden, obwohl die mittlere Plasma-Nikotinkonzentration bei beiden Verbrauchergruppen bei regelmäßigem Konsum ähnlich ist (Russell *et al.* 1981).

In Bezug auf den Metabolismus bzw. die Aktivierung der TSNA zu ultimalen Carcinogenen sind immer die individuellen Unterschiede zu beachten (Castonguay *et al.* 1983). In einer Untersuchung der tabakspezifischen Hämoglobinaddukte konnte in 23% der untersuchten Mundtabakkonsumenten und in 18% der Raucher wesentlich erhöhte Adduktmengen im Vergleich zu anderen Probanden der jeweiligen Gruppe

aufgezeigt werden (Carmella *et al.* 1990). Zudem ist der Einfluß anderer Stoffe wie z.B. Nikotin auf den Metabolismus der TSNA von Bedeutung. Nikotin hemmt den Metabolismus von NNN und NNK in oralem Geweben von Ratten, wobei die Wirkung auf NNN etwas größer als auf NNK ist. Dabei ist der inhibierende Effekt um so größer, je höher die Konzentration des Nikotins in den Kulturmedien gewählt wurde (Murphy und Heiblum, 1990). Die inhibierende Wirkung von Nikotin beruht wahrscheinlich auf einer Konkurrenzreaktion zwischen Nikotin und NNK um das metabolisierende Enzymsystem und darauf, daß Nikotin und NNK als Liganden für nikotinische, cholinerge Rezeptoren konkurrieren (Schuller *et al.* 1991). Hong *et al.* (1992) konnte feststellen, daß das Enzymsystem, das NNK metabolisiert und von einem Überschuß von Nikotin gehemmt wird, im olfaktorischen Nasengewebe von Hasen zu finden ist, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der hemmende Effekt von Nikotin auch in der Nase stattfinden kann. Da Nikotin in den Tabaken in 500-fach höheren Konzentrationen als die TSNA vorhanden ist, ist eine Hemmung des Metabolismus von NNN und NNK durch Nikotin bei Verwendung von Schnupftabak nicht auszuschließen. Damit wird jedoch auch das Krebsrisiko über diese Verbindungen gemindert.

In diesem Zusammenhang muß auch darauf verwiesen werden, daß es bisher keine epidemiologischen Studien in dem für die untersuchten Schnupftabake interessierenden Konsumentenraum gibt, die eine Korrelation zwischen der Verwendung von Schnupftabak und der Entstehung von Nasenhöhlen- bzw. Nasennebenhöhlenkrebs aufzeigen. Zwei Fall-Kontrollstudien bei einer Bantu-Subpopulation in Südafrika zeigen zwar ein schwach erhöhtes Nasenkrebsrisiko mit dem Gebrauch von Snuff, jedoch ist zum einen nicht geklärt, ob der Snuff oral oder nasal angewendet wird, zum anderen besitzt der Snuff eine besondere Zusammensetzung, die mit europäischen Schnupftabaken nicht zu vergleichen ist. Er enthält Asche von Aloe und ist stark mit Schwermetallen belastet. Andere Tabakkonsumgewohnheiten, wie z. B. das Rauchen wurden in der Studie zudem nicht berücksichtigt (Baumschlag und Keen, 1971; Higginson und Oettlé, 1960). Die Untersuchung von 160 Patienten mit Nasenhöhlen- und Nasennebenhöhlenkrebs eines Krankenhauses in North Carolina/Virginia im Vergleich zu 290 Kontrollen ergab eine Korrelation für Plattenepithelcarcinome (relativ risk: RR=1.9) und für Adenocarcinome (relativ risk: RR=3.1) im Zusammenhang mit dem Gebrauch von rauchlosem Tabak, worunter jedoch oraler Snuff verstanden wird (Brinton *et al.* 1984). In dieser Studie wurden ebenfalls eventuelle begleitende Rauchgewohnheiten außer Acht gelassen. Neuere Studien, in denen auch die nasale Anwendung von Snuff berücksichtigt wird, wurden von Sankaranarayanan *et al.* in Indien durchgeführt. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem Schnupfen und Zahnfleischkrebs festgestellt werden (Sankaranarayanan *et al.* 1989), jedoch kein Zusammenhang zur Krebsentstehung am Kehlkopf (Sankaranarayanan *et al.* 1990) oder Ösophagus (Sankaranarayanan *et al.* 1991). Die Autoren geben zu bedenken, daß die Korrelation zwischen der Anwendung von Snuff und der Entstehung von Zahnfleischkrebs (RR = 3.9 bei täglichem Gebrauch) noch einmal bestätigt werden muß, da nur wenige Probanden (5) zur Verfügung standen. Nachteil dieser Studie ist, daß die Zusammensetzung der in der Nase verwendeten Schnupftabake nicht bekannt ist. Die TSNA Gehalte indischer Schnupftabake sind nach Studien von Tricker und Preussmann (1988; 1989; 1992) stark unterschiedlich. In Zarda konnten wesentlich höhere Gehalte, bis zu 13.4 mg/kg NNN und NNK, als in europäischen Schnupftabaken nachgewiesen werden (Tricker und Preussmann, 1988), so daß die Vergleichbarkeit nicht gewährleistet ist. Im Gegensatz zum Schnupftabak existieren zur Anwendung von Mundtabaken eine Reihe von Studien über positive Korrelationen zwischen Mundtabakkonsum und der Ent-

