

# Untersuchung von Hühnereiern mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR)

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Svenja Manuela Wenig

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referent: Hon. Prof. Dr. Thomas Kuballa

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Hühnerei.....	2
1.1.1	Aufbau und Inhaltsstoffe.....	2
1.1.2	Eifett.....	3
1.2	Haltungsformen und deren rechtlichen Hintergründe in Deutschland und der Europäischen Union.....	7
1.2.1	Käfighaltung.....	7
1.2.2	Bodenhaltung.....	7
1.2.3	Freilandhaltung.....	8
1.2.4	Biologische Haltungsform.....	8
1.3	Produktion/Marktsituation.....	8
1.3.1	Deutschland und Europa.....	8
1.4	Einfluss der Fütterung auf die Eizusammensetzung.....	10
1.5	Analytik von Hühnereiern.....	11
1.6	NMR Spektroskopie.....	14
1.6.1	Grundlagen.....	14
1.6.2	Quantitative NMR.....	17
1.6.3	Prozessierung.....	22
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1	Probenmaterial – Haltung und Herkunft.....	29
3.2	Aufarbeitung der Proben.....	29
3.2.1	Fettextraktion/Fettisolierung.....	29
3.3	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ und $^{31}\text{P}$ NMR Messung von Lipiden.....	31
3.3.1	Entwicklung und Optimierung einer $^1\text{H}$ NMR Methode zur Messung des Eifettes.....	32
3.3.2	Optimierung einer $^{13}\text{C}$ NMR Methode zur Messung des Eifettes.....	33
3.3.3	Entwicklung und Optimierung einer $^{31}\text{P}$ NMR Methode zur Messung und Quantifizierung der Phospholipide im Eifett.....	34
3.3.3.1	Optimierung des Lösungsmittels und der Messtemperatur.....	35
3.3.3.2	Identifizierung und Quantifizierung der Phospholipide mittels $^{31}\text{P}$ NMR.....	37
3.4	Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäureverteilung im Eifett.....	40
3.5	Datenverarbeitung – Multivariate Datenanalyse.....	41
3.5.1	Datenvorbehandlung.....	42
3.5.2	Univariate Datenanalyse – Kruskal-Wallis Test.....	45
3.5.3	Hauptkomponentenanalyse, lineare Diskriminanzanalyse.....	46

3.5.3.1	Monte-Carlo Kreuzvalidierung und Konfusionsmatrix .....	48
3.5.4	Validierung von multivariaten Verfahren.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1	Charakterisierung der Fettbestandteile im Hühnerei .....	51
4.1.1	Charakterisierung des Eifettes mittels $^1\text{H}$ NMR .....	51
4.1.2	Charakterisierung des Eifettes mittels $^{13}\text{C}$ NMR .....	54
4.1.3	Charakterisierung der Phospholipide im Eifett mittels $^1\text{H}$ , $^{31}\text{P}$ und 2D NMR.....	58
4.1.4	Quantifizierung der Phospholipide mittels $^{31}\text{P}$ NMR.....	62
4.1.4.1	Quantifizierung der Phospholipide unter Anwendung eines internen Standards .....	62
4.1.4.2	Quantifizierung der Phospholipide unter Anwendung eines externen Standards .....	65
4.1.4.3	Vergleich der beiden Methoden zur Quantifizierung von Phospholipiden .....	67
4.1.5	Analyse der Fettsäurezusammensetzung im Eifett mittels GC-FID .....	68
4.2	Unterscheidung von biologisch und konventionell erzeugten Hühnereiern.....	71
4.2.1	Analyse der Phospholipidverteilung/-anteile und der Fettsäureverteilung mit Hinblick auf Haltungsdifferenzierung.....	71
4.2.2	Multivariate Analyse der $^1\text{H}$ NMR Daten .....	74
4.2.2.1	Erstellung eines Klassifizierungsmodells mittels Hauptkomponentenanalyse und linearer Diskriminanzanalyse (PCA-LDA) .....	74
4.2.2.2	Anwendung des Modells auf neue Proben.....	76
4.2.3	Identifizierung und Analyse der für die Trennung verantwortlichen Parameter...	78
4.2.4	Vergleich mit den Ergebnissen der Fettsäureverteilung.....	79
4.3	Validierung und Qualitätskontrolle des Klassifizierungsmodells .....	79
4.3.1	Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung .....	80
4.3.2	Validierung der multivariaten Datenanalyse .....	82
4.4	Zusammenfassende Diskussion.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Chemikalien und Instrumente.....</b>	<b>104</b>
7.1	Chemikalien .....	104
7.2	Hergestellte Lösungen und Reagenzien .....	106
7.3	Instrumente und Materialien.....	108
<b>8</b>	<b>Arbeitsvorschriften .....</b>	<b>109</b>
8.1	Ausgangsmaterialien.....	109
8.2	Extraktion des Eifettes aus Hühnereigelb.....	109
8.2.1	Aufarbeitung für frische Eier.....	109

8.2.2	Aufarbeitung für gefrorenes Eigelb.....	110
8.2.3	Gefriertrocknung.....	110
8.2.4	Extraktion des Eifettes.....	110
8.3	Messung der Eifettproben.....	111
8.3.1	$^1\text{H}$ NMR Messung.....	111
8.3.2	$^{13}\text{C}$ NMR Messung.....	112
8.3.3	$^{31}\text{P}$ NMR Messung der Phospholipide.....	113
8.4	Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels NMR.....	114
8.4.1	Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels $^1\text{H}$ NMR und $^{13}\text{C}$ NMR .....	114
8.4.2	Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels $^{31}\text{P}$ NMR.....	114
8.4.3	Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels 2D NMR Experimente.....	115
8.5	Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung in Eifett... 115	
8.5.1	Umesterung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern.....	115
8.5.2	Messbedingungen .....	115
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>
9.1	Vergleich verschiedener Haltungssysteme für Legehennen .....	116
9.2	Eierkennzeichnung .....	116
9.3	Metadaten der Proben.....	117
9.4	Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur bei der $^1\text{H}$ NMR Messung.....	117
9.5	Verwendete NMR Experimente .....	119
9.5.1	$^1\text{H}$ NMR Standard Experiment.....	119
9.5.2	$^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$ NMR Messung mit inverse gated decoupling.....	120
9.5.3	Longitudinale Relaxationszeitbestimmung.....	120
9.5.4	2D NMR Experimente.....	120
9.6	NMR Daten der Standardsubstanzen .....	121
9.6.1	$^{31}\text{P}$ NMR Zuordnung der Phospholipidstandardsubstanzen.....	121
9.6.2	Berechnung der molaren Masse der Phospholipide.....	122
9.6.3	1D $^1\text{H}$ NMR Zuordnung der Phospholipidstandardsubstanzen .....	123
9.6.4	2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC NMR Signalzuordnung von Phosphatidylcholin .....	124
9.6.5	Berechnete Anteile der Phospholipide am Gesamtphospholipidgehalt in Eifett. 125	
9.6.6	Zuordnung der Fettsäuremethylester der GC-FID Analyse zu den entsprechenden Fettsäuren .....	126
9.6.7	Univariate Analyse der $^1\text{H}$ NMR Spektren .....	132
9.6.8	Die Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Proben .....	132
9.6.9	Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung .....	135
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>137</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AOCS	American Oil Chemist Society
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
AQ	Akquisitionszeit
BF <sub>3</sub>	Bortrifluorid
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
CD <sub>3</sub> OD	deutერიertes Methanol
CDCl <sub>3</sub>	deutერიertes Chloroform
CDTA	Cyclohexandiamintetraessigsäure
CSA	chemical shift anisotropy
D1	Relaxationsdelay
D <sub>2</sub> O	deutერიertes Wasser
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dublett
DG	Diglyceride
DHA	Docosahexaensäure
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DPA	Docosapentaensäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	evaporative light scattering detector
ERETIC	electronic reference to access in vivo concentrations
ESI	electrospray ionisation
FFS	freie Fettsäure
FID	free induction decay
FS	Fettsäure
FSME	Fettsäuremethylester

FT	Fouriertransformation
FWHM	full width at half maximum
GC	Gaschromatographie
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GPC	Glycerophosphatidylcholin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
HILIC	hydrophilic interaction chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
HPTLC	high performance thin layer chromatography
IRMS	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kFCV	k-fache Kreuzvalidierung
KNN	k-nächste Nachbar Methode
KOH	Kaliumhydroxid
LB	line broadening
LD	Diskriminanzfunktion
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LDL	low density lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
m	Multipllett
MALDI	matrix assisted laser desorption
MCCV	Monte-Carlo Kreuzvalidierung
MDPA	Methylendiphosphonsäure
MS	Massenspektrometrie
MUFS	mehrfach ungesättigte Fettsäuren

MVDA	Multivariate Datenanalyse
NaOH	Natriumhydroxid
NCM	nearest class mean
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NS	number of scans
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCo	principal component
PCA	principal component analysis
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphoglycerid
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PLS	partial least squares
PULCON	pulse length based concentration determination
qNMR	quantitative NMR
RG	receiver gain
s	Singulett
S/N	signal to noise
SI	Datenpunkt
sn	stereospecifically numbered
SPL	Sphingophospholipid
T1	longitudinale Relaxationszeit
t	Triplett
TAG	Triacylglycerid
TIBP	Triisobutylphosphat
TMP	Trimethylphosphat
TMS	Tetramethylsilan



TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
TTP	Triphenylphosphat
VK	Variationskoeffizient
Wdf	Wiederfindung
zgif	inverse gated decoupling

# 1 Einleitung

Hühnereier gehören weltweit zu den beliebtesten Eiern und stellen ernährungsphysiologisch eine wichtige Proteinquelle dar. In den Proteinen sind alle essentiellen Aminosäuren enthalten, und zudem besitzen Hühnereier eine Vielzahl wichtiger Inhaltsstoffe wie verschiedene Vitamine und Mineralstoffe. Durch die physikochemischen bzw. technofunktionellen Eigenschaften der verschiedenen Eikomponenten wie das Emulgiervermögen und die Bildung von Schäumen sowie die antibakterielle Wirkung durch das Lysozym aus dem Eiklar finden Eier und ihre Inhaltsstoffe in vielen verarbeiteten Lebensmitteln Verwendung.

In den letzten Jahren sind Eier und vor allem die Haltungsbedingungen der Legehennen immer wieder in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gerückt. In der Europäischen Union gibt es für die Produktion von Eiern vier offizielle Haltungssysteme für Legehennen. Diese sind die ausgestaltete Käfighaltung, die Bodenhaltung, die Freilandhaltung und die biologische Haltung. Durch verschiedene EU-Verordnungen und Richtlinien werden die Bedingungen für die verschiedenen Haltungssysteme vorgegeben. Der Unterschied der biologischen Haltung zu den konventionellen Haltungssystemen liegt zum einen in der Anzahl der Tiere, die in einer Herde gehalten werden dürfen, sowie deren Platzangebot und zum anderen am Futter. Bei der biologischen Tierhaltung wird vorgeschrieben, dass das Futter größtenteils aus biologischer Produktion stammen muss. Die damit verbundenen höheren Produktionskosten bei geringerem Ertrag zeigen sich im Preisunterschied biologischer Eier im Vergleich zu konventionellen Eiern.

Die Kennzeichnung von Eiern ist europaweit durch den „Erzeugercode“, einen Stempel, welcher direkt auf die Eierschale aufgebracht werden muss und Informationen über Herkunftsland und Haltungsart gibt, geregelt. Die steigende Nachfrage an biologisch produzierten Eiern und die Akzeptanz dafür einen höheren Preis zu zahlen, erhöht das Risiko für ein Falsch- bzw. Umstempeln, welches nur schwer nachweisbar ist. Derzeit gibt es keine Methode, mit der die Richtigkeit der Stempelung überprüft werden kann.

Daher ist es wichtig, Eier und deren Inhaltsstoffe auf Unterschiede die Haltung betreffend zu untersuchen. Dass die Eizusammensetzung und vor allem das enthaltene Fett durch das Futter beeinflusst werden kann, wurde in der Vergangenheit bereits durch mehrere Studien bewiesen. Durch verschiedene isolierte Fütterungsansätze wurde versucht die Lipidzusammensetzung so zu beeinflussen, dass sie ernährungsphysiologische Vorteile aufweist.

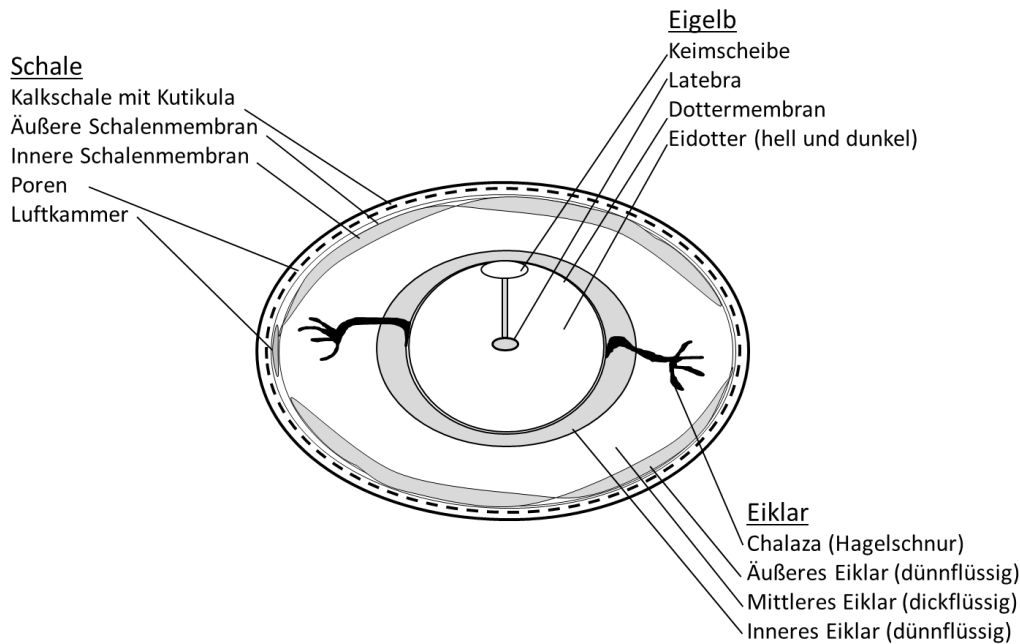
Verschiedene analytische Ansätze zeigten bereits, dass es möglich ist zwischen unterschiedlichen Haltungssystemen zu unterscheiden, jedoch wurden meist nur wenige Proben mit geringer Variabilität getestet. Zudem zielte der Großteil der Methoden darauf ab nur eine Verbindungsklasse oder einen bestimmten Parameter zu untersuchen.

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR) erlaubt eine Art Fingerprint auf molekularer Ebene einer Probe zu erhalten, ohne deren Inhaltsstoffe vorher physikalisch oder chemisch aufzutrennen. So können unter Verwendung verschiedener NMR basierter Methoden einzelne Verbindungsklassen sowie die Gesamtheit aller enthaltenen Verbindungen untersucht werden. Vor allem die Kombination mit multivariaten statistischen Verfahren ermöglicht es, nicht offensichtliche Zusammenhänge bzw. Abhängigkeiten der Verbindungen sichtbar zu machen. Die NMR Spektroskopie sollte daher gut geeignet sein anhand der Analyse der Inhaltsstoffe die Eier unterschiedlicher Haltungssysteme zu charakterisieren und zuzuordnen.

# 1.1 Das Hühnerei

## 1.1.1 Aufbau und Inhaltsstoffe

Das Hühnerei besteht in einer groben Aufteilung aus drei Hauptkomponenten, der Eierschale mit ihren Membranen, dem Eiklar und dem Eigelb. Im Inneren befindet sich das Eigelb, welches vom Eiklar umgeben wird. Dieses wiederum ist von Membranen und abschließend der Eierschale eingehüllt. In Abbildung 1-1 ist ein vereinfachter Aufbau des Hühnereis im Querschnitt zu sehen.



**Abbildung 1-1: Vereinfachter Aufbau des Hühnereis im Querschnitt; modifiziert nach U.S. Department of Agriculture, 2000**

Die Eierschale besteht aus mehreren Schichten. Die äußerste Schicht der Schale wird als Kutikula bezeichnet, darunter folgt eine poröse Kalkschicht. Diese ist aus Kalzitkristallen ( $\text{CaCO}_3$ ) aufgebaut, welche in eine Matrix aus faserigen und kugelförmigen Protein-Mucopolysacchariden eingebettet sind. Zudem sind geringere Gehalte an Magnesiumcarbonat und Phosphate enthalten. Die Kalkschicht ist von Poren durchsetzt, welche durch die Kutikula verschlossen werden. Während ein Gasaustausch möglich ist, werden Mikroorganismen am Eindringen gehindert. An der Innenseite der Eierschale befinden sich die äußere und innere Schalenmembran; sie separieren sich am größeren Ende des Eis und bilden eine Luftkammer. Diese wächst mit zunehmender Lagerung des Eis und kann aufgrund ihrer relativen Größe für die Altersbestimmung verwendet werden.

Das Eiklar besteht zu fast 90 % aus Wasser, die restlichen 10 % sind Proteine sowie wenige Kohlenhydrate und Mineralstoffe. Die Konsistenz des Eiklars ist gelartig und es besteht aus insgesamt drei Fraktionen mit unterschiedlicher Viskosität. Diese lassen sich auf unterschiedliche Gehalte des Proteins Ovomucin zurückführen. Ovomucin ist in der Lage, fibrilläre Strukturen auszubilden, welche zu einer Erhöhung der Viskosität führen. Das mittlere Eiklar (s. Abbildung 1-1) hat einen höheren Gehalt an Ovomucin als das äußere und innere Eiklar und ist somit viskoser. Die Hagelschnur oder Chalaza ist eine feine, jedoch sehr feste Schicht aus Eiklar, welche sich um das Eigelb herum befindet. Sie bildet an den Enden jeweils einen Zweig, der wie ein Anker fungiert und das Eigelb in der Mitte hält. Der pH-Wert des Eiklars steigt mit zunehmendem Alter durch

Diffusion des gelösten Kohlenstoffdioxids (CO<sub>2</sub>) aus der Schale. Bei frisch gelegten Eiern liegt der pH-Wert bei 7,5-8, dieser kann auf einen Wert von bis zu 9,7 (nach ca. 21 Tagen) ansteigen.

Den größten Proteinanteil am Eiklar nimmt das Ovalbumin mit über 50 % ein; danach folgt das Conalbumin, oder auch als Transferrin bezeichnet, mit ca. 12 %. Dies ist in der Lage, Metallionen wie Mn<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup> zu binden. Ovomuroid ist zu ca. 11 % enthalten, es ist ein Proteaseinhibitor und kann z.B. Rindertrypsin hemmen. Andere Proteine sind nur in geringeren Anteilen enthalten, daher wird nur kurz auf einige bzw. deren besondere Eigenschaften eingegangen. Ovomucin ist wie bereits erläutert für die Viskosität des Eiklars verantwortlich und inhibiert die virale Hämagglutination. Lysozym oder Ovoglobulin G1 ist ein *N*-Acetylmuramidase-Enzym. Es findet sich auch in anderen tierischen oder pflanzlichen Gewebearten und ist in der Lage die Zellwände von grampositiven Bakterien zu hydrolysieren, wodurch diese aufgelöst werden. Ovoglobulin G2 und G3 sind gute Schaumbildner, Flavoprotein kann Riboflavin binden und Ovoinhibitor ist vergleichbar mit Ovomuroid ein Proteaseinhibitor. Avidin bindet Biotin und besitzt wahrscheinlich antimikrobielle Eigenschaften, die allerdings nicht näher bekannt sind (Li-Chan et al., 1995; Mine, 2008; Stadelman et al., 1995).

Die Keimscheibe, aus der sich das Küken entwickelt, befindet sich oberhalb der keulenförmigen Latebra (Dotterbett) auf einer Seite des Eidotters.

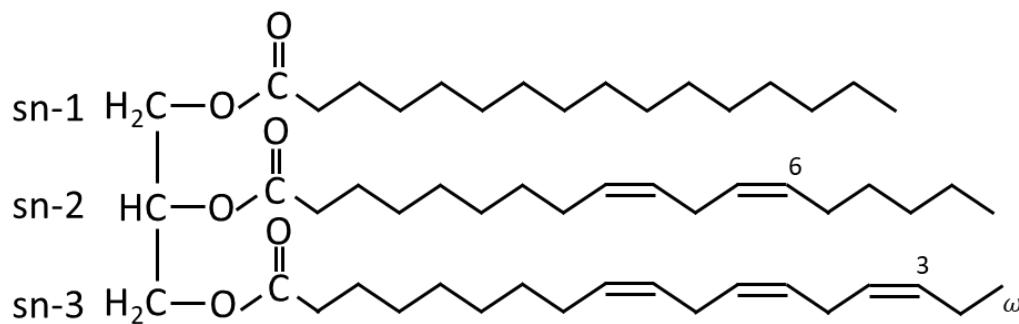
Der Eidotter oder das Eigelb liegt in der Mitte des Eis. Es ist eine Fett-in-Wasser-Emulsion mit einer Trockenmasse von 50 %, die zu ca. 65 % aus Lipiden, zu ca. 31 % aus Proteinen und zu ca. 4 % aus Kohlenhydraten besteht. Der Rest sind Vitamine und Mineralien. Die Hauptkomponenten im Eigelb sind mit 68 % Lipoproteine niedriger Dichte (low density lipoprotein, LDL). Lipoproteine höherer Dichte (high density lipoprotein, HDL) sind mit ca. 16 % vertreten. Danach folgen Livetine mit 10 % und Phosvitin mit 4 %. Im Eigelb sind Partikel enthalten, die in zwei Größen eingeteilt werden können. Die größeren sind sogenannte Dottertröpfchen oder Fetttröpfchen. Sie bestehen hauptsächlich aus Lipiden, die teilweise eine Proteinmembran besitzen und können im Wesentlichen zu den LDL gezählt werden. Die kleineren Körnchen oder Granula bestehen hauptsächlich aus HDL (ca. 70 %), 12 % LDL und 16 % Phosvitin, können aber auch Lipide und Mineralien enthalten. Die Größe ist sehr einheitlich, wobei die Form variieren kann (Li-Chan et al., 1995; Mine, 2008; Stadelman et al., 1995).

