

In vitro studies on the incorporation of medical and illicit drugs into dental hard tissue

Miriam Klima^{1,*}, Laura M. Huppertz¹, Markus J. Altenburger², Volker Auwärter¹, Merja A. Neukamm¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg; *corresponding author: miriam.klima@uniklinik-freiburg.de

²Universitätsklinikum Freiburg, Department für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Hugstetter Straße 55, D-79106 Freiburg

Aim: Dental hard tissue can be used as an alternative matrix in post mortem toxicology. Until now, relatively little is known about the routes and rates of drug incorporation into components of teeth like enamel and dentin. To investigate incorporation of drugs from oral fluid into these materials, *in vitro* studies were conducted taking into account the daily pH course in the oral cavity. **Methods:** Dentin and enamel pellets of bovine teeth (with or without previous demineralisation) were treated with remineralisation solutions containing different model drugs (amphetamine, benzoylecgonine, cocaine, codeine, MDA, MDEA, MDMA, methamphetamine, 6-acetylmorphine and morphine) in three different concentrations for three different times with or without pH-cycling. After grinding, the pellets were extracted with methanol and analysed quantitatively for the model drugs applying a validated LC-MS/MS method (LODs and LOQs ranged from 0.25 to 15 pg/mg). **Results:** Almost all drugs were detected both in dentin and in enamel. The measured concentrations in dentin were considerably higher than in enamel. Furthermore, the concentration of drugs in demineralised pellets was approximately five times higher compared to non-demineralised pellets. The amount of the drugs detected in the different dental hard tissues depends on the concentration of drugs in the remineralisation solution and seems to depend on the physico-chemical properties of the substance. Maximum concentrations were 1400 pg/mg without pH-cycling and 16 pg/mg with pH-cycling. **Conclusions:** Although incorporation rates of drugs from oral fluid into dental hard tissue seem to be low in general, detectable concentrations may be reached in drug users. Molecule size and polarity seem to play a decisive role in efficiency of incorporation. In addition, other routes of incorporation (e.g. from dental pulp) may contribute.

1. Einleitung

Bei postmortal fäulnisveränderten oder verbrannten Leichen ist es häufig nicht möglich, das üblicherweise für forensisch-toxikologische Untersuchungen verwendete Probenmaterial (Blut, Urin, Haare) zu asservieren. Als alternative Matrix haben Zahnhartsubstanz (Dentin und Schmelz) sowie kariöses Material das Potential, einen zurückliegenden Drogen- und Medikamentenkonsum zu belegen. Möglicherweise kann mit diesem Material die zeitliche Nachweislücke zwischen Blut- bzw. Urinproben und Haarproben geschlossen werden. Um die Einlagerung von Drogen und Arzneistoffen in Zahnmaterialien zu untersuchen, wurden zwei *in vitro* Versuche durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Probenherstellung

Für die Durchführung der Versuche wurden frisch extrahierte Rinderzähne verwendet, welche bis zur weiteren Verarbeitung in 0,1 %iger Thymol-Lösung bei 8 °C gelagert wurden. Nach

Beseitigung von Geweberesten wurden sowohl Schmelz- als auch Dentinproben hergestellt. Die Zahnkrone wurde für Schmelz- und Dentinproben verwendet, die Zahnwurzel nur für Dentinproben. Mit Hilfe eines wassergekühlten, diamantierten Trepanbohrers wurden Pellets mit einem Durchmesser von 5 mm herausgeschliffen und anschließend in Kunstharz (Technovit 4071) eingebettet. Bei den Schmelzproben wurde das Dentin entfernt, bei den Dentinproben aus der Zahnkrone wurde der Schmelz entfernt und bei den Dentinproben aus der Wurzel wurde das Wurzelzement entfernt. Die Proben wurden plangeschliffen und mit aufsteigenden Schleifpapierkörnungen bis zu einer Körnung von 4000 poliert, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Anschließend wurden die Pellets aus dem Kunststoff herausgebrochen und für 10 min in Aqua dest. bei 20°C ins Ultraschallbad gelegt um eventuelle Kunststoffreste zu entfernen.

2.2. pH-Cycling

Um gleichmäßige initialkariöse Läsionen herzustellen, wurden die Pellets für 7 Tage in eine Demineralisationslösung (pH 5,0) gelegt [1]. Die Lösung wurde jeden zweiten Tag gewechselt und der pH-Wert ggf. neu eingestellt. Nach Überprüfen der Läsionsbildung mittels TMR (Transversale Mikroradiographie) wurden die Proben für ca. 20 s mit Aqua dest. gespült und bis zur weiteren Verwendung in einer feuchten Plastikschiene gelagert.