wicklung von Mundhöhlenkrebs (Boyle *et al.* 1990; Cullen *et al.* 1986; Connolly *et al.* 1986; Kaugars *et al.* 1992; Langdon, 1985; Winn, 1988) und anderen Krebsarten wie z.B. Ösophaguskrebs (Winn, 1988), Magenkrebs (Kneller *et al.* 1991), Postatakrebs (Hsing *et al.* 1990) und Bauchspeicheldrüsenkrebs (Heuch *et al.* 1983). In einer Studie von Tolbert *et al.* (1991) konnte bei Konsumenten von Mundtabaken eine größere Anzahl von Mikrokernen in Epithelzellen der Backengewebe nachgewiesen werden als bei Rauchern oder Rauch- und Tabak-freien Personen. Da jedoch bei der Anwendung von rauchlosen Tabakprodukten im Mund und in der Nase völlig andere Bedingungen berücksichtigt werden müssen (längere Absorptionszeiten, bakterielle Umgebung im Mund, Verschlucken der Substanzen), ist ein Vergleich der Studien von Mundtabakkonsumenten mit Studien über Schnupfer nicht aussagekräftig.

Im Vergleich zur Zigarette sind im Schnupftabak als rauchlosem Tabakprodukt natürlich wesentlich weniger Stoffe enthalten, die eine bekannte carcinogene Wirkung im Tierversuch aufweisen. Im Zigarettenrauch sind über 2000 verschiedene Substanzen enthalten wie z.B. aromatische Amine, 4-Aminobiphenyl oder 2-Naphtylamin (Vineis *et al.* 1990). In diesem Zusammenhang zeigte ein Vergleich der mutagenen Aktivität von Urinen von Rauchern mit dem von Konsumenten von Mundtabaken eine wesentlich erhöhte Aktivität bei den Rauchern (Curvall *et al.* 1987). Auch das Herzinfaktrisiko ist bei Rauchern erhöht, während bei täglichem Snuffgebrauch kein erhöhtes Risiko festgestellt werden konnte (Huhtasaari *et al.* 1992). Die Autoren dieser Fall-Kontroll-Studie gehen davon aus, daß beim Rauchen die Toxizität von Kohlenmonoxid oder der aromatischen Kohlenwasserstoffe bei myocardialen Erkrankungen eine große Rolle spielen.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß durch die Anwendung von Schnupftabak eine mit dem Rauchen vergleichbare Exposition mit tabakspezifischen Nitrosaminen gegeben ist. Das Enzymsystem, das diese Präcarcinogene zu den eigentlich, im Tierversuch wirksamen Carcinogenen metabolisiert, ist im Nasengewebe reichlich vorhanden. Neuere Studien zeigen jedoch eine Inhibierung des Enzymsystems durch ein Überschuß Nikotin, der im Tabak vorhanden ist. Inwieweit letzteres auch auf den Nitrosaminmetabolismus in der menschlichen Nasenschleimhaut zutrifft, ist noch unbekannt. Im Gegensatz zum Zigaretten- und Mundtabakkonsum existieren bisher keine eindeutigen epidemiologischen Studien zur Korrelation zwischen der nasalen Anwendung von Snuff und der Entstehung von Krebs. Somit kann eine Krebsentstehung durch Verwendung von Schnupftabak nicht ausgeschlossen werden, jedoch bisher auch nicht eindeutig belegt werden.

10. Analytik

10.1. Vorbereitung der Proben

4-5 g Schnupftabak oder Tabakmehl wurden über Nacht mit 100 ml 0.01n NaOH, in der 100 ppm Natriumethylmercurythiosalicylat enthalten sind, extrahiert. Nach Zentrifugation der Proben wurde der Überstand zur Analytik auf tabakspezifische und nicht-flüchtige Nitrosamine verwendet.