### 1.1.2 Eifett

Das Eigelb besteht zu 32-36 % aus Lipiden, welche sich wiederum aus ca. 65 % Triacylglyceriden (TAG), 28-30 % aus Phospholipiden (PL) und zu ca. 5 % aus Cholesterin zusammensetzen. Ungefähr 1 % des Cholesterins sind Cholesterinester. In noch geringeren Mengen können freie Fettsäuren (FFS) und andere Sterine wie Cholestanol, 7-Cholestanol,  $\beta$ -Sitosterin, Campesterin, 24-Methylencholesterin und Lanosterin vorkommen (Speake et al., 1998; Stadelman et al., 1995). Das Verhältnis der verschiedenen Lipidklassen (TAG, PL und Cholesterin) ist laut Speake, Murray und Noble bei Hühnereiern sehr konstant und das auch bei einem Vergleich mit Eiern anderer Vogelspezies wie z.B. Ente, Truthahn oder Taube (Speake et al., 1998). Dagegen werden die Fettsäuren (FS) der Fettkomponenten wie den TAG oder PL vom Alter der Henne, von der Rasse, von der Fütterung und anderen äußeren Einflüssen wie z.B. Stress beeinflusst. So kann es je nach Futter und dessen Fettsäurezusammensetzung zu An- bzw. Abreicherungen bestimmter FS kommen (Mine, 2008; Speake et al., 1998; Stadelman et al., 1995). Der Einfluss des Futters auf die Fettsäurezusammensetzung wird in Kapitel 1.4 näher behandelt.

## Lipidklassen

Die größte Lipidklasse ist die der TAG. TAG setzen sich aus einem Glycerinmolekül, welches an jeder seiner drei Hydroxylgruppen mit einer FS unterschiedlicher Länge und Sättigung verestert ist, zusammen. In Abbildung 1-2 ist die Struktur eines TAG dargestellt, welches mit drei verschiedenen FS verestert ist. Zur leichteren Charakterisierung und Unterscheidung der Positionsisomere werden die Kohlenstoffatome des Glycerinrundgerüsts von oben nach unten mit dem Präfix „sn“ (stereospecifically numbered) und der Ziffer 1, 2 und 3 beschrieben.



**Abbildung 1-2: Struktur eines Triacylglycerids, verestert mit drei verschiedenen Fettsäuren. In sn-1 Position: Palmitinsäure (C16:0), sn-2 Position: Linolsäure (C18:2), sn-3 Position:  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3)**

FS gehören zu den aliphatischen Monocarbonsäuren, sie unterscheiden sich aufgrund der Länge der Kohlenwasserstoffkette sowie der Anzahl, der Stellung und der Konfiguration der Doppelbindungen. Sie können dadurch in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die gesättigten FS besitzen keine Doppelbindung, die einfach ungesättigten FS besitzen eine Doppelbindung und mehrfach ungesättigte FS (MUFS) besitzen mehrere Doppelbindungen. Die ungesättigten FS können zusätzlich über die Position der letzten Doppelbindung ( $\omega$ -FS) und generell über die Stellung der Doppelbindungen charakterisiert werden. Auch von Bedeutung ist, ob die Doppelbindungen isoliert oder konjugiert und in welcher Konfiguration (cis oder trans) sie vorliegen. Diese Einteilung ist dahingehend wichtig, da FS aufgrund ihrer Biosynthese natürlicherweise überwiegend in der cis-Konfiguration vorkommen. Trans-FS, die ernährungsphysiologisch bedenklich sind, entstehen bei Verarbeitungsschritten wie z.B. durch partielle Hydrogenierungsprozesse bei der industriellen Fetthärtung, durch starkes Erhitzen beim Braten oder im Pansen von Wiederkäuern (Belitz et al., 2008). In Abbildung 1-2 ist das Glycerin beispielhaft in sn-1 Position mit der Palmitinsäure (C16:0), in Position sn-2 mit der Linolsäure (C18:2,  $\omega$ -6) und in sn-3 Position mit der  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3,  $\omega$ -3) verestert.

Die  $\omega$ -FS werden durch die Position ihrer letzten Doppelbindung definiert. Die Zählweise erfolgt ausgehend von der Methylgruppe bis zur Doppelbindung. Sie werden in drei Gruppen eingeteilt,  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 und  $\omega$ -9. Die Ziffern geben an, wie viele Kohlenstoffatome die Doppelbindung vom Methylende entfernt liegt. Diese Einteilung der FS ist insbesondere aus ernährungsphysiologischen Aspekten wichtig, da  $\omega$ -3 und  $\omega$ -6 FS nicht vom Menschen synthetisiert werden können, aber unter anderem zur Eicosanoidsynthese benötigt werden. In Tabelle 1-1 ist ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzung des Eifettes aus verschiedenen Literaturquellen dargestellt. Die Fettsäureverteilung im Eifett variiert ja nach Alter, Rasse oder Futter. Allgemein besteht der Anteil an gesättigten FS mit 30-38 % zum größten Teil aus Palmitinsäure und Stearinsäure, bei den einfachungesättigten FS ist die Ölsäure mit 30-40 % die mengenmäßig dominante FS, bei den MUFS macht die Linolsäure mit 15-25 % den größten Anteil

aus. Darüber hinaus ist noch die Arachidonsäure mit 2-3 % in nennenswerten Mengen enthalten (Cherian et al., 2002; Juneja, 1997).

**Tabelle 1-1: Literaturvergleich zum Vorkommen der Fettsäuren im Eifett**

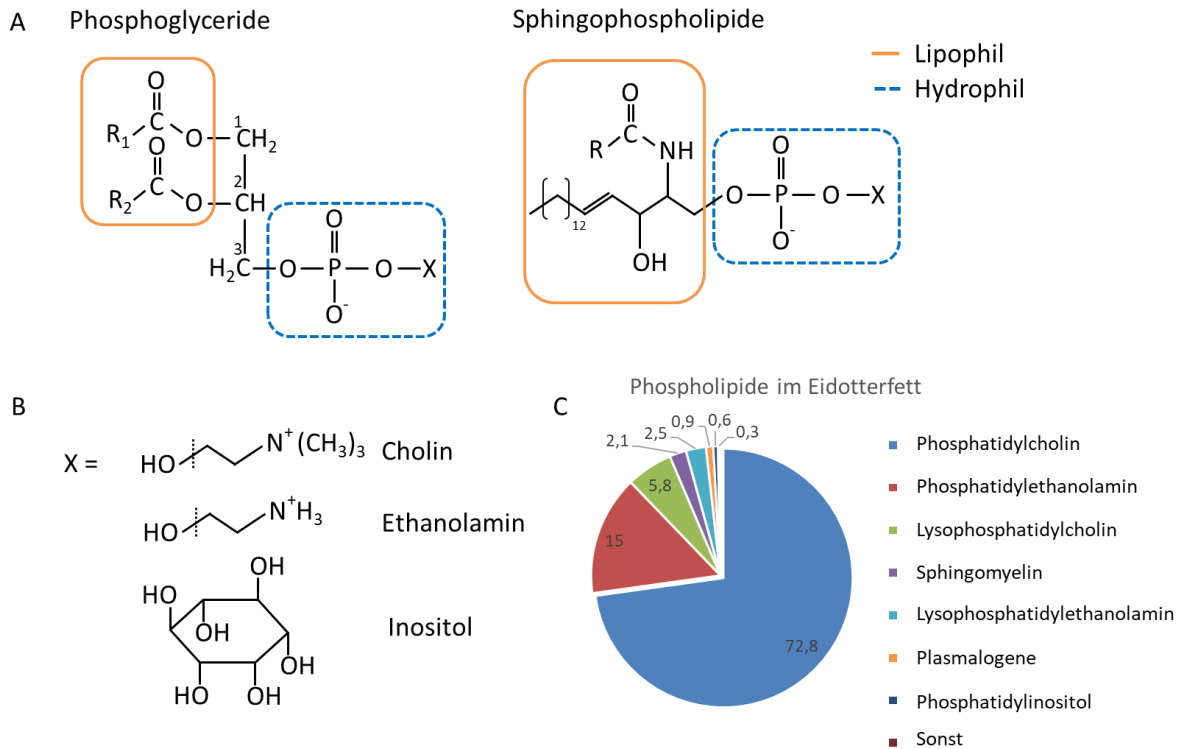
Fettsäure	Kurzschreibweise	Vergleich von Literaturdaten		
		(Mine, 2008) [%-Anteil]	(Cherian et al., 2002) [%-Anteil]	(Oliveira et al., 2010) [%-Anteil]
<b>Myristinsäure</b>	14:0	-	-	0,4
<b>Palmitinsäure</b>	16:0	24,24	26,1	25,21
<b>Palmitoleinsäure</b>	16:1	1,18	3,2	-
<b>Margarinsäure</b>	17:0	0,16	-	0,25
<b>Heptadecensäure</b>	17:1	-	-	0,17
<b>Stearinsäure</b>	18:0	12,40	8,9	9,71
<b>Ölsäure</b>	18:1 ( $\omega$ -9)	28,48	42,6	42,29
<b>Linolsäure</b>	18:2 ( $\omega$ -6)	26,81	16,2	12,18
<b><math>\alpha</math>-Linolensäure</b>	18:3 ( $\omega$ -3)	0,26	-	0,23
<b>Eicosadiensäure</b>	20:2 ( $\omega$ -3)	0,23	-	-
<b>Eicosatriensäure</b>	20:3 ( $\omega$ -6)	0,27	-	-
<b>Arachidonsäure</b>	20:4 ( $\omega$ -6)	3,53	2,0	2,17
<b>Docosapentaensäure (DPA)</b>	22:5 ( $\omega$ -3)	0,83	-	0,09
<b>Docosahexaensäure (DHA)</b>	22:6 ( $\omega$ -3)	0,93	0,7	0,54

Die PL sind die zweitgrößte Verbindungsklasse der Lipide im Eifett. Diese können aufgrund ihres unterschiedlichen Grundgerüsts (s. Abbildung 1-3A) in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden – die Phosphoglyceride (PG) und die Sphingophospholipide (SPL). Das Grundgerüst der PG ist vergleichbar zu den TAG aus Glycerin aufgebaut, während sich das Grundgerüst der SPL von Sphingosin ableitet. In Abbildung 1-3B sind verschiedene Alkohole dargestellt, die an der Phosphatgruppe der PL verestert vorliegen können. Die gebildeten PL werden dann als Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) oder Sphingomyelin (SM) bezeichnet. Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylethanolamin (LPE) sind strukturell mit PC und PE vergleichbar, einzig mit der Ausnahme, dass in Position sn-2 keine Veresterung stattfindet.

In Abbildung 1-3C sind die prozentualen Anteile der PL im Eifett nach Rhodes und Lea dargestellt. Den größten Anteil mit insgesamt 72,8 % der PL stellt PC, danach folgen PE mit 15 %, LPC mit 5,8 %, SM mit 2,5 %, LPE mit 2,1 % und PI mit 0,6 %. Des Weiteren sind 0,9 % Plasmalogene, die zu den Etherlipiden gehören, vorhanden. Diese ähneln strukturell den Phosphoglyceriden, anstelle eines Fettsäureesters besitzen sie jedoch in Position sn-1 einen Enolether (Rhodes & Lea, 1957).

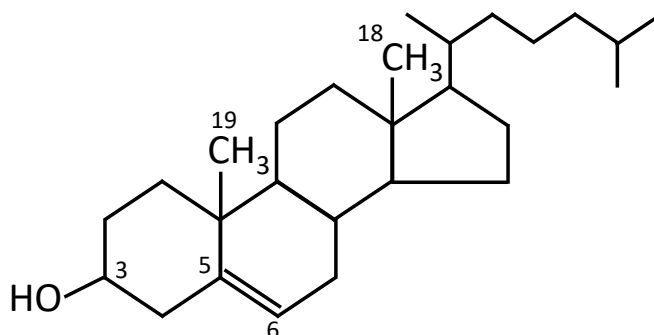
Bei der Fettsäureverteilung der PL zeigten Kuksis und Murai, dass die ungesättigten FS der PL im Eidotter vor allem in Position sn-2 vorliegen. Die gesättigten FS werden dagegen eher in Position sn-1 gefunden (Kuksis & Marai, 1967). Die Haupt-FS von PC sind v.a. die Palmitin-, Öl-, Stearin- und Linolsäure. Bei den MUFS sind es Linol-, Arachidonsäure und DHA (Gladkowski et al., 2011; Juneja, 1997). Hawke untersuchte die FS von PC und PE und zeigte, dass die Fettsäureverteilung bei beiden PL sehr variiert (Hawke, 1959). Bei den gesättigten FS besitzt PC mehr Palmitinsäure als Stearinsäure, bei PE ist es genau umgekehrt. Die ungesättigten FS setzen sich bei PE v.a. aus DHA, Arachidonsäure, Linolsäure und Ölsäure zusammen, wobei die DHA den weitaus größten Anteil ausmacht. Bei PC sind dagegen die Linolsäure und die Ölsäure in einem hohen Anteil

vertreten. Der Grad der Ungesättigtheit der FS ist dementsprechend bei PE höher als bei PC (Gladkowski et al., 2011; Hawke, 1959).



**Abbildung 1-3: A zeigt die Grundstrukturen der Phospholipide (Phosphoglyceride, Sphingophospholipide), B zeigt mögliche veresterte Alkoholreste, C gibt einen Überblick über die Phospholipide und deren prozentualen Anteile im Eifett (die Werte wurden von Rhodes & Lea, 1957 übernommen)**

Die drittgrößte Verbindungsklasse der Lipide sind die Sterine. Cholesterin nimmt mit 5 % den größten Anteil ein, wobei 1 % davon mit FS verestert vorliegt (Belitz et al., 2008). Die Struktur des Cholesterins ist in Abbildung 1-4 dargestellt.



**Abbildung 1-4: Molekülstruktur des freien Cholesterins. Die Kohlenstoffatome ausgewählter Gruppen, die im  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum leicht zu identifizieren sind, wurden nummeriert**

## 1.2 Haltungsformen und deren rechtlichen Hintergründe in Deutschland und der Europäischen Union

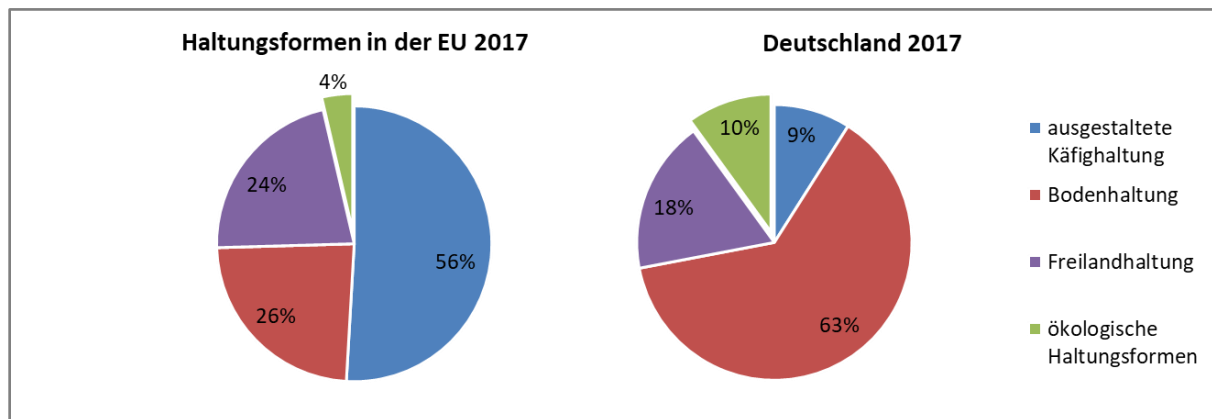


Abbildung 1-5: Prozentualer Anteil der Haltungsformen in der Europäischen Union (EU) und in Deutschland (Grafik nach Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2017)

### 1.2.1 Käfighaltung

Die Käfighaltung ist seit dem 1. Januar 2010 in Deutschland und seit dem 1. Januar 2012 in der gesamten EU gesetzlich verboten. Abgelöst wird sie durch die Haltung in Kleingruppen in ausgestalteten Käfigen (EU Council Directive 1999/74/EC, 1999). Deutschland geht in diesem Punkt noch weiter und entschied sich am 6. November 2015 durch einen Beschluss des Bundesrates zu einer Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung. Diese sieht nun eine Auslaufzeit für die ausgestaltete Käfighaltung vor, um danach komplett auf die Käfighaltung zu verzichten. Eine Übergangsfrist, in der Hennen in ausgestalteten Käfigen gehalten werden dürfen, gibt es noch bis Ende 2025, für besondere Härtefälle bis 2028 (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, 2015). Danach ist in Deutschland die „ausgestaltete“ Käfighaltung verboten. Daher nimmt der prozentuale Anteil der ausgestalteten Käfighaltung immer weiter ab. 2017 lag der Anteil bei nur noch 9 % und somit unter dem Wert der biologischen Haltungsform. Dagegen stammen in der Europäischen Union rund 56 % aller produzierten Eier aus Haltungssystemen mit ausgestalteten Käfigen und Kleingruppen. Die ausgestaltete Käfighaltung ist somit in der EU die vorherrschende Haltungsart. Vor allem in Ländern wie Polen, Portugal und Spanien bildet dieses Haltungssystem, mit jeweils um die 90 %, sogar den größten Anteil (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018).

### 1.2.2 Bodenhaltung

Auf EU-Ebene stellt die Bodenhaltung mit 26 % (s. Abbildung 1-5) das zweitgrößte Haltungssystem zur Hühnereierproduktion dar. Mit einem Anteil von 63 % ist dagegen die Bodenhaltung in Deutschland das Haltungssystem, mit dem die meisten Hühnereier produziert werden. Ein Grund dafür ist, dass die ausgestaltete Käfighaltung durch die Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung bis Ende 2025 abgeschafft wird. Zudem lehnen Verbraucher in Deutschland Eier mit der Kennzeichnung „3“, welche für Käfighaltung steht (s. Anhang 9.2 Eierkennzeichnung; Abbildung 9-1), nach der Einführung der Eierkennzeichnung im Jahre 2004 und den damit verbundenen Kampagnen ab (Müller, 2006). In anderen Ländern wie Österreich, Schweden und den Niederlanden ist die Bodenhaltung ebenfalls das vorherrschende System zur Eierproduktion.



Die Anforderungen an die Bodenhaltung sind in der Richtlinie 1999/74/EG und der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung geregelt. Darüber hinaus gibt es noch verschiedene Sonderformen der Bodenhaltung, wie Volieren- oder Etagensysteme.

### **1.2.3 Freilandhaltung**

Die Freilandhaltung zählt zu den konventionellen Haltungssystemen. In der EU werden rund 14 % und in Deutschland 18 % der Eier in Freilandhaltung produziert (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018). Die gesetzlichen Anforderungen entsprechen denen der Bodenhaltung und den zusätzlichen Mindestanforderungen der Verordnung (EG) Nr. 589/2008. Diese regelt den Zugang zum Auslauf und das Mindestplatzangebot im Freien. Die Freilandhaltung ist seit 2017 in Großbritannien das vorherrschende Haltungssystem und hat somit die ausgestaltete Käfighaltung von ihrer Vormachtstellung dort abgelöst.

### **1.2.4 Biologische Haltungsform**

Die biologischen Haltungssysteme spielen mit lediglich 4 % in der EU noch keine große Rolle in der Hühnereierproduktion. In Deutschland liegt der Anteil bereits bei rund 10 % und übersteigt somit die Produktion der ausgestalteten Käfighaltung. Da jedoch die Nachfrage an biologisch erzeugten Eiern stetig wächst, wird auch dieser Bereich weiter ausgebaut (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018).

Für die biologische Lebensmittelproduktion in der EU gibt es bestimmte Vorgaben und Richtlinien, die sich von der konventionellen Herstellungsweise unterscheiden. Diese sind in der Verordnung (EG) Nr. 834/2007 „über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen“ und in der Verordnung (EG) Nr. 889/2008, welche die Durchführungsvorschrift zu Verordnung (EG) Nr. 834/2007 darstellt, aufgeführt. Die grundlegenden Änderungen im Vergleich zu den konventionellen Haltungssystemen beziehen sich im Wesentlichen auf das Platzangebot, die Besatzgröße und das Futter. Letzteres muss nach ökologischen/biologischen Vorschriften gewonnen werden und vorzugsweise aus dem eigenen Betrieb stammen (VO(EG) Nr. 889, 2008). Zusätzlich gibt es Restriktionen, welche den Einsatz von Zusatzstoffen regeln.

In Deutschland gibt es verschiedene Anbauverbände wie z.B. Bioland, Naturland oder Demeter, die eigene, meist strengere Richtlinien und Kriterien bezüglich der Hühnereierproduktion anlegen. So ist der maximale Tierbestand wesentlich geringer, auch müssen die Futtermittel zu mindestens 50 % aus dem eigenen Betrieb oder regionalen Kooperationen stammen. Zudem sind auch weniger Zusatzstoffe zugelassen (Bioland e.V., 2018; Demeter, 2018; Naturland, 2014).

Ein Überblick sowie ein Vergleich der verschiedenen Haltungsarten bezüglich Platzanforderungen und Besatzdichte ist im Anhang 9.1 in der Tabelle 9-1 zu finden.

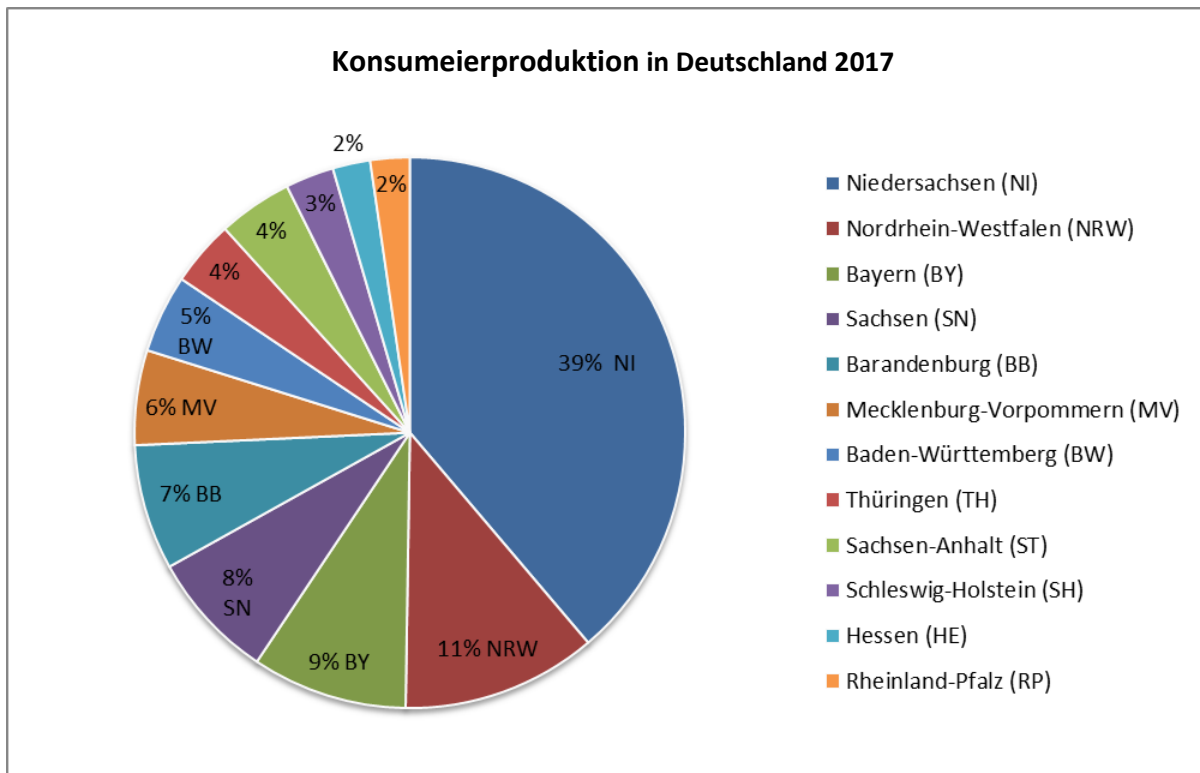
## **1.3 Produktion/Marktsituation**

### **1.3.1 Deutschland und Europa**

Der Pro-Kopf-Verbrauch, der sich u.a. aus dem Gesamtnahrungsverbrauch an Eiern in Deutschland berechnet, betrug laut Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im

Jahr 2017 230 Eier. Der europäische Durchschnitt liegt bei einem Pro-Kopf-Verbrauch von ungefähr 200 Eiern<sup>1</sup>.

