

Spurenanalytik von Carnosolsäure,  
p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und den Piperinisomeren  
in Matrices tierischen Ursprungs

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin Edburga L. Krause

geboren am 8. Januar 1970 in Witten

1999

Referent: Prof. Dr. Waldemar Ternes

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Andreas Seubert

Tag der Promotion: 17. Mai 1999

Datum der Veröffentlichung: Juni 1999

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der biologische Transfer der antioxidativen Inhaltsstoffe von Rosmarin- und Thymianextrakt anhand des Versuchsmodells „Futter – Legehennen – Ei“ untersucht. Hierzu wurde zu dem Hühnerfutter Rosmarin- bzw. Thymianextrakt, der durch Verunreinigung weiterhin piperinhaltigen Pfefferextrakt enthielt, hinzugefügt. Anschließend wurden die Eier untersucht.

Die Entwicklung geeigneter Methoden zur Analyse von Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin in den tierischen Matrices bildete den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Für die Untersuchung der antioxidativen Inhaltsstoffe im Ei wurden leistungsfähige Probenaufarbeitungen entwickelt. Bei der mehrstufigen Probenaufarbeitung für Eigelb wurde zunächst eine Extraktion und anschließend eine Aufreinigung durch Adsorption an Gelpermeationsmaterial, Auskristallisieren von Lipiden, Fällung von Proteinen und abschließend eine Festphasenextraktion durchgeführt. Diese Probenaufarbeitung ermöglicht es, die Matrix weitgehend abzutrennen und die antioxidativen Inhaltsstoffe im unteren ng/g-Bereich im Ei nachzuweisen und zu bestimmen.

Um die nach Fütterung mit piperinhaltigem Thymianextrakt aufgetretenen Piperinisomere zu untersuchen, wurde eine HPLC-Methode an einer Silberionenphase entwickelt, die es erstmalig ermöglicht, mit einer kommerziell erhältlichen Säule die vier *cis-trans*-Isomere Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin basisliniengetreunt zu analysieren. Diese Methode erlaubt eine Anwendung in der Spurenanalytik.

Mit Hilfe der neu entwickelten Probenaufarbeitung konnten nach Fütterung von Rosmarin bzw. piperinhaltigem Thymianextrakt im Eigelb Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und die durch Stoffwechsel gebildeten Piperinisomere nachgewiesen und bestimmt werden. Für diese Substanzen konnte nur ein geringer biologischer Transfer festgestellt werden. Die Untersuchung des Eiklars ergab, daß der Übergang der untersuchten Substanzen noch einmal deutlich geringer war als im Eigelb. Nur Piperin und die durch Stoffwechsel gebildeten Isomere waren nachweisbar. In dem Legehennenblut konnten die Substanzen Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und die durch Stoffwechsel gebildeten Piperinisomere nachgewiesen werden. Eine pathologische Veränderung der Versuchstiere nach Dotierung des Futters mit 1-2 % Gewürzextrakt wurde nicht beobachtet.

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methoden konnte die lichtinduzierte Isomerisierung des Piperins in Chavicin, Isochavicin und Isopiperin untersucht und die Halbstufenpotentiale der einzelnen Isomere bestimmt werden.

Der Übergang von Carnosolsäure in Milch wurde anhand des Versuchsmodells „Futter – Kuh – Milch“ untersucht. Hierzu wurde dem Futter Rosmarinextrakt zugesetzt. Ein Übergang von Carnosolsäure aus dem Futter in die Milch konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

In humanen Magen- und Leberzellen konnten nach entsprechender Dotierung Carnosolsäure, Thymol, Piperin und die durch Stoffwechsel gebildeten Isomere Chavicin und Isochavicin sowohl in den Zellwänden als auch im Cytosol nachgewiesen werden.

Schlagwörter: Gewürz, Ei, Futter

## Abstract

In the present thesis the biological transfer of antioxidative compounds of rosemary and thyme extract into eggs was investigated. For the investigations hens were feeded with different concentrations of the spice extracts and the eggs of the hens were analysed later on. Due to a contamination the used thyme extract has also a reasonable concentration of piperine from pepper.

The main topic of the thesis was development of a suitable analytical method to analyse carnosic acid, p-cymene-2,3-diol, thymol and piperine in the samples. For the determination a powerful multistep method was developed to isolate the antioxidative compounds from the egg. The isolation method for egg yolk comprises the following steps: 1. extraction, 2. purification by adsorption at a GPC-column, 3. crystallisation of lipids, 4. precipitation of proteins and 5. solid phase extraction. By this method it is possible to quantify the antioxidative compounds in the ng/g-range.

Furthermore a special HPLC-method was developed for the analysis of all four *cis-trans*-isomers piperine, chavicine, isopiperine and isochavicine by using HPLC by silver ion chromatography.

With the newly developed method the eggs from hens feeded with rosemary and thyme extract (containing also piperine) were analysed. Carnosic acid, p-cymene-2,3-diol, thymol, piperine and the piperine isomers (formed by metabolism) could be identified and quantified in egg yolk. The analysis of the eggs showed that the transfer rate of the spice compounds into the eggs were very low. The transfer rate of the compounds in the egg white was lower than in the egg yolk: in egg white only piperine and the *cis-trans*-isomers (formed by metabolism) could be determined. In the blood of the hens carnosic acid, p-cymene-2,3-diol, thymol, piperine and the piperine isomers could be determined. After addition of 1-2 % of the spice extracts to the feed a pathological change couldn't be observed.

With the developed HPLC-methods the light induced isomerisation of piperine into chavicin, isochavicin and isopiperine was analysed and the half wave potential of the isomers was determined.

The transfer from carnosic acid into milk was investigated by feeding cows with a rosemary extract enriched dietary. In this case no transfer of carnosic acid into the milk was detected.

In human stomach and liver cells carnosic acid, thymol, piperine and the isomers chavicin, isochavicin (formed by metabolism) were detected in cell walls and in cytosols after adequate addition of these substances to the cells.

keywords: spice, egg, feed

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. W. Ternes in der Zeit vom März 1996 bis Dezember 1998 in der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ternes danke ich für die vielseitige Förderung und für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Eltern

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Gewürze: von der Kostbarkeit im Altertum zum Zusatz in modernen Lebensmitteln	1
1.2	Rosmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> Labiatae)	6
1.3	Thymian ( <i>Thymus vulgaris</i> Labiatae)	7
1.4	Pfeffer ( <i>Piper nigrum</i> Piperaceae)	8
<b>2</b>	<b>Literaturbekannte Ergebnisse zur Analytik, Toxizität und zum Metabolismus von Rosmarin, Thymian und Piperin</b>	<b>10</b>
2.1	<b>Rosmarin</b>	<b>10</b>
2.1.1	HPLC	10
2.1.2	GC	10
2.1.3	Extraktion aus biologischen Proben	10
2.1.4	Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus	11
2.2	<b>Thymian</b>	<b>11</b>
2.2.1	HPLC	11
2.2.2	GC	12
2.2.3	Extraktion aus biologischen Proben	12
2.2.4	Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus	12
2.3	<b>Piperin</b>	<b>13</b>
2.3.1	HPLC	13
2.3.2	GC	14
2.3.3	Extraktion aus biologischen Proben	15
2.3.4	Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus	15
2.3.5	Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin	16
<b>3</b>	<b>Ziel der Untersuchungen</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Auswahl der Versuchstiere</b>	<b>18</b>
4.1	Fütterung von Legehennen	19
4.2	Fütterung von Kühen	20
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>22</b>
5.1	<b>Methodenentwicklung</b>	<b>22</b>
5.1.1	Probenaufarbeitung	22
5.1.1.1	Eigelb	22
5.1.1.1.1	Ziel	22
5.1.1.1.2	Vorüberlegungen	22
5.1.1.1.3	Anwendung und Problem der literaturbeschriebenen Aufarbeitung	22
5.1.1.1.4	Entwicklung einer leistungsfähigen Eigelbaufarbeitung	23
5.1.1.1.5	Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	27
5.1.1.1.6	Zusammenfassung	27
5.1.1.1.7	Überprüfung der Probenaufarbeitung	28
5.1.1.2	Eiklar	31
5.1.1.2.1	Ziel	31
5.1.1.2.2	Vorüberlegungen	31
5.1.1.2.3	Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Eiklar	31
5.1.1.2.4	Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen	32
5.1.2	Analytik mittels HPLC	33
5.1.2.1	HPLC-Untersuchung von Rosmarinextrakt an RP-18	33
5.1.2.1.1	Ziel	33
5.1.2.1.2	Vorüberlegungen	33
5.1.2.1.3	Entwicklung einer isokratischen HPLC-Methode	33

5.1.2.2	Trennung der Piperinisomere mit Reversed-Phase-Chromatographie	35
5.1.2.2.1	Ziel	35
5.1.2.2.2	Vorüberlegungen	35
5.1.2.2.3	HPLC-Säulenmaterialoptimierung zur Trennung der Piperinisomeren	35
5.1.2.2.4	Einfluß des Eluenten bei der HPLC-Trennung	36
5.1.2.2.5	Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Piperinisomere	39
5.1.2.2.6	Zusammenfassung	43
5.1.2.3	HPLC-Trennung der Piperinisomeren mit Normalphasenchromatographie	44
5.1.2.3.1	Ziel	44
5.1.2.3.2	Vorüberlegungen	44
5.1.2.3.3	Anwendung und Problem der literaturbeschriebenen Isomerentrennung	44
5.1.2.3.4	Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der Piperinisomeren durch Silberionenchromatographie	45
5.1.2.3.5	Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Piperinisomere bei der Silberionenchromatographie	49
5.1.2.3.6	Zusammenfassung	53
<b>5.2</b>	<b>Bioverfügbarkeit von Rosmarinextrakt</b>	<b>54</b>
5.2.1	Bestimmung der Inhaltsstoffe von Rosmarinextrakt	54
5.2.2	Fütterung von Legehennen	54
5.2.3	Untersuchung von Eigelb	55
5.2.4	Untersuchung von Eiklar	58
5.2.5	Untersuchung von Legehennenblut	58
5.2.6	Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen	59
5.2.7	Pathologische Untersuchung der Legehennen	61
<b>5.3</b>	<b>Bioverfügbarkeit von Thymianextrakt</b>	<b>64</b>
5.3.1	Bestimmung der Inhaltsstoffe von Thymianextrakt	64
5.3.2	Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt	65
5.3.3	p-Cymen-2,3-diol und Thymol aus Thymianextrakt	65
5.3.3.1	Untersuchung von Eigelb	65
5.3.3.2	Untersuchung von Eiklar	69
5.3.3.3	Untersuchung von Legehennenblut	69
5.3.3.4	Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen	70
5.3.4	Piperin aus piperinhaltigem Thymianextrakt	72
5.3.4.1	Untersuchung von Eigelb	72
5.3.4.2	Untersuchung von Eiklar	79
5.3.4.3	Untersuchung von Legehennenblut	80
5.3.4.4	Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen	81
5.3.5	Pathologische Untersuchung von Legehennen	83
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin und Bestimmung der Halbstufenpotentiale der Piperinisomere</b>	<b>86</b>
5.4.1	Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin	86
5.4.2	Bestimmung der Halbstufenpotentiale	88
<b>5.5</b>	<b>Sensorische Untersuchung der Eier aus den Fütterungsversuchen</b>	<b>89</b>
5.5.1	Ziel	89
5.5.2	Theorie	89
5.5.3	Durchführung und Auswertung der sensorischen Untersuchung	90
5.5.3.1	Eier aus Fütterungsversuchen mit Thymianextrakt	90
5.5.3.2	Eier aus Fütterungsversuchen mit Rosmarinextrakt	91
5.5.4	Zusammenfassung	92
<b>5.6</b>	<b>Aufarbeitung und HPLC-Analyse von Rahmproben nach Fütterung von Kühen mit Rosmarinextrakt</b>	<b>93</b>
5.6.1	Ziel	93
5.6.2	Methode zur Untersuchung von Rahm	93
5.6.3	Untersuchungsergebnisse	93



<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>95</b>
<b>6.1</b>	<b>Allgemeine Angaben</b>	<b>95</b>
6.1.1	Verwendete Meßgeräte	96
6.1.1.1	HPLC mit elektrochemischer und UV-Detektion für die RP-Chromatographie	96
6.1.1.2	HPLC mit Diodenarraydetektion	96
6.1.1.3	Präparative HPLC mit UV-Detektion	96
6.1.1.4	HPLC mit UV-Detektion für die Normalphasen-Chromatographie	96
6.1.1.5	Massenspektrometrie	96
6.1.1.6	NMR-Spektrometer	97
6.1.1.7	FT-IR-Spektrometer	97
6.1.1.8	UV-Lampe	97
6.1.2	Verwendete Chemikalien	97
<b>6.2</b>	<b>Verwendete HPLC-Bedingungen</b>	<b>99</b>
6.2.1	Bestimmung von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin mit RP-Chromatographie	99
6.2.2	Bestimmung von Piperin mit Normalphasenchromatographie	100
6.2.3	Bestimmung von Carnosolsäure	100
6.2.4	Isolierung von Inhaltsstoffen aus den Gewürzextrakten	101
6.2.5	HPLC-Trennung mit Diodenarraydetektion zur Aufnahme von UV-Spektren	101
<b>6.3</b>	<b>Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin</b>	<b>102</b>
6.3.1	HPLC-Trennung an ODS-Hypersil	102
6.3.2	HPLC-Trennung an Silberionenphase	105
<b>6.4</b>	<b>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure</b>	<b>107</b>
<b>6.5</b>	<b>Bestimmung der Inhaltstoffe der verwendeten Extrakte</b>	<b>108</b>
6.5.1	Thymianextrakt	108
6.5.1.1	p-Cymen-2,3-diol-Gehalt	108
6.5.1.2	Thymolgehalt	108
6.5.1.3	Piperingehalt	109
6.5.1.4	UV-Spektren aus Thymianextrakt	109
6.5.1.5	NMR-Spektroskopie	110
6.5.1.6	Massenspektrum von Piperin aus Thymianextrakt	111
6.5.2	Rosmarinextrakt	111
6.5.2.1	Carnosolsäuregehalt	111
6.5.2.2	UV-Spektrum von Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt	111
6.5.2.3	Massenspektren von Carnosol und Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt	112
6.5.2.4	NMR-Spektroskopie	112
6.5.2.5	FT-IR-Spektrum von Carnosolsäure	113
6.5.3	Pfefferextrakt	113
6.5.4	NMR-Spektroskopie von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin	114
<b>6.6</b>	<b>Analytische Untersuchung des Eigelbes</b>	<b>115</b>
6.6.1	Aufarbeitung nach Fütterung mit Thymian- und Rosmarinextrakt	115
6.6.1.1	Extraktion von Fett und fettlöslichen Substanzen	115
6.6.1.2	Trennung der Gewürzinhaltstoffe von Fett	115
6.6.1.3	Trennung der Gewürzinhaltstoffe von Protein	116
6.6.1.3.1	Thymian	116
6.6.1.3.2	Rosmarin	116
6.6.1.4	Aufreinigung durch Festphasenextraktion	117
6.6.2	Wiederfindungsraten	117
6.6.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	120
6.6.3.1	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der untersuchten Lösung	120
6.6.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Eigelb	121
6.6.4	Ermittelte Konzentration nach Fütterung mit Thymianextrakt	122
6.6.4.1	Fütterung ohne Zusatz von Thymianextrakt	122
6.6.4.2	Fütterung mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Futter	122
6.6.4.3	Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Futter	123

---

6.6.5	Ermittelte Konzentration nach Fütterung mit Rosmarinextrakt	124
6.6.5.1	Fütterung ohne Zusatz von Rosmarinextrakt zum Futter	124
6.6.5.2	Fütterung mit 0,283 % Rosmarinextrakt zum Futter	124
6.6.5.3	Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Futter	125
6.6.6	Überprüfung der Methode zur Extraktion des Eigelbes	125
6.6.6.1	Analytische Untersuchung des Eigelbes nach Methanolextraktion	125
6.6.6.2	Analytische Untersuchung des Eigelbes nach Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase	126
6.6.6.3	Analytische Untersuchung des Rückstandes der Eigelbextraktion	126
<b>6.7</b>	<b>Analytische Untersuchung des Eiklars</b>	<b>128</b>
6.7.1	Aufarbeitung nach Fütterung mit Thymian- und Rosmarinextrakt	128
6.7.2	Nachweisgrenzen in der untersuchten Lösung und im Eiklar	128
<b>6.8</b>	<b>Aufarbeitung der Milchrahmproben</b>	<b>130</b>
6.8.1	Isolierung von Carnosolsäure aus dem Rahm	130
6.8.2	Nachweisgrenze von Carnosolsäure	130
<b>6.9</b>	<b>Histologische Untersuchungen von Leber, Niere und Lunge der Legehennen</b>	<b>131</b>
<b>6.10</b>	<b>Untersuchungen von Blutserum/Blutplasma der Legehennen nach Sektion</b>	<b>132</b>
6.10.1	Aufarbeitung von Blutserum nach Fütterung mit Rosmarinextrakt	132
6.10.2	Aufarbeitung von Blutplasma nach Fütterung mit Thymianextrakt	132
<b>6.11</b>	<b>Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen</b>	<b>132</b>
6.11.1	Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Substanzkonzentration	132
6.11.2	Zellkulturversuch mit anschließender HPLC-Untersuchung	134
6.11.3	Aufarbeitung der Zellen und Mediumüberstände	137
6.11.3.1	Aufarbeitung angegriffener Zellkulturen	137
6.11.3.2	Aufarbeitung adhärenter Zellkulturen	138
6.11.3.3	Aufarbeitung der Isolate für die HPLC-Trennung	138
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>153</b>
9.1	Verzeichnis der Abkürzungen	153
9.2	Verzeichnis der Hersteller	153
9.3	Verzeichnis der Abbildungen	154
9.4	Verzeichnis der Tabellen	158

# 1 Einleitung

## 1.1 Gewürze: von der Kostbarkeit im Altertum zum Zusatz in modernen Lebensmitteln

Gewürze sind sehr aromatische Teile von Pflanzen – zumeist die Samen, Früchte, Wurzeln oder Blütenteile und manchmal auch Blätter. Jedes Gewürz hat seinen eigenen, in der Regel sehr charakteristischen Geschmack und Duft. Dieses hat Gewürze schon in der Frühzeit zum Zusatz für Lebensmittel werden lassen, um den Gerichten einen typischen und angenehmen Geschmack zu geben oder auch nur um den ranzigen Geschmack zu lang gelagerter Lebensmittel zu überdecken. Es ist sicherlich kein Zufall, daß gerade in den heißen Ländern Speisen sehr scharf gewürzt werden, so daß der Eigengeschmack der Lebensmittel kaum noch wahrnehmbar ist.

Die Vielfalt an unterschiedlichen Gewürzen war bereits im Altertum fast unüberschaubar. So führten die Römer während ihrer Feldzüge durch Europa an die 400 Gewürze und Kräuter ein, von denen viele in den nächsten Jahrhunderten wieder verschwanden, nur um während der Kreuzzüge erneut entdeckt zu werden. Gewürze wie Ingwer, Zimt, Kardamon, Muskatnuß, Koriander, Nelken, Senf, Anis und Kümmel waren den Römern gut bekannt und wurden bereits in deren Küche vielfach verwendet, wie es etwa in dem Werk *De Re Coquinaria* (Über das Kochen) aus dem 1. Jahrhundert n. Chr. von Apicius beschrieben wird. Über 90 % der dort beschriebenen Rezepte erforderten die Verwendung exotischer Gewürze.

Die Römer führten die wertvollen Gewürze über die alten Handelsstraßen aus China und Indien nach Europa ein, vor allem über die Seidenstraße, die sich südlich der Wüste Gobi schlängelt, über den Osten des Himalayas und durch Afghanistan und Persien zieht, bevor sie Osteuropa erreicht. Daneben wurden aber auch schon Gewürze von indonesischen Händlern über die offenen Gewässer bis an die Ostküste Afrikas und die arabische Halbinsel verschifft. Rund 1000 Jahre nach dem Untergang des römischen Reiches waren in der Renaissance die technischen Möglichkeiten in Navigation und Schiffbau soweit entwickelt, daß weite Seereisen möglich wurden. Der wirtschaftliche Anreiz für die Unternehmungen war vor allem das Interesse an Gewürzen. Im Jahre 1480 umrundeten die Portugiesen Afrika, und 1497 landete Vasco da Gama auf indischem Boden und gab dabei bekannt „Ich komme wegen der Christen und der Gewürze“. 1492 segelte Christoph Kolumbus auf der Suche nach einem Seeweg zu den indischen Gewürzen Richtung Westen und entdeckte Amerika.

In den kommenden Jahrhunderten verfiel der Preis der einst kostbaren Gewürze durch zunehmende Konkurrenz und bessere technische Möglichkeiten, so daß sie in unseren Tagen sauber verpackt in Supermärkten auf der ganzen Welt zu erwerben sind.

Gewürze kommen zum größten Teil in getrockneter Form aber auch in frischem Zustand in den Handel. Gewürzkräuter werden ebenfalls tiefgefroren angeboten, frische Gewürze zum Teil in Lake eingelegt (grüner Pfeffer) und Kräuter in Öl im Handel angeboten.

In der Lebensmittelindustrie werden vor allem Gewürzextrakte eingesetzt. Diese können durch Extraktion mit Lösemitteln wie z. B. Ethanol oder Hexan oder auch durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid hergestellt werden. Lösungsmittelextrakte enthalten sehr oft Umwandlungsprodukte der Wirksubstanzen, ferner sind diese Extrakte nicht vollkommen öllöslich und enthalten höhere Gehalte an Chlorophyll und Carotinoiden. Das Aromaprofil der Lösungsmittelextrakte ist, verglichen mit dem Rohstoff, ebenfalls unterschiedlich. CO<sub>2</sub>-Extrakte hingegen sind öllöslich, enthalten die wirksamen originären Inhaltsstoffe und zeigen ein dem Gewürz äquivalentes Aromaprofil. Kohlendioxid als Extraktionsmittel ist zudem eine physiologisch unbedenkliche Substanz, die keimfrei ist und bakterizid wirkt [Weinreich (1998), Gerhard (1990)].

Seit dem Altertum wurden Gewürze jedoch nicht nur aufgrund ihrer geschmacksverbessernden Eigenschaften verwendet, sondern es wurden auch heilende bzw. generell physiologische Wirkungen angenommen. Einige davon lassen uns heute schmunzeln, wie die früher unterstellte aphrodisierende Wirkung vieler Gewürze, die wohl eher durch die exotische Assoziation an die fremden Herkunftsländer und weniger durch die Inhaltsstoffe ausgelöst wurde. Viele der Wirkungen ließen sich jedoch bestätigen. So wirken Gewürze häufig appetitanregend und beeinflussen durch ihren Reiz auf die Mundschleimhaut die Salzsäuresekretion im Magen. So kann z. B. die schmerzstillende Wirkung von Nelken, die bereits im Altertum gegen Zahnschmerzen eingesetzt wurden, auf das enthaltene Eugenol zurückgeführt werden. Rosmarin besitzt durch die enthaltene Rosmarinsäure eine entzündungshemmende Wirkung. Die Heilwirkung des Thymians beruht vor allem auf seinem Thymolgehalt. Thymol ist ein starkes Antiseptikum, wirkt aber auch sekretverflüssigend, auswurfördernd, krampflösend und hustenberuhigend. Auch dem Pfeffer wird eine hustenberuhigende Wirkung nachgesagt [Gerhard (1990), Rex (1994), Norman (1991), Frankenhäuser (1987)].

Verschiedene Gewürze enthalten antimikrobiell wirksame Substanzen, die eine keimhemmende oder keimabtötende Wirkung auf eine große Anzahl von Bakterien und/oder Pilzarten ausüben. Diese Substanzen werden als Phytonzide bezeichnet und können die Pflanze vor dem Verderb schützen. Die Phytonzide findet man in allen Teilen der Pflanze. Bei zahlreichen Gewürzen sind die ätherischen Öle Träger der antibakteriellen Wirkung [Narahimharao (1970a,b,c; 1971a,b, 1972)].

Eine antimikrobielle Wirkung von Rosmarin auf *Listeria monocytogenes* [Pandit (1994)], auf *Aspergillus parasiticus* [Özcan (1998)] und auf *Streptomyces scabies* [Takenaka (1997)] wird beschrieben.

Thymian zeigt eine Hemmwirkung auf das Wachstum von Hefen [Conner (1984)], weiterhin werden Carvacrol und Thymol als Hemmfaktoren auf das Wachstum verschiedener, in Lebensmitteln vorkommender Bakterien beschrieben [Kivanc (1988)]. Spotti et al. haben Thymol als mikrobiellen Umwelt-Dekontaminant charakterisiert und schlagen es als Ersatz für Desinfektionsmittel synthetischen Ursprungs vor [Spotti (1997)].

Salzer hat festgestellt, daß Pfefferextrakt generell keimhemmend wirkt. Hierzu untersuchte er die Wirkung von Gewürzextrakten in einer handelsüblichen Dosierung (0,5 bis 1 g/kg) auf die am häufigsten vorkommenden Verderbniserreger im Lebensmittelbereich (E. coli, Enterokokken, Salmonellen, Staphylokokken, Pseudomonaden, Bacillus cereus, Clostridien und Aspergillus flavus) [Salzer (1982)].

Gewürze können jedoch aufgrund des intensiven Eigengeschmacks im allgemeinen nicht zur Lebensmittelkonservierung eingesetzt werden. [Gerhard (1990)].

Weiterhin können Gewürze antioxidativ wirken. Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem diese Eigenschaft von Gewürzen interessant, da sie dazu geeignet ist, die Haltbarkeit von Lebensmitteln zu verlängern.

Antioxidantien kommen in beträchtlichen Mengen in der Familie der Lippenblütler (Rosmarin, Salbei, Oregano, Majoran, Thymian), in der Familie der Doldenblütler (Petersilie, Fenchel, Sellerie) sowie in einigen anderen Pflanzen vor.

Nach verschiedenen Einzelhinweisen anderer Autoren untersuchten Chipault et al. in systematischen Versuchen 32 Gewürze in unterschiedlichen Substraten [Chipault (1952, 1955, 1956)]. Hierbei erwiesen sich Rosmarin, Salbei, Oregano, Nelken, Piment und Thymian in allen Substraten als besonders günstig.

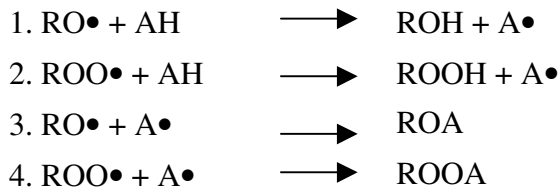
Anhand der in der Literatur zitierten Wirkungen teilte Gerhardt Gewürze nach ihrer antioxidativen Wirkung ein (Tabelle 1) [Gerhardt (1990)]:

<b>Antioxidative Wirksamkeit</b>			
<b>optimal</b>	<b>sehr gut</b>	<b>gut</b>	<b>neutral bis geringfügig</b>
Muskatblüte	Muskatnuß	Bohnenkraut	Basilikum
Rosmarin	Oregano	Majoran	Chillies
Salbei	Pfefferminze	Nelken	Knoblauch
Thymian		Paprika	Kümmel
		Pfeffer (schwarz)	Pfeffer (weiß)
		Zimt	Schnittlauch

*Tabelle 1: Antioxidative Wirksamkeit von Gewürzen.*

Antioxidantien sind Substanzen, die die Autoxidation von Lipiden verhindern bzw. verzögern. Die antioxidativen Eigenschaften von Gewürzen sind hauptsächlich auf phenolische Verbindungen wie Flavonoide, Phenolcarbonsäuren und tricyclische

Diterpendiphenole zurückzuführen [Hermann (1973)]. Sie haben häufig eine 3,4-Dihydroxybenzol-Struktur oder eine 3-Methoxy-4-hydroxybenzol-Struktur [Herrmann (1994)]. Sie führen bei den Kettenfortpflanzungsreaktionen (Reaktion 1 und 2 in Abbildung 1) zu resonanzstabilisierten Phenoxyradikalen ( $A\bullet$ ). Die energetisch relativ stabilen Phenoxyradikale können nicht mehr eine H-Abstraktion an Substraten und damit eine Kettenfortpflanzung bewirken, sondern beenden in Kettenabbruchreaktionen mit anderen Radikalen die Reaktion (Reaktionen 3 und 4 in Abbildung 1) [Belitz (1992), Ternes (1994)].



*Abbildung 1: Wirkung von Antioxidantien als Radikalfänger [Belitz (1992)].*

Alkylsubstituenten oder Hydroxygruppen in ortho-Stellung zur Hydroxygruppe wirken als sterischer Schutz und erhöhen die Stabilität von Antioxidansradikalen mit phenolischer Hydroxygruppe [Ternes (1994)].

Von den Gewürzen mit starker antioxidativer Wirkung haben besonders Rosmarin und Thymian eine breite Anwendung gefunden. Sie sind besonders dazu geeignet, die Haltbarkeit von Lebensmitteln zu verlängern. Daher werden diese Gewürze bzw. deren Extrakte nicht nur wegen ihrer würzenden, sondern auch aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft Lebensmitteln zugesetzt. So wird etwa in der Lebensmittelindustrie die Haltbarkeit von Pizzasalami durch Zusatz von Rosmarinextrakt verlängert.

Um die antioxidative Eigenschaft von Rosmarin besser auszunutzen, wurden Extraktionsverfahren entwickelt, mit deren Hilfe Extrakte mit einem besonders hohen Gehalt an antioxidativen Inhaltsstoffen hergestellt werden können.

Die Verwendung von Gewürzen oder deren Extrakten zur Verbesserung der Haltbarkeit von Lebensmitteln hat zusätzlich den Vorteil eines „clean labels“. So muß die Verwendung von Gewürzextrakten in der Zutatenliste eines Lebensmittels nicht als zulassungspflichtiger Zusatzstoff gekennzeichnet werden, wie es etwa bei den reinen Konservierungsstoffen der Fall ist (z. B. „Konservierungsstoff Benzoesäure“). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Gewürzextrakten ist eine positive Einstellung des Verbrauchers gegenüber natürlichen Inhaltsstoffen, wohingegen der Zusatz von synthetischen Zusatzstoffen vom Verbraucher negativ beurteilt wird.

Als Reaktion auf diese Entwicklung wurde in Frankreich die Verwendung von Rosmarinextrakten in Lebensmitteln eingeschränkt. Von dem Ministère de l'Economie des Finances et de l'Industrie wurde am 9. Juli 1997 erlassen, daß Rosmarinextrakte als Zusatzstoffe angesehen werden müssen und zwar unabhängig davon, ob sie aufgrund ihrer antioxidativen oder aromatischen Eigenschaften zugesetzt werden. Daher dürfen in Frankreich Rosmarin-

extrakte in Lebensmitteln nur noch dann eingesetzt werden, wenn sie als Zusatzstoffe zugelassen worden sind. Einem solchem Antrag auf Zulassung müssen umfangreiche Untersuchungen beigelegt werden, die eine toxikologische Unbedenklichkeit in der verwendeten Konzentration bescheinigen.

Die Diskussion, ob Gewürzextrakte als Zusatzstoffe angesehen werden müssen oder nicht, könnte vermieden werden, wenn Gewürzextrakte direkt dem Futter zugesetzt würden und dann in das tierische Produkt übergingen. Damit könnten auch Produkte beeinflusst werden, bei denen der Zusatz von Stoffen prinzipiell nicht möglich ist (wie z. B. bei Eiern).

Obwohl Gewürzextrakte aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften in der Lebensmittelindustrie zunehmend zielgerichteter verwendet werden, ist bei vielen Gewürzen nichts über Toxizität oder Bioverfügbarkeit bekannt. So ist der Metabolismus und die Toxizität der am stärksten antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe von Thymian und Rosmarin (p-Cymen-2,3-diol, Carnosol und Carnosolsäure) bisher noch nicht untersucht worden. Untersuchungen über die Bioverfügbarkeit dieser Würzinhaltstoffe sind in der Literatur nicht erwähnt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften die Würze Rosmarin und Thymian ausgewählt. Da der verwendete Thymianextrakt durch Kreuzkontamination auch Piperin, einen Inhaltsstoff des Pfeffers, enthielt, wird im folgenden auch auf Pfeffer eingegangen.

## 1.2 Rosmarin (*Rosmarinus officinalis* Labiatae)

Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) gehört zur Familie der Lippenblütler (Labiatae) und ist eine in allen Mittelmeerländern, in Mitteleuropa und im Süden der USA auf trockenen, steinigen Böden verbreitete und angebaute Pflanze. Rosmarin ist ein holziger, buschiger, verzweigter, immergrüner, 0,5–1,5 m hoher Strauch mit stumpf-vierkantigen, flaumig behaarten Stengeln. Als Gewürz verwendet werden die während und nach der Blüte geernteten, frischen oder getrockneten, 2-3 cm langen und 2-4 mm breiten, am Rande nach unten eingewinkelten Blätter. Der angenehme, aber durchdringende kampferartige Geruch der Blätter beruht auf bis zu 2,5 % ätherischem Öl, das sich u. a. aus  $\alpha$ -Pinen, Camphen, Borneol, Campher und Cineol zusammensetzt. Der Geschmack ist herb-würzig und bitter-aromatisch [Gerhardt (1990), Seidemann (1987), Seidemann (1993), Franke (1992), Göck (1965), Küster (1987), Sieweck (1990)].



Abbildung 2: *Rosmarinus officinalis* aus Boros (1981).

Der Labiatendroge Rosmarin wird eine gute antioxidative Wirksamkeit zugesprochen. Die antioxidative Aktivität von Rosmarin wurde zunächst auf das Vorkommen von Rosmarinsäure zurückgeführt. Rosmarinsäure ist in der Familie der Labiaten ubiquitär vorhanden. [Herrmann (1993, 1962), Reschke (1983)]. Eine zusätzliche antioxidative Wirkung geht ebenfalls auf die Inhaltsstoffe Kaffeesäure,  $\alpha$ -Hydroxykaffeesäure und Flavonole zurück [Herrmann (1961)]. Da die beiden Säuren in der Familie der Labiaten jedoch relativ häufig vorkommen, muß die auffallend starke Wirkung von Rosmarin noch andere Ursachen haben. 1969 erkannten Brieskorn et al., daß Carnosolsäure und Carnosol die besondere antioxidative Wirkung von Rosmarin und Salbei bedingen [Brieskorn (1969)]. Carnosolsäure zeigt die größte antioxidative Aktivität [Aruoma (1992), Cuvelier (1994), Frankel (1996a,b)] und ist die Hauptkomponente in der phenolischen Diterpenoidfraktion von *Rosmarinus officinalis* [Schwarz (1992b), Okamura (1994)].

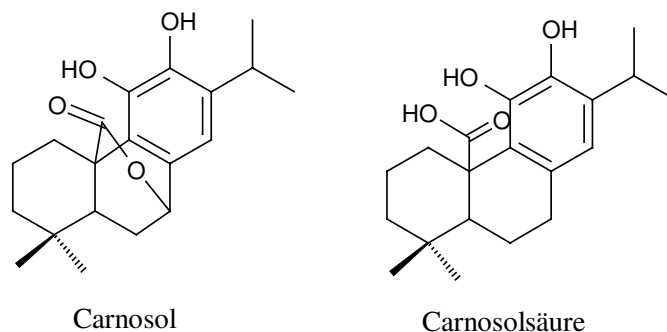


Abbildung 3: Antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe von *Rosmarinus officinalis*.



Weitere antioxidative Substanzen wurden in den folgenden Jahren isoliert und identifiziert. Zu nennen sind hier Rosmanol, Epirosmanol, Isorosmanol, Rosmarindiphenol und Rosmarinchinon [Inatani (1982, 1983) Nakatani (1984)]. 1992 konnten Schwarz et al. die Umwandlung von Carnosolsäure zu Carnosol und weiter zu Rosmanol, Epirosmanol und 7-Methyl-Epirosmanol zeigen [Schwarz (1992b)].

Das große Interesse an der außergewöhnlich hohen antioxidativen Aktivität von Rosmarin, Rosmarinextrakten und Rosmarininhaltsstoffen zeigen die zahlreichen Untersuchungen, die in den letzten Jahren hierzu durchgeführt worden sind [Huang (1996), Frankel (1996a,b), Hopia (1996), Aruoma (1992), Geoffroy (1994), Haraguchi (1994), Linberg Madsen (1996, 1998), Lacroix (1997), Zegarska (1998), Pokorný (1997)].

### 1.3 Thymian (*Thymus vulgaris* Labiatae)

Thymian (*Thymus vulgaris*) gehört ebenso wie Rosmarin zur Familie der Lippenblütler und stammt aus dem westlichen Mittelmeergebiet. Er wird in zahlreichen Ländern Europas, im Süden der Ukraine sowie in Nordamerika angebaut. Der mehrjährige, 20-45 cm hohe, dicht verästelte Halbstrauch hat vierkantige, graubraune bis purpurne, markige Stengel und Zweige. Die Blätter sind länglich bis lanzettlich, ganzrandig, am Rande eingerollt, unterseits filzig



behaart und von graugrüner Farbe. Die terminalen Blütenstände seiner zahlreichen Ästchen sind hellrötlich bis violett gefärbt. Als Gewürz werden die getrockneten, meist gerebelten, seltener grob zerkleinerten Blätter mit geringen Blütenanteilen verwendet. Sie weisen einen intensiv aromatischen Geruch und würzigen, etwas scharfen, leicht bitteren Geschmack auf.

Das in den Blättern zu 0,3 – 3,4 % enthaltene ätherische Öl besteht u. a. aus 30-70 % Thymol, 3-15 % Carvacrol, Cymol, p-Cymen-2,3-diol, Cineol, sowie  $\alpha$ -Pinen, Borneol und Linalool. Das Verhältnis von Thymol zu Carvacrol hängt eindeutig von der Thymiansorte und von der Provenienz ab [Schwarz (1996), Gerhardt (1990), Seidemann (1987), Seidemann (1993), Franke (1992), Gööck (1965), Küster (1987), Sieweck (1990)].

Abbildung 4: *Thymus vulgaris* aus Boros (1981).

Dem Thymian wird ebenfalls eine gute stabilisierende Wirkung von Fetten zugesprochen [Farg (1989a,b)]. Die hauptsächlich vorkommenden phenolischen Komponenten sind Thymol (3-Methyl-6-isopropylphenol; p-Cymen-3-ol) und Carvacrol (2-Methyl-5-isopropylphenol; p-Cymen-2-ol) [Rhyu (1979), Bestmann (1985), Stahl-Biskup (1986)]. Nakatani et al. und Miura et al. haben fünf Biphenyle und sechs Flavonoide isoliert, die eine größere antioxidative Aktivität als  $\alpha$ -Tocopherol zeigen [Nakatani (1989), Miura (1989a,b,c)]. Schwarz et al. berichten über die Isolierung und Identifizierung von p-Cymen-

2,3-diol, das eine sehr starke antioxidative Wirkung aufweist. Es baut sich jedoch besonders bei thermischer Belastung der Lebensmittel schneller ab als Thymol. [Ternes (1995a), Schwarz (1995, 1996)]. Die gefundenen Konzentrationen von p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol, und Thymol in *Thymus vulgaris* sind 0,8, 0,1 und 1,2 % (Trockengewicht) [Schwarz (1996)].

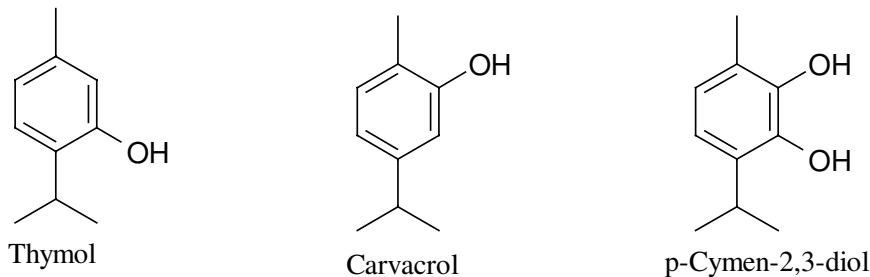
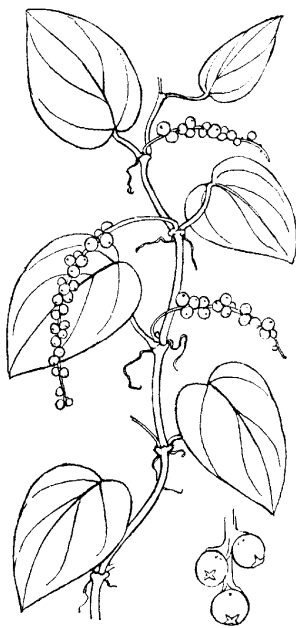


Abbildung 5: Antioxidativ wirksame Substanzen aus *Thymus vulgaris*.

Zahlreiche Untersuchungen zur antioxidativen Aktivität von Thymian und Thymianinhaltsstoffen bekunden das große Interesse an natürlichen Antioxidantien, deren Funktion und Anwendungsmöglichkeiten [Yanishlieva (1999), Botsoglou (1997), Spotti (1997), Haraguchi (1996), Schwarz (1996), Takácsová (1995), Aeschbach (1994)].

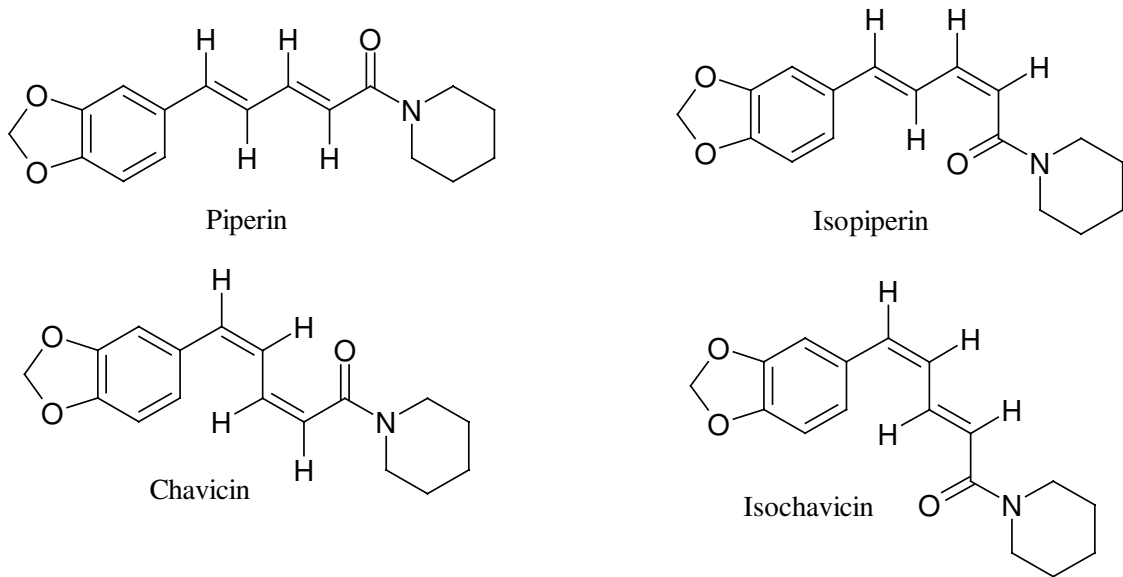
## 1.4 Pfeffer (*Piper nigrum* Piperaceae)

Pfeffer (*Piper nigrum*) ist die namengebende Pflanze der Pfeffergewächse (Piperaceae) und wird in Indien, Westafrika und in Südamerika kultiviert. Die Pfefferpflanze ist ein immergrüner, bis 9 m hoher, rankender Strauch mit ledrigen, dunkelgrünen, ovalen, ganzrandigen, zugespitzten, 7-15 cm langen Blättern. Aus den unauffälligen weißen Blüten, in ährigen Blütenständen geordnet, entwickeln sich einsamige, kugelige Steinfrüchte, die sich vom grün in ein kräftiges orangerot während der Reife verfärben. Jeder der 5-10 cm langen Blütenstände trägt 20-30 erbsengroße Einzelfrüchte. Je nach Erntezeitpunkt und weiterer Behandlung wird aus den Früchten grüner, schwarzer oder auch weißer Pfeffer gewonnen.



Ausschlaggebend für den Geschmack und den Geruch von Pfeffer sind das ätherische Öl (1-3,5 %) und das Alkaloid Piperin (5-9 %) und verwandte Verbindungen wie Piperilin, Piperetin und einige Piperidinamide. Zu den Hauptbestandteilen des ätherischen Öles gehören: Sabinen, Limonen,  $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen,  $\delta$ -3-Caren sowie zahlreiche weitere Verbindungen [Gerhardt (1990), Normann (1991), Seidemann (1987), Seidemann (1993), Franke (1992), Gööck (1965), Küster (1987), Sieweck (1990)].

Abbildung 6: *Piper nigrum* aus Boros (1981).



**Abbildung 7: Piperin, Isopiperin, Chavicin, Isochavicin.**

Die Schärfe von Pfeffer ist vorwiegend auf *trans-trans*-Piperin (=Piperin) zurückzuführen. Die drei weiteren möglichen Isomere (*cis-trans*-Piperin<sup>1</sup> [Isopiperin], *trans-cis*-Piperin [Isochavicin], *cis-cis*-Piperin [Chavicin]) besitzen nur geringe bis fast keine Schärfewirkung und können im Pfeffer nur in geringen Mengen nachgewiesen werden [Verzele (1989)]. Seit 1955 wurde durch Fagen et al. bekannt, daß Piperin eine photosensible Substanz darstellt und durch Lichteinwirkung einer *cis-trans*-Isomerisierung in Isopiperin, Isochavicin und Chavicin unterliegt [Verzele (1979), Glasl (1984), Wood (1988)].

<sup>1</sup> Die Konfigurationsbezeichnung beginnt vom Piperidinende des Moleküls.

## **2 Literaturbekannte Ergebnisse zur Analytik, Toxizität und zum Metabolismus von Rosmarin, Thymian und Piperin**

### **2.1 Rosmarin**

#### **2.1.1 HPLC**

In der Literatur sind verschiedene HPLC-Methoden zur Untersuchung von Rosmarin-inhaltsstoffen beschrieben:

Schwarz et al. und Ternes et al. beschreiben eine HPLC-Methode zur Untersuchung von Inhaltsstoffen von Rosmarin und Salbei mit einer Gradientenelution und anschließender elektrochemischer Detektion (Eluent A: Methanol/H<sub>2</sub>O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (50/50/0,5/0,5); Eluent B: Methanol/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (100/1,0/0,2); Zusammensetzung A/B von 40/60 bis 0/100, Chromatogrammdauer 25 Minuten, Flußrate 0,7 mL/min, Säule: ODS-Hypersil 5µm 250 x 4 mm) [Schwarz (1992a), Ternes (1995b)].

Okamura et al. verwenden zur Untersuchung von Carnosolsäure und Carnosol in Rosmarin und Salbei eine isokratische Elution mit anschließender UV-Detektion (Eluent 0,1%-ige Phosphorsäure/Acetonitril (40/60, Säule Wako Wakosil-II 5C-18 HG, 150 x 4,5 mm, Flußrate 1,0 mL/min, ) bei einer Chromatographiedauer von insgesamt 15 Minuten [Okamura (1994)].

Tena et al. verwenden eine Gradientenelution mit anschließender Diodenarraydetektion zur Trennung von Carnosol und Carnosolsäure (Eluent 0,01 mol/L Essigsäure/Acetonitril (30/70 bis 0/100, Chromatogrammdauer 25 Minuten, Flußrate 1,0 mL/min, Säule: Ultrabase-C-18 250 x 4,6 mm, 5 µm) [Tena (1997)].

#### **2.1.2 GC**

Carnosolsäure und Carnosol können aufgrund ihrer fehlenden Flüchtigkeit gaschromatographisch nicht direkt erfaßt werden. Die gaschromatographischen Untersuchungen von Rosmarin beschränken sich auf die Untersuchung des ätherischen Öls [Pino (1998), Rao (1997), Ravid (1997), Domokos (1997)].

#### **2.1.3 Extraktion aus biologischen Proben**

Carnosolsäure kann mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton, n-Hexan und Dichlormethan aus Rosmarin isoliert werden [Tena (1997), Takenaka (1997), Wenkert (1965)].

Ternes et al. beschreiben die Isolierung von Inhaltsstoffen des Rosmarins aus verschiedenen Lebensmitteln [Ternes (1995b)]. Rosmarinextrakt wurde hierzu zu Mayonnaise, Hühnerfleisch, Quark, Saurer Sahne, Casein, Yoghurt und Eigelb dotiert und anschließend mit

Methanol extrahiert. Zur Probenaufarbeitung von Rosmarinextrakt aus Eigelb wurde der Extrakt in einer Konzentration von 100 µg Carnosolsäure/g Eigelb zugesetzt. 500 mg des Eigelbs wurden viermal mit 5 mL Methanol extrahiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand auf 20 mL aufgefüllt. 2 mL dieser Lösung wurden mit 6 mL destilliertem Wasser versetzt und die erhaltene Lösung über eine Festphasenkartusche (RP-18) gereinigt. Zur Festphasenreinigung wurde die Kartusche mit 5 mL Wasser konditioniert und anschließend die Probe aufgegeben. Matrixbestandteile wurden durch Aufgabe von 5 mL Wasser abgetrennt und die gewünschten Substanzen anschließend mit 5 mL Methanol eluiert. Diese Lösung wurde mittels HPLC und elektrochemischer Detektion untersucht (HPLC-Bedingung siehe Kapitel 2.1.1).

Eine Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Rosmarininhaltstoffen im Eigelb im ng/g-Bereich ist nicht literaturbekannt.

## 2.1.4 Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus

Untersuchungen zur Toxizität und zum Metabolismus von Carnosol und Carnosolsäure sind nicht literaturbekannt.

## 2.2 Thymian

### 2.2.1 HPLC

Zur Untersuchung von Thymian sind in der Literatur verschiedene HPLC-Methoden veröffentlicht.

Botsoglou et al. haben eine HPLC-Methode zur Untersuchung von Thymian verwendet, mit denen es den Autoren möglich ist, Thymol im Thymianextrakt zu bestimmen (Säule: Nucleosil 120, C-18, 250 x 4,6 mm, Eluent Acetonitril/Wasser (40/60), Fluß 1,0 mL/min, UV-Detektion bei 283 nm) [Botsoglou (1997)].

Solinas et al. untersuchten den Gehalt von Carvacrol und Thymol im ätherischen Öl von Thymian mittels HPLC (Säule Bondapak C-18 300 x 3,9mm, Eluent Acetonitril/Wasser (40/60), Fluß 1,5 mL/min, UV-Detektion bei 283 nm) [Solinas (1981)].

Schwarz et al. und Ternes et al. haben eine HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion zur Trennung von p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol aus Thymianextrakt verwendet (Säule ODS-Hypersil 250 x 4 mm, Eluent Acetonitril/Wasser/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (50/50/0,5/0,5), Fluß 0,7 mL/min, elektrochemische Detektion bei +800mV) [Schwarz (1996), Ternes (1995a)]. Mit Hilfe der HPLC konnten Schwarz et al. erstmalig p-Cymen-2,3-diol aus Thymian isolieren, das zuvor bei der vor allem auf gaschromatographische Methoden ausgelegten Analytik nicht zugänglich war [Schwarz (1996)].

### 2.2.2 GC

Gaschromatographische Untersuchungen von Thymian sind vor allem für die Untersuchung des ätherischen Öls von Thymian vorgenommen worden [Guillén (1998), Lawrence (1998), Guidotti (1998), Russo (1998), Kulevanova (1997), Jackson (1994), Sur (1991), Holm (1988), Rhyu (1979)]. Mit Hilfe der Gaschromatographie können die antioxidativen Inhaltsstoffe Thymol und Carvacrol untersucht werden, p-Cymen-2,3-diol ist mittels GC nicht zugänglich.

### 2.2.3 Extraktion aus biologischen Proben

Thymol kann mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln wie Methanol und Diethylether aus Thymian isoliert werden [Botsoglou (1997), Solinas (1981)].

Ternes et al. beschreiben die Extraktion von p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol mit Methanol aus verschiedenen Lebensmitteln. Nach Zusatz von Thymianextrakt zu Mayonnaise, Casein, Fleischbällchen und Würstchen wurde p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol durch Extraktion mit Methanol aus den Proben isoliert. Nach Aufreinigung durch Festphasenextraktion wurden die Proben mittels HPLC und elektrochemischer Detektion analysiert (HPLC-Methode siehe Kapitel 2.2.1) [Ternes (1995a)].

Eine Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Thymianinhaltsstoffen in Eiern ist nicht literaturbekannt.

### 2.2.4 Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus

Die Toxizität von Thymol ist seit langem bekannt. Thymol wirkt expektorierend, stark antiseptisch, übertrifft in diesen Eigenschaften das Phenol beträchtlich, zeigt eine hohe Wirksamkeit gegen Spulwürmer und wird deshalb auch in der Medizin verwendet. Dauernde Zufuhr von Thymol in Form thymolhaltiger Mundwässer, Zahnpasten usw. kann Thyreotoxikosen (Schilddrüsenüberfunktion) auslösen [Täufel (1993)].

Austgulen et al. untersuchten den Metabolismus von Carvacrol und Thymol in Ratten. Die im Urin enthaltenen Metaboliten von Thymol zeigen eine große Ähnlichkeit zu den für Carvacrol gefundenen. Als Metaboliten wurden Substanzen identifiziert, die im Vergleich zum Thymol eine Oxidation der Methylgruppe bzw. der Isopropylgruppe zu dem entsprechenden Alkohol oder der entsprechenden Carbonsäure aufwiesen. Die aromatische Hydroxilierung spielt bei dem Metabolismus von Thymol und Carvacrol nur eine sehr geringe Rolle. So konnte nur bei Carvacrol die Bildung von p-Cymen-2,3-diol als Metabolit beobachtet werden. Das Blut der Ratten wurde nicht untersucht [Austgulen (1987)].

Untersuchungen zur Toxizität und zum Metabolismus von p-Cymen-2,3-diol sind nicht literaturbekannt.

## 2.3 Piperin

### 2.3.1 HPLC

Verschiedene HPLC-Methoden zur Untersuchung von Piperin und den Isomeren Chavicin, Isopiperin und Isochavicin wurden in der Literatur bisher beschrieben.

Da sich im Verlauf der Arbeit herausgestellt hat, daß außer Piperin auch die Piperinisomeren in den biologischen Proben enthalten waren, wird auf die HPLC-Trennung der Isomeren ebenfalls eingegangen.

Takagi et al. beschreiben eine Trennung von Piperin und seinen Isomeren an einer Reversed-phase-Phase C-8 [Takagi (1988)]. Die hierzu verwendeten HPLC-Bedingungen waren LiChrospher 300 RP-8 10 $\mu$ m (4 x 4 mm) und LiChrosorb RP-8 SelectB (250 x 4 mm), als Elutionsmittel wurde eine Mischung von 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser und 75 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (92/8) mit einer Flußrate von 1,0 mL/min verwendet. Mit diesen HPLC-Bedingungen konnten Takagi et al. Piperin von den Isomeren abtrennen. Die Isomere wurden jedoch nicht voneinander getrennt und heben sich nur als kleine „Schulter“ in einem als ganzen Peak eluierenden Gemisch heraus. Als Elutionsreihenfolge wurde Isopiperin, Chavicin, Isochavicin und Piperin angegeben. Die Retentionszeit wurde für Piperin durch Standardzusatz bestimmt. Chavicin wurde nach Isolierung mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Die Zuordnung von Isopiperin und Isochavicin wurde aufgrund ihres Isomerisierungsverhaltens postuliert.

Archer beschreibt ebenfalls eine HPLC-Trennung von Piperin und den Isomeren an einer C-8-Phase (Lichrosorb RP-8, 250 x 7 mm, 5 $\mu$ m). Als Elutionsmittel wurde Wasser, Acetonitril und Tetrahydrofuran in einem Mischungsverhältnis von 69/32/8 bei einer Flußrate von 2,0 mL/min gewählt. Die dargestellten HPLC-Chromatogramme zeigen 3 Peaks, die nicht basisliniengetrennt sind und eine Auftrennung in das vierte Isomer vermissen lassen. Eine Elutionsreihenfolge der Isomere wird nicht angegeben [Archer (1986)].

Bei den HPLC-Untersuchungen auf einer RP-18-Phase handelt es sich um Untersuchungen von Piperin in Pfeffer [Weaver (1988), Chauhan (1998), Li (1986)], um die Analyse von Piperin neben Capsaicin [Chiang (1986)] oder um die Analyse von mit Pfeffer kontaminiertem Zimt [Kermasha (1994)]. Die Methoden gehen lediglich auf die Analyse von Piperin in den untersuchten Gewürzen ein. Auf die Trennung der vier Piperinisomeren an RP-18-Material wird in der Literatur nicht eingegangen.

Verzele et al. berichten über die Trennung von den Piperinisomeren an verschiedenen stationären Phasen (Säulen 250 x 4,6 mm) [Verzele (1979)]. Bei der Verwendung einer Kieselgelsäule mit Silberionen zur Komplexbildung (Eluent Methanol/Wasser (80/20)) eluieren die vier Isomere als ein einziger Peak. Bei Verwendung von einer Aluminiumoxid-

(60)-Säule der Firma Merck und Methylenchlorid/Isooctan (45/55) als Eluent eluieren die Peaks angetrennt (teilweise als Schulter). Bei Einsatz einer Säule mit einer Diolphase mit Methylenchlorid/Isooctan (80/20) als Eluent eluieren die vier Isomere in zwei Peaks. Ein starker Kationenaustauscher (Sulfonsäure auf Kieselgel) als Säulenmaterial mit Chloroform/Isooctan (150/20) läßt sie in 3 basisliniengetrennten Peaks, eine Kieselgelsäule mit Cyanbelegung mit Isooctane/Methylenchlorid/Methanol (17,5/17,5/8,5) in ebenfalls 3, weitestgehend basisliniengetrennten Peaks eluieren. Eine sehr gute Trennung aller 4 Isomere innerhalb von 15 Minuten erreichten Verzele et al. durch eine selbstgepackte Nitro-Silicagel-Säule mit Methylenchlorid/Methanol (100/4,5) als Eluenten. Als Elutionsreihenfolge wird hier Chavicin, Isochavicin, Isopiperin und Piperin angegeben.