Durch das darauf folgende pH-Cycling sollte ein Drogenkonsum nachgestellt werden. Dafür wurden die Proben verschiedenen Milieus ausgesetzt, um die täglichen pH-Wert-Änderungen in der Mundhöhle zu simulieren. Als Modellsubstanzen wurden Amphetamin, Methamphetamin, MDA, MDEA, MDMA, Codein, Morphin, 6-Acetylmorphin (6-MAM), Cocain und Benzoyllecgonin (BE) verwendet. Es wurden 3 verschieden konzentrierte wässrige Lösungen hergestellt (0,4 µg/ml, 2 µg/ml und 6 µg/ml) und diese anschließend 1:1 mit der Remineralisationslösung (pH 7,0) verdünnt [2]. Der Versuch wurde für 7, 9 bzw. 11 Tage mit jeweils 4 Zyklen pro Tag durchgeführt. Dafür wurden jeweils 3 Pellets in Glasküvetten mit verschiedenen Lösungen gelegt, wobei ein Zyklus aus 0,5 h Inkubation in Demineralisationslösung (pH 4,8) [2] und 2,5 h in mit Modellsubstanzen angereicherter Remineralisationslösung bestand.

Über Nacht wurden die Proben für 12 h in Remineralisationslösung ohne Modellsubstanzen aufbewahrt. Die Lösungen wurden täglich gewechselt und der pH-Werte ggf. neu eingestellt. Zwischen jedem Schritt wurden die Proben für ca. 20 s mit Aqua dest. abgespült. Nach Beenden des pH-Cyclings wurden sie erneut abgespült, bei 37 °C im Trockenschrank für etwa 15 h getrocknet und bei -30 °C in Eppendorf Tubes gelagert.

2.3. Lagerung in Drogenlösungen

Für diesen Versuch wurden die Proben genauso hergestellt wie für das pH-Cycling. Allerdings wurde nur jeweils die Hälfte der Dentin- und Schmelzpellets demineralisiert. Anschließend wurden jeweils 3 Proben für 1, 2 bzw. 3 Wochen in die Remineralisationslösung mit Modellsubstanzen (1 µg/ml, 3 µg/ml und 6 µg/ml) gelegt. Die Lösungen wurde alle 2 Tage gewechselt und der pH-Wert ggf. neu eingestellt.

2.4. Probenextraktion

Für die Extraktion der Substanzen aus den Pellets wurden diese für 3 min in flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend 15 min in der Kugelmühle gemahlen. Von dem Pulver wurden 50 mg bzw. bei Werten, die oberhalb des höchsten Kalibrators lagen, zusätzlich 5 mg eingewogen. Bei nicht mehr ausreichendem Probenmaterial wurde der Extrakt 1:10 verdünnt gemessen und die Ergebnisse als ca. Werte angegeben. 10 µl eines Gemisches aus internen

Tab. 3. Konzentrationen [pg/mg] im Dentin nach Lagerung in Substanzlösung (1 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	ca. 230	60	210	95	ca. 250	81
Methamphetamin	ca. 200	47	210	58	ca. 200	56
MDA	ca. 320	56	310	78	ca. 330	85
MDMA	ca. 320	47	350	56	ca. 310	62
MDEA	ca. 340	42	420	47	ca. 290	51
Morphin	ca. 89	6,5	87	9,4	ca. 80	9,9
Codein	ca. 160	11	140	15	ca. 130	15
6-MAM	n.n.	6,1	99	9,9	ca. 85	12
Cocain	3,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,75

Tab. 4. Konzentrationen [pg/mg] im Dentin nach Lagerung in Substanzlösung (3 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	600	220	560	260	530	280
Methamphetamin	560	170	520	180	460	220
MDA	790	230	740	240	620	310
MDMA	800	180	710	180	640	240
MDEA	910	150	790	150	690	190
Morphin	270	28	250	26	180	41
Codein	370	38	310	39	220	51
6-MAM	200	21	170	15	100	26
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	2,9	n.n.	1,4	n.n.	2,4

Tab. 5. Konzentrationen [pg/mg] im Dentin nach Lagerung in Substanzlösung (6 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	960	370	1100	490	1100	450
Methamphetamin	840	280	970	330	1000	320
MDA	1000	380	1400	480	1400	460
MDMA	960	280	1300	370	1300	340
MDEA	990	250	1300	300	1300	280
Morphin	350	45	540	54	610	63
Codein	440	62	620	90	640	73
6-MAM	260	20	160	27	120	27
Cocain	5,3	5,7	n.n.	9,0	4,2	13
BE	3,7	9,4	3,5	13	3,7	8,4

Die Konzentrationen in den demineralisierten Pellets waren ca. fünfmal höher als in nicht demineralisierten Pellets. Von den Substanzgruppen zeigten Amphetamine die höchste Einlagerungsrate, während bei Opiaten und Cocain geringere Werte gemessen wurden. Dies lässt vermuten, dass physikalisch-chemische Eigenschaften wie Molekülgröße, Polarität und/oder Basizität entscheidenden Einfluss auf die Einlagerungsraten in die Zahnmaterialien haben.

