

# Analyse von prähistorischer Zahnhartsubstanz auf Betelnussalkaloide mit Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS und LC-HR-TOF-MS)

Merja A. Neukamm<sup>1,\*</sup>, Miriam Klima<sup>1</sup>, Laura M. Huppertz<sup>1</sup>, Markus J. Altenburger<sup>2</sup>, Volker Auwärter<sup>1</sup>, Andreas Reinecke<sup>3</sup>, Simone Kraiss<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg;

\*korrespondierender Autor: merja.neukamm@uniklinik-freiburg.de

<sup>2</sup>Universitätsklinikum Freiburg, Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Hugstetter Straße 55, D-79106 Freiburg

<sup>3</sup>Deutsches Archäologisches Institut, Kommission für Archäologie Außereuropäischer Kulturen (KAAK), Dürenstraße 35-37, D-53173 Bonn

<sup>4</sup>Universität Freiburg, Biologische Anthropologie, Hebelstraße 29, D-79104 Freiburg

**Aim:** The consumption of the so called betel quid is quite common in Asia to date due to its stimulating effects. Traditionally, it consists of a betel nut (*Areca catechu*) which is wrapped together with slaked lime (calcium hydroxide) in a leaf of *Piper betle*. Continuous betel quid chewing typically results in a visible red stain of saliva and teeth. The aim of this study was to investigate which alkaloids are incorporated into dental hard tissue after betel nut chewing, and to provide analytical evidence that the betel quid was already chewed in prehistory. **Methods:** An individual from the burial site Gò Ô Chùa (Vietnam, Early Iron Age, 400-100 BC) showed reddish overall tooth staining, with more intense spots at the occlusal enamel parts. The red stains of one molar and the inner dentin were removed with a fine dental drill. The powder was extracted with methanol and analysed by LC-MS/MS and LC-QTOF-MS. *In-vitro*, acid-treated bovine enamel and dentin pellets were treated for 14 days with a paste of pulverised betel nut and calcium hydroxide. All specimens were powdered, extracted with methanol and analysed by LC-MS/MS. **Results:** In the prehistoric tooth enamel, arecoline, one of the characteristic alkaloids of *Areca catechu* was found as well as arecaidine and guvacine. Arecolidine was tentatively identified. Arecaidine and guvacine are typically formed during chewing of betel quid. In the prehistoric dentin, no alkaloids were found. After *in-vitro* treatment with betel nut paste, mainly arecoline was present in the enamel pellets and mainly arecaidine was present in the dentin pellets. **Conclusion:** The analytical finding of areca alkaloids in the prehistoric tooth enamel with characteristic staining suggests that betel quid has been chewed probably for recreational purposes. Use of betel nut for ritual tooth staining seems less plausible.

## 1. Einleitung

Der Konsum des sogenannten Betelbissens als Genussmittel ist in Südostasien recht verbreitet. Weltweit gibt es ca. 600 Millionen Menschen, die regelmäßig Betel kauen [1]. Bei dem sogenannten Betelbissen handelt es sich um ein Päckchen, das aus der Frucht der Betelnusspalme (Betelnuss, *areca catechu*), dem Blatt des Betelpfeffers (*piper betle*) und gelöschtem Kalk (slaked lime, Calciumhydroxid) besteht. Beim Kauen des Betelbissens entwickelt sich eine milde anregende Wirkung mit einer Steigerung des Wohlbefindens. Der Betelbissen zählt weltweit zusammen mit Alkohol, Tabak und Kaffee zu den am häufigsten konsumierten potentiell abhängigkeiterzeugenden Mitteln [1].

Hauptinhaltsstoffe der Betelnuss sind 0,3 – 0,6 % Alkaloide: Arecolin (0,1 – 0,5 %), Arecaidin, Arecolidin, Guvacolin und Guvacin [2]. Beim Kauen der Betelnuss mit Calciumhydroxid werden die Ester gespalten, aus Arecolin wird Arecaidin freigesetzt und aus Guvacolin wird Guvacin freigesetzt, außerdem entwickelt sich der typische rote Farbstoff Arecarot (ein Tannin).