Mit Kieselgel als Säulenmaterial (RsiL 250 x 4,6 mm, 10µm) erreichten Verzele et al. mit 0,1 % 2-Propanol in Methylenchlorid bei einer Flußrate von 4 mL/min eine Trennung in 3 Peaks bei einer Elutionsdauer von 50 Minuten. Die Elutionsreihenfolge wurde mit Chavicin, Isochavicin (Elution als Schulter an Chavicin), Isopiperin und Piperin angegeben [Verzele (1984)].

Eine weitere Trennung der vier Isomeren gelang Verzele et al. mit einer Polyphenol-RsiL-Säule (250 x 4,5mm) mit Hexan/THF (60/40) als Eluenten und einer Flußrate von 0,8 mL/min. Die Substanzen eluieren innerhalb von 25 Minuten in der Reihenfolge Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, Piperin. Bei einer guten Basislinientrennung von Isopiperin, Isochavicin und Piperin, konnten hier Chavicin und Isopiperin nicht basisliniengetrennt werden [(Verzele (1989)].

Eine Basislinientrennung der Isomere Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin wurde mit einer Nitro-Silicagel-Säule erreicht [Verzele (1979)]. Mit Hilfe einer Polyphenol-RsiL-Säule kann ebenfalls eine ausreichende Trennung dieser vier Isomere erreicht werden [Verzele (1989)]. Bei den von Verzele et al. veröffentlichten HPLC-Methoden (s.o.) wurde Piperin als Reinsubstanz verwendet und anschließend isomerisiert.

### **2.3.2 GC**

Die Analyse flüchtiger Inhaltsstoffe von Pfeffer wurde mittels GC durchgeführt [Möllenbeck (1997), Hu (1996), Ndiege (1994), König (1992)]. Piperin wurde bei diesen Untersuchungen nicht detektiert.

Durch cold-on-column-Injektion ist die gaschromatographische Untersuchung von Piperin möglich [Verzele (1980)]. Die Untersuchung der Piperinisomere mittels GC ist nicht literaturbekannt.



### 2.3.3 Extraktion aus biologischen Proben

Neben der Extraktion von Piperin aus Pfeffer oder aus Gewürzmischungen mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethylacetat, Ethanol, Aceton, Methylenchlorid und n-Hexan [Kermascha (1994), Chiang (1986), Genest (1963), De Cleyn (1972), Weaver (1988)] ist in der Literatur die Extraktion von Piperin aus Urin und Fäzes mit Chloroform/Methanol (2:1) zur Untersuchung des Metabolismus von Piperin in Ratten [Bhat (1986)] beschrieben.

Eine spurenanalytische Aufarbeitung von Piperin aus komplexen Matrices wie Eigelb oder Blut ist nicht literaturbekannt.

### 2.3.4 Toxikologische Untersuchungen und Metabolismus

Bei Mäusen konnte bei einer täglichen Aufnahme von 160 mg Pfeffer/kg Körpergewicht innerhalb von drei Monaten die Bildung von Tumoren beobachtet werden. Das im Pfeffer enthaltene Piperin wirkt je nach Verabreichungsform (intravenös bzw. intramuskulär) in Konzentrationen von 15 bis 400 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen akut toxisch [Piyachaturawat (1983)]. Die von Menschen täglich höchstens aufgenommene Menge von 140 mg schwarzem Pfeffer [Gerhardt (1990)] (dieses entspricht einer Aufnahme von etwa 2 mg pro kg Körpergewicht), ist im Vergleich dazu verschwindend gering.

Untersuchungen zum Metabolismus von Piperin in Ratten sind ebenfalls literaturbekannt [(Bhat 1986, 1987)]. Nach einer oralen Verabreichung von Piperin (170 mg/kg) konnten im Urin der Ratten die Metaboliten Piperionylsäure, Piperonylalkohol, Piperonal und Vanillinsäure und in der Galle der Metabolit Piperinsäure identifiziert werden. Piperin war im Urin und in der Galle nicht enthalten [Bhat (1987)]. Die Untersuchungen zeigen, daß Piperin während der Absorption keine metabolische Veränderung erfährt, da nur Piperin im Darmgewebe nachzuweisen war. Die vermehrte Ausscheidung (Urin, Fäzes) von konjugierten Uronsäuren, konjugierten Sulfaten und Phenolen haben gezeigt, daß die Glucuronisierung und Sulfatisierung den wichtigsten Schritt für die Disposition von Piperin in Ratten darstellen [Bhat (1986)].

Untersuchungen von Khajuria et al. zur permeablen Charakteristik von Piperin an Ratten und Gewebesäcken zeigen, daß die Aufnahme von Piperin sehr schnell erfolgt. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse schlugen sie einen transzellularen Weg für die Absorption von Piperin vor [Khajuria (1998)].

Untersuchungen zur *cis/trans*-Isomerisierung von Piperin durch Stoffwechsel sind nicht literaturbekannt. Ebenfalls nicht literaturbekannt sind Untersuchungen des Blutes.

### 2.3.5 Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin

Bereits seit 1955 ist bekannt, daß Piperin eine photosensible Substanz ist. Fagen et al. hatten bei der photometrischen Messung von Piperin in Chloroform beobachtet, daß während sechs Stunden Belichtung die Extinktion bei 345 nm abgenommen hatte. Im Dunkeln jedoch blieben die Extinktionswerte gleich. Tausig et al. fanden das gleiche Ergebnis. Es wurden jedoch bereits Überlegungen angestellt, ob es sich hier um eine *cis-trans*-Isomerisierung handeln könnte, da der Autor außer der Extinktionsabnahme eine Verschiebung des Maximums von 343 nm auf 330 nm beobachtet hatte [Glasl (1984)].

Der photochemische Abbau von Piperin zu den Isomeren wird von Wood et al., Archer und Takagi et al. beschrieben. Die Isomerisierung wurde jedoch hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit, Lösungsmittelabhängigkeit oder den einzelnen gebildeten Isomeren (aufgrund der ungenügenden HPLC-Trennung der Isomere war eine Einzelerfassung der gebildeten Isomere nicht möglich) nicht näher untersucht [Wood (1988), Archer (1986), Takagi (1988)].

Untersuchungen von Glasl et al. zur Isomerisierung von Piperin in Chavicin und in die als Summe erfaßten *cis/trans*-Isomere Isopiperin und Isochavicin zeigen, daß sowohl die Isomerisierungsgeschwindigkeit als auch das Verhältnis der Isomere zueinander lösungsmittelabhängig sind. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit kann durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe im Vergleich zu einer Tageslichtlampe erhöht werden, ohne daß sich dabei das Verhältnis der Isomere in der untersuchten Lösung ändert [Glasl (1984)].

### 3 Ziel der Untersuchungen

Von den zahlreichen physiologischen Eigenschaften von Rosmarin- und Thymianextrakten war im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem die antioxidative Wirkung interessant, da dadurch die Haltbarkeit von Lebensmitteln verbessert werden kann. Obwohl Rosmarin- und Thymianextrakte vielfach in Lebensmitteln zur Verbesserung der Haltbarkeit eingesetzt werden, gibt es bislang keine Kenntnisse zu der Bioverfügbarkeit der antioxidativen Inhaltsstoffe. Auch die Toxizität wurde bislang nicht untersucht.

Es war daher vorgesehen, Futter mit Rosmarin- oder Thymianextrakt zu versetzen und an Tiere zu verfüttern, um anschließend die Bioverfügbarkeit<sup>2</sup> der Gewürzinhaltsstoffe zu ermitteln. Von besonderem Interesse wäre es, wenn die antioxidativen Inhaltsstoffe aus Rosmarin oder Thymian über das Futter in tierische Produkte wie Fleisch, Milch oder Eier übergangen. Als Versuchstiere sollten daher solche Tiere ausgewählt werden, bei denen nicht nur prinzipiell die Bioverfügbarkeit überprüft werden kann, sondern bei denen die tierischen Produkte auch eine Bedeutung für die menschliche Ernährung besitzen.

Zur Analytik der Gewürzinhaltsstoffe in tierischen Produkten war daher geplant, zunächst die literaturbekannten Methoden auf ihre Eignung hin zu überprüfen. Sollten sich diese Methoden als nicht geeignet herausstellen, war anschließend vorgesehen, eine leistungsfähige Methode zur Aufarbeitung der Proben und anschließenden Analyse zu erarbeiten. Eine empfindliche Analysenmethode, die auch den Nachweis der Gewürzinhaltsstoffe im ng/g-Bereich sicher ermöglicht, war eine wesentliche Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten dann die ausgewählten tierischen Produkte auf die Gewürzinhaltsstoffe und mögliche Metaboliten hin untersucht werden. Es war vorgesehen, die Fütterungsversuche so anzulegen, daß die Konzentrationen der Gewürzinhaltsstoffe im tierischen Produkt in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer und der verfütterten Extraktmenge bestimmt werden können.

Um Anhaltspunkte über die Toxizität der untersuchten Gewürzinhaltsstoffe und möglicher Metaboliten zu erhalten, war abschließend geplant, durch pathologische Untersuchungen die Toxizität von Rosmarin- und Thymianextrakt und das Stoffwechselverhalten an Zellkulturen zu untersuchen.

---

<sup>2</sup> Mit dem aus der Pharmakologie stammenden Begriff der Bioverfügbarkeit wird in der Regel die biologische Verfügbarkeit eines Arzneimittels bezeichnet. Man versteht darunter das Ausmaß, mit dem ein therapeutisch wirksamer Bestandteil aus einer Arzneiform freigesetzt, resorbiert und letztendlich am Wirkort verfügbar wird [Mutschler (1991)].

Im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Begriff losgelöst von dem Hintergrund eines Arzneimittels betrachtet und verwendet im Sinne einer Verfügbarkeit der untersuchten Substanzen in biologischen Systemen. Speziell wird darunter verstanden, in welchem Maße die Gewürzinhaltsstoffe aus dem Futter in das tierische Produkt übergehen.

## 4 Auswahl der Versuchstiere

Ziel der Fütterungsversuche war es, die Bioverfügbarkeit von Gewürzinhaltsstoffen in tierischen Produkten zu untersuchen. Die Versuchstiere wurden unter zwei Gesichtspunkten ausgewählt: Zum einen sollten die untersuchten tierischen Produkte eine Bedeutung in der menschlichen Ernährung haben und zum anderen eine wiederholte Probennahme ermöglichen. Demzufolge waren Untersuchungen von Fleisch, die eine Tötung des Tieres voraussetzten, ausgeschlossen. Ideale Versuchstiere im Hinblick auf die genannten Bedingungen sind Legehennen und Kühe, da die von ihnen gelieferten tierischen Produkte (Eier, Milch) ohne Eingriff in das Individuum untersucht werden können. Zudem besitzen das Fleisch der Tiere und ihre Produkte eine große Bedeutung für die menschliche Ernährung.

Die Bildung der Inhaltsstoffe von Eiern und von Milch erfolgt direkt aus dem Blutkreislauf [Nickel (1992), Belyavin (1994), Kielwein (1994)], so daß ein unmittelbarer Übergang in die entsprechenden tierischen Produkte untersucht werden kann.

Legehennen zeichnen sich weiterhin dadurch aus, daß sie bei relativ geringem Körpergewicht ausreichend Untersuchungssubstanz (Eier) liefern. Zudem hat das Hühnerei eine besondere physiologische Bedeutung: Der Dotter ist die größte bekannte Zelle, da er aus einer Zellteilung entsteht und einen Nucleus enthält. Da der gesamte Dotter jedoch nicht einer Zellteilung unterliegt (sie ist auf den befruchteten Blastoderm beschränkt), ist der Dotter eher als hoch spezialisiertes Organ zu betrachten anstatt als Einzelzelle. Der Dotter erfüllt eine Vielzahl biologischer Funktionen, da von ihm aus die Embryonalentwicklung beginnt und er Lipide, Proteine und andere Nährstoffe für den wachsenden Embryo bereitstellt. Der Dotter wird von Eiklar umhüllt. Die biologischen Funktionen bestehen in der Verhinderung des Wachstums von Mikroorganismen, die den Dotter angreifen könnten, durch antibakteriell wirkende Inhaltsstoffe und in der Bereitstellung von Wasser, Proteinen und anderen Nährstoffen für den Embryo, vor allem in dessen letzter Wachstumsphase [Gerken (1994)].

Die Bildung der Ausgangsstoffe für den Dotter erfolgt in der Leber. Anschließend erfolgt ein Transport von der Leber über die Blutbahn zum Ovar. Das Ei und seine begrenzende Membran werden als Follikel bezeichnet. Das aktive Ovar stellt ein Gebilde dar, in dem eine Follikelrangordnung besteht, bei der eine schrittweise Entwicklung und Entlassung voll entwickelter Eidotter stattfindet. Das größte Follikel ist jeweils das nächste, das ovuliert wird. Die Follikelreifung im Ovar ist verbunden mit einem Anstieg des Follikeldurchmessers und einem Anstieg an Eimasse und dauert 8 bis 12 Tage [Belyavin (1994)]. Ein Aufnahme-maximum der Gewürzinhaltsstoffe ist daher nach ungefähr 12 Tagen zu erwarten. Diese Konzentration sollte bis zum Ende der Fütterung konstant bleiben.

Mit den gewählten Versuchsmodellen „Futter – Legehennen – Ei“ und „Futter – Kuh – Milch“, können Erkenntnisse über eine biologische Verfügbarkeit von Gewürzinhaltsstoffen

gewonnen werden. Weiterhin kann untersucht werden, ob eventuell Metaboliten in Eiern oder Milch nachgewiesen werden können. Weiterhin kann mit diesem Modell abgeschätzt werden, ob die gewonnenen Lebensmittel Eier und Milch durch Supplementierung des Futters mit Gewürzextrakten direkt beeinflusst werden können.

## 4.1 Fütterung von Legehennen

Die für die Untersuchung der Bioverfügbarkeit notwendigen Fütterungsversuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Gerhard Gluender (Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover) durchgeführt.

Für die Fütterungsversuche wurde dem Legehennenmehl der entsprechende Gewürzextrakt zugefügt. Der Zusatz an Gewürzextrakt zu dem Futter wurde möglichst hoch gewählt, so daß ein Übergang aus dem Futter in das Ei sicher nachweisbar ist. Die zugesetzte Menge an Gewürzextrakt entsprach einer Futtermischung, die 10 % von der reinen Gewürzpflanze enthält (bezogen auf die antioxidativen Inhaltsstoffe). Ein noch höherer Zusatz an Gewürzextrakt schien nicht angebracht, um die Legeleistung der Hühner nicht zu gefährden.

Zur besseren Homogenisierung des Extraktes im Legehennenmehl wurde der Extrakt zunächst mit Pflanzenöl vermischt und dann zu dem Futter gegeben. Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Versuchsreihe Nr. 1 diente als Kontrollversuch. Dem Legehennenmehl wurde dazu ausschließlich 1 % Öl (Bonita Pflanzenöl, Penny Markt) zugesetzt. Bei der Versuchsreihe 2 wurde dem Futter neben dem Öl der entsprechende Gewürzextrakt (Thymian oder Rosmarin) zugesetzt. Versuchsreihe 3 enthielt ebenfalls 1 % Öl und den entsprechenden Gewürzextrakt in einer höheren Konzentration als in der Versuchsreihe 2. Das Futter wurde mit zwei unterschiedlichen Gewürzextraktkonzentrationen dotiert, um einen Übergang der Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von der dotierten Konzentration untersuchen zu können.

Die Behandlungsperioden der Versuchsreihen 2 und 3 hatten eine Dauer von etwa 3 Wochen. In den Vor- und Nachperioden wurden die Hühner mit Legehennenmehl unter Zusatz von 1 % Öl gefüttert.

	<b>Vorperiode</b>	<b>Behandlungsperiode</b>	<b>Nachperiode</b>
<b>1</b>	Futter + 1 % Öl	Futter + 1 % Öl	Futter + 1 % Öl
<b>2</b>	Futter + 1 % Öl	Futter + 1 % Öl + 1 Teil Gewürzextrakt	Futter + 1 % Öl
<b>3</b>	Futter + 1 % Öl	Futter + 1 % Öl + 1,5 – 2 Teile Gewürzextrakt	Futter + 1 % Öl

*Table 2: Übersicht: Fütterungsversuch Legehennen.*

Um eine definierte Aufnahmemenge des angebotenen Futters zu gewährleisten, wurden die Legehennen einzeln im Käfig gehalten (Käfiggröße 43\*35\*38cm [Tiefe\*Breite\*Höhe], Beleuchtungsdauer 14 Stunden pro Tag, 1000 lx). Die Käfige standen in einer Anordnung von

3 x 3 Käfigen über- bzw. nebeneinander. Sie waren oben mit einer Metallplatte abgedeckt, so daß eine einheitliche Beleuchtungsstärke für alle Legehennen gewährleistet war. Die tägliche Futtermenge wurde mit einem eigens dafür hergestellten Meßbecher den Hühner „ad libitum“ jeden Morgen zur Verfügung gestellt. Weiterhin stand den Legehennen eine ausreichende Menge Trinkwasser zur Verfügung. Die Futtermenge wurde aus dem Futterbedarf der Vorperiode ermittelt und betrug 100 g/Tag. Die Eier wurden täglich gesammelt und beschriftet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 5 °C gelagert.

## 4.2 Fütterung von Kühen

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Pabst (Bundesanstalt für Milchforschung, Institut für Chemie und Physik, Kiel) wurden Fütterungsversuche mit Rosmarinextrakt an Kühen durchgeführt.

Für den Fütterungsversuch mit Rosmarinextrakt standen 3 Kühe zur Verfügung. Es wurden drei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt.

Das Grundfutter bestand aus Grassilage (morgens 8,0 kg; abends 10,0 kg) und 6,0 kg Getreideschrot (Weizen, Hafer). Diese Menge wurde täglich verfüttert.

Versuchsreihe 1 diente als Kontrollversuch; dem Futter wurde lediglich Öl zugesetzt. Versuchsreihe 2 bekam während des Behandlungszeitraum in den ersten 6 Tagen nur Öl als Zusatz zum Futter, in den letzten 7 Tagen wurde dem Futter ebenfalls Rosmarinextrakt zugesetzt. Die Versuchsreihe 3 begann in den ersten Tagen der Fütterung mit einem geringeren Carnosolsäuregehalt, der in der zweiten Versuchshälfte gesteigert wurde.

Das Futter während der Behandlungsperiode wurde wie folgt angesetzt:

Versuchsreihe	Anzahl Kühe	Behandlungsperiode (1. – 6. Tag)	Behandlungsperiode (7. – 12. Tag)
1	1	Futter + Öl	Futter + 1 % Öl
2	1	Futter + Öl	Futter + 1 % Öl + Gewürzextrakt
3	1	Futter + Öl + Gewürzextrakt	Futter + 1 % Öl + Gewürzextrakt

*Tabelle 3: Übersicht: Fütterungsversuch Kühe.*

Der Rosmarinextrakt wurde mit Öl versetzt und zu Getreideschrot (Kraftfutter) gegeben und homogenisiert. Je Futterzeit (morgens und abends) wurden am 1. Tag der Behandlung 60 g Rosmarinextrakt in 100 g Öl und ab dem 2. Tag bis zum 7. Tag 90 g Rosmarinextrakt in 150 g Öl verfüttert.

Da die verwendeten Rosmarinextrakte einen unterschiedlichen Carnosolsäuregehalt aufwiesen und jeweils am 1. Tag der Behandlungsperiode eine geringere Carnosolsäuremenge gefüttert wurde, wird in der nachfolgenden Tabelle direkt der täglich aufgenommene Carnosolsäuregehalt angegeben:

Fütterungstag	täglich aufgenommene Carnosolsäure [g]		
	Versuchsreihe 1	Versuchsreihe 2	Versuchsreihe 3
1	0	0	15,6
2 - 6	0	0	23,4
7	0	21,6	32,4
8 - 13	0	32,4	32,4

***Tabelle 4: Fütterungsversuch Kühe: Zusatz Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt während der Behandlungsperiode.***

Die täglich verfütterte Menge an Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt war damit, bezogen auf das Körpergewicht der Versuchstiere, vergleichbar mit der Fütterung von Rosmarinextrakt an Legehennen, so daß die erhaltenen Untersuchungsergebnisse aus den beiden Fütterungsversuchen einen Vergleich ermöglichen.

Bei der Probennahme der Milch wurde 1 L Milch in eine Kautexflasche gefüllt und eingefroren. Aus den eingefrorenen Gemelksproben wurden aliquote Tagesgemelksproben hergestellt, aus denen der Rahm mit der Zentrifuge gewonnen wurde. Der Rahm wurde zunächst bei  $-18\text{ °C}$  eingefroren und dann bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Methodenentwicklung

#### 5.1.1 Probenaufarbeitung

##### 5.1.1.1 Eigelb

###### 5.1.1.1.1 Ziel

Voraussetzung für die Untersuchung zur Bioverfügbarkeit antioxidativer Inhaltsstoffe im Eigelb ist eine geeignete Analytik. Das erste Teilziel der Arbeit bestand daher darin, eine geeignete Methode zur Bestimmung der Gewürzinhaltsstoffe im Eigelb zu finden.

###### 5.1.1.1.2 Vorüberlegungen

Ternes et al. beschreiben eine Methode zur Aufarbeitung von Eigelb nach Zusatz von Rosmarinextrakt und anschließender HPLC-Analyse (siehe Kapitel 2.1.3) [Ternes (1995b)]. Andere Aufarbeitungsmethoden zur Analyse von Gewürzinhaltsstoffen oder antioxidativ wirkenden Stoffen in Eigelb sind nicht literaturbekannt.

Ausgehend von der von Ternes et al. beschriebenen Probenaufarbeitung wurde versucht, die antioxidativen Inhaltsstoffe aus den Eiern des Fütterungsversuches zu isolieren.

###### 5.1.1.1.3 Anwendung und Problem der literaturbeschriebenen Aufarbeitung

In einem Vorversuch zu den durchgeführten Fütterungsversuchen wurde eine Legehennen mit Rosmarin- und eine weitere mit Thymianextrakt gefüttert. Die dem Futter zugesetzte Menge Gewürzextrakt entsprach der höchsten zugesetzten Menge, die anschließend in den Fütterungsversuchen eingesetzt wurde. Die 10 Tage nach Fütterungsbeginn erhaltenen Eier wurden für die literaturbeschriebene Aufarbeitung herangezogen [Ternes (1995b)]. In den erhaltenen Proben konnte jedoch weder Carnosolsäure noch p-Cymen-2,3-diol oder Thymol nachgewiesen werden.

Es wurde daher versucht, die Nachweisgrenze der Methode zu erniedrigen. Dazu wurden die Proben an verschiedenen Stellen der Aufarbeitung aufkonzentriert. Eine Konzentrierung des Methanolextraktes führte anschließend zum Verstopfen der Festphasenkartusche. Eine Erhöhung der Probeneinwaage führte wiederum dazu, daß die Festphasenextraktion nicht durchgeführt werden konnte. Wurde die Lösung nach der Festphasenaufreinigung um den Faktor 2 aufkonzentriert, kam es bei der anschließenden HPLC-Analyse zum Verschluß der Säule.

Aufgrund der geringen Konzentration von Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol und Thymol nach der Fütterung mit Gewürzextrakten erwies sich die literaturbekannte Methode für die Untersuchung von Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarin- und Thymianextrakt als nicht empfindlich genug und für die Spurenanalytik ungeeignet.



#### **5.1.1.1.4 Entwicklung einer leistungsfähigen Eigelbaufarbeitung**

Ausgehend von der literaturbeschriebenen Aufarbeitung [Ternes (1995b)] wurde zunächst versucht, die Extraktion der Gewürzinhaltsstoffe durch Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels unter weitgehender Abtrennung von Matrixbestandteilen zu optimieren, eine Übersicht zur Methodenoptimierung ist in Abbildung 8 wiedergegeben.

Zunächst wurde Methanol durch das unpolare Lösungsmittelgemisch n-Hexan/2-Propanol (3/1) zur Extraktion des Eigelbes ersetzt. Die anschließende Festphasenextraktion an RP-18 war jedoch aufgrund der hohen Matrixbelastung nicht durchführbar, da die Festphasenkartusche verstopfte.

Anschließend wurde daher versucht, die Gewürzinhaltsstoffe durch eine Heißextraktion mit Cyclohexan/Ethanol in einer Apparatur nach Twisselmann durchzuführen [Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in Eiern und Eiprodukten, in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG]. Die Methode nach § 35 LMBG wurde dahingehend abgewandelt, daß für eine geringere Nachweisgrenze die Probeneinwaage verdreifacht (6 g Eigelb) wurde. Die Einsatzmenge von Seesand, Natriumsulfat und Lösungsmittel (Cyclohexan/Ethanol) wurde entsprechend erhöht. Der Extrakt wurde nach einer Extraktionszeit von 5 Stunden unter Vakuum auf ~5 mL eingengt, in ein Zentrifugenglas überführt und dreimal mit je 10 mL Methanol extrahiert. Mit 5 mL des Methanolextraktes wurde erneut versucht, eine Festphasenextraktion nach der Vorschrift von Ternes et al. durchzuführen [Ternes (1995b)]. Dieses war jedoch wiederum aufgrund der zu hohen Matrixbelastung nicht möglich, da die Festphasenkartusche verstopfte.

Da die Festphasenextraktion nicht gelang, wurde die erhaltene methanolische Lösung nach Verdünnen (75 µL Probe + 150 µL Methanol) direkt mittels HPLC untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu einem parallel aufgearbeiteten Kontrollrei, daß die Gewürzinhaltsstoffe nachgewiesen werden konnten. Um die HPLC-Säule vor Verunreinigungen durch in der Probe enthaltene Matrixbestandteile zu schützen und somit die Trenneigenschaften nicht zu gefährden, wurde jedoch eine den Anforderungen entsprechende Aufreinigung angestrebt.

Zur Aufreinigung von Matrixbestandteilen im Methanolextrakt wurde das mitisierte Probenfett bei -18 °C durch Lagerung in der Tiefkühltruhe (30 min) ausgefroren. Untersuchungen in Abhängigkeit von der Temperatur und der Dauer der Ausfrierzeit zeigen, daß eine Ausfrierzeit von 1,5 Stunden bei -18 °C und anschließende Kühlung in einem Eis/Kochsalz-Gemisch (1/1) die beste Wiederfindung zeigte. Der nach dem Zentrifugieren (1000 x g, 3 min, -18 °C) erhaltene Überstand wurde unter Vakuum eingengt (60 °C). Nach Verdünnen mit Wasser wurde versucht, die Festphasenextraktion nach Ternes et al. durchzuführen. Aufgrund der immer noch zu hohen Matrixbelastung verstopfte die Festphasenkartusche und die Aufreinigung führte damit erneut nicht zu dem gewünschten Erfolg.

Da eine Aufreinigung des Methanolextraktes nicht gelang, wurde versucht, direkt den Extrakt aus der Cyclohexan/Ethanol-Extraktion mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) zu

reinigen. Dadurch sollte versucht werden, die Gewürzinhaltsstoffe von der Matrix aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße der darin enthaltenen Bestandteile zu trennen. Zur Trennung wurde eine Sephadex-LH-20-Säule (320 x 10 mm) mit Vorsäule (0,5 g Sephadex-LH-20) verwendet, als Lösungsmittel wurde Methanol eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß ca. 50 % der Matrix bereits von der Vorsäule zurückgehalten wurden. Mit der nachfolgenden Hauptsäule wurde keine weitere Reinigung erzielt; es trat im Gegenteil aufgrund der langen Chromatographiedauer (~2 Stunden, je nach Tropfgeschwindigkeit) ein Abbau der Untersuchungssubstanzen ein. Für die weiteren Versuche wurde daher nur noch die kurze Vorsäule zur Reinigung eingesetzt.

Genauere Untersuchungen an dieser Sephadex-Kartusche zeigten, daß die Elution der Gewürzinhaltsstoffe mit 30 mL Methanol verlustfrei ablief. Wurde anschließend mitisoliertes Probenfett ausgefroren, wurde noch eine Wiederfindung von 96 % der Gewürzinhaltsstoffe erreicht.

Die Elution über die Sephadex-Kartusche (0,5 g Sephadex-LH-20) konnte deutlich beschleunigt werden, wenn die Probe vorher filtriert wurde (Verkürzung der Elutionszeit von 2 Stunden auf eine  $\frac{3}{4}$  Stunde).

Ein Ersatz von Methanol durch Acetonitril bei der Gelpermeationschromatographie (Vor- und Hauptsäule) führte zu einer höheren Wiederfindung (Erhöhung um ~20 %), gleichermaßen erhöhte sich jedoch die Matrixbelastung, da sich Acetonitril zum Ausfrieren von Fett als ungeeignet erwies.

Eine Verseifung des Probenfetts als Probenaufarbeitung konnte aufgrund der Instabilität der untersuchten Substanzen nicht durchgeführt werden.

Aus der nach der Gelpermeationschromatographie erhaltenen Lösung fiel bei der HPLC-Analyse mit Acetonitril/Wasser als Eluent Protein aus und führte zum Verstopfen der Säule. Deshalb mußten aus der Probenlösung vor der HPLC-Analyse die Proteine durch Zugabe von Acetonitril/Wasser ausgefällt werden, wobei die Zusammensetzung von Acetonitril/Wasser dem späteren HPLC-Eluenten entsprach. Da die Wiederfindungsrate um so besser war, je höher der Acetonitrilgehalt war, sollte der Gehalt an Acetonitril nicht niedriger gewählt werden, als in dem späteren HPLC-Eluenten.

Vor der Zugabe von Acetonitril/Wasser mußte zunächst die Probenlösung nach dem Ausfrieren von Fett eingeeengt werden. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Proben niemals bis zur Trockene eingeeengt wurden, da dieses die Wiederfindung auf bis zu 10 % der zuvor dotierten Menge senkte. Anschließend wurde Acetonitril/Wasser zugegeben. Der dadurch entstandene Niederschlag an Proteinen wurde durch einen angefeuchteten Faltenfilter abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit der Acetonitril/Wasser-Lösung nachgewaschen, so daß die gesamte Probe in insgesamt 5 mL vorlag.

Mit der erhaltenen Lösung war es nun erstmals möglich, eine Festphasenextraktion durchzuführen. Die daraus erhaltene Lösung konnte mittels HPLC untersucht werden.

Nach Ausarbeitung der Methode zur Aufarbeitung von Eigelb wurde von Machery-Nagel eine neue Festphasenkartusche auf Polystyrolbasis (quervernetztes Polystyrol-Divenylbenzolcopolymer) mit einer deutlich höheren Trennkapazität auf den Markt gebracht. Die abschließende Festphasenreinigung wurde daher von der RP-18-Säule auf diese Säule (Chromabond HR-P) umgestellt: Die Kartusche wurde zunächst mit 4 mL Wasser konditioniert. Die Proben wurden mit Wasser verdünnt und auf pH 2 durch Zugabe von Salzsäure eingestellt. Durch das Ansäuern wurden die Phenolate in die entsprechenden Phenole überführt, die eine bessere Absorption an der Festphasenkartusche zeigten. Bei der Untersuchung auf Carnosolsäure wurde aufgrund der Instabilität auf die Zugabe von Salzsäure verzichtet. Nach der Aufgabe der Probenlösung auf die Säule wurde zunächst durch Waschen mit Wasser die Probenmatrix entfernt und dann die Gewürzinhaltsstoffe mit 5 mL Acetonitril/Methanol (1/1) von der Festphase eluiert. Die auf der Säule verbleibende Probenmatrix verzögert die Elution der Gewürzinhaltsstoffe. Um eine quantitative Elution in 5 mL zu gewährleisten, mußte die Probeneinwaage für die Cyclohexan/Ethanol-Extraktion deshalb auf 4 g Eigelb beschränkt werden.

Um die Nachweisgrenze der isolierten Substanzen zu erniedrigen, wurde das Eluat nach Festphasenextraktion unter Vakuum bei 50 °C eingeeengt.

Eine vollständige Beschreibung der neu entwickelten Probenaufarbeitung befindet sich im Experimentellen Teil in Kapitel 6.6.1 dieser Arbeit.

Mit der entwickelten Probenaufarbeitung war es nun erstmalig möglich, die untersuchten Substanzen um bis zu drei Zehnerpotenzen empfindlicher als in der literaturbeschriebenen Methode nachzuweisen. Damit wurde eine wesentliche Voraussetzung zur anschließenden Untersuchung des Eigelbs aus den Fütterungsversuchen geschaffen.

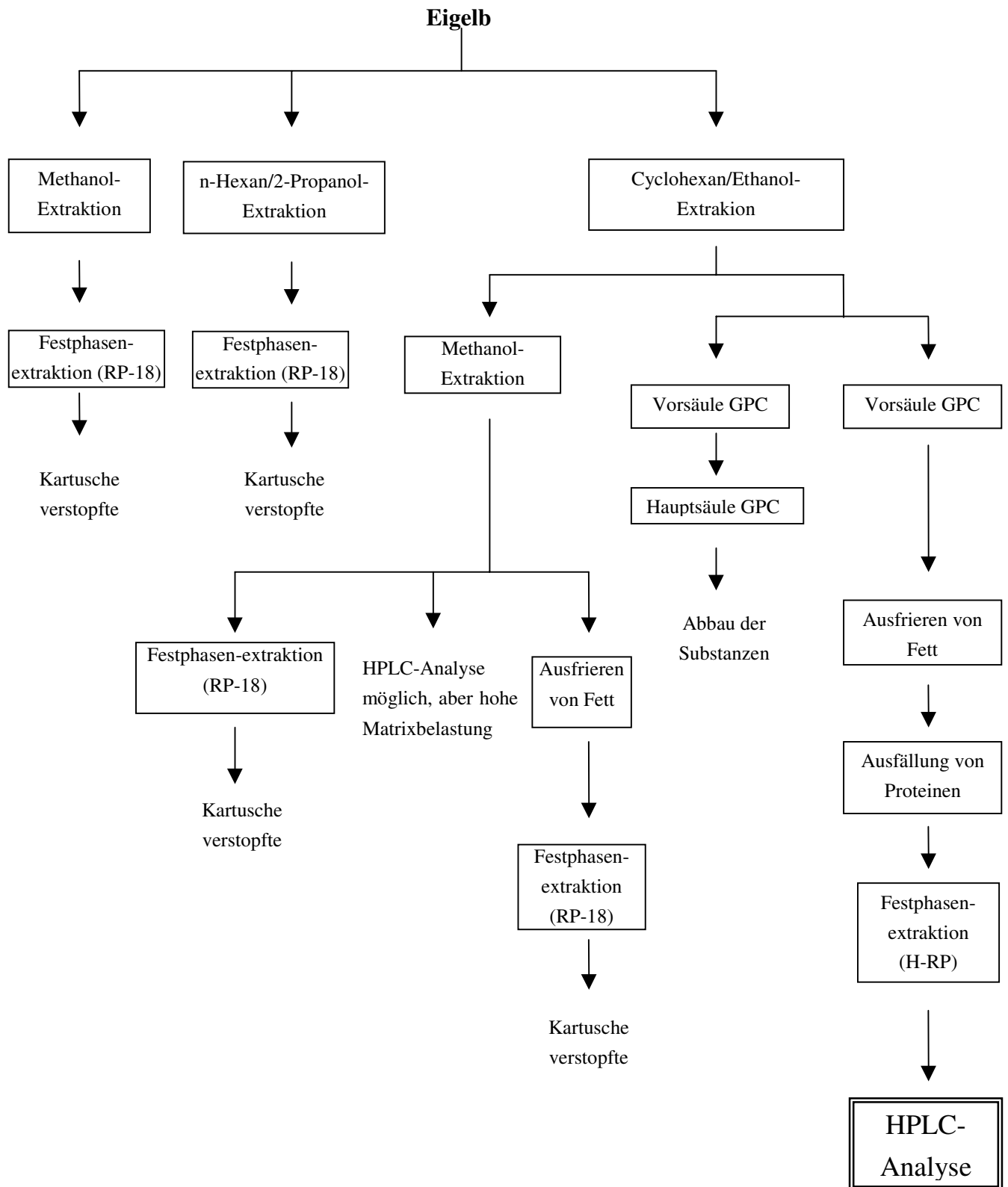


Abbildung 8: Übersicht der Aufarbeitungsentwicklung zur Isolierung von Gewürzinhaltstoffen aus Eigelb.

### 5.1.1.1.5 **Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen**

Die neu entwickelte Methode wurde statistisch abgesichert und damit validiert. Die genauen Versuchsbedingungen und die statistischen Angaben können dem experimentellen Teil (Kapitel 6) dieser Arbeit entnommen werden. Es wurden folgende Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten der Inhaltsstoffe im Eigelb ermittelt:

	Nachweisgrenze		Bestimmungsgrenze		Wiederfindungsrate	
	[ng/g Eigelb]		[ng/g Eigelb]		[%]	
<b>p-Cymen-2,3-diol</b>	2,4	± 0,2	4,7	± 0,5	61	± 5
<b>Thymol</b>	21,6	± 0,6	43,3	± 1,2	55	± 5
<b>Piperin</b>	24,8	± 0,2	49,6	± 0,4	70	± 8
<b>Carnosolsäure</b>	19,5	± 0,8	39,1	± 1,6	52	± 8

*Tabelle 5: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten im Eigelb von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure.*

Die Ergebnisse zeigen, daß es nun erstmalig möglich ist, die Substanzen im unteren ng/g-Bereich nachzuweisen. Somit können auch sehr geringe Übergänge von dem dotierten Futter in das Ei nachgewiesen werden. Damit konnte das erste Teilziel der Arbeit – die Entwicklung einer leistungsfähigen Probenaufarbeitung zur Analyse von Eigelb auf Gewürzinhaltsstoffe – erreicht werden.

### 5.1.1.1.6 **Zusammenfassung**

Für die Probenaufarbeitung von Gewürzinhaltsstoffen aus Eigelb wurde eine neue Methode entwickelt. Diese sieht zunächst eine Extraktion des Eigelbes mit Cyclohexan/Ethanol vor. Im nächsten Schritt wird die Probe durch Gelpermeationschromatographie gereinigt. Die danach noch enthaltenen Fette werden durch Ausfrieren entfernt. Eine Abtrennung der in der Matrix verbleibenden Proteine wird durch Fällung mit Acetonitril/Wasser erreicht. Die abschließende Reinigung erfolgt danach durch eine neu entwickelte Festphasenextraktion an H-RP-Material. Die erhaltene Lösung hat eine so geringe Matrixbelastung, daß sie auch nach Aufkonzentrierung problemlos mittels HPLC untersucht werden kann.

Mit Hilfe der neu entwickelten Methode war es nun erstmals möglich, Gewürzinhaltsstoffe im unteren ng/g-Bereich im Eigelb nachzuweisen. Dadurch können auch sehr geringe Übergänge der Substanzen aus dem Futter in das Eigelb bestimmt werden.

Die Methode wurde für Substanzen entwickelt, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und Polarität ein breites Spektrum abdecken. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die neu entwickelte Probenaufarbeitung über die untersuchten Gewürzinhaltsstoffe hinaus für eine Vielzahl an Substanzen geeignet ist. Dieses zeigte sich im weiteren Verlauf der Arbeit bereits dadurch, daß mit der für Thymian- und Rosmarininhaltsstoffe entwickelten Probenaufarbeitung auch das nicht erwartete Piperin

einschließlich der Isomere nachgewiesen werden konnte und hierfür ebenfalls Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren ng/g-Bereich erhalten wurden. Denkbar sind daher weiterführende Untersuchungen zur biologischen Verfügbarkeit anderer Substanzen im Eigelb. Aber auch neue Bereiche sollten sich mit der neuen Methode erschließen lassen. So könnte der Übergang von Arzneimitteln in das Eigelb untersucht werden. Dadurch könnten Zeiten festgesetzt werden, in denen Eier bei Behandlung von Legehennen mit pharmakologisch wirksamen Stoffen nicht dem menschlichen Verzehr zugeführt werden dürften.

#### **5.1.1.1.7 Überprüfung der Probenaufarbeitung**

Mit Hilfe der neu entwickelten Methode wurde nur ein sehr geringer Übergang der Gewürzinhaltsstoffe in das Eigelb festgestellt (siehe Kapitel 5.2.3, 5.3.3.1 und 5.3.4.1). Dieses Ergebnis war sehr überraschend und wurde zu Beginn der Untersuchungen nicht erwartet.

Die Wiederfindungsrate der neu entwickelten Probenaufarbeitung wurde durch Dotierung des Eigelbes mit den entsprechenden Extrakten bestimmt. Obwohl dieses Vorgehen in der Regel zu zuverlässigen Ergebnissen führt, ist nicht gänzlich auszuschließen, daß die nach Fütterung mit Gewürzextrakten im Eigelb enthaltenen Gewürzinhaltsstoffe in einer anderen Form gebunden sind, als es die Dotierung des Eigelbes mit den Gewürzinhaltsstoffen wiedergibt. In diesem Fall wäre die Wiederfindungsrate zu hoch bestimmt worden.

Eine mögliche Ursache könnte die nicht quantitative Extraktion der Gewürzinhaltsstoffe oder die Bindung von Gewürzinhaltsstoffen im Rückstand der Eigelbextraktion sein. Darüber hinaus könnten durch den Stoffwechsel die Gewürzinhaltsstoffe als Glucuronid- oder Sulfatmetabolit in das Eigelb eingelagert werden und somit bei der Extraktion nicht vollständig erfaßt worden sein.

Um eine nicht quantitative Erfassung der Gewürzinhaltsstoffe aus dem Eigelb auszuschließen, wurde der erste Schritt der Probenaufarbeitung, bei der das Eigelb aufgeschlossen wird, erneut überprüft.

#### **5.1.1.1.7.1 Überprüfung der Cyclohexan/Ethanol-Extraktion**

Es wurde untersucht, ob die entwickelte Probenaufarbeitung eine höhere Wiederfindung aufwies, wenn Eigelb mit einem polareren Lösungsmittel als Cyclohexan/Ethanol extrahiert wurde. Eigelb aus der Rosmarinextraktfütterung wurde hierzu mit Methanol statt mit Cyclohexan/Ethanol (1/1) extrahiert. Die weitere Aufarbeitung blieb unverändert. Die Gelpermeationschromatographie mit Sephadex-LH-20 dauerte hierbei um einen Faktor 4 länger als dieser Aufreinigungsschritt üblicherweise in Anspruch nahm. Parallel wurden identische Eigelbproben mit der bisherigen Methode mit Cyclohexan/Ethanol (1/1) extrahiert. Die mit Methanol extrahierten Eigelbproben zeigten im Vergleich zu den mit Cyclohexan/Ethanol extrahierten Eigelbproben einen um 16 % geringeren Carnosolsäuregehalt. Dieser geringe Gehalt ist vermutlich auf die längere Aufarbeitungszeit zurückzu-

führen. Mit diesem Untersuchungsergebnis ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine unvollständige Extraktion.

#### **5.1.1.1.7.2 Überprüfung des Rückstandes aus der Cyclohexan/Ethanol-Extraktion**

Der Rückstand der Eigelbextraktion könnte aufgrund einer unvollständigen Extraktion Gewürzinhaltsstoffe enthalten. Diese Inhaltsstoffe könnten z. B. in Proteinen eingebunden vorliegen und bei der Extraktion nicht quantitativ extrahiert worden sein. Zur Überprüfung sollte daher der Rückstand durch Säurezugabe aufgeschlossen werden. Aufgrund der Instabilität von Carnosolsäure waren für diesen Aufschluß nur die Eier der mit Thymianextrakt gefütterte Legehennen geeignet.

Der Rückstand wurde hierzu mit Salzsäure versetzt, für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert, filtriert und durch eine Festphasenextraktion gereinigt. Anschließend wurden 1,5 mL dieser Lösung unter Vakuum bei 50 °C bis zu einem Volumen von ungefähr 250 µL<sup>3</sup> eingeeengt, mit Stickstoff belüftet und mittels HPLC untersucht.

Zunächst wurde durch Dotierung des Eigelbrückstandes mit Thymianextrakt die Nachweisgrenze dieser Methode bestimmt. Die Nachweisgrenze pro Gramm Eigelbrückstand lag für p-Cymen-2,3-diol bei 0,03 µg, für Thymol bei 0,60 µg und für Piperin bei 0,73 µg. Sollten im Rückstand noch relevante Mengen an Gewürzinhaltsstoffen eingeschlossen sein, könnten diese somit sicher ermittelt werden.

Anschließend wurde daher der Rückstand der Eigelbextraktion von Eiern aus der Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt auf verbleibende Gewürzinhaltsstoffe untersucht. In dem Rückstand konnten jedoch keine Gewürzinhaltsstoffe nachgewiesen werden.

Es ergab sich damit kein Anhaltspunkt für eine Einlagerung von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin in dem Extraktionsrückstand.

#### **5.1.1.1.7.3 Analytische Untersuchung des Eigelbes nach Inkubation mit β-Glucuronidase/Arylsulfatase**

Die Gewürzinhaltsstoffe könnten nach einer Metabolisierung als Glucuronid- oder Sulfatmetabolit in das Eigelb eingelagert werden. Durch die Enzymmischung β-Glucuronidase/Arylsulfatase sollte überprüft werden, ob die Gewürzinhaltsstoffe nach Fütterung in dem Eigelb gebunden vorliegen und damit bei der Extraktion eventuell nicht miterfaßt wurden. Dieses wurde exemplarisch an Eigelb aus der Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt untersucht. Hierzu wurden jeweils 4,00 g Eigelb mit 1 mL 0,1 mol/L Acetat-Puffer (pH 5,4) und 10 µL β-Glucuronidase/Arylsulfatase versetzt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung nach der bisherigen Methode.

---

<sup>3</sup> Das genaue Volumen der Proben wurde durch Aufziehen der gesamten Probenmenge in eine HPLC-Sprize bestimmt. Der Fehler dieser Volumenbestimmung liegt bei 1-2 %.

Parallel wurden identische Eigelbproben, die nicht mit der Enzymmischung versetzt worden waren, aufgearbeitet und analysiert.

Im Vergleich mit dem nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode aufgearbeiteten Eigelb, zeigten die Eigelbproben nach Inkubation einen um 57 % verringerten Carnosolsäuregehalt. Dieses kann auf die thermische Belastung während der Inkubation zurückgeführt werden.

Insgesamt ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine unvollständige Erfassung.



## 5.1.1.2 Eiklar

### 5.1.1.2.1 Ziel

Die Eiklarsynthese erfolgt aus Bestandteilen, die dem Blut entnommen werden. Aus diesem Grund könnte ebenfalls ein Übergang der Gewürzinhaltsstoffe in das Eiklar möglich sein. Es sollte daher eine Aufarbeitungsmethode entwickelt werden, die es ermöglicht, Gewürzinhaltsstoffe nach Fütterung von Legehennen mit Gewürzextrakten im Eiklar mittels HPLC zu analysieren.

### 5.1.1.2.2 Vorüberlegungen

In der Literatur sind keine Aufarbeitungsmethoden zur Analyse von den untersuchten Gewürzinhaltsstoffen in Eiklar bekannt.

Eiklar ist im wesentlichen eine 10 %ige Proteinlösung und enthält nur in geringem Maße andere Stoffe wie Lipide (0,03 %), Kohlenhydrate (1 %) und Mineralien (0,6 %). Daher konnte sich die Aufarbeitung im wesentlichen auf die Fällung von Proteinen konzentrieren.

Eine Proteinfällung mit Carrez I und II, wie sie bei der Bestimmung von Zuckern nach Luff-Schoorl [§ 35 Methode LMBG, Matissek (1992)] angewendet wird, konnte auf die Eiklar-aufarbeitung nicht übertragen werden, da sich die Gewürzinhaltsstoffe durch eine geringe Löslichkeit in einer wäßrigen Lösung auszeichnen.

Günstiger erschien daher die Fällung von Proteinen durch Zusatz von Lösungsmitteln, da darin die Gewürzinhaltsstoffe besser als in einer rein wäßrigen Lösung gelöst werden.

### 5.1.1.2.3 Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Eiklar

Ausgehend von den Vorüberlegungen wurde Eiklar mit Acetonitril versetzt und so die Proteine ausgefällt. Um einen direkten Vergleich mit der Eigelbaufarbeitung zu haben, wurde die Einwaage des Eiklars der Einwaage des Eigelbes (4 g) angepaßt. Zur Fällung wurde das Eiklar mit 4,0 mL Acetonitril versetzt und homogenisiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 1000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde unter Vakuum bei 50 °C eingengt und auf 5 mL mit Acetonitril aufgefüllt.

1,5 mL dieser Lösung wurden unter Vakuum bei 50 °C zu einem Volumen von ungefähr 500 µL<sup>4</sup> eingengt und mit Stickstoff belüftet.

Ein weiteres Einengen der Proben (auf z. B. 250 µL wie bei dem Eigelb) war bei den Proben aufgrund des Wassergehaltes langwierig und wurde daher nicht durchgeführt.

---

<sup>4</sup> Das tatsächliche Volumen wurde durch Aufziehen der Lösung in einer HPLC-Spritze bestimmt. Der Fehler dieser Volumenbestimmung liegt bei 1 %.

#### 5.1.1.2.4 **Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen**

Um die entwickelte Methode auf ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen, wurden die Nachweisgrenzen von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure bestimmt.

Hierzu wurde Thymian- bzw. Rosmarinextrakt in Methanol gelöst und entsprechend der entwickelten Methode aufgearbeitet. Für die Nachweisgrenzen im Eiklar wurden so folgende Werte ermittelt:

	Nachweisgrenze [ng/g Eiklar]	
p-Cymen-2,3-diol	64,4	± 1,0
Thymol	179	± 13
Piperin	37,9	± 4,9
Carnosolsäure	90,0	± 3,6

*Tabelle 6: Nachweisgrenzen für p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure im untersuchten Eiklar.*

Piperin konnte neben den gebildeten Isomeren als einzige Substanz im Eiklar nachgewiesen werden. Um einen Übergang aus dem Futter in das Eiklar berechnen zu können, wurde daher für diese Substanz die Wiederfindungsrate der Methode bestimmt. Hierzu wurde der piperinhaltige Thymianextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen dem Eiklar zugesetzt und die Wiederfindung von Piperin nach Aufarbeitung bestimmt. Es ergibt sich für Piperin eine Wiederfindung von 75,9 %.

## 5.1.2 Analytik mittels HPLC

### 5.1.2.1 HPLC-Untersuchung von Rosmarinextrakt an RP-18

#### 5.1.2.1.1 Ziel

Um die HPLC-Analysenzeit zur Untersuchung von Rosmarininhaltstoffen zu verkürzen, sollte durch Modifizierung von literaturbekannten HPLC-Untersuchungen eine isokratische HPLC-Trennung mit elektrochemischer Detektion entwickelt werden, die es innerhalb einer kurzen Chromatographiezeit ermöglicht, Carnosol und Carnosolsäure in den untersuchten Matrices zu analysieren.

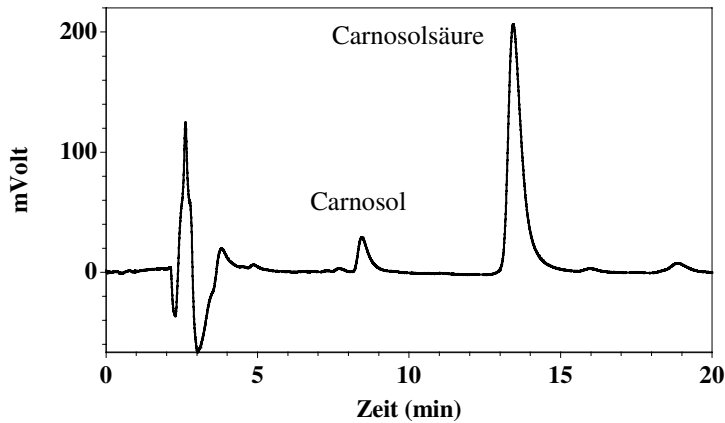
#### 5.1.2.1.2 Vorüberlegungen

In der Literatur sind bereits mehrere HPLC-Methoden zur Untersuchung von Rosmarinextrakt beschrieben (siehe Kapitel 2.1.1). Darauf aufbauend sollte eine HPLC-Trennung mit elektrochemischer Detektion entwickelt werden.

#### 5.1.2.1.3 Entwicklung einer isokratischen HPLC-Methode

Zur Trennung der Rosmarininhaltstoffe sollte aus Gründen der Verfügbarkeit eine RP-18-Säule verwendet werden. Aufgrund der größeren Elutionskraft von Acetonitril gegenüber Methanol bei der Chromatographie an RP-18-Material wurde Acetonitril der Vorzug gegeben, da es sich gegenüber Methanol durch eine kürzere Elutionszeit der untersuchten Substanzen auszeichnet. Ferner wurde auf die von Schwarz gemachte Erfahrung zurückgegriffen, daß ein Zusatz von Citronensäure anstelle von Essigsäure zu dem HPLC-Eluenten ein Tailen der Peaks reduziert und sich Tetraethylammoniumhydroxid (TEAOH) als Leitsalz gegenüber anderen Leitsalzen wie  $\text{LiClO}_4$  und  $\text{KNO}_3$  bei der elektrochemischen Detektion besonders eignet [Schwarz (1992, Dissertation)].

Durch Optimierung sowohl der Acetonitril/Wasser-Zusammensetzung als auch der zugeetzten Konzentration von TEAOH und Citronensäure zu dem Eluenten wurde ein Eluent mit der Zusammensetzung von Acetonitril/Wasser/TEAOH/2 mol/L Citronensäure von (65/35/0,3/1,0) entwickelt. Mit der Säule ODS-Hypersil 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße (Fa. Knauer) erhielt man bei einer Flußrate von 1,0 mL/min bei einer Gesamtlaufzeit von 15 Minuten eine Basislinientrennung von Carnosol und Carnosolsäure (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** HPLC-Trennung von Rosmarinextrakt an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.

[406 ng Carnosolsäure]

Die Trennleistung dieser Methode war im Rahmen dieser Arbeit ausreichend, da der verwendete Extrakt im wesentlichen Carnosolsäure enthielt (zur Identifizierung siehe Kapitel 6.5.2) und auf eine Trennung von eventuell als Minorkomponenten enthaltenen Rosmanolen verzichtet werden konnte.

Der Vorteil der isokratischen Elution gegenüber der zu Beginn der Arbeit verwendeten Gradientenelution [Schwarz (1992a), Ternes (1995)] besteht vor allem in dem Wegfall von Äquilibrationszeiten zwischen zwei Messungen. Mit der entwickelten Methode verkürzte sich die Chromatographiezeit von 40 Minuten (Chromatographiedauer plus Äquilibrationszeit von 15 Minuten bei der Gradientenelution) auf 15 Minuten.

## 5.1.2.2 Trennung der Piperinisomere mit Reversed-Phase-Chromatographie

### 5.1.2.2.1 Ziel

Die nach der Fütterung mit Thymianextrakt aufgetretenen Piperinisomere konnten mit den anfänglich verwendeten HPLC-Bedingungen (Säule: ODS-Hypersil (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße; Fa. Knauer), Eluent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (50/50/0,5/0,5) [Schwarz (1996)] nicht zufriedenstellend getrennt werden<sup>5</sup>, da die vier Isomere nur als drei Peaks eluierten. Die Methode sollte dahingehend optimiert werden, daß sowohl die Trennung von p-Cymen-2,3-diol und Thymol als auch der vier Piperinisomeren erreicht wurde. Zur Optimierung der Methode kam daher nur eine Variation des RP-18-Materials in Kombination mit einer Eluentenoptimierung in Frage, welches sowohl eine Analyse von p-Cymen-2,3-diol und Thymol zuließ, als auch auf eine bessere Trennung der Piperinisomere hoffen ließ.

### 5.1.2.2.2 Vorüberlegungen

In der Literatur sind bereits HPLC-Untersuchungen veröffentlicht, in der eine RP-18-Phase zur Untersuchung von Piperin benutzt wurde (siehe Kapitel 2.3.1). Auf die Trennung von Piperinisomeren an RP-18-Material wird in der Literatur nicht eingegangen.

Bei der reversed-phase-Chromatographie ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. In erster Näherung steigt die Retention der Probesubstanzen mit abnehmender Löslichkeit in Wasser, d. h. mit abnehmender Polarität. Generell ist die Retention um so stärker, je größer die Kontaktfläche zwischen Probe und stationärer Phase ist. Klassischerweise wird die RP-Chromatographie an C-18 nicht zur Trennung von *cis/trans*-Isomeren eingesetzt [Meyer (1992), Engelhardt (1977)].

Aufgrund der oben genannten Zielsetzung (gleichzeitige Analyse von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und den Piperinisomeren) wurde dennoch versucht, eine Trennung der Isomere an C-18-Material zu erlangen.

### 5.1.2.2.3 HPLC-Säulenmaterialoptimierung zur Trennung der Piperinisomeren

Ausgehend von einer Hypersil 120 ODS-Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Fa. Knauer, Eluent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (50/50/0,5/0,5)) wurde versucht, die Trennung der Piperinisomere durch eine Erhöhung der Trennleistung der HPLC-Säule zu verbessern. Die Zusammensetzung des Eluenten wurde bei diesen Untersuchungen zunächst nicht variiert.

---

<sup>5</sup> Die von Schwarz et al. entwickelte HPLC-Methode diente zur Trennung von p-Cymen-2,3-diol, Carvacrol und Thymol aus Thymianextrakt (vgl. Kapitel 2.2.1).

Hierzu wurden zwei Säulen der Fa. Knauer (Hypersil 120 ODS, 300 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße (Säule 1) bzw. Hypersil 120 ODS, 250 x 4 mm, 3 µm Partikelgröße (Säule 2)) verwendet. Neben sehr ähnlichen Trenneigenschaften, bei denen die vier Isomere angetrennt werden konnten, wies Säule 2 einen ungleich höheren Säulenvordruck (24,0 MPa) gegen Säule 1 (9,0 MPa) auf, weshalb von einem Säulenmaterial mit der Partikelgröße 3 µm Abstand genommen wurde.