10.2. Analytik der tabakspezifischen Nitrosamine

Die Bestimmung der präformierten TSNA in den Schnupftabakproben und -mehlen erfolgte nach der Methode von Spiegelhalder *et al.* (Spiegelhalder *et al.* 1989). Hierzu wurden 10 ml der vorbereiteten alkalischen Tabaklösung (aus 1.) mit 1 ml interner Standardlösung NPICPEN (N-Nitrosopentyl-3-picolylamin in Ethanol) in einer Konzentration von 1 µg/ml und 10 ml Wasser versetzt. Diese Lösung wurde einer flüssig/flüssig Extraktion an Extrelut (Merck, Darmstadt) unterworfen. Dazu wurde eine Glassäule mit 2 g Extrelut, 5 g Ascorbinsäure und weiteren 18 g Extrelut (Merck) gefüllt. Zur Extraktion wurde die wäßrige Lösung auf die Säule gegeben und nach 30 minütiger Einwirkzeit mit 40 ml Dichlormethan in ein Kuderna-Danish-Konzentrator, der aus einem graduierten 10 ml Receiver und einem Luftkühler mit Kugelaufsatz besteht, eluiert. Nach Zugabe von 1.5 ml Hexan und einigen Siedesteinen wird die Probe im Heizblock bei 80 C auf 5 ml eingeengt. Nach dem Abkühlen wird der Konzentrator mit 1-2 ml Dichlormethan gespült und die Lösung unter Stickstoff auf 1 ml eingeengt. Nach dem Abfüllen wird diese Lösung zur Gaschromatographie verwendet.

Die für diese Proben optimalen Gaschromatographiebedingungen sind:

Säule:	2.4 m x 2 mm Glassäule mit 3 % OV 275 auf Chromosorb W/HP
Trägergas:	Helium 30 ml/min
Injektor:	220° C
Temperaturprogramm:	180°C/2min mit 7°C/min auf 200°C/2 min mit 10°C/min auf 240 min/20 min

Ein typisches Gaschromatogramm einer Standardmischung der TSNA ist in der folgenden Abbildung wiedergegeben. Unter den gewählten Bedingungen werden NAT/NAB nicht getrennt. Die Nachweisgrenze der Methode beträgt 0.1 µg/kg Tabak.

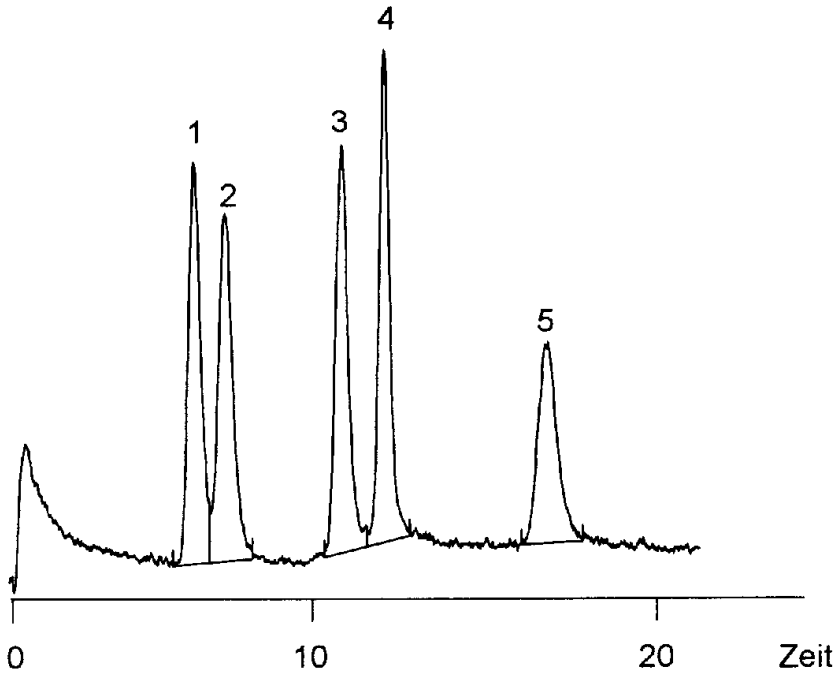


Abbildung 7: Chromatogramm eines TSNA-Standards (1 µg/ml in Ethanol); 1: NPICPent (interner Standard), 3: NAT, 4: NNN, 5: NNK11.3. Bestimmung der nicht-flüchtigen Nitrosamine