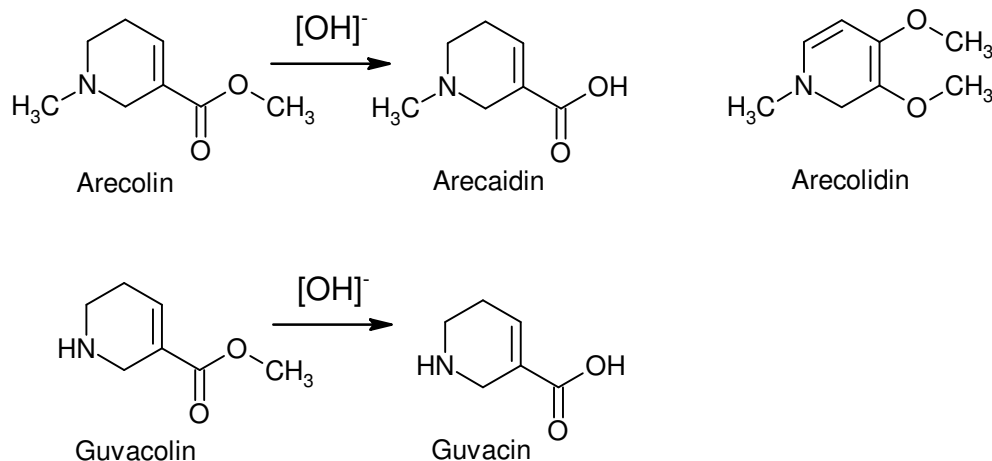


Abb. 1. Esterspaltung von Betelalkaloiden mit Calciumhydroxid.

Arecolin wirkt parasymphomimetisch und regt daher den Speichelfluss an. Dies führt dazu, dass im südasiatischen Raum oft typische, an Blutspritzer erinnernde rote Speichelflecke auf der Straße zu finden sind. Außerdem sind regelmäßige Betelkauer an den rötlich-braunen Zahnverfärbungen insbesondere an den Kauflächen (okklusal) zu erkennen [3].

In bisherigen Studien, in denen archäologische Zahnproben chemisch-analytisch auf Betelinhaltsstoffe untersucht wurden, wurden labial rötlich-braun verfärbte Zähne verwendet. In der Studie von Hocart *et al.* [4] wurden in den rötlich-braunen Anteilen eines Zahnes mittels GC-MS (SIM nach Derivatisierung mit TMS) Arecaidin und Guvacin gefunden. Oxenham *et al.* [5] identifizierten mittels GC-MS (SIM nach Derivatisierung mit TMS) ein Tannin, welches auch in einem parallel untersuchten Extrakt einer Betelnuss nachgewiesen werden konnte. Das in diesen Studien beschriebene, ausschließlich labiale Zahnfärbemuster wird mit dem Ritual des sogenannten „Tooth blackening“ in Verbindung gebracht. Diese labiale, intentionale oder auch rituell durchgeführte Zahnfärbung, meist in schwarz oder rot, ist heutzutage sehr selten, dürfte aber in der Vergangenheit deutlich verbreiteter gewesen sein, und wird bis in die heutige Zeit in manchen Kulturen als Schönheitsideal angesehen [6,7].

Es stellt sich also die Frage, ob man Betelkonsum mittels der Analyse von archäologischem Zahnmaterial nachweisen kann, und welche Alkaloide in Zahnhartsubstanzen nach Kontakt mit der Betelnuss nachgewiesen werden können. Dazu wurden zum einen verschiedene Bestandteile eines charakteristisch gefärbten archäologischen Zahnes mit Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie untersucht und zum anderen ein *in vitro* Experiment durchgeführt, bei dem Pellets aus Rinderdentin und –schmelz mit einer Paste aus gemahlener Betelnuss und Calciumhydroxid inkubiert wurden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Archäologisches Zahnmaterial