Aufgrund der erfolgreichen Antrennung durch Erhöhung der Bodenzahl wurden zwei weitere Säulen (Hypersil 120 ODS, 125 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße (Säule 3) und Hypersil 120 ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße (Säule 4)) nacheinander geschaltet. Durch Erhöhung des Innendurchmessers der Säule sollte einem zu hohen Vordruck entgegengewirkt werden. Eine Kombination der beiden Säulen durch Hintereinanderschalten (Säulenvordruck 8,0 MPa) ergab eine Basislinientrennung von Piperin und Chavicin und von Isopiperin und Isochavicin. Chavicin und Isopiperin konnten nur angetrennt werden.

Die Piperinisomerentrennung auf Säule 4 als alleinig genutzte Säule (Säulenvordruck 6,1 MPa) ergab keine wesentlich schlechtere Trennung (Piperin und Chavicin konnten nicht mehr vollständig basisliniengetrennt werden) als die Kombination von Säule 3 und Säule 4. Aufgrund der kürzeren Retentionszeiten wurde der Säule 4 als alleiniger Säule zur Trennung der Piperinisomere der Vorzug gegeben.

Neben der Anwendungsoptimierung des Säulenmaterials der Fa. Knauer wurde noch RP-18-Material anderer Hersteller getestet, die eventuell eine bessere Trennung der Piperinisomere ermöglichen hätten. Auf der Säule Lichrospher 100 RP-18 endcapped (Fa. Merck, 250 x 4 mm) eluieren die Isomere in zwei nicht basisliniengetrennten Peaks. Bei der HPLC-Trennung auf eine Lichrocart RP-18e Purospher (Fa. Merck, 250 x 4 mm) eluieren die Isomere als zwei basisliniengetrennte Peaks. Weitere Untersuchungen mit dem Säulenmaterial wurden aufgrund der ungenügenden Trennleistung nicht durchgeführt.

Eine bei der Firma Machery-Nagel nach den ermittelten äußeren Parametern (Säulengröße, Partikelgröße) bestellte Säule (Nucleosil 100-5 C-18 AB, 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße), sollte nach Aussagen des Herstellers aufgrund der Quervernetzung des Säulenmaterials eine bessere Trennung von Isomeren ermöglichen. Dieses konnte nicht bestätigt werden. Die Trenneigenschaften waren identisch mit der Säule der Fa. Knauer.

Im folgenden wurde daher mit der Säule 4 (Hypersil 120 ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) versucht, die Trennung der Piperinisomeren durch Optimierung der Eluentenzusammensetzung zu verbessern.

#### **5.1.2.2.4 Einfluß des Eluenten bei der HPLC-Trennung**

Der Einfluß des Eluenten auf die Trennung der Piperinisomere wurde mit der Säule 4 (Hypersil 120 ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Fa. Knauer) untersucht. Dazu wurde zunächst Acetonitril/Wasser (50/50) ohne Zusatz von Salzen als Eluent eingesetzt. Dieses führte zu einer Verschlechterung der Trennleistung (Isomere waren nur noch angetrennt) und konnte auch mit einer Gradientenelution (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10/90 bis 90/10 innerhalb 60 Minuten)

nicht verbessert werden. Ein Ersatz von Acetonitril gegen Methanol ließ die Isomere in der Gradientenelution als nur einen Peak eluieren. Zugabe von THF, Ethanol oder einer flacher ansteigenden Gradientenelution von CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O führten ebenfalls zu keiner Verbesserung der Trennleistung.

Die Beeinflussung des pH-Wertes auf die Trennleistung wurde durch Zugabe von Triethylamin (TEA) (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TEA 50/50/0,3 pH 8,0) bzw. Essigsäure (Eluent auf pH 3 eingestellt) überprüft. Die Trennung der Isomere war identisch und brachte keine Verbesserung. Durch Zugabe eines Ionenpaarreagenzes (Natriumheptan-1-sulfonat) sollte aufgrund der basischen Eigenschaften von Piperin und den Isomeren ein Ionenpaar mit diesen Substanzen hergestellt werden, um die Trennleistung der HPLC-Methode zu verbessern. Der Zusatz des Ionenpaarreagenzes zeigte jedoch keinen Einfluß auf die Trennleistung und brachte keine Verbesserung.

Insgesamt zeigten die Versuche, daß das ursprüngliche Laufmittel bereits die besten Trenneigenschaften für die Piperinisomere aufwies. Daher wurde das Verhältnis von Acetonitril/Wasser optimiert. Eine Variation der Konzentration von TEAOH und Citronensäure in dem Eluenten zeigte keinen Einfluß auf die Trennung und wurde daher in der ursprünglichen Konzentration beibehalten. Die beste Trennung erhielt man mit einem Eluenten der Zusammensetzung CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (48/52/0,5/0,5).

Mit der neuen Methode konnten die vier Piperinisomere angetrennt werden. Sie eluieren in der Reihenfolge Piperin (*trans/trans*), Chavicin (*cis/cis*), Isopiperin (*cis/trans*) und Isochavicin (*trans/cis*)<sup>6</sup>. Die Wechselwirkungen der *cis-trans*-Isomere Isopiperin und Isochavicin mit der stationären Phase sind damit größer als die Wechselwirkungen des *trans/trans*- (Piperin) bzw. *cis/cis*- (Chavicin) Isomers.

Die Elutionsreihenfolge aller untersuchten Substanzen (p-Cymen-2,3-diol, Piperinisomere, Thymol) änderte sich erwartungsgemäß nicht.

Eine Basislinientrennung aller 4 Piperinisomere gelang mit der HPLC-Methode jedoch nicht (siehe Abbildung 10). Für die Analyse der Piperinisomere im Eigelb war die Methode ausreichend (siehe Abbildung 11). Ein großer Vorteil der Methode war, daß die Piperinisomere von p-Cymen-2,3-diol und Thymol abgetrennt wurden und daß so eine gleichzeitige Analyse dieser Substanzen möglich war (siehe Abbildung 13).

---

<sup>6</sup> Zur Zuordnung der Elutionsreihenfolge der Piperinisomere siehe Kapitel 5.1.2.2.5.

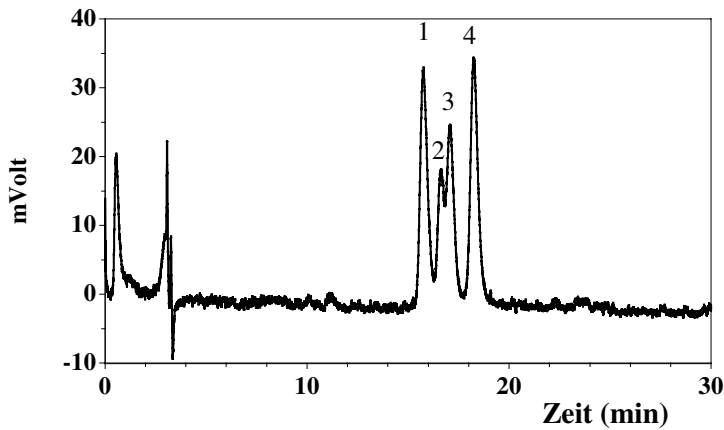


Abbildung 10: Trennung Piperin, Chavicol, Isopiperin und Isochavicol an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) (Säule 4) mit UV-Detektion bei 340 nm.

Piperinlösung nach UV-Bestrahlung.  
Elutionsreihenfolge: Piperin (1), Chavicol (2), Isopiperin (3), Isochavicol (4)

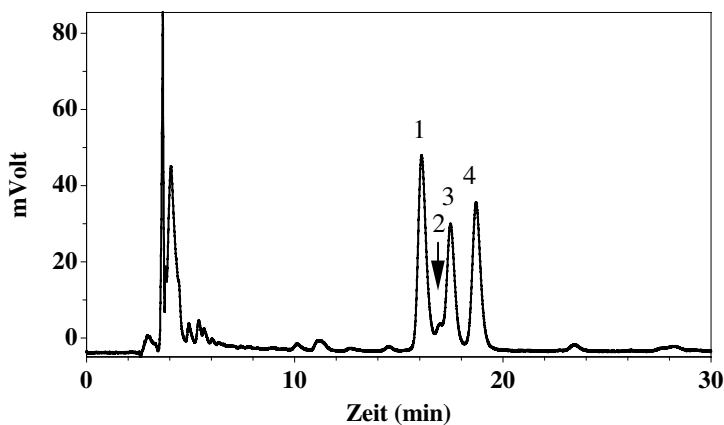


Abbildung 11: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 % Thymianextrakt zum Futter, 9. Fütterungstag), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm.

Elutionsreihenfolge Piperin (1), Chavicol (2), Isopiperin (3), Isochavicol (4)

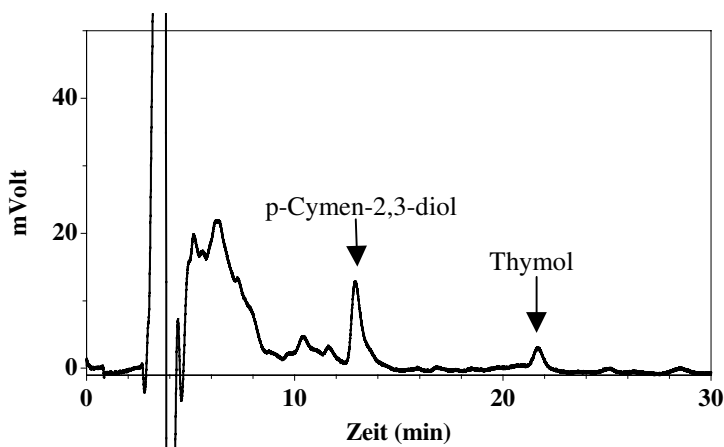


Abbildung 12: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 % Thymianextrakt zum Futter, 9. Fütterungstag), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.

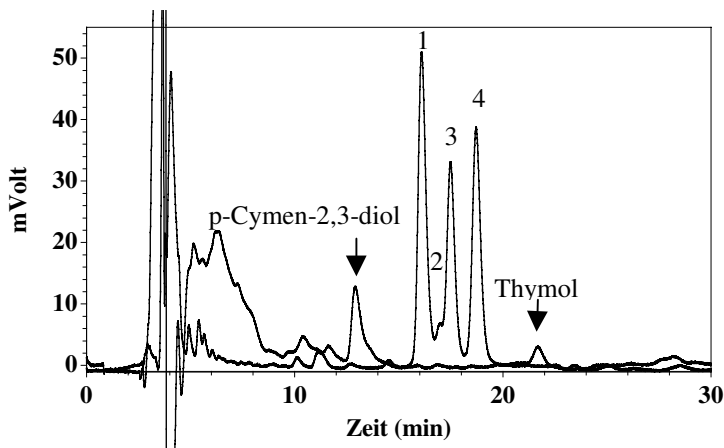


Abbildung 13: Die vorangegangenen beiden Chromatogramme in übereinandergelegter Darstellung.



### 5.1.2.2.5 Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Piperinisomere

#### 5.1.2.2.5.1 Aufnahme von UV-Spektren

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Bedingungen wurden mittels Diodenarraydetektion UV-Spektren der vier Isomere aufgenommen (siehe Abbildung 14 bis Abbildung 17). Die eluierenden Substanzen zeigen UV-Maxima bei 317 nm, 330 nm, 334 nm und 340 nm. Die UV-Maxima wurden mit den Literaturdaten verglichen. Die von Grewe et al. ermittelten Maxima wurden in Methanol aufgenommen (Piperin 340 nm, Isopiperin 332 nm, Isochavacin 333 nm, Chavacin 318 nm) [Grewe (1970)]. Von De Cleyn et al. wurden leicht unterschiedliche UV-Maxima ermittelt, eine Angabe des verwendeten Lösungsmittels fehlt in dieser Literatur (Piperin 343 nm, Isopiperin 335 nm, Isochavacin 336 nm, Chavacin 321 nm) [De Cleyn (1975)].

Aufgrund der Literaturangaben konnten Piperin (UV-Maximum bei 340 nm) und Chavacin (UV-Maximum bei 317 nm) den eluierenden Substanzen zugeordnet werden (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Isopiperin und Isochavacin zeigten nahezu das gleiche UV-Maximum (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17) und konnten daher nicht eindeutig zugeordnet werden<sup>7</sup>.

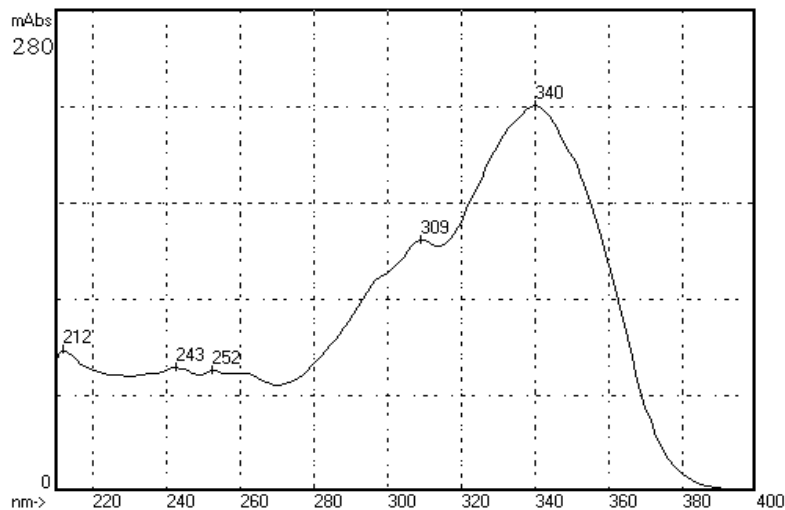
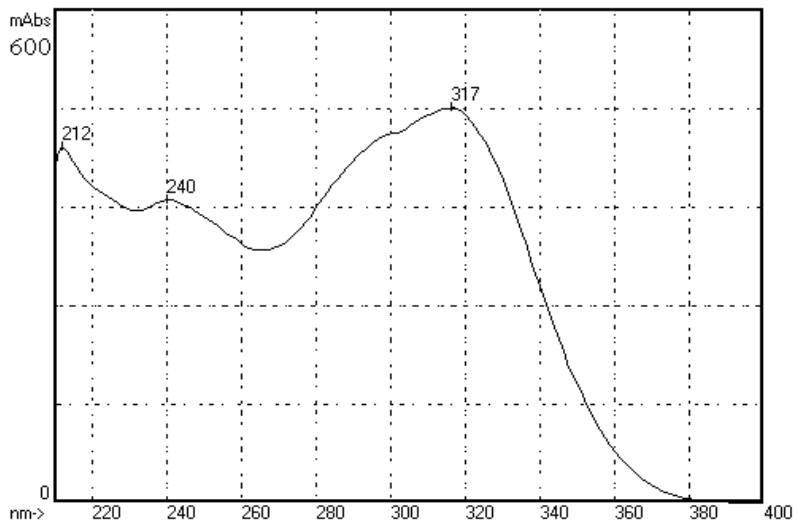


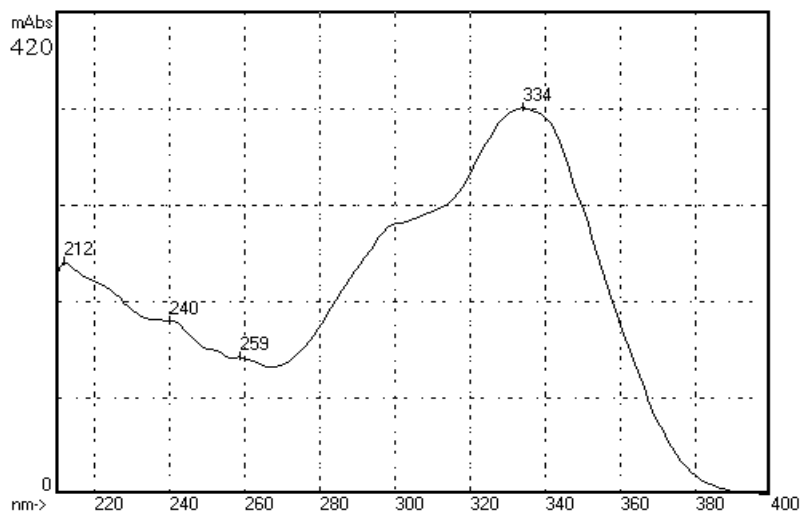
Abbildung 14: UV-Spektrum  
Piperin.  
1. Peak an ODS-Hypersil

<sup>7</sup> Die angegebene Zuordnung erfolgte aufgrund der NMR-Daten (siehe Kapitel 5.1.2.3.5.4).



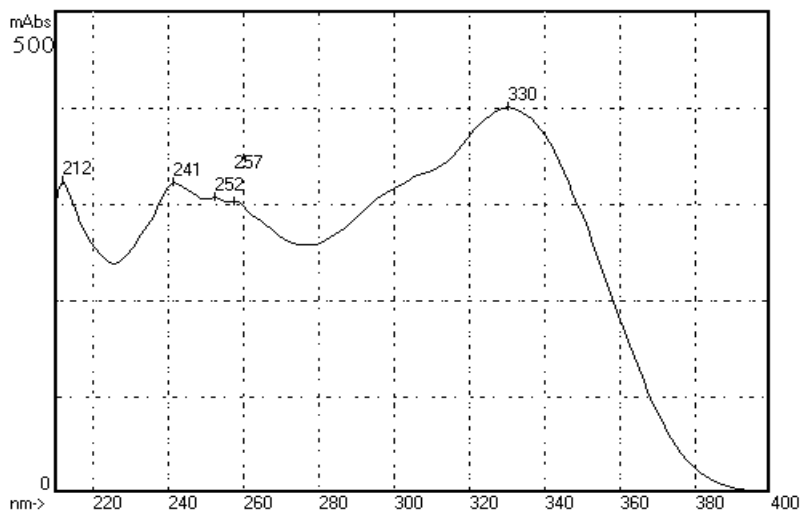
**Abbildung 15: UV-Spektrum Chavicin.**

**2. Peak an ODS-Hypersil**



**Abbildung 16: UV-Spektrum Isopiperin.**

**3. Peak an ODS-Hypersil**



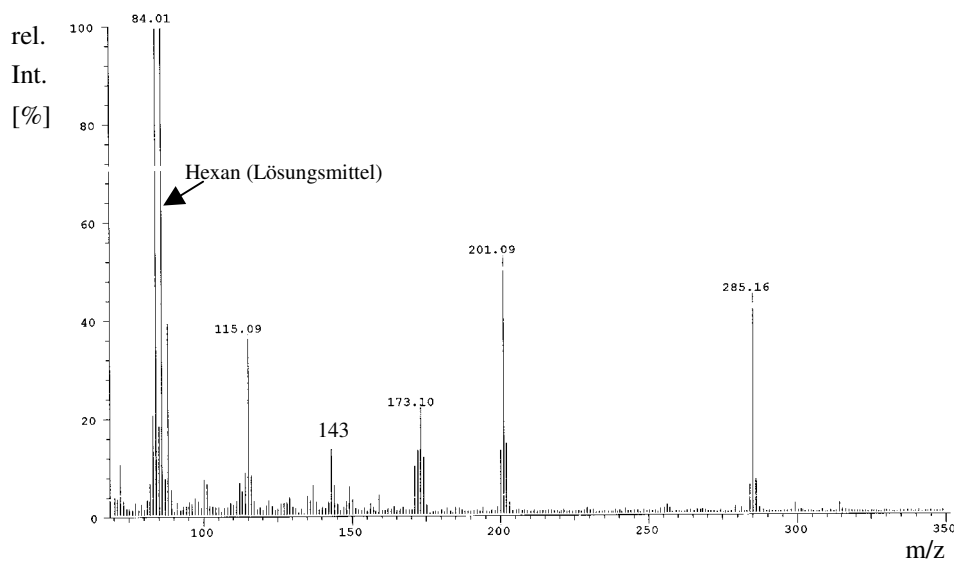
**Abbildung 17: UV-Spektrum Isochavicin.**

**4. Peak an ODS-Hypersil**

### 5.1.2.5.2 Aufnahme von Massenspektren der Piperinisomere

Durch Aufnahme von Massenspektren mittels HPLC-MS-Kopplung wurde die Identität der Isomere überprüft. Weiterhin wurde untersucht, ob die Isomere ein geringfügig unterschiedliches Fragmentierungsmuster ergeben, um so eine eindeutige Zuordnung der Isomere vornehmen zu können.

Abbildung 18 gibt das Massenspektrum von Piperin wieder. Die Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin liefern identische Massenspektren.



**Abbildung 18:** Massenspektrum von Piperin (HPLC-MS-Kopplung).

*Die Isomere Chavicin, Isochavicin und Isopiperin liefern identische Massenspektren.*

Wie schon von De Cleyn et al. beschrieben, sind die Massenspektren der vier Isomere identisch, so daß sie nicht zur Unterscheidungsmöglichkeit herangezogen werden können [De Cleyn (1975)]. Abbildung 18 gibt daher stellvertretend für alle Piperinisomere das Massenspektrum von Piperin wieder.

In der Literatur ist das Fragmentierungsmuster von Piperin bisher noch nicht beschrieben. Anhand von in der Literatur beschriebenen ähnlichen Substanzklassen (Fragmentierung von Piperolein B [Grewe (1970)] und Piperamiden [Kiuchi (1988)]) wird folgendes Fragmentierungsmuster vorgeschlagen:

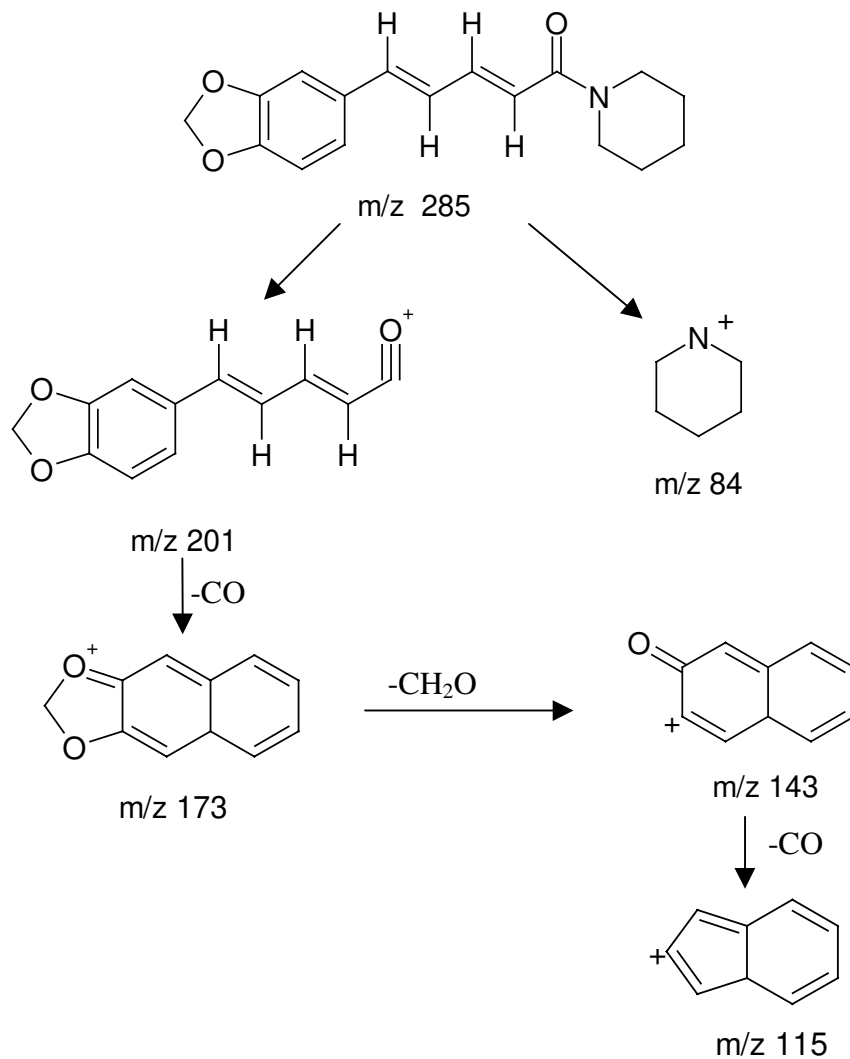


Abbildung 19: Postuliertes Fragmentierungsmuster von Piperin.

Mit dem Fragmentierungsmuster können die auftretenden Massenpeaks in dem Spektrum erklärt werden (siehe Abbildung 18). Der Massenpeak bei einer Masse von 86 in dem Spektrum stammt aus dem Lösungsmittel Hexan.

Aufgrund des postulierten Fragmentierungsmusters wäre auf dem Schritt des Ringschlusses zum Naphthalin-Grundgerüst (Massenpeak 173) eine Abhängigkeit von den Isomeren zu erwarten, da nur bei *cis/cis* ein direkter Ringschluß stattfinden kann. Offensichtlich werden jedoch die Moleküle bei der Ionisierung so stark angeregt, daß bereits vor dem Ringschluß eine Isomerisierung stattfindet.

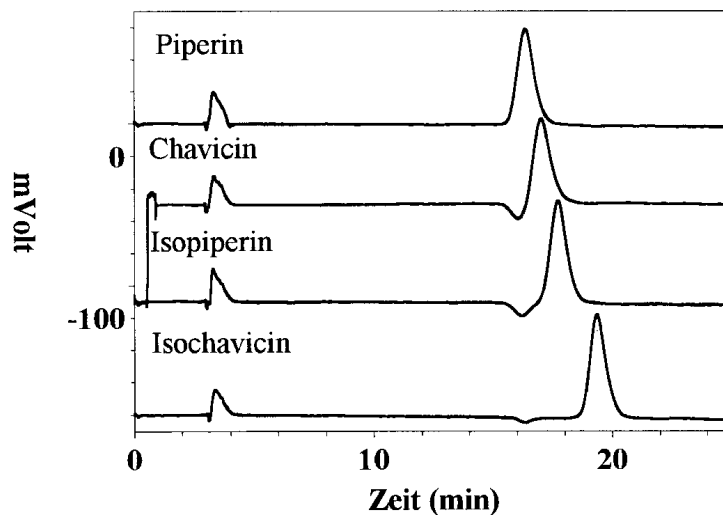
Die Massenspektrometrie mittels Elektronenstoßionisation bei 70 eV war damit zur Unterscheidungsmöglichkeit der vier Isomere nicht geeignet.

### 5.1.2.2.5.3 Isolierung und Identifizierung

Anhand der UV- und Massenspektren war eine eindeutige Identifizierung der vier Isomere nicht möglich. Eine Isolierung nach Trennung der Isomere an der analytischen RP-18-Säule mit anschließender Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie schien nicht sinnvoll, da die Isomere mit der HPLC-Methode nicht basisliniengetrennt werden konnten und so die einzelnen Fraktionen eventuell noch koeluirende Isomere enthalten hätten.

Mit der unter Kapitel 5.1.2.3 beschriebenen HPLC-Trennung an einer Silberionenphase konnten die vier Isomere getrennt und eindeutig identifiziert werden. Mit diesen Vergleichsverbindungen konnte auch die Elutionsreihenfolge an ODS-Hypersil bestimmt werden. Es ergibt sich folgende Elutionsreihenfolge: Piperin, Chavicin, Isopiperin, Isochavicin.

Von Takagi et al. wurde die Elutionsreihenfolge an einer reversed-phase-Phase (RP-8) mit Isopiperin, Chavicin, Isochavicin und Piperin angegeben [Takagi (1988), siehe auch Kapitel 2.3.1)]. Die Elutionsreihenfolge an der RP-8-Phase ist damit unterschiedlich zu der Elutionsreihenfolge an der RP-18-Phase. Die beiden Säulenmaterialien unterscheiden sich durch ihre Bindungsbelegung der Silanolgruppen, so daß sie eine unterschiedliche Elutionsreihenfolge bedingen.



*Abbildung 20: Übereinandergelegte HPLC-Chromatogramme der mittels Silberionenchromatographie isolierten Fraktionen. Es ergibt sich folgende Elutionsreihenfolge: Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin.*

### 5.1.2.2.6 Zusammenfassung

Die Parameter zur HPLC-Trennung der Piperinisomere neben p-Cymen-2,3-diol und Thymol an RP-18-Material wurden breit variiert. Dabei konnte jedoch keine Methode gefunden werden, mit der eine vollkommene Basislinientrennung aller Substanzen möglich gewesen wäre. Jedoch konnten die Piperinisomeren weitgehend angetrennt werden. p-Cymen-2,3-diol und Thymol werden vollständig von ihnen abgetrennt. Im Rahmen der Anforderung dieser Arbeit konnten damit hinreichend genaue Ergebnisse erzielt werden.

### 5.1.2.3 HPLC-Trennung der Piperinisomeren mit Normalphasen- chromatographie

#### 5.1.2.3.1 Ziel

Mittels Reverse-phase-Chromatographie an RP-18 konnte keine Basislinientrennung der Piperinisomere erreicht werden. Eine eindeutige Zuordnung der Isomere Isopiperin und Isochavicin konnte anhand der vorliegenden Daten nicht vorgenommen werden, so daß die Elutionsreihenfolge nicht bestimmt werden konnte. Es sollte daher auf Basis eines anderen Säulenmaterials eine Methode gefunden werden, die eine vollständige Trennung der Piperinisomere ermöglicht. Mit Hilfe dieser Methode sollten die Isomere getrennt voneinander isoliert und anschließend spektroskopisch untersucht werden. Damit sollte eine eindeutige Zuordnung der Isomere ermöglicht werden.

#### 5.1.2.3.2 Vorüberlegungen

In der Literatur wurden bisher verschiedene HPLC-Methoden zur Untersuchung und Trennung von Piperin und den Isomeren beschrieben (siehe Kapitel 2.3.1). Für eine Anwendung der HPLC-Trennung der vier Isomeren schienen aufgrund der Literaturangaben eine Nitrosilicagel- und eine Polyphenol-Säule in Frage zu kommen.

#### 5.1.2.3.3 Anwendung und Problem der literaturbeschriebenen Isomeren- trennung

##### 5.1.2.3.3.1 Nitrosilicagel-Säule

Die von Verzele et al. veröffentlichte HPLC-Methode schien sehr gut geeignet zu sein, die vier Isomere zu analysieren [Verzele (1979)]. Eine nach den Angaben in der Literatur käuflich erworbene Nitrosilicagel-Säule der Firma Knauer (Nucleosil-100 NO<sub>2</sub>) zeigte allerdings nicht den gewünschten Trennerfolg. Die vier Isomere eluierten unter den von Verzele et al. angegebenen Bedingungen in einem taillenden Peak nach einer Retentionszeit von 4 Minuten mit einer Elutionsdauer von 12 Minuten (Fluß 1,0 mL/min). Da die Phase nach den Literaturangaben grundsätzlich zur Trennung geeignet sein sollte, wurden die HPLC-Bedingungen variiert.

Die Elutionskraft des Eluenten wurde durch Verringerung des Methanolgehaltes erniedrigt. Dadurch sollte eine längere Verweildauer auf der Säule und damit eine Trennung der Isomere erreicht werden. Es wurde eine Eluentenzusammensetzung von Methylenchlorid/Methanol von 100/2 gewählt. Die Verweildauer der Isomere konnte dadurch zwar verlängert werden, allerdings eluierten die Isomere nun innerhalb von 22 Minuten in einem einzigen, noch stärker taillenden Peak.

Da in einigen Fällen durch Verwendung von Acetonitril eine bessere Trennung als mit Methanol erreicht werden kann, wurde in dem Eluent Methanol gegen Acetonitril ersetzt. Es

wurde eine Eluentenzusammensetzung von Methylenchlorid/Acetonitril von 100/6 gewählt (Fluß 1,0 mL/min). Die vier Isomere eluierten unter diesen HPLC-Bedingungen nach 6 Minuten mit einer Elutionsdauer von 17 Minuten unter Ausbildung eines einzigen, stark taillenden Peaks.

Es wurde weiterhin überprüft, ob mit Hilfe einer Gradientenelution eine Trennung der Isomere möglich ist. Hierzu wurde der Anteil von Acetonitril in Methylenchlorid von 1,0/100 auf 6,0/100 innerhalb von 60 Minuten erhöht. Die Isomere eluierten nach 17 Minuten mit einer Elutionsdauer von 13 Minuten unter Ausbildung eines einzigen stark taillenden Peaks.

Insgesamt konnte die von Verzele et al. beschriebene Trennung der Piperinisomere an einer kommerziell erhältlichen Nitrosilicagelsäule nicht nachvollzogen werden.

#### **5.1.2.3.3.2 Polyphenolsäule**

Die von Verzele et al. beschriebene HPLC-Trennung an Polyphenol-RsiL stellte aufgrund der ausreichenden Trennung der Isomere eine Alternative bei der HPLC-Analyse dar [Verzele (1989)]. Auch hier sollte auf kommerziell erhältliche Säulen zurückgegriffen werden. Allerdings wird eine solche Säule von den gängigen Firmen nicht (Merck, Machery-Nagel) oder nicht mehr (Knauer) angeboten. Auf eine solche Säule konnte daher nicht zurückgegriffen werden. (Bei den von den Firmen Machery-Nagel und Knauer produzierten Polyphenol-Säulen handelt es sich aufgrund der Bindungsbelegung der freien SiOH-Gruppen um reversed-phase-Material und nicht um das von Verzele et al. beschriebene Säulenmaterial.)

#### **5.1.2.3.4 *Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung der Piperinisomeren durch Silberionenchromatographie***

Mit Silbernitrat belegte Kieselgelsäulen zeichnen sich durch gute Trenneigenschaften von *cis/trans*-Verbindungen aus. Solche Säulen können organische Moleküle vor allem nach der Anzahl, der geometrischen Konfiguration und der Position der Doppelbindungen trennen und werden vornehmlich bei der Analyse von Lipiden eingesetzt [Nikolova-Damyanova (1992), Dobson (1995), Elfman-Börjesson (1997)].

Das grundsätzliche Trennprinzip der Silberionenchromatographie basiert auf der reversiblen Reaktion von ungesättigten organischen Molekülen mit Übergangsmetallen (hier Silber) unter Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes. Die Stabilität der Komplexe wird von der Verfügbarkeit der Elektronen in den gefüllten Orbitalen und von der sterischen Hinderung der Orbitale bestimmt. Durch Röntgenkristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, daß ein Silberion mit zwei Doppelbindungen in einem Molekül bzw. mit zwei ungesättigten Molekülen gleichzeitig in Wechselwirkung treten kann. [Dobson (1995)]

Im Zusammenhang mit der Analytik von Fettsäuren ist bekannt, daß für 1,4-Diene die Komplexstabilität mit steigender Anzahl der Doppelbindungen zunimmt und *cis*-konfigurierte Isomere stärker gebunden werden als *trans*-Doppelbindungen. [Dobson (1995)]

Aufgrund der im allgemeinen guten Trenneigenschaften einer mit Silbernitrat belegten Kieselgelsäule für *cis/trans*-Isomere wurde eine derartige Phase für die Trennung der Piperinisomere ausgewählt. Für die Versuche wurde eine Säule der Firma Chrompack (Chromspher Lipids 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße) eingesetzt.

Untersuchungen von Verzele et al. zur Trennung der Piperinisomere mit Silberionen-chromatographie haben bereits gezeigt, daß die Piperinisomere mit einem polaren Eluenten (hier Methanol/Wasser 80/20) in einem einzigen Peak eluieren [Verzele (1979)]. Deshalb wurde zunächst das weniger polare Dichlormethan als Eluent eingesetzt. Die Elution der Isomere erfolgte jedoch auch hier bei einer Flußrate von 2,0 mL/min und einer Retentionszeit von 3 Minuten in einem einzigen Peak. Um die Elutionskraft des Eluenten zu verringern, wurde in steigendem Anteil eine Lösung von 1,5% Acetonitril in n-Hexan zugegeben und die Elution isokratisch durchgeführt. Dieses führte jedoch nicht zum Erfolg, da selbst bei einer Zusammensetzung von 1,5 % CH<sub>3</sub>CN in n-Hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> von 90/10 die Elution nur auf eine Retentionszeit von 7 Minuten verzögert wurde und die 4 Substanzen nur in einem einzigen Peak eluieren.

Die Elutionskraft des Eluenten wurde daher zusätzlich durch Ersatz von Dichlormethan gegen 2-Propanol verringert. Eine Gradientenelution (1,5 % CH<sub>3</sub>CN in n-Hexan/2-Propanol von 90/10 bis 75/25 innerhalb von 30 Minuten) zeigte eine Auftrennung in 3 Peaks. Eine Variation der Zusammensetzung dieses Eluenten brachte keine weitere Auftrennung.

Eine Auftrennung in die vier Isomere konnte durch Zugabe von Acetonitril zum 2-Propanol erstmalig erreicht werden. Es wurden verschiedene Gradientenelutionen der beiden Eluenten getestet, um eine optimale Trennung in Kombination mit zufriedenstellenden Retentionszeiten der Isomere zu erhalten. Hierbei mußte auf eine Basislinientrennung der sehr schnell nacheinander eluierenden Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin geachtet werden. Piperin eluierte zeitlich deutlich verzögert.

Um eine Basislinientrennung der ersten drei Isomere zu erreichen, zeigte ein schwach in seiner Elutionskraft ansteigender Gradient die besten Trennerfolge. Um die anschließende Elution des Piperins zu beschleunigen, wurde gegen Ende der Chromatographie sowohl die Flußrate auf 2,0 mL/min erhöht als auch ein schnellerer Anstieg des Gradienten eingestellt.



Folgender Lösungsmittel-Gradient wurde für die Trennung der Isomere Piperin, Chavicin, Isopiperin, Isochavicin entwickelt:

1,5% CH <sub>3</sub> CN in n-Hexan Volumenanteil [%]	CH <sub>3</sub> CN/2-Propanol (10/90) Volumenanteil [%]	Zeit [min]	Fluß [mL/min]
98	2	0,0	1,0
90	10	30,0	1,0
90	10	30,1	2,0
80	20	40,0	2,0

Tabelle 7: Gradientenzusammensetzung für die Trennung der Piperinisomere an der Silberionensäule (ChromSpher Lipids).

Die vier Isomere konnten mit dieser HPLC-Methode basisliniengetreunt analysiert werden. Die Isomere eluierten bei einer Retentionszeit von 21,5; 23,3; 24,5 und 33,8 Minuten in der Reihenfolge Chavicin, Isopiperin, Isochavicin und Piperin. (Zur Zuordnung siehe Kapitel 5.1.2.3.5)

Für Piperin wurde eine Nachweisgrenze von 0,37 ng und eine Bestimmungsgrenze von 0,74 ng absolut mit UV-Detektion bei 340 nm ermittelt (siehe Kapitel 6.4).

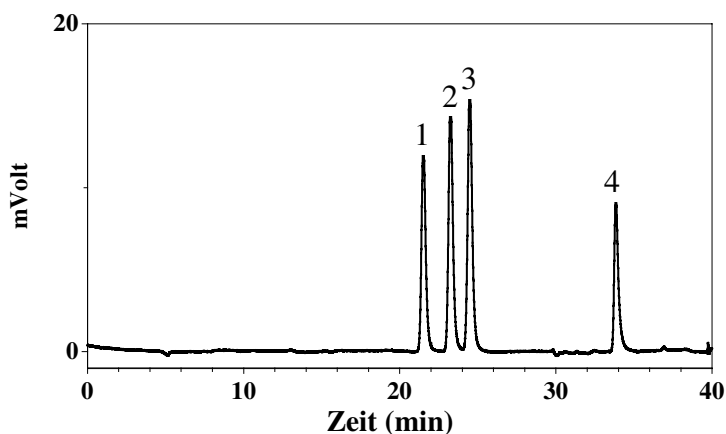


Abbildung 21: Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, Piperin, HPLC-Trennung an Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm.

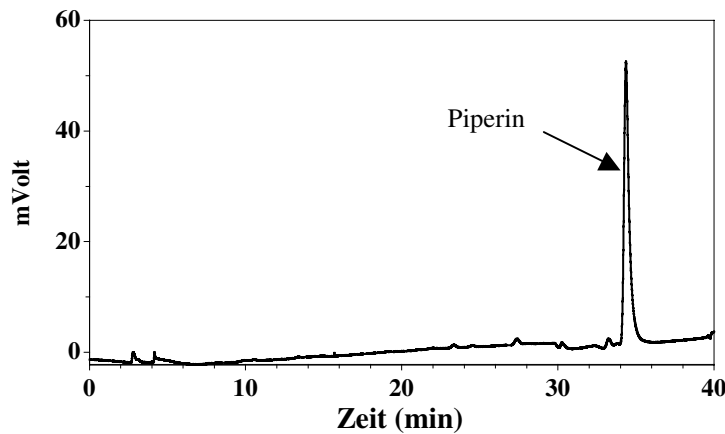
(Piperinlösung nach Bestrahlung mit UV-Licht, Gesamtkonzentration Isomere 206 ng)

- 1 = Chavicin (RT 21,50 min),
- 2 = Isopiperin (RT 23,25 min),
- 3 = Isochavicin (RT 24,48 min),
- 4 = Piperin (RT 33,84 min)

Die Elutionsreihenfolge Chavicin (*cis/cis*), Isopiperin, Isochavicin und Piperin (*trans/trans*) ist genau reziprok, wie von den Ergebnissen aus der Fettsäureanalytik bekannt ist. Bei den Fettsäuren werden *cis*-Isomere stärker gebunden als die *trans*-Isomere, somit kommt es also zunächst zu einer Elution der *trans*- und dann der *cis*-Isomere. Diese Reihenfolge bestätigt sich bei den Piperinisomeren nicht, da Chavicin als *cis/cis*-Isomer als erstes und Piperin (*trans/trans*) als letztes Isomer eluiert und damit am stärksten gebunden wird. Die *cis-trans*-Isomere Isopiperin (*cis/trans*) und Isochavicin (*trans/cis*) eluieren zwischen Chavicin und Piperin und nehmen damit in dieser Mittelstellung die Elutionsreihenfolge ein, wie sie aufgrund ihrer geometrischen Struktur zu erwarten war.

Nach Entwicklung der HPLC-Methode wurde untersucht, ob die HPLC-Trennung an der Silberionenphase auch für komplexe Matrices geeignet ist.

Hierzu wurde zunächst Thymianextrakt der Firma Raps untersucht. Dazu wurden 55,7 mg Thymianextrakt in 25 mL 2-Propanol gelöst und anschließend 1:10 mit n-Hexan verdünnt (siehe Abbildung 22).

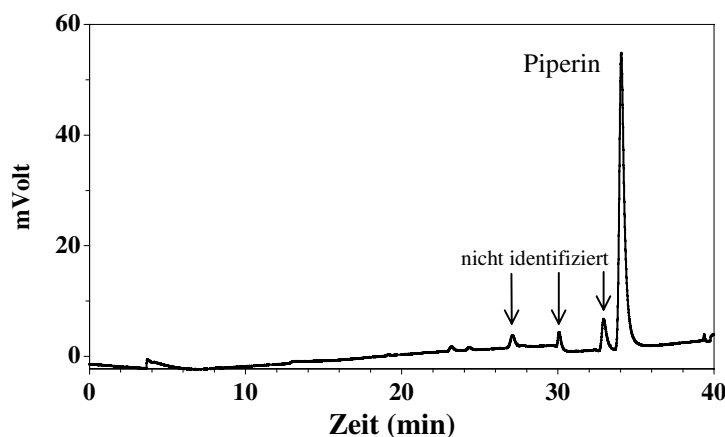


**Abbildung 22:** HPLC-Chromatogramm von piperinhaltigem Thymianextrakt (4,46 µg), Trennung auf einer Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm.

Der untersuchte Thymianextrakt enthielt kein Chavicin (RT 21,50 min), kein Isopiperin (RT 23,25 min) und kein Isochavicin (RT 24,48 min).

Die Messung bestätigt, daß der verwendete Thymianextrakt ausschließlich Piperin und keine Piperinisomeren enthielt. Aufgrund der fehlenden UV-Absorption von p-Cymen-2,3-diol und Thymol bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde bei dieser HPLC-Trennung nur Piperin detektiert.

Weiterhin wurde Pfefferextrakt der Firma Raps mit der entwickelten HPLC-Methode untersucht. Hierzu wurden 86,4 mg Pfefferextrakt in 25 mL 2-Propanol gelöst und anschließend 1:100 mit n-Hexan verdünnt (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** HPLC-Chromatogramm von Pfefferextrakt (0,69 µg), Trennung an einer Silberionen-Phase mit UV-Detektion bei 340 nm.

Der untersuchte Pfefferextrakt enthielt kein Chavicin (RT 21,50 min), kein Iospiperin (RT 23,25 min) und kein Isochavicin (RT 24,48 min).

Erwartungsgemäß konnte im Pfefferextrakt Piperin nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mit der neuen HPLC-Methode erstmalig gezeigt werden, daß bei der Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid keine Piperinisomere entstehen.

Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt wurde ebenfalls mit Hilfe der neu entwickelten chromatographischen Methode untersucht. Das Ergebnis ist in Kapitel 5.3.4.1 dargestellt.

Die Untersuchungen zeigen, daß die neu entwickelte Methode ebenfalls zur Trennung der Piperinisomere in komplexen Matrices anwendbar ist.

### **5.1.2.3.5 Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Piperinisomere bei der Silberionenchromatographie**

#### **5.1.2.3.5.1 Ziel**

Da Standardsubstanzen für die Piperinisomere nicht verfügbar waren, konnte die Identität der Piperinisomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin nicht durch Vergleich der Retentionszeiten bestimmt werden. Nachdem mit der neu entwickelten Silberionenchromatographie nun eine Basislinientrennung der Piperinisomere möglich war, sollten nun die einzelnen Substanzen isoliert und identifiziert werden.

#### **5.1.2.3.5.2 UV-Spektren der Piperinisomere**

Die UV-Spektren der vier Isomere wurden mit Hilfe der neu entwickelten HPLC-Methode (Silberionenchromatographie) mit Diodenarraydetektion aufgenommen. Die einzelnen Isomere können mit dieser Methode basisliniengetrennt analysiert werden und die aufgenommenen UV-Spektren hätten eine bessere Zuordnung der einzelnen Substanzen ermöglichen können.

Die Untersuchung ergab, daß die UV-Spektren mit den UV-Spektren der Isomere in Kapitel 5.1.2.2.5.1 übereinstimmen<sup>8</sup>. Die Zuordnung von Piperin und Chavicin war damit möglich. Isopiperin und Isochavicin konnten jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden.

#### **5.1.2.3.5.3 FT-IR-Spektren der Piperinisomere**

Die Konformationen der *cis/trans*-Isomere wurde weiterhin mittels FT-IR-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Isomere mit Hilfe der Silberionenchromatographie getrennt und die Isomere in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Bei der Isolierung wurde auf weitestgehenden Lichtausschluß geachtet und die isolierten Isomere bei  $-18\text{ °C}$  gelagert.

Eine Überprüfung der isolierten Fraktionen ergab, daß die einzelnen Substanzen sauber voneinander getrennt isoliert werden konnten und anschließend keine Isomerisierung stattfand. Die einzelnen Fraktionen wurden bei  $60\text{ °C}$  unter Vakuum eingengt. Restliches Lösungsmittel (Eluent) wurde durch Vakuum an einer Ölpumpe über Nacht entfernt. Die isolierten Substanzen wurden anschließend mittels FT-IR untersucht.

Bei einer *trans*-Konformation der Doppelbindung zeigt sich eine charakteristische Bande in einem Wellenzahlbereich von  $970\text{ bis }960\text{ cm}^{-1}$ . Steht die *trans*-Bindung in Konjugation zu

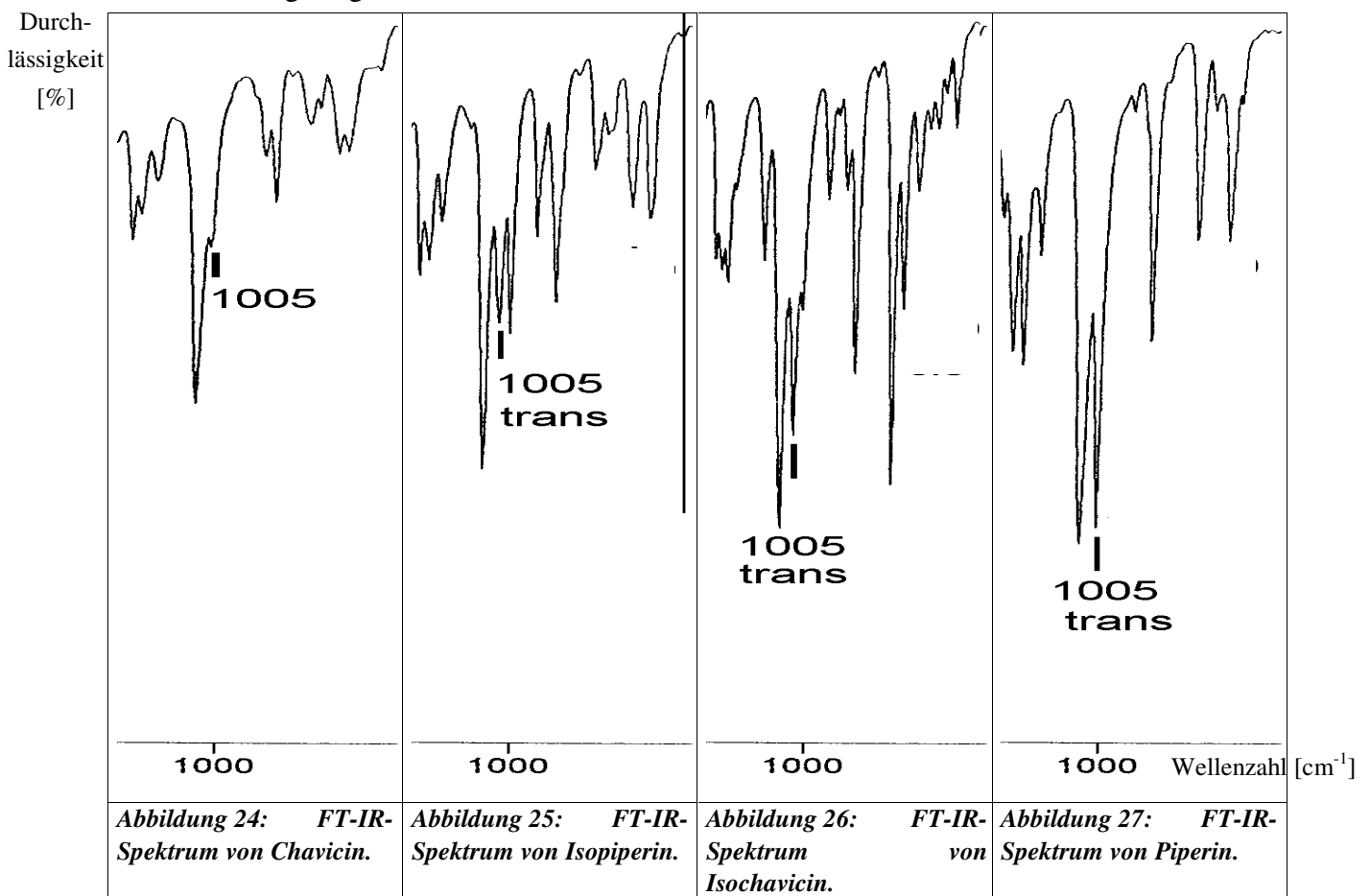
---

<sup>8</sup> Die Zuordnung für die einzelnen Isomere erfolgte aufgrund der NMR-Daten (siehe Kapitel 5.1.2.3.5.4).

einer C=O-Gruppe wird die Bande um  $30\text{ cm}^{-1}$  in Richtung einer höheren Wellenzahl verschoben [Hesse (1987)]. Bei Piperin und den Piperinisomeren stehen die Doppelbindungen in Konjugation zu einer Carbonylgruppe, so daß eine charakteristische Bande für die *trans*-Doppelbindung bei einer Wellenzahl von  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten ist. In den untersuchten FT-IR-Spektren zeigt die *trans*-Konformationen der Doppelbindungen eine charakteristische Bande bei einer Wellenzahl<sup>9</sup> von  $1005\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande zeigt sich bei Chavicin<sup>8</sup> (*cis/cis*) nicht, während sie bei Isochavicin, Isopiperin und am stärksten bei Piperin ausgeprägt ist.

Für die *cis*-Konformation einer Doppelbindung ist eine charakteristische Bande in einem Wellenzahlbereich von  $730\text{ bis }675\text{ cm}^{-1}$  typisch [Hesse (1987)]. Eine eindeutige Charakterisierung für die *cis*-Konformation konnte jedoch anhand der vorliegenden Spektren, auch unter Berücksichtigung einer Verschiebung der *cis*-Bande aufgrund der Konjugation mit der Carbonylgruppe, nicht vorgenommen werden.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse, die mittels FT-IR-Spektrometrie gewonnen werden konnten, ist insgesamt nur eine bedingte Aussage über die Konfiguration der Doppelbindung möglich. Eine Identifizierung der einzelnen Isomere aufgrund der erhaltenen Daten konnte nicht eindeutig vorgenommen werden.



<sup>9</sup> Die Wellenzahlen sind der zu der Abbildung gehörenden Peakliste entnommen worden.

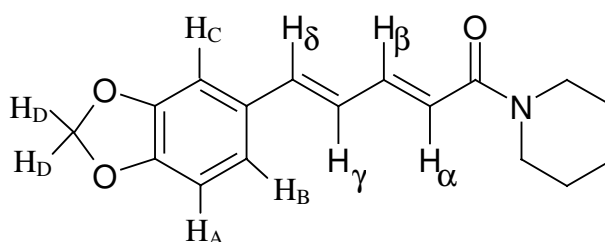
#### 5.1.2.3.5.4 NMR-Spektroskopie der Piperinisomere

Um die Elutionsreihenfolge der vier Isomere zu bestimmen, wurden sie mit Hilfe der Silberionenchromatographie getrennt und die Isomere als einzelne Fraktionen aufgefangen. Bei der Isolierung wurde auf weitestgehenden Lichtausschluß geachtet und die isolierten Isomere bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Restliches Lösungsmittel (Eluent) wurde durch Vakuum an einer Ölpumpe über Nacht entfernt.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden in  $\text{CDCl}_3$  ohne Zusatz von TMS aufgenommen (siehe Abbildung 28 bis Abbildung 31).

Anhand der literaturbekannten NMR-Daten kann eine Strukturzuordnung für die einzelnen Isomere vorgenommen werden [De Cleyn (1975)].

Die Konfiguration der Doppelbindungen kann zweifelsfrei anhand der vicinalen  $^2J(\text{H,H})$ -Kopplungen bestimmt werden. Eine *cis*-Konfiguration der Doppelbindung ergibt Kopplungskonstanten von  $\sim 11\text{ Hz}$ , eine *trans*-Konfiguration der Doppelbindung ergibt Kopplungskonstanten von  $\sim 15\text{ Hz}$  [Hesse (1987)].



	$J_{\alpha,\beta}$	$J_{\beta,\gamma}$	$J_{\gamma,\delta}$
Piperin	14.7 ( <i>trans</i> )	8.5	15.0 ( <i>trans</i> )
Isochavicin	14.7 ( <i>trans</i> )	11.8	11.8 ( <i>cis</i> )
Isopiperin	11.2 ( <i>cis</i> )	11.2	15.6 ( <i>trans</i> )
Chavicin	11.1 ( <i>cis</i> )	11.0	11.0 ( <i>cis</i> )

Tabelle 8: Kopplungskonstanten  $^1\text{H-NMR}$ : Piperin, Isochavicin, Isopiperin und Chavicin.

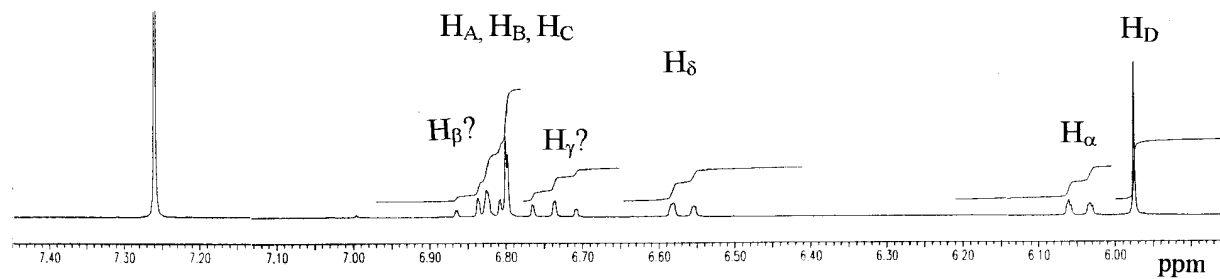
Mit Hilfe der aus den spektroskopischen Daten<sup>10</sup> ermittelten Kopplungskonstanten (siehe Tabelle 8) kann die Konfiguration der Isomere bestimmt werden.

Für die HPLC-Trennung an der Silberionensäule erhält man folgende Elutionsreihenfolge: Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, Piperin.

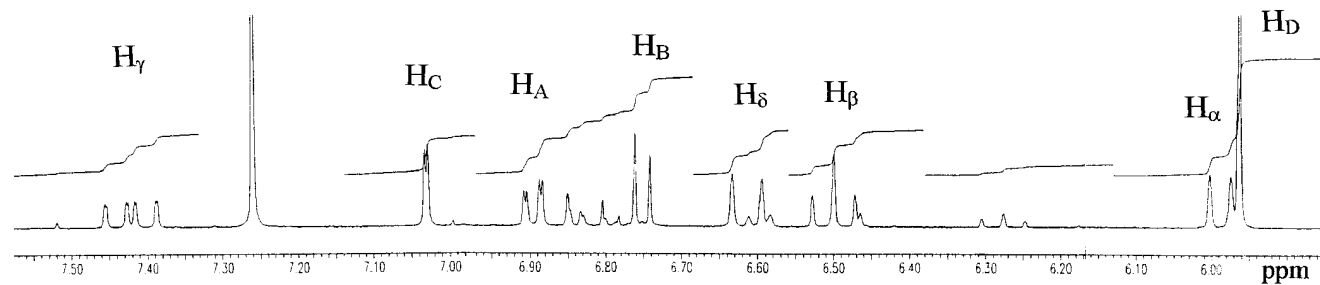
Mit Hilfe der isolierten Fraktionen konnte nun auch die Bestimmung der Elutionsreihenfolge für die Isomerentrennung an ODS-Hypersil vorgenommen werden (siehe Kapitel 5.1.2.2.) Es ergibt sich folgende Elutionsreihenfolge: Piperin, Chavicin, Isopiperin, Isochavicin.