Der Selbstversorgungsgrad bei Hühnereiern lag 2017 in Deutschland bei ungefähr 70 %. Rund 30 % der Hühnereier wurden aus den Niederlanden und aus Polen importiert. Dabei stammten die Eier zur Abgabe an den Verbraucher überwiegend aus den Niederlanden, während die Eier für die weiterverarbeitende Industrie und die Großverbraucher zumeist aus Polen kamen. Für die weiterverarbeitende Industrie wurden zum größten Teil Eier aus Betrieben mit ausgestalteten Käfigsystemen verwendet.



**Abbildung 1-6: Überblick der Konsumeierproduktion 2016 in Deutschland (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018)**

Innerhalb der Konsumeierproduktion in Deutschland gibt es große regionale Unterschiede; Niedersachsen ist das Bundesland, welches die meisten Zuchtbetriebe besitzt und auch die meisten Hühnereier produziert. 2016 lag der niedersächsische Anteil an der Gesamtproduktion bei 39 % (s. Abbildung 1-6). Dahinter folgten Nordrhein-Westfalen mit 11 %, Bayern mit 9 % und Sachsen mit 8 %. Baden-Württemberg, welches flächenmäßig das drittgrößte Bundesland in Deutschland ist, trägt an siebter Stelle mit nur 4 % zur Eierproduktion bei (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018).

Auf europäischer Ebene sind die größten Eierproduzenten Frankreich und Deutschland gefolgt von Italien und Spanien. Allerdings weisen die Länder unterschiedliche Selbstversorgungsgrade auf. Die größten Überschüsse von bis zu 300 % werden von den Niederlanden produziert, danach folgen mit jeweils 120 % Polen und Spanien. Der Selbstversorgungsgrad der EU insgesamt liegt bei 104,2 %. Aus diesem Grund ist die EU nicht auf Importe aus Drittländern angewiesen. Diese sind zudem aufgrund der Einfuhrzölle und der rechtlichen Anforderungen in Bezug auf

<sup>1</sup> Bei diesem Wert handelt es sich um einen berechneten Wert, der teilweise aus geschätzten Werten besteht, da die Werte nicht von allen europäischen Ländern vorlagen (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018).

Kennzeichnung, Qualität und Vermarktung erschwert. Daher sind die Importe von Eiern und Eiprodukten eher vernachlässigbar, stammen aber vor allem aus den USA und der Ukraine. 2017 nahm der Import aus der Ukraine etwas zu, da aufgrund des geringeren Angebotes, verursacht durch den Fipronil-Skandal, mehr Eier benötigt wurden. Exporte von Eiern aus der EU spielen eher eine untergeordnete Rolle. Hauptabnehmer sind hier vor allem Japan und die Schweiz (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft, 2018).

## 1.4 Einfluss der Fütterung auf die Eizusammensetzung

Die Qualität der Eierschale wird vor allem durch die Rasse, das Alter der Henne und deren Stresslevel bestimmt, kann aber auch durch gezielte Fütterung beeinflusst werden. Eine ausreichende Menge an Kalzium und darauf abgestimmte Anteile von Phosphor und Vitamin D3 können die Aufnahme positiv beeinflussen (Mine, 2008). Durch spezielle Fütterungsversuche wurde und wird auch immer wieder versucht, die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Eiern zu beeinflussen. Im Fokus dieser Versuche steht vor allem die Lipidfraktion.

Mehrfach wurde berichtet, dass die Fütterung die Fettsäurezusammensetzung im Eifett beeinflussen kann. Rhodes zeigte, dass die Gabe von Lebertran zu einer Zunahme der ungesättigten FS in sn-2 Position des PE führt (Rhodes, 1958). Gladkowski und Mitarbeiter fütterten in ihrer Studie Legehennen mit humushaltigem Futter, welches mit unterschiedlichen Gehalten an DHA und  $\alpha$ -Linolsäure angereichert war. Die Folge war eine Zunahme der  $\omega$ -3 FS, v.a. in den PL (Gladkowski et al., 2011). 2015 veröffentlichten Coorey und Mitarbeiter eine Studie über die Fütterung von Chiasamen, Fischöl und Leinsamen und deren Einfluss auf die Fettsäureverteilung. Die Fütterungen führten zu einer Zunahme der  $\alpha$ -Linolensäure (Coorey et al., 2014). Auch Cherian und Quezada zeigten in ihrer Studie, dass die Fütterung von Leinsamen zu einer allgemeinen Erhöhung der  $\omega$ -3 FS im Eidotter führt. Dies ist vor allem bei DHA und DPA deutlich zu erkennen (Cherian & Quezada, 2016).

Cholesterin ist im Eifett zu einem Anteil von 5-6 % enthalten. In den letzten Jahrzehnten wurden die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Cholesterin kontrovers diskutiert (Liu et al., 2010). Cholesterin wird durch die Henne synthetisiert und ist notwendig für die Eiproduktion. Verschiedene Fütterungsversuche zielten darauf ab, den Gehalt an Cholesterin zu senken. Basmacioğlu und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Fischöl und Leinsamen auf den Cholesteringehalt in Serum und im Ei. Die Ergebnisse zeigten, dass durch den höheren Gehalt an  $\omega$ -3 FS der Gehalt an Cholesterin im Serum der Legehennen signifikant gesenkt werden konnte. In den Eiern dagegen zeigte sich lediglich eine moderate Senkung des Cholesteringehalts, wohingegen der Anteil an  $\omega$ -3 FS auf das sechsfache anstieg (Basmacioğlu et al., 2003). In einer Studie durch Salma und Mitarbeiter wurden Legehennen unterschiedliche Mengen an *Rhodobacter capsulatus* (Probiotikum) gegeben, wodurch der Cholesteringehalt im Serum, wie auch in den Eiern gesenkt werden konnte (Salma et al., 2007). Versuche mit Hilfe von Pflanzensterinen den Cholesteringehalt im Serum und im Ei zu senken, zeigten keine Erfolge (Liu et al., 2010). Auch die Zugabe von Knoblauchsaff (Mahmoud et al., 1984) und verschiedenen Kräuterölen (Bölükbaşı et al., 2008) blieben wirkungslos.

Carotinoide kommen im Ei zu ca. 1 % (Huopalathi et al., 2007) vor und sind als farbgebende Komponente maßgeblich für die Dotterfarbe verantwortlich. Insgesamt zählen zu der Carotinoid-Familie mehr als 600 verschiedene fettlösliche Verbindungen. Die Hauptcarotinoide der Xantophylle sind Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin, in geringeren Mengen ist das  $\beta$ -Carotin vorhanden, welches zu der Gruppe der Carotine gehört. Andere Carotinoide sind nur in geringeren Mengen vorhanden oder wurden noch nicht identifiziert. Die Henne selbst kann keine Carotinoide produzieren, ist also darauf angewiesen, diese mit der Nahrung aufzunehmen. Die Aufnahme ist

abhängig von der Hühnerrasse, dem Fettgehalt und der Vitamine im Futter (Na et al., 2004). Durch die Fütterung kann die Dotterfarbe so beeinflusst werden, dass Farben von hellgelb bis tieforange erreicht werden können. Für die Farbauswahl können Eierproduzenten mit Hilfe eines Farbfächers entscheiden, welche Dotterfarbe im Ei erreicht werden soll und sie so den Konsumentenvorstellungen anpassen. Entsprechend wird das Futter mit verschiedenen Zusätzen an Carotinoiden angereichert (Bovšková et al., 2014). Durch die EU-Öko-Verordnung VO (EU) Nr. 834/2007 ist die Beigabe von Carotinoiden durch das Futtermittel bei der biologischen Haltung nicht zugelassen (VO(EG) Nr. 834, 2007). Andere Inhaltsstoffe des Eis wie Flavonoide und  $\alpha$ -Tocopherol konnten durch größere Auslaufmöglichkeiten auf Grünflächen, in Abhängigkeit von der Jahreszeit, positiv beeinflusst werden (Mugnai et al., 2014).

Das Alter, die Rasse und die Legephase, in der sich eine Henne befindet, sind neben der Fütterung zusätzliche Faktoren, die die Eizusammensetzung beeinflussen können. Bei der kommerziellen Eierproduktion werden als Legehennen meist nur sog. Hybridrassen eingesetzt. Legehybride sind spezielle Züchtungen, die so verändert wurden, dass sie mit wenig Futter viele Eier gleicher Qualität legen können. Nach der ersten Legephase, die ca. ein Jahr lang andauert, werden die Hennen aufgrund ihrer abnehmenden Legeleistung aussortiert (U.S. Department of Agriculture, 2000). Daher wird auf das Alter, die Rasse und die Legephase als Einflussfaktoren der Eizusammensetzung bei der weiteren Betrachtung nicht näher eingegangen.

## 1.5 Analytik von Hühnereiern

Das Hühnerei ist aus mehreren Komponenten aufgebaut, in welchen eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zu finden sind. Daher gestaltet sich die Analytik von Hühnereiern sehr vielfältig. Zu den Methoden, die zur Beurteilung der Beschaffenheit der Eierschale verwendet werden, zählen z.B. die Untersuchung der Schalenfarbe, der Form, der Abmessung des Eis, der Oberfläche, des Gewichtes der Schale, der Schalendicke und ihre Bruchfestigkeit. Um die Qualität des Eiinneren zu beurteilen, werden unter anderem die Farbe des Eigelbs, die Qualität des Eiklar und die Unversehrtheit der Dotterhaut untersucht (Roberts, 2004). Anhand der Haugh Einheit ist es möglich, die Qualität der Proteine und das Alter des Eis zu bewerten. Die Haugh Einheit ist eine von Haugh 1937 vorgestellte Maßeinheit, bei der mit Hilfe der Masse des Eis und der Höhe des Eiklars, welches das Eigelb nach dem Aufschlagen umgibt, Rückschlüsse auf die Viskosität des Eiklars und somit auf das Alter und die Qualität des Eis gezogen werden können (Haugh, 1937). Die Dotterfarbe, der Durchmesser des Eigelbs und das Verhältnis zwischen Eiklar und Eigelb sind weitere Parameter, die zur Beurteilung herangezogen werden können (Roberts, 2004).

Für die Untersuchung der verschiedenen Lipidklassen im Eigelb ist eine Isolierung der Fettfraktion unabdingbar. Diese kann mittels unterschiedlich polarer und unpolare Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemischen erfolgen. Um eine möglichst vollständige Extraktion der im Eigelb enthaltenen Lipide zu erhalten, wird in den meisten Studien eine Mischung aus unpolaren und polaren Lösungsmitteln verwendet (Bligh & Dyer, 1959; Folch et al., 1957; Löfgren et al., 2012; Matyash et al., 2008). Folch, Lees und Stanley verwendeten für die Extraktion von Hirn-Lipiden, welche vergleichbar mit den Lipiden aus Eigelb einen hohen Anteil an polaren Lipide besitzen eine Mischung aus Chloroform und Methanol (Folch et al., 1957). Andere versuchten weniger toxische Lösungsmittel zu verwenden, wie z.B. Hexan und Isopropanol (Radin et al., 1978) oder Butanol und Methanol (Löfgren et al., 2012).

Für eine vollständige Charakterisierung der enthaltenen Verbindungen ist meist eine Isolierung der einzelnen Fettkomponenten notwendig. Die unterschiedliche Löslichkeit in polaren und unpolaren Lösungsmitteln wird dabei zur Trennung genutzt. Galanos und Kapoulas verwendeten

dafür eine Mischung aus Petrolether und 87 % Ethanol. Sie konnten damit die unpolaren Lipide verschiedener Fettextrakte aus Matrices wie Ei, Milch und Rinderhirn, vollständig von den polaren Lipiden abtrennen und analysieren (Galanos & Kapoulas, 1962). Palacios und Wang trennten die PL und Cholesterin aus frischem Eigelb von den TAG, indem sie in mehreren Schritten mit Ethanol und Hexan extrahierten und so die einzelnen Gruppen voneinander isolierten. Ihnen war es damit möglich die Fraktionen einzeln zu untersuchen (Palacios & Wang, 2005). Eine andere Möglichkeit zur Auftrennung der Fettkomponenten sind chromatographische Methoden. Rhodes und Lea verwendeten eine Kieselgelsäule, um die TAG, PL und vorhandene Pigmente des zuvor extrahierten Eifettes zu trennen (Rhodes & Lea, 1957). Kuksis und Marai isolierten nach Fettextraktion die Lecithinfraktion mittels präparativer DC. Die verschiedenen Lipidbanden wurden mit 2,7-Dichlorfluorescein-Lösung besprüht, wodurch sie unter UV-Licht sichtbar wurden und durch einen Vergleich mit Standardsubstanzen zugeordnet werden konnten. Für weitere Untersuchungen wurden die Komponenten von der Platte entfernt und separat analysiert (Kuksis & Marai, 1967).

Die Untersuchung und Bestimmung der FS erfolgt aus dem isolierten Eifett. Die wohl bekannteste Methode hierfür ist die Analyse der FS als Fettsäuremethylester (FSME) unter Verwendung der Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) (L 13.00-45 BVL, 2018). Die FS der TAG, die am GlycerinGrundgerüst verestert vorliegen werden hierbei durch Umesterung in leichtflüchtige FSME überführt und anschließend mittels GC voneinander getrennt. Die Umesterung kann säure- oder basenkatalysiert erfolgen. Die säurekatalysierte Veresterung kann mit verschiedenen Säuren wie z.B. Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ), Salzsäure (HCl) oder Bortrifluorid ( $BF_3$ ) erfolgen. Der Nachteil der säurekatalysierten Umesterung sind die hohen Temperaturen, bei der es zu Artefaktbildung kommen kann. Die basenkatalysierte Umesterung kann unter Verwendung von Natriumhydroxid (NaOH) oder Kaliumhydroxyd (KOH) erfolgen. Diese Umesterung ist schnell und benötigt nur milde Temperaturen. Der Nachteil der basenkatalysierten Umesterung ist, dass FFS hierbei nicht verestert werden (Ke-Shun, 1994). Die Positionen der verschiedenen FS am TAG können durch enzymatische, chromatographische oder NMR spektroskopische Methoden bestimmt werden (Kuksis & Marai, 1967; Suárez et al., 2010; Takagi & Ando, 1991; Xia et al., 2015). Dabei zeigte sich, dass die Position sn-1 der TAG v.a. mit gesättigten FS, wie der Palmitinsäure, verestert ist. In Position sn-2 dagegen finden sich die ungesättigten FS wie Ölsäure und Linolsäure und Position sn-3 kann gleichermaßen beide, gesättigte und ungesättigte, FS enthalten (Juneja, 1997).

Die Analyse der PL kann mit chromatographischen Methoden, wie der Dünnschichtchromatographie (DC) und der Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatographie, HPLC) erfolgen. Bei den flüssig-chromatographischen Methoden erfolgt im Allgemeinen die Trennung an unterschiedlichen stationären Phasen unter Verwendung flüssiger Eluenten. So kann z.B. nach der Klasse der PL oder nach veresterten FS getrennt werden. Die Detektion erfolgt bei der DC mittels Detektionsreagenzien, die oxidierende Eigenschaften besitzen wie z.B. Molybdätdi-phosphorsäure oder eine Mischung aus Phosphorsäure und Kupfersulfat. Durch Abkratzen der PL-Banden von der DC-Platte können diese mit weiteren Analysemethoden untersucht werden (Helmerich & Koehler, 2003). Bei der HPLC kann die Detektion unter Verwendung verschiedener Detektoren wie einem UV-Detektor oder einem Lichtstreuungsdetektor (evaporative light scattering detector, ELSD) erfolgen (Pati et al., 2016). Die  $^{31}P$  NMR bietet eine Alternative zu den chromatographischen Methoden. Der Vorteil der  $^{31}P$  NMR ist, dass die einzelnen PL leicht identifiziert und quantifiziert werden können, der Nachteil ist die geringe Empfindlichkeit (Schiller & Arnold, 2002). Die Methoden der PL Analytik werden in Kapitel 3.4.2 genauer beschrieben.

Für die Untersuchung der Carotinoide können durch eine visuelle Analyse der Dotterfarbe bereits erste Rückschlüsse auf die Verwendung von Carotinoiden im Futter gezogen werden. Hierbei wird die Farbe des Eigelbs mit Hilfe eines Farbfächers verglichen. Die Farbe des Eigelbs kann hierbei von hellgelb bis tieforange variieren. Eine tieforange Farbe des Eigelbs deutet auf einen Zusatz von Carotinoiden zum Futter hin, der allerdings nur bei der konventionellen Hühnereierproduktion erlaubt ist. Eier biologischer Herkunft zeigen dagegen überwiegend eine hellere gelbliche Färbung des Eigelbs. Bei der photometrischen Bestimmung nach der AOAC Methode wird der Gesamtcarotinoidgehalt des Eigelbs als  $\beta$ -Carotin bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass andere Carotinoide, deren Maxima bei höheren Wellenlängen liegen, unterbestimmt werden (Bovšková et al., 2014). Einen Ansatz zur Bestimmung der Carotinoidzusammensetzung bietet die HPLC gekoppelt mit einem Diodenarray Detektor (DAD) (Schlatterer & Breithaupt, 2006; Van Ruth et al., 2010).

Die Bestimmung des Gehalts an Cholesterin und dessen Estern kann entweder enzymatisch oder mit Hilfe chromatographischer Methoden wie HPLC erfolgen (Liu et al., 2010; Yang et al., 2013).

Analytische Methoden zur Unterscheidung der Haltungssysteme zielen zum größten Teil auf die Parameter ab, die durch die Fütterung der Hennen beeinflusst werden können. Dazu zählen wie bereits in Kapitel 1.4 genannt, die Zusammensetzung der FS und darüber hinaus die Carotinoide, Flavonoide,  $\alpha$ -Tocopherol und die Qualität der Eierschale. Die chromatographischen Trenntechniken zählen hier zu den vorherrschenden Untersuchungsmethoden. Schlatterer und Breithaupt untersuchten in ihrer Studie mittels HPLC-DAD und LC gekoppelt mit chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) und Messung unter Verwendung von Massenspektrometrie (MS) (LC-(APCI)MS) die Carotinoidprofile von Eiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen. Vor allem die Gehalte an Zeaxanthin und Lutein trugen zur Differenzierung der Eier aus biologischer Haltung und den konventionellen Haltungssystemen bei (Schlatterer & Breithaupt, 2006). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Van Ruth und Mitarbeiter, die die Carotinoidprofile von Eiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen aus den Niederlanden und aus Neuseeland mittels einer vergleichbaren HPLC-DAD Methode untersuchten (Van Ruth et al., 2010). In ihrer Studie untersuchten sie unter Verwendung von HPLC-DAD das Carotinoidprofil von Eiern aus den Niederlanden und Neuseeland. In der Europäischen Union ist allgemein bei der biologischen Haltung ein Zusatz von Carotinoiden zu Futtermitteln nicht zugelassen (VO(EG) Nr. 834, 2007). In Kombination mit chemometrischen Verfahren konnten sie biologisch von konventionell erzeugten Hühnereiern aufgrund ihrer Carotinoidzusammensetzung unterscheiden (Van Ruth et al., 2010). Die limitierenden Faktoren bei dieser Studie sind die Anzahl der untersuchten Proben und die Schwankungen innerhalb einer Haltungsart. So lag die Probenanzahl für den Modellaufbau bei lediglich 48 Proben (24 Proben aus biologischer Haltung und je 12 Proben aus Bodenhaltung und Freilandhaltung) und die der Testproben bei insgesamt 36 (je 12 Proben von jeder Haltungsart). Mugnai und Mitarbeiter zeigten den Einfluss des Zugangs zu Grünflächen bzw. den damit verbundenen Einfluss der Aufnahme von Gräsern auf einzelne Eifettkomponenten. Die Untersuchung der Flavonoide und des  $\alpha$ -Tocopherols mittels HPLC-Trennung und fluorimetrischer Detektion zeigten deutliche Unterschiede in den Gehalten. Auch die Analyse der Fettsäureverteilung der TAG und PL, welche nach Umesterung mit GC-FID analysiert wurde, zeigte Unterschiede in den Haltungsgruppen (Mugnai et al., 2014). Campos und Mitarbeiter konnten bei ihren Untersuchungen der Fettsäureverteilung der PL und TAG Unterschiede feststellen. Das extrahierte Fett wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert, um die Fraktionen der PL und TAG einzeln zu analysieren. Die Fettsäureverteilung der beiden Fraktionen wurde nach Umesterung mittels GC gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) ermittelt

(Campos et al., 2016). Eine andere Herangehensweise zur Untersuchung der Haltungsdifferenzierung ist die Analyse der Stabilisotopenverteilung (isotope ratio mass spectrometry, IRMS). Rogers und Mitarbeiter untersuchten in verschiedenen Studien die  $\delta^{15}\text{N}$  und  $\delta^{13}\text{C}$  Werte im Eiklar von Hühnereiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen. Die  $\delta^{15}\text{N}$  Werte zeigten dabei signifikante Unterschiede zwischen den Haltungssystemen. Jedoch zeigten sich auch höhere Schwankungen innerhalb einer Haltungsort, welche unter anderem auf die geringe Probenzahl zurückgeführt werden können (Rogers, 2009; Rogers et al., 2015). Einen umfassenderen analytischen Ansatz wählten dagegen Filipiak-Florkiewicz und Mitarbeiter. Sie verglichen in ihrer Studie chemische Grundparameter wie den Wasser-, Protein-, Fett- und Aschegehalt sowie den Gehalt verschiedener Elemente (Na, K, Ca, Mg, Yn, Fe, Mn, Cu) von Eiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen (biologische Haltung, konventionelle Haltung (Käfighaltung)). Zudem untersuchten sie auch Eier aus Käfighaltung, die durch eine spezielle Fütterung der Legehennen mit  $\omega$ -3 FS angereichert wurden. Sie fanden, dass biologisch erzeugte Eier im Vergleich zu den beiden konventionellen Haltungsortarten höhere Gehalte an Protein und Kalium im Eiklar aufweisen. Dagegen waren die Natrium- und Magnesiumgehalte im Eigelb von konventionellen Eiern am höchsten. Die Eier, die mit  $\omega$ -3 FS angereichert wurden, zeigten hohe Gehalte an Kalzium im Eigelb. Außerdem zeigten sie höhere Gehalte an  $\omega$ -3 FS und niedrigere Gehalte an gesättigten FS. Die Fettsäurezusammensetzungen der Eier aus den verschiedenen Haltungsortgruppen ohne spezielle Fütterung unterschieden sich dagegen nur geringfügig (Filipiak-Florkiewicz et al., 2017). Allerdings waren die Probenzahlen bei dieser Studie eher gering, es wurden lediglich 10 Proben je Haltungsortart untersucht. Bei der Untersuchung von Eiern auf verschiedene Schwermetallgehalte aus konventionellen und biologischen Haltungssystemen fanden Bologna und Mitarbeiter signifikante Unterschiede in den Gehalten von Pb, Cd, Cu und Zn. Allerdings belief sich die Probenzahl bei dieser Studie auf lediglich 20 Proben (Bologna et al., 2014). Schließlich zeigten die Untersuchungen von Hidalgo und Mitarbeiter mittels einem Bruchfestigkeitsmesser unter anderem, dass die Eierschalen von Eiern aus Käfighaltung im Vergleich zu anderen Haltungsortarten die höchste Bruchfestigkeit aufwiesen (Hidalgo et al., 2008).