Es wurde ein Zahn (Nr. 36: Molar eins, linker Unterkiefer) aus dem Gräberfeld Gò Ô Chùà im südlichen Vietnam untersucht. Die Gräber datieren zwischen 400 – 100 vor Christus (frühe

Eisenzeit). Der untersuchte Zahn stammte von einem Individuum, das eine charakteristische unregelmäßige Rotfärbung einiger Zähne, insbesondere im okklusalen Bereich aufwies. Das geschätzte Alter des Individuums betrug 15 Jahre (mittels Zahnzementannulation (TCA) bestimmt), das Individuum wies eine kleine Körpergröße, verfrühten Schädelnahtverschluss und viele kariöse Läsionen auf. Der rotgefärbte Anteil (Schmelz) wurde mittels eines zahnmedizinischen Feinbohrers abgeschliffen und für die Analyse gewonnen.

## 2.2. Simuliertes Betelkauen

Es wurden je 10 bovine Schmelz- und Dentinpellets verwendet. Die Zähne stammten aus einem Schlachtbetrieb (Schlachthof Freiburg Betriebsgesellschaft d.b.R.). Mit einem Trepanbohrer (Durchmesser 4,5 mm) wurden Dentinproben aus dem Wurzelbereich und Schmelzproben aus dem Kronenbereich der Zähne entnommen. Gewebsreste, Verunreinigungen sowie sichtbare Einlagerungen wurden entfernt. Anschließend wurden die Proben poliert.

Die Pellets wurden für 30 Sekunden in 0,1%-ige Zitronensäure (Merck) gelegt, dann mit destilliertem Wasser (Fresenius Kabi) abgespült und mit Betelpaste bestrichen (gemahlene Betelnuss (Vietnam) ca. 1:1 mit Calciumhydroxid gemischt und so viel Remineralisationslösung zugegeben, bis eine streichfähige Paste entstand). Zusammensetzung der Remineralisationslösung: Calciumchlorid (Merck) 0,32 g, Kaliumhydrogenphosphat (Calbiochem) 0,24 g, Kaliumchlorid (Carl Roth GmbH) 19,38 g, HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Carl Roth GmbH) 9,52 g, Aqua dest. 1 l. Die Lösung wurde mit Kalilauge (5 mol/l, Emsure) auf pH 7 eingestellt.

Die Proben wurden in eine feuchte Kammer gelegt und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurde die Paste mit destilliertem Wasser abgespült, und die Pellets wieder für 30 Sekunden in Zitronensäure gelegt. Die Behandlung mit Betelpaste wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. In den zwei folgenden Tagen lagen die Proben in der feuchten Kammer und wurden nicht weiterbehandelt. Im Anschluss wurden die Proben wieder 5 Tage lang mit der Betelpaste behandelt und zwei Tage nicht behandelt. Am Ende des Zeitraumes wurden die Pellets mit destilliertem Wasser abgespült und zum Trocknen für ca. 24 Stunden in den Wärmeschrank bei 37 °C gelegt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -30°C eingefroren.

## 2.3. Probenvorbereitung

Vom archäologischen Zahn wurden die rot gefärbten Anteile (hauptsächlich Schmelz) mittels eines zahnmedizinischen Feinbohrers (Körnung: 30 µm, Gebr. Brasseler & Co. KG, Lemgo, Deutschland) abgetragen (Probenmenge 44 mg). Zur Gewinnung von pulpanahem Dentinpulver wurde das Innere des Zahnes mittels eines zahnmedizinischen Feinbohrers ausgehöhlt (Probenmenge 50 mg).

Je zwei Dentin- und Schmelzpellets aus dem *in vitro* Experiment wurden zusammen in einer Kugelmühle (MM2, Retsch, Haan) für 15 Minuten gemahlen und 50 mg eingewogen. Die Extraktion von gepulverter Zahnhartsubstanz erfolgte wie bei Spinner et al. beschrieben [8]. In Kürze: Das Pulver wurde dreimal mit 500 µl Methanol (Th. Geyer) für 60 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt und der Überstand abgenommen. Die kombinierten Überstände von drei Extraktionszyklen wurden vereinigt, unter Stickstoff abgedampft (unter Zusatz von 100 µl Isopropanol/HCl 3/1 (v/v)) und in 100 µl mobiler Phase aufgenommen.