<sup>10</sup> Die Daten der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin sind in Kapitel 6.5.4 aufgeführt.

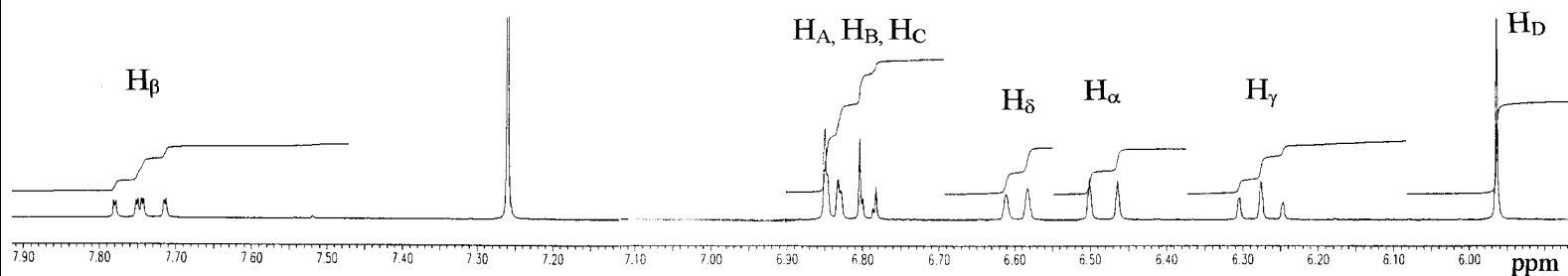
**Abbildung 28:**  
**<sup>1</sup>H-NMR Chavicin**  
**in CDCl<sub>3</sub>.**  
**(1. Peak**  
**Silberionen-**  
**chromatographie)**



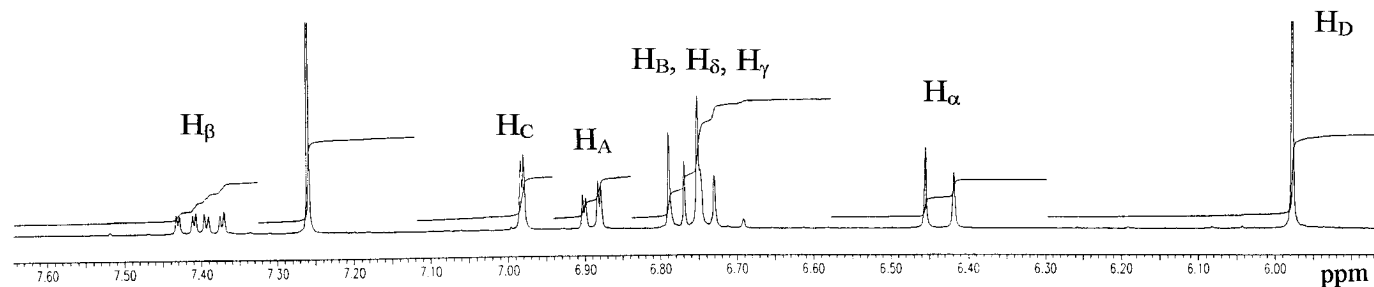
**Abbildung 29:**  
**<sup>1</sup>H-NMR Isopiperin**  
**in CDCl<sub>3</sub>.**  
**(2. Peak**  
**Silberionen-**  
**chromatographie)**



**Abbildung 30:**  
**<sup>1</sup>H-NMR**  
**Isochavicin in**  
**CDCl<sub>3</sub>.**  
**(3. Peak**  
**Silberionen-**  
**chromatographie)**



**Abbildung 31:**  
**<sup>1</sup>H-NMR Piperin in**  
**CDCl<sub>3</sub>.**  
**(4. Peak**  
**Silberionen-**  
**chromatographie)**



### **5.1.2.3.6 Zusammenfassung**

Wie im vorausgegangenen Kapitel dargestellt, konnten mit Hilfe der Chromatographie an RP-18 die Piperinisomere nicht basisliniengetrennt analysiert werden. Es wurde daher auf eine von Verzele et al. beschriebene Methode zur Trennung der Piperinisomeren zurückgegriffen [Verzele (1979)]. Die beschriebene Trennung an einer von Verzele et al. selbst hergestellten Nitrosilicagelsäule konnte jedoch nicht nachvollzogen werden. Es wurde daher eine vollständig neue Methode mit einer kommerziell erhältlichen, mit Silbernitrat belegten Kieselgel-Säule entwickelt. Anhand dieser Methode war eine Basislinientrennung aller vier Piperinisomeren problemlos möglich. Dadurch konnten die Isomere isoliert und spektroskopisch eindeutig identifiziert werden. Mit diesen Ergebnissen konnte die Elutionsreihenfolge der vier Isomere sowohl für die Silberionenchromatographie als auch der Trennung an ODS-Hypersil festgelegt werden. Die Isomere eluieren bei der Silberionenchromatographie in der Reihenfolge Chavicin, Isopiperin, Isochavicin und Piperin und bei der RP-Chromatographie an ODS-Hypersil in der Reihenfolge Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin.

Die Methode wurde mit Erfolg zur Analyse von Piperin und den Isomeren in den komplexen Matrices von Gewürzextrakten und Eigelbproben angewandt.

Mit der neu entwickelten Methode steht damit erstmals eine allgemein anwendbare HPLC-Trennung von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin zur Verfügung.

## 5.2 Bioverfügbarkeit von Rosmarinextrakt

### 5.2.1 Bestimmung der Inhaltsstoffe von Rosmarinextrakt

Der verwendete Rosmarinextrakt wurde durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid von der Firma CAL (Frankreich) hergestellt. Er enthält vor allem Carnosolsäure als antioxidativ wirksame Substanz. Carnosol ist nur in sehr geringen Mengen enthalten.

Für die Untersuchungen wurden unterschiedliche Rosmarinextrakte mit verschiedenen Carnosolsäuregehalten verwendet. Der entsprechende Carnosolsäuregehalt ist daher im folgenden explizit aufgeführt, damit die Versuchsbedingungen vergleichbar bleiben.

Als Kalibrierstandard wurde ein Rosmarinextrakt mit einem Carnosolsäuregehalt von 15,3 g/100 g Extrakt verwendet.

Die Zuordnung von Carnosol und Carnosolsäure im Extrakt erfolgte sowohl durch Aufnahme von UV-Spektren, als auch - nach Isolierung der Substanzen mittels präparativer HPLC - durch Aufnahme von NMR-, FT-IR-, und Massenspektren. Die erhaltenen Spektren stimmen mit den Literaturdaten überein [Schwarz (1992b), Cuvelier (1994), Inatani (1982)].

Versuchsbedingungen und Untersuchungsergebnisse können dem experimentellen Teil der Arbeit entnommen werden (siehe Kapitel 6.2.3 und 6.5.2). Die HPLC-Analysenmethode wird in Kapitel 5.1.2.1 beschrieben.

### 5.2.2 Fütterung von Legehennen

Für den Fütterungsversuch mit Rosmarinextrakt standen 15 Legehennen zur Verfügung. Das Alter der Legehennen betrug zu Versuchsbeginn 40 Wochen.

Als Futtermittel wurde Legehennenmehl mit 1 % Pflanzenöl versetzt. Das Futter während der Behandlungsperiode wurde wie folgt angesetzt:

Versuchsreihe	Anzahl Hühner	Zusatz Rosmarinextrakt [mg/100 g Futter]	≡ Zusatz Carnosolsäure [mg/100 g Futter]
1	3	0	0
2	4	283	50
3	8	571	100

*Tabelle 9: Fütterungsversuch Legehennen: Zusatz Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl während der Behandlungsperiode.*

Die täglich aufgenommene Futtermenge betrug pro Legehenne 100 g. Der numerische Wert in Tabelle 9 entspricht der täglich aufgenommenen Menge an Rosmarinextrakt bzw. der täglich aufgenommenen Menge an Carnosolsäure.

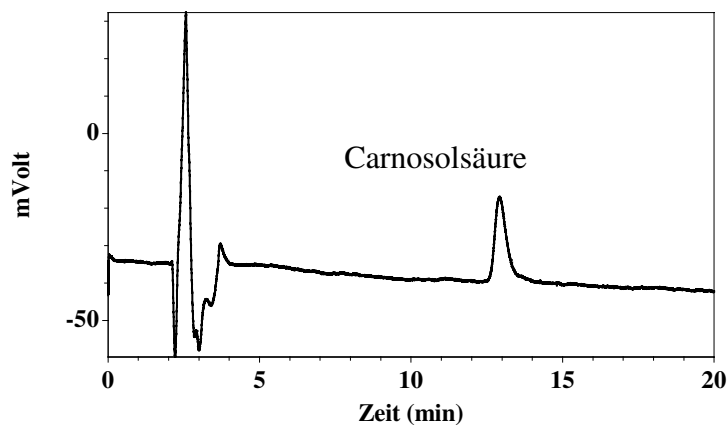


### 5.2.3 Untersuchung von Eigelb

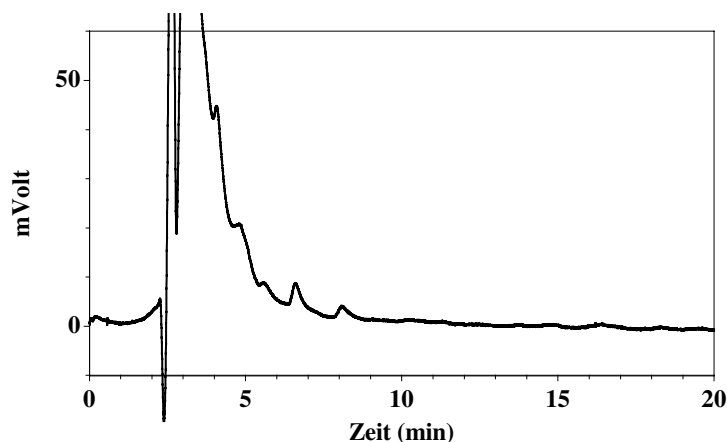
Eigelb während des gesamten Fütterungszeitraumes und in der Nachperiode wurde nach der entwickelten Methode aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer Detektion analysiert (Analysemethoden und Ergebnisse siehe auch Kapitel 6.2.3, 6.6.1 und 6.6.5).

Die Probennahme für die Untersuchungen mußte sich an den gelegten Eiern orientieren, da nicht von jedem Huhn jeden Tag ein Ei gelegt wurde. Für die Untersuchung der Eier wurde ein Probennahmeabstand von 4 Tagen angestrebt. Nachdem ein Aufnahme maximum in den untersuchten Proben festgestellt worden war, wurden zur Bestätigung je nach Verfügbarkeit weitere Proben untersucht. Zur Untersuchung wurden die Eigelbproben eines Fütterungstages vereinigt. Die Carnosolsäurekonzentration dieser vereinigten Eigelbproben wurde in Doppelbestimmungen bestimmt.

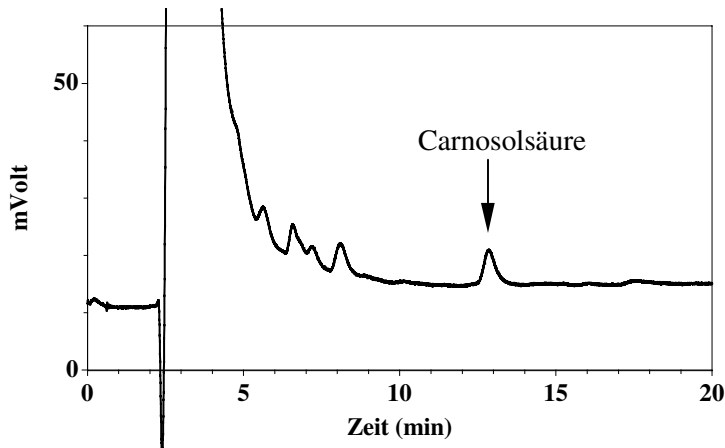
Die Analysen zeigen, daß Carnosolsäure nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt im Eigelb enthalten war. In den untersuchten Eigelbproben der Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt konnte keine Carnosolsäure nachgewiesen werden (siehe Abbildung 32 bis Abbildung 34).



*Abbildung 32: Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion. (18,0 ng Carnosolsäure, RT 12,92 min)*

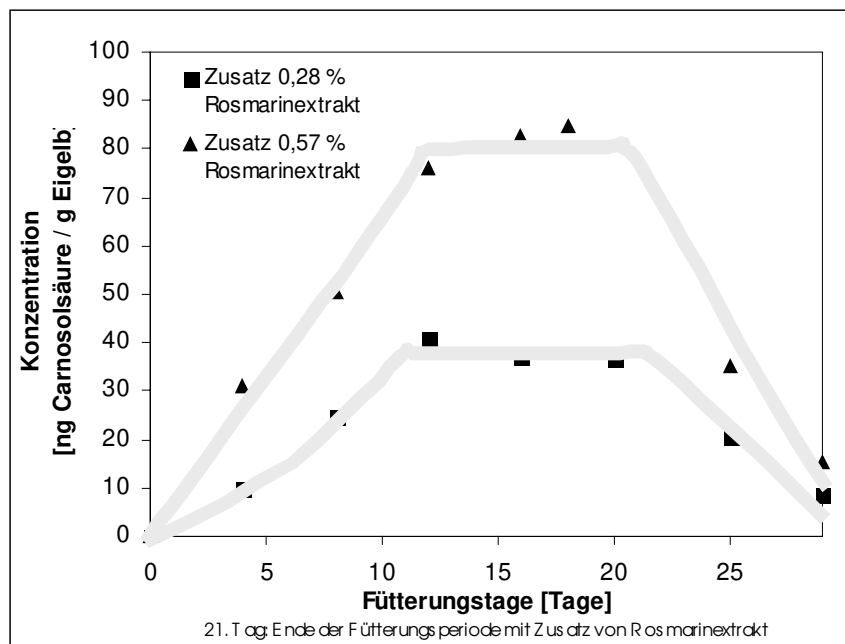


*Abbildung 33: Eigelb ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.*



**Abbildung 34: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt (Zusatz 0,57 %), HPLC -Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion. (RT Carnosolsäure 12,92 min)**

Die Konzentration von Carnosolsäure stieg in den ersten 12 Tagen der Fütterung an. Anschließend wurde ein Plateau erreicht, bei dem die Konzentration nicht weiter anstieg. Nach Beendigung der Fütterung mit Rosmarinextrakt nahm die Konzentration von Carnosolsäure in dem Eigelb wieder ab (siehe Abbildung 35).



**Abbildung 35: Konzentration von Carnosolsäure in Abhängigkeit von der Fütterungszeit. 0. bis 21. Tag: Fütterung mit Rosmarinextrakt (Zusatz von 0,28 % und 0,57 % Rosmarinextrakt), anschließend Fütterung mit normalem Legehennenmehl.**

Die Zu- und Abnahme der Konzentration von Carnosolsäure entsprach der Follikelbildung im Ovar der Legehenne. Es kann daher angenommen werden, daß eine depotähnliche Einlagerung in der Leber nicht erfolgte.

Die Konzentration (Mittelwert) von Carnosolsäure im Maximum kann der folgenden Tabelle entnommen werden. Die Standardabweichung des Mittelwertes beträgt 5,0 %.

Zusatz von Rosmarinextrakt [%]	Konzentration im Eigelb [ng/g]	Übergang vom Futter in das Eigelb <sup>11</sup> [%]
	Carnosolsäure	Carnosolsäure
0	<19,5 (NWG)	0,0000
0,28	38,2	0,0024
0,57	81,2	0,0025

**Tabelle 10: Konzentration und Übergang von Carnosolsäure in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Rosmarinextrakt.**

Mit zunehmender Menge an Rosmarinextrakt im Futter nahm der Gehalt an Carnosolsäure im Eigelb entsprechend der zudosierten Menge zu. Der Übergang von Carnosolsäure von dem Futter in das Eigelb war jedoch sehr gering. Es sind daher keine Auswirkungen auf das Ei zu erwarten.

Um Gehalte in dem Eigelb zu erreichen, die von praktischer Bedeutung wären, müßte das Futter mit extrem hohen Mengen an Gewürzextrakt versetzt werden. Selbst bei einer hypothetischen Annahme, daß ein Huhn mit reinem Rosmarinextrakt gefüttert würde, ergäbe sich bei Hochrechnung der vorhandenen Ergebnisse eine immer noch sehr geringe Konzentration von 14 µg Carnosolsäure/g Eigelb. Eine Wiederholung der Versuche mit einem höheren Zusatz von Gewürzextrakt zum Futter scheint daher nicht sinnvoll und ist aus toxikologischen Gründen kaum vertretbar.

Die Identität der eluierenden Substanz im Eigelb wurde mittels HPLC-Trennung und Diodenarraydetektion überprüft. Das erhaltene Spektrum zeigt die typischen Absorptionsmaxima für Carnosolsäure bei 233 und 283 nm und stimmt mit dem UV-Spektrum von Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt (siehe Abbildung 83) überein.

Eine Bestätigung der Substanzen mit dem verwendeten Massenspektrometer war aufgrund der zu geringen Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb nicht möglich.

<sup>11</sup>Zur Berechnung des Überganges der untersuchten Substanz wurde die im Eigelb gefundene Menge ins Verhältnis mit der von dem Huhn täglich aufgenommenen Menge gesetzt. Der Berechnung wurde ein mittleres Eigelbgewicht von 16 g zugrundegelegt. Desweiteren wurde die Wiederfindungsrate bei der Probenaufarbeitung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte somit nach folgender Formel:

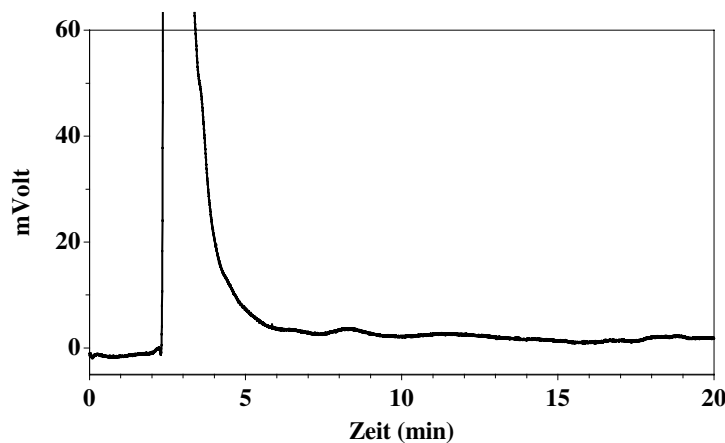
$$\text{Übergang [\%]} = \frac{\text{Konzentration im Eigelb} \times \text{mittleres Eigelbgewicht}}{\text{Konzentration im Futter} \times \text{tägliche Futtermenge} \times \text{Wiederfindungsrate}}$$

## 5.2.4 Untersuchung von Eiklar

Die zwölf Tage nach Beginn der Fütterung mit Gewürzextrakt erhaltenen Eiklarproben wurden nach der unter 5.1.1.2.3 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer sowie UV-Detektion untersucht. Insgesamt wurden sechs Eiklarproben untersucht.

Nach Fütterung unter Zusatz von 0,57 % Rosmarinextrakt war keine Carnosolsäure im Eiklar nachweisbar (NWG 60 ng/g). Ein Übergang von Carnosolsäure aus dem mit Futter dotierten Rosmarinextrakt in das Eiklar konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36).

Das Ergebnis dieser Untersuchung entspricht der Erwartung, daß Carnosolsäure aus dem Rosmarinextrakt aufgrund der Fettlöslichkeit bevorzugt in das Eigelb und weniger in das Eiklar eingelagert wird.



*Abbildung 36: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.*

*(RT Carnosolsäure 12,90 min in dem zu Vergleich injizierten Rosmarinextraktstandard)*

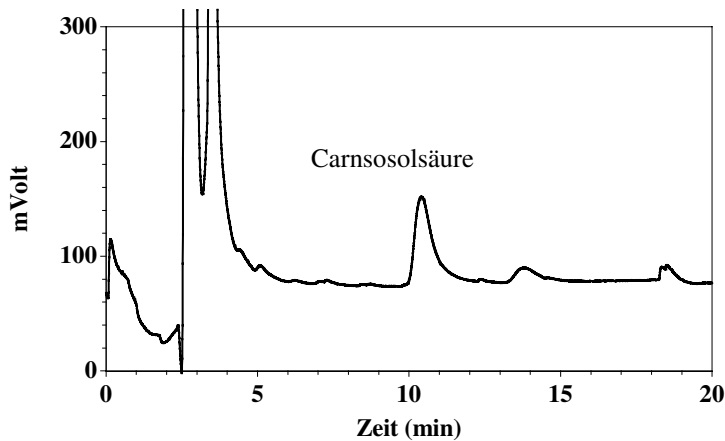
## 5.2.5 Untersuchung von Legehennenblut

Nach Ende der Fütterungsperiode mit einem Zusatz von 0,57 % Rosmarinextrakt wurden 5 Legehennen an der Klinik für Geflügel seziert (siehe Kapitel 5.2.7) und bei 2 Legehennen Blutserumproben gewonnen. Weiterhin wurden zwei Legehennen, deren Futter nicht mit Rosmarinextrakt dotiert worden war, untersucht und hier ebenfalls Blutserum zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. (Zur Aufarbeitung der Blutserumproben siehe Kapitel 6.10.1, die erhaltenen Proben wurden je zweimal mittels HPLC untersucht.)

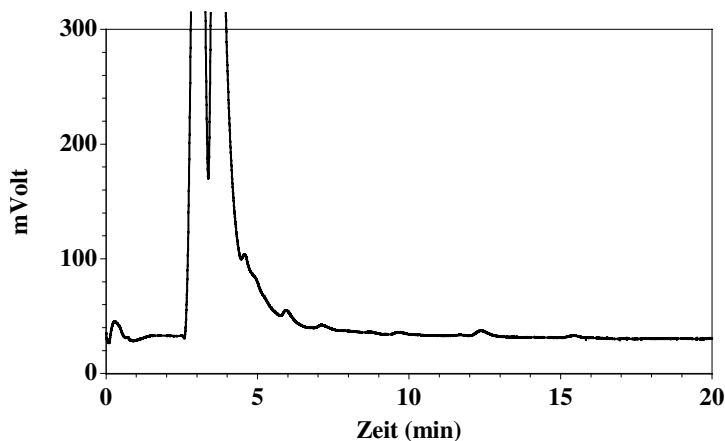
Als Blutserum wird die bei der Gerinnung von Blut aus dem geronnenen Blutkuchen sich abscheidende klare Flüssigkeit bezeichnet. In Abgrenzung hierzu ist Blutplasma der flüssige Anteil des Blutes. Man erhält es dadurch, daß man Blut durch Zugabe von z. B. Heparin ungerinnbar macht und die Blutzellen abzentrifugiert. Plasma besteht zu etwa 90% aus Wasser, zu 7-8% aus Eiweiß und enthält außerdem Salze, Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren u. a. Vom Blutplasma unterscheidet sich das Serum vor allem dadurch, daß der Gerinnungsfaktor Fibrinogen fehlt [Mutschler (1991)].

Die Untersuchung des Blutserums ergab, daß nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt Carnosolsäure nachweisbar war (siehe Abbildung 37). In den untersuchten Serumproben der Legehennen, deren Futter nicht mit Rosmarinextrakt dotiert worden war, konnte keine Carnosolsäure nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38).

Für die Bestimmung der Gewürzinhaltsstoffe im Blutserum wurde keine statistische Absicherung der Versuchsbedingungen durchgeführt. Der Gehalt an Carnosolsäure im Blut bei den beiden untersuchten Legehennen lag bei 10 µg/mL.



*Abbildung 37: Serum Legehennenblut nach Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.  
RT Carnosolsäure 10,38 min  $\equiv$   
RT Carnosolsäure im Rosmarinextraktstandard*



*Abbildung 38: Serum Legehennenblut ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.  
Blindprobe zu Abbildung 37*

## 5.2.6 Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen

Anknüpfend an die Versuche zur Bioverfügbarkeit sollten Effekte der verwendeten Substanzen auf humane Zellkulturen untersucht werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die verwendeten Substanzen von den Zellen aufgenommen werden und ob eventuelle Abbauprodukte detektiert werden können. Aufgrund der physiologischen Funktion wurden menschliche Magen- (HMO2) und Leberzellen (HepG2) ausgewählt.

Menschliche Magen- und Leberzellen wurden mit einem Medium, das Rosmarinextrakt in verschiedenen Konzentration enthielt, inkubiert. Die hierzu verwendeten Konzentrationen

wurden in einem Vorversuch ermittelt, um die optimale Substanzkonzentration zu erhalten, bei denen die Zellen die größte Stoffwechselaktivität besitzen.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Medium wurden das Medium, die Zellwandbestandteile und das Cytosol untersucht und miteinander verglichen. Als Vergleichsprobe wurde parallel zu den Versuchen reines Medium mit Gewürzextrakt, aber ohne den Zusatz von Zellen ebenso gelagert und anschließend analysiert.

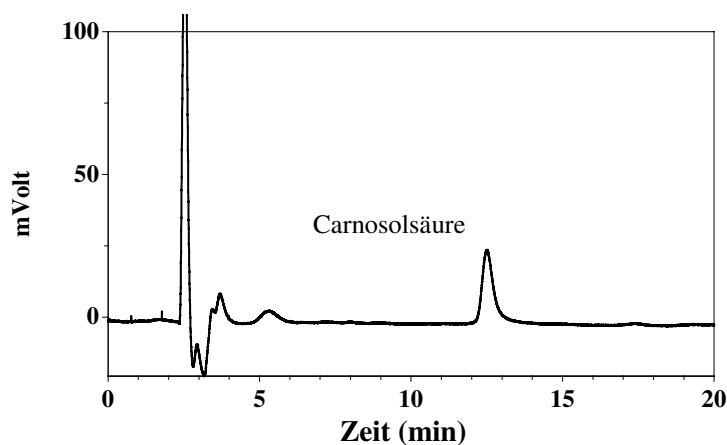
Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.11 wiedergegeben. Jede erhaltene Probe (Medium und Isolate) wurde je zweimal mittels HPLC untersucht.

In dem Medium ohne Zusatz von humanen Zellen konnte Carnosolsäure nicht mehr nachgewiesen werden. Statt dessen wurde das Abbauprodukt Carnosol in den Vergleichsproben nachgewiesen (siehe Abbildung 40). Schon von Schwarz et al. wurde beschrieben, daß Carnosolsäure sich zu Carnosol abbaut [Schwarz (1992b)].

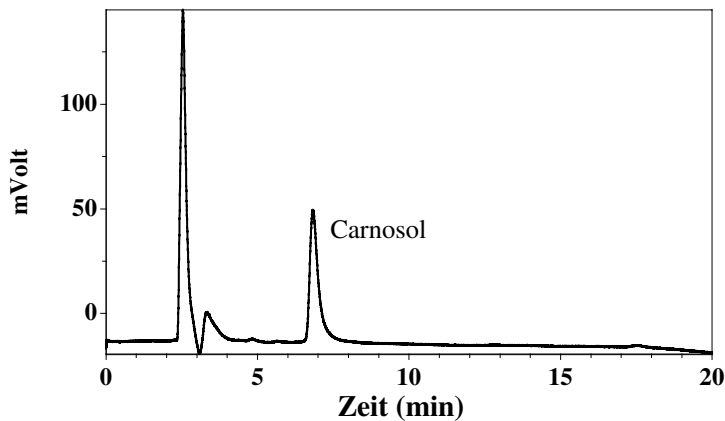
In den untersuchten Lösungen mit humanen Magen- und Leberzellen konnte für beide Zelllinien Carnosolsäure sowohl in dem Mediumüberstand, in dem Isolat Zellwand als auch in dem Isolat Cytosol nachgewiesen werden (siehe Abbildung 39).

Bei der Aufnahme von Carnosolsäure in die Zellwand und in das Cytosol der beiden Zelllinien konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Von der detektierten Carnosolsäurekonzentration befanden sich 87 % in dem Mediumüberstand, 10 % konnten in dem Isolat Zellwand und 3 % in dem Isolat Cytosol bestimmt werden.

Sonstige Abbauprodukte oder Stoffwechselprodukte konnten nicht detektiert werden.



*Abbildung 39: Isolat Zellwand nach Behandlung von humanen Magen­zellen mit Rosmarinextrakt [257,4 µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.*



**Abbildung 40: Mediumkontrolle: Rosmarinextrakt gelöst in Medium (ohne humane Zellen), Konzentration 514,8 µg/mL, 1:10 verdünnt), Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.**

*Abbau von Carnosolsäure zu Carnosol in dem Medium ohne Zusatz von humanen Zellen.*

Die Ergebnisse zeigen, daß Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt von humanen Magen- und Leberzellen aufgenommen wird. Stoffwechselprodukte konnten bei der Untersuchung nicht detektiert werden. Während sich in dem Medium ohne humane Zellen Carnosolsäure vollständig zu Carnosol abgebaut hatte, konnte dieser Abbau in den untersuchten Lösungen (Mediumüberstände, Cytosol, Zellwände) nicht beobachtet werden. Welche Vorgänge hierzu ausschlaggebend waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die Untersuchung zeigt aber ein interessantes Ergebnis für das Stoffwechselverhalten der humanen Zellkulturen.

### 5.2.7 Pathologische Untersuchung der Legehennen

Um einen Einfluß der Gewürzextraktfütterung auf Veränderungen der Gesundheit der Legehennen zu untersuchen, wurde eine klinische und histologische Untersuchung auf pathologische Veränderungen der Legehennen durchgeführt. Dabei wurden vornehmlich solche Organe untersucht, bei denen am ehesten mit einer pathologischen Veränderung zu rechnen ist (Leber, Niere, Lunge).

Die Leber ist die größte Drüse des Organismus. Sie ist beteiligt an der Regulation des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, sowie des Hormon- und des Wasserhaushaltes. Weitere Funktionen der Leber sind die Entgiftung, die Harnstoffvorbereitung, die Vitamin-speicherung, die Gallebildung und die Eiweißsynthese [Tackmann (1994), Loeffler (1994)].

Die Niere ist das Hauptexkretionsorgan des Organismus. In ihr wird das Blut von den harnpflichtigen Stoffen befreit. Außerdem bildet sie Hormone [Tackmann (1994), Loeffler (1994)].

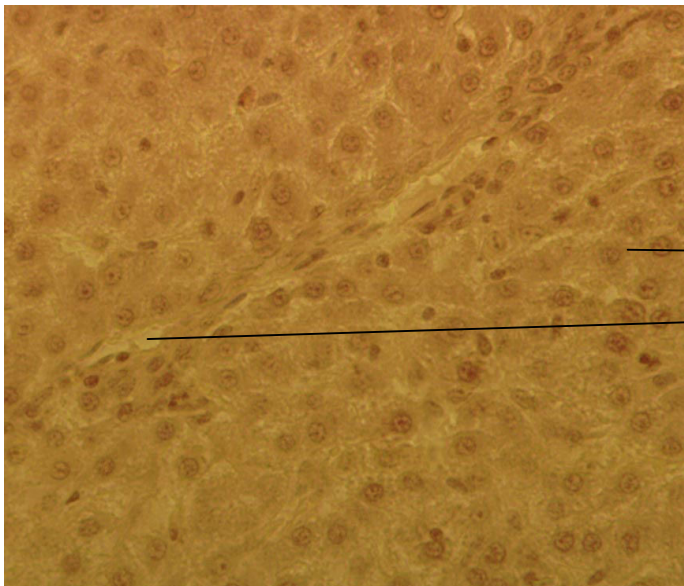
In der Lunge wird bei dem Lungenblutkreislauf in den Alveolen Kohlendioxid in die Ausatemungsluft abgegeben und Sauerstoff von der Einatemungsluft aufgenommen. Neben dem Austausch der Atemgase findet in der Lunge ebenfalls eine Biotransformation von Fremdstoffen statt [Tackmann (1994), Loeffler (1994), Mutschler (1991)].

Fünf Legehennen aus dem Fütterungsversuch unter Zusatz von 0,57 % Rosmarinextrakt und zwei Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Gewürzextrakt wurden zum Ende der Behandlungsperioden an der Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover seziert.

Die Untersuchung ergab, daß der Ernährungszustand aller Tiere gut und reichlich Bauchhöhlenfett vorhanden war. Die Leber war - Legehennen entsprechend - hellbraun gefärbt. Veränderungen an den Organen waren nicht erkennbar.

Sowohl aufgrund des klinischen als auch des pathologisch-anatomischen Bildes lagen keinerlei Anhaltspunkte für eine gesundheitliche Beeinträchtigung der Tiere vor.

Bei der Sektion wurden Proben von Leber, Niere und Lunge der Legehennen für eine histologische Untersuchung entnommen.

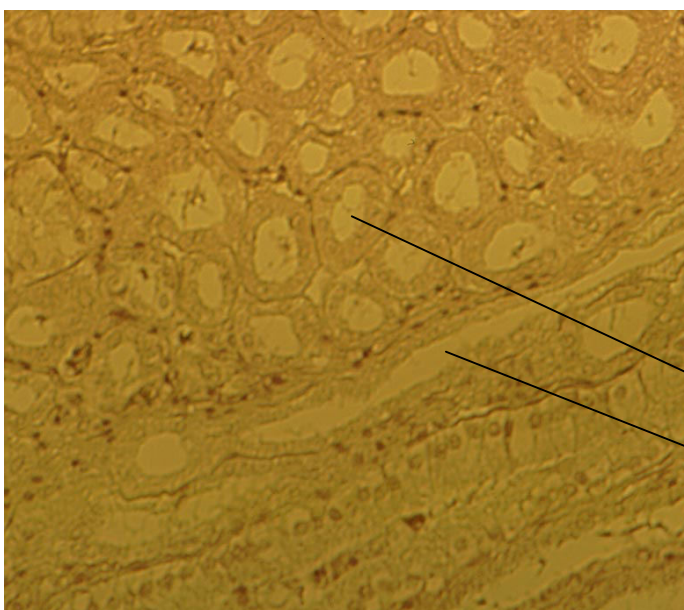


*Abbildung 41: Leber nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt. (Hämalaun-Eosin-Färbung), Vergrößerung 400fach*

*große, eckige Zellen mit runden Kernen*

*Gallengang*

↔  
10 µm



*Abbildung 42: Niere nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt. (Hämalaun-Eosin-Färbung), Vergrößerung 400fach*

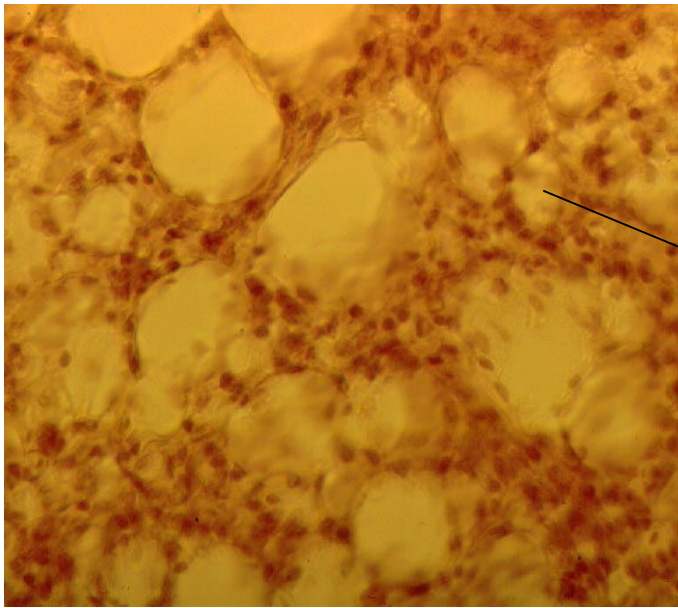
*Schnitt durch das Mittelstück des Nierenkanälchsystems; die Zellen besitzen keinen Bürstensaum, das Lumen ist deutlich erkennbar und wird von den Zellen scharf begrenzt.*

*Querschnitt*

*Längsschnitt*

↔  
10 µm





**Abbildung 43: Lunge nach  
Fütterung mit 0,57 %  
Rosmarinextrakt.  
(Hämalaun-Eosin-Färbung),  
Vergrößerung 400fach**

Alveole

↔  
10 µm

Zur histologischen Untersuchung wurde eine histochemische Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer durchgeführt. Es wurden Leber, Nieren und Lungen der Kontrollegehennen und der mit Rosmarinextrakt gefütterten Legehennen untersucht.

Die oben dargestellten Abbildungen zeigen Leber-, Nieren- und Lungenpräparate von den mit Rosmarinextrakt gefütterten Legehennen.

Das in Abbildung 41 dargestellte Leberpräparat zeigt die für Leber typischen großen, eckigen Zellen mit runden Kernen. Weiterhin ist als rinnenartiger Spalt ein Gallengang sichtbar.

Abbildung 42 zeigt einen Schnitt durch das Mittelstück des Nierenkanälchensystems im Quer- und Längsschnitt. Die Zellen besitzen keinen Bürstensaum, das Lumen ist deutlich erkennbar und wird von den Zellen scharf begrenzt.

Abbildung 43 zeigt ein Lungenpräparat. Sichtbar sind in der Abbildung Alveolen, die sich in ihrem Durchmesser um das dreifache unterscheiden können.

Histologisch konnten keinerlei Veränderungen in den Leber-, Nieren- und Lungenpräparaten nachgewiesen werden. Die vereinzelt kleineren Herde lymphozytärer Zellen waren in der festgestellten Anzahl und Größe als normal bei Geflügel anzusehen.

Unter Einbeziehung des klinischen Bildes, des Sektionsbefundes und der histologischen Untersuchung waren die untersuchten Tiere als gesund anzusehen.

## 5.3 Bioverfügbarkeit von Thymianextrakt

### 5.3.1 Bestimmung der Inhaltsstoffe von Thymianextrakt

Der verwendete Thymianextrakt wurde durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid hergestellt und von der Firma Raps (Kulmbach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Er enthält p-Cymen-2,3-diol und Thymol als antioxidativ wirksame Substanzen, Carvacrol ist nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Der von der Firma Raps zur Verfügung gestellte Extrakt enthielt durch Kreuzkontamination weiterhin Piperin, was sich erst im letzten Drittel der Untersuchungen herausstellte. Piperin kommt typischerweise in Pfeffer vor und ist in Thymian nicht enthalten. Der Thymianextrakt wurde anfangs ausschließlich mit elektrochemischer Detektion untersucht. Da Piperin bei der angelegten Potentialspannung von 800 mVolt nicht miterfaßt wurde, konnte diese Substanz nicht detektiert werden. Erst durch den im 2. Teil der Arbeit verwendeten UV-Detektor konnte Piperin nachgewiesen werden.

Die Bezeichnung „Thymianextrakt“ wurde trotz des Gehaltes an Piperin beibehalten, da der Extrakt nach Thymian riecht und schmeckt. Der Gehalt an Piperin störte die Untersuchungen nicht, im Gegenteil zeigte sich im Laufe der Arbeit, daß mit Piperin interessante, zusätzliche Ergebnisse erhalten wurden.

Die Bestimmung von p-Cymen-2,3-diol und Thymol erfolgte mittels HPLC-Trennung an einer RP-18-Phase (ODS-Hypersil) und elektrochemischer Detektion. Die elektrochemische Detektion stellt für die untersuchten Substanzen aufgrund der hohen Oxidationsbereitschaft eine selektive und empfindliche Detektionsmöglichkeit dar.

Der Piperingehalt wurde mittels HPLC-Trennung an einer RP-18-Phase (ODS-Hypersil) und UV-Detektion bestimmt.

	<b>p-Cymen-2,3-diol</b> [g/100 g]		<b>Thymol</b> [g/100 g]		<b>Piperin</b> [g/100 g]	
Thymianextrakt	4,50	±0,08	20,0	±0,5	4,76	±0,05

*Tabelle 11: Gehalt an p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Thymianextrakt.*

Die Zuordnung von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Chromatogramm erfolgte durch Zuordnung der Retentionszeit und UV-Spektren von Standardsubstanzen.

Zur weiteren Absicherung, vor allem des in dem Thymianextrakt gefundenen Piperins, wurde der Extrakt mittels HPLC-MS und nach Isolierung der Substanzen an einer präparativen HPLC mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Sowohl die Massenspektren als auch die NMR-Spektren stimmen mit den Literaturdaten überein [Schwarz (1996), Pouchert (1983), Grewe (1970), De Cleyn (1975), Banerji (1984), Kiuchi (1988)].

Versuchsbedingungen, Chromatogramme und Spektren können dem experimentellen Teil der Arbeit entnommen werden (siehe Kapitel 6.2.1 und 6.5.1). Die Analysenmethode wird in Kapitel 5.1.2.2 beschrieben.

### 5.3.2 Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt

Für den Fütterungsversuch mit Thymianextrakt standen zehn Legehennen zur Verfügung. Das Alter der Legehennen betrug zu Versuchsbeginn 25 Wochen.

Als Futtermittel wurde Legehennenmehl mit 1 % Pflanzenöl versetzt. Das Futter während der Behandlungsperiode wurde wie folgt angesetzt:

Versuchsreihe	Anzahl Hühner	Zusatz Thymianextrakt [mg/100 g Futter]	≡ Zusatz p-Cymen-2,3-diol [mg/100 g Futter]	≡ Zusatz Thymol [mg/100 g Futter]	≡ Zusatz Piperin [mg/100 g Futter]
1	3	0	0	0	0
2	3	1120	50	224	53
3	4	1680	75	336	80

*Tabelle 12: Fütterungsversuch Legehennen: Zusatz Thymianextrakt zum Legehennenmehl während der Behandlungsperiode.*

Die täglich aufgenommene Futtermenge betrug pro Legehenne 100 g. Der numerische Wert in Tabelle 12 entspricht der täglich aufgenommenen Menge an Thymianextrakt bzw. der täglich aufgenommenen Menge an Gewürzinhaltsstoffen.

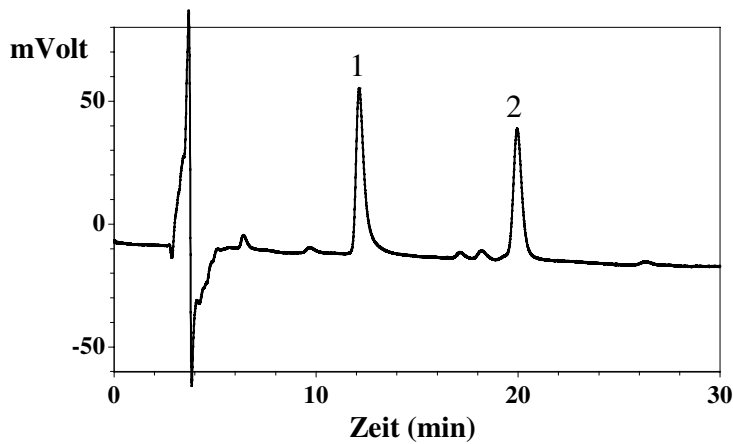
### 5.3.3 p-Cymen-2,3-diol und Thymol aus Thymianextrakt

#### 5.3.3.1 Untersuchung von Eigelb

Das während des gesamten Fütterungszeitraumes und in der Nachperiode erhaltene Eigelb wurde nach der neu entwickelten Methode aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer Detektion analysiert (Analysenmethoden und Ergebnisse siehe auch Kapitel 6.2.1, 6.6.1 und 6.6.4).

Die Probennahme für die Untersuchungen mußte sich an den gelegten Eiern orientieren, da nicht von jedem Huhn jeden Tag ein Ei gelegt wurde. Für die Untersuchung der Eier wurde, wie bereits in Kapitel 5.2.3 erläutert, ein Probennahmeabstand von 4 Tagen angestrebt. Nachdem ein Aufnahmemaximum in den untersuchten Proben festgestellt worden war, wurden zur Bestätigung je nach Verfügbarkeit weitere Proben untersucht. Die Eigelbproben eines Fütterungstages wurden für die Untersuchungen vereinigt. Für die Bestimmung der p-Cymen-2,3-diol und Thymol-Konzentration im Eigelb wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

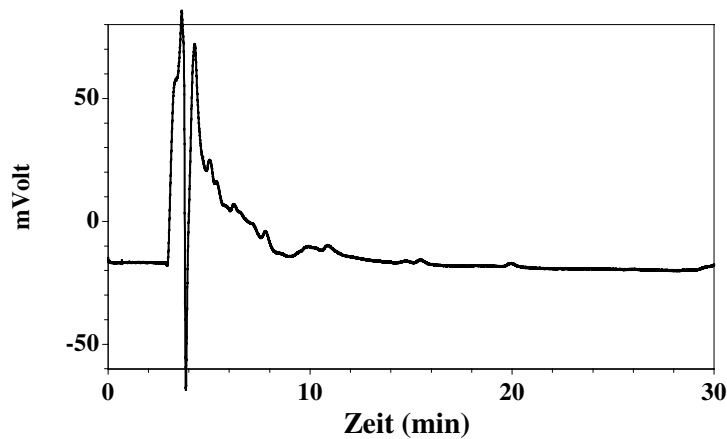
Die Analysen zeigen, daß p-Cymen-2,3-diol und Thymol nach Fütterung von Thymianextrakt im Eigelb enthalten war. In den untersuchten Eigelbproben der Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt konnte erwartungsgemäß weder p-Cymen-2,3-diol noch Thymol nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44 bis Abbildung 46).



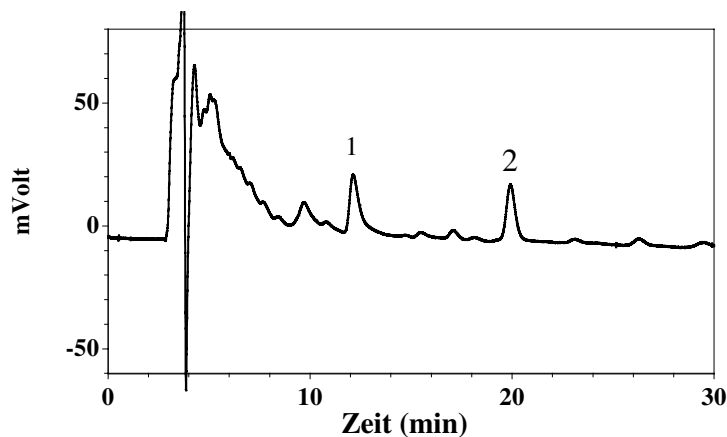
**Abbildung 44:** HPLC-Trennung von Thymianextrakt, an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.

[5 ng p-Cymen-2,3-diol und 22 ng Thymol]

1 = p-Cymen-2,3-diol, 2 = Thymol



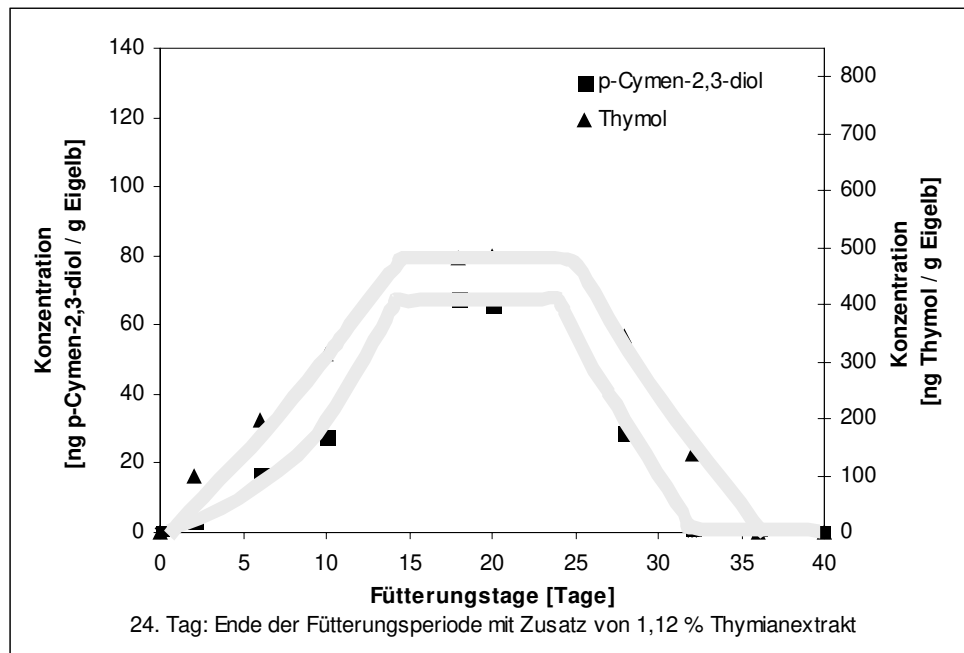
**Abbildung 45:** Eigelb ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.



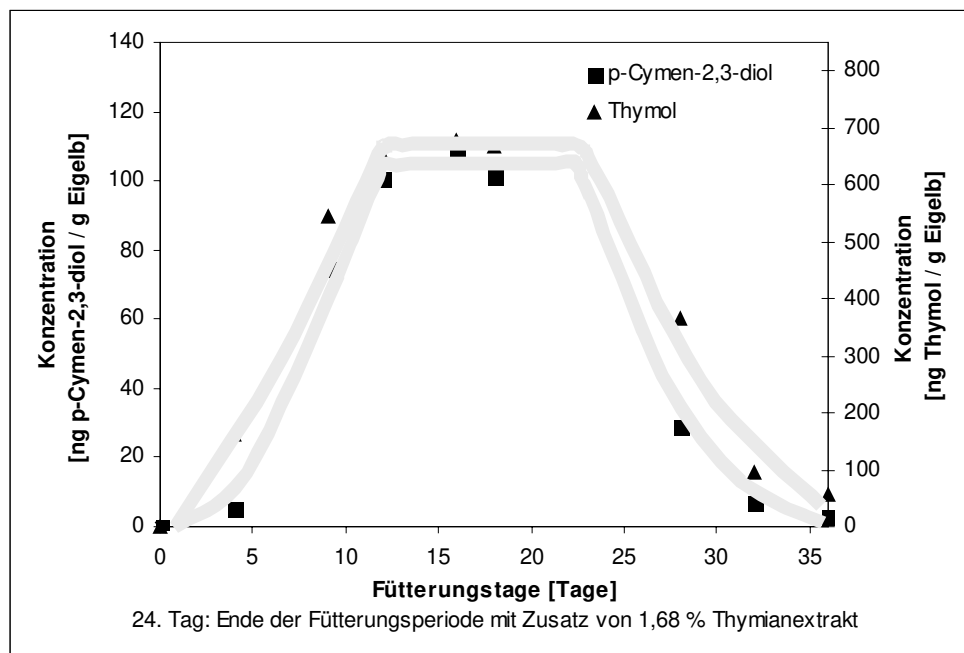
**Abbildung 46:** Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 %), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.

1 = p-Cymen-2,3-diol, 2 = Thymol

Die Konzentrationen von p-Cymen-2,3-diol und Thymol stieg in den ersten 12 Tagen der Fütterung an. Anschließend stagnierte sie auf einem gleich hohen Niveau und nahm erst wieder ab, nachdem die Fütterung mit Thymianextrakt beendet worden war (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).



**Abbildung 47: Konzentration von *p*-Cymen-2,3-diol und Thymol in Abhängigkeit von der Fütterungszeit. 0. bis 24. Tag: Fütterung mit Legehennenmehl unter Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt, anschließend Fütterung mit normalem Legehennenmehl.**



**Abbildung 48: Konzentration von *p*-Cymen-2,3-diol und Thymol in Abhängigkeit von der Fütterungszeit. 0. bis 24. Tag: Fütterung mit Legehennenmehl unter Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt, anschließend Fütterung mit normalem Legehennenmehl.**

Die Zunahme des Gehaltes an p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Eigelb erfolgte entsprechend der Follikelbildung im Ovar der Legehennen. Da auch die Abnahme der Konzentration nach Beendigung der Fütterung mit Thymianextrakt der Bildung der Follikel entsprach, kann man davon ausgehen, daß eine depotähnliche Einlagerung der Substanzen in die Leber nicht stattfand.

Die Konzentrationen von p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Maximum (Mittelwert) sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes beträgt für p-Cymen-2,3-diol 3,9 % und für Thymol 1,7 % (Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt).

Zusatz von Thymianextrakt [%]	Konzentration im Eigelb [ng/g]		Übergang vom Futter in das Eigelb <sup>12</sup> [%]	
	p-Cymen- 2,3-diol	Thymol	p-Cymen-2,3- diol	Thymol
0	<2,4 (NWG)	<21,7 (NWG)	0,0000	0,0000
1,12	66	484	0,0035	0,0063
1,68	103	667	0,0036	0,0058

*Tabelle 13: p-Cymen-2,3-diol und Thymol: Konzentration und Übergang in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.*

Mit zunehmender Menge an Thymianextrakt im Futter nahm der Gehalt an p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Eigelb entsprechend der dotierten Konzentration zu. Aufgrund der sehr geringen Übergangsrate wurden jedoch nur sehr geringe Konzentrationen im Eigelb erreicht. Die sehr geringen Übergangsraten von p-Cymen-2,3-diol und Thymol lassen darauf schließen, daß es sich nicht um einen aktiven Transport über das Blut in das Ovar der Legehennen handelte, sondern daß dieser Transport passiv erfolgte.

Die Identität der Substanzen wurde mittels HPLC-Trennung und Diodenarraydetektion überprüft und mit den Spektren von p-Cymen-2,3-diol und Thymol verglichen. Das Spektrum von p-Cymen-2,3-diol in den untersuchten Eigelbproben zeigt Maxima bei 223 und 273 nm und stimmt mit dem UV-Spektrum in Abbildung 80 überein. Das Spektrum von Thymol in den

<sup>12</sup> Zur Berechnung des Überganges der untersuchten Substanz wurde die im Eigelb gefundene Menge ins Verhältnis mit der von dem Huhn täglich aufgenommenen Menge gesetzt. Der Berechnung wurde ein mittleres Eigelbgewicht von 16 g zugrundegelegt. Desweiteren wurde die Wiederfindungsrate bei der Probenaufarbeitung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte somit nach folgender Formel:

$$\text{Übergang [\%]} = \frac{\text{Konzentration im Eigelb} \times \text{mittleres Eigelbgewicht}}{\text{Konzentration im Futter} \times \text{tägliche Futtermenge} \times \text{Wiederfindungsrate}}$$

untersuchten Eigelbproben zeigt die Maxima bei 230 und 276 nm und stimmt mit dem UV-Spektrum in Abbildung 81 überein. Die Identität der Substanzen konnte somit bestätigt werden.

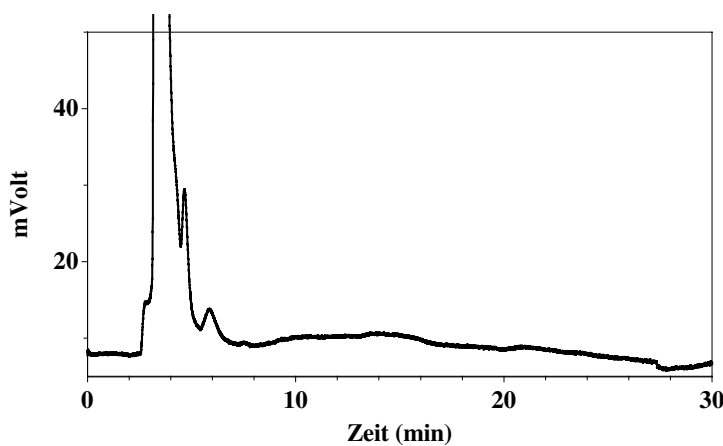
Eine Bestätigung der Substanzen mit dem verwendeten Massenspektrometer war aufgrund der zu geringen Konzentration der Substanzen im Eigelb nicht möglich.

### 5.3.3.2 Untersuchung von Eiklar

Die zwölf Tage nach Beginn der Fütterung mit Gewürzextrakt erhaltenen Eiklarproben (Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zu dem Futter) wurden nach der unter 5.1.1.2.3 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer sowie UV-Detektion untersucht. Insgesamt wurden fünf Eiklarproben untersucht.

Nach der Fütterung unter Zusatz von Thymianextrakt konnten p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Eiklar nicht nachgewiesen werden (NWG p-Cymen-2,3-diol 64,4 ng/g Eiklar, NWG Thymol 179 ng/g Eiklar) (siehe Abbildung 49).

Ein Übergang von p-Cymen-2,3-diol und Thymol aus dem mit Thymianextrakt dotierten Futter in das Eiklar konnte damit nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, daß die Substanzen aufgrund ihrer sehr geringen Wasserlöslichkeit nicht in das Eiklar, sondern bevorzugt in das Eigelb übergehen.