## 1.6 NMR Spektroskopie

### 1.6.1 Grundlagen

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie oder kurz NMR gehört zu den wichtigsten Charakterisierungsmethoden in der Chemie. Ihre Anfänge reichen zurück in das Jahr 1946, in dem zwei Forschungsgruppen an der Harvard und der Stanford Universität unabhängig voneinander in Paraffin und Wasser die ersten Protonensignale detektierten. Purcell und Bloch erhielten für ihre Entwicklungen 1952 den Nobelpreis für Physik. Mittlerweile hat sich die NMR zu einer sehr vielseitigen Methode entwickelt, die in vielen Bereichen der Chemie, der Biologie, der Medizin, der Materialwissenschaften, der Geologie und deren Teilgebiete nicht mehr wegzudenken ist (Claridge, 2009).

Das Prinzip der NMR beruht auf dem Verhalten von Atomkernen in einem äußeren magnetischen Feld  $B_0$ . Die Voraussetzung dafür ist der Eigendrehimpuls  $P$ , den die meisten Kerne besitzen. Der, angenommen kugelförmige, Atomkern rotiert dabei um die eigene Achse.

#### Formel 1

$$P = \sqrt{I(I + 1)} \hbar$$

$P$  ist gequantelt, wobei  $h$  ( $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ ) das Planck'sche Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js),  $\hbar$  das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum und  $I$  die Kernspinquantenzahl ist. Diese steht in Relation zu den Kernbausteinen, Protonen und Neutronen. Sie kann Werte von  $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$  annehmen. Sogenannte „gg“ Kerne besitzen sowohl eine gerade Anzahl an Neutronen als auch an Protonen und haben die Kernspinquantenzahl  $I=0$ . Sie sind für die NMR nicht zugänglich, da sie keinen Eigendrehimpuls und somit kein magnetisches Moment  $\mu$  aufweisen (Claridge, 2009; Friebolin, 2014).

**Formel 2**

$$\mu = \gamma P$$

Das magnetische Moment  $\mu$  ist definiert durch den Drehimpuls  $P$  und das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$ , welches die charakteristische Konstante eines jeden Isotops darstellt. Kerne mit einem großen gyromagnetischen Verhältnis sind bei der NMR empfindlicher als solche mit einem kleinen.

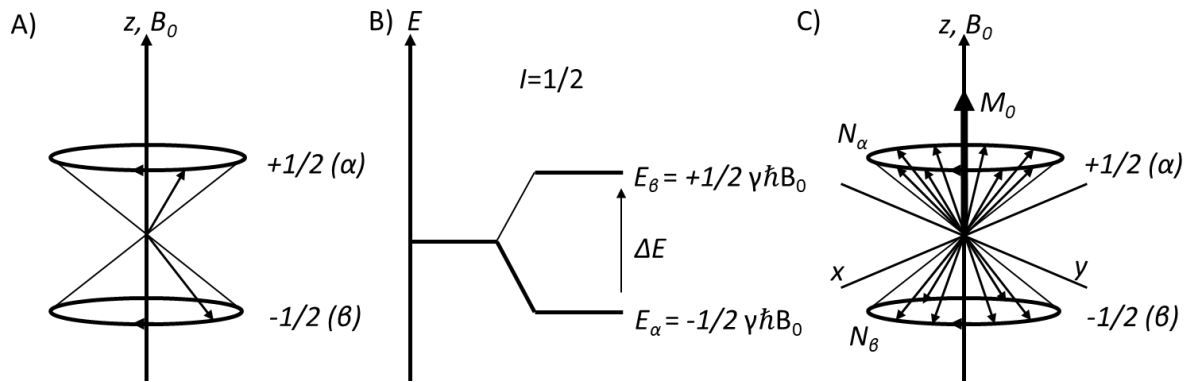
In einem statischen Magnetfeld ( $B_0$ ) richtet sich  $P$  entlang des Magnetfeldes entsprechend einer bestimmten Anzahl an Orientierungen aus, welche wiederum durch die Quantelung der Energiezustände zustande kommen. Für einen Spin  $I$  gibt es  $(2I + 1)$  mögliche Spinzustände im magnetischen Feld. Dieses Verhalten wird auch als Richtungsquantelung bezeichnet. Ein Kern ( $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) mit  $I=1/2$  kann demnach zwei Spinzustände mit den Werten  $+1/2$  bzw.  $-1/2$  einnehmen. Ein Kern mit  $I=1$  dagegen drei,  $+1$ ,  $0$  und  $-1$ . In Abbildung 1-7A sind die zwei möglichen Spinzustände eines Kerns mit der Spinquantenzahl  $I=1/2$  zu sehen,  $+1/2$  ( $\alpha$ -Zustand) und  $-1/2$  ( $\beta$ -Zustand). Durch Einbringen der Kerne in ein statisches Magnetfeld präzedieren die Kerndipole um die z-Achse des  $B_0$  Feldes. Die Präzessionsfrequenz der Kerndipole, die auch als Larmor-Frequenz ( $\nu_L$ ) bezeichnet wird, ist abhängig von der magnetischen Flussdichte  $B_0$  und dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$ .

**Formel 3**

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0$$

Entsprechend der Orientierung der Spins gibt es  $2I + 1$  unterschiedliche Energiezustände der Kerne ( $E_\alpha$  und  $E_\beta$ ). Diese werden als Kern-Zeeman-Niveaus bezeichnet. In Abbildung 1-7B ist das Energieniveauschema für Kerne der Spinquantenzahl  $I=1/2$  zu sehen. Der  $\alpha$ - oder  $+1/2$  Spinzustand, der parallel zur Feldrichtung ausgerichtet ist, besitzt eine energetisch günstigere Anordnung, die etwas energieärmer ist als der  $\beta$ -Zustand. Der Energieunterschied  $\Delta E$  der beiden Kerne beträgt  $\Delta E = \gamma \hbar B_0$  und ist damit abhängig vom Magnetfeld  $B_0$ .





**Abbildung 1-7: A) Doppelpräzessionskegel der Spinzustände für Kerne mit einer Spinquantenzahl von  $I=1/2$  B) Energieeiveauschema für Kerne mit einer Spinquantenzahl  $I=1/2$  C) makroskopische Magnetisierung  $M_0$  verursacht durch  $N_\alpha > N_\beta$**

Für die Besetzung der Energieniveaus folgt mit Hilfe der Boltzmann-Verteilung ( $k_B =$  Boltzmann-Konstante,  $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ):

**Formel 4**

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T}$$

$N_\alpha$  und  $N_\beta$  bezeichnet die Anzahl der Kerne mit entsprechender Orientierung. Die Unterschiede der Energiezustände und somit auch der Besetzungszustände sind sehr gering. Im Gleichgewicht besteht ein kleiner Überschuss der Kerne im energieärmeren  $\alpha$ -Zustand ( $N_\alpha$ ). Dieser Besetzungsüberschuss der Kerne im  $\alpha$ -Zustand führt zu einer makroskopischen Magnetisierung  $M_0$  entlang der z-Achse in Feldrichtung (s. Abbildung 1-7C). Da die Orientierung der Spins in der transversalen Ebene (x-y-Richtung) statistisch verteilt ist und keiner bestimmten Orientierung folgt, kann die makroskopische Magnetisierung einfachheitshalber auf einen einzelnen Vektor  $M_0$  reduziert werden. Diese Darstellung wird auch als Bloch Vektor Modell bezeichnet (Claridge, 2009; Friebolin, 2014).

Bei der NMR Messung werden die Spinzustände der Kerne durch die Absorption von Energiequanten verändert. Die Energie wird dabei durch elektromagnetische Strahlung in Form eines Hochfrequenzpulses zugeführt, bei dem alle Kerne einer Sorte auf einmal angeregt werden. Um diesen Effekt und dessen Auswirkungen einfacher beschreiben zu können, wird ein rotierendes Koordinatensystem ( $x', y', z'$ ), welches sich entsprechend der Larmor-Frequenz der Kerne mitdreht, verwendet. Dadurch ist die Präzession der Spins um die z-Achse vernachlässigbar, da sie sich entsprechend dem Koordinatensystem bewegt. Durch einen  $90^\circ_x$  Impuls (s. Abbildung 1-8A) wird die Magnetisierung in die  $y'$ -Achse gedreht (s. Abbildung 1-8B). Dabei präzediert nun ein kleiner Teil der Kerne gebündelt in Phase. Die entstandene Quermagnetisierung  $M_{y'}$  induziert ein Signal in der Empfängerspule, die um die y-Achse angeordnet ist. Im Laufe der Zeit nimmt  $M_{y'}$  durch Relaxationsprozesse wieder ab (s. Abbildung 1-8C). Dabei fächern die kohärent präzedierenden Kerne auf und kehren in ihren Ursprungszustand  $M_0$  zurück. Die Relaxation kann durch zwei Relaxationsvorgänge beschrieben werden. Die Spin-Gitter oder longitudinale Relaxation und die Spin-Spin oder transversale Relaxation. Bei der longitudinalen Relaxation wird die vom Impuls aufgenommene Energie an die Umgebung (Gitter) übertragen, wodurch dessen Energie in Form von Wärme zunimmt. Das Gitter ist definiert als die Nachbarmoleküle und die Gefäßwand. Dieser Prozess ist exponentiell und die Wiederherstellung +z-Magnetisierung ( $M_z$ ) wird durch folgende von Bloch aufgestellte Gleichung beschrieben:

## Formel 5

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{(M_0 - M_z)}{T_1}$$

Mit  $M_0$  als Magnetisierung im Gleichgewicht und  $T_1$  als longitudinale Relaxationszeit des nach erster Ordnung ablaufenden Prozesses. Die transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ) beschreibt die in Abbildung 1-8C dargestellte Auffächerung der zuvor kohärenten Spins. Je weiter dieser Prozess fortschreitet, desto kleiner wird  $M_{y'}$  und somit das in der Empfängerspule induzierte Signal. Die Auffächerung rührt zum größten Teil daher, da das effektiv wirkende Magnetfeld  $\Delta B_0$  nicht für alle Kerne gleich ist. Durch diese Inhomogenität präzedieren die Kerne mit unterschiedlichen Larmorfrequenzen, wodurch es mit fortschreitender Zeit zur oben genannten Auffächerung der Spins kommt. Dass mit der Zeit abnehmende Signal in der Empfängerspule wird auch als freier Induktionszerfall (free induction decay, FID) bezeichnet. Durch eine Fouriertransformation (FT) wird das aufgenommene Spektrum von der Zeit- in die Frequenzdomäne umgewandelt (Claridge, 2009; Friebolin, 2014).

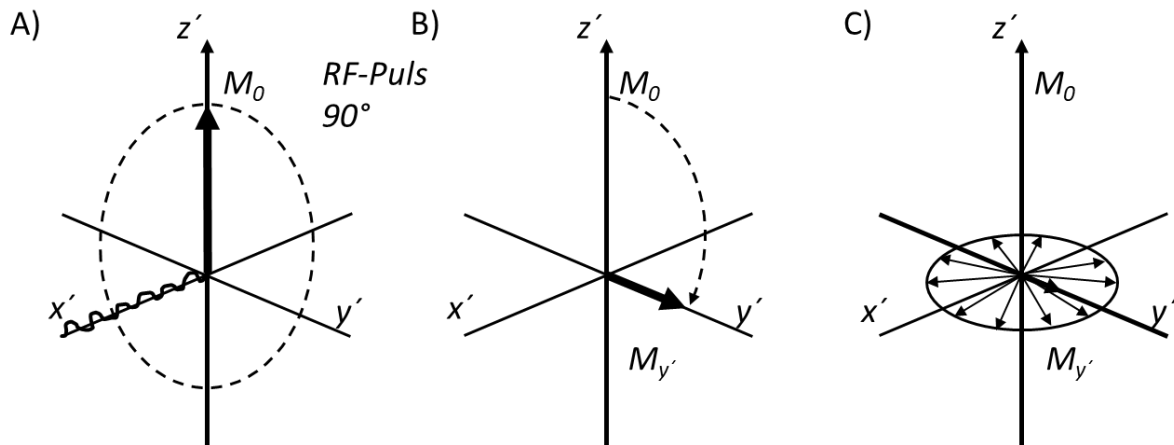


Abbildung 1-8: A)  $90^\circ_{x'}$ -Impuls dargestellt in einem rotierenden Koordinatensystem B) durch den  $90^\circ_{x'}$ -Impuls wird die Magnetisierung in die  $x'$ - $y'$ -Ebene gedreht C) durch Relaxationsprozesse kommt es zur Auffächerung der zuvor kohärenten Spins (hier nur in  $x'$ - $y'$ -Ebene gezeigt)

## 1.6.2 Quantitative NMR

Die quantitative NMR oder auch qNMR ist vor allem im Bereich der  $^1\text{H}$  NMR nicht mehr wegzudenken. Pauli und Mitarbeiter zeigten, dass die Anzahl von Veröffentlichungen im Bereich der qNMR in den letzten 55 Jahre stetig gestiegen ist (Pauli et al., 2012). Die Vorteile der NMR gegenüber anderen Methoden liegen vor allem in der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen mittels verschiedener NMR Spektrometer. Auch zeigt die qNMR eine sehr kleine Streuung der Messwerte untereinander, was für eine gute Präzision und somit einen niedrigen Anteil an zufälligen Fehlern steht. Die Richtigkeit ist durch eine gute Übereinstimmung einer Messreihe mit dem „wahren“ Wert gegeben, was durch einen kleinen systematischen Fehler wiedergegeben wird. Auch hier zeigen Messungen der qNMR in der Regel eine gute Richtigkeit der Ergebnisse über einen weiten Konzentrationsbereich. Ein weiterer Vorteil ist, dass die NMR Messung nicht destruktiv ist und die Probe nach der Messung weiterverwendet werden kann. Weiter können mit einer Messung mehrere Analyten gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden. Ein Nachteil

der NMR ist ihre Unempfindlichkeit und die hohen Anschaffungskosten für das Spektrometer (Jancke, 1998; Pauli et al., 2012).

Die Grundlage und einer der wesentlichen Vorteile der  $^1\text{H}$  qNMR ist, dass die Signalintensität ( $I_x$ ) direkt proportional zu der Anzahl an Kernen ( $N_x$ ) ist, die zu dem Signal führt.

**Formel 6**

$$I_x = k_s * N_x$$

$k_s$  wird als Spektrometerkonstante bezeichnet, ist jedoch bei Einhaltung der gleichen qNMR Aufnahmeparameter und bei Verwendung des gleichen Spektrometers und Probenkopfes nicht relevant. Die Intensitätsverhältnisse stehen im direkten Zusammenhang zu den jeweiligen Kernen und können so auf alle anderen Kerne der gleichen Sorte und Signale bezogen werden (Friebolin, 2014).

**Formel 7**

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1}{N_2}$$

Es gibt verschiedene Aufnahmeparameter, die  $k_s$  beeinflussen können:

1) Der Anregungspuls, der über die gesamte spektrale Breite gleichförmig sein sollte. Es kann ein  $90^\circ$  Puls oder ein Puls mit geringerem Winkel verwendet werden. Ein  $90^\circ$  Puls liefert das Maximum an Intensität, allerdings benötigt das Spinsystem anschließend auch die volle  $T_1$ , um in den Ausgangszustand zurückzukehren. Bei einem geringeren Pulswinkel dagegen braucht das Spinsystem nur einen Teil von  $T_1$ , wodurch die Messzeit verringert wird.

An den Rändern der angeregten Bandbreite, die weiter von der Frequenz der Einstrahlung, dem sogenannten Offset entfernt liegen, ist die Intensität aufgrund der Form des Pulses geringer. Dies kann dazu führen, dass diese Bereiche nicht die volle Anregung erfahren (Bharti et al., 2008). Der Puls kann je nach Probenart und deren Zusammensetzung abgeschwächt werden, was vor allem bei wässrigen Lösungen mit einem höheren Salzgehalt der Fall sein kann. Salzionen in Lösung besitzen einen abschirmenden Effekt auf Analytmoleküle und erhöhen die Leitfähigkeit der Probe. In diesem Fall ist es wichtig, dass jede Probe ein separates „Tuning und Matching“ erfährt und eine Pulskalibrierung durchgeführt wird (Gadian & Robinson, 1979). Beim Tuning und Matching werden die Sender- und Empfängerspule im Probenkopf durch Veränderung der im Stromkreis enthaltenen Kondensatoren optimal auf die Messung eingestellt. Das Tuning sorgt dafür, dass die Frequenz einer Kernsorte optimal auf den Probenkopf eingestellt wird. Dies ist vergleichbar mit dem Einstellen eines Radios auf einen bestimmten Radiosender. Beim Matching wird die Fähigkeit der Spulen ein Signal zu senden und zu empfangen so optimiert, dass ein Maximum erreicht wird (Claridge, 2009).

2) Die Repetition Time  $T_R$  setzt sich zusammen aus dem Relaxations-Delay ( $D_1$ ) und der Akquisitionszeit (AQ). Die AQ ist die Zeit, über die ein Scan aufgenommen wird. Die  $T_R$  sollte möglichst fünfmal (Mooney, 1989) der längsten  $T_1$  entsprechen, um 99 % der Gleichgewichtsmagnetisierung zu erlangen. Die  $T_1$  kann mittels inversion recovery-Experiment bestimmt werden (Friebolin, 2014).

3) Die Breitbandentkopplung der  $^1\text{H}$  Kerne spielt vor allem bei Heterokernen wie  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  eine Rolle. Diese führt dazu, dass Signale durch den Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE) abgeschwächt oder verstärkt werden. Um diese Intensitätsschwankungen auf ein Minimum von ca. 1 % zu reduzieren, sollte die Breitbandentkopplung während der AQ erfolgen.

Dies wird mit Hilfe eines Pulsprogrammes, dem inverse gated decoupling (zgig) erreicht (Bharti et al., 2008).

Andere Akquisitionsparameter, wie der Receiver Gain (RG), die digitale Auflösung und der Shim müssen auf die Probe und deren Konzentration angepasst werden. Die digitale Auflösung wird definiert durch die spektrale Breite dividiert durch die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte. Der Shim oder das Shimmen wird angewandt, um mit speziellen Shim-Spulen eine maximale Magnetfeldhomogenität über den zu messenden Probenbereich zu erreichen. Magnetfeldinhomogenitäten führen zu Signalen mit deformierten Linienformen, die die Empfindlichkeit und die Auflösung nachteilig beeinflussen. Die Temperatur sollte zwischen Experimenten nicht variieren, da sie u.a. die Relaxation beeinflussen kann. Wichtige Punkte stellen noch die Lösungsmittelunterdrückungstechniken und die Qualität der NMR Röhren dar (Burton et al., 2005). Bei Letzteren kann je nach Hersteller die Qualität stark variieren. Der Innendurchmesser und dessen Schwankungen sind entscheidend für vergleichbare Messungen (Bharti et al., 2008). Auf Besonderheiten, die bei der Prozessierung und Integration beachtet werden müssen, wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

Bei der qNMR werden verschiedene Quantifizierungsmethoden unterschieden, es gibt relative und absolute Methoden. Die absoluten Methoden können nochmals unterteilt werden in Methoden mit internem Standard und in Methoden mit externem Standard (Bharti & Roy, 2012). Allgemein gilt, dass die Anforderungen und Voraussetzungen für alle Quantifizierungsmethoden die gleichen sind. Die NMR wurde von Jancke und Malz als primäre Relativmethode beschrieben, da sie in der Lage ist Absolutgrößen wie Reinheit, Konzentration und Gehalt mit Hilfe eines Standards zu bestimmen (Jancke, 1998; Malz, 2003).

Die relative Quantifizierung gehört zu den einfachsten Quantifizierungsmethoden. Mit ihr ist es möglich Stoffmengenverhältnisse ( $n_1/n_2$ ) von zwei Komponenten 1 und 2 direkt zu berechnen, da die Verhältnisse der Intensitäten direkt in Beziehung zu den jeweiligen Kernen gesetzt werden können. Die einzige Bedingung ist, dass  $k_s$  über die gesamte spektrale Breite konstant ist (Malz, 2003).