Tab. 6. Konzentrationen [pg/mg] im Schmelz nach Lagerung in Substanzlösung (1 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	< 10	n.n.	< 10	< 10	15	< 10
Methamphetamin	6,4	1,1	4,6	2,7	11	2,5
MDA	5,2	1,0	3,8	1,2	9,1	1,7
MDMA	7,7	1,1	5,1	1,6	11	2,1
MDEA	9,6	0,88	6,0	1,5	13	2,1
Morphin	1,1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2,9	< 1,0
Codein	1,6	0,36	1,0	0,41	3,6	0,63
6-MAM	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Tab. 7. Konzentrationen [pg/mg] im Schmelz nach Lagerung in Substanzlösung (3 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	25	12	13	< 10	20	< 10
Methamphetamin	25	7,6	14	3,1	18	7,6
MDA	24	6,9	10	1,5	15	6,0
MDMA	31	6,1	13	1,4	18	5,6
MDEA	35	5,5	14	1,2	20	4,9
Morphin	6,8	1,7	2,3	< 1,0	3,2	1,6
Codein	9,5	1,4	2,8	0,38	4,0	1,7
6-MAM	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Tab. 8. Konzentrationen [pg/mg] im Schmelz nach Lagerung in Substanzlösung (6 µg/ml). dem. = demineralisiert, n.n. = nicht nachgewiesen.

	1 Woche		2 Wochen		3 Wochen	
	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.	dem.	nicht dem.
Amphetamin	25	ca. 43	ca. 68	20	27	16
Methamphetamin	25	34	ca. 62	19	28	13
MDA	15	33	ca. 61	16	22	9,7
MDMA	19	30	ca. 64	16	28	9,8
MDEA	20	26	ca. 64	15	29	8,8
Morphin	2,7	7,6	18	4,3	5,8	2,3
Codein	3,9	4,5	ca. 23	3,9	6,0	2,5
6-MAM	n.n.	n.n.	3,2	n.n.	n.n.	n.n.
Cocain	n.n.	n.n.	1,2	n.n.	n.n.	n.n.
BE	n.n.	n.n.	0,88	n.n.	n.n.	n.n.

Bei beiden Versuchen stiegen die Konzentrationen der Substanzen in den Schmelz- und Dentinproben mit Erhöhung der Konzentration der Drogenlösung an. Wie zu erwarten ist somit von einer Konzentrationsabhängigkeit auszugehen. Vergleicht man die in den beiden Versuchen gemessenen Konzentrationen, wird deutlich, dass bei der Lagerung in Drogenlösung die Werte ca. 70-mal höher waren als nach dem pH-Cycling. Dies lässt sich dadurch erklären,

dass die Proben auch über Nacht mit den Drogen in Kontakt standen. Tagsüber fand keine regelmäßige Demineralisation mit drogenfreier Lösung statt, bei der es zu einer teilweisen Ausschwemmung der Substanzen kommen kann.

4. Schlussfolgerungen

Obwohl die Einlagerung von Drogen und Arzneistoffen über den Speichel in Zahnhartsubstanz eher gering ausgeprägt zu sein scheint, erscheint es möglich, dass über diesen Weg im Zahnmaterial von Drogenkonsumenten detektierbare Konzentrationen erreicht werden. Zudem scheinen die Molekülgröße und die Polarität bei der Einlagerung eine entscheidende Rolle zu spielen.

5. Danksagung

Wir bedanken uns bei der DFG (NE 1879/2-1, AL 1665/3-1) für die Förderung des Projektes "Nachweis von Drogen und Medikamenten in Zahnmaterialien".

6. Literatur

- [1] Bukes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res* 1985;19:490.
- [2] Ten Cate JM, Nyvad B, Van de Plassche-Simons YM, Fejerskov O. A quantitative analysis of mineral loss and shrinkage of an in vitro demineralized human root surfaces. *J Dent Res* 1991;70:1371.
- [3] Spinner S, Klima M, Kempf J, Huppertz LM, Auwärter 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.