*Abbildung 49: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion. (RT p-Cymen-2,3-diol 13,17 min und Thymol 22,17 min in dem zum Vergleich injizierten Thymianextraktstandard)*

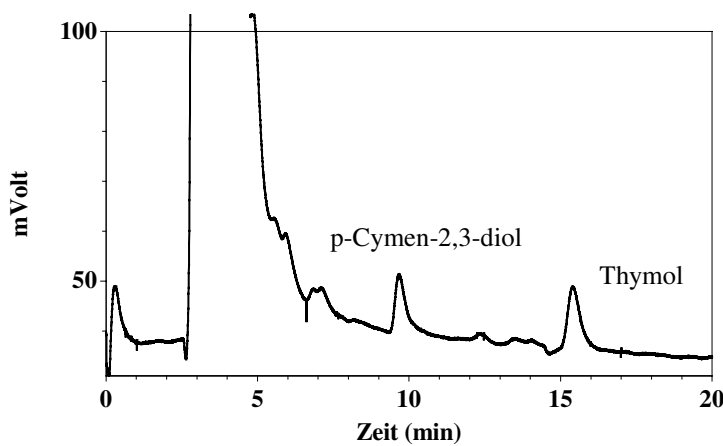
### 5.3.3.3 Untersuchung von Legehennenblut

Zum Ende der Fütterungsperiode mit Thymianextrakt wurden zwei Legehennen aus dem Fütterungsversuch mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt und zwei Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt an der Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover seziert. Das bei der Sektion entnommene Blut wurde chromatographisch untersucht. Dazu wurden bei der Sektion der mit Thymianextrakt gefüt-

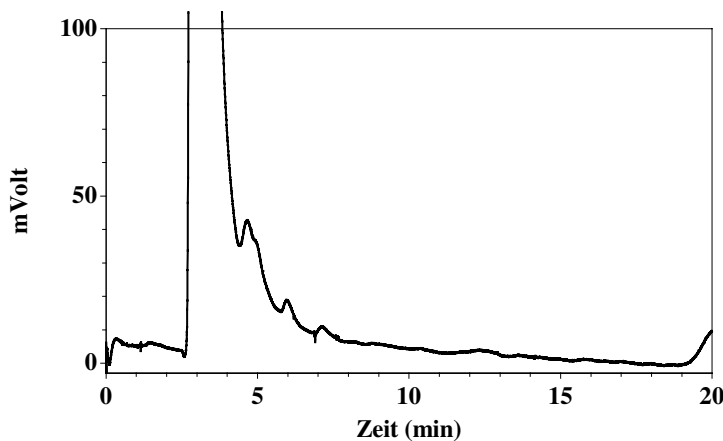
terten Legehennen Blutplasma für die HPLC-Untersuchung gewonnen. (Zur Aufarbeitung siehe Kapitel 6.10.2, jede erhaltene Probe wurde je zweimal mittels HPLC untersucht.)

Die Untersuchung des Blutplasmas ergab, daß nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt p-Cymen-2,3-diol und Thymol nachweisbar war (siehe Abbildung 50). Erwartungsgemäß war in den untersuchten Plasmaproben der Legehennen, deren Futter nicht mit Thymianextrakt dotiert worden war, weder p-Cymen-2,3-diol noch Thymol nachweisbar (siehe Abbildung 51).

Für die Bestimmung der Gewürzinhaltsstoffe im Blutplasma wurde keine statistische Absicherung der Versuchsbedingungen durchgeführt. Der Gehalt an p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Blut bei den beiden untersuchten Legehennen lag bei 4 und 8 µg/ mL.



**Abbildung 50:** Plasma Legehennenblut nach Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.  
RT p-Cymen-2,3-diol 9,67 min, RT Thymol 15,39 min



**Abbildung 51:** Plasma ohne Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.  
Blindprobe zu Abbildung 50

#### 5.3.3.4 Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen

Anknüpfend an die Versuche zur Bioverfügbarkeit sollten Effekte von den verwendeten Substanzen auf humane Magen- und Leberzellkulturen untersucht werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die verwendeten Substanzen von den Zellen aufgenommen werden und ob eventuelle Abbauprodukte detektiert werden können.

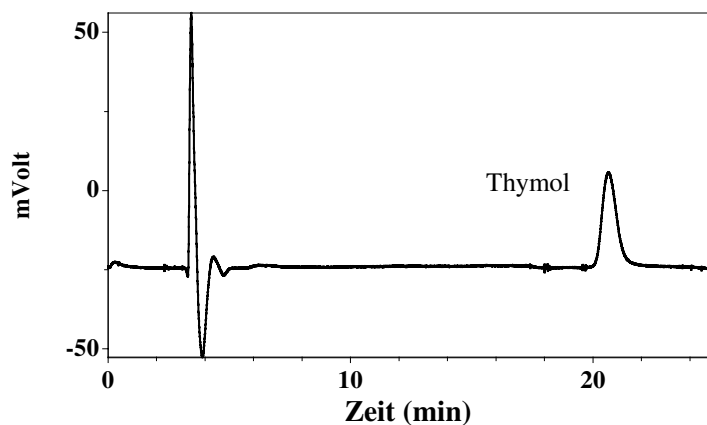


Menschliche Magen- und Leberzellen wurden mit einem Medium, das Thymol in verschiedenen Konzentration enthielt, inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.11 wiedergegeben. Jede erhaltene Probe (Medium und Isolate) wurde je zweimal mittels HPLC untersucht.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Medium wurde das Medium, die Zellwandbestandteile und das Cytosol untersucht und miteinander verglichen. Als Vergleichsprobe wurde parallel zu den Versuchen reines Medium mit Gewürzextrakt, aber ohne den Zusatz von Zellen ebenso gelagert und anschließend analysiert.

In der Vergleichsprobe konnten keine relevanten Veränderungen festgestellt werden. In den untersuchten Lösungen mit humanen Magen- und Leberzellen konnte für beide Zelllinien Thymol sowohl in dem Mediumüberstand, in dem Isolat Zellwand und dem Isolat Cytosol nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration an Thymol wies hier das Isolat Mediumüberstand auf (94% bei Magenzellen, 99% bei Leberzellen der Gesamtkonzentration). Die aufgenommene Konzentration von Thymol in die Magenzellwand und in das Magenzellencytosol (je 3 % der Gesamtkonzentration) war höher als in die Leberzellwand und dem entsprechenden Cytosol (je 0,5% der Gesamtkonzentration).

Abbauprodukte oder Stoffwechselprodukte von Thymol konnten bei dieser Bestimmung nicht detektiert werden.



*Abbildung 52: Isolat Cytosol nach Behandlung von humanen Magenzellen mit Thymol [85,1µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.*

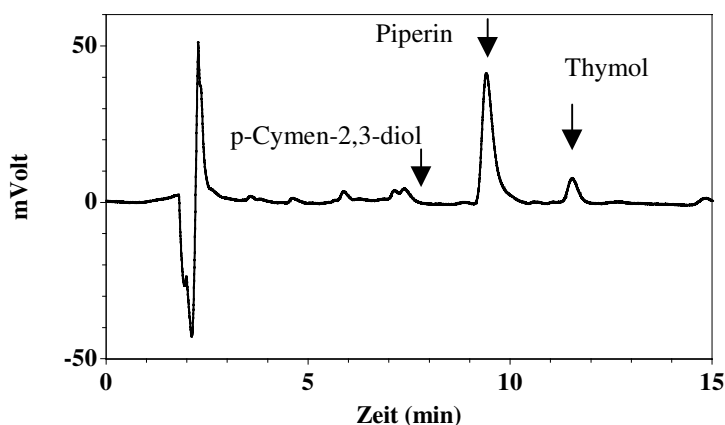
## 5.3.4 Piperin aus piperinhaltigem Thymianextrakt

### 5.3.4.1 Untersuchung von Eigelb

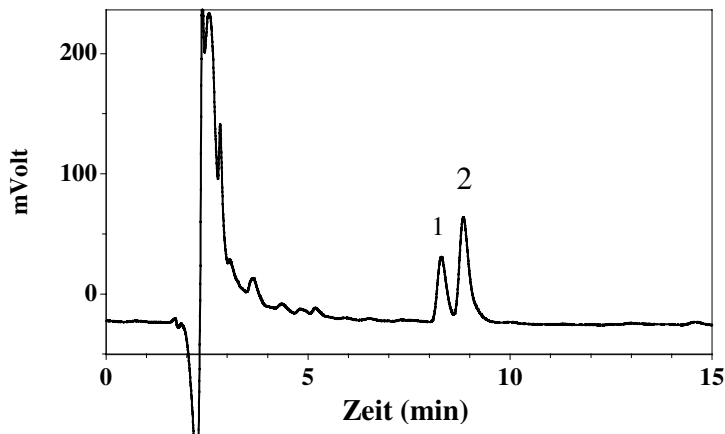
Während des gesamten Fütterungszeitraumes und in der Nachperiode wurden die erhaltenen Eigelbproben mittels HPLC (RP-Chromatographie) und UV-Detektion bei 240 nm analysiert (Analysenmethoden und Ergebnisse siehe auch Kapitel 6.2.1, 6.6.1 und 6.6.4). Für die Analyse wurden die Eigelbproben eines Fütterungstages vereinigt. Zur Bestimmung der Konzentration wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Analysen zeigten, daß Piperin nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt im Eigelb enthalten war (siehe Abbildung 55). Weiterhin traten nach Fütterung mit Thymianextrakt weitere Substanzen auf, die als die Piperinisomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin identifiziert werden konnten. Da diese Isomere im Thymianextrakt nicht enthalten waren (siehe Abbildung 53), muß die Isomerisierung auf einen Stoffwechselvorgang im Huhn zurückzuführen sein. Außer Piperin und den Isomeren können in dem Eigelb nach Fütterung mit Thymianextrakt mittels UV-Detektion zwei weitere Substanzen nachgewiesen werden. Die UV-Spektren dieser Substanzen sind in Abbildung 58 und Abbildung 59 wiedergegeben. Diese Substanzen sind im Eigelb unabhängig davon enthalten, ob die Hühner mit Thymianextrakt gefüttert wurden oder nicht (vgl. Abbildung 54) und sind damit im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht von Interesse.

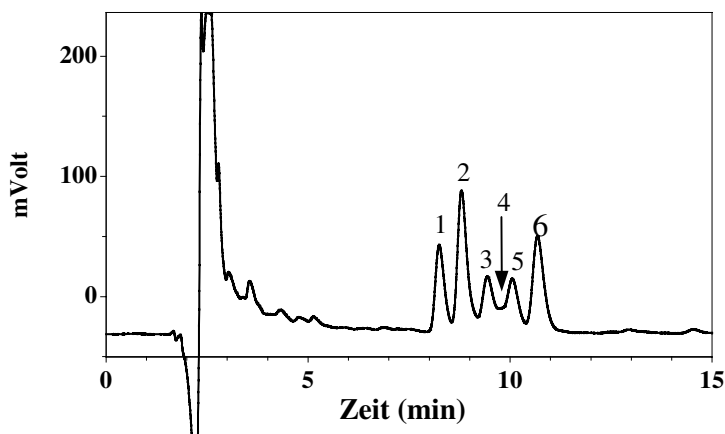
In den untersuchten Eigelbproben der Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt konnte erwartungsgemäß weder Piperin noch die Piperinisomere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 54).



**Abbildung 53:** *Piperinhaltiger Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm. [96,0 ng Piperin und 403 ng Thymol] Piperin RT = 9,44 min, Thymol RT = 11,55 min, p-Cymen-2,3-diol wurde nicht detektiert.*

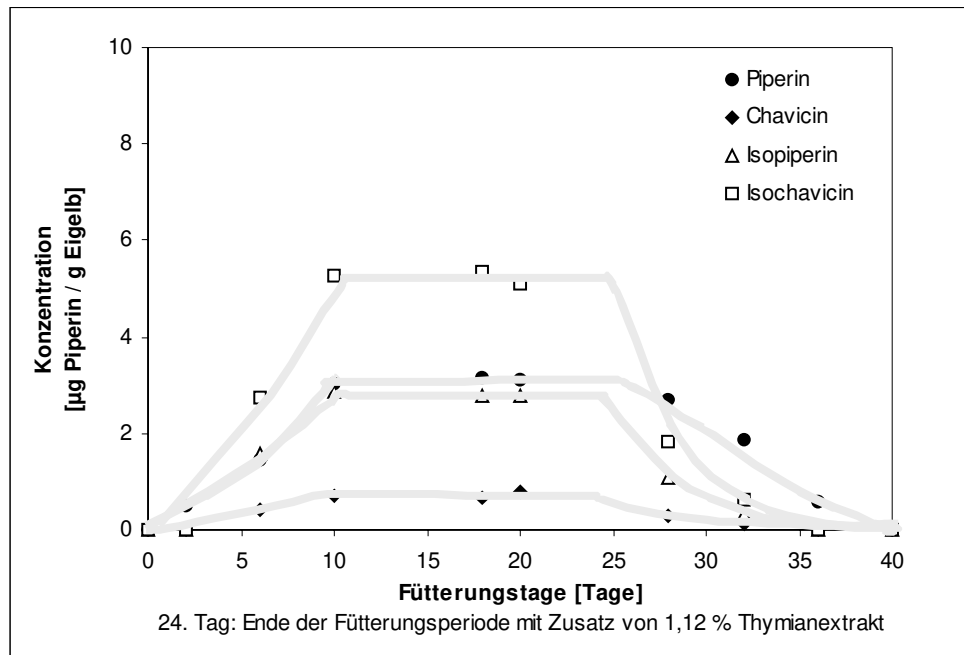


**Abbildung 54:** Eigelb ohne Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. Blindprobe zu Abbildung 55, 1 = nativ in Eigelb vorkommende Substanz, RT = 8,28 min, 2 = nativ in Eigelb vorkommende Substanz, RT = 8,83 min.



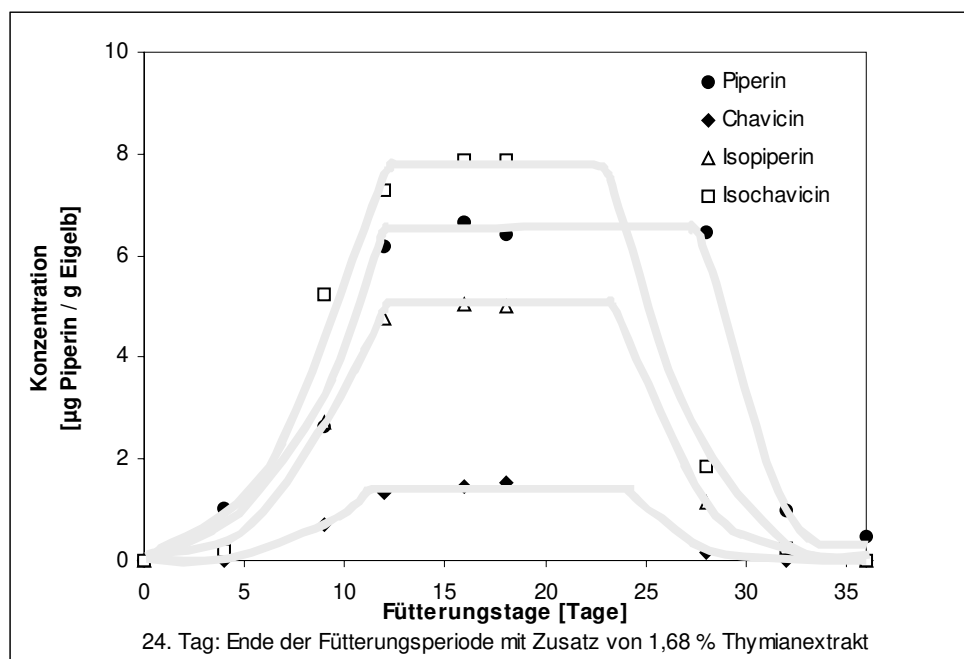
**Abbildung 55:** Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt (Zusatz 1,12 %), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. 1 = nativ in Eigelb vorkommende Substanz, RT = 8,28 min, 2 = nativ in Eigelb vorkommende Substanz, RT = 8,83 min, 3 = Piperin RT = 9,44 min, 4 = Chavicin RT = 9,74 min, 5 = Isopiperin RT = 10,05 min, 6 = Isochavicin RT = 10,68 min

Die Konzentration von Piperin und den gebildeten Isomeren stieg in den ersten 10 Tagen der Fütterung an. Anschließend stagnierte die Konzentration auf einem gleich hohen Niveau und nahm erst wieder ab, nachdem die Fütterung unter Zusatz von Thymianextrakt beendet worden war (siehe Abbildung 56 und Abbildung 57).



**Abbildung 56:** Konzentration von Piperin und den durch Stoffwechsel entstandenen Piperinisomeren Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Fütterungszeit.

0. bis 24. Tag: Fütterung mit Thymianextrakt (Zusatz von 1,12 % piperinhaltigem Thymianextrakt), anschließend Fütterung mit normalem Legehennenmehl.



**Abbildung 57:** Konzentration von Piperin und den durch Stoffwechsel entstandenen Piperinisomeren Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Fütterungszeit.

0. bis 24. Tag: Fütterung mit Thymianextrakt (Zusatz von 1,68 % piperinhaltigem Thymianextrakt), anschließend Fütterung mit normalem Legehennenmehl.

Wie bereits bei Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol und Thymol erfolgte auch bei Piperin und dessen Isomeren die Zunahme im Eigelb entsprechend der Follikelbildung im Ovar der Legehennen. Da auch die Abnahme der Konzentration nach Beendigung der Fütterung mit Thymianextrakt der Bildung der Follikel entsprach, ist auch hier davon auszugehen, daß eine depotähnliche Einlagerung der Substanzen in die Leber nicht stattfand. Hierbei ist beachtenswert, daß die Zunahme der Piperinisomere langsamer erfolgte als vom Piperin selbst (siehe Abbildung 56 und Abbildung 57). Umgekehrt erfolgte die Abnahme der Piperinisomere nach Beendigung der Fütterung schneller als die Abnahme von Piperin. Für dieses Verhalten sind mehrere Erklärungen denkbar. Welche physiologischen Vorgänge letztlich dafür eine Rolle spielten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Die Konzentrationen (Mittelwert) von Piperin und den Isomeren im Maximum sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Standardabweichung des Mittelwertes beträgt bei der Fütterung mit 1,12 % Thymianextrakt 2,2 % für Piperin und 2,1 % für die Piperinisomere und bei der Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt 3,6 % für Piperin und 4,5% für die Piperinisomere.

Zusatz von Thymianextrakt [%]	Konzentration im Eigelb [µg/g]		Übergang vom Futter in das Eigelb <sup>13</sup> [%]	
	Piperin	Isomere, gesamt	Piperin	Isomere, gesamt
0	<0,025 (NWG)	<0,025 (NWG)	0,0000	0,0000
1,12	3,1	11,9	0,133	0,510
1,68	6,4	20,5	0,183	0,586

*Tabelle 14: Piperin und Piperinsisomere: Konzentration und Übergang in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.*

Die aufgenommene Menge an Piperin und Isomeren nimmt mit der dem Futter zugesetzten Menge an Thymianextrakt zu. Jedoch ist die Zunahme im Eigelb geringer als die entsprechende Erhöhung der Extraktmenge im Futter.

Das Verhältnis der Isomere im Eigelb ist nahezu unabhängig von der dem Futter zugesetzten Menge an Thymianextrakt: Nach Dotierung des Futters mit 1,12 % Thymianextrakt treten die

<sup>13</sup> Zur Berechnung des Überganges der untersuchten Substanz wurde die im Eigelb gefundene Menge ins Verhältnis mit der von dem Huhn täglich aufgenommenen Menge gesetzt. Der Berechnung wurde ein mittleres Eigelbgewicht von 16 g zugrundegelegt. Desweiteren wurde die Wiederfindungsrate bei der Probenaufarbeitung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte somit nach folgender Formel:

$$\text{Übergang [\%]} = \frac{\text{Konzentration im Eigelb} \times \text{mittleres Eigelbgewicht}}{\text{Konzentration im Futter} \times \text{tägliche Futtermenge} \times \text{Wiederfindungsrate}}$$

Isomere in einem Verhältnis von 26 % Piperin, 6 % Chavicin, 24 % Isopiperin und 44 % Isochavicin auf. Das Isomerenverhältnis nach Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt beträgt 31 % Piperin, 7 % Chavicin, 24 % Isopiperin und 38 % Isochavicin.

Der Übergang von Piperin in das Eigelb ist sehr gering, aber um den Faktor 40 bis 50 höher als der Übergang von p-Cymen-2,3-diol und Thymol in das Eigelb.

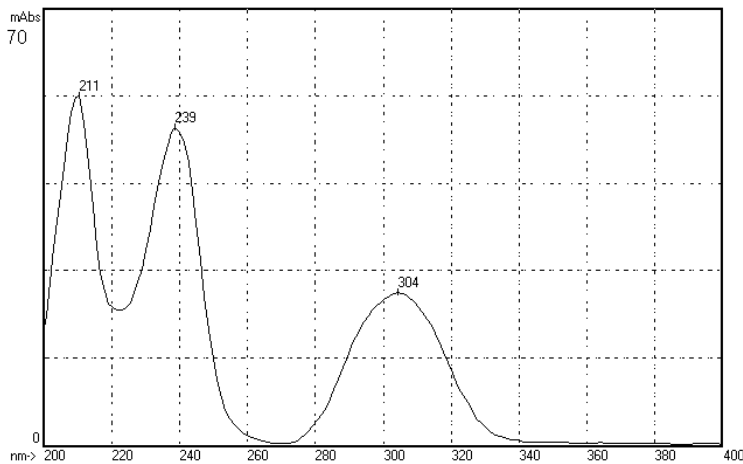
Untersuchungen von Khajuria et al. zur Aufnahme von Piperin in Ratten und Gewebesäcken hatten bereits gezeigt, daß die Aufnahme sehr schnell erfolgt. Die Autoren schlugen daher einen transzellularen Weg für die Absorption vor [Khajuria (1998)].

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse scheint ein Übergang von Piperin in das Eigelb einem anderen Mechanismus zu folgen als der Übergang von Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol und Thymol in das Eigelb. Welche Stoffwechselforgänge für den Übergang letztlich eine Rolle spielten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

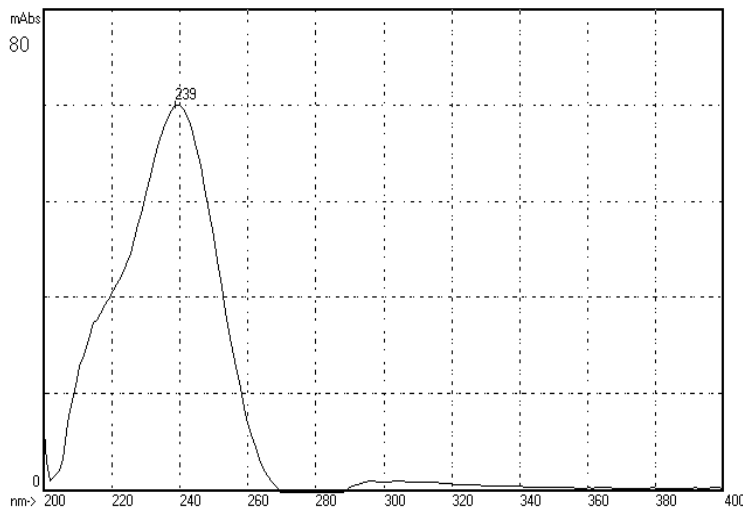
Die Identität von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin im Eigelb konnte durch Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit Vergleichssubstanzen und mittels HPLC-MS bestätigt werden. Die UV-Spektren von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin stimmen mit den UV-Spektren in Kapitel 5.1.2.2.5.1 überein. Im Massenspektrum konnten im Fragmentierungsmuster keine Unterschiede zwischen Piperin und den Isomeren festgestellt werden. Die erhaltenen Massenspektren stimmen mit dem Massenspektrum in Abbildung 18 überein.

Die Aufnahme der UV-Chromatogramme erfolgte bei einer Wellenlänge von 240 nm, da die nativ im Ei vorkommenden Substanzen bei dieser Wellenlänge ebenfalls absorbieren und bei einer Wellenlänge von 340 nm nicht miterfaßt werden konnten (siehe Abbildung 58 und Abbildung 59). p-Cymen-2,3-diol und Thymol wurden aufgrund der deutlich geringeren Konzentration als von Piperin im Eigelb mittels UV nicht detektiert.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Trennung der Piperinisomere, wurde die HPLC-Methode verbessert (Siehe Kapitel 5.1.2.2). Dort werden die HPLC-Chromatogramme nach Modifizierung dargestellt.



**Abbildung 58: UV-Spektrum 1. Peak aus Abbildung 55, Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. Die eluierende Substanz kann auch in einem Ei ohne Fütterung der Legehennen mit Thymianextrakt detektiert werden (Vergleiche Chromatogramme Abbildung 54 und Abbildung 55).**

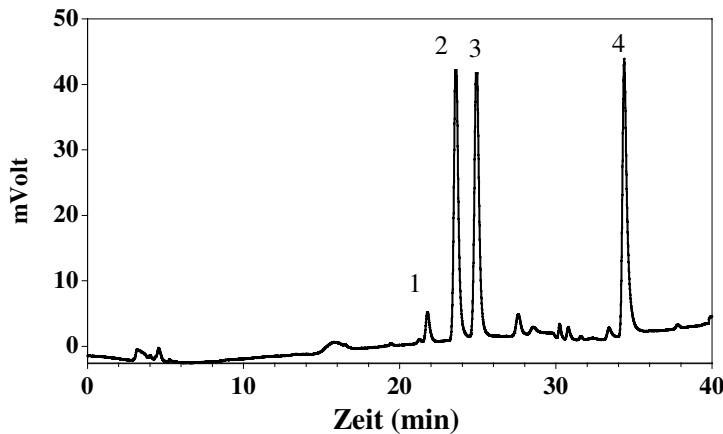


**Abbildung 59: UV-Spektrum 2. Peak aus Abbildung 55, Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. Die eluierende Substanz kann auch in einem Ei ohne Fütterung der Legehennen mit Thymianextrakt detektiert werden (Vergleiche Chromatogramme Abbildung 54 und Abbildung 55).**

Zum Ende der Arbeit stand mit der Silberionenchromatographie eine HPLC-Methode zur Verfügung, die es ermöglichte, die Piperinisomere basisliniengetrennt zu untersuchen. Exemplarisch wurden Eigelbproben nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt mit dieser Methode untersucht.

Hierzu wurde zunächst das Methanol/Acetonitril-Eluat nach der in Kapitel 5.1.1.1 beschriebenen Eigelbaufarbeitung für die HPLC-Analyse eingesetzt. Bei Einsatz dieser Lösung wurde jedoch kein auswertbares Chromatogramm erhalten. Vermutlich ist dies auf das Lösungsmittel Methanol/Acetonitril zurückzuführen.

Daher wurde das Methanol/Acetonitril-Eluat durch einen Stickstoffstrom von dem Lösemittel befreit und die Probe in n-Hexan aufgenommen. Die erhaltene Lösung konnte problemlos analysiert werden. Da das Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 340 nm aufgenommen wurde, wurden p-Cymen-2,3-diol und Thymol aufgrund der fehlenden Absorption in diesem Wellenlängenbereich nicht detektiert.



**Abbildung 60:** Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt (Zusatz 1,68 %), HPLC-Trennung auf Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm.

1 = Chavicin, 2 = Isopiperin, 3 = Isochavicin, 4 = Piperin

Die Verteilung der Isomere zeigt, daß Chavicin in geringster Konzentration im Eigelb enthalten ist und die Isomere Isopiperin, Isochavicin und Piperin in nahezu gleicher Konzentration im Eigelb enthalten sind. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Untersuchungsergebnis des Eigelbes an RP-18 als Säulenmaterial überein. Die geringfügigen Unterschiede im Isomerisierungsmuster sind auf die unterschiedlichen Wellenlängen bei der UV-Detektion zurückzuführen (Chromatographie an ODS-Hypersil: UV-Detektion bei 240 nm, Silberionenchromatographie: UV-Detektion bei 340 nm).

Piperin ist eine photosensible Substanz und isomerisiert unter Lichteinwirkung in die *cis-trans*-Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin (vergleiche Kapitel 2.3.5 und 5.4.1). Es wurde daher überprüft, ob die nachgewiesenen Isomere ausschließlich durch einen Stoffwechselfvorgang gebildet wurden oder ob eine Isomerisierung während der Fütterung oder der Aufarbeitung erfolgt ist.

Hierzu wurde Futter mit Thymianextrakt versetzt und wie bei den Fütterungsversuchen in der Geflügelklinik gelagert und beleuchtet (tägliche Beleuchtungsdauer 14 Stunden bei 1000 lx). Täglich wurden Futterproben genommen und das Futter durchmischt, wie es der täglichen Futterentnahme bei den Hühner entsprach. Selbst nach einer Versuchsdauer von 24 Tagen war keine Isomerisierung des Piperins in dem Futter feststellbar.

Weiterhin wurde die Futteranbietung für die Legehennen nachgestellt. Nach 24 Stunden (hiervon 14 Stunden Beleuchtungsdauer bei 1000 lx) war keine Isomerisierung des Piperins feststellbar. Auch bei der Aufarbeitung des Eigelbs fand keine Isomerisierung statt.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen (Fütterung und Aufarbeitung) fand keine Isomerisierung des Piperins statt. Erklärbar ist dies durch die Eigenfärbungen des Extraktes und des Eigelbes, die durch Absorption eine Isomerisierung des Piperins verhindern. Die Isomerisierung läßt sich damit auf Stoffwechselfvorgänge in der Legehenne zurückführen.



### 5.3.4.2 Untersuchung von Eiklar

Die zwölf Tage nach Beginn der Fütterung mit Gewürzextrakt erhaltenen Eiklarproben wurden nach der unter 5.1.1.2.3 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels HPLC und elektrochemischer sowie UV-Detektion untersucht. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 240 nm detektiert, um das Ergebnis dieser Untersuchungen mit den Ergebnissen der Eigelbuntersuchung direkt vergleichen zu können. Insgesamt wurden fünf Eiklarproben untersucht.

Nach der Fütterung unter Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt konnten p-Cymen-2,3-diol und Thymol im Eiklar nicht nachgewiesen werden. Die gleichzeitige UV-Detektion der Proben ergab jedoch, daß das ebenfalls im Thymianextrakt enthaltene Piperin im Eiklar nachzuweisen war. Außerdem konnten auch hier – wie im Eigelb – die Piperinisomere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 61). Im Eiklar von Legehennen deren Futter nicht mit Thymianextrakt dotiert worden war, konnten erwartungsgemäß weder Piperin noch die Piperinisomeren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 62).

Die UV-Detektion bei 240 nm ergab weiterhin, daß die nativ im Eigelb vorkommenden Substanzen (siehe Kapitel 5.3.4.1) im Eiklar nicht detektiert werden konnten.

Die Konzentration von Piperin und den Piperinisomeren im Eiklar ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

Zusatz von Thymianextrakt [%]	Konzentration im Eiklar [µg/g]		Übergang vom Futter in das Eiklar <sup>14</sup> [%]	
	Piperin	Isomere, gesamt	Piperin	Isomere, gesamt
1,68	0,115	1,017	0,0068	0,060

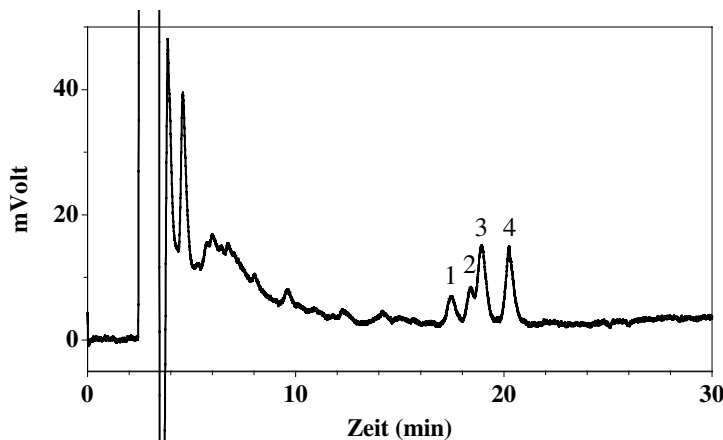
*Tabelle 15: Piperin und Piperinisomere: Konzentration und Übergang in Eiklar nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.*

Wie bereits beim Eigelb konnten im Eiklar außer Piperin auch Chavicin, Isopiperin und Isochavicin nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Isomere gehen 0,06 % des dem Futter zugesetzten Piperins in das Eiklar über. Das Ergebnis dieser Untersuchung entspricht der Erwartung, daß Piperin und die Isomere aufgrund ihrer Fettlöslichkeit bevorzugt in das Eigelb und weniger in das Eiklar eingelagert werden.

<sup>14</sup>Zur Berechnung des Überganges der untersuchten Substanz wurde die im Eiklar gefundene Menge ins Verhältnis mit der von dem Huhn täglich aufgenommenen Menge gesetzt. Der Berechnung wurde ein mittleres Eiklargeteicht von 36 g zugrundegelegt. Des weiteren wurde die Wiederfindungsrate bei der Probenaufarbeitung berücksichtigt. Die Berechnung erfolgt somit nach folgender Formel:

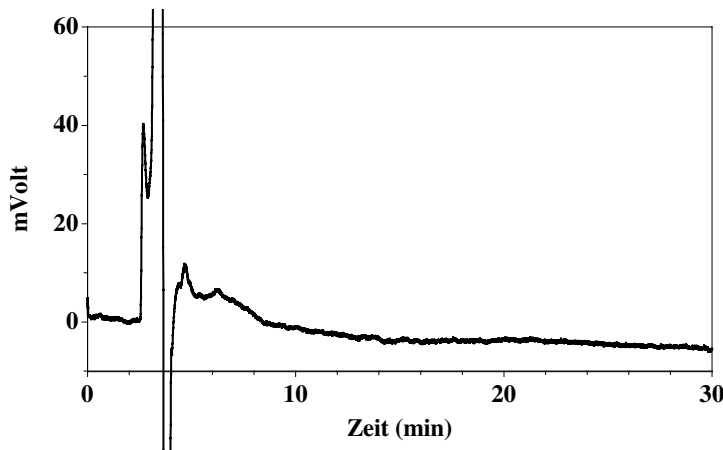
$$\text{Übergang [\%]} = \frac{\text{Konzentration im Eiklar} \times \text{mittleres Eiklargeteicht}}{\text{Konzentration im Futter} \times \text{tägliche Futtermenge} \times \text{Wiederfindungsrate}}$$

Das Verhältnis der Piperinisomere im Eiklar unterschied sich von der Zusammensetzung im Eigelb (siehe Kapitel 5.3.4.1). Das Eiklar enthielt die Isomere in einem Verhältnis von 11 % Piperin, 11 % Chavicin, 42 % Isopiperin und 36 % Isochavicin.



*Abbildung 61: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm.*

*RT Piperin (1) 17,64 min, RT Chavicin (2) 18,51 min, RT Isopiperin (3) 19,04 min, RT Isochavicin (4) 20,38 min*



*Abbildung 62: Eiklar von Legehennen, ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm.*

*Blindprobe zu Abbildung 61.*

### 5.3.4.3 Untersuchung von Legehennenblut

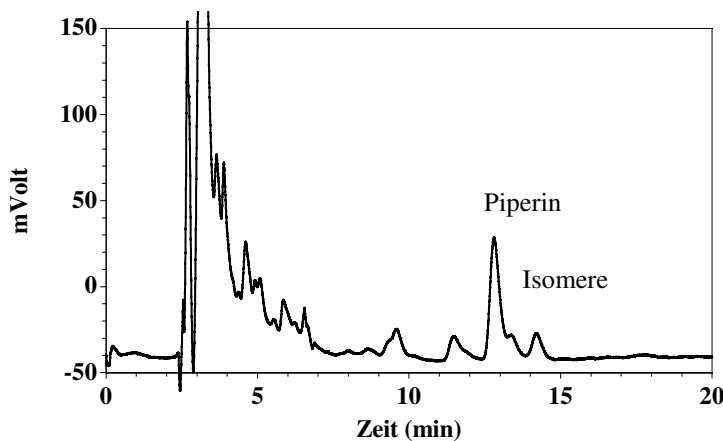
Zwei Legehennen aus dem Fütterungsversuch mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt und zwei Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt wurden zum Ende der Behandlungsperiode an der Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover sezziert. Das bei der Sektion entnommene Blut wurde chromatographisch untersucht. Dazu wurde bei der Sektion der mit Thymianextrakt gefütterten Legehennen Blutplasma für die HPLC-Untersuchung gewonnen. (Zur Aufarbeitung siehe Kapitel 6.10.2, die erhaltenen Proben wurden je zweimal mittels HPLC untersucht.)

In dem Blutplasma der mit piperinhaltigem Thymianextrakt gefütterten Legehennen findet man Piperin und die Piperinisomeren wieder (siehe Abbildung 63). In den untersuchten Blutproben zeigt sich, daß vor allem Piperin im Blut enthalten war. In den untersuchten Plasmaproben der Legehennen, deren Futter nicht mit Thymianextrakt dotiert worden war,

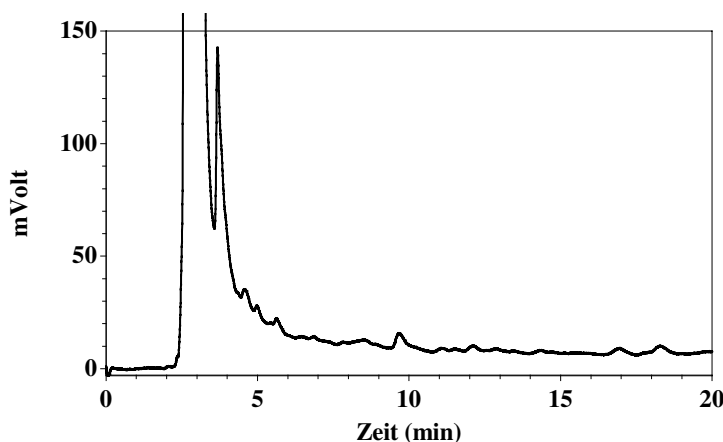
konnten erwartungsgemäß kein Piperin und keine Piperinisomeren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 64).

Für die Bestimmung der Gewürzinhaltstoffe im Blutplasma wurde keine statistische Absicherung der Versuchsbedingungen durchgeführt. Der Gehalt an Piperin und den Isomeren im Blutplasma der beiden untersuchten Legehennen lag bei 13 µg/mL.

Um das Säulenmaterial der verwendeten HPLC-Säule (ODS-Hypersil 250 x 4,6 mm) vor eventuellen Verunreinigungen zu schützen, wurde für die HPLC-Trennung die „alte“ Säule ODS-Hypersil (250 x 4 mm) verwendet. Mit dieser Säule konnte jedoch keine vollständige Antrennung der Piperinisomere erreicht werden.



*Abbildung 63: Plasma Legehennenblut nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. RT Piperin 12,80 min  
Da die Trennung mit Hilfe der Säule ODS-Hypersil (250 x 4 mm) erfolgte, konnte keine vollständige Auftrennung in die 4 Isomere erzielt werden.*



*Abbildung 64: Plasma Legehennenblut ohne Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. Blindprobe zu Abbildung 63*

#### 5.3.4.4 Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen

Anknüpfend an die Versuche zur Bioverfügbarkeit sollten Effekte von Piperin auf humane Magen- und Leberzellkulturen untersucht werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob die verwendeten Substanzen von den Zellen aufgenommen werden und ob eventuell auch in diesem Fall eine Isomerisierung von Piperin erfolgt.

Menschliche Magen- und Leberzellen wurden mit einem Medium, das Piperin bzw. Pfefferextrakt in verschiedenen Konzentrationen enthielt, inkubiert. Eine detaillierte Beschreibung

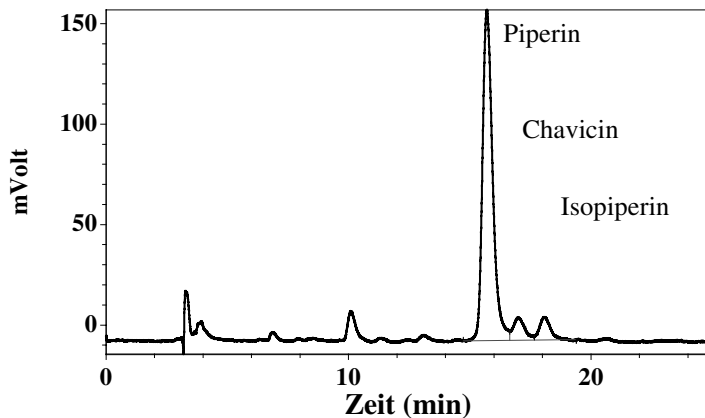
der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.11 wiedergegeben. Jede erhaltene Probe (Medium und Isolate) wurde je zweimal mittels HPLC untersucht.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Medium wurden das Medium, die Zellwandbestandteile und das Cytosol untersucht und miteinander verglichen. Als Vergleichsprobe wurde parallel zu den Versuchen reines Medium mit Piperin bzw. Pfefferextrakt, aber ohne den Zusatz von Zellen ebenso gelagert und anschließend analysiert.

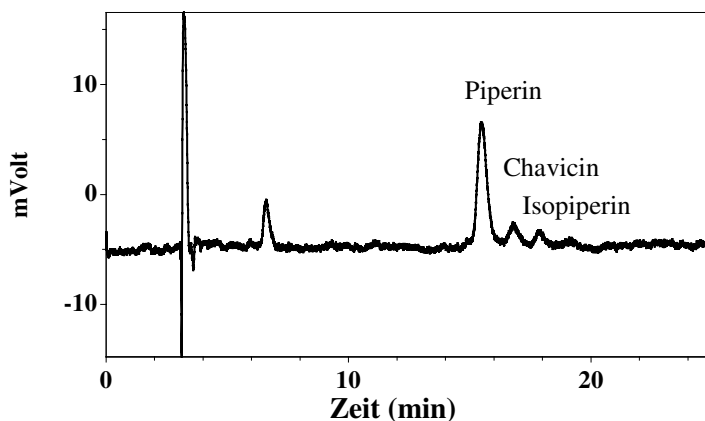
In den Vergleichsproben konnte keine Isomerisierung von Piperin festgestellt werden. In den untersuchten Lösungen mit humanen Magen- und Leberzellen konnten für beide Zelllinien Piperin sowohl in dem Mediumüberstand, in dem Isolat Zellwand und dem Isolat Cytosol nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von Thymol und Rosmarinextrakt konnten Stoffwechselprodukte nachgewiesen werden. Als Stoffwechselprodukte von Piperin konnten die Isomere Chavicin und Isopiperin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 65 und Abbildung 66). Isochavicin wurde nicht detektiert.

Die Untersuchung der Vergleichsprobe belegt, daß es sich bei der Isomerisierung um einen Stoffwechselvorgang und nicht um eine photochemische Reaktion handelte.

Bei dem Vergleich der beiden Zelllinien konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Auffallend war, daß in allen untersuchten Lösungen unabhängig von der dotierten Konzentration und der dotierten Substanz (Piperin oder Pfefferextrakt) kein Isochavicin nachzuweisen war. Allen untersuchten Lösungen gemeinsam war, daß bei abnehmender Piperin- und Pfefferextraktkonzentration der Isomerisierungsgrad der Lösungen stieg. So konnte im Cytosol von Magenzellen ein Isomerenverhältnis von bis zu 78 % Piperin, 14 % Chavicin und 8 % Isopiperin bestimmt werden. Auch im Cytosol von Leberzellen konnte ein Isomerenverhältnis von bis zu 78 % Piperin, 11 % Chavicin und 11 % Isopiperin bestimmt werden. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, daß die optimale Konzentration für Stoffwechselvorgänge diejenige ist, die die Zellen gerade nicht mehr absterben läßt. Die Konfluenz der Zellen, die mit Piperin und Pfefferextrakt behandelt wurden, zeigte, daß die dotierte Konzentration teilweise über der wirklich optimalen Substratkonzentration lag. Isochavicin scheint daher bei den Stoffwechselvorgängen nicht gebildet oder sofort weiter verstoffwechselt zu werden. Die Ursache für die Diskriminierung von Isochavicin konnte im Rahmen dieser Arbeit letztlich nicht geklärt werden.



*Abbildung 65: Isolat Cytosol nach Behandlung von humanen Leberzellen mit Pfefferextrakt [906 µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm. Zellen weisen einen geringeren Isomerisierungsgrad von Piperin auf.*



*Abbildung 66: Isolat Cytosol nach Behandlung von Magenzellen mit Piperin [93,2 µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm. Zellen weisen einen höheren Isomerisierungsgrad von Piperin auf.*

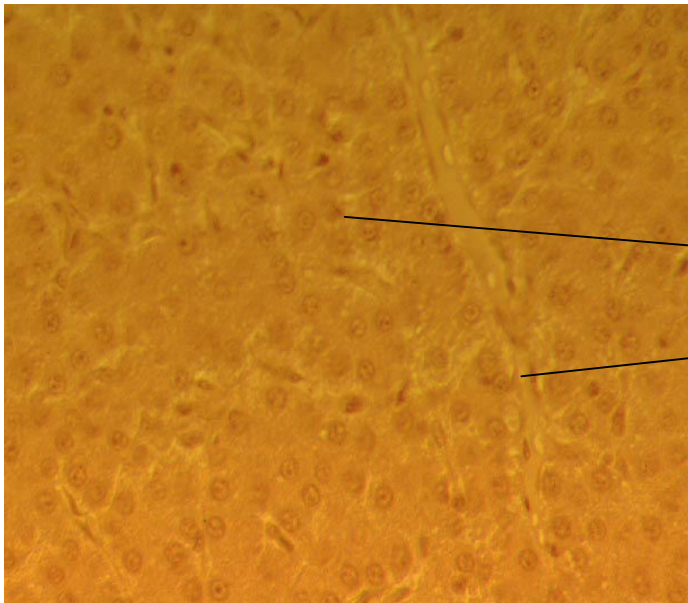
### 5.3.5 Pathologische Untersuchung von Legehennen

Um einen Einfluß der Thymianextraktfütterung auf Veränderungen der Gesundheit der Legehennen zu untersuchen, wurde eine klinische und histologische Untersuchung auf pathologische Veränderungen der Legehennen durchgeführt. Hierzu wurden zwei Legehennen aus dem Fütterungsversuch mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt und zwei Legehennen ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt zum Ende der Behandlungsperiode an der Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover seziiert. Dabei wurden vornehmlich solche Organe untersucht, bei denen am ehesten mit einer pathologischen Veränderung zu rechnen ist (Leber, Niere, Lunge) (Eine kurze Funktionsbeschreibung der untersuchten Organe ist in Kapitel 5.2.7 wiedergegeben.).

Die Untersuchung ergab, daß der Ernährungszustand aller Tiere gut und reichlich Bauchhöhlenfett vorhanden war. Die Leber war - Legehennen entsprechend - hellbraun gefärbt. Veränderungen an den Organen waren nicht erkennbar.

Sowohl aufgrund des klinischen als auch des pathologisch-anatomischen Bildes lagen keinerlei Anhaltspunkte für eine gesundheitliche Beeinträchtigung der Tiere vor.

Bei der Sektion wurden Proben von Leber, Niere und Lunge der Legehennen für eine histologische Untersuchung entnommen.

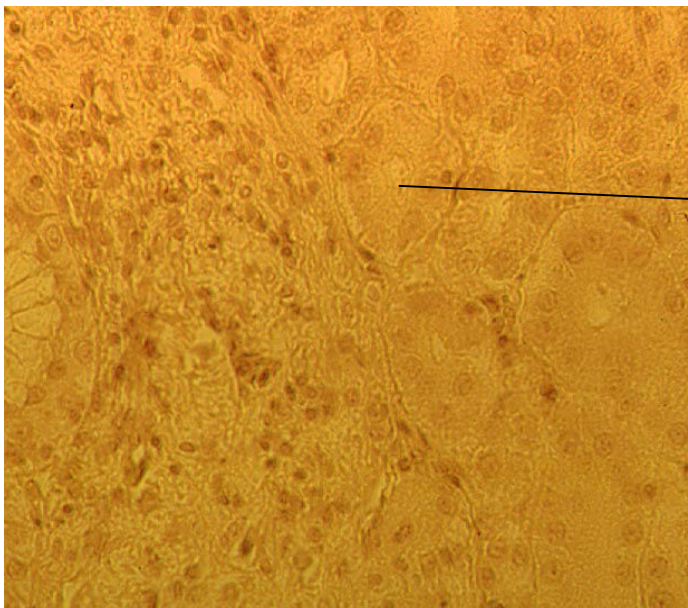


**Abbildung 67: Leber nach Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt. (Hämalaun-Eosin-Färbung), Vergrößerung 400fach**

*große, eckige Zellen mit runden Kernen*

*Gallengang*

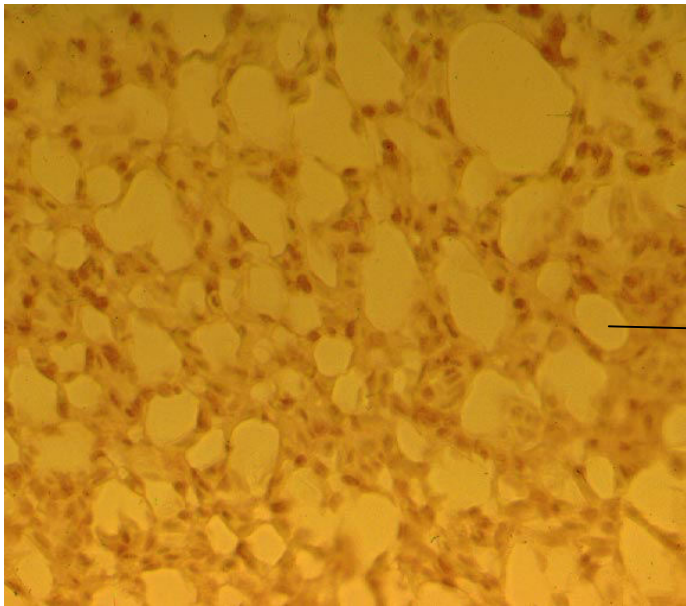
↔  
10 µm



**Abbildung 68: Niere nach Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt. (Hämalaun-Eosin-Färbung), Vergrößerung 400fach**

*Querschnitt durch das Hauptstück des Nierenkanälchensystems. Die Zellen besitzen eine Streifung der Zelloberfläche und innerhalb des Cytoplasmas eine grobe Streifung der Zellbasis.*

↔  
10 µm



*Abbildung 69: Lunge nach  
Fütterung mit 1,68 %  
Thymianextrakt.  
(Hämalaun-Eosin-Färbung),  
Vergrößerung 400fach*

Alveole

↔  
10 µm

Zur histologischen Untersuchung wurde eine histochemische Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer durchgeführt (siehe Kapitel 6.9). Es wurden Leber, Nieren und Lungen der Kontrollegehennen und der mit Thymianextrakt gefütterten Legehennen untersucht.

Die oben dargestellten Abbildungen zeigen Leber-, Nieren- und Lungenpräparate von den mit Thymianextrakt gefütterten Legehennen.

Abbildung 67 zeigt ein Leberpräparat mit den für die Leber typischen, großen, eckigen Zellen mit runden Kernen. Weiterhin ist als rinnenartiger Spalt ein Gallengang sichtbar.

Abbildung 68 zeigt einen Querschnitt durch das Hauptstück des Nierenkanälchensystems. Die Zellen besitzen eine Streifung der Zelloberfläche und innerhalb des Cytoplasmas eine grobe Streifung der Zellbasis.

Abbildung 69 zeigt ein Lungenpräparat. Sichtbar sind in der Abbildung Alveolen, die sich in ihrem Durchmesser um das dreifache unterscheiden können.

Histologisch konnten keinerlei Veränderungen in den Leber-, Nieren- und Lungenpräparaten nachgewiesen werden. Die vereinzelt kleineren Herde lymphozytärer Zellen waren in der festgestellten Anzahl und Größe als normal bei Geflügel anzusehen.

Unter Einbeziehung des klinischen Bildes, des Sektionsbefundes und der histologischen Untersuchung waren die untersuchten Tiere als gesund anzusehen.

## 5.4 Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin und Bestimmung der Halbstufenpotentiale der Piperinisomere

### 5.4.1 Untersuchungen zur Isomerisierung von Piperin

Piperin ist eine photosensible Substanz, die sich bei Belichtung in die *cis/trans*-Isomere umlagert. Untersuchungen von Glasl zur Isomerisierung des Piperins in Chavicin und in die als Summe erfaßten *cis/trans*-Isomere Isopiperin und Isochavicin zeigen, daß sowohl die Isomerisierungsgeschwindigkeit als auch das Verhältnis der Isomere zueinander lösungsmittelabhängig sind. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit kann durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe im Vergleich zu einer Tageslichtlampe erhöht werden, ohne daß sich dabei das Verhältnis der Isomere in der untersuchten Lösung ändert [Glasl (1984)].

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten HPLC-Methoden konnten die vier Isomere durch HPLC-Trennung einzeln erfaßt werden. Unterschiede im Isomerisierungsgrad, vor allem für die nun getrennt analysierbaren Isomere Isopiperin und Isochavicin, konnten damit eindeutig bestimmt werden. Es war daher von Interesse, die Vorgänge der Isomerisierung näher zu untersuchen.

Die Isomerisierung wurde in Acetonitril und n-Hexan untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Piperinlösungen (10 µg Piperin/mL Acetonitril und 10 µg Piperin/mL n-Hexan) mit einer UV-Lampe (366 nm, 330 lx) 4 Stunden bestrahlt. In Abständen von 15 min bis zu einer Stunde wurden Proben gezogen und mittels reversed-phase-HPLC (Acetonitrillösung) und Silberionenchromatographie (n-Hexan-Lösung) durch UV-Detektion bei 340 nm analysiert.

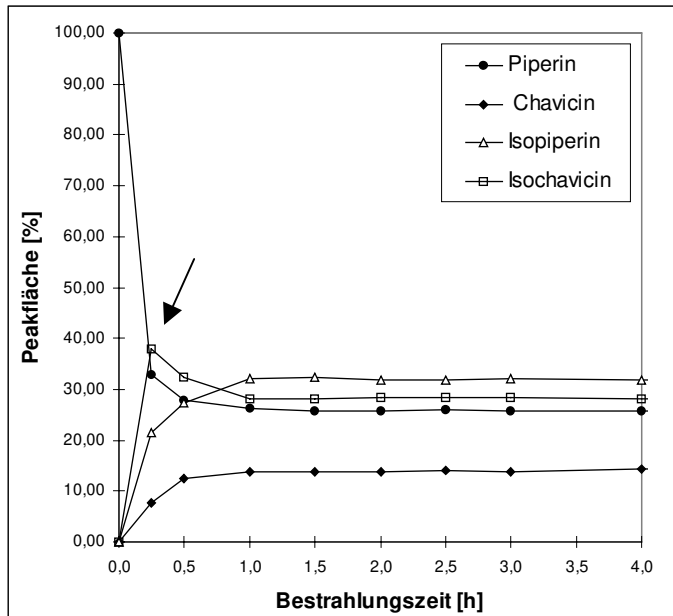
Bei der Bestrahlung einer Lösung von Piperin in Acetonitril bzw. n-Hexan fand ein Abbau von Piperin zugunsten der *cis/trans*-Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin statt. Nach einer Bestrahlungszeit von einer Stunde wurde sowohl in der Acetonitril- als auch in der n-Hexan-Lösung das photostabile Gleichgewicht erreicht. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit war damit unter den gewählten Versuchsbedingungen lösungsmittelunabhängig. Die Isomerenzusammensetzung der beiden Lösungen zeigte hingegen Unterschiede auf, wie der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen ist.

	Piperin [%]	Chavicin [%]	Isopiperin [%]	Isochavicin [%]
Acetonitril	25,5	13,6	31,9	29,0
n-Hexan	29,6	17,3	41,6	11,5

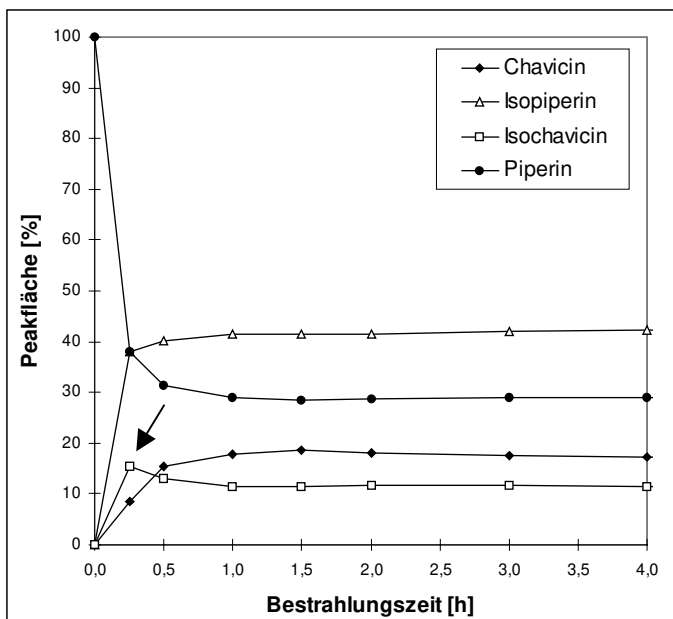
**Tabelle 16: Zusammensetzung der Isomere Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin im photostabilen Gleichgewicht in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.**



Sowohl bei der Isomerisierung in Acetonitril als auch in n-Hexan durchlief der Gehalt an Isochavicin ein Maximum, welches sich im weiteren Verlauf der Bestrahlung wieder abbaute. Damit verlief die Isomerisierung von Piperin zu Isochavicin am schnellsten und zu Beginn der Isomerisierung stellte sich ein kinetisch bestimmtes Isomerenverhältnis ein. Nach hinreichend langer Bestrahlungsdauer wurde das photochemische Gleichgewicht erreicht.



**Abbildung 70:** Isomerisierung von Piperin in Acetonitril und Bildung der Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Beleuchtungsdauer.



**Abbildung 71:** Isomerisierung von Piperin in n-Hexan und Bildung der Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Beleuchtungsdauer.

### 5.4.2 Bestimmung der Halbstufenpotentiale

Das Halbstufenpotential bzw. Halbwellenpotential ist definiert als das Potential, bei dem die Signale in der Sigmoidkurve den Wendepunkt erreichen [Christen (1990)].

Erstmalig gelang mit der neuen HPLC-Methode eine Trennung aller vier Isomere an einer RP-Phase. Dadurch lassen sich nun die Halbstufenpotentiale dieser Substanzen bestimmen. Hierzu wurde eine Lösung von Piperin mit 1 µg/mL bis zum photostabilen Gleichgewicht bei Bestrahlung unter einer UV-Lampe bei 366 nm isomerisiert, über HPLC getrennt und mit dem elektrochemischen Detektor untersucht.

Das höchste Meßsignal wurde jeweils gleich 100 % gesetzt. Die gemessenen Werte gegen eine Ag/AgCl-Elektrode wurden als Meßsignal in % gegen die gewählte Potentialspannung aufgetragen. Als Meßabstände wurden 50-100 mV gewählt.