**Formel 8**

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{I_1}{I_2} * \frac{N_1}{N_2}$$

Auch ist es möglich den Stoffmengenanteil  $n$  einer Komponente X in einer Mischung aus Z Komponenten mit folgender Gleichung zu ermitteln:

**Formel 9**

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^Z n_i} = \frac{I_x N_x}{\sum_{i=1}^Z I_i / N_i} * 100\%$$

Bei der absoluten Quantifizierungsmethode ist es erforderlich, dass ein Standard mit bekanntem Gehalt und bekannter Reinheit der Lösung hinzugefügt wird. Dadurch ist es möglich, eine absolute Messgröße, wie den Gehalt der anderen Komponenten zu bestimmen (Malz, 2003). Der Standard sollte der Qualität eines Primärstandards entsprechen, wie z.B. ein Standard aus zertifiziertem Referenzmaterial (certified reference material, CRM) oder auf diesen zurückgeführt werden können (Beyer, 2011).

## **Quantifizierung unter Verwendung interner Standardsubstanzen**

Die Verwendung eines internen Standards zur Quantifizierung ist eine der bekanntesten Methoden. Ein Standard bekannter Reinheit und Konzentration wird direkt zu der Lösung gegeben. Dabei muss der Standard bestimmte Anforderungen erfüllen. Der „perfekte“ interne Standard ist chemisch inert, d.h. er zeigt keinerlei Wechselwirkungen mit den Analyten oder dem Lösungsmittel, dabei ist er in den gängigen NMR Lösungsmitteln gut löslich. Er ist in Reinform kostengünstig erhältlich, nicht hygroskopisch und bei längeren Untersuchungen stabil und nicht leicht flüchtig. Er weist keine Überlagerungen mit anderen Signalen auf und seine T1 entspricht denen der zu untersuchenden Analyten (Malz, 2003). Da es relativ schwierig ist einen solchen Standard zu finden, müssen Kompromisse eingegangen werden. In der Literatur werden verschiedene Standardsubstanzen für die qNMR empfohlen (Malz, 2003; Pauli et al., 2012). Der wohl bekannteste interne Standard für wässrige Lösungen ist Natriumtrimethylsilylpropionat (TSP) und für organische Lösungen Tetramethylsilan (TMS). Diese werden zur Referenzierung der chemischen Verschiebung, aber auch zur Quantifizierung eingesetzt (Bharti & Roy, 2012). Allerdings eignen sich beide eher nur bedingt für letzteren Zweck. TMS ist leicht flüchtig und daher eher ungeeignet für quantitative Analysen. Bei TSP ist die Matrix entscheidend, da es von Proteinen und TAG komplexiert wird (Alum et al., 2008). Auch wurde bei TSP während Langzeitstabilitätsuntersuchungen in abgeschmolzenen Röhrchen festgestellt, dass dieses an die Glaswand adsorbiert (Larive et al., 1997). Daher ist es wichtig, für jede Fragestellung neu zu entscheiden, welcher Standard am geeignetsten ist.

Bei der Analyse werden die Analyten gegen den internen Standard ausgewertet. Durch die bekannte molare Masse der Analyten und deren Signalfäche können die Gehalte bestimmt werden. Es ist nicht unbedingt erforderlich, alle Signale eines Analyten in die Bestimmung miteinzubeziehen. Wichtig ist, dass das verwendete Signal nicht überlagert wird. Der größte Nachteil der Methode ist, dass der Standard zu jeder Probe hinzugegeben werden muss, was Zeit und Material kostet und eine Fehlerquelle darstellt. Auch kann die Suche nach einem geeigneten Standard sehr mühsam sein (Cullen et al., 2013; Malz, 2003).

## **Quantifizierung unter Verwendung externer Standardsubstanzen**

Bei Verwendung eines externen Standards müssen die gleichen Messbedingungen und Akquisitionsparameter wie bei der Probe eingehalten werden, d.h. Temperatur, RG, Anregungspulslänge, spektrale Breite und NMR Röhrchen mit gleicher Spezifikation (Beyer, 2011). Grundsätzlich sollte bei der Verwendung einer externen Standardlösung die Konzentration des Standards zuvor mit einem anderen Referenzstandard mit bekannter Konzentration überprüft und gegebenenfalls angepasst werden. Die Vorteile der Verwendung externer Standardsubstanzen liegen darin, dass es zu keiner Überlagerung der Analytsignale aufgrund gleicher chemischer Verschiebungen kommt. Zudem muss der Standard nicht zu jeder Probe hinzugegeben werden und etwaige Wechselwirkungen zwischen Standard und Analyt können dadurch ausgeschlossen werden. Auch wird die Probe nicht durch den Standard verunreinigt und steht für eine weitere Verwendung zur Verfügung. Ein Nachteil einer externen Standardlösung ist die nicht Berücksichtigung des Matrixeffektes in der Probenlösung. Dieser wird durch die Einflüsse aller Probenbestandteile einer Lösung auf die zu quantifizierenden Analyten beschrieben und kann mittels einer externen Standardlösung nicht erfasst werden. Ein v.a. früher auftretender Nachteil war die Spektrometerstabilität, die jedoch in den letzten Jahren soweit verbessert wurde, dass sie heute nur noch einen geringen Einfluss ausübt. Den wohl größten nachteiligen Einfluss stellen die verwendeten NMR Röhrchen dar. Diese zeigen je nach

verwendeter Qualitätsstufe Schwankungen v.a. im Bereich des Innendurchmessers, der ausschlaggebend für die Füllhöhe der Lösung ist. Unterschiedliche Füllhöhen im Proben- und Standardröhrchen führen zu unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten in der aktiven Messregion, was zu falschen Ergebnissen führt. Cullen und Mitarbeiter zeigten, dass die Quantifizierung unter Verwendung externer Standardsubstanzen im Vergleich zum internen Standard zwar größeren Schwankungen unterliegt, aber diese sich noch in einem vertretbaren Rahmen befinden (Cullen et al., 2013). Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Quantifizierung mittels externer Standards. Dazu zählen die Verwendung einer Standardlösung in einem separaten NMR Röhrchen gleicher Spezifikation, die Verwendung eines Coaxialröhrchens, das ERETIC-Verfahren und das PULCON-Verfahren. In den nächsten Abschnitten werden diese Verfahren näher beschrieben.

Bei Verwendung der üblichen externen Standardmethode befinden sich Analytlösung und Standardlösung in zwei verschiedenen NMR Röhrchen. Diese werden unter denselben Messbedingungen vermessen, und die Auswertung erfolgt über das absolute Integral des Standards. Es kommt dadurch zu keinen Signalüberlagerungen. Die Standardlösung kann für mehrere Proben und je nach Stabilität der Lösung auch über einen längeren Zeitraum verwendet werden. Der Nachteil liegt in der Verwendung eines zusätzlichen Röhrchens, welches einen Volumenfehler, je nach Qualität, von ca.  $\pm 1$  % verursachen kann (Wider & Dreier, 2006). Auch werden etwaige Matrixeffekte in der Probenlösung nicht berücksichtigt.

Bei der Verwendung eines Coaxialröhrchen wird ein zusätzliches Röhrchen, welches den gelösten Standard enthält, in das NMR Röhrchen mit Probenlösung eingesetzt. Es ist darauf zu achten, dass die Füllhöhen beider Röhrchen gleich sind. Das Signal des Standards erscheint bei Verwendung eines Coaxialröhrchens im Analytspektrum. Probleme können z.B. beim Shimmen der Probe auftreten, wenn unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden. Auch ist die Empfindlichkeit aufgrund des geringeren Analytvolumens im Probenröhrchen reduziert. Wird eine vergleichende Studie durchgeführt, sollte wegen der besseren Reproduzierbarkeit immer dasselbe Coaxialröhrchen verwendet werden (Bharti & Roy, 2012; Cullen et al., 2013).

ERETIC bedeutet "Electronic REference To access In vivo Concentrations" (Barantin et al., 1997) und bezeichnet ein Verfahren, welches erstmals von Barantin, Pape und Akoka vorgestellt wurde. Dabei wird dem FID ein künstlich erzeugtes elektronisches Signal hinzugefügt. Nach erfolgter Fourier-Transformation ist das künstlich erzeugte Signal im Spektrum sichtbar. Das sog. ERETIC-Signal kann mit Lösungen bekannter Konzentration kalibriert werden und kann dadurch zur Quantifizierung von Analyten verwendet werden (Akoka et al., 1999; Barantin et al., 1997). Der Nachteil dieser Methode zeigt sich vor allem, wenn Proben mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen vermessen werden. Der Quality-Faktor (Q-Faktor) des Probenkopfes ändert sich mit dem Salzgehalt der Probe. Durch einen höheren Salzgehalt wird die Leitfähigkeit der Probe erhöht und die Salzionen üben einen abschirmenden Effekt auf die Analytmoleküle aus. Aufgrund eines schlechten Tunings und Matchings wird der Einfluss des  $90^\circ$ -Pulses abgeschwächt, wodurch Fehler beim Quantifizieren entstehen können. Bei einer Rekalibrierung des Pulses zeigt sich eine Abhängigkeit der Pulslänge zum Salzgehalt. Je höher der Salzgehalt, desto länger wird der Anregungspuls. Das ERETIC-Signal muss entsprechend der unterschiedlichen Pulslängen der Probenlösungen angepasst werden. Eine andere Möglichkeit gemäß ERETIC2 ist es, ein digitales Signal durch die Software in das Spektrum zu integrieren (Bharti & Roy, 2012).

Das "Pulse Length based CONcentration determination" (Wider & Dreier, 2006) oder kurz PULCON-Prinzip wurde von Wider und Dreier vorgestellt. Sie entwickelten dieses Verfahren, da es bei biologischen Proben schwierig war einen internen Referenzstandard zu finden, der keine Wechselwirkung mit den in der Probe vorhandenen Makromolekülen, v.a. Proteinen, zeigte und auch mit keinen Signalen überlagerte. Das Verfahren musste zudem in der Lage sein jegliche Änderungen der Empfängerspule, die sich aufgrund der Probenzusammensetzung ergeben, zu berücksichtigen. Ein Beispiel dafür ist die Salzkonzentration, welche unter anderem die Signalstärke beeinflusst. Das PULCON-Prinzip beruht auf dem Reziprozitätsprinzip (Hoult, 2011), welches aussagt, dass bei geeigneten Einstellungen die Länge des 90° Pulses für eine Probe in einer bestimmten Spule umgekehrt proportional zu deren Sensitivität ist.

Durch Anwendung von Formel 10 kann durch die Bestimmung des 90° Pulses einer Probe die Konzentration mit Hilfe einer externen Referenzprobe bestimmt werden. Dabei bezeichnet  $c_U$  die unbekannte Konzentration einer Probe U und  $c_R$  die bekannte Konzentration einer Probe R.

**Formel 10**

$$c_U = f_T c_R \frac{S_U T_U \theta_{90}^U n_R}{S_R T_R \theta_{90}^R n_U}$$

$S$  ist das Signal bzw. das Integral eines bestimmten Signals,  $T$  bezeichnet die Probentemperatur in Kelvin,  $\theta_{90}$  ist die Länge des 90° Hochfrequenzpuls und  $n$  ist die jeweilige Anzahl der Scans von  $U$  und  $R$ . Der Faktor  $f_T$  wird verwendet, um Unterschiede der Signalintensitäten auszugleichen, wenn z.B. verschieden Experimente oder unterschiedliche Parametereinstellungen bei den Experimenten verwendet werden. Die Voraussetzungen für das Funktionieren des PULCON-Prinzips ist die Verwendung des gleichen Probenkopfes bei Probe und Referenz und ein jeweils separates Tuning und Matching. Wider und Dreier verwendeten dieses Verfahren, um Proteinproben mit unterschiedlichen Pulslängen zu quantifizieren. Die Methode ist vor allem dann geeignet, wenn Proben einen unterschiedlichen Salzgehalt aufweisen und dadurch der Puls bei jeder Messung variiert (Wider & Dreier, 2006).

Die hier vorgestellten Techniken beziehen sich alle auf eindimensionale Messungen von kleinen Molekülen einfacher Zusammensetzung. Bei Mischungen mit mehr oder komplexeren Molekülen wird eine einfache Quantifizierung oft durch Signalüberlagerungen verhindert. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Signal-Dekonvolution oder die Verwendung von 2D NMR Techniken (Bharti & Roy, 2012). Bei der Signal-Dekonvolution werden die Signalflächen überlagernder Signalen mit Hilfe eines mathematischen Iterationsverfahrens, bei dem die Signalbreite, die Frequenz, die Intensität, die Multiplizität und die Signalform eines Signals berücksichtigt werden, berechnet (Soininen et al., 2005). Vor allem auf dem Gebiet der quantitativen 2D NMR gab es in den letzten Jahren immer mehr Entwicklungen, wie der Übersichtsartikel von Patrick Giraudeau (Giraudeau, 2014) zu diesem Thema zeigt.

### 1.6.3 Prozessierung

Die Prozessierung der NMR Daten ist für die quantitative Auswertung genauso wichtig wie die Aufnahme der NMR Spektren. Falsche Referenzierung behindert die Signalzuordnung und erschwert Vergleiche mit der Literatur oder Referenzspektren. Eine falsche oder inkonsistente Phasen- und Basislinienkorrektur verursacht ungenaue quantitative Bestimmungen und macht eine statistische Auswertung unmöglich. Richtige Prozessierung dagegen kann die Integration, das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) und die Auflösung verbessern. Daher ist es wichtig, die

Prozessierungsparameter zu kennen und korrekt anzuwenden. Die wichtigsten Parameter und ihre Einflüsse werden nachfolgend beschrieben.

### **Anwendung von Fensterfunktionen**

Eine Fensterfunktion oder window function wird vor der Fourier-Transformation auf die Daten angewendet, d.h. der FID wird mathematisch verändert. Sie kann entweder das S/N-Verhältnis oder die Auflösung verbessern. Die gängigste Funktion ist eine exponentielle Fensterfunktion. Durch diese wird die Verdichtung der hinteren Datenpunkte des FIDs reduziert, und der FID wird gegen Null gezwungen. Dies führt zu einer Verringerung des Rauschens und einer Erhöhung der Empfindlichkeit. Dies ist aber mit breiteren Signalen und einer geringeren Auflösung verbunden. Im Gegensatz dazu wird bei Anwendung einer Fensterfunktion, die den mittleren und hinteren Bereich des FIDs verstärkt, wie z.B. eine Gaussfunktion, die Auflösung aber auch das Rauschen erhöht. Dadurch können beispielsweise Signale mit ähnlicher chemischer Verschiebung besser voneinander getrennt werden (Emwas et al., 2016).

Die Stärke des Abfalls einer Exponentialfunktion wird durch den Parameter für die Linienbreite (line broadening, LB) bestimmt (Bharti & Roy, 2012). Die Signalform, welche im Normalfall einer Lorentzform entspricht, wird durch eine Multiplikation des FIDs mit einer Gaussfunktion in eine Gaussform umgewandelt. Diese unterscheidet sich dadurch, dass sie an der Basis des Signals schmaler wird. Die Gaussfunktion wird durch zwei Parameter LB und GB beeinflusst. LB ist wie bei der exponentiellen Funktion für die Stärke des Abfalls verantwortlich, jedoch sind die Werte negativ. GB kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und bestimmt, welcher Bereich des FIDs hervorgehoben wird (Emwas et al., 2016).

### **Zero filling**

Das zero filling wird dazu verwendet das S/N-Verhältnis zu verbessern. Erhöht man die Anzahl an Datenpunkten bei der Fourier-Transformation, werden diese zusätzlichen Datenpunkte dem FID am Ende hinzugefügt. Jeder dieser neuen Datenpunkte besitzt die Amplitude Null. Durch diese Vorgehensweise wird zwischen den realen Datenpunkten interpoliert, um die Signalform zu verbessern und die Signallage besser bestimmen zu können. Das Spektrum erhält dadurch keine neuen Informationen, jedoch kann die digitale Auflösung erhöht werden, wodurch das Rauschen abnimmt. Wichtig für das zero filling ist, dass der FID bei dessen Aufnahme, bis Null abgeklungen ist, da ansonsten Abbruch-Artefakte entstehen können. Diese zeigen sich als Signalverzerrungen sogenannte sinc wiggles an der Basis des NMR Signals. Mehr als die Verdopplung der Datenpunkte bringt meist keine Verbesserung des S/N, sondern benötigen nur mehr Speicherplatz (Bharti & Roy, 2012; Emwas et al., 2016).

Eine Alternative zum zero filling ist die Methode der linearen Vorhersage (linear prediction), die v.a. dann eingesetzt werden kann, wenn Teile des FIDs fehlen. Bei einem nicht vollständig abgeklungenen FID kann das fehlende Ende mit Hilfe der forward linear prediction berechnet werden. Hierzu werden Informationen über Frequenz, Phase und Amplitude des existierenden FIDs verwendet, um den fehlenden Teil zu rekonstruieren. Dadurch können z.B. Basislinienverzerrungen, nicht lineare Phasenprobleme und wiggles abgeschwächt werden. Der Unterschied zum zero filling ist, dass bei der linear prediction sowohl die digitale Auflösung als auch die Qualität des Spektrums verbessert wird. Diese Technik wird v.a. bei der 2D NMR eingesetzt, um die Messzeit zu verkürzen oder die Qualität von bereits vorhandenen Spektren zu erhöhen (Led & Gesmar, 1991).



## **Phasenkorrektur**

Die Phasenkorrektur ist einer der wichtigsten Parameter für eine genaue Intensitätsmessung. Mit dieser Anpassung ist es möglich Intensität und Symmetrie der Signale in einem Spektrum zu beeinflussen. Fehler zeigen sich durch falsche Signalverhältnisse und führen zu inkorrekten Konzentrationsbestimmungen. Bharti und Roy sowie Emwas und Mitarbeiter zeigen, dass eine manuelle Phasenkorrektur einer automatischen vorgezogen werden sollte, da vor allem bei Metabolomicsuntersuchungen kleine Signale sonst verzerrt werden könnten (Bharti & Roy, 2012; Emwas et al., 2016). Bei der automatischen Phasenkorrektur treten v.a. dann Probleme auf, wenn das Spektrum größere Restsignale enthält. Diese werden z.B. durch die Lösungsmittelunterdrückung verursacht. Die Funktion der automatischen Phasenkorrektur versucht hierbei das Restlösungsmittelsignal zu korrigieren, wodurch das gesamte Spektrum verzerrt wird. Es ist zwar möglich, diese Bereiche bei der automatisierten Phasenkorrektur auszuschließen, allerdings können immer noch Fehler auftreten, die bei der manuellen Phasenkorrektur besser bewältigt werden können. Der Nachteil der manuellen Phasenkorrektur liegt beim Bediener, der einen persönlichen Fehler durch bestimmte Verfahrensvorlieben einbringt. Der Vorteil der automatischen Phasenkorrektur liegt somit darin, dass sie zum einen keinen systematischen Fehler durch den Bediener einbringt und zum anderen der Durchsatz sehr hoch ist (Bharti & Roy, 2012; Emwas et al., 2016).

## **Basislinienkorrektur**

Die Basislinienkorrektur kann manuell, halbautomatisch oder automatisch erfolgen. Bei der halbautomatischen Methode werden manuell verschiedene Regionen im Spektrum ausgewählt und anschließend wird die Korrektur auf Basis dieser Bereiche automatisch durch verschiedene Funktionen, wie normale oder sich schrittweise anpassende Polynomial- oder Splinefunktionen durchgeführt. Bei der automatischen Basislinienkorrektur können je nach Auswertesoftware verschiedenen Algorithmen zur Korrektur gewählt werden (Emwas et al., 2016). Bei der manuellen Basislinienkorrektur kann der Bediener selbst auswählen, welche Funktion er für die Korrektur verwenden möchte und deren Koeffizienten entsprechend auf das Spektrum anpassen. Für eine nachfolgende statistische Auswertung der Daten ist es von Vorteil auf automatische Prozessierungen zurückzugreifen, da die Variation hier deutlich geringer ist als bei Prozessierungen, die von verschiedenen Bedienern durchgeführt wurden (Bharti & Roy, 2012; Emwas et al., 2016).

## **Referenzierung**

Die Referenzierung der chemischen Verschiebung ist eine Voraussetzung, um Spektren miteinander vergleichen zu können. Sie ist wichtig für die Identifizierung der Signale und für die Signalübereinstimmungen bei multivariaten statistischen Auswertungen. Die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) hat 2008 unter anderem Empfehlungen über die Konventionen zur chemischen Verschiebung herausgebracht. Sie beschreibt darin drei verschiedene Möglichkeiten der Referenzierung:

- a) Das interne Referenzieren mit internem Standard im selben Röhrchen.
- b) Das externe Referenzieren, mit externem Standard in zwei Röhrchen. Das zweite Röhrchen, welches die Referenzsubstanz beinhaltet, ist hierbei meist ein Coaxialröhrchen.
- c) Die Substitutionsmethode, die auf einer lock-basierten Referenzierung beruht (Harris et al., 2008).

Die bekanntesten Referenzsubstanzen für die interne Referenzierung sind TSP und 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure (DSS), die in wässrigen Systemen eingesetzt werden, und TMS, welches in organischen Lösungen seinen Einsatz findet. Allen gemeinsam ist das zentrale Siliziumatom, substituiert mit drei oder vier Methylgruppen. Durch den stark abschirmenden Effekt des Siliziums erscheint das Signal der Methylgruppen weit hochfeldverschoben. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze und verwendet die chemische Verschiebung dieser Signale als Nullpunkt, alle anderen Signale werden darauf bezogen. Ein Vergleich der chemischen Verschiebung bei unterschiedlichen Feldstärken ist möglich, da diese anders als die Resonanzfrequenz von der magnetischen Flussdichte unabhängig ist (Bharti & Roy, 2012; Emwas et al., 2016).

Probleme können dann auftreten, wenn die interne Referenzsubstanz mit den Analyten reagiert oder anderweitig von ihnen beeinflusst wird. So kann z.B. TSP von größeren Molekülen wie Proteinen gebunden werden, wodurch es zu Signalabschwächungen kommen kann, die v.a. eine automatische Referenzierung mit Schwellenwertvorgaben erschweren kann (J. T. M. Pearce et al., 2008). Zudem ist TSP pH-empfindlich, sodass darauf geachtet werden sollte, dass das System optimal gepuffert ist und/oder der pH exakt eingestellt wird (Wishart et al., 1995). TMS, welches in organischen Lösungen eingesetzt wird, ist leicht flüchtig. Daher ist es wichtig, dass eine ausreichende Menge bei längeren Messzeiten verwendet wird oder die Röhrchen gut verschlossen bzw. abgeschmolzen werden (Pauli et al., 2005).

Falls kein zusätzlicher Standard der Probe hinzugefügt werden soll, können auch andere Signale, wie z.B. die Restlösungsmittelsignale, zur internen Referenzierung verwendet werden. Allerdings muss vorher sichergestellt werden, dass diese Signale nicht durch den pH-Wert, die Temperatur oder andere Analyten beeinflusst werden (Emwas et al., 2018).