10.3. Bestimmung der nicht-flüchtigen Nitrosamine

Die Bestimmung der nicht-flüchtigen Nitrosamine erfolgt nach der Methode von Tricker *et al.* (1988). Hierzu werden 10 ml der alkalischen Tabaklösung (siehe 1.) mit 15 g Ammoniumsulphat, 1 ml 15 % Amoniumsulphamatlösung in 3.6 n Schwefelsäure und 1 ml interner Standard NCPIP (N-Nitroso-4-carboxypiperidin, 1 µg/ml in Aceton) versetzt. Diese Lösung wird auf eine Glassäule, die mit 2 g Extrelut, 5 g wasserfreiem Ammoniumsulphat und weiteren 18 g Extrelut beschickt ist, zur flüssig/flüssig Extraktion gegeben. Nach 30 min Einwirkzeit werden die nicht-flüchtigen Nitrosamine mit 80 ml Ethylacetat in einen 150 ml Rundkolben eluiert. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockene abrotiert. Um dies zu erreichen, ist es hilfreich 50 ml Cyclohexan zuzugeben und erneut abzurotieren. Der trockene Rückstand im Kolben wird mit Aceton in einen Spitzkölbchen überführt und unter Stickstoff zur Trockene abgeblasen. Durch Zugabe einer konzentrierten Diazomethanlösung werden die Carbonsäuren 30 min bei Raumtemperatur methyliert. Nach Abblasen der Diazomethanlösung unter Stickstoff wird die Probe in 1 ml Methanol aufgenommen und zur Gaschromatographie verwendet.

Gaschromatographiebedingungen:

Säule:	1.2 m x 2 mm Glassäule mit 10 % OV 275 auf Volaspher A2
Trägergas:	Helium 30 ml/min
Injektor:	200° C
Temperaturprogramm:	160°C/0min mit 5°C/min auf 200°C/20 min

Ein typisches Gaschromatogramm einer Standardmischung der methylierten, nicht-flüchtigen Nitrosamine ist in der folgenden Abbildung wiedergegeben. Die Nachweisgrenze der Methode beträgt 0.1 µg/kg Tabak.

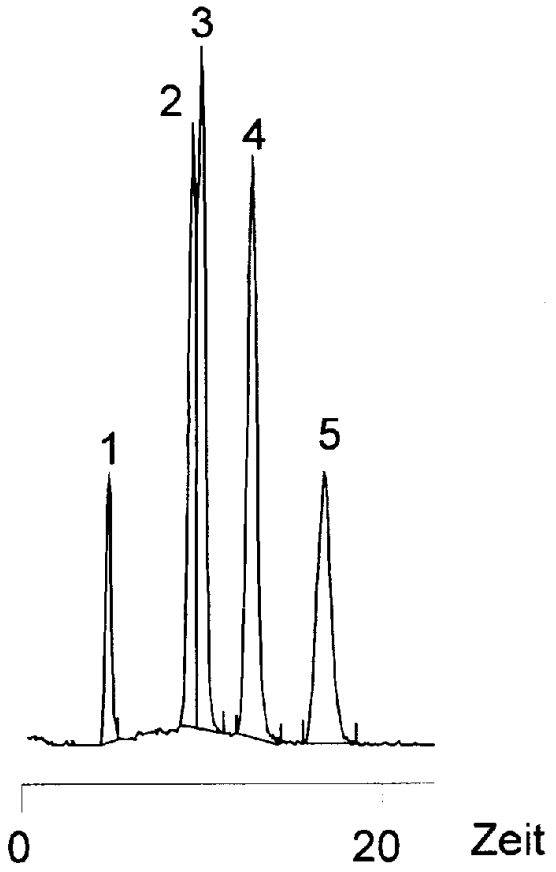


Abbildung 8: Gaschromatogramm eines Standardgemisches der nicht-flüchtigen Nitrosamine (Konzentration 1 µg/ml in Aceton): 1: NSAR; 2: NPIC; 3: NMPA; 4: NPRO; 5: NCPIP (interner Standard)

10.4. Nitrat/Nitrit-Bestimmung

Zur Bestimmung des Nitrit/Nitrat-Gehaltes der Tabakproben wurde ebenfalls der alkalische Überstand (wie unter 1. beschrieben) verwendet. Nitrit wurde nach Diazotierung mit Sulfanilamid und anschließender Kopplung mit N-(1-nahptyl)-ethylendiamin als Diazofarbstoff photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte bei 450 nm in einem kontinuierlichen Durchflußphotometer. Nitrat wird nach Reduktion in einer Kupfer-Cadmium-Säule wie Nitrit nachgewiesen und die Konzentration über Differenzbildung ermittelt. Der Meßbereich für Nitrit liegt zwischen 1 und 50 ppm, für Nitrat zwischen 2 und 250 ppm. Höher konzentrierte Lösungen wurden mit dest. Wasser verdünnt und nochmals vermessen. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit Nitrit-/Nitratstandardlösungen. Durch Vergleich der Peakhöhen wurden die Nitrit/Nitratgehalte der Proben bestimmt.

11. Literatur

Adams, J.D., Owens Tucciarone, P. und Hoffmann, D., Tobacco-specific N-nitrosamines in dry snuff, *Food Chem Toxicol*, 25 (3), 245-246, **1987**.