Die Halbstufenpotentiale der 4 Isomere liegen über 1000 mV und weisen damit auf eine niedrige Oxidationsbereitschaft hin. Die Halbstufenpotentiale sind für die Substanzen sehr ähnlich und stellen keine selektive Unterscheidungsmöglichkeit für die Isomere dar. Man erhält als Halbstufenpotential für Piperin 1040 mV, für Chavicin 1050 mV, für Isopiperin 1040 mV und für Isochavicin 1070 mV (siehe Abbildung 72).

Die elektrochemische Detektion der Isomerenstandardlösung zeigte in der Größenordnung die gleiche Nachweisgrenze wie die UV-Detektion. Die Selektivität der elektrochemischen Detektion nimmt mit Erhöhung der angelegten Potentialspannung ab. Gleichzeitig erhöht sich die Nachweisgrenze der untersuchten Substanzen. Da die elektrochemische Bestimmung von Piperin und den Piperinisomeren gegenüber der UV-Detektion keinen Vorteil aufwies, wurde die UV-Detektion zur Untersuchung dieser Substanzen beibehalten.

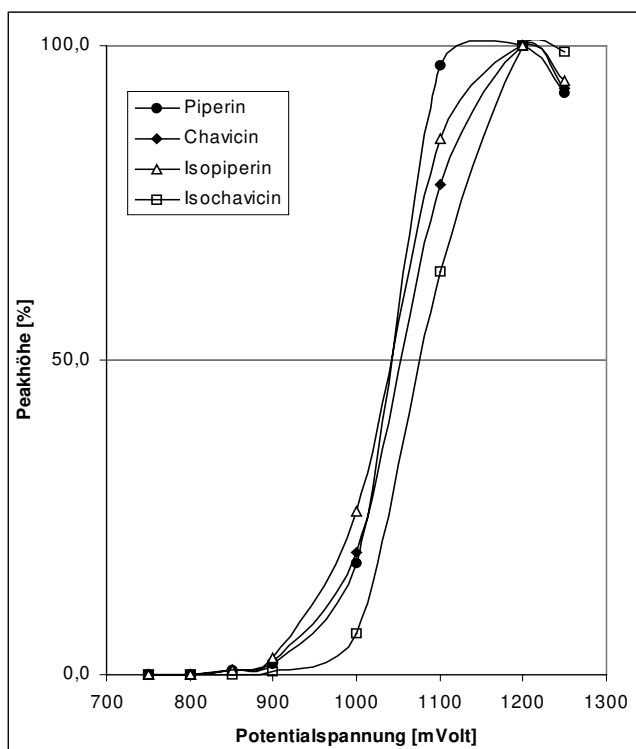


Abbildung 72: Halbstufenpotentiale von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin.

## 5.5 Sensorische Untersuchung der Eier aus den Fütterungsversuchen

### 5.5.1 Ziel

Die Inhaltsstoffe von Rosmarin und Thymian sind im Hühnerei nachweisbar. Bereits ein Zusatz von 1-2 % der untersuchten Extrakte zu einem Lebensmittel führt zu einer sehr bitteren Geschmacksnote. Es ist daher möglich, daß die Substanzen eine Geschmacksveränderung bei den Eiern hervorrufen. Ein Übergang von anderen aromagebenden Komponenten der untersuchten Gewürzextrakte in das Ei wurde chromatographisch nicht untersucht. Eine erste Abschätzung des Überganges von den Aromakomponenten der Gewürzextrakte kann mit Hilfe dieser sensorischen Untersuchung gegeben werden.

Eine geruchliche Veränderung der Eier aus der Behandlungsperiode konnte während der Eiaufarbeitung bei keinem der Fütterungsversuche festgestellt werden. Eine Veränderung der Zusammensetzung der Eier nach Fütterung mit Gewürzextrakten wurde daher nur in sehr geringem Umfang erwartet. Deshalb wurde ein sensorisches Testverfahren gewählt, welches ermöglichte, auch geringe Unterschiede in den vorgelegten Proben zu erkennen.

### 5.5.2 Theorie

Die Untersuchung wurde nach dem sensorischen Prüfverfahren DIN 10951 durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Dreiecksprüfung bzw. um den sogenannten Triangeltest.

Der Triangeltest stellt eine der Möglichkeiten dar, sensorische Unterschiede bzw. Übereinstimmungen zwischen zwei Proben oder einer Reihe von Probenpaaren festzustellen. Er wird vorteilhaft zur Feststellung der Anwesenheit bzw. Abwesenheit besonders geringer sensorischer Unterschiede eingesetzt.

Bei der Prüfung werden drei Proben in einer Dreiergruppe (Triangel) vorgelegt, üblicherweise mehrere Triangeln nacheinander.

In jedem Probenpaar werden Kontrollproben (K) und Analysenproben (A) eingesetzt. Die Proben sollen nach einem Zufallssystem alle möglichen Anordnungen erfahren, sowohl innerhalb der Triangeln (Verteilungsmöglichkeiten 2A+1K und 2K+1A) als auch in einer Triangelreihe (Stellmöglichkeiten A-A-K, A-K-A, K-A-A, K-K-A, K-A-K, A-K-K).

Durch das Aufstellen der Proben im Dreieck wird die Zufälligkeit der Anordnung besser sichtbar gemacht. Weiterhin erfährt die erste Probe der Triangel keine unbewußt intensivere Ansprache [Kiermeier (1972)].

Jede Prüfperson prüft jede Dreier-Probengruppe (mehrfaches Prüfen ist zulässig) und bestimmt die Probe, bei der sie gegenüber den anderen beiden Proben einen Unterschied feststellt. Die Nummer der abweichenden Probe wird in ein dem Zweck der Prüfung entsprechendes Formular eingetragen.

Bei der statistischen Auswertung werden die Einzelurteile zusammengefaßt. Jede Antwort auf die Frage nach der abweichenden Probe wird durch den Prüfungsleiter in „richtig“ oder „falsch“ umgesetzt. Danach wird die Anzahl der richtigen und die Anzahl der falschen Antworten ermittelt. Die Antwort „kein Unterschied feststellbar“ gilt als „falsch“.

Die Prüfergebnisse werden mit Hilfe der Binomialverteilung statistisch ausgewertet.

In bestimmten Fällen kann es zweckmäßig sein, die einfache Dreiecksprüfung zu erweitern. Nachdem ein Unterschied festgestellt ist, geht es darum den Unterschied zu charakterisieren, die Intensität des Unterschiedes zu bestimmen und/oder die Bevorzugung zu ermitteln.

Die statistische Auswertung erfolgt zunächst wie bei der einfachen Dreiecksprüfung. Die zusätzlichen Angaben, richtige Beantwortung der Fragen bei der einfachen Dreiecksprüfung vorausgesetzt, werden nach der Tabelle für die Signifikanz bei der paarweisen Unterschiedsprüfung (DIN 10954) ausgewertet.

### **5.5.3 Durchführung und Auswertung der sensorischen Untersuchung**

#### **5.5.3.1 Eier aus Fütterungsversuchen mit Thymianextrakt**

15 Prüfpersonen wurden Eier aus dem Fütterungsversuch mit Thymianextrakt zur Beurteilung vorgelegt. Es handelte sich bei den vorgelegten Proben um Eier, die für die jeweilige Fütterung die maximale Konzentration an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen enthielten. Für die sensorische Untersuchung wurden Eier des 13., 15. bzw. 19. Fütterungstages verwendet.

Bei den Prüfpersonen handelte es sich vorwiegend um Lebensmittelchemiker und Lebensmitteltechnologe.

Als Prüfgut wurde den Prüfpersonen Eiklar bzw. Eigelb (10 Minuten in siedendem Wasser gekocht) in insgesamt vier Dreier-Probengruppen vorgelegt. Eiklar und Eigelb wurden voneinander getrennt und getrennt verkostet.

Das Prüfgut wurde in einem Dreieck angeordnet, um eine intensivere Ansprache des ersten Prüfgutes auszuschließen.

EiV1: Eier aus Versuchsreihe 1; Fütterung mit Zusatz von 1 % Öl zum Legehennenmehl

EiV2: Eier aus Versuchsreihe 2; Fütterung mit Zusatz von 11,2 g Thymianextrakt/kg Legehennenmehl

EiV3: Eier aus Versuchsreihe 3, Fütterung mit Zusatz von 16,8 g Thymianextrakt/kg Legehennenmehl

	Verteilung	Verschlüsselung	abweichende Probe	richtige Antworten	falsche Antworten	Bevorzugung Einzelprobe	Bevorzugung Doppelprobe
Eiklar	EiV2/EiV2/EiV1	622/968/439	439	4	11	3	2
Eigelb	EiV2/EiV1/EiV2	301/082/564	082	10	5	4	6
Eiklar	EiV3/EiV1/EiV1	608/710/458	608	6	9	3	3
Eigelb	EiV3/EiV1/EiV1	127/050/576	127	9	6	6	2

*Tabelle 17: Sensorische Untersuchung von Eiern nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt.*

Aufgrund der vorliegenden Daten kommt man nach der statistischen Auswertung zu folgendem Ergebnis:

Das Eiklar aus den Fütterungsversuchen ist nicht signifikant von dem Eiklar aus dem Blindversuch zu unterscheiden.

Das Eigelb aus den Fütterungsversuchen kann von dem Eigelb aus dem Blindversuch signifikant unterschieden werden (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ). Wenngleich der Geschmacksunterschied signifikant festgestellt werden konnte, wurde von den Versuchspersonen kein Pfeffer- oder Thymianaroma im Eigelb wahrgenommen. Der Geschmack des Eigelbes war immer noch typgerecht.

Bezüglich der Bevorzugung der Einzel- bzw. der Doppelprobe lassen die Daten keine signifikante Aussage zu.

### 5.5.3.2 Eier aus Fütterungsversuchen mit Rosmarinextrakt

16 Prüfpersonen wurden Eier aus dem Fütterungsversuch mit Rosmarinextrakt zur Beurteilung vorgelegt. Es handelt sich bei den vorgelegten Proben um Eier, die für die jeweilige Fütterung die maximale Konzentration an antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen enthalten sollten. Für die sensorische Untersuchung wurden Eier des 15. Fütterungstages verwendet.

Bei den Prüfpersonen handelte es sich vorwiegend um Lebensmittelchemiker und Lebensmitteltechnologe.

Als Prüfgut wurde den Prüfpersonen Eiklar bzw. Eigelb (10 Minuten in siedendem Wasser gekocht) in insgesamt vier Dreier-Probengruppen vorgelegt. Eiklar und Eigelb wurden voneinander getrennt und getrennt verkostet.

Das Prüfgut wurde in einem Dreieck angeordnet, um eine intensivere Ansprache des ersten Prüfgutes auszuschließen.

EiV1: Eier aus Versuchsreihe 1; Fütterung mit Zusatz von 1 % Öl zum Legehennenmehl

EiV2: Eier aus Versuchsreihe 2; Fütterung mit Zusatz von 2,86 g Rosmarinextrakt/kg Legehennenmehl

EiV3: Eier aus Versuchsreihe 3, Fütterung mit Zusatz von 5,71 g Rosmarinextrakt/kg Legehennenmehl

	Verteilung	Verschlüsselung	abweichende Probe	richtige Antworten	falsche Antworten	Bevorzugung Einzelprobe	Bevorzugung Doppelprobe
Eiklar	EiV1/EiV1/EiV2	581/175/346	346	1	15	1	-
Eigelb	EiV1/EiV2/EiV1	927/192/537	192	6	10	2	4
Eiklar	EiV3/EiV3/EiV1	438/721/280	280	6	10	2	4
Eigelb	EiV1/EiV3/EiV3	598/977/459	598	6	10	4	2

*Tabelle 18: Sensorische Untersuchung von Eiern nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt.*

Das Eiklar aus dem Fütterungsversuch 1 ist signifikant nicht von dem Eiklar aus dem Blindversuch zu unterscheiden (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ).

Bei den anderen drei Versuchsreihen kann keine signifikante Aussage zur Unterscheidungsmöglichkeit getroffen werden.

Bezüglich der Bevorzugung der Einzel- bzw. der Doppelprobe lassen die Daten ebenfalls keine signifikante Aussage zu.

#### **5.5.4 Zusammenfassung**

Eine Geschmacksbeeinflussung von Eiern durch Fütterung der Legehennen mit Gewürzextrakten war nur in sehr geringem Maß gegeben. Lediglich das Eigelb aus dem Fütterungsversuch mit Thymianextrakt konnte von einem Kontrolleigelb signifikant unterschieden werden. Das Eigelb schmeckte allerdings nach wie vor typgerecht und hatte kein Thymian- oder Pfefferaroma. Bei allen anderen untersuchten Proben (Eiklar aus Fütterungsversuch mit Thymianextrakt, Eiklar und Eigelb aus Fütterungsversuch mit Rosmarinextrakt) konnten keine relevanten Geschmacksunterschiede festgestellt werden.

## 5.6 Aufarbeitung und HPLC-Analyse von Rahmproben nach Fütterung von Kühen mit Rosmarinextrakt

### 5.6.1 Ziel

Als vergleichende Untersuchungen zu den Fütterungsversuchen mit Legehennen wurden Fütterungsversuche mit Kühen durchgeführt. Es sollte hierbei untersucht werden, ob die Inhaltsstoffe von Rosmarinextrakt in die Milch übergehen.

Die Durchführung der Fütterungsversuche ist in Kapitel 4.2 wiedergegeben.

### 5.6.2 Methode zur Untersuchung von Rahm

Während des gesamten Fütterungszeitraumes wurden die erhaltenen Rahmproben untersucht. Insgesamt wurden 12 Rahmproben untersucht.

Zur Untersuchung wurden 10,0 g Rahm mit Methanol versetzt, homogenisiert, auf 50 °C erwärmt, in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einen Rundkolben überführt. Anschließend wurde die Methanol-extraktion des Rahmes noch zweimal wiederholt.

Die vereinigten Überstände einer Probe wurden unter Vakuum bei 60 °C auf ein Volumen von ungefähr 3 mL eingengt und mit 9 mL Wasser versetzt. Die erhaltene Lösung wurde mit einer Chromabond HR-P-Festphasenkartusche aufgereinigt. Hierzu wurde die Festphasenkartusche mit 4 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde die Festphasenkartusche mit 2 mL Wasser gereinigt, überschüssiges Wasser durch kurzes Luftdurchpusten entfernt und die gewünschten Substanzen mit 5 mL Acetonitril/Methanol (1/1) eluiert und in einem 5 mL Meßkolben gesammelt. 1,5 mL dieser Lösung wurden unter Vakuum bei 50 °C auf ein Volumen von 250 µL eingengt. Diese Lösung wurde mittels HPLC und elektrochemischer Detektion untersucht.

Durch Zusatz von Rosmarinextrakt wurde die Nachweisgrenze der Methode bestimmt:

	NWG in der untersuchten Lösung [ng/mL]		NWG im Rahm [ng/g]	
Carnosolsäure	351	± 16	29,3	± 1,4

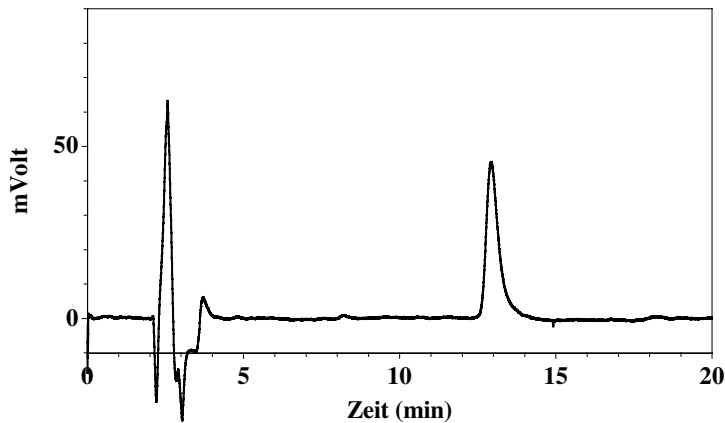
*Tabelle 19: Nachweisgrenze von Carnosolsäure in Milchrahmproben.*

### 5.6.3 Untersuchungsergebnisse

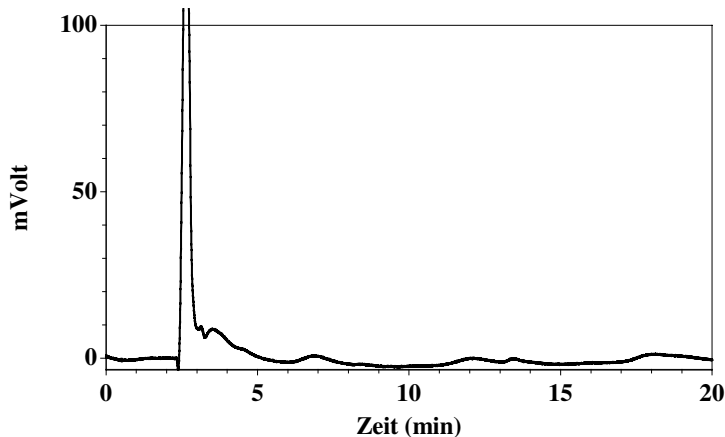
Die während des gesamten Fütterungszeitraumes erhaltenen Rahmproben wurden mittels HPLC und elektrochemischer Detektion analysiert. In den Rahmproben des Fütterungsversuches ohne Zusatz von Rosmarinextrakt konnte erwartungsgemäß keine Carnosolsäure

nachgewiesen werden (siehe Abbildung 74). In den erhaltenen Rahmproben aus den Fütterungsversuchen mit Zusatz von Rosmarinextrakt zu dem Futter konnte jedoch ebenfalls keine Carnosolsäure nachgewiesen werden (siehe Abbildung 75). Als Vergleich wird in Abbildung 73 ein HPLC-Chromatogramm eines Rosmarinextraktstandards wiedergegeben.

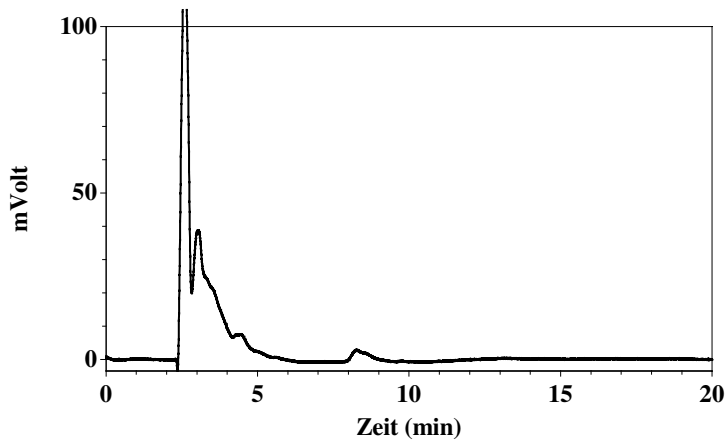
In den untersuchten Rahmproben konnte Carnosolsäure nicht nachgewiesen werden (NWG 19,5 ng/g). Damit ist der Übergang von Carnosolsäure aus dem Futter in den Rahm noch einmal deutlich geringer als der Übergang von Carnosolsäure in Eier bei der Fütterung von Legehennen unter Zusatz von Rosmarinextrakt.



**Abbildung 73:** Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemische Detektion.  
[36,0 ng Carnosolsäure]  
RT Carnosolsäure 12,95 min



**Abbildung 74:** Rahmprobe ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemischer Detektion.



**Abbildung 75:** Rahmprobe nach Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemischer Detektion.



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeine Angaben

Prozentangaben beziehen sich auf Gewichtsprozente. Mischungsverhältnisse von Lösungsmitteln sind volumenbezogen.

Die Standardabweichung ist ein Maß dafür, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert (Durchschnitt) streuen. Die Standardabweichung wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}, \quad \begin{array}{l} \text{mit } n = \text{Zahl aller Meßwerte} \\ \text{und } x = \text{einzelne Meßwerte.} \end{array}$$

Die Kalibriergerade für die untersuchten Substanzen wurde täglich neu bestimmt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden zur Ermittlung der statistischen Daten 6 Bestimmungen durchgeführt. Bei den dotierten Konzentrationen z. B. zur Bestimmung von Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, wurde der angegebene Bereich durch die Proben in regelmäßigen Abständen abgedeckt.

Gehalts- und Konzentrationsbestimmungen der untersuchten Proben wurden mindestens in Doppelbestimmungen bestimmt. Jede einzelne Probenlösung wurde zweimal mittels HPLC untersucht.

Die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte nach den Richtlinien des Arbeitskreises Chromatographie der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze entspricht derjenigen Konzentration des Analyten, die im Detektor gerade ein Signal ergibt, welches ein Mehrfaches des Rauschens ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Vorschrift der DIN 32645 (Mai 1994) für die Bestimmung der Nachweisgrenze ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3 und für die Bestimmungsgrenze von 6 gewählt [Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur].

Im HPLC-Chromatogramm wurde die Peakhöhe der Substanz ermittelt und mit der dotierten Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Für das Rauschen der Basislinie wurde jeweils vor und nach dem Substanzpeak die Höhe ermittelt und der Mittelwert gebildet. Die „Konzentration des Rauschens“ wurde mittels folgender Funktion berechnet:

$$c_R = \frac{c_S \times H_R}{H_S},$$

wobei  $c_R$  die berechnete Konzentration des Rauschens,  $c_S$  die dotierte Konzentration der Substanz,  $H_R$  die Höhe des Rauschen (Mittelwert ermittelt aus Höhe Rauschen vor und nach dem Peak) und  $H_S$  die Höhe des Substanzpeaks bedeuten.

Für die Berechnung der absoluten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde das Injektionsvolumen berücksichtigt, das bei den verwendeten analytischen HPLC-Anlagen 20  $\mu\text{L}$  betrug.

## **6.1.1 Verwendete Meßgeräte**

### **6.1.1.1 HPLC mit elektrochemischer und UV-Detektion für die RP-Chromatographie**

HPLC-Pumpe (Knauer, Typ 364), Pulsationsdämpferrohr nach dem Bourdon-Prinzip, UV-Detektor (Knauer, variabler Wellenlängendetektor, Nr. 87.00), Elektrochemischer Detektor (Methrom, Typ 2.656.0020, Arbeitselektrode: Glassy carbon, Referenzelektrode: Ag/AgCl  $c_{(\text{KCl})} = 3 \text{ mol/L}$ ); Hilfselektrode: festeingebauter Goldstift in der Detektorzelle, Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ .

### **6.1.1.2 HPLC mit Diodenarraydetektion**

HPLC-Pumpe (Knauer, Typ Maxi-Star K-1000), Diodenarraydetektor (Shimadzu, Typ SPD-M10AVP), Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ .

### **6.1.1.3 Präparative HPLC mit UV-Detektion**

HPLC-Pumpe (Knauer, Typ 364 mit präparativem Pumpenkopf), UV-Detektor (Knauer, variabler Wellenlängen-Detektor), Injektionsvolumen 250  $\mu\text{L}$ , Säule Merck Lichrocart Cat. 50179 Superspher RP-18.

### **6.1.1.4 HPLC mit UV-Detektion für die Normalphasen-Chromatographie**

HPLC-Pumpe (Merck Hitachi Lachrom, L-7100), UV-Detektor (Merck Hitachi Lachrom, L-7400), Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ .

### **6.1.1.5 Massenspektrometrie**

Die EI-Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer (Spektrometer SSQ 710, Finnigan MAT) mit Particle-Beam-Interface (40 °C, 60 psi Helium-Druck) bei 70 eV im Direkteinlaß oder über direkte vorherige HPLC-Trennung aufgenommen (Quellentemperatur 250 °C). Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte über die Software ICIS Version 8.3.0. Die HPLC-Trennung erfolgte nach den in den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.3 beschriebenen Angaben. Abweichend hiervon wurde dem Eluenten weder Citronensäure noch TEAOH zugesetzt und folgende HPLC-Anlage verwendet: Pumpe W 616, Controller W 600S, Detektor: W 490E programmeble multiwavelength detector (Fa. Waters).

### 6.1.1.6 NMR-Spektrometer

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an dem Spektrometer AM-300 der Firma Bruker aufgenommen. Die Resonanzfrequenz für  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren betrug 300 MHz, für  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren 75,4 MHz.

Abweichend hiervon wurden die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin nach Isolierung an der Silberionenphase an einem Spektrometer der Fa. Bruker Avance 400 aufgenommen. Die Resonanzfrequenz für die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren betrug 400 MHz.

Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in ppm aufgeführt, die Multiplizitäten der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen wurden nach der DEPT-Methode ermittelt. Die Angaben zur Aufspaltung wurden wie folgt abgekürzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett eines Dubletts, m = Multiplett, sept = Septett, br. = breit.

### 6.1.1.7 FT-IR-Spektrometer

Das FT-IR-Spektrum von Carnosolsäure wurden an einem Bruker IFS 88 FT-IR-Spektrophotometer als Film aufgenommen.

Die FT-IR-Spektren von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin wurden an einem Paragon 1000PC-Spektrophotometer der Firma Perkin Elmer als KBr-Preßling aufgenommen.

### 6.1.1.8 UV-Lampe

Zur Isomerisierung der Piperin-Lösungen wurde eine UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 366 nm verwendet. Die Lichtstärke wurde mit einem Luxmeter bestimmt und betrug 330 lx.

## 6.1.2 Verwendete Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Acetonitril gradient grade (Merck, Nr. 100030), Methanol G Chromasolv (Riedel-de Haën, Nr. 34885), Wasser 18 M $\Omega$  (Millipore, Milli-Q PF), n-Hexan reinst (BASF-AG, für die HPLC zweimal destilliert), 20 %ige Tetraethylammoniumhydroxid (TEAOH)-Lösung in Wasser (Sigma, Nr. T 6393), Ethanol (Kraul & Wilkening u. Stelling KG, Nr. 450 mit 1 % Petrol-ether), Cyclohexan Pestanal (Riedel-de Haën, Nr. 34496), Citronensäuremonohydrat (Riedel-de Haën, Nr. 33114), Natriumsulfat wasserfrei extra rein (Merck, Nr. 1.06643.2500 getrocknet für 2 Stunden bei 450 °C), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Nr. 17-0090-01), Thymol (2-Isopropyl-5-methylphenol, Aldrich, Nr. 2019448), p-Cymen-2,3-diol (synthetisiert von Herrn Dr. Frank Hoyer, Chemisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Hannover [Surrey (1955), Gross (1963)]), Piperin (Riedel-de Haën, Nr. 63001), Seesand (Riedel-de Haën, Nr. 18648), Salzsäure 2 mol/L und Salzsäure 12,5 % (Merck, Nr. 316.2500, durch entsprechende Verdünnung hergestellt), Chromabond HR-P-Festphasenextraktionssäule (Machery-Nagel, 500 mg, Nr. 730117), Faltenfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 311645),

$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer Mannheim, Nr. 127060), Dimethylsulfoxid (Sigma, Nr. D 5879), Triethylamin (TEA) (Merck Nr. 1.08379.0250), Xylol (für die Histologie, Roth, Nr. 9713.3), Natriumheptan-1-sulfonat (Aldrich, Nr. H 8901).

Zellkulturversuche: Magenzellen (HMO2) und Leberzellen (HepG2) (Bestände von Prof. Dr. Beate Meier, Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren); Zellmedium MEM (Minimum Essential Medium) Eagle, PBS (Phosphate Buffered Saline).

	MEM Eagle	PBS
<b>Salze</b>		
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	265,00	
KCl	400,00	1,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200,00	
NaCl	6800,00	40,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	140,00	7,2
NaHCO <sub>3</sub>	3700,00 Z <sup>15</sup>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1,0
<b>Essentielle Aminosäuren</b>		
L-Isoleucin	52,50	
L-Leucin	52,50	
L-Lysin	73,06	
L-Methionin	14,90	
L-Phenylalanin	32,02	
L-Threonin	47,64	
L-Tryptophan	10,20	
L-Valin	46,90	
<b>Nicht-Essentielle Aminosäuren</b>		
L-Arginin	126,40	
L-Cystinmonohydrat	31,30	
L-Glutamin	292,30	
L-Histidin	41,90	
L-Tyrosin	36,22	
<b>Vitamine</b>		
Calcium-D-(+)-panthotenat	1,00	
Cholinchlorid	1,00	
Folsäure	1,00	
Myo-Inosit	2,00	
Nicotinamid	1,00	
Pyridoxin HCl	1,00	
Riboflavin	0,10	
Thiamin HCl	1,00	
<b>Sonstige Substanzen</b>		
D(+)-Glucose H <sub>2</sub> O	1100,00	
D(+)-Glucose H <sub>2</sub> O	3400,00 Z <sup>15</sup>	
Phenol-Rot (Na)	10,60	
Pyruvat (Na)	110,00 Z <sup>15</sup>	

*Tabelle 20: Zusammensetzung des Zellkulturmediums MEM und von PBS.*

<sup>15</sup> Z = Substanz wird dem Medium direkt vor dem Gebrauch zugegeben.

Lösungen für Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer zur histologischen Untersuchung (Durchführung der Färbung siehe Kapitel 6.9):

Hämalaunstammlösung: 1 g Hämatoxylin, 50 g  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{NaIO}_3$  in 1000 mL Aqua dest. lösen.

Chloralhydratlösung: 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure auf 100 mL auffüllen.

Hämalaungebrauchslösung: 200 mL Hämalaunstammlösung + 10 mL Chloralhydratlösung.

Eosin-Lösung: 0,33 g Eosin in 100 mL Wasser lösen.

## 6.2 Verwendete HPLC-Bedingungen

Soweit nicht anders angegeben wurden folgende HPLC-Bedingungen verwendet:

### 6.2.1 Bestimmung von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin mit RP-Chromatographie

Die Detektion von p-Cymen-2,3-diol und Thymol erfolgte mittels elektrochemischer Detektion, die Detektion von Piperin mittels UV-Detektor.

HPLC-Pumpe	Typ 364 (Knauer) mit Pulsationsdämpferrohr nach dem Bourdon-Prinzip
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{L}$
HPLC-Kartusche	ODS-Hypersil 250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße (Fa. Knauer) <sup>16</sup>
Eluent	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TEAOH}/2 \text{ mol/L Citronensäure} (48/52/0,5/0,5)$
Flußrate	0,7 mL/min
Detektor	UV-Detektor: variabler Wellenlängendetektor (Knauer), Nr. 87.00, Integratorausgang 1V/AU = Extinktion 1,0 Abs/AU Elektrochemischer Detektor: Typ 2.656.0020 (Methrom) Arbeitselektrode: Glassy carbon, Referenzelektrode: Ag/AgCl $c_{(\text{KCl})} = 3 \text{ mol/L}$ ; Hilfselektrode: festeingebauter Goldstift in der Detektorzelle
Detektion	UV-Detektor: 240, range = 0,01 Elektrochemische Detektion: Potential: + 800 mV, $i = 0,1 \mu\text{A}$
HPLC-Software	EuroChrom 2000, Version 1.2 (Knauer)

<sup>16</sup> Bei Angabe von ODS-Hypersil (250 x 4 mm) als HPLC-Kartusche wurde der Eluent  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TEAOH}/2 \text{ mol/L Citronensäure} (50/50/0,5/0,5)$  verwendet [Schwarz (1996)].

## 6.2.2 Bestimmung von Piperin mit Normalphasenchromatographie

HPLC-Pumpe	Lachrom, L-7100 (Merck Hitachi)			
Injektionsvolumen	20 µL			
HPLC-Kartusche	Chromspher Lipids 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße (Chrompack)			
Eluent A	1,5 % Acetonitril in n-Hexan			
Eluent B	Acetonitril/2-Propanol (10/90)			
Gradientenprogramm mit jeweils linearem Anstieg:	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Flußrate [mL/min]
	0	98	2	1,0
	30	90	10	1,0
	30,1	90	10	2,0
	40	80	20	2,0
Detektor	Lachrom, L-7400 (Merck Hitachi)			
Detektion	340 nm, 1AU/FS			
HPLC-Software	EuroChrom 2000, Version 1.2 (Knauer)			

## 6.2.3 Bestimmung von Carnosolsäure

HPLC-Pumpe	Typ 364 (Knauer) mit Pulsationsdämpferrohr nach dem Bourdon-Prinzip
Injektionsvolumen	20 µL
HPLC-Kartusche	ODS-Hypersil 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße (Fa. Knauer)
Eluent	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (65/35/0,3/1,0)
Flußrate	1,0 mL/min
Detektor	UV-Detektor: variabler Wellenlängendetektor (Knauer) <sup>17</sup> , Nr. 87.00, Integratorausgang 1V/AU = Extinktion 1,0 Abs/AU
	Elektrochemischer Detektor: Typ 2.656.0020 (Methrom) Arbeitselektrode: Glassy carbon, Referenzelektrode: Ag/AgCl c <sub>(KCl)</sub> = 3 mol/L; Hilfselektrode: festeingebauter Goldstift in der Detektorzelle
Detektion	UV-Detektor: 230, range = 0,01
	Elektrochemische Detektion: Potential: + 800 mV, r = 0,1µA
HPLC-Software	EuroChrom 2000, Version 1.2 (Knauer)

<sup>17</sup> Carnosolsäure wurde mittels elektrochemischer Detektion bestimmt, die UV-Detektion sollte zur Detektion von eventuell auftretenden Metaboliten, Abbauprodukten oder sonstigen Stoffwechselprodukten dienen. Mit der UV-Detektion konnten jedoch keine Ergebnisse erzielt werden.

## 6.2.4 Isolierung von Inhaltsstoffen aus den Gewürzextrakten

HPLC-Pumpe		Typ 364 (Knauer) mit präparativem Pumpenkopf
Injektionsvolumen		250 µL
HPLC-Kartusche		Lichrocart Cat. 50179 Supersher RP-18 (Merck)
Eluent	Thymian	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (48/52/0,5/0,5)
	Rosmarin	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (65/35/0,3/1,0)
Flußrate	Thymian	25,0 mL/min
	Rosmarin	30,0 mL/min
Detektor		UV-Detektor: variabler Wellenlängendetektor (Knauer)
Detektion		UV-Detektor: 230 nm
Integrator		C-R1A Chromatopac (Shimadzu)

## 6.2.5 HPLC-Trennung mit Diodenarraydetektion zur Aufnahme von UV-Spektren

HPLC-Pumpe		Typ Maxi-Star K-1000 (Knauer)
Injektionsvolumen		20 µL
HPLC-Kartusche		ODS-Hypersil 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße (Fa. Knauer)
Eluent	Thymian	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (48/52/0,5/0,5)
	Rosmarin	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/TEAOH/2 mol/L Citronensäure (65/35/0,3/1,0)
Flußrate	Thymian	0,7 mL/min
	Rosmarin	1,0 mL/min
Detektor		Diodenarraydetektor: Typ SPD-M10AVP (Shimadzu)
Detektion		200 – 400 nm
HPLC-Software		CLASS-M10A, Version 1.60 (Shimadzu)

## 6.3 Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin

### 6.3.1 HPLC-Trennung an ODS-Hypersil

Um die Linearität der verwendeten HPLC-Methode zu überprüfen, wurde eine Piperinisomerenlösung im photostabilen Gleichgewicht in verschiedenen Konzentrationen mittels HPLC und UV-Detektion bei 340 und 240 nm untersucht.

Hierzu wurden 50 mg Piperin in 50 mL Acetonitril gelöst und anschließend 1:100 mit Acetonitril verdünnt. Die erhaltene Lösung mit einer Konzentration von 10 µg Piperin/mL Acetonitril wurde 1,5 Stunden durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe (366 nm) bis zur Einstellung des photochemischen Gleichgewichts isomerisiert. Diese Lösung wurde anschließend verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Aufgrund fehlender Standardsubstanzen konnten die Konzentrationen der einzelnen Isomere nicht bestimmt werden. Daher ist auf der x-Achse der nachfolgenden beiden Abbildungen die Gesamtkonzentration der Isomere in der Lösung wiedergegeben. Da bei den Verdünnungsreihen das relative Verhältnis der Isomere zueinander erhalten bleibt, kann anhand der Ergebnisse die Linearität der Methode ermittelt werden.



Bei der UV-Detektion bei 340 nm erhält man folgende Kalibriergeraden für Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin:

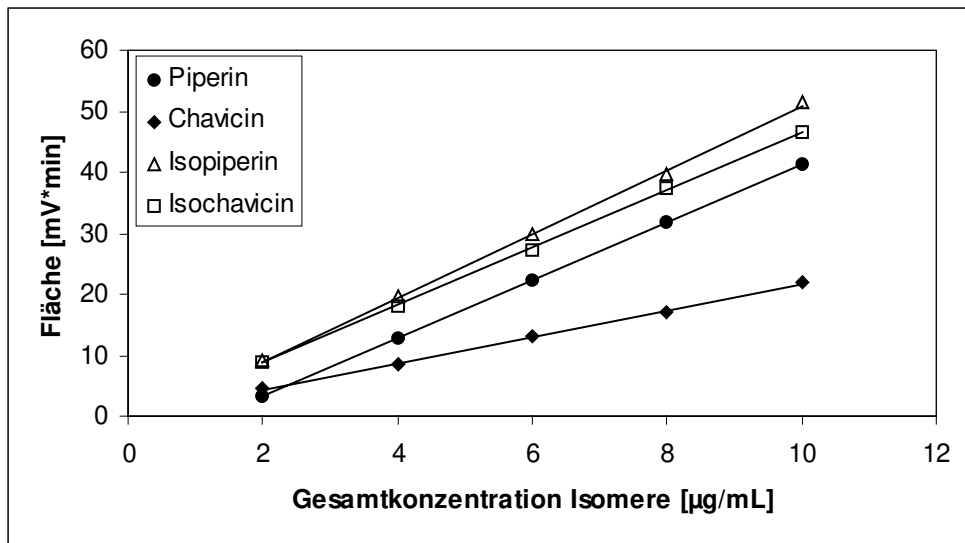


Abbildung 76: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil und UV-Detektion bei 340 nm.

Substanz	Kalibriergerade, mit $y = \text{Peakfläche [mV} \times \text{min]}$ , $x = \text{Konzentration [}\mu\text{g/mL]}$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Schnittpunkt mit y-Achse	
Piperin	$y = 4,7369 x$	-6,114	0,9999
Chavicin	$y = 2,1681 x$	+0,028	0,9981
Isopiperin	$y = 5,2233 x$	-1,435	0,9992
Isochavicin	$y = 4,7139 x$	-0,717	0,9997

Tabelle 21: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 340 nm.

Bei der UV-Detektion bei 240 nm erhält man folgende Kalibriergeraden für Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin:

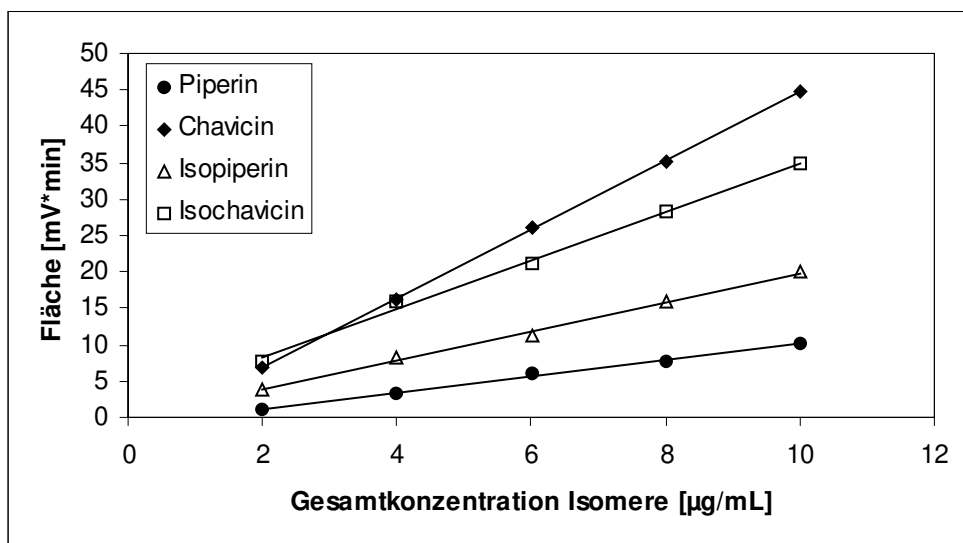


Abbildung 77: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil und UV-Detektion bei 240 nm.

Substanz	Kalibriergerade, mit $y = \text{Peakfläche [mV} \times \text{min]}$ , $x = \text{Konzentration [}\mu\text{g/mL]}$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Schnittpunkt mit y-Achse	
Piperin	$y = 1,1268 x$	-1,065	0,9976
Chavicin	$y = 4,7557 x$	-2,719	0,9999
Isopiperin	$y = 1,9875 x$	-0,066	0,9968
Isochavicin	$y = 3,3426 x$	+1,512	0,9969

Tabelle 22: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 240 nm.

In dem untersuchten Konzentrationsbereich (Konzentration Gesamtisomere bis 10 mg/L) zeigen die Kalibriergeraden sowohl bei der UV-Detektion bei 340 nm als auch bei UV-Detektion bei 240 nm Linearität. Für die einzelnen Isomere erhält man unterschiedliche Kalibriergeraden, die eine Abhängigkeit von der zur Detektion verwendeten Wellenlänge zeigen.

### 6.3.2 HPLC-Trennung an Silberionenphase

Um die Linearität der neu entwickelten Silberionenchromatographie zu überprüfen, wurde eine Piperinisomerenlösung im photostabilen Gleichgewicht in verschiedenen Konzentrationen mittels HPLC und UV-Detektion bei 340 nm untersucht.

Hierzu wurden 50 mg Piperin in 50 mL n-Hexan gelöst und anschließend 1:100 mit n-Hexan verdünnt. Die erhaltene Lösung mit einer Konzentration von 10 µg Piperin/mL n-Hexan wurde 1,5 Stunden durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe (366 nm) bis zur Einstellung des photochemischen Gleichgewichts isomerisiert. Diese Lösung wurde anschließend verdünnt und mittels HPLC untersucht.

Aufgrund fehlender Standardsubstanzen konnten die Konzentrationen der einzelnen Isomere nicht bestimmt werden. Daher ist auf der x-Achse der nachfolgenden Abbildung die Gesamtkonzentration der Isomere in der Lösung wiedergegeben. Da bei der Verdünnungsreihe das relative Verhältnis der Isomere zueinander erhalten bleibt, kann anhand des Ergebnisses die Linearität der Methode ermittelt werden.

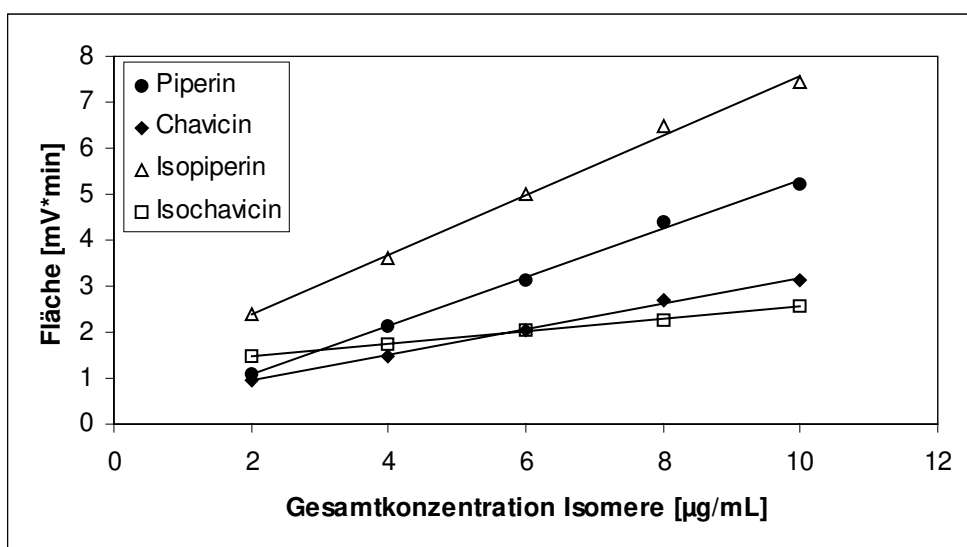


Abbildung 78: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, HPLC-Trennung an Silberionenphase und UV-Detektion bei 340 nm

Substanz	Kalibriergerade, mit $y = \text{Peakfläche [mV} \times \text{min]},$ $x = \text{Konzentration [}\mu\text{g/mL]}$		Bestimmtheitsmaß $R^2$
	Steigung	Schnittpunkt mit y-Achse	
Piperin	$y = 0,5282 x$	+0,0197	0,9972
Chavicin	$y = 0,2813 x$	+0,3749	0,9970
Isopiperin	$y = 0,6489 x$	+1,0894	0,9964
Isochavicin	$y = 0,1341 x$	+1,2119	0,9973

Tabelle 23: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 340 nm.

In dem untersuchten Konzentrationsbereich (bis 10 mg Gesamtisomere/L) sind die Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin linear. Die einzelnen Isomere ergeben unterschiedliche Kalibriergeraden.

Bei der Untersuchung mittels Silberionenchromatographie wurden Piperin in n-Hexan, bei der HPLC-Untersuchung an ODS-Hypersil in Acetonitril isomerisiert. In den Lösungen stellt sich ein unterschiedliches Isomerenverhältnis ein. Dadurch werden unterschiedlich Steigungen der Kalibriergeraden erhalten.

## 6.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure

### **p-Cymen-2,3-diol**

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von p-Cymen-2,3-diol wurden sechs Lösungen unterschiedlicher p-Cymen-2,3-diol-Konzentration (80 ng/mL bis 400 ng/mL) je dreimal injiziert.

### **Thymol**

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Thymol wurden sechs Lösungen unterschiedlicher Thymol-Konzentration (119 ng/mL bis 1,188 ng/mL) je dreimal injiziert.

### **Piperin: HPLC-Trennung mit Reversed-Phase Chromatographie**

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Piperin wurden fünf Lösungen unterschiedlicher Piperin-Konzentration (120 ng/mL bis 300 ng/mL) je dreimal injiziert. Insgesamt wurden 15 Bestimmungen bei einer Wellenlänge von 240 nm durchgeführt.

### **Piperin: HPLC-Trennung mit Silberionenchromatographie**

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Piperin wurden sechs Lösungen unterschiedlicher Piperin-Konzentration (0,550 µg/mL bis 5,500 µg/mL) injiziert. Die Bestimmungen wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt.

### **Carnosolsäure**

Für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Carnosolsäure wurden sechs Rosmarinextrakt-Lösungen unterschiedlicher Konzentration injiziert. Die Konzentration an Carnosolsäure dieser Lösungen lag zwischen 90 ng/mL bis 1,8 µg/mL.

Substanz	n <sup>18</sup>	Rauschen [ng/mL]		NWG (S/N = 3) [ng/mL]		BG (S/N = 6) [ng/mL]		NWG, absolut [pg]		BG, absolut [pg]	
p-Cymen-2,3-diol	18	1,71	±0,23	5,1	±0,7	10,3	±1,4	103	±14	206	±28
Thymol	18	7,95	±0,99	23,9	±3,0	47,7	±5,9	477	±59	954	±118
Piperin <sup>19</sup> (RP-Chromatographie)	15	18,96	±0,99	56,9	±3,0	113,8	±6,0	1137	±59	2274	±118
Piperin <sup>20</sup> (Silberionen-chromatographie)	6	6,13	±0,95	18,4	±2,8	36,8	±5,7	368	±56	736	±114
Carnosolsäure	6	9,94	±0,74	29,8	±1,5	59,6	±3,0	596	±30	1193	±59

*Tabelle 24: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure.*

## 6.5 Bestimmung der Inhaltstoffe der verwendeten Extrakte

### 6.5.1 Thymianextrakt

Der verwendete Thymianextrakt wurde durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid hergestellt und von der Firma Raps (Kulmbach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Er enthielt p-Cymen-2,3-diol und Thymol als antioxidativ wirksame Substanzen, Carvacrol war nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Der von der Firma Raps zur Verfügung gestellte Extrakt enthielt weiterhin Piperin.

#### 6.5.1.1 p-Cymen-2,3-diol-Gehalt

Die Aufnahme der Kalibriergeraden erfolgte mit p-Cymen-2,3-diol als Standard. Der p-Cymen-2,3-diol-gehalt des verwendeten Thymianextraktes betrug  $4,50 \text{ g} \pm 0,08 \text{ g}$  p-Cymen-2,3-diol in 100 g Extrakt ( $n = 6$ ).

#### 6.5.1.2 Thymolgehalt

Die Aufnahme der Kalibriergeraden erfolgte mit Thymol als Standard. Der Thymolgehalt des verwendeten Thymianextraktes betrug  $20,0 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  Thymol in 100 g Extrakt ( $n = 4$ ).

<sup>18</sup> n = Anzahl Messungen.

<sup>19</sup> Reversed-Phase-Chromatographie mit ODS-Hypersil (250x4,6 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm.

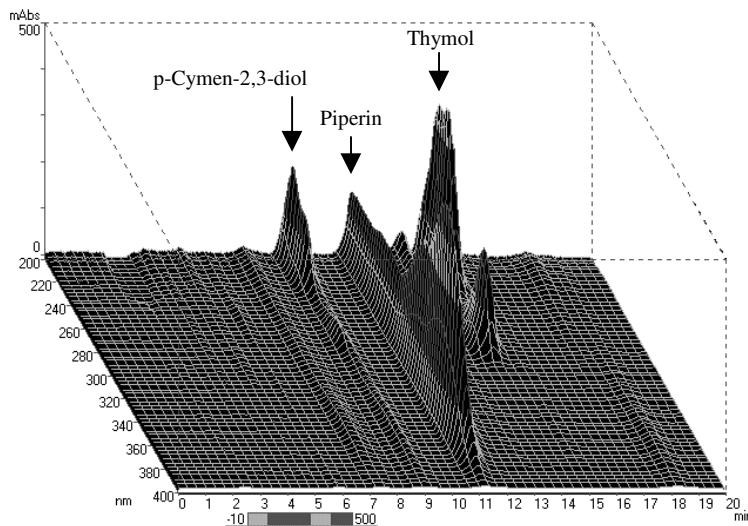
<sup>20</sup> Silberionen-Chromatographie mit UV-Detektion bei 340 nm.

### 6.5.1.3 Piperinegehalt

Die Aufnahme der Kalibriergeraden erfolgt mit Piperin als Standard: Abweichend von der in Kapitel 6.2.1 angegebenen HPLC-Methode wurde die UV-Detektion bei 340 nm (range = 0,04) durchgeführt.

Der Piperinegehalt des Thymianextraktes betrug  $4,76 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$  Piperin in 100 g Extrakt (n = 4).

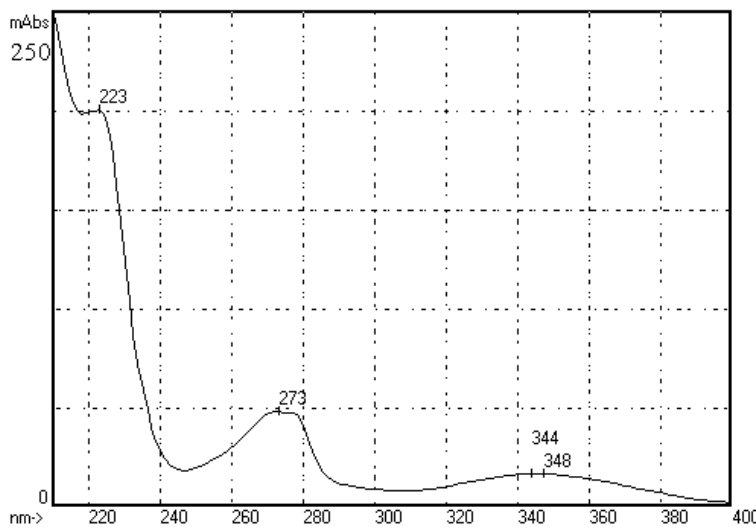
### 6.5.1.4 UV-Spektren aus Thymianextrakt



**Abbildung 79:** HPLC-Chromatogramm von piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion.

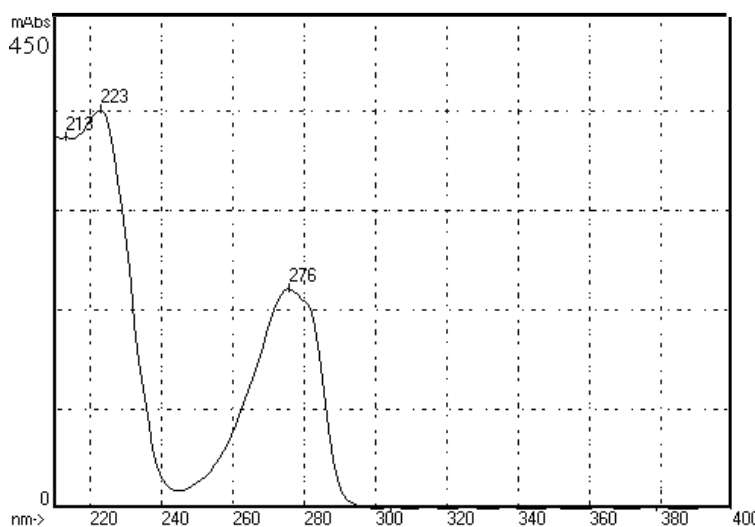
[25,0 µg Thymianextrakt]

Retentionszeiten: p-Cymen-2,3-diol 8,86 min, Piperin 11,27 min, Thymol 14,14 min



**Abbildung 80:** UV-Spektrum von p-Cymen-2,3-diol aus Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion.

[1,12 µg p-Cymen-2,3-diol]



**Abbildung 81:** UV-Spektrum von Thymol aus Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion. [6,2 µg Thymol]

Das UV-Spektrum von Piperin stimmt mit dem UV-Spektrum in Abbildung 14 überein.

### 6.5.1.5 NMR-Spektroskopie

Thymol, p-Cymen-2,3-diol und Piperin wurden mit der in Kapitel 6.1.1.3 beschriebenen präparativen HPLC-Methode isoliert und mittels NMR untersucht.

#### Thymol $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.18 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ), 2.20 (s, 3H, arom.- $\text{CH}_3$ ), 3.20 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ), 6.56 (s, 1H, arom.-H), 6.59 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, arom.-H), 6.99 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, arom.-H).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Pouchert (1983)].

#### p-Cymen-2,3-diol $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.20 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ), 2.18 (s, 3H, arom.- $\text{CH}_3$ ), 3.10 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ), 6.63 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, arom.-H), 6.71 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, arom.-H).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Schwarz (1996)].

#### Piperin $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

Die experimentellen Daten stimmen mit den Angaben in Kapitel 6.5.4 und damit mit der Literatur überein [De Cleyn (1975), Grewe (1970)].

#### Piperin $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  (ppm) = 24.8, 25.6, 26.7, 43.3, 46.9 (t, t, t, t, t, Piperidin-C), 101.2 (t, O- $\text{CH}_2$ -O), 105.7 (d), 108.5 (d), 119.9 (d), 122.4 (d), 125.3 (d), 131.0 (s), 138.3 (d), 142.3 (d), 148.1 (s), 148.2 (s), 165.5 (s, C=O).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Banerji (1984)].



### 6.5.1.6 Massenspektrum von Piperin aus Thymianextrakt

Das Massenspektrum stimmt mit dem Massenspektrum in Abbildung 18 überein.

m/z (%): 285 (44) [M+], 201 (50), 173 (24), 143 (16), 115 (36), 84 (100).

Die Daten stimmen mit der Literatur überein [De Cleyn (1975)].

## 6.5.2 Rosmarinextrakt

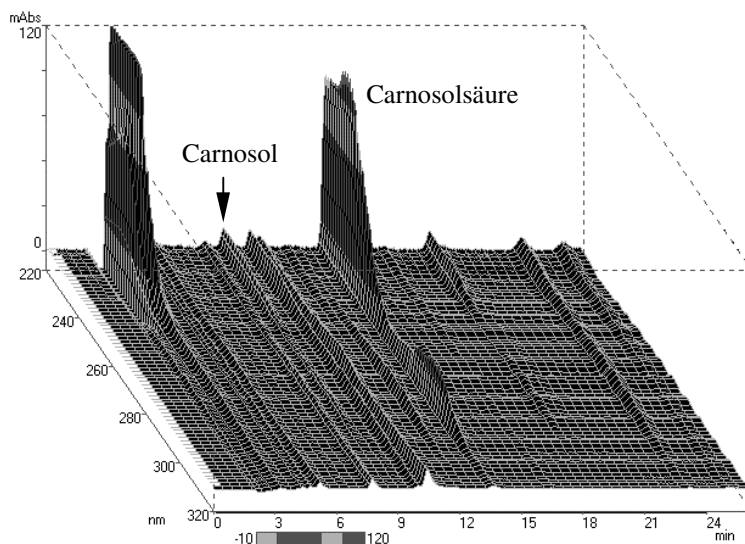
Der verwendete Rosmarinextrakt wurde durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid von der Firma CAL (Frankreich) hergestellt. Er enthält vor allem Carnosolsäure als antioxidativ wirksame Substanz. Carnosol war nur in sehr geringen Mengen vorhanden.

### 6.5.2.1 Carnosolsäuregehalt

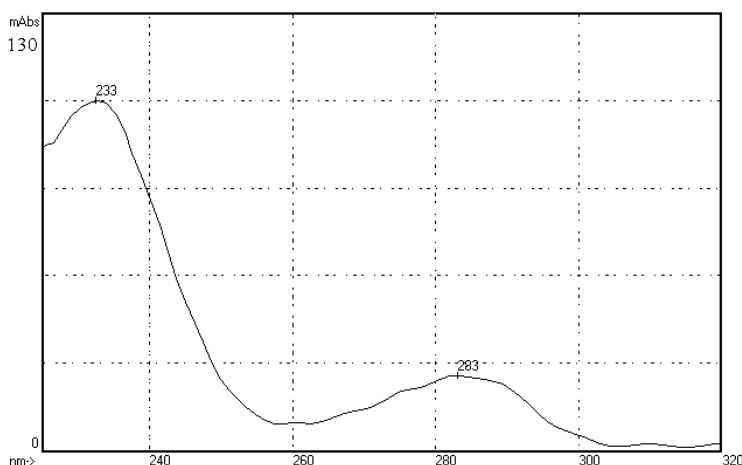
Es wurden während der Arbeit unterschiedliche Rosmarinextrakte verwendet. Der entsprechende Carnosolsäuregehalt ist daher den entsprechenden Angaben zu entnehmen.