Ein Teil der für das *in vitro* Experiment verwendeten Betelnuss wurde pulverisiert und mit Methanol im Ultraschallbad extrahiert.

## 2.4. Analyse

Die Proben des archäologischen Zahns wurden mittels Flüssigchromatographie-hochauflösender Time-Of-Flight Massenspektrometrie (LC-HR-TOF-MS) untersucht. Das verwendete LC-MS-System bestand aus einer Dionex Ultimate 3000 HPLC-Anlage gekoppelt mit einem Bruker Maxis Impact. Die Spektren wurden im positiven Elektrospray-Ionations-Modus (ESI (+)) im full scan aufgenommen. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Dionex acclaim Säule (C18, 100 mm, 2,2 µm). Als mobile Phase wurde Acetatpuffer und Methanol verwendet.

Die Proben aus dem *in vitro* Experiment und die archäologischen Zahnproben wurden quantitativ mittels validierter LC-MS/MS-Methode [8] analysiert. Das verwendete LC-MS-System bestand aus einer Dionex Ultimate 3000 HPLC-Anlage gekoppelt mit einem AB Sciex API 5000. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Luna PFP Säule (Phenomenex), mittels 15 minütiger Gradientenelution. Als mobile Phase wurden 2 % Ameisensäure mit 20 mM Ammoniumformiat in Wasser (95 %) und 0,1 % Ameisensäure in Methanol (5 %) verwendet. Folgende MRM-Übergänge wurden verwendet: Arecolin (Dr. Ehrenstorfer GmbH) 156 > 81, 156 > 53 und der Pseudoübergang 156 > 156, Arecaidin (American Custom Chemical Corporation) 142 > 81, 142 > 53, Guvacolin (American Custom Chemical Corporation) 142 > 113, 142 > 59, Guvacin (American Custom Chemical Corporation) 128 > 81, 128 > 53. Als interner Standard wurde d5-MDMA (MRM: 199 > 165) verwendet, als Kontrolle Dentinpulver mit 0,1 ng/mg Arecolin, Arecaidin, Guvacolin und Guvacin.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Dentinpellets entwickelten nach 14 Tagen Behandlung mit Betelpaste eine rötliche Farbe, während die Schmelzpellets weitgehend die ursprüngliche Farbe (cremeweiß) behielten.

Im extrahierten Ionenchromatogramm der exakten Masse von Arecolin (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 156,1019 +/- 0,001 u) war beim Extrakt der Betelnuss ein Peak mit der Retentionszeit 2,0 min zu sehen. Beim Extrakt der rot gefärbten Anteile des archäologischen Zahnschmelzes war der Peak deutlich weniger intensiv, erhob sich aber noch über das Rauschen. Einer von zwei weiteren im Vergleich deutlich intensiveren Peaks (RT 3,1 min und RT 4,1 min) könnte eventuell dem Arecolidin, einem Isomer des Arcolins, zugeordnet werden. Mit LC-HR-TOF-MS konnten im archäologischen Zahnmaterial keine weiteren Alkaloide identifiziert werden.

Tab. 1. Nachweise der verschiedenen Alkaloide in Schmelz und Dentin aus dem *in vitro* Experiment und im prähistorischen Zahn mit LC-MS/MS.

	<b>Arecolin</b>	<b>Arecaidin</b>	<b>Guvacolin</b>	<b>Guvacin</b>
Schmelz <i>in-vitro</i>	+	-	-	-
Dentin <i>in-vitro</i>	+/-	++	+	+
Prähistorischer Schmelz	+	-	-	-
Prähistorisches Dentin	-	-	-	-

Im Schmelz, der *in vitro* 14 Tage mit einer Betelpaste behandelt wurde, konnte dieselbe Alkaloid-verteilung nachgewiesen werden wie in den rot gefärbten Schmelzanteilen des prähistorischen Zahns. Im Schmelz war nur Arecolin nachweisbar, die anderen Betelalkaloide wurden offenbar unter den gewählten *in vitro* Bedingungen und unter den prähistorischen Konsumbedingungen nicht in den Schmelz eingelagert.