Andersen, R.A., Fleming, P.D., Burton, H.R., Hamilton-Kemp, T.R. und Sutton, T.G., Nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloids during storage of smokeless tobaccos: effects of moisture, temperature, and their interactions, *J.Agric.Food Chem.*, 39, 1280-1287, **1991**.

Archer, M.C., Mechanisms of action of N-nitroso compounds, *Cancer Surv.*, 8, 241-253, **1989**.

Baumslag, N. und Keen, P., Carcinoma of the maxillary antrum and its relationship to trace metal content of snuff, *Arch. environ. Health*, 23, 1-5, **1971.**

Belinsky, S.A., White, C.M., Boucheron, J.A., Richardson, F.C., Swenberg, J. und Anderson, M., Accumulation and persistence of dna adducts in respiratory tissue of rats following multiple administrations of the tobacco specific carcinogen 4-(n-methyl-n-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Cancer Res.*, 46 (3), 1280-1284, **1986**.

Bolinder, G.M., Ahlborg, B.O. und Lindell, J.H., Use of smokeless tobacco: Blood pressure elevation and other health hazards found in a large-scale population survey, *J.Intern.Med.*, 232, 327-334, **1992**.

Boyle, P., Macfarlane, G.J., Maisonneuve, P., Zheng, T., Scully, C. und Tedesco, B., Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review (see comments), *J R.Soc.Med*, 83, 724-730, **1990**.

Brinton, L.A., Blot, W.J., Becker, J.A., Winn, D.M., Browder, J.P., Farmer, J.C.., Jr., und Fraumeni, J.F.,Jr., A case-control study of cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses, *Am.J.Epidemiol.*, 119, 896-906, **1984**.

Brittebo, E.B., Castonguay, A., Furuya, K. und Hecht, S.S., Metabolism of tobacco-specific nitrosamines by cultured rat nasal mucosa, *Cancer Res.*, 43 (9), 4343-4348, **1983**.

Brunnemann, K.D., Genoble, L. und Hoffmann, D., N-Nitrosamines in chewing tobacco: an international comparison, *J.Agric.Food Chem.*, 33, 1178-1181, **1985**.

Brunnemann, K.D., Genoble, L. und Hoffmann, D., Identification and analysis of a new tobacco-specific n-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol, *Carcinogenesis*, 8(3), 465-469, **1987**.

Brunnemann, K.D. und Hoffmann, D., Assessment of the carcinogenic N-nitrosodiethanolamine in tobacco products and tobacco smoke, *Carcinogenesis*, 2, 1123-1127, **1981**.

Brunnemann, K.D. und Hoffmann, D., Analytical studies on tobacco-specific n-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke, *Crit. Rev. Toxicol.*, 21 (4), 235-240, **1991**.

Brunnemann, K.D., Hornby, A.P. und Stich, H.F., Tobacco-specific nitrosamines in the saliva of inuit snuff dippers in the northwest territories of canada, *Cancer Lett.*, 37 (1), 7-16, **1987**.

Carmella, S.G., Kagan, S.S., Kagan, M., Foiles, P.G., Palladino, G., Quart, A., Quart, E. und Hecht, S.S., Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff dippers, smokers, and nonsmokers, *Cancer Res.*, 50 (17), 5438-5445, **1990**.

Castonguay, A., Stoner, G.D., Schut, H.A. und Hecht, S.S., Metabolism of tobacco-specific n-nitrosamines by cultured human tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (21), 6694-6697, **1983**.

Castonguay, A., Tjaelve, H., Trushin, N., D'Argy, R. und Sperber, G., Metabolism and tissue distribution of tobacco-specific N-nitrosamines in the marmoset monkey (Callithrix jacchus), *Carcinogenesis*, 6, 1543-1550, **1985**.

Chamberlain, W.J., Schlotzhauer, W.S. und Chortyk, O.T., Chemical composition of nonsmoking tobacco products, *J.Agric.Food Chem.*, 36, 48-50, **1988**.

Connolly, G.N., Winn, D.M., Hecht, S.S., Henningfield, J.E., Walker, B.,Jr. und Hoffmann, D., The reemergence of smokeless tobacco, *N.Engl.J.Med.*, 314 (16), 1020-1027, **1986**.

Cullen, J.W., Blot, W., Henningfield, J., Boyd, G., Mecklenburg, R., Massey, M.. und M., , Health consequences of using smokeless tobacco: summary of the advisory committee's report to the surgeon general, *Public Health Rep.*, 101 (4), 355-373, **1986**.

Curvall, M., Romert, L., Norlen, E. und Enzell, C.R., Mutagen levels in urine from snuff users, cigarette smokers and non tobacco users--a comparison, *Mutat Res*, 188 (2), 105-110, **1987**.