Carnosolsäure als Standardsubstanz ist kommerziell nicht erhältlich. Die Bestimmung des Carnosolsäuregehaltes eines als Kalibrierstandard verwendeten Rosmarinextraktes erfolgte durch Kalibrierung gegen isolierte Carnosolsäure. Der Gehalt von Carnosolsäure in diesem Rosmarinextrakt wurde in der Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zu 15,3 g/100 g bestimmt.

### 6.5.2.2 UV-Spektrum von Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt



*Abbildung 82: HPLC-Trennung von Rosmarinextrakt an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. [22,0µg Rosmarinextrakt]*



**Abbildung 83:** UV-Spektrum von Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und Diodenarraydetektion.

### 6.5.2.3 Massenspektren von Carnosol und Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt

Carnosol und Carnosolsäure wurde nach der in Kapitel 6.2.4 beschriebenen Methode isoliert und mittels Massenspektrometrie untersucht.

**MS Carnosol** (Particle-beam-Interface):

$m/z$  (%): 330 (20) [ $M^+$ ], 286 (100), 284 (60), 271 (20), 269 (38), 215 (70), 204 (20).

Die Daten stimmen mit den Literangaben überein [Cuvelier (1994)].

**MS Carnosolsäure** (Particle-beam-Interface):

$m/z$  (%): 332 (8) [ $M^+$ ], 286 (100), 271 (22), 243 (25), 230 (50), 218 (21), 215 (22), 204 (21).

Die Daten stimmen mit den Literangaben überein [Cuvelier (1994), Schwarz (1992b)].

### 6.5.2.4 NMR-Spektroskopie

Carnosol und Carnosolsäure wurde nach der in Kapitel 6.2.4 beschriebenen Methode isoliert und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

**Carnosol  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta$  (ppm) = 0.86 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 1.22 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H), 1.30 (dd,  $J = 3.5$  Hz,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 1.54 (d, br,  $J = 13.2$  Hz., 1H), 1.62-1.88 (m, 2H), 1.91 (dt,  $J = 1.4$  Hz,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 2.02 (m, 1H), 2.19 (ddd,  $J = 4.1$  Hz,  $J = 5.4$  Hz,  $J = 13.5$  Hz, 1H), 2.40 (ddd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 2.90 (d, br,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 3.09 (sept,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 5.37 (dd,  $J = 1.4$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 6.64 (s, 1H, arom.-H).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Inatani (1982)].

**Carnosol  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta$  (ppm) = 18.8 (t), 19.7 (q), 22.4 (q), 22.5 (q), 27.3 (d), 29.2 (t), 29.7 (t), 31.7 (q), 34.5 (s), 41.0 (t), 45.4 (d), 48.4 (s), 77.9 (d), 112.2 (d, arom.-C), 121.6, 132.1, 132.8, 141.1, 141.7, (s, s, s, s, arom.-C), 175.8 (s, C(=O)O).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Inatani (1982)].

**Carnosolsäure  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**

$\delta$  (ppm) = 0.92 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.05 (dd,  $J = 4.0$  Hz,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 1.17 (dd,  $J = 6.9$  Hz, 6H), 1.35 (m, 1H), 1.54 (m, 3H), 1.82 (d, br.,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.78 (m, 2H), 3.18 (sept,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 3.52 (d, br.,  $J = 13.7$  Hz, 1H), 6.45 (s, 1H).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Schwarz (1992b), Cuvelier (1994)].

**Carnosolsäure  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**

$\delta$  (ppm) = 19.8 (t), 21.3 (t), 21.3 (q), 23.0 (q), 23.3 (q), 27.9 (d), 32.9 (t), 33.2 (q), 35.1 (s), 35.7 (t), 42.9 (t), 55.7 (d), 118.8 (d, arom.-C), 126.3, 130.6, 135.6, 141.3, 145.5 (s, s, s, s, s, arom.-C), 180.6 (s, COOH).

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Schwarz (1992b)].

**6.5.2.5 FT-IR-Spektrum von Carnosolsäure**

Carnosolsäure wurde nach der in Kapitel 6.2.4 beschriebenen Methode isoliert und mittels FT-IR-Spektroskopie als Film auf einer NaCl-Platte untersucht.

**IR Carnosolsäure (Film):**

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1680, 1426, 1370, 1320, 1284

Die charakteristischen Banden stimmen mit den Angaben in der Literatur überein [Cuvelier (1994)].

**6.5.3 Pfefferextrakt**

Der verwendete Pfefferextrakt wurde durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid hergestellt und von der Firma Raps zur Verfügung gestellt.

Die Aufnahme der Kalibriergeraden erfolgte mit Piperin als Standard. Abweichend von der angegebenen HPLC-Methode wurde die UV-Detektion bei 340 nm (range = 0,04) durchgeführt.

Der Piperingehalt des Pfefferextraktes betrug  $29,7 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  Piperin in 100 g Extrakt ( $n = 3$ ).

Die Identität von Piperin wurde durch Vergleich von Retentionszeiten der HPLC-Trennung mittels Reversed-Phase und Silberionen-Chromatographie mit einer Standardsubstanz bestätigt.

Die Analysenmethode wird in Kapitel 5.1.2.2 und 5.1.2.3 beschrieben, des weiteren können die Versuchsbedingungen Kapitel 6.2.1 und 6.2.2 entnommen werden.

#### 6.5.4 NMR-Spektroskopie von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin

##### Piperin $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.55-1.70 (m, br., 6H, Piperidin-H), 3.52 (s, br., 2H, Piperidin-H), 3.63 (s, br., 2H, Piperidin-H), 5.98 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 6.44 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 14.7$  Hz,  $\alpha$ -H), 6.76 (dd, 1H,  $J_{\beta,\gamma} = 8.5$  Hz,  $J_{\gamma,\delta} = 15.0$  Hz,  $\gamma$ -H), 6.77 (d, 1H,  $J_{\gamma,\delta} = 15.0$  Hz,  $\delta$ -H), 6.78 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, aromat.-H), 6.89 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, aromat.-H), 6.98 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, aromat.-H), 7.40 (ddd, 1H,  $J_{\alpha\beta} = 14.7$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = 8.5$  Hz;  $J = 1.8$  Hz,  $\beta$ -H).

##### Chavicin $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.55-1.70 (m, br., 6H, Piperidin-H), 3.46 (s, br., 2H, Piperidin-H), 3.63 (s, br., 2H, Piperidin-H), 5.97 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 6.04 (d, br., 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 11.1$  Hz,  $\alpha$ -H), 6.57 (d, br., 1H,  $J_{\gamma,\delta} = 11.0$  Hz,  $\delta$ -H?), 6.74 (dd, 1H,  $J_{\beta,\gamma} = J_{\gamma,\delta} = 11.0$  Hz,  $\gamma$ -H), 6.79-6.87 (m, 4H, aromat.-H,  $\beta$ -H?).

##### Isochavicin $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.62 (m, 6H, Piperidin-H), 3.52 (s, br., 2H, Piperidin-H), 3.62 (s, br., 2H, Piperidin-H), 5.97 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 6.27 (dd, 1H,  $J_{\beta,\gamma} = J_{\gamma,\delta} = 11.8$  Hz,  $\gamma$ -H), 6.48 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 14.7$  Hz,  $\alpha$ -H), 6.60 (d, 1H,  $J_{\gamma,\delta} = 11.8$  Hz,  $\delta$ -H), 6.82 (m, 3H, aromat.-H), 7.75 (ddd, 1H,  $J_{\alpha\beta} = 14.7$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = 11.8$  Hz;  $J = 1.1$  Hz,  $\beta$ -H).

##### Isopiperin $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  (ppm) = 1.50-1.70 (m, br., 6H, Piperidin-H), 3.48 (s, br., 2H, Piperidin-H), 3.63 (s, br., 2H, Piperidin-H), 5.96 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ -O), 5.99 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 11.2$  Hz,  $\alpha$ -H), 6.50 (dd, 1H,  $J_{\alpha\beta} = J_{\beta,\gamma} = 11.2$  Hz;  $\beta$ -H), 6.61 (d, 1H,  $J_{\gamma,\delta} = 15.6$  Hz,  $\delta$ -H), 6.75 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, aromat.-H), 6.90 (dd, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, aromat.-H), 7.03 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, aromat.-H), 7.42 (ddd, 1H,  $J_{\beta,\gamma} = 11.2$  Hz,  $J_{\gamma,\delta} = 11.2$  Hz,  $J = 1.0$  Hz,  $\gamma$ -H).

## 6.6 Analytische Untersuchung des Eigelbes

### 6.6.1 Aufarbeitung nach Fütterung mit Thymian- und Rosmarinextrakt

Ein massenäquivalentes Gemisch von Eigelb einer Versuchsreihe an einem Untersuchungstag wurde zur Untersuchung auf Gewürzinhaltsstoffe in Eigelb herangezogen.

Hierzu wurden die Eier mit einem handelsüblichen Eiertrenner (Firma WMF) getrennt. Anhaftendes Eiklar wurde durch Hin- und Herrollen des Eigelbes auf einem Papiertuch entfernt. Das Eigelb einer Versuchsreihe eines jeden Fütterungstages wurde vereinigt und durch Rühren mit einem Spatel homogenisiert.

#### 6.6.1.1 Extraktion von Fett und fettlöslichen Substanzen

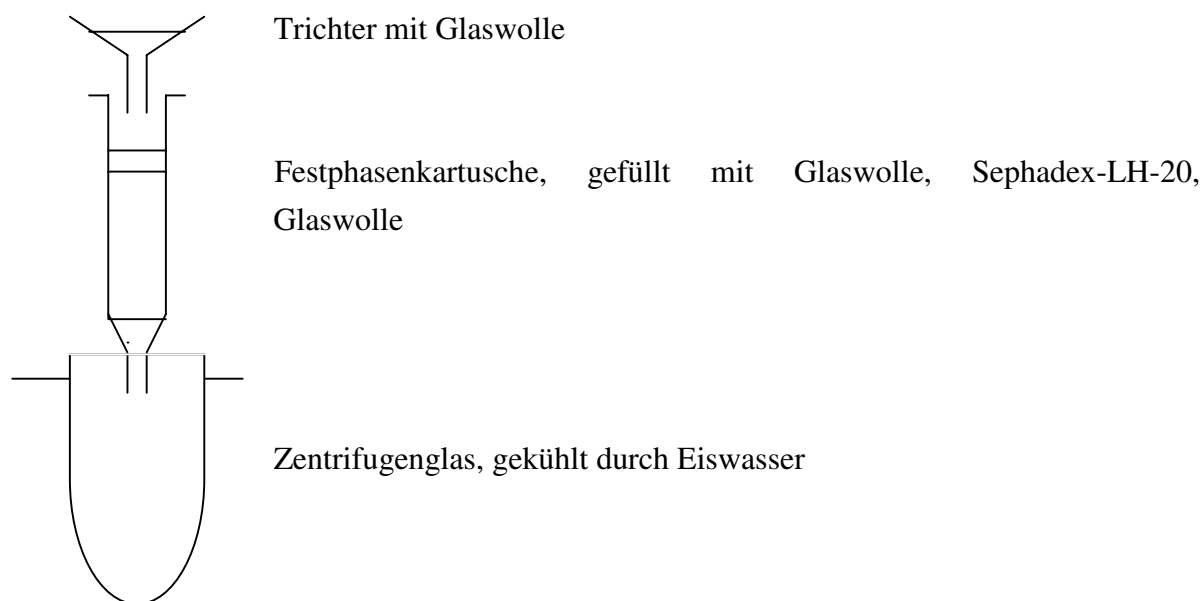
Fett und fettlösliche Substanzen wurden mit Cyclohexan/Ethanol extrahiert. Hierzu wurden bei den Untersuchungen 40 g Seesand mit 4,00 g Eigelb verrührt. Diese Mischung wurde anschließend mit 30 g Natriumsulfat homogenisiert und in einer Apparatur nach Twisselmann [Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in Eiern und Eiprodukten, in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG] mit 150 mL Ethanol/Cyclohexan (1/1) für 5 Stunden unter Rückfluß extrahiert. Danach wurde der erhaltene Extrakt bei 50 °C unter Vakuum bis zu einem Volumen von ungefähr 5 mL eingengt. Die Apparatur wurde mit Stickstoff belüftet und der eingengte Extrakt bis zur weiteren Verarbeitung über Nacht bei -18 °C unter Schutzgas (Stickstoff) in einer Tiefkühltruhe gelagert.

#### 6.6.1.2 Trennung der Gewürzinhaltsstoffe von Fett

Der Extrakt wurde in Methanol gelöst und durch Glaswolle filtriert. Anschließend wurde er durch eine selbsthergestellte Sephadex-LH-20-Säule<sup>21</sup> (0,5 g Sephadex-LH-20, gequollen in Methanol) filtriert.

---

<sup>21</sup> Das hierzu verwendete Sephadex-LH-20 muß zuvor in Methanol für mindestens 24 Stunden quellen. Das Sephadex-LH-20 (0,5 g trockenes Sephadex-LH-20 entspricht in etwa 2 mL in Methanol gequollenem Material) wurde in eine leere Festphasenkartusche (5 mL) gefüllt (z. B. Firma Machery-Nagel). Das Gelbett wurde mit Glaswolle gegen Verwirbelung geschützt.



**Abbildung 84: Versuchsanordnung Gelpermeationschromatographie.**

Die aufgegebene Probe wurde mit Methanol bis zu einem Probenvolumen von 30 mL eluiert und das Filtrat mit Eiswasser gekühlt. Ein Teil der Probenmatrix blieb ohne Verlust von Gewürzinhaltsstoffen auf der Säule zurück. Um die Lösung von restlichem Fett zu trennen, wurde sie für 1,5 Stunden in einer Tiefkühltruhe bei  $-18\text{ °C}$  eingefroren und anschließend für 15 Minuten in einem Eis/Kochsalz-Gemisch (1/1) bei  $-21\text{ °C}$  gekühlt. Die Probe wurde für 2 Minuten bei  $1000 \times g$  bei  $-18\text{ °C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (wobei die Proben weiterhin gekühlt wurden), das Lösungsmittel bei  $60\text{ °C}$  unter Vakuum bis zu einem Endvolumen von ungefähr 1,5 mL eingengt und anschließend mit Stickstoff belüftet.

### 6.6.1.3 Trennung der Gewürzinhaltsstoffe von Protein

#### 6.6.1.3.1 *Thymian*

Eine teilweise Ausfällung der Proteine wurde erreicht durch Zugabe von 4 mL Acetonitril/Wasser (1/1), Filtrieren durch einen mit Acetonitril/Wasser (1/1) angefeuchteten Faltenfilter und Waschen mit 1 mL Acetonitril/Wasser (1/1). Die Zusammensetzung Acetonitril/Wasser wurde entsprechend dem HPLC-Eluenten ausgewählt.

#### 6.6.1.3.2 *Rosmarin*

Eine teilweise Ausfällung der Proteine wurde erreicht durch Zugabe von 4 mL Acetonitril/Wasser (6,5/3,5), Filtrieren durch einen mit Acetonitril/Wasser (6,5/3,5) angefeuchteten Faltenfilter und Waschen mit 1 mL Acetonitril/Wasser (6,5/3,5). Die Zusammensetzung Acetonitril/Wasser wurde entsprechend dem HPLC-Eluenten ausgewählt.

### 6.6.1.4 Aufreinigung durch Festphasenextraktion

Das Filtrat wurde mit 4 mL Wasser versetzt. Bei den Untersuchungen auf die Thymianinhaltsstoffe wurde durch Zugabe von ~0,15 mL 2 mol/L Salzsäure die Lösung auf pH 2 eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde mit einer Chromabond HR-P-Festphasenkartusche aufgereinigt. Hierzu wurde die Festphasenkartusche mit 4 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde die Festphasenkartusche mit 2 mL Wasser gereinigt, überschüssiges Wasser durch kurzes Luftdurchpusten entfernt, die gewünschten Substanzen mit 5 mL Acetonitril/Methanol (1/1) eluiert und in einem 5 mL Meßkolben gesammelt. 1,5 mL dieser Lösung wurden unter Vakuum bei 50 °C bis zu einem Volumen von ungefähr 250 µL eingengt und mit Stickstoff belüftet. Das tatsächliche Endvolumen der Probe wurde durch Aufziehen in eine HPLC-Spritze ermittelt und bei der Berechnung berücksichtigt. Der Fehler dieser Volumenbestimmung liegt bei 1-2 %.

### 6.6.2 Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Inhaltsstoffe der Extrakte wurde Gewürzextrakt in Methanol gelöst (Gehalt der Gewürzextraktlösungen ~1 mg Extrakt/mL Methanol). Unterschiedliche Volumina dieser Lösung wurden zu 4,00 g Eigelb dotiert und homogenisiert. Damit ergaben sich für die Bestimmung der Wiederfindungsrate unterschiedliche Konzentrationen des Extraktes pro g Eigelb. Die zudotierte Menge wurde so gewählt, daß die erhaltene Konzentration auch noch mit einer Wiederfindungsrate von 20–30 % bestimmt werden konnte.

Der tatsächliche Gehalt der Lösung ergab sich durch Kalibrierung mit dem entsprechenden Gewürzextrakt. Die Berechnung der Wiederfindungsrate für die einzelnen Inhaltsstoffe ergab sich durch Vergleich der tatsächlich gefundenen Konzentration in Bezug zu der eingesetzten Konzentration.

Für die neu entwickelte Methode zur Eigelbaufarbeitung wurden folgende Wiederfindungsraten ermittelt:

	Dotierter Konzentrationsbereich [µg/g Eigelb]	Anzahl Messungen	Wiederfindungsrate [%]	
<b>p-Cymen-2,3-diol</b>	0,1-5,8	10	60,5	±4,8
<b>Thymol</b>	1-26	10	55,2	±5,1
<b>Piperin</b>	0,3-5	5	70,3	±7,7
<b>Carnosolsäure</b>	0,1-34	10	51,8	±7,0

*Tabelle 25: Wiederfindungsrate von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure nach Eigelbaufarbeitung.*

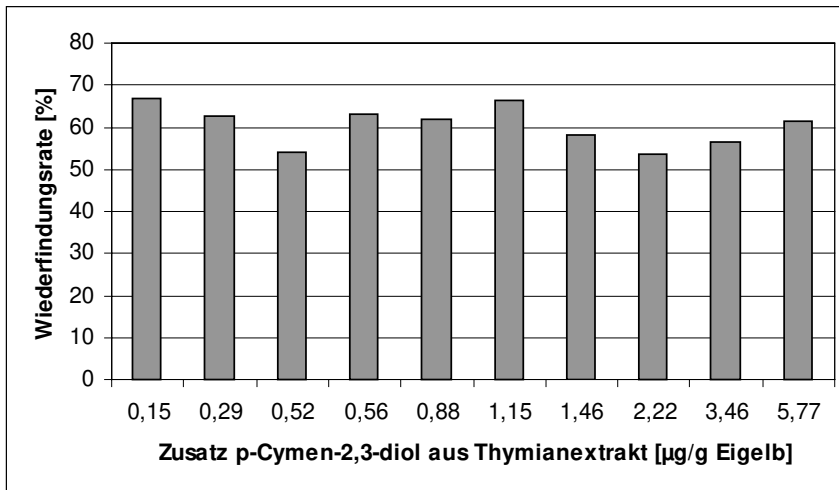


Abbildung 85: Wiederfindungsrate von p-Cymen-2,3-diol nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode.

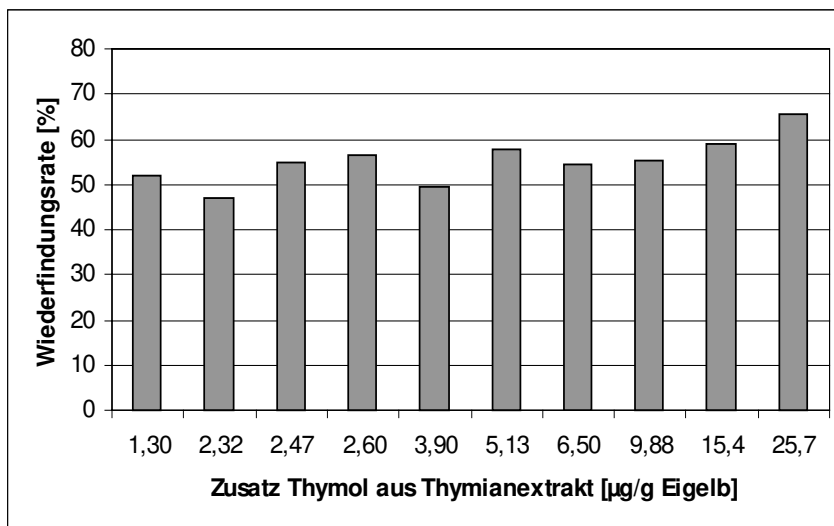


Abbildung 86: Wiederfindungsrate von Thymol nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode.



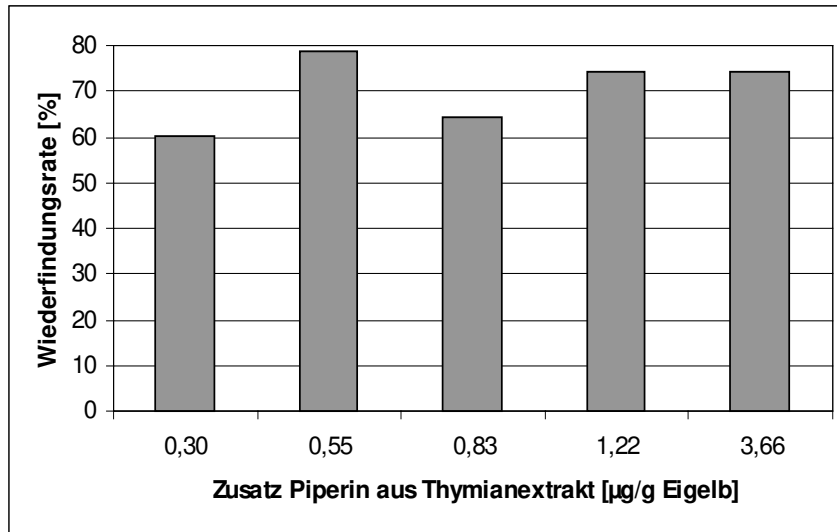


Abbildung 87: Wiederfindungsrate von Piperin nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode.

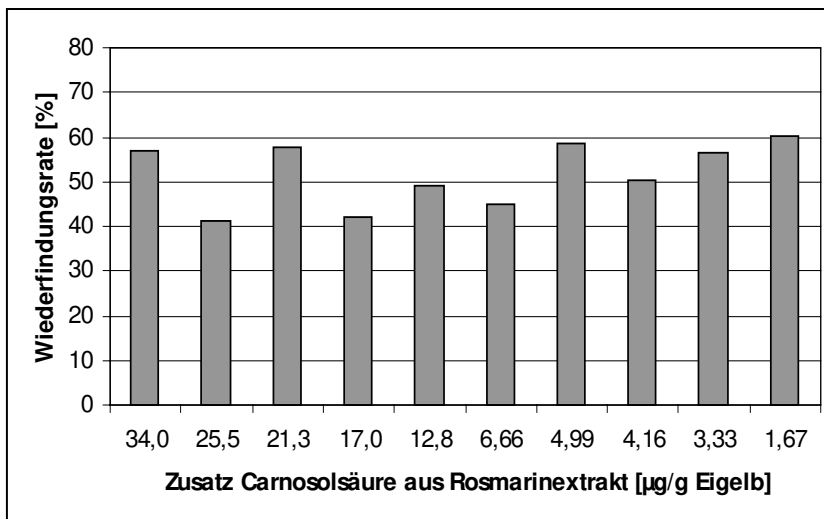


Abbildung 88: Wiederfindungsrate von Carnosolsäure nach Zusatz von Rosmarinextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode.

## 6.6.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

### 6.6.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der untersuchten Lösung

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Gewürzinhaltsstoffe wurde durch Dotierung von Gewürzextrakt zu Kontrolleiern (ohne Dotierung des Futters mit Gewürzextrakt) bestimmt.

Hierzu wurde Gewürzextrakt in Methanol gelöst (Gehalt der Gewürzextraktlösungen ~1 mg Extrakt/mL Methanol). Unterschiedliche Volumina dieser Lösung wurden zu 4,00 g Eigelb dotiert. Damit ergaben sich für die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen unterschiedliche Konzentrationen des Extraktes pro g Eigelb. Die zudotierte Menge wurde so gewählt, daß sich die erhaltenen Peakhöhen im HPLC- Chromatogramm annähernd in einem Signal zu Rausch-Verhältnis von 3 oder höher befanden, so daß das Signal/Rausch-Verhältnis der Substanz sicher ermittelt werden konnte. Hierdurch konnte sichergestellt werden, daß tatsächlich das Rauschen der Substanz und nicht eines Artefacts gemessen wurde.

Die anschließende Aufarbeitung der dotierten Proben erfolgte nach der neu entwickelten Methode für die Untersuchung des Eigelbs. Ausgewertet wurden die von 1,5 mL auf 250 µL eingeeengten Proben.

Für die Konzentration der Peakhöhe wurde die zudotierte Menge angenommen; in die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze geht daher die Wiederfindung der Substanzen ein.

	dotierter Konzentrationsbereich [µg/g Eigelb]	Rauschen [ng/mL]		NWG [ng/mL]		BG [ng/mL]	
p-Cymen-2,3-diol	0,07-0,30	3,77	±0,37	11,3	±1,1	22,6	±2,2
Thymol	0,3-1,2	34,6	±0,99	103,8	±2,97	207,7	±5,94
Piperin <sup>22</sup>	0,5-0,8	39,65	±0,33	118,9	±0,99	237,9	±1,98
Carnosolsäure	0,07-1,3	31,3	±1,3	93,8	±3,9	187,6	±7,8

*Tabelle 26: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in der zur HPLC-Analyse von Eigelb eingesetzten Lösung.*

<sup>22</sup> UV-Detektion bei 240 nm

### 6.6.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Eigelb

Aus den Nachweisgrenzen der gemessenen Lösungen ließen sich die Nachweisgrenzen der Substanzen für Eigelb berechnen.

Bei dieser Berechnung wurden die Verdünnungs- und Aufkonzentrierungsschritte der Aufarbeitung berücksichtigt. Diese waren die Elution der gesamten Probe nach Festphasenextraktion auf ein Volumen von 5 mL und die Konzentrierung dieser Lösung von 1,5 mL auf 250 µL.

Die Berechnung der Nachweisgrenzen im Eigelb erfolgte daher nach folgender Formel:

$$NWG_1[\text{ng} / \text{g Eigelb}] = NWG_2[\text{ng} / \text{mL Lösung}] \times \frac{0,250 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}}{1,50 \text{ mL} \times 4,00 \text{ g}}$$

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte ebenfalls nach obiger Formel.

	Nachweisgrenze		Bestimmungsgrenze	
	[ng/g Eigelb]		[ng/g Eigelb]	
p-Cymen-2,3-diol	2,4	±0,2	4,7	±0,5
Thymol	21,6	±0,6	43,3	±1,2
Piperin <sup>22</sup>	24,8	±0,2	49,6	±0,4
Carnosolsäure	19,5	±0,8	39,1	±1,6

*Tabelle 27: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in Eigelb.*

## 6.6.4 Ermittelte Konzentration nach Fütterung mit Thymianextrakt

Es wurden Eier während der gesamten Behandlungsperiode mit Thymianextrakt nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeder Meßwert wurde in Doppelbestimmungen bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen der Doppelbestimmung wichen nur sehr gering voneinander ab.

Die Konzentration der im Ei untersuchten Substanzen wurde durch Kalibration mittels Thymianextrakt berechnet. Die UV-Detektion von Piperin und den Isomeren erfolgte bei 240 nm. Die Berechnung der Konzentration von Chavicin, Isopiperin und Isochavicin erfolgte aufgrund nicht kommerziell erhältlicher Standardsubstanzen anhand der Kalibriergeraden von Piperin.

Die erhaltene Konzentration in der Lösung an untersuchten Substanzen wurde durch Berücksichtigung von Aufkonzentrierungsschritten auf das Eigelb bezogen.

### 6.6.4.1 Fütterung ohne Zusatz von Thymianextrakt

Es konnte keine der untersuchten Substanzen nachgewiesen werden.

### 6.6.4.2 Fütterung mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Futter

Behandlungsperiode [Tag]	p-Cymen-2,3-diol [ng/g Eigelb]	Thymol [ng/g Eigelb]	Piperin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Chavicin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Isopiperin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Isochavicin [ $\mu$ g/g Eigelb]
0	0	0	0	0	0	0
2	3,5	99,3	0,52	0	0	0
6	16,7	196,0	1,44	0,41	1,57	2,74
10	27,6	312,7	3,02	0,72	2,86	5,28
18	67,9	482,5	3,16	0,68	2,80	5,34
20	65,8	485,2	3,10	0,79	2,78	5,12

*Tabelle 28: Konzentrationen von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Behandlungsperiode mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.*

Nachperiode [Tag]	p-Cymen-2,3-diol [ng/g Eigelb]	Thymol [ng/g Eigelb]	Piperin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Chavicin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Isopiperin [ $\mu$ g/g Eigelb]	Isochavicin [ $\mu$ g/g Eigelb]
4	28,9	342,5	2,69	0,30	1,07	1,84
8	0	135,7	1,89	0,11	0,34	0,63
12	0	0	0,59	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0

*Tabelle 29: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Nachperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.*

### 6.6.4.3 Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Futter

Behandlungs- periode [Tag]	p-Cymen-2,3- diol [ng/g Eigelb]	Thymol [ng/g Eigelb]	Piperin [µg/g Eigelb]	Chavicin [µg/g Eigelb]	Isopiperin [µg/g Eigelb]	Isochavicin [µg/g Eigelb]
0	0	0	0	0	0	0
4	5	162	1,01	0	0,12	0,20
9	74,9	546	2,64	0,71	2,7	5,23
12	100,5	655	6,18	1,32	4,77	7,30
16	107,7	678	6,64	1,45	5,03	7,89
18	101,2	667	6,41	1,54	5,00	7,88

**Tabelle 30: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Behandlungsperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.**

Nachperiode [Tag]	p-Cymen-2,3- diol [ng/g Eigelb]	Thymol [ng/g Eigelb]	Piperin [µg/g Eigelb]	Chavicin [µg/g Eigelb]	Isopiperin [µg/g Eigelb]	Isochavicin [µg/g Eigelb]
4	29	364	6,46	0,17	1,14	1,85
8	7	96	0,98	0	0,23	0
12	3	55	0,48	0	0	0

**Tabelle 31: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Nachperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.**

## 6.6.5 Ermittelte Konzentration nach Fütterung mit Rosmarinextrakt

Es wurden Eier während der gesamten Behandlungsperiode mit Rosmarinextrakt nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeder Meßwert wurde in Doppelbestimmungen bestimmt. Die Konzentrationen der Doppelbestimmung wichen nur sehr gering voneinander ab.

Die Konzentration der im Ei untersuchten Substanzen wurde durch Kalibration gegen einen Rosmarinextraktstandard berechnet.

Die erhaltene Konzentration in der Lösung an untersuchten Substanzen wurde durch Berücksichtigung von Aufkonzentrierungsschritten auf das Eigelb bezogen.

### 6.6.5.1 Fütterung ohne Zusatz von Rosmarinextrakt zum Futter

Es konnte keine Carnosolsäure nachgewiesen werden.

### 6.6.5.2 Fütterung mit 0,283 % Rosmarinextrakt zum Futter

Behandlungsperiode [Tag]	Carnosolsäure [ng/g Eigelb]
0	0
4	10,1
8	24,6
12	40,8
16	37,1
20	36,8

*Tabelle 32: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Behandlungsperiode nach Fütterung mit 0,28 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.*

Nachperiode [Tag]	Carnosolsäure [ng/g Eigelb]
5	20,7
8	8,7

*Tabelle 33: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Nachperiode nach Fütterung mit 0,28 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.*

### 6.6.5.3 Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Futter

Behandlungsperiode [Tag]	Carnosolsäure [ng/g Eigelb]
0	0
4	30,8
8	50,6
12	76,1
16	82,5
18	84,9

*Tabelle 34: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Behandlungsperiode nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.*

Nachperiode [Tag]	Carnosolsäure [ng/g Eigelb]
4	35,3
8	15,2

*Tabelle 35: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Nachperiode nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.*

## 6.6.6 Überprüfung der Methode zur Extraktion des Eigelbes

### 6.6.6.1 Analytische Untersuchung des Eigelbes nach Methanolextraktion

Eigelb aus der Rosmarinextraktfütterung (Fütterungsdauer von 16 Tagen mit Zusatz von 0,57 % Rosmarinextrakt) wurde mit Methanol statt mit der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Extraktion mit Cyclohexan/Ethanol (1/1) extrahiert. Die Aufarbeitung der mit Methanol extrahierten Eigelbproben erfolgte nach der Extraktion analog der Aufarbeitung für die mit Rosmarinextrakt gefütterten Eier. Die Gelpermeationschromatographie mit Sephadex-LH-20 dauerte hierbei um einen Faktor 4 länger als dieser Aufreinigungsschritt üblicherweise in Anspruch nimmt. Parallel zu der geringfügig geänderten Aufarbeitung wurden identische Eigelbproben mit Hilfe der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode mit Cyclohexan/Ethanol (1/1) extrahiert.

Die mit Methanol extrahierte Eigelbproben zeigten im Vergleich zu dem mit Cyclohexan/Methanol extrahierten Eigelbproben einen um 16 % geringeren Carnosolsäuregehalt nach Fütterung.

Die Extraktion mit Methanol zeigte neben einer länger dauernden Aufarbeitungszeit eine geringere Wiederfindung von Carnosolsäure.

### **6.6.6.2 Analytische Untersuchung des Eigelbes nach Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase**

4,00 g Eigelb aus der Rosmarinextraktfütterung (Fütterungsdauer von 16 Tagen mit Zusatz von 0,57 % Rosmarinextrakt) wurden jeweils mit 1 mL 0,1 mol/L Acetat-Puffer (pH 5,4) und 10  $\mu$ L  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase versetzt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Eigelbproben mit der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Parallel hierzu wurden identische Eigelbproben, die nicht mit der Enzymmischung versetzt worden waren, ebenfalls aufgearbeitet.

Im Vergleich mit den nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode aufgearbeiteten Eigelbproben zeigten die Eigelbproben nach Inkubation mit der Enzymmischung einen um 57% verringerten Carnosolsäuregehalt.

### **6.6.6.3 Analytische Untersuchung des Rückstandes der Eigelbextraktion**

Der Rückstand der Eigelbextraktion mit Cyclohexan/Ethanol (1/1) wurde auf verbleibende Inhaltsstoffe von Thymian untersucht. Insgesamt wurden sechs Proben untersucht.

Für die Aufarbeitung wurden 60 mL von 12,5 % Salzsäure zu dem Rückstand der Extraktion hinzugefügt und in einem Autoklaven für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Die Proben wurden anschließend mit Eiswasser gekühlt, durch einen Faltenfilter filtriert und der Filterrückstand mit 5 mL Wasser nachgewaschen.

Das Filtrat wurde anschließend durch eine Festphasenextraktion mit einer Chromabond HR-P-Kartusche aufgereinigt. Hierzu wurde die Festphasenkartusche mit 4 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde die Festphasenkartusche mit 5 mL Wasser gereinigt, überschüssiges Wasser durch kurzes Luftdurchpusten entfernt, die gewünschten Substanzen mit 5 mL Acetonitril/Methanol (1/1) eluiert und in einem 5 mL Meßkolben gesammelt. 1,5 mL dieser Lösung wurde unter Vakuum bei 50 °C bis zu einem Volumen von ungefähr 250  $\mu$ L eingengt und mit Stickstoff belüftet. Das tatsächliche Endvolumen der Probe wurde durch Aufziehen in eine HPLC-Spritze ermittelt. Der Fehler dieser Volumenbestimmung liegt bei 1-2 %.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde Thymianextrakt in Methanol gelöst und in verschiedenen Konzentrationen zu dem Rückstand nach der Eigelbextraktion hinzugegeben, homogenisiert und nach der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Ausgewertet wurden die von 1,5 mL auf 250  $\mu$ L eingengten Proben.

Aus den ermittelten Nachweisgrenzen der Substanzen in den gemessenen Lösungen ließen sich die Nachweisgrenzen im Rückstand der Eigelbextraktion berechnen.

Bei der Berechnung waren die Verdünnungs- und Aufkonzentrierungsschritte der Aufarbeitung zu berücksichtigen.



Die Berechnung der Nachweisgrenzen im Eigelbrückstand erfolgte daher nach folgender Formel:

$$NWG_1[ng / g] = NWG_2[ng / mL] \times \frac{0,250 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}}{1,50 \text{ mL} \times 4,00 \text{ g}}$$

Hierbei bedeuten  $NWG_1$  die Nachweisgrenze der Substanz in [ng/g Eigelbrückstand] und  $NWG_2$  die Nachweisgrenze der Substanz in [ng/mL Lösung].

Die Standardabweichung wurde ebenfalls nach obiger Formel berechnet.

	dotierter Konzentrationsbereich [µg/g Eigelb]	Rauschen [µg/mL]		NWG [µg/mL]		NWG [µg/g Eigelbrückstand]	
p-Cymen-2,3-diol	8-16	0,0482	±0,0093	0,145	±0,028	0,030	±0,006
Thymol	36-72	0,962	±0,033	2,89	±0,10	0,600	±0,021
Piperin <sup>23</sup>	4,3-8,5	1,16	±0,09	3,48	±0,27	0,725	±0,057

**Tabelle 36: Nachweisgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Rückstand der Eigelbextraktion.**

<sup>23</sup> UV-Detektion bei 240 nm

## 6.7 Analytische Untersuchung des Eiklars

### 6.7.1 Aufarbeitung nach Fütterung mit Thymian- und Rosmarinextrakt

4,00 g Eiklar wurden mit 4,0 mL Acetonitril versetzt und homogenisiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 1000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde unter Vakuum bei 50 °C eingengt und in einem 5 mL Meßkolben gesammelt und bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.

1,5 mL dieser Lösung wurden unter Vakuum bei 50 °C zu einem Volumen von ungefähr 500 µL eingengt und mit Stickstoff belüftet. Das tatsächliche Endvolumen der Probe wurde durch Aufziehen in eine HPLC-Spritze ermittelt. Der Fehler dieser Volumenbestimmung liegt bei 1 %.

### 6.7.2 Nachweisgrenzen in der untersuchten Lösung und im Eiklar

Rosmarin- bzw. Thymianextrakt gelöst in Methanol wurde in verschiedenen Konzentrationen zu dem Eiklar hinzugegeben und homogenisiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der unter 6.7.1 beschriebenen Methode. Ausgewertet wurden die von 1,5 mL auf 500 µL eingengten Proben.

Aus den Nachweisgrenzen der Substanzen in den gemessenen Lösungen lassen sich die Nachweisgrenzen der Substanzen im Eiklar berechnen. Bei dieser Berechnung sind die Verdünnungs- und Aufkonzentrierungsschritte der Aufarbeitung zu berücksichtigen. Diese sind die Elution der gesamten Probe nach Festphasenextraktion auf ein Volumen von 5 mL, und die Konzentrierung dieser Lösung von 1,5 mL auf 500 µL.

Die Berechnung der Nachweisgrenzen im Eigelb erfolgte nach folgender Formel:

$$NWG_1[ng / g \text{ Eiklar}] = NWG_2[ng / mL \text{ Lösung}] \times \frac{0,500 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}}{1,50 \text{ mL} \times 4,00 \text{ g}}$$

Die Standardabweichung wurde ebenfalls nach obiger Formel berechnet.

	dotierter Konzentrationsbereich [µg/g Eigelb]	Rauschen [ng/mL]		NWG [ng/mL]		NWG [ng/g Eiklar]	
p-Cymen-2,3-diol	0,3-0,5	51,5	±1,2	155	±3,6	64,4	±1,5
Thymol	1,4-2,2	142	±15	426	±45	179	±20
Piperin <sup>24</sup>	0,17-0,52	30,3	±3,9	91	±12	37,9	±4,9
Carnosolsäure	0,33-3,33	72,0	±4,3	144	±13	90,0	±5,4

*Tabelle 37: Nachweisgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in der zur HPLC-Analyse von Eiklar eingesetzten Lösung und im Eiklar.*

Von den untersuchten Substanzen konnte nur Piperin im Eiklar nachgewiesen werden. Es wurde daher für Piperin die Bestimmungsgrenze berechnet und die Wiederfindungsrate bestimmt.

Es ergab sich für Piperin in den untersuchten Lösungen eine Nachweisgrenze von  $91 \pm 12$  ng/mL und eine Bestimmungsgrenze von  $182 \pm 23$  ng/mL. Die Berechnung der Nachweisgrenze für Piperin im Eiklar ergab  $37,9 \pm 4,9$  ng Piperin/g Eiklar und eine Bestimmungsgrenze von  $76 \pm 9,8$  ng Piperin/g Eiklar.

### **Wiederfindungsrate für Piperin im Eiklar**

Piperin und seine Isomere konnten im Eiklar nachgewiesen werden. Um einen Übergang von dem Futter in das Eiklar berechnen zu können, wurde für die oben genannte Methode die Wiederfindungsrate für Piperin bestimmt.

Thymianextrakt gelöst in Methanol wurde hierzu in verschiedenen Konzentrationen zu 4,00 g Eiklar hinzugegeben und homogenisiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der unter 6.7.1 beschriebenen Methode.

Die dotierte Konzentration von Piperin in Thymianextrakt pro g Eiklar lag zwischen  $0,23 \mu\text{g/g}$  Eiklar und  $12 \mu\text{g/g}$  Eiklar. Abweichend von den unter den in Kapitel 6.1 aufgeführten Angaben wurden insgesamt 5 Bestimmungen durchgeführt.

Die Wiederfindungsrate für Piperin liegt bei  $75,7 \% \pm 1,9 \%$  ( $n = 5$ ).

<sup>24</sup> UV-Detektion bei 240 nm

## 6.8 Aufarbeitung der Milchrahmproben

### 6.8.1 Isolierung von Carnosolsäure aus dem Rahm

10,00 g Rahm wurden mit 25 mL Methanol versetzt, homogenisiert, auf 50 °C erwärmt und für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Die Suspension wurde anschließend bei 1000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einen Rundkolben überführt.

Der Rückstand wurde mit 15 mL Methanol versetzt, homogenisiert, auf 50 °C erwärmt und für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Die Suspension wurde anschließend bei 1000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit der Lösung in dem Rundkolben vereinigt. Der Rückstand wurde ein weiteres mal mit 15 mL Methanol extrahiert. Hierzu wurde er wiederum auf 50 °C erwärmt, für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, und bei 1000 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ebenfalls mit der Lösung in dem Rundkolben vereinigt.

Die vereinigten Überstände einer Probe wurden unter Vakuum bei 60 °C auf ein Volumen von ungefähr 3 mL eingengt und mit 9 mL Wasser versetzt. Die erhaltene Lösung wurde mit einer Chromabond HR-P-Festphasenkartusche aufgereinigt. Hierzu wurde die Festphasenkartusche mit 4 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde die Festphasenkartusche mit 2 mL Wasser gereinigt, überschüssiges Wasser durch kurzes Luftdurchpusten entfernt und die gewünschten Substanzen mit 5 mL Acetonitril/Methanol (1/1) eluiert und in einem 5 mL Meßkolben gesammelt. 1,5 mL dieser Lösung wurden unter Vakuum bei 50 °C auf ein Volumen von ungefähr 250 µL eingengt. Das tatsächliche Endvolumen der Probe wurde durch Aufziehen in eine HPLC-Spritze ermittelt.

### 6.8.2 Nachweisgrenze von Carnosolsäure

Rosmarinextrakt gelöst in Methanol wurde in verschiedenen Konzentrationen zu dem Rahm hinzugegeben und homogenisiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode. Ausgewertet wurde die auf 250 µL eingengten Proben.

Die dotierte Konzentration von Carnosolsäure pro g Rahm lag zwischen 0,32 µg/g Rahm und 0,79 µg/g Rahm.

Es ergab sich für das Rauschen von Carnosolsäure eine Konzentration von 117,0 ng/mL mit einer Standardabweichung von 5,3 ng/mL. Damit ergab sich für Carnosolsäure eine Nachweisgrenze von  $351 \pm 16$  ng/mL.

Die Berechnung der Nachweisgrenzen im Rahm erfolgte nach folgender Formel:

$$NWG_1[\text{ng} / \text{g} \text{ Rahm}] = NWG_2[\text{ng} / \text{mL} \text{ Lösung}] \times \frac{0,250 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}}{1,50 \text{ mL} \times 10,00 \text{ g}}$$

Damit ergab sich als Nachweisgrenze von Carnosolsäure in Rahm eine Konzentration von  $29,3 \text{ ng/g} \pm 1,4 \text{ ng/g}$ .

## 6.9 Histologische Untersuchungen von Leber, Niere und Lunge der Legehennen

Während der Sektion der Legehennen wurden den Tieren Gewebeprobe von der Leber, Niere und der Lunge entnommen. Die Proben wurden 6 Tage in einer Lösung von 10 % Formaldehyd in Wasser fixiert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Reihe von alkoholischen Lösungen (50–96%ige alkoholische Lösungen). Nach der Behandlung mit Aceton als Intermedium wurden sie mit Paraffin behandelt und das Organ mit Wachs ausgegossen. Mittels Schlittenmikrotom wurden nun 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Um überschüssiges Paraffin aus den Schnitten zu entfernen, wurden sie mit Xylol und einer absteigenden Reihe von alkoholischen Lösungen (96–20%ige alkoholische Lösungen) und anschließend mit Aqua dest. behandelt. Anschließend wurde eine Hämalaun-Eosin-Färbung nach Mayer durchgeführt:

10%ige Formaldehydlösung in Wasser	6 Tage
Leitungswasser	15 min
50%iges Ethanol	60 min
70%iges Ethanol	60 min
80%iges Ethanol	60 min
90%iges Ethanol	60 min
96%iges Ethanol	60 min
Ethanol abs.	60 min
Ethanol/Aceton (1/1)	90 min
Ethanol/Aceton (1/1)	90 min
Aceton	60 min
Aceton	60 min
Paraffin	180 min
Paraffin	180 min
Ausgießen mit Wachs und Schneiden der Schnitte	
Xylol	10 min
Xylol	10 min
96%iges Ethanol	5 min
70%iges Ethanol	5 min
50%iges Ethanol	5 min
20%iges Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Hämatoxylin	10 min
Leitungswasser	10 min
Eosin	5 min
Aqua dest.	30 sek
Aqua dest	30 sek
70%iges Ethanol	30 sek
96%iges Ethanol	3 min
Ethanol abs.	5 min
Karbol-Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	10 min
Eindecken der Proben	

## **6.10 Untersuchungen von Blutserum/Blutplasma der Legehennen nach Sektion**

### **6.10.1 Aufarbeitung von Blutserum nach Fütterung mit Rosmarinextrakt**

Das bei der Sektion entnommene Blut der Legehennen wurde über Nacht zur Blutgerinnung bei Raumtemperatur stehengelassen. Das dadurch gewonnene Serum wurde nach Zentrifugieren bei 11400 x g direkt zur chromatographischen Untersuchung eingesetzt.

### **6.10.2 Aufarbeitung von Blutplasma nach Fütterung mit Thymianextrakt**

Das bei der Sektion erhaltene Blutplasma wurde bei 30 x g zentrifugiert. Da der Überstand leicht gelblich trübe gefärbt war, wurde das Plasma weiter aufgereinigt. Je 1 mL des Plasmas wurde mit 1 mL Acetonitril versetzt und der dadurch entstehende Niederschlag (Fällung von Proteinen) abzentrifugiert (11400 x g). Der Überstand wurde mit 6 mL Wasser versetzt, durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und anschließend mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Hierzu wurde die Festphasenkartusche HR-P mit 6 mL Wasser konditioniert, die Probe aufgegeben, mit 3 mL Wasser gewaschen und mit 3 mL Acetonitril/Methanol eluiert. Das Eluat wurde anschließend bei 50 °C unter Vakuum auf ein Drittel seines Volumens eingeeengt und zur chromatographischen Untersuchung eingesetzt.

## **6.11 Zellkulturversuche mit humanen Magen- und Leberzellen**

### **6.11.1 Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Substanzkonzentration**

Anhand eines Vorversuches wurde ermittelt, welche der aufgegebenen Substanzkonzentrationen zytotoxisch wirkt, beziehungsweise, welche gerade nicht mehr, da diese Konzentration die optimale Konzentration für die Zellkulturversuche darstellt. Der Stoffwechsel der Zellen kann bei dieser Konzentration ausgeschöpft werden. Eine zu hohe Konzentration bringt die Zellen zum Absterben. Bei einer zu geringen Substanzkonzentration werden die Substanzen von den Zellen nicht oder kaum verstoffwechselt.

Für den Vorversuch wurden je 40.000 humane Magen- und Leberzellen pro Cup ausgesät und anschließend für 48 Stunden inkubiert. Das überstehende Medium wurde von den adhärennten Zellen entfernt und je 200 µL der Substanzen auf die Zellen gegeben.

Die verwendeten Substanzen für den Vorversuch waren: Thymol, Piperin, Thymianextrakt und Rosmarinextrakt. Die Substanzen wurden in Methanol/PBS (20/80) gelöst und

anschließend 1:10 bis 1:1000 mit dem Medium verdünnt. Parallel zu dem Versuch wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem nur Medium auf die Zellen gegeben wurde.

Je 200 µL folgender Substanzkonzentrationen wurden sowohl auf die Magen- als auch auf die Leberzellen aufgebracht:

Cup	Thymol [µg/mL]	Piperin [µg/mL]	ThyEx <sup>25</sup> [µg/mL]	RosEx <sup>26</sup> [µg/mL]	Kontrolle [µg/mL]
1	1480	1145	1274	1606	0
2	740	572,3	637	803	0
3	592	457,8	509,6	642,4	0
4	296	228,9	254,8	321,4	0
5	148	114,5	127,4	160,6	0
6	74	57,2	63,7	80,3	0
7	29,6	22,89	25,48	32,1	0
8	14,8	11,45	12,74	16,1	0

**Tabelle 38: Dotierte Substanzen und deren Konzentration zur Cytotoxizitätsbestimmung an humanen Magen- und Leberzellen.**

Nach einer Inkubation der Zellen für 22 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre zeigte sich folgendes Bild bei der mikroskopischen Auswertung:

Cup	Magenzellen HMO2					Leberzellen HepG2				
	Thymol	Piperin	ThyEx	RosEx	Kontrolle	Thymol	Piperin	ThyEx	RosEx	Kontrolle
1	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-
2	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-
3	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-
4	+++	+++	+++	++	-	+++	++	+++	+	-
5	+++	++	++	+	-	+++	+	+++	-	-
6	+++	-	-	-	-	+++	-	++	-	-
7	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 39: Auswertung Cytoxizitätstest nach Aufgabe von den in Tabelle 38 aufgeführten Substanzen. (Hierbei bedeuten: - = lebend, + = weniger als 50 % der Zellen sind abgestorben, ++ = mehr als 50 % der Zellen sind abgestorben, +++ = alle Zellen sind abgestorben.)**

Für die Durchführung der Zellkulturversuche und anschließender HPLC-Untersuchung wurde nun der Konzentrationsbereich gewählt, bei dem die Zellen gerade alle lebten (z. B. Konzentration von Piperin bei Cup 6 bei Aufgabe auf Magenstellen). Da es sich bei der Bestimmung

<sup>25</sup> ThyEx = Thymianextrakt

<sup>26</sup> RosEx = Rosmarinextrakt

der optimalen Substanzkonzentration nur um eine Einfachbestimmung handelte, wurde zur Durchführung der weiteren Zellkulturversuche jeweils eine Konzentration über und unter der ermittelten optimalen Substanzkonzentration gewählt.

### 6.11.2 Zellkulturversuch mit anschließender HPLC-Untersuchung

10 mL der Magenzelllinie (200.000 Zellen/mL) und 10 mL der Leberzelllinie (300.000 Zellen/mL) wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Nutzfläche) eingebracht und 48 Stunden in einem Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellzahl wurde so gewählt, daß zum Ende des gesamten Versuches die Zellen eine optimale Zelldichte (90-100%ige Konfluenz bei den Magenzellen, 80-90%ige Konfluenz bei den Leberzellen) erreicht hatten. Das Medium über den adhärennten Zellen wurde gegen jeweils 5 mL einer Probelösung (Substanz gelöst in Medium) bzw. gegen Medium (Kontrollversuch) ausgetauscht.

Für den Versuch wurden die im Vorversuch ermittelten Konzentrationsbereiche gewählt. Zur Durchführung der Untersuchung stand nur eine begrenzte Anzahl von Zellkulturflaschen zur Verfügung. Es wurde daher auf den Zusatz von Thymianextrakt zugunsten des Zusatzes der in ihm enthaltenen Substanzen verzichtet.

Die aufgegebenen Konzentrationen für die Magen- und Leberzellen sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Zellkultur-Flasche		Substanz	Konzentration der Substanzen in Medium [µg/mL]
HMO2	HepG2		
M1	L1	Thymol	85,1
M2	L2	Thymol	42,55
M3	L3	Piperin	372,8
M4	L4	Piperin	186,4
M5	L5	Piperin	93,2
M6	L6	Pfefferextrakt	906,0
M7	L7	Pfefferextrakt	453,2
M8	L8	Rosmarinextrakt	514,8
M9	L9	Rosmarinextrakt	257,4
M10	L10	ohne Zusatz	0

*Tabelle 40: Dotierte Substanzen und deren Konzentration auf humane Magen- und Leberzellen.*

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde die Konfluenz der Zellen mit Hilfe eines Invertmikroskopes mit Phasenkontrast-Einrichtung ausgewertet. Optimal konfluente Zellen zeichnen sich durch sich berührende backsteinförmige Zellen aus (sogenanntes Monolayer). Zu diesem Zeitpunkt stellen die Zellen ihr Wachstum ein, da sie

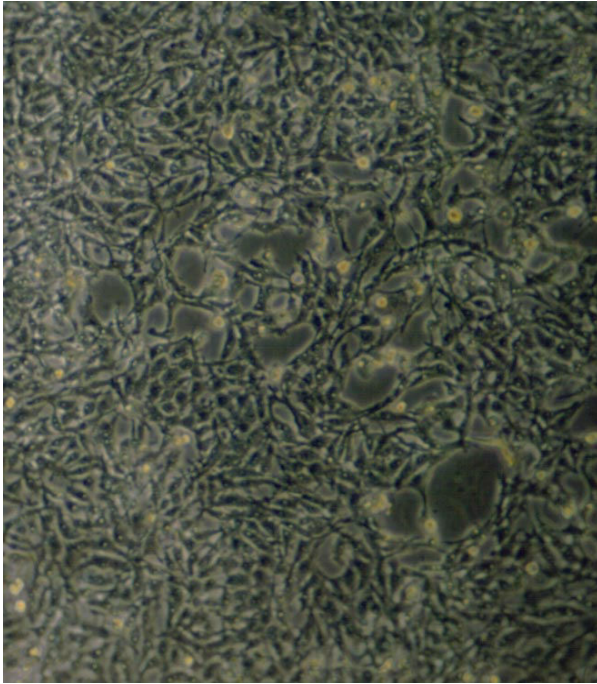


einer Kontaktinhibition unterliegen. In Kulturen adhärenter Zellen findet man immer einen kleinen Anteil nicht angehefteter Zellen. Hierbei kann es sich sowohl um abgestorbene Zellen handeln als auch um solche Zellen, die gerade aus einer Teilung hervorgegangen sind und sich noch nicht angeheftet haben. Bei der Beurteilung der Kultur können zu dieser Unterscheidung tote Zellen mit Trypanblau angefärbt werden. Dieser Farbstoff kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht passieren. Das Plasma von toten Zellen erscheint dagegen im Mikroskop blau, auch wenn der Zellkörper sonst vollständig intakt erscheint [Meier (1996)]. Auf diese Unterscheidungsmöglichkeit wurde verzichtet und die Beurteilung durch die mikroskopische Untersuchung vorgenommen, um die nachfolgende HPLC-Analytik nicht zu stören.