Eine andere Möglichkeit ist die externe Referenzierung, bei der ein zweites Röhrchen, welches die Referenzsubstanz enthält, verwendet wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Wechselwirkungen zwischen Analyten und Referenz ausgeschlossen werden können. Aufgrund verschiedener chemischer Zusammensetzung der Lösungen in den beiden Röhrchen resultieren unterschiedlich wirkende  $B_0$ -Felder auf die Analyten, welche einen Einfluss auf die chemische Verschiebung haben. Daher muss bei dieser Methode darauf geachtet werden, eine Korrektur dafür miteinzuberechnen (Harris et al., 2008).

Eine weitere Methode stellt das lock-basierte Referenzieren dar. Dieses verwendet das Deuteriumsignal des deuterierten Lösungsmittels. Daraus kann jegliche chemische Verschiebung berechnet werden. Der Nachteil liegt darin, dass die Deuteriumverschiebungen aus einer internen Lösungsmitteltabelle des Spektrometers, welche fehlerbehaftet sein könnte, entnommen werden (Harris et al., 2008).

## **Integration**

Die Integration wird durch die bereits beschriebenen Parameter wie Phasen- und Basislinienkorrektur stark beeinflusst. Sie selbst ist einer der wichtigsten Schritte der Gehaltbestimmung und bietet ein großes Fehlerpotential. Theoretisch müssten die Integrationsgrenzen für jedes Signal von Plus-Unendlich bis Minus-Unendlich gewählt werden, um die Signalfäche vollständig zu erfassen. Dies ist allerdings nicht praktikabel. Griffiths und Irving zeigten, dass bereits 99 % der gesamten Signalfäche integriert werden, wenn das Integral einen Bereich umfasst, der zu beiden Seiten des Signals so breit ist wie 24x die Signalbreite auf halber Höhe (full width at half maximum, FWHM). Um den Fehler auf < 0,1 % zu reduzieren, müsste das Integral einen Bereich von 76x der FWHM auf beiden Seiten umfassen. Bei der Integration sollte darauf geachtet werden, dass  $^{13}\text{C}$  Satelliten entweder immer mitintegriert

werden oder immer außerhalb des vom Integral erfassten Bereichs liegen, wodurch eine einheitliche Integrationsroutine geschaffen wird. Nach Bharti und Roy sollte der Mittelwert aus fünf bis zehnmal durchgeführten Integrationen genommen werden, um einen systematischen Fehler, der durch den Bediener erzeugt wird, zu vermeiden (Bharti & Roy, 2012).

Bei überlagerten oder sehr kleinen Signalen wird in der Literatur statt einer herkömmlichen Integration die Signal-Dekonvolution oder auch die line fitting Methode diskutiert. Dabei wird die Signalform mit Hilfe von mathematischen Funktionen nachgebildet und die Signalfläche bestimmt. Dabei ist es wichtig, Informationen wie z.B. die Multiplizität der zu fittenden Signale zu kennen und die Fittingmethode dahingehend anzupassen (Emwas et al., 2018; Pauli et al., 2012). Heutzutage sind viele verschiedene Softwareprogramme zur Dekonvolution erhältlich, jedoch ist die Anwendung bei stark überlagerten Signalen oft schwierig, sodass auch hier der Erfahrung des Bedieners eine wesentliche Rolle zukommt (Emwas et al., 2018).

## 2 Zielsetzung

Die Haltung von Legehennen zur Erzeugung von Hühnereiern gestaltet sich sehr vielfältig. In Europa gibt es vier offizielle Haltungsformen, deren Anforderungen in EU-Verordnungen festgehalten sind: die Käfighaltung (Haltung in Kleingruppen in ausgestalteten Käfigen), die Bodenhaltung, die Freilandhaltung und die biologischen Haltungssysteme. Die Haltungsart und die Herkunft sind bei jedem Ei in Form eines Erzeugercodes auf der Schale anzubringen. Mehr als die Hälfte, der in der EU produzierten Eier stammen aus „ausgestalteter“ Käfighaltung. In Deutschland ist die vorherrschende Haltungsart der Legehennen die Bodenhaltung, unter anderem weil die Haltung in Kleingruppen in ausgestalteten Käfigen per Gesetz bis 2028 vollständig abgeschafft wird. Die biologischen Haltungssysteme unterscheiden sich durch das Platzangebot, die Besatzgröße und das Futter von den konventionellen Haltungsarten. Da dies allerdings auch mit höheren Produktionskosten verbunden ist, spielt diese Haltungsart in den meisten Ländern der EU eine eher untergeordnete Rolle. Durch die hohe Verbraucherakzeptanz wächst die Nachfrage an biologisch erzeugten Eiern und so auch das Risiko von Betrug durch vorsätzliche Falschkennzeichnung, da diese analytisch nur schwer nachzuweisen ist. Daher ist es wichtig, Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, Eier von verschiedenen Haltungsarten zu unterscheiden. Versuche auf diesem Gebiet zeigten, dass es keine einzelne Markerverbindung gibt, mit der sich die Haltungsarten unterscheiden lassen. Daher ist eine Methode von Vorteil, die in der Lage ist, das gesamte Spektrum an Verbindungen zu erfassen. Die NMR ist eine sehr reproduzierbare Methode, die es ermöglicht, einen Einblick in die Struktur einer Probe auf molekularer Ebene, vergleichbar mit einem Fingerabdruck, zu geben. Vor allem in Kombination mit multivariaten statistischen Verfahren können so Muster erkannt werden, die durch Auswertung von Einzelparametern nicht sichtbar sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Inhaltsstoffe von Eiern verschiedener Haltungssysteme mittels unterschiedlicher NMR Methoden, wie  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  NMR zu charakterisieren und eventuell vorhandene Unterschiede zu untersuchen. Durch diverse isolierte Fütterungsversuche wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass sich die Zusammensetzung von Hühnereiern, vor allem der Lipide, durch das Futter beeinflussen lässt. Da bei den unterschiedlichen Haltungsformen neben dem Futter auch das Platzangebot und die Möglichkeit zum Auslauf ins Freie unterschiedlich sind, liegt es nahe, dass all diese Komponenten einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Eier haben können. Die Untersuchungen fokussieren sich hauptsächlich auf die Eidotterlipide, da hier durch die Vielfalt der Verbindungsklassen mit dem größtmöglichen Unterschied gerechnet wird. Für diesen Zweck soll eine Fettextraktionsmethode entwickelt werden, bei der sowohl die amphiphilen als auch die unpolaren Fettkomponenten extrahiert werden, so dass die Gesamtheit der im Eidotterfett enthaltenen Bestandteile repräsentiert wird. Es sollen geeignete  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  NMR Messmethoden entwickelt werden, mit denen das Eifett charakterisiert werden kann. Mit Hilfe der  $^{31}\text{P}$  NMR sollen die PL und deren Gehalte in den unterschiedlichen Haltungsgruppen genauer untersucht werden. Für diesen Zweck soll eine geeignete Messmethode mittels  $^{31}\text{P}$  NMR optimiert werden, sodass eine Quantifizierung möglich ist. Ein Vergleich der enthaltenen PL soll zeigen, ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Haltungsarten gibt.

Mit Hilfe der multivariaten statistischen Auswertung der  $^1\text{H}$  NMR Daten sollen nicht offensichtliche Zusammenhänge bzw. Abhängigkeiten der Verbindungen in Bezug auf die Haltungsform sichtbar gemacht werden. Es ist wichtig, dass die einzelnen Haltungsarten durch eine ausreichende Anzahl an Proben vertreten sind. Es sollen möglichst viele Eier aus den drei in

Deutschland dominierenden Haltungssystemen, Boden-, Freiland- und biologische Haltung, mit unterschiedlicher Herkunft untersucht werden. Um eine reproduzierbare Aufarbeitung und Messung zu garantieren, die für eine statistische Auswertung unabdingbar sind, sollen verschiedene qualitätssichernde Maßnahmen entwickelt und durchgeführt werden.

Für einen Vergleich mit konventionellen fettanalytischen Methoden sollen die extrahierten Eifette mittels GC-FID auf ihre Fettsäureverteilung untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Analysen werden mit den Ergebnissen der NMR Untersuchungen verglichen, um die Aussagekraft der erhaltenen Datensätze bezüglich der Fragestellung zu bewerten.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Probenmaterial – Haltung und Herkunft**

Der Großteil des verwendeten Probenmaterials wurde von der amtlichen Lebensmittelüberwachung in Baden-Württemberg zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden von Anfang 2016 bis Ende 2018 von den amtlichen Lebensmittelkontrolleuren in lokalen Supermärkten, auf Wochenmärkten, bei Eierpackstellen oder direkt bei den Erzeugerbetrieben erhoben. Dabei wurde bei der Probenauswahl darauf geachtet, dass die unterschiedlichen Haltungssysteme in einer ausreichenden Anzahl vertreten sind. Lediglich für die ausgestaltete Käfighaltung konnte keine ausreichende Anzahl an Proben beschafft werden, da Eier dieser Haltungsart nur sehr selten, bis gar nicht im deutschen Einzelhandel zu finden sind. Insgesamt wurden 382 Eierproben beschafft, davon kamen 327 aus Deutschland. Diese unterteilen sich in 143 Proben aus konventioneller Haltung (Boden- und Freilandhaltung) und 134 Proben aus biologischen Haltungssystemen. Der größte Anteil der Eier aus dem europäischen Ausland stammte aus den Niederlanden (insgesamt 38 Proben). Da diese Eier im deutschen Einzelhandel erhältlich sind, konnten sie somit auch in Deutschland bezogen werden. Der Rest der ausländischen Proben wurde von Mitarbeitern der Chemischen und Veterinäruntersuchungsämter Karlsruhe und Freiburg in ausländischen Supermärkten gekauft und mitgebracht. Die insgesamt 14 Proben aus Käfighaltung stammten aus Deutschland und dem europäischen Ausland (Ungarn, Niederlande, Frankreich, Polen). Allerdings ist hier die Anzahl der Proben zu gering, um eine wissenschaftliche Aussage treffen zu können. Ein genauerer Überblick über die Herkunft und die den Proben zugrundeliegende Haltungssysteme, ist in Kapitel 8.1 (Tabelle 8-1) zu finden.

Zu den meisten Proben wurden zusätzliche Metainformationen (s. Anhang 9.3), wie z.B. die Packstellenummer und die Postleitzahl des Herstellers, miterfasst, um bei späteren Auffälligkeiten einfacher Rückschlüsse ziehen zu können. Bei den Proben handelt es sich nicht um Referenzmaterial, d.h. die Rückverfolgbarkeit bezieht sich ausschließlich auf die Angaben auf dem Ei, nämlich den Erzeugercode, den Informationen auf der Eierschachtel und den Zusatzinformationen, die den Lebensmittelkontrolleuren bei der Probennahme zur Verfügung gestellt wurden. Bei einigen Proben war es möglich, Informationen über das Futter zu erhalten. Da dies aber nur für eine begrenzte Anzahl an Proben der Fall war, wurde diese Information nicht verwendet.

### **3.2 Aufarbeitung der Proben**

Die Hühnereier wurden bei der Aufarbeitung aufgeschlagen und das Eiklar jeweils vom Eigelb getrennt. Eine Probe setzt sich dabei aus dem gesamten Inhalt einer Eierschachtel mit je 10 Eiern oder zwei Eierschachteln mit je 6 Eiern zusammen. Das Eigelb wurde für die weitere Aufarbeitung gefriergetrocknet. Dadurch wird zum einen die Lagerfähigkeit erhöht und zum anderen für die anschließenden Untersuchungszwecke der eventuell unterschiedliche Wassergehalt im Eigelb berücksichtigt. Zudem stellt gefriergetrocknetes und gemahlenes Eigelbpulver eine sehr homogene Matrix dar, die leicht zu handhaben ist.

#### **3.2.1 Fettextraktion/Fettisolierung**

Die Lipide im Eigelb setzen sich aus unterschiedlichen Fraktionen zusammen. Das besondere an Eigelb ist der in Kapitel 1.1.2 beschriebene hohe Anteil an polaren Fettbestandteilen wie den PL.

Aufgrund dieser Verbindungsklasse ist eine Fettextraktion nach Weibull-Stoldt (L 06.00-6 BVL, 2014), die vor allem auf unpolaren Lösungsmitteln basiert, eher ungeeignet. Daher wurde nach Extraktionsmethoden gesucht, die geeignet sind, die Gesamtheit der im Eigelb enthaltenen Fettbestandteile zu extrahieren, um so ein umfassendes Bild von allen Fettkomponenten zu erhalten. Im Jahr 1956 stellten Folch, Lees und Stanley und wenig später Bligh und Dyer Extraktionsmethoden vor, die es ermöglichten, unpolare und amphiphile Lipidbestandteile zu extrahieren. Beide verwendeten dafür ein Gemisch aus Chloroform und Methanol, mit jeweils unterschiedlichen Anteilen. Das Methanol bricht die Wasserstoffbrückenbindungen und die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und Proteinen. Das Chloroform als unpolares Lösungsmittel sorgt dafür, dass sich die Phasen und somit die Lipide von den Nicht-Lipiden trennen (Reis et al., 2013).

Die Extraktion der Lipide erreicht laut Bligh und Dyer ein Optimum, wenn das Verhältnis zwischen Chloroform, Methanol und Wasser so eingestellt wird, dass diese ein einphasiges System bilden. Erstmals wurde diese Methode zur Lipidextraktion von Fischfleisch vorgestellt. Voraussetzung ist, dass der Wassergehalt der Probe bekannt ist, damit die Anteile der Lösungsmittel aufeinander abgestimmt werden können. Erfolgt dann eine Zugabe von Chloroform und Wasser, bildet sich ein Zweiphasensystem, in welchem die Lipide von den Nicht-Lipiden getrennt vorliegen. Die Methode zeichnet sich dadurch aus, dass nur vernachlässigbare Anteile an Nicht-Lipiden in der Lipidphase verbleiben und der Verlust an Lipiden in der wässrigen Phase und im Rückstand minimiert wird (Bligh & Dyer, 1959).

Die Methode nach Folch, Lees und Stanley, die erstmals auf Hirn-Lipide angewendet wurde, basiert auf einer flüssig-flüssig Extraktion, bei der das Probenmaterial mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol versetzt wird. Bei anschließender Zugabe einer Natriumchlorid-Lösung kommt es zu einer Anreicherung der Nicht-Lipidkomponenten, wie z.B. Proteinen und Zuckern in der wässrigen und der Lipidbestandteile in der organischen Phase. Dabei ist das Verteilungsverhältnis von Wasser, Methanol und Chloroform in der oberen und unteren Phase entscheidend für die Trennung der Lipid-/Nicht-Lipidkomponenten. Die Natriumchlorid-Lösung sorgt dafür, dass die aziden Lipide, vor allem einige PL wie z.B. Phosphatidsäure, die noch in der oberen wässrigen Phase in dissoziierter Form vorliegen, durch Erhöhung der Ionenstärke in ihre nicht dissoziierte Salz-Form übergehen und aufgrund des Massenwirkungsgesetzes in die untere organische Phase wandern (Folch et al., 1957).

In den letzten Jahrzehnten wurden beide Methoden wiederholt angewendet, wenn auch oft in abgeänderter Form. Bei Vergleichen mit anderen Lösungsmittelgemischen und Extraktionsmethoden, die keine chlorierten Lösungsmittel enthalten und daher umweltschonender und für den Menschen weniger schädlich sind, z.B. Hexan/Isopropanol (Radin et al., 1978), Butanol/Methanol (Löfgren et al., 2012) oder Methanol/Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (Matyash et al., 2008), gibt es meist wenig signifikante Unterschiede, was die Extraktion der Hauptfettkomponenten wie TG, PC und Cholesterin betrifft. Dies trifft jedoch nicht für Minorkomponenten wie z.B. Lyso-Lipide und PI zu. So zeigte sich, dass die Methoden nach Folch, Lees und Stanley und Bligh und Dyer am besten geeignet sind, um ein breites Spektrum an unterschiedlichen Lipiden zu extrahieren. Andere Methoden dagegen für bestimmte Lipidklassen oder einzelne Komponenten besser geeignet sein können (Reis et al., 2013).

Für die Extraktion des Eifettes wurde ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser so gewählt, dass ein einphasiges Lösungsmittelgemisch gebildet wird. Dies wurde mit einem Volumenverhältnis von 2:1:0,2 (Chloroform:Methanol:Wasser) erreicht. Das entwickelte Mischungsverhältnis wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Brendel, 2016) optimiert und auf die Matrix Eigelb angepasst. Damit die Extraktion reproduzierbar durchgeführt wird, ist es wichtig,

die Anteile des Extraktionsgemisches genau einzuhalten. Dies wird unter anderem dadurch erreicht, dass dem Eigelb durch die Gefrierdrying das Wasser entzogen wird. Bei unterschiedlichen Wassergehalten kann es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Lipidbestandteile zwischen der wässrigen und organischen Phase kommen, was die Reproduzierbarkeit negativ beeinträchtigt. Für eine bessere Durchmischung und Extraktion der Probe wurden Glasperlen dem Extraktionsgemisch hinzugegeben. Durch die Zugabe der wässrigen Natriumchlorid-Lösung kommt es, wie von Folch, Lees und Stanley beschrieben, zu einer Phasentrennung. Die obere Phase enthält die polaren Verbindungen wie Zucker und Proteine und nur noch vernachlässigbare Anteile an Lipiden. Durch Waschen des Filtrerrückstandes mit dem Extraktionsgemisch zur Überprüfung der Vollständigkeit der Extraktion konnte Brendel zeigen, dass noch Lipide enthalten sind und die Extraktion somit nicht vollständig verläuft. Allerdings entsprechen die Verhältnisse der Lipidkomponenten im nicht extrahierten Fett denen des extrahierten Fettes. Somit findet bei der Extraktion keine Diskriminierung einzelner Komponenten statt und es kann auf einen zusätzlichen Wasch- bzw. Extraktionsschritt verzichtet werden (Brendel, 2016). Die detaillierte Vorschrift der Extraktion ist in Kapitel 8.2 zu finden.

### 3.3 $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ und $^{31}\text{P}$ NMR Messung von Lipiden

Der Vorteil der NMR spektroskopischen Verfahren liegt in der einfachen Probenvorbereitung, die meist nur ein Lösen in deuterierten Lösungsmitteln beinhaltet. Die Messzeit, die bei entsprechender Konzentration, v.a. bei der  $^1\text{H}$  NMR, kurzgehalten werden kann, ist ein weiterer Vorteil. Als relative Primärmethode ist sie unter Einhaltung bestimmter Bedingungen eine quantitative Analysetechnik. Die Signalintensität ist direkt proportional zu der enthaltenen Stoffmenge, wodurch die Gehalte unter Verwendung eines internen oder externen Standards quantifiziert werden können (Malz, 2003).

Da bei der Aufarbeitung und Messung keine Selektion von bestimmten Substanzen oder Substanzklassen gemacht wird, liefert die NMR ein umfassendes Spektrum aller in einer Probe enthaltenen Verbindungen, sofern diese den gemessenen Kern enthalten. Ein Nachteil der  $^1\text{H}$  NMR stellt die geringe spektrale Breite dar, was dazu führt, dass viele Signale überlagern und dadurch schwerer zu identifizieren sind. Bei der  $^{13}\text{C}$  NMR dagegen sind Überlagerungen der Signale nur selten ein Problem, jedoch stellt hier die geringe natürliche Häufigkeit von 1,07 % den entscheidenden Nachteil dar. Dieser, in Kombination mit dem geringen gyromagnetischen Verhältnis im Vergleich zu Protonen, führt dazu, dass die Messzeiten bei einer  $^{13}\text{C}$  NMR Messung meist sehr lang sind. Aus diesem Grund wird die Methode nur selten in die Routineanalytik überführt (Friebolin, 2014).

Die Messung von Lipiden mittels  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR findet vor allem bei der Untersuchung und Charakterisierung von pflanzlichen Ölen Anwendung. In den letzten 20 Jahren gab es viele Veröffentlichungen, die sich mit diesem Thema auseinandergesetzt haben. Keeton und Mitarbeiter zeigten, dass die Fettgehaltbestimmung nach Mikrowellentrocknung und anschließender  $^1\text{H}$  NMR Untersuchung von Schwein, Rind und Huhn vergleichbare Ergebnisse wie die offizielle AOCS-Soxhlet-Methode liefert (Keeton et al., 2003). Auch steht oft die Bestimmung und Identifizierung von Fettkomponenten im Fokus. Dies sind v.a. die gesättigten und ungesättigten FS sowie die MUFS (Barison et al., 2010; Castejón et al., 2014; Diehl & Ockels, 1995; Mannina et al., 2003; Sacchi et al., 1997; Zamora et al., 2001). Durch Vergleiche mit Standardmethoden, wie z.B. der GC, zeigte sich, dass mit NMR vergleichbare Ergebnisse erzielt



werden können (Gunstone, 1994). Sacchi, Addeo und Paolillo, sowie Barison und Mitarbeiter zeigten, dass bei der Bestimmung der Fettsäureverteilung von verschiedenen pflanzlichen Ölen ohne vorherige Derivatisierung mittels  $^1\text{H}$  NMR vergleichbare Ergebnisse wie durch gaschromatographische Methoden erzielt werden können (Barison et al., 2010; Sacchi et al., 1997). Die Bestimmung ist möglich, da der Großteil der FS in pflanzlichen Ölen mit Glycerin verestert vorliegt. Die Quantifizierung kann durch die Beziehung der charakteristischen Fettsäuresignale zu dem TAG-Grundgerüstsignal, welches als internes Referenzsignal dient, erfolgen. Ein interner Standard ist somit nicht vonnöten, da die Flächen der Signale direkt proportional zu den jeweiligen Protonen der entsprechenden FS sind. In der Literatur existieren zahlreiche Studien zur Berechnung der Fettsäureverteilung aus dem  $^1\text{H}$  NMR Spektrum mit Hilfe verschiedener mathematischer Gleichungen (Barison et al., 2010; Faulh et al., 2000; Sacchi et al., 1997; Vigli et al., 2003). Weitere Publikationen befassten sich mit in pflanzlichen Ölen vorkommende Phenole (Christophoridou & Dais, 2009), mit nicht verseifbaren Lipiden (Alonso-Salces et al., 2010), mit Verunreinigungen oder Beimischungen anderer pflanzlicher Öle (Agiomyrgianaki et al., 2010; Fang et al., 2013; Faulh et al., 2000) sowie mit Verderbnis- und Verarbeitungsparametern (Skiera et al., 2012a). Der Großteil der genannten Studien untersuchte vorrangig Olivenöl. Hier spielt insbesondere die Herkunft und Authentizität (Mannina et al., 2003; Mannina & Sobolev, 2011; Montealegre et al., 2010; Rezzi et al., 2005) eine wichtige Rolle.