Djordjevic, M.V., Brunnemann, K.D. und Hoffmann, D., Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco, *Carcinogenesis*, 10 (9), 1725-1731, **1989**.

Djordjevic, M.V., Brunnemann, K.D. und Hoffmann, D., The need fo regulation of carcinogenic N-nitrosamines in oral snuff, *Food Chem Toxicol*, 31, 497-501, **1993**.

Fannin, F.F. und Bush, L.P., Nicotine demethylation in *nicotiana*, *Med.Sci.Res.*, 20, 867-868, **1992**.

Fischer, S., Spiegelhalder, B. und Preussmann, R., Preformed tobacco-specific nitrosamines in tobacco - role of nitrate and influence of tobacco type, *Carcinogenesis*, 10, 1511-1517, **1989**.

Fischer, S., Spiegelhalder, B. und Preussmann, R., Tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of West German cigarettes - tar alone is not a sufficient index for the carcinogneic potential of cigarette smoke, *Carcinogenesis*, 10, 169-173, **1989**.

Grimmer, G., Naujack, K.-W. und Dettbarn, G., Gaschromtatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, aza-arenes, aromatic amines in the particlem and vapor phase of mainstream and sidestream smoke of cigarettes, *Toxicol.Lett.*, 35, 117-124, **1987**.

Guo, Z., Smith, T.J., Thomas, P.E. und Yang, C.S., Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by inducible and constitutive cytochrome P450 enzymes in rats, *Arch.Biochem.Biophys.*, 298, 279-286, **1992**.

Hammond, S.K., Coghlin, J., Gann, P.H., Paul, M., Taghizadeh, K., Skipper, P.L. und Tannenbaum, S.R., Relationship between environmental tobacco smoke exposure and smoke exposure and carcinogen-hemoglobin adduct levels in nonsmokers, *J Natl Cancer Inst*, 85, 474-478, **1993**.

Hecht, S.S., Carmella, S.G. und Murphy, S.E., Hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to and metabolic activation of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines, *Biomed.Environ.Sci*, 4, 93-103, **1991**.

Hecht, S.S. und Hoffmann, D., Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke, *Carcinogenesis*, 9 (6), 875-884, **1988**.

Hecht, S.S. und Hoffmann, D., The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer, *Cancer Surv.*, 8, 273-294, **1989**.

Heuch, I., Kvale, G., Jacobsen, B.K. und Bjelke, E., Use of alcohol, tobacco and coffee, and risk of pancreatic cancer, *Br.J Cancer*, 48, 637-643, **1983**.

Higginson, J. und Oettlém, A.G., Cancer incidence in the Banut and "Cape Colored" races of South Africa. Report of a cancer survey in the Tranvaval (1953-55)., *J. Natl cancer Inst*, 24, 589-671, **1960**.

Hoffmann, D. und Adams, J.D., Carcinogenic Tobacco-specific N-Nitrosamines in Snuff and in the Saliva of Snuff Dippers, *Cancer Res.*, 41, 4305-4308, **1981**.

Hoffmann, D., Adams, J.D., Lisk, D., Fisenne, I. und Brunnemann, K.D., Toxic and carcinogenic agents in dry and moist snuff, *J Natl Cancer Inst*, 79 (6), 1281-1286, **1987**.

Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., Adams, J.D. und Hecht, S.S., Formation and analysis of n-nitrosamines in tobacco products and their endogenous formation in consumers (70 refs), *IARC Sci Publ*, 57, 743-762, **1984**.

Hoffmann, D., Brunnemann, K.D. und Venitt, S., Carcinogenic nitrosamines in oral snuff (letter), *Lancet*, 1, 1232, **1988**.

Hoffmann, D., Djordjevic, M.V. und Brunnemann, K.D., New brands of oral snuff, *Food Chem Toxicol*, 29 (1), 65-68, **1991**.

Hoffmann, D., Harley, N.H., Fisenne, I., Adams, J.D. und Brunnemann, K.D., Carcinogenic agents in snuff, *J Natl Cancer Inst*, 76, 435-437, **1986**.

Hoffmann, D. und Hecht, S.S., Nicotine derived N-nitrosamines and tobacco related cancer: current status and future directions, *Cancer Res.*, 45, 935-944, **1985**.

Hoffmann, D., Rivenson, A., Chung, F.L. und Hecht, S.S., Nicotine-derived N-nitrosamines (TSNA) and their relevance in tobacco carcinogenesis, *Crit. Rev. Toxicol.*, 21, 305-311, **1991**.