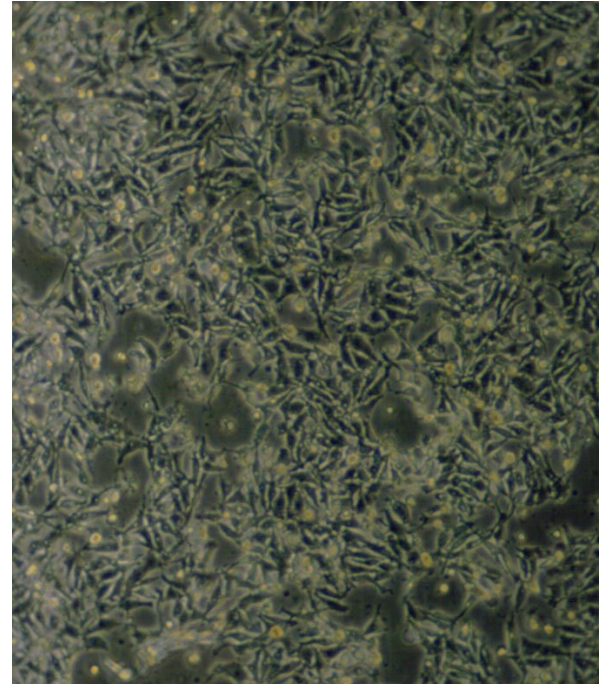
<b>Magenzellen HMO2</b>		<b>Leberzellen HepG2</b>	
<b>Flasche</b>	<b>Konfluenz [%]</b>	<b>Flasche</b>	<b>Konfluenz [%]</b>
M1	80 <sup>27</sup>	L1	50-60 <sup>27</sup>
M2	100	L2	60
M3	90	L3	70
M4	90	L4	80
M5	90	L5	80
M6	30 <sup>27</sup>	L6	50-60 <sup>27</sup>
M7	40 <sup>27</sup>	L7	60 <sup>27</sup>
M8	80-90	L8	60
M9	90	L9	80
M10	100	L10	90

*Tabelle 41: Konfluenz nach 24-stündiger Behandlung mit den in Tabelle 40 aufgeführten dotierten Substanzen.*

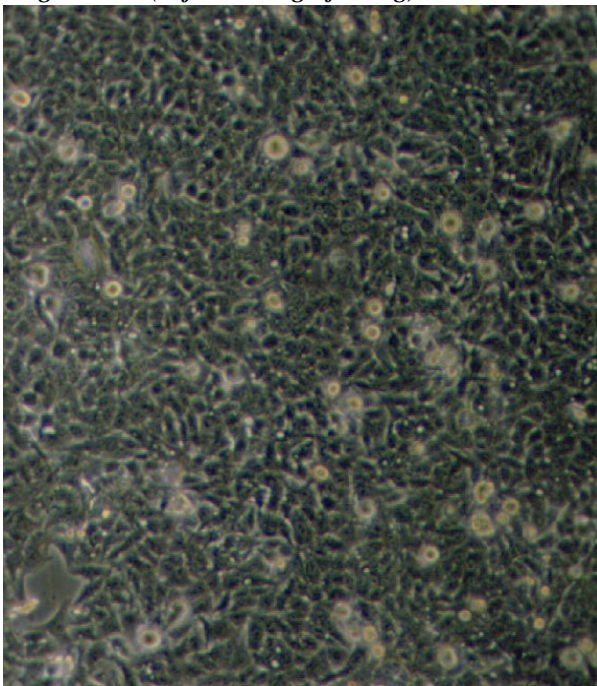
<sup>27</sup> Adhärente Zellen stark angegriffen und durch Schwenken ablösbar.



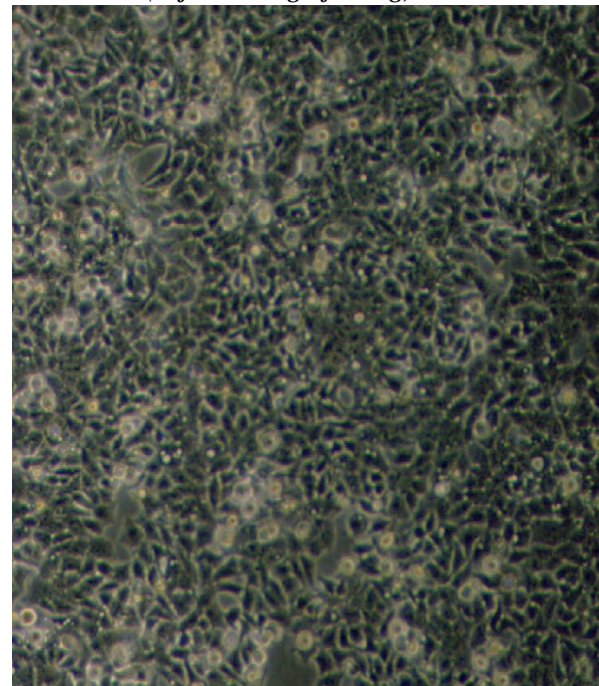
**Abbildung 89: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M1. Nach Thymol-Behandlung (85,1 µg/mL) angegriffene Magenzellen (40fache Vergrößerung).**



**Abbildung 90: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L1. Nach Thymol-Behandlung (85,1 µg/mL) angegriffene Leberzellen (40fache Vergrößerung).**

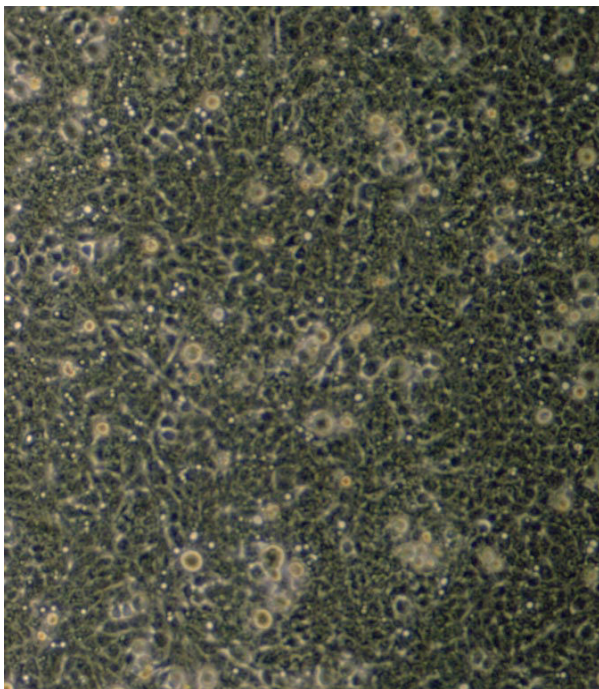


**Abbildung 91: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M5. Magenzellen nach Piperin-Behandlung (93,2 µg/mL) (40fache Vergrößerung).**

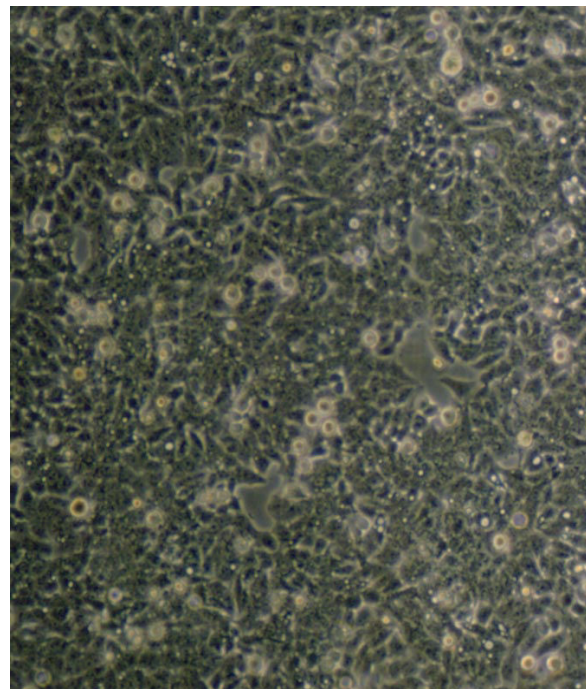


**Abbildung 92: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L5. Leberzellen nach Piperin-Behandlung (93,2 µg/mL) (40fache Vergrößerung).**

↔  
100 µm



*Abbildung 93: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M10. Optimale Konfluenz humaner Magenzellen im Medium ohne Zusatz (40fache Vergrößerung).*



*Abbildung 94: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L10. Optimale Konfluenz humaner Leberzellen im Medium ohne Zusatz (40fache Vergrößerung).*

↔  
100 µm

### 6.11.3 Aufarbeitung der Zellen und Mediumüberstände

#### 6.11.3.1 Aufarbeitung angegriffener Zellkulturen

Die adhärenenten Zellen der Flaschen M1, M6, M7, L1, L6 und L7 waren stark angegriffen und durch Schwenken der Flasche teilweise ablösbar. Ein Abdekantieren des Mediumüberstandes von den Zellen war daher nicht möglich.

Das Medium mit den darin enthaltenen (durch Schwenken und Erschütterung der Flasche durch Schlagen mit der Hand) abgelösten Zellen wurde in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 30 x g zentrifugiert, wobei die Zellen intakt bleiben. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert (Isolat Mediumüberstand) und bis zur HPLC-Analyse bei Lichtausschluß und  $-18\text{ °C}$  gelagert. Der Rückstand wurde mit 2 mL PBS gewaschen, zentrifugiert (30 x g), nach Verwerfen des Überstandes in 500 µL PBS resuspendiert und in 1,5 mL Eppendorf-Caps überführt. Die Suspension wurde 1 min im Ultraschallbad behandelt, um die Zellen zu fragmentieren und den Zellinhalt freizusetzen. Die Suspension wurde anschließend bei 11400 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen (Isolat Cytosol) und unter Lichtausschluß und  $-18\text{ °C}$  bis zur HPLC-Aufarbeitung gelagert. Das Sediment wurde in 200 µL PBS resuspendiert (Isolat Zellwand) und ebenfalls unter Lichtausschluß und bei  $-18\text{ °C}$  bis zur HPLC-Aufarbeitung gelagert.

### 6.11.3.2 Aufarbeitung adhärenter Zellkulturen

Das Medium über den adhärennten Zellen wurde abdekantiert (Isolat Mediumüberstand) und unter Lichtausschluß bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur HPLC-Aufarbeitung gelagert. Die adhärennten Zellen wurden abgeschabt, mit 2 mL PBS in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei  $30 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Die Zellen wurden in 2 mL PBS resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Das Sediment wurde anschließend in 500  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen, in 1,5 mL Eppendorf-Caps überführt und 1 min im Ultraschallbad behandelt, um die Zellen zu fragmentieren und den Zellinhalt freizusetzen. Die Suspension wurde anschließend bei  $11400 \times g$  zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Isolat Cytosol) und unter Lichtausschluß bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur HPLC-Aufarbeitung gelagert. Das Sediment wurde in 200  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert (Isolat Zellwand) und ebenfalls unter Lichtausschluß bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur HPLC-Aufarbeitung gelagert.

### 6.11.3.3 Aufarbeitung der Isolate für die HPLC-Trennung

Isolat Mediumüberstand: Zur HPLC-Analyse wurde der Überstand direkt eingesetzt, bzw. auf die für die HPLC übliche gemessene Konzentration mit dem jeweiligen HPLC-Eluenten verdünnt.

Isolat Cytosol: Das Isolat Cytosol wurde mit 500  $\mu\text{L}$  des jeweiligen HPLC-Eluenten versetzt (Endvolumen 1 mL), bei  $11400 \times g$  zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

Isolat Zellwand: Das Isolat Zellwand wurde mit 800  $\mu\text{L}$  des jeweiligen HPLC-Eluenten versetzt (Endvolumen 1 mL), bei  $11400 \times g$  zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Übergang antioxidativer Gewürzinhaltsstoffe aus Rosmarin und Thymian aus dem Futter in tierische Produkte analytisch untersucht. Gleichzeitig konnte dabei der Übergang von Piperin untersucht werden, das im Thymianextrakt als Kreuzkontamination enthalten war.

Die Fütterungsversuche wurden schwerpunktmäßig an Legehennen durchgeführt, wobei die Eier auf die Gewürzinhaltsstoffe untersucht wurden. Neben der Fütterung von Legehennen wurden auch orientierte Fütterungsversuche mit Rosmarinextrakt an Kühen durchgeführt und der Übergang von Carnosolsäure von dem Futter in die Milch untersucht.

Der Schwerpunkt der Arbeit bildete die Ausarbeitung einer geeigneten Analysenmethode zur Untersuchung von Eigelb und Eiklar auf antioxidative Inhaltsstoffe von Rosmarin und Thymian. Dabei stellte sich vor allen Dingen der analytische Nachweis der Gewürzinhaltsstoffe im Eigelb aufgrund der sehr komplexen Matrix als Herausforderung dar. Durch breite Variation konnte eine Probenaufarbeitung entwickelt werden, die eine hervorragende Abtrennung der Matrix und damit eine problemlose HPLC-Untersuchung ermöglichte. Mit Hilfe der neu entwickelten Probenaufarbeitung ist es nun erstmals möglich Carnosolsäure, Thymol, p-Cymen-2,3-diol und Piperin im unteren ng/g-Bereich im Eigelb nachzuweisen.

Die Probenaufarbeitung sieht zunächst eine Extraktion des Eigelbes mit Cyclohexan/Ethanol vor. Im nächsten Schritt wird die Probe durch Adsorption von Matrixbestandteilen an Sephadex-LH-20 (Material für die Gelpermeationschromatographie) gereinigt. Die danach noch enthaltenen Lipide werden durch Kristallisation und anschließendem Abzentrifugieren abgetrennt. Eine Abtrennung der in der Matrix verbleibenden Proteine wird durch Fällung mit Acetonitril/Wasser erreicht. Die abschließende Reinigung erfolgt danach durch eine neu entwickelte Festphasenextraktion an H-RP-Material. Die erhaltene Lösung hat eine so geringe Matrixbelastung, daß sie auch nach Aufkonzentrierung problemlos mittels HPLC untersucht werden kann.

Die Aufarbeitung der untersuchten Substanzen im Eiklar erfolgte durch Fällung der Proteine mit Acetonitril. Mit Hilfe dieser Probenaufarbeitung konnten Carnosolsäure, p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im unteren ng/g-Bereich im Eiklar nachgewiesen und bestimmt werden.

Die HPLC-Methode zur Untersuchung von Carnosol und Carnosolsäure mit elektrochemischer Detektion konnte dahingehend optimiert werden, daß die Untersuchung dieser Substanzen durch eine isokratische Elution innerhalb von 15 Minuten ermöglicht

wurde, so daß sich die Analysenzeit gegenüber der zu Beginn der Untersuchungen verwendeten Gradientenelution deutlich verkürzte.

Zur HPLC-Analyse des Eies nach Fütterung mit Thymianextrakt wurde die Chromatographie an RP-18 (ODS-Hypersil) modifiziert. Mit Hilfe dieser optimierten HPLC-Methode konnten die vier Piperinisomere angetrennt und von p-Cymen-2,3-diol und Thymol basisliniengetreunt werden, so daß eine gleichzeitige Analyse der Inhaltsstoffe des Eies möglich war.

Um die Piperinisomere einzeln zu untersuchen, wurde eine HPLC-Trennung an einer kommerziell erhältlichen Säule entwickelt. Die Piperinisomere konnten an einer mit Silbernitrat belegten Kieselgelsäule basisliniengetreunt innerhalb von 35 Minuten analysiert werden. Mit Hilfe dieser HPLC-Methode konnten die Isomere isoliert und eindeutig charakterisiert werden, so daß die Elutionsreihenfolge sowohl für die Silberionen-chromatographie als auch für die Trennung an ODS-Hypersil bestimmt werden konnte.

Die Detektion erfolgte aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität für die antioxidativen Inhaltsstoffe p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Carnosolsäure mittels elektrochemischer Detektion. Aufgrund der geringen Oxidationsempfindlichkeit von Piperin wurde diese Substanz mittels UV-Detektion analysiert.

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methoden konnte die lichtinduzierte Isomerisierung des Piperins in alle entstehenden Isomere untersucht und die Halbstufenpotentiale von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin bestimmt werden.

Nach der Ausarbeitung leistungsfähiger Analysenmethoden wurden im zweiten Teil der Arbeit Eier aus der Fütterung von Hühnern mit Rosmarin- und Thymianextrakt untersucht. Dazu wurden jeweils Gruppen von 3 bis 8 Hühnern mit Futter unter Zusatz von Rosmarinextrakt bzw. Thymianextrakt gefüttert. Weiterhin wurden Legehennen als Blindprobe mit Futter ohne Zusatz von Gewürzextrakt gefüttert. Die Versuche unter Zusatz von Gewürzextrakt erfolgten bei zwei verschiedenen Konzentrationen, um eine Abhängigkeit des Überganges von der dotierten Konzentration zu untersuchen. Bei den Fütterungsversuchen konnte in allen Fällen eindeutig ein Übergang der antioxidativen Inhaltsstoffe aus Thymian (p-Cymen-2,3-diol und Thymol), des antioxidativen Inhaltsstoffes aus Rosmarinextrakt (Carnosolsäure) und von dem ebenfalls im Thymianextrakt enthaltenen Piperin nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich in allen Fällen qualitativ ein ähnliches Bild: In den ersten zwölf Tagen der Fütterung stieg parallel zur Bildung der Follikel im Ovar der Legehenne die Konzentration der Gewürzinhaltsstoffe im Eigelb an. Im weiteren Verlauf der Fütterung blieb die Konzentration auf konstantem Niveau, um nach Beendigung der Behandlungsperiode wieder abzunehmen.

Der Übergang der Gewürzinhaltsstoffe aus dem Futter in das Eigelb war jedoch in allen Fällen extrem gering. So gingen bei Fütterung mit piperinhaltigem Thymianextrakt 0,006 %

vom Thymol, 0,004 % vom p-Cymen-2,3-diol und 0,15 % vom Piperin aus dem Futter in das Eigelb über. Bei Fütterung unter Zusatz von Rosmarinextrakt gingen 0,002 % von der Carnosolsäure in das Eigelb über. Damit erscheint es ausgeschlossen, daß durch Fütterung unter Zusatz von Thymian- oder Rosmarinextrakt die Eigenschaften von Eigelb signifikant verändert werden können.

Nach der Fütterung von piperinhaltigem Thymianextrakt konnten im Eigelb die Piperin-isomere Chavicin, Isochavicin und Isopiperin nachgewiesen und bestimmt werden. Da die Isomere nicht in dem Thymianextrakt enthalten waren, müssen sie durch einen Stoffwechselfvorgang in den Legehennen gebildet und in das Eigelb eingelagert worden sein.

Die Untersuchung des Eiklars zeigt, daß die Konzentrationen der Gewürzinhaltsstoffe im Eiklar noch einmal deutlich geringer als im Eigelb waren. p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Carnosolsäure konnten nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarin- bzw. Thymianextrakt im Eiklar nicht nachgewiesen werden. Nachweisbar hingegen waren Piperin und – wie im Eigelb – die Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin. Das Eiklar wies jedoch im Vergleich zu dem Eigelb ein unterschiedliches Isomerenverhältnis auf.

Im Anschluß an die Fütterungsversuche mit Legehennen wurde untersucht, ob die Fütterung mit den Gewürzextrakten pathologische Veränderungen bei den Versuchstieren hervorgerufen hatte. Die Untersuchung der Legehennen ergab, daß die Tiere gesund waren und die Fütterung mit Gewürzextrakten keine Veränderungen hervorrief.

In dem bei der Sektion entnommenen Legehennenblut konnte nach der Fütterung von piperinhaltigem Thymianextrakt p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Blutplasma nachgewiesen werden. Weiterhin konnten auch hier als Stoffwechselprodukte die Piperinisomere nachgewiesen werden. Nach Fütterung der Legehennen mit Rosmarinextrakt konnte in dem Blutserum Carnosolsäure nachgewiesen werden.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen deutlich, daß die Untersuchung des Eigelbes das Stoffwechselverhalten der untersuchten Substanzen im Blut widerspiegelt. So konnten sowohl im Blut als auch im Eigelb die untersuchten Substanzen nachgewiesen werden. Zudem war eine Isomerisierung von Piperin in den Matrices nachweisbar.

Anhand von Zellkulturversuchen wurde ein Übergang der Gewürzinhaltsstoffe in humane Magen- und Leberzellen untersucht. Hierbei konnte sowohl ein Übergang von Carnosolsäure und Thymol als auch von Piperin in die Zellen festgestellt werden. Für Piperin konnte außerdem eine Stoffwechselaktivität der Zellen nachgewiesen werden. Nach Dotierung der Zellen mit Piperin bzw. Pfefferextrakt konnten die Isomere Chavicin und Isopiperin detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde desweiteren die Auswirkung des Überganges der Gewürzinhaltsstoffe auf den Geschmack der Eier untersucht. Eine Geschmacksbeeinflussung war nur in

sehr geringem Maße gegeben, da lediglich das Eigelb aus dem Fütterungsversuch mit Thymianextrakt signifikant von einem Kontrolleigelb unterschieden werden konnte. Bei allen anderen untersuchten Proben konnten keine relevanten Geschmacksunterschiede festgestellt werden.

Um die Fütterungsversuche der Legehennen mit einer anderen Tierart vergleichen zu können, wurden orientierende Fütterungsversuche unter Zusatz von Rosmarinextrakt mit Kühen durchgeführt. Ein Übergang von Carnosolsäure in die Milch konnte nicht nachgewiesen werden. Damit ist der Übergang von Carnosolsäure in die Milch noch einmal deutlich geringer als der Übergang von Carnosolsäure in die Eier bei der Fütterung von Legehennen.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure aus Gewürzextrakten in biologischen Systemen verfügbar sind und daß im Fall von Piperin eine stoffwechselbedingte Isomerisierung in die *cis/trans*-Isomere stattfindet. Die neu entwickelten Analysemethoden zeichnen sich durch ihre Spurenmatrixtrennung aus und eröffnen ein weites Feld für weitere Untersuchungen.



## 8 Literaturverzeichnis

Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Fd Chem Toxic* 32:31-36

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Juni 1991, L, Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in Eiern und Eiprodukten, 05.00/14

Archer AW (1986) Separation and determination of piperine in ground pepper by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr* 351:595-598

Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J (1992) Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica* 22:257-268

Austgulen LT, Solheim E, Scheline RR (1987) Metabolism in Rats of p-Cymene Derivatives: Carvacrol and Thymol, *Pharmacol Toxicol* 61:98-102

Banerji A, Sarkar M, Ghosal T, Chandra S (1984) Carbon-13 NMR Spectra of Piper Alkalmides and Related Compounds, *Organic Magnetic Resonance* 22:734-736

Belitz HD, Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg

Belyavin CG (1994) Physiologie der Eibildung, in: Ternes W, Acker L, Scholtyssek S (Herausgeber) *Ei und Eiprodukte*, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

Bestmann HJ, Erler J, Vostowsky O (1985) Extraction of thyme with liquid carbon dioxide and laboratory scale, *Z Lebensm Unters Forsch* 180:491-493

Bhat BG, Chandrasekhara N (1986) Studies on the metabolism of piperine: absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats, *Toxicology* 40:83-92

Bhat BG, Chandrasekhara N (1987) Metabolic disposition of piperine in the rat, *Toxicology* 44:99-106

Boros G (1981) *Unsere Küchen- und Gewürzkräuter*, 4. Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Botsoglou NA, Yannakopoulos AL, Fletouris DJ, Tserveni-Goussi AS, Fortomaris PD (1997) Effect of Dietary Thyme on the Oxidative Stability of Egg Yolk, *J Agric Food Chem* 45:3711-3716

Brieskorn CH, Dömling HJ (1969) Carnosolsäure, der wichtige antioxidativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes, *Z Lebensm Unters Forsch* 141:10-16

- Chauhan SK, Kimothi GP, Singh BP, Agrawal S (1998) Development of HPLC method to determine piperine in different Piper species, *Indian-Drugs* 35:408-411
- Chiang GH (1986) HPLC Analysis of Capsaicins and Simultaneous Determination of Capsaicins and Piperine by HPLC-ECD and UV, *J food sci* 51:499-503
- Chipault JR, Mizuno GR, Hawkins JM, Lundberg WO (1952) The antioxidant properties of natural spices, *Food Research* 17:46-55
- Chipault JR, Mizuno GR, Lundberg WO (1955) The antioxidant properties of spices in Oil-in-Water-Emulsions, *Food Research* 20:443-448
- Chipault JR, Mizuno GR, Lundberg WO (1956) The antioxidant properties of spices in Food, *Food Technol* 10:209-211
- Christen HR, Vögtle F (1990) *Organische Chemie-Von den Grundlagen zur Forschung, Band II*, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main
- Conner DE, Beuchat LR (1984) Effects of essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeast, *J Food Sci* 49:429-434
- Cuvelier ME, Berset C, Richard H (1994) Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*), *J Agric Food Chem* 42:665-669
- Cuvelier ME, Berset C, Richard H (1994) Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*), *J Agric Food Chem* 42:665-669
- De Cleyn R, Verzele M (1975) Constituents of peppers, Part VII Spectroscopic structure elucidation of piperine and its isomers, *Bull Soc Chim Belg* 84:435-438
- Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Dezember 1986, Sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung, DIN 10951
- Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Dezember 1986, Sensorische Prüfverfahren, Paarweise Unterschiedsprüfung, DIN 10954
- Dobson G, Christie WW, Nikolova-Damyanova B (1995) Silver Ion Chromatography of Lipids and Fatty Acids, *J Chromatogr B* 671:197-222
- Domokos J, Héthelyi, É, Pálinkás J, Szirmai S, Tulok M (1997) Essential Oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Hungarian Origin, *J Essent Oil Res* 9:41-45
- Elfman-Börjesson I, Van der Hark S, Härröd M (1997) Gradients of n-Heptane and Acetonitrile in Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography Analyses of *cis* and *trans* Bonds in Lipid, *JAACS* 74:1177-1180
- Engelhardt H (1977) *Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin

- Fagen HJ, Kolen EP, Hussong RV (1955) Spectrophotometric method for determining piperine in oleoresins of black pepper, *J Agric Food Chem* 3:860-862
- Farag RS, Badei AZMA, El Baroty GSA (1989a) Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation, *J Am Oil Chem Soc* 66:800-804
- Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, El Baroty GSA (1989b) Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media, *J Am Oil Chem Soc* 66:792-799
- Franke W (1992) *Nutzpflanzenkunde*, 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart
- Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E (1996a) Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion, *J Agric Food Chem* 44:131-135
- Frankel EN, Huang SW, Prior E, Aeschbach R (1996b) Evaluation of Antioxidant Activity of Rosemary Extracts, Carnosol and Carnosic Acid in Bulk Vegetable Oils and Fish Oil and Their Emulsions, *J Sci Food Agric* 72:201-208
- Frankenhäuser H (1987) Wo der Pfeffer wächst: Zur Biologie exotischer Nutzpflanzen, *Naturhistorisches Museum Mainz, Museumsführer Nr. 14*
- Genest C, Smith DM, Chapman DG (1963) A Critical Study of Two Procedures for the Determination of Piperine in Black and White Pepper, *Agric Food Chem* 11:508-512
- Geoffroy M, Lambelet P, Richert P (1994) Radical intermediates and antioxidants: an ESR study of radicals formed on carnosic acid in the presence of oxidized lipids, *Free Rad Res* 21:247-258
- Gerhardt U (1990) *Gewürze in der Lebensmittelindustrie: Eigenschaften – Technologien - Verwendung*, Behr's Verlag, Hamburg
- Gerken M, Krampitz G, Petersen J (1994) Morphologischer Aufbau des Eies, in: Ternes W, Acker L, Scholtyssek S (Herausgeber) *Ei und Eiprodukte*, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Glasl H (1984) Zur Isomerisierung des Piperins, *Deutsche Lebensm Rundsch* 5:148-151
- Gööck R (1965) *Das Buch der Gewürze*, Mosaik Verlag, Hamburg
- Grewe R, Freist W, Neumann H, Kersten S (1970) Über die Inhaltsstoffe des schwarzen Pfeffers, *Chem Ber* 103:3752-3770
- Gross H, Rieche A, Matthey G (1963)  $\alpha$ -Haloethers XIII New procedure for the preparation of phenol aldehydes, *Chem Ber* 96: 308-313
- Guidotti M, Vitali M (1998) Identification of volatile organic compounds present in different honeys through SPME and GC-MS, *Ind Aliment* 37:351-353

- Guillén MD, Manzanos MJ (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant, Food Chemistry 63:373-383
- Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Date H, Kataoka S, Tamura Y, Mizutani K (1996) Antiperoxidative Components in *Thymus vulgaris*, Planta Medica 62:217-221
- Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A (1995) Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation by Diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*, Planta Med 61:333-336
- Herrmann K (1961) Über die antioxidative Wirkung der Labiatendrogen und der in ihnen enthaltenen Labiatensäure („Labiatergerbstoff“), Z Lebensm Unters Forsch 116:224
- Herrmann K (1973) Phenolische Inhaltsstoffe als natürliche Antioxidantien, Fette, Seifen, Anstrichmittel 75:499
- Herrmann K (1993) Phenolcarbonsäuren pflanzlicher Lebensmittel als Antioxidantien, Gordian 93:92-96
- Herrmann K (1994) Antioxidativ wirksame Pflanzenphenole sowie Carotinoide als wichtige Inhaltsstoffe von Gewürzen, Gordian 7-8:113-117
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (1987) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Holm Y, Aho E, Hiltunen R (1988) Analysis of the essential oil from *Thymus vulgaris* by headspace gas chromatography, Acta Pharm Fenn 97:13-19
- Hopia AI, Huang SW, Schwarz K, German JB, Frankel EN (1996) Effect of Different Lipid Systems on Antioxidant Activity of Rosemary Constituents Carnosol and Carnosic Acid with and without  $\alpha$ -Tocopherol, J Agric Food Chem 44:2030-2036
- Hu SL, Ao P, Liu D (1996) Pharmacognostical studies on the roots of *Piper nigrum* L.: Determination of essential oil and piperine, Acta Hort 426:179-181
- Huang SW, Frankel EN, Schwarz K, Aeschbach R, German JB (1996) Antioxidant Activity of Carnosic Acid and Methyl Carnosate in Bulk Oils and Oil-in-Water Emulsions, J Agric Food Chem 44:2951-2956
- Inatani R, Nakatani N, Fuwa H (1983) Antioxidative Effect of Constituents of Rosemary, Agric Biol Chem 47:521-528
- Inatani R, Nakatani N, Fuwa H, Seto H (1982) Structure of a New Antioxidative Phenolic Diterpene Isolated from Rosemary, Agric Biol Chem 46:1661-1666
- Jackson SAL, Hay RKM (1994) Characteristics of varieties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) for use in the UK: Oil content, composition and related characters, J Hort Sci 69:275-281
- Kaufmann HP, Baya AW (1967) Pro- und Antioxidantien auf dem Fettgebiet, Fette, Seifen, Anstrichmittel 69:236

- Kermasha S, Goetghebeur M, Dumont J (1994) Separation and Characterization of Pepper-Contaminated Cinnamon Using HPLC Analyses, *Lebensm Wiss Technol* 27:578-582
- Khajuria N, Zutshi U, Bedi KL (1998) Permeability characteristics of piperine on oral absorption – An active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer, *Indian Journal of Experimental Biology* 36:46-50
- Kielwein G (1994) *Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene*, 3. Aufl., Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- Kiermeier F, Haevecker U (1972) *Sensorische Beurteilung von Lebensmitteln*, J.F. Bergmann, München
- Kiuchi F, Nakamura N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H (1988) Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. IV Isolation and Identification of Larvicidal principles in Pepper, *Chem Pharm Bull* 36:2452-2465
- Kivanc M, Akgül A (1988) Effect of some Essential Oil Components on the Growth of Food-borne Bacteria and Synergism with Some Food Ingredients, *Flavour and Fragrance* 3:95-98
- König WA, Krüger A, Icheln D, Runge T (1992) Enantiomeric Composition of the Chiral Constituents in Essential Oils, Part 1: Monoterpene Hydrocarbones, *Journal of High Resolution Chromatography* 15:184-189
- Kulevanova S, Ristic M, Stafilov T, Dorevski K, Ristov T (1997) Composition of essential oils of *Thymus tosevii* ssp. *tosevii* and *Thymus tosevii* ssp. *substriatus* from Macedonia, *Pharmazie* 52:382-386
- Küster H (1987) *Wo der Pfeffer wächst: Lexikon zur Kulturgeschichte der Gewürze*, C.H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München
- Lacroix M, Smoragiewicz W, Pazdernik L, Koné MI, Krzystyniak K (1997), Prevention of lipid radiolysis by natural antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Food Research International* 30:457-462
- Lawrence BM (1998) *Progress in Essential Oils*, *Perfumer & Flavorist* 23:63-82
- Li H, Jia Z, Zhang M, Zhou J (1986) Determination of piperine in *Piper longum* L. by HPLC, *Yaowu-Fenxi-Zazhi* 6:346-348
- Lindberg Madsen H, Andersen L, Christiansen L, Brockhoff P, Bertelsen G (1996) Antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in minced, cooked pork meat, *Z Lebensm Unters Forsch* 203:333-338
- Lindberg Madsen H, Sorensen B, Skibsted LH, Bertelsen G (1998) The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness, *Food Chem* 63:173-180
- Loeffler K (1994) *Anatomie und Physiologie der Haustiere*, 9. Aufl., Ulmer-Verlag, Stuttgart

- Matissek R, Schnepel FM, Steiner G (1992) Lebensmittelanalytik – Grundzüge, Methoden, Anwendungen, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Heidelberg
- Meier B (1996) Unterlagen zum Kurs „Zellkulturtechnik“ am Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- Meyer VR (1992), Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, 7. Aufl., Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main
- Miura K, Inagaki T, Nakatani N (1989a) Structure and activity of new deodorant biphenylic compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.) Chem Pharmacol Bull 37:1816-1819
- Miura K, Nakatani N (1989b) Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.) Agric Biol Chem 53:3043-3045
- Miura K, Nakatani N (1989c) Antioxidative activity of biphenylic compounds from Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Chem Express 4:237-240
- Möllenbeck S, König T, Schreier P, Schwab W, Rajaonarivony J, Ranarivelo L (1997) Chemical Composition and Analyses of Enantiomers of Essential Oils from Madagascar, Flavour and Fragrance Journal 12:63-69
- Mutschler E (1991) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl., Wiss. Ver.-Ges., Stuttgart
- Nakatani N, Inatani R (1984) Constituents of spices of the family Labiatae. Part III. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol, Agric Biol Chem 48:2081-2085
- Nakatani N, Miura K, Inagaki T (1989) Structure of new deodorant biphenylic compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their activity against methyl mercaptan, Agric Biol Chem 53:1375-1381
- Narahimharao BGV, Adinarayana S (1970a) Untersuchungen der antimikrobiellen Wirksamkeit einiger ätherischer Öle; Riechstoffe, Aromen, Körperpflegern 20:215-220
- Narahimharao BGV, Nigam SS (1970b) The invitro antimicrobial efficiency of essential oils, Ind J Med Res 58:627-633
- Narahimharao BGV, Nigam SS (1970c) The invitro antimicrobial efficiency of some essential oils, Flavour Ind 10:725-729
- Narahimharao BGV, Subberao R (1971) Die Wirksamkeit äther. Öle gegenüber pathogenen Fungi, Teil I, Ibid 21 7:214-244
- Narahimharao BGV, Subberao R (1972) The efficiency of essential oils on pathogenic fungi, Teil II, Flavour Ind 7:368-370

- Ndiege IO, Otieno DO, Budenberg WJ, Hassanali A (1994) The use of Reverse-Phase C<sub>18</sub>-Bonded Silica for the Trapping, Concentration and Analysis of Headspace Vapour from Model Organic Compounds, Banana Pseudostem and Black Pepper, *J Sci Food Agric* 64:47-52
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V – Anatomie der Vögel*, 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Hamburg
- Nikolova-Damyanova B (1992) In: *Advances in Lipid Methodology-One*, Autor: WW Christie, Oily Press, 181-237
- Norman J (1991) *Das große Buch der Gewürze*, AT Verlag Aarau, Stuttgart
- Okamura N, Fujimoto Y, Kuwabara S, Yagi A (1994) High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *J Chromatogr A* 679:381-386
- Özcan M (1998) Inhibitory effects of spice extracts on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 strain, *Z Lebensm Unters Forsch* 207:253-255
- Pandit VA, Shelef LA (1994) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Food Microbiology* 11:57-63
- Pino JA, Estarrón M, Fuentes V (1998) Essential Oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Cuba, *J Essent Oil Res* 10:111-112
- Piyachaturawat P, Glinsukon T, Toskulkao C (1983) Acute and subacute Toxicity of piperine in mice, rats and hamsters, *Toxicol Lett*, 351-359
- Pokorný J, Nguyen HTT, Korczak J (1997) Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil, *Nahrung* 41:176-177
- Pouchert CJ (1983) *The Aldrich Library of NMR-Spectra, Edition II, Vol. 1*:822
- Rao LJ, Singh M, Raghavan B, Abraham KO (1997) Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact of drying on its flavor quality, *J Food Qual* 21:107-115
- Ravid U, Putievsky E, Katzir I, Lewinsohn E, Dudai N (1997) Identification of (1R)(+)-Verbenone in Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Flavour and Fragrance Journal* 12:109-112
- Reschke A (1983) Capillargaschromatographische Bestimmung der Rosmarinsäure in Blattgewürzen, *Z Lebensm Unters Forsch* 176:116-119
- Rex D, Pabst I, Wehling C (1994) *Kräuter und Gewürze*, Unipart-Verlag, Stuttgart
- Rhyu HY (1979) Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the Labiatae family, *J Food Sci* 44:1373-1378

- Salzer UJ (1982) Antimikrobielle Wirkung einiger Gewürzextrakte und Würzmischungen, *Fleischwirtschaft* 62:885-887
- Schwarz K (1992) Stabilität von Fritierfett bei Lagerung und thermischer Belastung, Dissertation, Fachbereich Geistes- und Sozialwissenschaften der Universität Hannover
- Schwarz K, Ernst H, Ternes W (1996) Evaluation of Antioxidative Constituents from Thyme, *J Sci Food Agric* 70: 217-223
- Schwarz K, Ternes W (1992a) Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC, *Z Lebensm Unters Forsch* 195:95-98
- Schwarz K, Ternes W (1992b) Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes, *Z Lebensm Unters Forsch* 195:99-103
- Schwarz K, Ternes W, Schmauderer E (1992c) Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes, *Z Lebensm Unters Forsch* 195:104-107
- Seidemann J (1993) Würzmittel-Lexikon, Behr's Verlag, Hamburg
- Seidemann J, Siebert G (1987) Würzmittel, 1. Aufl., VEB Fachbuchverlag, Leipzig
- Sieweck F (1990) Exotische Gewürze: Herkunft, Verwendung, Inhaltsstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel
- Solinas V, Gessa C, Delitala LF (1981) High-performace liquid chromatographic analysis of carvacrol and thymol in the essential oil of *Thymus capitatus*, *J Chromatogr* 219:332-337
- Spotti E, Busolli C, Cortellazzi C, Cacchioli C (1997) The use of Thymol in environmental microbial decontamination, *Industria Conserve* 72:19-27
- Stahl-Biskup E (1986) Essential oils of norwegian thyme species; II. *Thymus pulegioides*, *Planta Medica* 52:233-235
- Sur SV, Tuljupa FM, Sur LI (1991) Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants, *J Chromatogr* 542:451-458
- Surrey AR (1955) Pyrogallol 1-Monomethyl Ether, *Org Synthesis Coll* 3: 759-760
- Tackmann W (1994) Repetitorium der Histologie, 2. Teil: Organe und Systeme, Tackmann-Verlag, Berlin
- Takácsová M, Pribela A, Faktorová M (1995) Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper and oregano, *Die Nahrung* 39:241-243



- Takagi K, Ochiai J, Okuyama T (1988) Analysis of Gamma Irradiated Pepper Constituents (Part 4) – Analysis of Piperine and its Isomers by Reversed Phase HPLC and Effect of Gamma Irradiation on Isomerization of Piperine-, Food-Irradiation [Shokuhin-Shosha] 23:51-56
- Takenaka M, Watanabe T, Sugahara K, Harada Y, Yoshida S, Sugawara F (1997) New Antimicrobial Substances against *Streptomyces scabies* from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), Biosci Biotech Biochem 61:1440-1444
- Täufel A, Ternes W, Tunger L, Zobel M (1993) Lebensmittellexikon, 3. Aufl., Behr's Verlag
- Tena MT, Valcárcel M, Hidalgo PJ, Uebera JL (1997) Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication, Anal Chem 69:521-526
- Ternes W (1994) Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung, 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg
- Ternes W, Gronemeyer M, Schwarz K (1995a) Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol and carvacrol in different foodstuffs, Z Lebensm Unters Forsch 201:544-547
- Ternes W, Schwarz K (1995b) Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* IV. Determination of carnosic acid in different foodstuffs, Z Lebensm Unters Forsch 201:548-550
- Verzele M, Mussche P, Qureshi SA (1979) High-performance liquid chromatographic analysis of the pungent principles of pepper and pepper extracts, J Chromatogr 172:493-497
- Verzele M, Redant G, Qureshi S, Sandra P (1980) High-Temperature quantitative glass capillary gas chromatography, Analysis of piperine and of Quinine-Quinidine, J Chromatogr 199:105-112
- Verzele M, Use L, Van Kerrebroeck M (1984) Problem of the internal standard in high-performance liquid chromatography, J Chromatogr 289:333-337
- Verzele M, Van Damme F, Schuddinck G, Vyncke P (1989) Quantitative microscale liquid chromatography of piperine in pepper and pepper extracts, J Chromatogr 471:335-346
- Vösgen B, Hermann K (1980) Flavonoglycoside von Pfeffer, Gewürznelken und Piment, Z Lebensm Unters Forsch 170:204-209
- Weaver KM, Neale ME, Laneville A (1988) Liquid Chromatographic Method for Determination of Piperine in *Piper nigrum* (Black and White Pepper), J Assoc off anal Chem 71:53-55
- Weinreich B (1998) Frischeschutz mit „weißer Weste“, ZFL 49:24-26

Wenkert E, Fuchs A, McChesney JD (1965) Chemical Artifacts from the Family Labiatae, J Org Chem 30:2931-2934

Wood AB, Barrow ML, James DJ (1988) Piperine Determination in Pepper (*Piper nigrum* L.) and its Oleoresins – A Reversed-phase High-performance Liquid Chromatographic Method, Flavour and Fragrance Journal 3:55-64

Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG (1999) Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, Food Chem 64:59-66

Zegarska Z, Rafalowski R, Amarowicz R, Karamac M, Shahidi F (1998) Stabilization of butter with deodorized rosemary extract, Z Lebensm Unters Forsch 206:99-102

## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis der Abkürzungen

BG	Bestimmungsgrenze
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot (-Spektroskopie)
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, Hochauflösende Flüssigkeit- schromatographie
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl an Messungen
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernmagnetische Resonanz (-Spektroskopie)
NWG	Nachweisgrenze
S/N	Signal/Noise, Signal zu Rausch-Verhältnis
TEAOH	Tetraethylammoniumhydroxid
UV	Ultraviolett
x g	Gravitationskonstante g

### 9.2 Verzeichnis der Hersteller

Aldrich	Steinheim, Deutschland
BASF-AG	Ludwigshafen, Deutschland
Boehringer Mannheim	Mannheim, Deutschland
Bruker	Reinstetten, Deutschland
CAL	Grasse, Frankreich
Chrompack	Frankfurt am Main, Deutschland
Finnigan MAT	Bremen, Deutschland
Knauer	Berlin, Deutschland
Kraul & Wilkening u. Stelling KG	Hannover, Deutschland
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Methrom	Herisau, Schweiz
Perkin Elmer	Überlingen, Deutschland
Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Raps	Kulmbach, Deutschland
Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Schleicher & Schüll	Dassel, Deutschland
Shimadzu	Duisburg, Deutschland
Sigma	Steinheim, Deutschland
Waters	Eschborn, Deutschland

### 9.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Wirkung von Antioxidantien als Radikalfänger [Belitz (1992)].	4
Abbildung 2: <i>Rosmarinus officinalis</i> aus Boros (1981).	6
Abbildung 3: Antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe von <i>Rosmarinus officinalis</i> .	6
Abbildung 4: <i>Thymus vulgaris</i> aus Boros (1981).	7
Abbildung 5: Antioxidativ wirksame Substanzen aus <i>Thymus vulgaris</i> .	8
Abbildung 6: <i>Piper nigrum</i> aus Boros (1981).	8
Abbildung 7: Piperin, Isopiperin, Chavicin, Isochavicin.	9
Abbildung 8: Übersicht der Aufarbeitungsentwicklung zur Isolierung von Gewürzinhaltsstoffen aus Eigelb.	26
Abbildung 9: HPLC-Trennung von Rosmarinextrakt an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	34
Abbildung 10: Trennung Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) (Säule 4) mit UV-Detektion bei 340 nm.	38
Abbildung 11: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 % Thymianextrakt zum Futter, 9. Fütterungstag), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm.	38
Abbildung 12: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 % Thymianextrakt zum Futter, 9. Fütterungstag), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	38
Abbildung 13: Die vorangegangenen beiden Chromatogramme in übereinandergelegter Darstellung.	38
Abbildung 14: UV-Spektrum Piperin.	39
Abbildung 15: UV-Spektrum Chavicin.	40
Abbildung 16: UV-Spektrum Isopiperin.	40
Abbildung 17: UV-Spektrum Isochavicin.	40
Abbildung 18: Massenspektrum von Piperin	41
Abbildung 19: Postuliertes Fragmentierungsmuster von Piperin.	42
Abbildung 20: Übereinandergelegte HPLC-Chromatogramme der mittels Silberionenchromatographie isolierten Fraktionen.	43
Abbildung 21: Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, Piperin, HPLC-Trennung an Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm.	47
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm von piperinhaltigem Thymianextrakt (4,46 µg), Trennung auf einer Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm.	48
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm von Pfefferextrakt (0,69 µg), Trennung an einer Silberionen-Phase mit UV-Detektion bei 340 nm.	48
Abbildung 24: FT-IR-Spektrum von Chavicin.	50
Abbildung 25: FT-IR-Spektrum von Isopiperin.	50
Abbildung 26: FT-IR-Spektrum von Isochavicin.	50
Abbildung 27: FT-IR-Spektrum von Piperin.	50
Abbildung 28: <sup>1</sup> H-NMR Chavicin in CDCl <sub>3</sub> .	52
Abbildung 29: <sup>1</sup> H-NMR Isopiperin in CDCl <sub>3</sub> .	52
Abbildung 30: <sup>1</sup> H-NMR Isochavicin in CDCl <sub>3</sub> .	52

---

Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}$ Piperin in $\text{CDCl}_3$ .	52
Abbildung 32: Rosmarinextrakt, HPLC -Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	55
Abbildung 33: Eigelb ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC -Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	55
Abbildung 34: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt (Zusatz 0,57 %), HPLC -Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	56
Abbildung 35: Konzentration von Carnosolsäure in Abhängigkeit von der Fütterungszeit.	56
Abbildung 36: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	58
Abbildung 37: Serum Legehennenblut nach Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.	59
Abbildung 38: Serum Legehennenblut ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.	59
Abbildung 39: Isolat Zellwand nach Behandlung von humanen Magenzellen mit Rosmarinextrakt [257,4 $\mu\text{g/mL}$ ], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	60
Abbildung 40: Mediumkontrolle: Rosmarinextrakt gelöst in Medium (ohne humane Zellen), Konzentration 514,8 $\mu\text{g/mL}$ , 1:10 verdünnt), Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	61
Abbildung 41: Leber nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt.	62
Abbildung 42: Niere nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt.	62
Abbildung 43: Lunge nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt.	63
Abbildung 44: HPLC-Trennung von Thymianextrakt, an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	66
Abbildung 45: Eigelb ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	66
Abbildung 46: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt (Zusatz 1,68 %), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	66
Abbildung 47: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol und Thymol in Abhängigkeit von der Fütterungszeit.	67
Abbildung 48: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol und Thymol in Abhängigkeit von der Fütterungszeit.	67
Abbildung 49: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	69
Abbildung 50: Plasma Legehennenblut nach Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.	70
Abbildung 51: Plasma ohne Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit elektrochemischer Detektion.	70
Abbildung 52: Isolat Cytosol nach Behandlung von humanen Magenzellen mit Thymol [85,1 $\mu\text{g/mL}$ ], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit elektrochemischer Detektion.	71
Abbildung 53: Piperinhaltiger Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm.	72
Abbildung 54: Eigelb ohne Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm.	73
Abbildung 55: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt (Zusatz 1,12 %), HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm.	73

---

Abbildung 56: Konzentration von Piperin und den durch Stoffwechsel entstandenen Piperinisomeren Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Fütterungszeit. _____	74
Abbildung 57: Konzentration von Piperin und den durch Stoffwechsel entstandenen Piperinisomeren Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Fütterungszeit. _____	74
Abbildung 58: UV-Spektrum 1. Peak aus Abbildung 55, Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	77
Abbildung 59: UV-Spektrum 2. Peak aus Abbildung 55, Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	77
Abbildung 60: Eigelb nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt (Zusatz 1,68 %), HPLC-Trennung auf Silberionenphase mit UV-Detektion bei 340 nm. _____	78
Abbildung 61: Eiklar nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm. _____	80
Abbildung 62: Eiklar von Legehennen, ohne Dotierung des Futters mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 240 nm. _____	80
Abbildung 63: Plasma Legehennenblut nach Fütterung von Legehennen mit piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. _____	81
Abbildung 64: Plasma Legehennenblut ohne Fütterung mit Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) und UV-Detektion bei 240 nm. _____	81
Abbildung 65: Isolat Cytosol nach Behandlung von humanen Leberzellen mit Pfefferextrakt [906 µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm. _____	83
Abbildung 66: Isolat Cytosol nach Behandlung von Magenzellen mit Piperin [93,2 µg/mL], Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit UV-Detektion bei 340 nm. _____	83
Abbildung 67: Leber nach Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt. _____	84
Abbildung 68: Niere nach Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt. _____	84
Abbildung 69: Lunge nach Fütterung mit 1,68 % Thymianextrakt. _____	85
Abbildung 70: Isomerisierung von Piperin in Acetonitril und Bildung der Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Beleuchtungsdauer. _____	87
Abbildung 71: Isomerisierung von Piperin in n-Hexan und Bildung der Isomere Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in Abhängigkeit von der Beleuchtungsdauer. _____	87
Abbildung 72: Halbstenpotentialen von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin. _____	88
Abbildung 73: Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemische Detektion. _____	94
Abbildung 74: Rahmprobe ohne Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemischer Detektion. _____	94
Abbildung 75: Rahmprobe nach Dotierung des Futters mit Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und elektrochemischer Detektion. _____	94
Abbildung 76: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil und UV-Detektion bei 340 nm. _____	103
Abbildung 77: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil und UV-Detektion bei 240 nm. _____	104
Abbildung 78: Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin, Isochavicin, HPLC-Trennung an Silberionenphase und UV-Detektion bei 340 nm _____	105

---

Abbildung 79: HPLC-Chromatogramm von piperinhaltigem Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	109
Abbildung 80: UV-Spektrum von p-Cymen-2,3-diol aus Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	109
Abbildung 81: UV-Spektrum von Thymol aus Thymianextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	110
Abbildung 82: HPLC-Trennung von Rosmarinextrakt an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) mit Diodenarraydetektion. _____	111
Abbildung 83: UV-Spektrum von Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt, HPLC-Trennung an ODS-Hypersil (250 x 4,6 mm) und Diodenarraydetektion. _____	112
Abbildung 84: Versuchsanordnung Gelpermeationschromatographie. _____	116
Abbildung 85: Wiederfindungsrate von p-Cymen-2,3-diol nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode. _____	118
Abbildung 86: Wiederfindungsrate von Thymol nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode. _____	118
Abbildung 87: Wiederfindungsrate von Piperin nach Zusatz von Thymianextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode. _____	119
Abbildung 88: Wiederfindungsrate von Carnosolsäure nach Zusatz von Rosmarinextrakt zu Eigelb und anschließender Aufarbeitung nach der in Kapitel 6.6.1 beschriebenen Methode. _____	119
Abbildung 89: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M1. _____	136
Abbildung 90: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L1. _____	136
Abbildung 91: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M5. _____	136
Abbildung 92: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L5. _____	136
Abbildung 93: Mikroskopische Aufnahme der Flasche M10. _____	137
Abbildung 94: Mikroskopische Aufnahme der Flasche L10. _____	137

## 9.4 Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 1: Antioxidative Wirksamkeit von Gewürzen.</i>	3
<i>Tabelle 2: Übersicht: Fütterungsversuch Legehennen.</i>	19
<i>Tabelle 3: Übersicht: Fütterungsversuch Kühe.</i>	20
<i>Tabelle 4: Fütterungsversuch Kühe: Zusatz Carnosolsäure aus Rosmarinextrakt während der Behandlungsperiode.</i>	21
<i>Tabelle 5: Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten im Eigelb von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure.</i>	27
<i>Tabelle 6: Nachweisgrenzen für p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure im untersuchten Eiklar.</i>	32
<i>Tabelle 7: Gradientenzusammensetzung für die Trennung der Piperinisomere an der Silberionensäule (ChromSpher Lipids).</i>	47
<i>Tabelle 8: Kopplungskonstanten <sup>1</sup>H-NMR: Piperin, Isochavicin, Isopiperin und Chavicin.</i>	51
<i>Tabelle 9: Fütterungsversuch Legehennen: Zusatz Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl während der Behandlungsperiode.</i>	54
<i>Tabelle 10: Konzentration und Übergang von Carnosolsäure in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Rosmarinextrakt.</i>	57
<i>Tabelle 11: Gehalt an p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Thymianextrakt.</i>	64
<i>Tabelle 12: Fütterungsversuch Legehennen: Zusatz Thymianextrakt zum Legehennenmehl während der Behandlungsperiode.</i>	65
<i>Tabelle 13: p-Cymen-2,3-diol und Thymol: Konzentration und Übergang in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.</i>	68
<i>Tabelle 14: Piperin und Piperinsisomere: Konzentration und Übergang in Eigelb nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.</i>	75
<i>Tabelle 15: Piperin und Piperinsisomere: Konzentration und Übergang in Eiklar nach 12 Tagen Fütterung von Thymianextrakt.</i>	79
<i>Tabelle 16: Zusammensetzung der Isomere Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin im photostabilen Gleichgewicht in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.</i>	86
<i>Tabelle 17: Sensorische Untersuchung von Eiern nach Fütterung von Legehennen mit Thymianextrakt.</i>	91
<i>Tabelle 18: Sensorische Untersuchung von Eiern nach Fütterung von Legehennen mit Rosmarinextrakt.</i>	92
<i>Tabelle 19: Nachweisgrenze von Carnosolsäure in Milchrahmproben.</i>	93
<i>Tabelle 20: Zusammensetzung des Zellkulturmediums MEM und von PBS.</i>	98
<i>Tabelle 21: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 340 nm.</i>	103
<i>Tabelle 22: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 240 nm.</i>	104
<i>Tabelle 23: Formeln der Kalibriergeraden von Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin, UV-Detektion bei 340 nm.</i>	105
<i>Tabelle 24: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure.</i>	108
<i>Tabelle 25: Wiederfindungsrate von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure nach Eigelbaufarbeitung.</i>	117



---

<i>Tabelle 26: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in der zur HPLC-Analyse von Eigelb eingesetzten Lösung.</i>	120
<i>Tabelle 27: Nachweis- und Bestimmungsgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in Eigelb.</i>	121
<i>Tabelle 28: Konzentrationen von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Behandlungsperiode mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.</i>	122
<i>Tabelle 29: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Nachperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,12 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.</i>	122
<i>Tabelle 30: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Behandlungsperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.</i>	123
<i>Tabelle 31: Konzentration von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin, Chavicin, Isopiperin und Isochavicin in der Nachperiode zur Fütterung mit Zusatz von 1,68 % Thymianextrakt zum Legehennenmehl.</i>	123
<i>Tabelle 32: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Behandlungsperiode nach Fütterung mit 0,28 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.</i>	124
<i>Tabelle 33: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Nachperiode nach Fütterung mit 0,28 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.</i>	124
<i>Tabelle 34: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Behandlungsperiode nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.</i>	125
<i>Tabelle 35: Konzentration von Carnosolsäure im Eigelb in der Nachperiode nach Fütterung mit 0,57 % Rosmarinextrakt zum Legehennenmehl.</i>	125
<i>Tabelle 36: Nachweisgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol und Piperin im Rückstand der Eigelbextraktion.</i>	127
<i>Tabelle 37: Nachweisgrenze von p-Cymen-2,3-diol, Thymol, Piperin und Carnosolsäure in der zur HPLC-Analyse von Eiklar eingesetzten Lösung und im Eiklar.</i>	129
<i>Tabelle 38: Dotierte Substanzen und deren Konzentration zur Cytotoxizitätsbestimmung an humanen Magen- und Leberzellen.</i>	133
<i>Tabelle 39: Auswertung Cytotoxizitätstest nach Aufgabe von den in Tabelle 38 aufgeführten Substanzen.</i>	133
<i>Tabelle 40: Dotierte Substanzen und deren Konzentration auf humane Magen- und Leberzellen.</i>	134
<i>Tabelle 41: Konfluenz nach 24-stündiger Behandlung mit den in Tabelle 40 aufgeführten dotierten Substanzen.</i>	135

## *DANKE!*

Danken möchte ich an dieser Stelle all denen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. W. Ternes danke ich für die interessante und aktuelle Themenstellung, für wertvolle wissenschaftliche Anregungen und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Allen Arbeitskreismitgliedern danke ich für die Hilfsbereitschaft und das von Freundschaft geprägte Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Frau A. Drotleff und Herrn G. Jungbluth für die schöne Zeit in Hannover.

Mein Dank gilt an dieser Stelle auch meinen Eltern, meiner Schwester Caroline und meinem Mann Stefan, die mich in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Dem Cusanuswerk danke ich für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Edburga Lucia Krause geb. Bigge  
Geburtsdatum: 08. Januar 1970 in Witten  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Meta Bigge, geb. Homann und Heinrich Bigge

## Schulbildung

1976 - 1980 Talschule Hamm  
1980 - 1986 Realschule Hamm Bockum-Hövel  
1986 - 1989 Galilei - Gymnasium Hamm  
Allgemeine Hochschulreife am 17.5.1989

## Hochschulstudium

WS 1989/90 Studienbeginn an der Westfälischen-Wilhelms-Universität  
Münster, Studiengänge: Lebensmittelchemie, Chemie (Diplom)  
27.5.1992 Diplom - Chemiker - Vorprüfung  
8.10.1992 Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker  
28.11.1994 Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker  
1.2. - 30.4.1995 Forschungsaufenthalt bei Herrn Prof. Dr. Hasselmann (Louis-  
Pasteur-Universität, Straßburg) mit dem Thema „Analyse des  
oxystérols formés par radiolyse du cholestérol“  
Stipendium des Centre International des Etudiants et Stagiaires  
1.5. – 31.10.1995 Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker an dem Medizinal-,  
Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen in  
Gießen  
24.11.1995 Zweite staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker an der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt  
1.3.1996 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn  
Prof. Dr. Ternes an der Tierärztlichen Hochschule Hannover  
1.4.96 – 31.7.98 Wissenschaftliche Hilfskraft am Chemischen Institut der  
Tierärztlichen Hochschule Hannover  
1.4.96 – 31.7.98 Lehrtätigkeit im Fach Organische Chemie an der Lehranstalt für  
Veterinär-Medizinisch-Technische Assistenten  
1.1.1997 – 17.5.1999 Promotionsstipendiatin des Cusanuswerkes