Im Dentin, das 14 Tage mit einer Betelpaste *in-vitro* behandelt wurde, sind die Alkaloide anders verteilt als im Schmelz. Es wurden nur Spuren von Arecolin nachgewiesen, während sich die übrigen Alkaloide, insbesondere Arecaidin, sehr gut in das Dentin einlagerten. Dies zeigt, dass die Betelalkaloide prinzipiell ins Dentin eingelagert werden können.

Vergleicht man die Ergebnisse mit dem prähistorischen pulpanahen Dentin, bei dem keinerlei Alkaloide nachgewiesen wurden, liegt der Schluss nahe, dass die Betelalkaloide vorwiegend durch den direkten Kontakt während des Kauens eines Betelbissens in die Zahnhartsubstanzen eingelagert werden. Die Einlagerung der Alkaloide über die Blutbahn und die Pulpa in das Dentin scheint eine geringere Rolle zu spielen. Da die Struktur von Dentin im Vergleich zum extrem harten Zahnschmelz poröser ist, muss auch beachtet werden, dass während der Liegezeit der Zähne im Erdreich taphonomische Prozesse zu destruktiven Strukturveränderungen führen können.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die rote Färbung des prähistorischen Zahnes unter vergleichbaren Bedingungen entstanden sein könnte, wie im *in vitro* Experiment, nämlich beim Kauen eines Betelbissens.

#### 4. Schlussfolgerungen

Der Nachweis von Betelalkaloiden im Schmelz eines prähistorischen Zahnes mit charakteristischer Rotfärbung legt nahe, dass in der frühen Eisenzeit Betelnuss gekaut wurde, vermutlich in Form eines Betelbissens zu Genusszwecken. Dagegen scheint die Anwendung von Betelnuss für eine intentionale Zahnfärbung bei dem untersuchten Individuum als weniger plausibel. Die chemisch-toxikologische Analyse von Zahnhartsubstanz mittels LC-MS/MS erscheint prinzipiell geeignet, um auch nach einem sehr langen post-mortem Intervall (hier: über 2.000 Jahre) feststellen zu können, welche Rauschmittel konsumiert wurden.

#### 5. Referenzen

- [1] Zumbroich TJ. Origin and diffusion of betel chewing: a synthesis of evidence from South Asia, Southeast Asia and beyond. *eJ Ind Med* 2008;1:87-140.
- [2] Roth L, Daunderer M, Kormann K. Areca catechu L. *Giftpflanzen-Pflanzengifte* 2008;140-141.
- [3] IARC Working Group. Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 2004;85:1-80.
- [4] Hocart CH, Fankhauser B. Betel nut residues in archaeological samples of human teeth from the Mariana Islands. *Experientia* 1996;52:281-285.
- [5] Oxenham MR, Locher C, Cuong NL, Thuy NK. Identification of *Areca catechu* (Betel Nut) Residues on the Dentitions of Bronze Age Inhabitants of Nui Nap, Northern Vietnam. *J Arch Sci* 2002;29:909-915.
- [6] Zumbroich TJ. The Ethnobotany of Teeth Blackening in Southeast Asia. *Ethnobotany Res Appl* 2009;7:381-398.
- [7] Zumbroich TJ. To Strengthen the Teeth and Harden the Gums - Teeth blackening as medical practice in Asia, Micronesia and Melanesia. *Ethnobotany Res Appl* 2011;9:97-113.
- [8] Spinner J, Klima M, Kempf J, Huppertz, LM, Auärter V, Altenburger MJ, Neukamm MA. Determination of drugs of abuse in bovine dentin using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2014;49:1306-1313.