Holm, H., Jarvis, M.J., Russell, M.A.H. und Feyerabend, C., Nicotine intake and dependence in Swedish snuff takers, *Psychopharmacology*, 108, 507-511, **1992**.

Hong, J.-Y., Ding, X., Smith, T.J., Coon, M.J. und Yang, C.S., Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific carcinogen, by rabbit nasal microsomes and cytochrome P450s NMa and NMb, *Carcinogenesis*, 13, 2141-2144, **1992**.

Hsing, A.W., McLaughlin, J.K., Schuman, L.M., Bjelke, E., Gridley, G., Wacholder, S., Chien, H.T. und Blot, W.J., Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study (see comments), *Cancer Res.*, 50, 6836-6840, **1990**.

Huhtasaari, F., Asplund, K., Lundberg, V., Stegmayr, B. und Wester, P.O., Tobacco and myocardial infarction: Is snuff less dangerous than cigarettes, *BMJ*, 305, 1252-1256, **1992**.

Idris, A.M., Nair, J., Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., Faustman, E. und Bartsch, H., Unusually high levels of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in sudan snuff (toombak), *Carcinogenesis*, 12 (6), 1115-1118, **1991**.

Johansson, C.J., Olsson, P., Bende, M., Carlsson, T. und Gunnarsson, P.O., Absolute bioavailability of nicotine applied to different nasal regions, *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 41, 585-588, **1991**.

Kaiserman, M.J. und Rickert, W.S., Carcinogens in tobacco smoke: benzo(a)pyrene from Canadian cigarettes and cigarettes tobacco, *Am.J.Public Health*, 82, 1023-1026, **1992**.

Kaugars, G.E., Riley, W.T., Brandt, R.B., Burns, J.C. und Svirsky, J.A., The prevalence of oral lesions in smokeless tobacco users and an evaluation of risk factors, *Cancer*, 70, 2579-2585, **1992**.

Kneller, R.W., McLaughlin, J.K., Bjelke, E., Schuman, L.M., Blot, W.J., Wacholder, S., Gridley, G., CoChien, H.T. und Fraumeni, J.F.,Jr., A cohort study of stomach cancer in a high-risk American population, *Cancer*, 68, 672-678, **1991**.

Koppang, N., Rivenson, A., Reith, A., Dahle, H.K., Evensen, O. und Hoffmann, D., A study of tobacco carcinogenesis XLVIII. Carcinogenicity of *N'*-nitrosonornicotine in mink (*Mustela vison*), *Carcinogenesis*, 13, 1957-1960, **1992**.

Langdon, J.D., Epidemiology and aetiology of oral cancer, *Manage Malignant Dis Ser*, 8, 1-13, **1985**.

Link, J.O., Kaugars, G.E. und Burns, J.C., Comparison of oral carcinomas in smokeless tobacco users and nonusers, *J Oral Maxillofac Surg*, 50, 452-455, **1992**.

Murphy, S.E. und Heiblum, R., Effect of nicotine and tobacco-specific nitrosamines of N'-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Carcinogenesis*, 11 (9), 1663-1666, **1990**.

Ohshima, H., Nair, J., Bourgade, M.C., Friesen, M., Garren, L. und Bartsch, H., Identification and occurrence of two new n-nitrosamino acids in tobacco products: 3-(n-nitroso-n-methylamino)propionic acid and 4-(n- nitroso-n-methylamino)butyric acid, *Cancer Lett.*, 26 (2), 153-162, **1985**.

Olsson, P., Kuylenstierna, F., Johansson, C.J., Gunnarsson, P. and Bende, M. Pharmacokinetics of nicotine after intranasal administration. In: *Eff. Nicotine Biol. Syst., [Satell. Symp.], Meeting Date 1990, 57-61. Edited by: Adlkofer, Franz; Thurau, Klaus. Birkhaeuser: Basel, Switz*, **1991**,

Osterdahl, B.G. und Slorach, S., N-Nitrosamines in snuff and chewing tobacco on the Swedish market in 1983, *Food Addit Contam*, 1, 299-305, **1983**.

Patrianakos, C. und Hoffmann, D., Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke, *J Analy Tox*, 3, 150-154, **1979**.

Prokopczyk, B., Wu, M., Cox, J.E. und Hoffmann, D., Bioavailability of tobacco-specific N-nitrosamines to the snuff dipper, *Carcinogenesis*, 13, 863-866, **1992**.

Reed, C.J., Drug metabolism in the nasal cavity: relevance to toxicology, *Drug Metab.Dispos.*, 25, 173-205, **1993**.

Richter, E., Schäffler, G., Malone, A. und Schulze, J., Tobacco-specific nitrosamines--Metabolism and biological monitoring of exposure to tobacco products, *Klin.Wochenschr.*, 70, 290-294, **1992**.