Die  $^1\text{H}$  NMR als auch die  $^{13}\text{C}$  NMR Methoden bieten hier eine Ergänzung und/oder Alternative zu den gängigen Methoden, wie z.B. Bestimmung der Fettsäureverteilung mittels GC-FID oder den nasschemischen Methoden zur Bestimmung der Peroxid- (DIN EN ISO 3960, 2010) und Anisidinzahl (ISO 6885:2006, 2006).

### **3.3.1 Entwicklung und Optimierung einer $^1\text{H}$ NMR Methode zur Messung des Eifettes**

Im Rahmen der Entwicklung und Optimierung der  $^1\text{H}$  NMR Messung der Eidotterlipide wurde zunächst ein Lösungsmittelgemisch gesucht, mit welchem es möglich ist, sowohl polare als auch nicht polare Fettbestandteile bei größtmöglicher Auflösung zu messen. Die chemische Verschiebung, vor allem die der Protonen an Heteroatomen, ist von der Messtemperatur und von der enthaltenen Stoffmengenkonzentration abhängig (Hesse et al., 2012). Dies ist unter anderem auf austauschbare Protonen der polaren Gruppen zurückzuführen bzw. durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Gruppen der in der Probe enthaltenen Verbindungen untereinander und dem Lösungsmittel. Es ist möglich durch eine Veränderung dieser Parameter die Signalbreite und somit Signaltrennung zu verändern sowie gezielt Signale zu verschieben, sodass diese im Spektrum nicht mehr überlagern.

In der Literatur findet bei der Analyse von Lipiden mittels NMR vor allem deuteriertes Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) häufig Verwendung, da es sehr gut neutrale Lipide löst (Barison et al., 2010; Castejón et al., 2014). Wenn jedoch der Anteil an polaren Lipiden am Gesamtfett steigt, ist  $\text{CDCl}_3$  als alleiniges Lösungsmittel nicht mehr geeignet. Aufgrund der Unlöslichkeit und der damit einhergehenden Aggregation einiger PL in  $\text{CDCl}_3$  werden die Signale sehr breit. Es ist daher schwierig ein Lösungsmittel zu finden, welches in der Lage ist alle Lipide gut zu lösen und die spektrale Auflösung optimal zu nutzen und somit Signalaufspaltungen gut sichtbar zu machen. Skiera und Mitarbeiter verwendeten für die Bestimmung der freien FS in pflanzlichen Ölen eine Mischung aus  $\text{CDCl}_3$  und  $\text{DMSO-}d_6$  in einem Verhältnis von 5:1 (v/v). Damit war es möglich, die Carboxylgruppe der FFS im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zu detektieren und zu bestimmen. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der DMSO S=O Gruppe und der COOH Gruppe der FFS

wird der Protonenaustausch verlangsamt, wodurch die Signale der FFS schmaler werden (Skiera et al., 2012). Wang und Hollingsworth beschreiben in ihrer Studie die Entwicklung eines geeigneten Lösungsmittels für die Untersuchung von Membranlipiden. Dieses besteht aus einer Mischung aus Pyridin-*d*5, Deuteriumchlorid in deuteriertem Wasser (D<sub>2</sub>O), deuteriertem Methanol (CD<sub>3</sub>OD) und CDCl<sub>3</sub> in einem Volumenverhältnis von 1:1:2:10 (Wang & Hollingsworth, 1995). Sparling, Zidovetzki, Muller und Chan verwendeten für die Untersuchung von Membranlipiden ein Gemisch aus CD<sub>3</sub>OD und CDCl<sub>3</sub> im Verhältnis 2:1 (Sparling et al., 1989). Das Lösungsmittelgemisch für die Eidotterlipide wurde im Rahmen einer Masterarbeit von R. Brendel entwickelt. Das beste Ergebnis wurde mit einer Mischung aus CDCl<sub>3</sub> und CD<sub>3</sub>OD im Volumenverhältnis von 3:2 erzielt (s. Abbildung 9-2). Im Anhang 9.4 ist der Einfluss von Lösungsmittelgemisch und Temperatur auf die chemische Verschiebung und die Breite der Signale dargestellt.

Die Temperatur beeinflusst vor allem die Lage des Restwassersignals, welches in der Probe und in den deuterierten Lösungsmitteln noch vorhanden ist. Durch eine schrittweise Erniedrigung der Temperatur von 300 auf 290 K, war es möglich die Überlagerung des Wassersignals mit Lipidsignalen zu vermeiden (s. Abbildung 9-3). Dies ist wichtig, da bei der späteren Auswertung das Wassersignal gezielt ausgeblendet werden kann. Andere Parameter wie der RG wurden der Stoffmengenkonzentration angepasst und bei jeder Messung konstant gehalten. Die AQ und die D1-Zeit wurden so gewählt, dass alle Protonen vollständig relaxieren können. Die optimierten Parameter sind in Kapitel 8.3.1 zu finden.

Die Parameter, die für die Prozessierung der <sup>1</sup>H NMR Spektren angewendet wurden, sind in Tabelle 8-5 dargestellt. Der FID wurde mit einer gaussförmigen Fensterfunktion (GM) multipliziert. Es folgten eine automatische Phasen- und Basislinienkorrektur. Bei allen Spektren wurde der Referenzstandard TMS auf 0 ppm gesetzt.

### 3.3.2 Optimierung einer <sup>13</sup>C NMR Methode zur Messung des Eifettes

Die <sup>13</sup>C NMR Analytik bietet bei der Untersuchung von Lipiden einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen Methoden wie GC-FID oder GC-MS. Die <sup>13</sup>C NMR ist in der Lage, ohne vorherige Derivatisierung oder chromatographische Auftrennung detaillierte Informationen über die Verteilung und den Gehalt der FS am Glyceringrundgerüst zu liefern. Auch ist bei Einhaltung bestimmter Messbedingungen eine quantitative Aussage möglich. Diehl und Ockels zeigten, dass sich ω-3, ω-6 und ω-9 FS im Methylbereich im <sup>13</sup>C NMR Spektrum unterscheiden. Es ist zudem möglich, die Position dieser FS am Glyceringrundgerüst zu bestimmen (Diehl & Ockels, 1995; Sacchi et al., 1997).

Ein bedeutender Nachteil liegt in der geringen natürlichen Häufigkeit des <sup>13</sup>C Kohlenstoff-Isotops (1,07 %) und der damit verbundenen längeren Messzeit. Ein anderer Nachteil, der sich im <sup>13</sup>C NMR Spektrum zeigt, ist die Aufspaltung der <sup>13</sup>C Signale. Diese werden durch die Kopplung der <sup>13</sup>C Kerne mit <sup>1</sup>H Kernen verursacht. Dadurch wird die ohnehin schon geringe Signalintensität der <sup>13</sup>C Kerne zusätzlich auf mehrere Signale aufgeteilt. Durch eine <sup>1</sup>H Breitbandentkopplung kann diesem Phänomen entgegengewirkt werden. Dabei wird ein Entkopplerpuls über den gesamten Protonenbereich gelegt. Dieser sorgt dafür, dass alle <sup>1</sup>H Kerne gleichzeitig gesättigt werden. Dadurch können sich keine <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H Kopplungen ausbilden, und die <sup>13</sup>C Signale erscheinen als schmale Singulets. Ein anderer Effekt, der sich dabei positiv auf die Signalintensität auswirkt, ist der NOE. Er führt dazu, dass <sup>13</sup>C Kerne die <sup>1</sup>H Kerne gebunden haben, bei der Entkopplung eine Signalverstärkung erfahren. Dies ist jedoch nicht für alle Kerne gleich. Methylgruppen erfahren hier die größte Signalverstärkung. Durch das sogenannte „gated decoupling“ kann der NOE genutzt werden, um die <sup>13</sup>C Signale zu verstärken, ohne diese aufzuspalten. Hierbei wird der

Entkopplerpuls während der D1 angeschaltet und während der AQ wieder ausgeschaltet. Bei quantitativen Messungen sollte allerdings darauf geachtet werden, dass sich kein NOE entwickeln kann, da in diesem Fall die Signalintensität nicht mehr proportional zu der Anzahl der Kerne ist. Dies wird mittels „inverse gated decoupling“ erreicht. Während dieser Pulssequenz wird der Entkopplerpuls nur während der AQ eingeschaltet, was dazu führt, dass sich lediglich ein sehr schwacher NOE ausbildet, der vernachlässigt werden kann. Für die  $^{13}\text{C}$  NMR Messung des Eifettes wurde daher mittels eines inverse gated decoupling Pulsprogrammes (zgig) gearbeitet. Ohne die Signalverstärkung durch den NOE muss die NS, welche eine negative Auswirkung auf die Messzeit hat, heraufgesetzt werden, um eine ähnliche Empfindlichkeit zu erlangen. Eine weitere Hürde stellen lange T1 dar. Vor allem für quartäre C-Atome können die T1 Werte bis in den Minutenbereich annehmen. Eine Möglichkeit lange T1 zu vermeiden, ist die Verwendung von paramagnetischen Relaxationsbeschleunigern, wie z.B.  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  (Grahn, 1986). Da die Eifette weitestgehend gleiche Inhaltsstoffe in ähnlichen Konzentrationen enthalten und sich dadurch immer vergleichbar verhalten, können jedoch die Spektren auch trotz nicht vollständiger Relaxation miteinander verglichen werden. Auf eine Quantifizierung der Komponenten wurde jedoch verzichtet.

Die verwendeten Parameter für die  $^{13}\text{C}$  NMR Messung sind in Kapitel 8.3.2 zu finden.

### **3.3.3 Entwicklung und Optimierung einer $^{31}\text{P}$ NMR Methode zur Messung und Quantifizierung der Phospholipide im Eifett**

Der  $^{31}\text{P}$  Kern, mit einer Kernspinquantenzahl von  $\frac{1}{2}$  Spin, einer natürlichen Häufigkeit von 100 % und moderaten T1, ist für die NMR Spektroskopie sehr gut geeignet. Durch den großen Bereich der chemischen Verschiebung von über 700 ppm kommt es nur selten zu Signalüberlagerungen. Dadurch ist das  $^{31}\text{P}$  NMR Spektrum sehr übersichtlich. Durch zusätzliche Entkopplung der  $^1\text{H}$  Kerne werden für die unterschiedlichen Phosphorverbindungen einzelne Singulettsignale erhalten, was die Interpretation erleichtert (Gorenstein, 1984). Die Referenzierung der Signale erfolgt konventionsgemäß nach IUPAC auf 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in  $\text{D}_2\text{O}$  (Harris et al., 2008).

In den Anfängen der NMR wurde die  $^{31}\text{P}$  NMR Messung vor allem zur Strukturanalyse eingesetzt. Erste PL Analysen mittels  $^{31}\text{P}$  NMR wurden bereits 1979 von Cullis und De Kruijff dazu verwendet, um phosphorhaltige Membranlipide und ihre funktionelle Rolle zu untersuchen (Cullis & De Kruijff, 1979). Allgemein findet die  $^{31}\text{P}$  NMR weite Verbreitung in den Bereichen der Biologie, Biochemie und Medizin. Gorenstein war einer der ersten, der über Anwendungen in diesem Bereich ausführlich berichtete (Gorenstein, 1984). Die ersten Anwendungen im Lebensmittelbereich stammen 1985 von Vogel und Mitarbeiter, die den Metabolismus im Rindermuskel nach der Schlachtung untersuchten (Vogel et al., 1985). Belton, Lyster und Richards waren die ersten, die ein  $^{31}\text{P}$  NMR Spektrum von Kuhmilch publizierten (Belton et al., 1985). Nach und nach fand die  $^{31}\text{P}$  NMR zunehmend Verbreitung im Lebensmittelbereich. Spyros und Dais veröffentlichten 2008 einen Überblick über die bisherigen Anwendungsgebiete in der Lebensmittelanalytik. Diese erstrecken sich über pflanzliche Öle (Spyros Apostolos & Dais Photis, 2000), Fleisch, Fisch (Kaffarnik et al., 2013), Milch (Andreotti et al., 2006; Garcia et al., 2012; Murgia et al., 2003) und Pflanzen, bis hin zu Lebensmittelzusatzstoffen, die Phosphor enthalten, wie Lecithine, Proteine oder Phosphate (Spyros & Dais, 2009).

Da die meisten Verbindungen im Lebensmittelbereich fünf-bindigen Phosphor in Form von Phosphaten besitzen, wird der spektrale Bereich auf 20-40 ppm verkleinert. Dadurch kann die Messzeit deutlich verringert werden. PL eignen sich sehr gut für die Untersuchung mit  $^{31}\text{P}$  NMR. Die  $^{31}\text{P}$  NMR bietet sich somit als eine alternative Methode zur  $^1\text{H}$  NMR an, da die gängigsten PL durch ihre unterschiedlichen chemischen Verschiebungen meist gut getrennte Signale liefern.

Zudem lässt sich die chemische Verschiebung der PL-Signal mit Hilfe von Temperatur und Lösungsmittelzusammensetzung leicht beeinflussen.

### 3.3.3.1 Optimierung des Lösungsmittels und der Messtemperatur

Die Wahl des Lösungsmittels für die PL Analyse ist ein kritischer Parameter, da PL sehr stark von ihrer Umgebung abhängig sind. Durch ihren amphiphilen Charakter besitzen sie die Neigung, in polaren und unpolaren Lösungsmitteln zu aggregieren. Dies erschwert die NMR Messung und führt zu Chemical Shift Anisotropy (CSA) -Effekten, welche wiederum zu breiteren Signalen führen (Spyros & Dais, 2009). Die CSA gehört zu den Relaxationsmechanismen. Die Elektronenverteilung in chemischen Verbindungen ist grundsätzlich unsymmetrisch oder anisotrop. Dadurch verändert sich das lokale Magnetfeld eines Kerns und somit auch die chemische Verschiebung in Abhängigkeit der Orientierung der Bindung zum äußeren angelegten Magnetfeld. Normalerweise wird die CSA in Lösungen durch die schnelle Brownsche Bewegung ausgemittelt, wodurch nur eine bestimmte Frequenz oder chemische Verschiebung beobachtet wird. Bei Kernen mit einem großen Bereich der chemischen Verschiebung, wie z.B.  $^{31}\text{P}$  oder bei verschiedenen Metallen, ist der Einfluss der Relaxation durch CSA größer und kann daher die Signalbreite beeinflussen (Claridge, 2009).

Bei großen Molekülen wird die Brownsche Bewegung langsamer, und die CSA-Effekte kommen deutlicher zum Vorschein (McLaughlin et al., 1975). McLaughlin, Cullis, Berden und Richards zeigten 1975, dass die Relaxation bei  $^{31}\text{P}$  Kernen feldabhängig ist, was auf die CSA zurückgeführt werden kann. Daher ist es besser PL bei niedrigen Feldern zu messen (McLaughlin et al., 1975). London und Feigenson untersuchten 1974 die Signalbreiten von PL in einer Mischung aus Detergenzien und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Sie zeigten, dass letzteres einen positiven Effekt auf die Linienbreite ausübt. Zum einen lösen sich die größeren Aggregate in kleineren Mizellen und zum anderen kann der pH-Wert, der einen großen Einfluss auf die chemische Verschiebung der polaren PL hat, stabilisiert werden (London & Feigenson, 1979). In der Literatur sind seither unterschiedliche Herangehensweisen zu finden, die sich mit dem Lösungsverhalten von PL in verschiedenen Lösungsmittelgemischen befassen. Einer der weit verbreitetsten Ansätze beinhaltet eine ternäre Mischung aus Chloroform, Methanol und einer wässrigen Lösung mit oder ohne Chelatbildner. Die Lösungsmittel können dabei deuteriert sein, müssen es aber nicht, da die  $^1\text{H}$  Kerne bei der  $^{31}\text{P}$  NMR Messung nicht stören. Vollständig deuterierte Lösungsmittel bieten dagegen die Möglichkeit die Lösungen auch zur  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Messung einzusetzen. Ein gewisser Anteil deuterierten Lösungsmittels wird für das Locksignal benötigt (Hatzakis et al., 2008; Lutz & Cozzone, 2010a, 2010b; Malewicz & Baumann, 1996; Meneses & Glonek, 1988; John M Pearce & Komoroski, 2000). Entscheidend sind die Verhältnisse der Lösungsmittel zueinander. Von diesen hängt es ab, ob ein einphasiges oder ein zweiphasiges Lösungsmittelsystem entsteht. Zweiphasige Systeme liefern zwar Spektren, die eine gute Signalaufklärung besitzen, dennoch ist die Quantifizierung erschwert, da sich die PL in beiden Phasen und in der Grenzschicht dazwischen befinden können (Lutz & Cozzone, 2010a). Um dieses Problem zu umgehen verwendeten Bosco Culeddo, Toffanin und Pollesello ein Gemisch aus Dimethylformamid, Triethylamin und Guanidinchlorid, welche zusammen ein einphasiges System bilden (Bosco et al., 1997). Andere wie Lutz und Cozzone veränderten die Verhältnisse der Lösungsmittel Chloroform, Methanol und Wasser so, dass diese ein einphasiges System bilden. Sie orientierten sich dabei am Phasendiagramm „Chloroform-Methanol-Wasser“, welches von Bligh und Dyer für die Fettextraktionsoptimierung verwendet wurde (Bligh & Dyer, 1959). Zudem untersuchten sie auch den Effekt des Chelatbildners sowie den Einfluss der Temperatur auf die

chemische Verschiebung, spektrale Auflösung und Signalbreite der PL-Signale (Lutz & Cozzone, 2010a, 2010b).

### **Einfluss des Chelatbildners und des pH-Wertes**

In einer PL Lösung enthaltene Metallkationen wie z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  können aufgrund ihre paramagnetischen Eigenschaften und durch Unterstützung der PL-Aggregation, die Signalbreite der PL-Signale nachteilig beeinflussen. Gängige Chelatbildner wie EDTA und Cyclohexandiamintetraessigsäure (CDTA) binden Metallkationen und vermindern dadurch den Einfluss dieser Stoffe auf die Signalbreite. CDTA ist EDTA gegenüber zu bevorzugen, da die gebildeten Komplexe stabiler sind. Als passendes Gegenion für CDTA wird  $\text{Cs}^+$  gewählt. Es ist das größte nicht radioaktive Alkalimetallkation und soll eine Komplexierung von einwertigen Metallkationen mit den PL minimieren. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Signalbreite ist die CDTA Konzentration. Je nach Konzentration des Chelatbildners muss das Wasser/Methanol zu Chloroform Verhältnis angepasst werden, da CDTA in Lösung solvatisiert vorliegt. Es ist wichtig, alle Parameter des Lösungsmittels so aufeinander abzustimmen, dass die PL gelöst und in kleinen Mizellen vorliegen. Die Stabilität der Chelatkomplexe und das damit verbundene Aggregationsverhalten der PL, sowie deren Mobilität sind pH-Wert abhängig und haben somit einen Einfluss auf die chemische Verschiebung der PL-Signale. Der pH-Wert kann mit Hilfe der  $\text{Cs}^+$ -Ionen eingestellt werden (Lutz & Cozzone, 2010a, 2010b).

Nach dem Vorbild von Lutz und Cozzone wurde für das Eifett ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus  $\text{CDCl}_3$ , MeOD und wässriger CDTA- $\text{Cs}$ -Lösung so optimiert, dass mit der gelösten Eifettprobe ein einphasiges System entstand, welches direkt zur Messung eingesetzt werden konnte. Das beste Ergebnis wurde mit einem  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}/\text{CDTA}$ -Lsg. Verhältnis von 582/358/60 erreicht. Bei einer CDTA Konzentration von 0,2 mol/L und einem pH-Wert von 6 zeigte sich das beste Ergebnis in Bezug auf Lösungsverhalten, Signalbreite und Signaltrennung.

### **Einfluss der Probenkonzentration**

Die Probenkonzentration beeinflusst die Signale der PL, da bei höheren Konzentrationen an PL größere Mizellen gebildet werden. Die Bildung der Mizellengröße ist abhängig vom molaren Verhältnis zwischen Wasser und PL. In größeren Mizellen kann es vermehrt zu Wasser-Austauschprozessen kommen, da der Anteil an freiem Wasser gegenüber kleineren Mizellen höher ist. Dies führt zu einer Verbreiterung der Signale. Auch kann es durch variierende Verhältnisse von Wasser und Methanol oder einem anderen polaren Lösungsmittel, zu Verschiebungen der Signale kommen. Dies wird durch die Wechselwirkung der Phosphatgruppe der PL mit den polaren Gruppen des Lösungsmittels bedingt. Daher ist es wichtig auf die genauen Lösungsmittelverhältnisse zu achten, um Signalüberlagerungen zu vermeiden. Auch werden bei höheren Probenkonzentrationen zunehmend Strukturen mit geordneter Anordnung wie Lipiddoppelschichten gebildet. Dadurch wird die Mobilität der PL sehr eingeschränkt und der CSA-Effekt begünstigt, was wiederum in breiteren Signalen resultiert (Lutz & Cozzone, 2010b).

### **Einfluss der Temperatur**

Neben dem Lösungsmittel beeinflusst die Temperatur die Lage, Form und Trennung der PL-Signale. Die Signalbreite wird über die molekulare Beweglichkeit und die Austauschrate der Kationen bestimmt. Bei höheren Temperaturen wäre zu erwarten, dass sich die Signalbreite verringert, stattdessen kommt es aber zu einer Verbreiterung der Signale (Lutz & Cozzone, 2010a). Dies ist durch geänderte intramolekulare Austauschprozesse aufgrund von

Konformationsumwandlungen der Mizellen zu erklären (Langevin, 1992). Auch kann eine Erhöhung der Temperatur zu einer Umordnung der PL-Aggregation in Form und Größe führen, was auch die Signalbreite beeinflussen kann (Lutz & Cozzone, 2010a). Die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der PL-Signale ist in der polaren Kopfgruppe begründet, die durch veränderten Ionenaustausch sowie Struktur und Aggregationsgrad beeinflusst wird (Langevin, 1992). Diese Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der PL kann dazu verwendet werden durch eine Änderung der Temperatur, die Signale von PL, die überlagern, voneinander zu trennen. Als optimale Messtemperatur wurde 295 K gewählt, da bei dieser Temperatur und den anderen gewählten Bedingungen die SM- und das PE-Signale getrennt voneinander vorliegen.