Russell, M.A.H., Jarvis, M.J., Devitt, G und Feyerabend, C., Nicotine intake by snuff users, *Br Med J (Clin Res Ed)*, 283, 814-817, **1981**.

Russell, M.A.H., Jarvis, M.J. und Feyerabend, C., A new age for snuff? *Lancet*, 474-475, **1980**.

Russell, M.A.H., Jarvis, M.J., Feyerabend, C. und Fernoe, O., Nasal nicotine solution: a potential aid to giving up smoking? *Br Med J (Clin Res Ed)*, 286, 683-684, **1983**.

Sankaranarayanan, R., Duffy, S.W., Nair, M.K., Padmakumary, G. und Day, N.E., Tobacco and alcohol as risk factors in cancer of the larynx in Kerala, India, *Int J Cancer*, 45, 879-882, **1990**.

Sankaranarayanan, R., Duffy, S.W., Padmakumary, G., Day, N.E. und Padmanabhan, T.K., Tobacco chewing, alcohol and nasal snuff of the gingiva in Kerala, India, *Br.J Cancer*, 60, 638-643, **1989**.

Sankaranarayanan, R., Duffy, S.W., Padmakumary, G., Nair, S.M., Day, N.E. und Padmanabhan, T.K., Risk factors for cancer of the oesophagus in Kerala, India, *Int J Cancer*, 49, 485-489, **1991**.

Schuller, H.M., Castonguay, A., Orloff, M. und Rossignol, G., Modulation of the uptake and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by nicotine in hamster lung, *Cancer Res.*, 51, 2009-2014, **1991**.

Smith, T.J., Guo, Z., Hong, J.Y., Ning, S.M., Thomas, P.E. und Yang, C.S., Kinetics and enzyme involvement in the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in microsomes of rat lung and nasal mucosa, *Carcinogenesis*, 13, 1409-1414, **1992**.

Spiegelhalder, B., Kubacki, S.J. und Fischer, S., A method for the determination of tobacco-specific nitrosamines, nitrate and nitrite in tobacco leaves and processed tobacco, *Beitr. Tabakforsch.*, 14, 135-144, **1989**.

Sutherland, G., Russell, M.A.H., Stapleton, J., Feyerabend, C. und Ferno, O., Nasal nicotine spray: a rapid nicotine delivery system, *Psychopharmacology*, 108, 512-518, **1992**.

Tolbert, P.E., Shy, C.M. und Allen, J.W., Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users, *Am.J.Epidemiol.*, 134, 840-850, **1991**.

Tricker, A.R. und Preussmann, R., The occurrence of n-nitro compounds in zarda tobacco, *Cancer Lett.*, 42 (1 2), 113-118, **1988**.

Tricker, A.R. and Preussmann, R. Preformed nitrosamines in smokeless tobacco. In: *Tobacco and cancer, perspectives in preventative research*, edited by Maskins, A.P., Molimard, R., Preussmann, R. and Wilmer, J.W. Amsterdam: Elsevier Science, **1989 a**, p. 35-47.

Tricker, A.R. und Preussmann, R., The occurrence of n-nitroso compounds in kiwam tobacco, *Cancer Lett.*, 46 (3), 221-224, **1989 b**.

Tricker, A.R. und Preussmann, R., Exposure to nicotine-derived N-nitrosamines from smokeless tobacco and evidence against their endogenous formation, *Adv. Pharm. Sci*, 109-113, **1992**.

Tricker, A.R., Scherer, G., Conze, C., Adlkofer, F., Pachinger, A. und Klus, H., Evaluation of 4-(N-methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butyric acid as a potential monitor of endogenous nitrosation of nicotine and its metabolites, *Carcinogenesis*, **1993**.

Tricker, A.R., Siddiqi, M.A. and Preussmann, R. N-nitroso compounds in indian tobacco. In: *N-Nitroso Compounds*, edited by Bhide, S.V. and Rao, K.V.K. New Dehli: Omega Scientific Publishers, **1989**, p. 41-49.

Van Benthem, J., Wilmer, J.W., Den Engelse, L. und Scherer, E., Localization of DNA adducts formed in the nasal cavity of the rat by the tobacco-specific nitrosamine 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3- pyridyl)-1-butanone (NNK), *IARC Sci Publ*, 496-501, **1991**.

Vineis, P., Caporaso, N., Tannenbaum, S.R., Skipper, P.L., Glogowski, J., Bartsch, H., Coda, M., Talaska, G. und Kadlubar, F., Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts, and cigarette smoking, *Cancer Res.*, 50, 3002-3004, **1990**.

Winn, D.M., Smokeless tobacco and cancer: the epidemiologic evidence, *Cancer J Clin*, 38 (4), 236-243, **1988**.