### **3.3.3.2 Identifizierung und Quantifizierung der Phospholipide mittels <sup>31</sup>P NMR**

Für die Identifizierung und Quantifizierung von PL gibt es verschiedene analytische Methoden. Grundsätzlich lassen sich diese in chromatographische und spektroskopische Methoden einteilen. Bei den chromatographischen Methoden werden im Hinblick auf die Identifizierung vor allem die HPLC und die DC angewendet. Die Auftrennung kann aufgrund der unterschiedlichen Kettenlänge und des Sättigungsgrades der FS über eine Umkehrphase erfolgen oder mittels Normalphase durch die unterschiedlich polaren Phosphatester. Allerdings kann es bei Letzteren auch zu Auftrennungen in Abhängigkeit der veresterten FS kommen, was eine Identifizierung ohne entsprechende Standardsubstanzen erschwert. Die Detektion kann mit Standarddetektoren wie UV oder ELSD erfolgen, jedoch sind diese Methoden nicht sehr selektiv. Der UV-Detektor ist abhängig von den Doppelbindungen und dem Umfang des  $\pi$ -Elektronensystems. Der ELSD detektiert dagegen unabhängig von Doppelbindungen. Bei UV-Detektoren sowie auch ELSD ist ein Vergleich der Retentionszeiten der Standardsubstanzen unabdingbar. Dies stellt einen der größten Nachteile der chromatographischen Methoden dar. Bei der Analytik der PL mittels GC ist der größte Nachteil, dass die Lipide nicht intakt analysiert werden können. Durch eine Derivatisierung nach z.B. alkalischer Hydrolyse können nur die FS analysiert werden. Durch eine Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der PL ist es allerdings möglich, eine Aussage über die Herkunft der PL zu treffen (Lendrath et al., 1991). Methoden, die auf der MS beruhen, werden in der Lipidanalytik oft in Kombination mit der GC verwendet. Bei Flüssigchromatographieverfahren ist es jedoch mittlerweile durch sogenannte „sanfte“ Ionisierungstechniken auch möglich, intakte PL zu bestimmen. Ein Beispiel hierfür ist die Elektrosprayionisation (electrospray ionisation, ESI). Ein anderes Beispiel für eine sanfte Ionisierungstechnik ist die matrix assisted laser desorption (MALDI) mit offline HPLC. Die Analyten werden dabei mittels HPLC aufgetrennt und anschließend zusammen mit einer speziellen Matrix präpariert. Bei der MALDI-MS findet nur eine geringfügige Fragmentierung statt, was die Bestimmung erleichtert (Schiller & Arnold, 2002).

Für die Quantifizierung spielt vor allem die HPLC, gekoppelt mit MS, die größte Rolle (Schiller & Arnold, 2002). Eine Quantifizierung ist auch mittels DC möglich, hier werden die PL meist an einer Hochleistungsdünnschichtchromatographieplatte (high performance thin layer chromatographie, HPTLC) nach ihrer PL-Klasse aufgetrennt und unter Verwendung von einem Detektionsreagenz sichtbar gemacht. Anschließend werden die PL densitometrisch mit Hilfe einer externen Kalibrierung von Standardsubstanzen bestimmt (Essig & Kovar, 2001).

Die <sup>31</sup>P NMR, die zu den spektroskopischen Methoden zählt, bietet gegenüber den chromatographischen Methoden den Vorteil, dass die Phospholipidklassen einzeln identifiziert und gleichzeitig in einer Messung quantifiziert werden können. Für die Quantifizierung wird

lediglich ein einzelner Standard, der nicht strukturell gleich sein muss, benötigt. Auf Besonderheiten, die bei der Quantifizierung mittels  $^{31}\text{P}$  NMR beachtet werden sollten, wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Helmerich und Köhler verglichen in einer Studie verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung von PL aus verschiedenen kommerziellen Lecithinen. Sie verwendeten dafür HPLC-UV, HPTLC mit anschließender densitometrischen Bestimmung und  $^{31}\text{P}$  NMR. Sie zeigten, dass alle Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Der größte Nachteil der  $^{31}\text{P}$  NMR ist die geringe Empfindlichkeit, die, verglichen mit den beiden anderen Methoden, um den Faktor 10-70 kleiner ist (Helmerich & Koehler, 2003).

In der Literatur gibt es verschiedene Beispiele, in der die  $^{31}\text{P}$  NMR für Quantifizierungszwecke Anwendung findet. Im Bereich der Medizin können mit Hilfe der quantitativen  $^{31}\text{P}$  NMR sich ändernde Gehalte von PL in bestimmten Gewebearten und Membranen untersucht werden, um z.B. Krankheiten leichter zu identifizieren (J M Pearce & Komoroski, 1993; Schiller & Arnold, 2002). So kann der Anteil der in Hirngewebe vorkommenden PL Klassen, bezogen auf den Gesamtgehalt der PL berechnet werden. Durch die Bestimmung der relativen Gehalte der einzelnen PL Klassen zueinander können diese dann bei verschiedenen Krankheiten verglichen werden (John M Pearce et al., 2009). Im Lebensmittelbereich findet die quantitative  $^{31}\text{P}$  NMR vor allem bei der Authentifizierung Anwendung. Hatzakis und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, mit der sie die PL in Olivenöl quantitativ unter Verwendung des internen Standards Triphenylphosphat (TPP) bestimmten (Hatzakis et al., 2008). Murgia, Mele und Monduzzi quantifizierten die PL-Gehalte in Kuh- und Schafmilch, wobei sie 1,2-Dimyristoylphosphatidylethanolamin als internen Standard einsetzten. Sie konnten zeigen, dass der PL-Gehalt der Milch durch die Fütterung beeinflusst werden kann (Murgia et al., 2003). Bei einem Vergleich der PL-Anteile von Büffel- und Kuhmilch konnte gezeigt werden, dass diese Milcharten anhand der PL nicht unterscheidbar sind (Andreotti et al., 2006). Garcia und Mitarbeiter untersuchten verschiedene Milcharten von Säugetieren auf ihre PL-Zusammensetzung und quantifizierten diese unter Verwendung von Methylendiphosphonsäure als externen Standard (Garcia et al., 2012).

### **Besonderheiten bei der Quantifizierung mittels $^{31}\text{P}$ NMR**

Bei  $^{31}\text{P}$  ist der NOE-Effekt durch  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  dipolare Wechselwirkungen positiv, was zu einer Signalverstärkung führt. Für die Quantifizierung ist dieser Effekt jedoch unerwünscht, weshalb mit einem „inverse gated decoupling“ Pulsprogramm (zgig) gemessen wird (Braun et al., 2000; Spyros & Dais, 2009). Bei der  $^{31}\text{P}$  NMR wie auch bei der  $^{13}\text{C}$  NMR ist die Spanne an T1 sehr breit und kann über wenige Sekunden bis in den Minutenbereich reichen. Für den Fall, dass die T1 zu lang sind und dadurch die Messzeit stark erhöht wird, können paramagnetische Relaxationsbeschleuniger wie z.B.  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  hinzugegeben werden. Für die Messung von PL ist dies nicht notwendig, da sich die T1 je nach Lösungsmittel im Bereich von 1-3 s befindet (Murgia et al., 2003). Bosco und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von verschiedenen Lösungsmittelgemischen auf die T1 von Lecithin und fanden für die verschiedenen PL T1 von 1-1,5 s (Bosco et al., 1997).

Aufgrund der Lösungsmittelabhängigkeit von T1 wurde für das verwendete Lösungsmittelgemisch von  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}/\text{CDTA}$ -Lsg. (582/358/60) die T1 der PL mittels Inversion recovery-Experiment „t1irpg“ bestimmt. Bei dieser Pulssequenz werden durch eine zusätzliche Breitbandprotonenentkopplung (pg steht für power gated decoupling) während der gesamten Sequenz die Kopplungen zwischen  $^1\text{H}$  und  $^{31}\text{P}$  Kernen unterdrückt, wodurch alle  $^{31}\text{P}$  Signale nur noch aus Singulets bestehen. Eine Übersicht und genauere Beschreibung der

verwendeten NMR Experimente sind im Anhang in Kapitel 9.5 zu finden. Bei der Bestimmung der T1 für die PL ergaben sich Werte zwischen 0,5 und 2 s, was in guter Übereinstimmung mit von Bosco und Mitarbeitern publizierten Werten ist (Bosco et al., 1997).

Für die Quantifizierung ist es erforderlich, die molare Masse der einzelnen PL zu ermitteln. Diese ergibt sich bei den PL aus dem GlycerinGrundgerüst, der Phosphatgruppe, einem veresterten Alkohol (Cholin, Ethanolamin, Inositol) und den veresterten FS. Bei den veresterten FS der PL handelt es sich zum größten Teil um gesättigte und ungesättigte Formen der Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0). Die Angaben der Fettsäurezusammensetzung, die für die Berechnung der molaren Masse der PL verwendet wurden, sind im Anhang (Tabelle 9-3) angegeben. Die Fettsäurezusammensetzungen von PC, PE und SM basieren auf verschiedenen Literaturquellen, die sich mit der Analyse der FS der PL aus Eifett befassten. Für PI konnte keine Fettsäurezusammensetzung für Eifett in der Literatur gefunden werden, daher wurde die Fettsäurezusammensetzung von PI aus verschiedenen Studien, die sich mit der Analyse von Gewebearten unterschiedlicher Tiere befassten, evaluiert und ein Mittelwert daraus gebildet. Dieser wurde für die Berechnung der molaren Masse der FS in PI verwendet. Für LPC und LPE wurden die Angaben zu den FS aus dem Zertifikat der Standardsubstanzen entnommen, da diese aus Eifett extrahiert wurden.

### **Referenzierung und Quantifizierung von $^{31}\text{P}$ unter Verwendung eines internen und externen Standards**

Die Referenzierung der  $^{31}\text{P}$  NMR Signale erfolgt wie bereits beschrieben standardmäßig über eine externe Standardlösung, die 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in  $\text{D}_2\text{O}$  enthält. Allerdings kann auch auf andere Substanzen, die der Lösung zugegeben werden, referenziert werden. Die Zugabe eines internen Standards bietet den Vorteil, dass dadurch die Möglichkeit besteht, diesen auch zur Quantifizierung einzusetzen. Murgia, Mele und Monduzzi verwendeten Trimethylphosphat (TMP) zur internen Referenzierung und Quantifizierung von PL in verschiedenen Milchproben. TMP hat allerdings den Nachteil, dass seine T1 im Vergleich zu den PL mit 9,55-14,81 s sehr lang ist (Hatzakis et al., 2008; Murgia et al., 2003). Andere verwendeten für die Referenzierung und Quantifizierung Triisobutylphosphat (TIBP) (Balsgart et al., 2016) oder TPP, mit deutlich kürzeren T1 von 1,44 und 2,12-4 s (Hatzakis et al., 2008; Weber et al., 2015). Der Nachteil von TPP ist seine chemische Verschiebung. Diese ist mit -17,60 ppm weiter entfernt von den chemischen Verschiebungen der PL, die sich im Bereich zwischen 1 bis -1 ppm befinden. Durch die größere Entfernung muss das Aufnahme Fenster erweitert werden, was sich bei gleicher digitaler Auflösung negativ auf die Messzeit auswirkt. An den Rändern des Spektrums sollte jeweils ein Abstand von mindestens 2 ppm zum ersten Signal eingehalten werden, welches quantifiziert werden soll. Dies ist wichtig, da nur so gewährleistet werden kann, dass die randständigen Signale eine richtige Signalfläche aufweisen (Beyer, 2011).

Meneses und Glonek verwendeten Glycerophosphatidylcholin (GPC) als internen Standard für die Bestimmung der PL in unterschiedlichen Matrices (Meneses & Glonek, 1988). GPC ist ein natürlich vorkommendes PL, welches jedoch nicht im Eigelb vorhanden ist. Ein Vorteil ist die chemische Verschiebung von GPC. Das GPC-Signal zeigt keine Überlagerung mit anderen im Eifett enthaltenen PL-Signalen. Durch die Verwendung von GPC als internen Standard kann die spektrale Weite kleiner gewählt werden, wodurch die Messzeit verkürzt werden kann. Zudem besitzt GPC eine mit den anderen im Eifett enthaltenen PL vergleichbare T1 von 2,096 s. Daher wurde GPC auch in dieser Arbeit als interner Quantifizierungsstandard für die PL im Eifett verwendet. Der GPC-Standard wurde zuvor mittels  $^1\text{H}$  NMR und einem zertifizierten Referenzstandard auf Gehalt und Reinheit überprüft.



Zur internen Referenzierung der chemischen Verschiebungen wurde das PC-Signal verwendet. Meneses und Glonek beschrieben PC als eines der PL, bei dem die chemische Verschiebung auch unter wechselnden Lösungsmittelzusammensetzungen konstant bleibt (Meneses & Glonek, 1988). In Vorversuchen konnte dieses Verhalten bestätigt werden. Es zeigte sich, dass das PC-Signal keine Veränderungen in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert aufweist. Die Verwendung von PC als interner Referenzstandard ist von Vorteil, da dieser nicht zusätzlich zur Lösung hinzugegeben werden muss. Zudem ist PC immer in ähnlichen Konzentrationen im Eigelb vorhanden, und somit unterliegt die chemische Verschiebung keinen Schwankungen aufgrund von Konzentrationsunterschieden.

Für einen Vergleich unterschiedlicher Quantifizierungsmethoden bei der  $^{31}\text{P}$  NMR wurden bei dieser Arbeit sowohl eine Quantifizierung unter Verwendung eines internen Standards als auch eine Quantifizierung unter Verwendung eines externen Standards durchgeführt. Der Einfachheit halber wurde für Herstellung des externen Quantifizierungsstandards eine Mischung aus GPC und PC im ternären  $^{31}\text{P}$  NMR Lösungsmittelgemisch verwendet. Das NMR Röhrchen wurde nach Befüllung abgeschmolzen und auf Dichtigkeit überprüft. So wird sichergestellt, dass Anteile des Lösungsmittels nicht verdampfen können und zu einer Konzentrationsänderung führen. PC dient wie auch in den Probenlösungen zur Referenzierung der chemischen Verschiebung. Die externe Standardlösung wurde auch bei Probenserien, die den internen Standard enthielten, mitgemessen.

Die NS wurden so gewählt, dass sie einen guten Kompromiss zwischen Messzeit und S/N bilden. Die genauen Messparameter sind in Kapitel 8.3.3 in Tabelle 8-7 zu finden. Die Prozessierungsparameter sind in Tabelle 8-8 beschrieben. Bei der Prozessierung wurde das PC-Signal auf -0,7 ppm gesetzt. Die Integration erfolgte mittels automatischer Integration in TopSpin. Hierbei wurden für die verschiedenen PL bestimmte Integrationsbereiche festgelegt.

### **3.4 Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäureverteilung im Eifett**

Die Fettsäureverteilung wird routinemäßig mittels GC-FID bestimmt. Das Fett, welches zum größten Teil aus TAG besteht, wird mit geeigneten Methoden extrahiert, anschließend werden die am GlycerinGrundgerüst veresterten FS zu FSME umgeestert (L 13.00-45 BVL, 2018). FSME sind leichter flüchtig als andere Fettsäureester und können daher gut zur GC eingesetzt werden, ohne dass sie sich im heißen Injektor zersetzen. Für die Umesterung stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die Umesterung kann basen- oder säurekatalysiert erfolgen. Die basenkatalysierte Umesterung läuft sehr schnell und unter milden Temperaturen ab. Die NaOH- oder KOH-katalysierte Umesterung von TAG benötigt bei Raumtemperatur wenige Minuten. Der Nachteil der basenkatalysierten Umesterung ist, dass FFS nicht verestert werden, da Basen zwar die Umesterung katalysieren, nicht aber die Veresterung. Die säurekatalysierte Veresterung kann z.B. mittels  $\text{BF}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oder  $\text{HCl}$  erfolgen (Ke-Shun, 1994). Der Nachteil von  $\text{BF}_3$  ist zum einen seine gesundheitsschädliche Wirkung und zum anderen seine geringe Lagerfähigkeit.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist eine sehr viskose, stark ätzende Säure, deren Handhabung Vorsicht erfordert. Bei höheren Temperaturen oder hohen Säurekonzentrationen, die überwiegend bei der säurekatalysierten Veresterung Verwendung finden, kann es zu Artefaktbildung der FS kommen.  $\text{HCl}$  stellt eine mildere Alternative zu den genannten Säuren dar, mit der eine fast vollständige Veresterung erzielt wird. Allerdings ist die Herstellungsmethode für die methanolische  $\text{HCl}$  mit erheblichem Aufwand verbunden und die käuflich erwerbbaaren Produkte oft teuer. Es ist möglich, mit allen

genannten Methoden verlässliche Werte zu erzielen, wenn bestimmte Vorsichtsmaßnahmen und Vorgehensweisen eingehalten werden. Auch muss berücksichtigt werden, aus welchen Bestandteilen das Fett besteht und ob FFS erfasst werden sollen (Ke-Shun, 1994; Sheppard & Iverson, 2012).

Bei der anschließenden gaschromatographischen Trennung werden die FSME nach ihrer Kettenlänge, dem Grad der Ungesättigtheit und der Konfiguration der Doppelbindung(en) (cis-/trans-Isomere) aufgetrennt. Für die Trennung finden v.a. polare Säulen mit stationären Phasen aus Cyanoalkyl-Polysiloxan oder Cyanopropyl-Polysilphenylen-Siloxan Anwendung (L 13.00-45 BVL, 2018). In der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB und in der Methodensammlung der „American Oil Chemists Society“ (AOCS) gibt es verschiedene Empfehlungen, welche Säulen am besten für welche Zwecke in der Fettsäureanalytik geeignet sind (L 13.00-45 BVL, 2018).

Für die Bestimmung der Fettsäureverteilung im Eifett fand in dieser Arbeit ein bestehendes und validiertes Prüfverfahren vom CVUA Karlsruhe Anwendung. Es handelt sich dabei um eine Methode, mit der die Gehalte an trans-Fettsäuren und die Fettsäureverteilung in pflanzlichen Fetten und Ölen bestimmt werden. Das Verfahren besteht aus einer kalten alkalischen Umesterung mit Kaliummetholat und der anschließenden Auftrennung der FSME mittels GC unter Verwendung einer Poly(Biscyanopropyl-Siloxan)-Phase. Eine genaue Beschreibung der Methode und der Parametereinstellungen ist in Kapitel 8.5 zu finden. Die Eifettproben wurden in Serien für die GC-Messung vorbereitet. Eine Probenserie bestand aus ca. 10-20 Proben. Die Zuordnung der FSME erfolgte mittels Standardsubstanzen, die bei jeder Messserie in den Standardlösungen „Omega-Test“ und „Butter/Margarine-Test“ enthalten sind und bei jeder Messung mitanalysiert wurden. Die Herstellung der beiden Testlösungen und die darin enthaltenen FSME sind in Kapitel 7.2 (Tabelle 7-3) genauer beschrieben. Für einige FS erfolgte bei der Zuordnung eine Absicherung durch GC-MS. Dies geschah im Rahmen einer Masterarbeit von R. Brendel. Für die Identifizierung der FS wurde dafür eine spezielle Derivatisierungsmethode mit 2-Amino-2-methyl-1-propanol durchgeführt. Aus den einzelnen FS entsteht bei dieser Derivatisierung ein 4,4-Dimethyloxazolin (DMOX) FS-Derivat, welches im MS je nach Lage der Doppelbindung zu charakteristischen Fragmentmustern führt.

Der Gehalt der einzelnen FS wird als relative Massenanteile der FS bezogen auf alle FS bestimmt. Für die Überprüfung der Aufarbeitung und Messung auf Reproduzierbarkeit wurde eine Reproduzierbarkeitsprobe (R-Probe), die aus einer Eiprobe bestand, verwendet. Diese wurde an drei aufeinander folgenden Tagen fünf Mal aufgearbeitet und vermessen. Die R-Probe wurde zudem bei einigen Probenserien als Qualitätsprobe zur Überprüfung der Aufarbeitung und Messung mitgeführt.

### **3.5 Datenverarbeitung – Multivariate Datenanalyse**

Für die Analyse der <sup>1</sup>H NMR Daten wurden verschiedene chemometrische Verfahren angewandt. Die Chemometrie ist eine chemische Teildisziplin, die sich damit beschäftigt, mathematische und statistische Methoden für die optimale Planung, Durchführung und Auswertung von chemischen Experimenten auszuwählen und zu entwickeln. Die Methoden selbst stammen aus der multivariaten Datenanalyse. Mit ihnen ist es möglich, mehrere Variablen gleichzeitig zu untersuchen und so Zusammenhänge und Abhängigkeiten voneinander aufzuzeigen. Die großen Datenmengen der NMR sind daher prädestiniert, um mit diesen Techniken analysiert zu werden. Im Vergleich zur univariaten Datenanalyse bietet der multivariate Ansatz einige Vorteile. Der Informationsverlust ist deutlich geringer, da die gesamten Daten in die Auswertung miteinfließen und nicht nur spezifische Bereiche oder einzelne Signale. Dadurch ist es möglich Abhängigkeiten

der Variablen voneinander zu erkennen, was gerade bei biologischen Proben sehr wichtig ist. Des Weiteren wird bei der univariaten Analyse ein größeres Vorwissen der Probenzusammensetzung vorausgesetzt, um die richtigen Variablen für die Analyse auszuwählen. Weiter können überlagernde Signale durch andere chemische Komponenten, eine verschobene Basislinie oder abnormale Proben die Auswertung erschweren. Bei der multivariaten Analyse sind diese „Ausreißer“ bei einer großen Anzahl an Spektren leichter als bei der univariaten Analyse zu identifizieren (Ebrahimi et al., 2017).

Die univariate Datenanalyse der <sup>1</sup>H NMR Daten erfolgte in Form eines Kruskal-Wallis Tests. Die Multivariate Datenanalyse (MVDA) bestand aus einer Hauptkomponentenanalyse oder principal component analysis (PCA) mit linearer Diskriminanzanalyse (LDA).

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe eines vorgefertigten Skriptes<sup>2</sup> in MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA).

### 3.5.1 Datenvorbehandlung

Für die Datenvorbehandlung wurden alle in TopSpin prozessierten <sup>1</sup>H NMR Spektren in MATLAB eingeladen. Die Spektrenbereiche, die Restlösungsmittelsignale oder andere für die Auswertung nicht relevante Signale enthalten, wurden für die Analyse ausgelassen. In Tabelle 3-1 ist eine Zusammenfassung der relevanten Parameter der Datenvorbehandlung dargestellt.

Anschließend wurde eine Bucketierung der Spektren durchgeführt. Das Bucketieren ist eine Methode der Datenreduktion, bei welcher das NMR Spektrum in viele gleichgroße Bereiche aufgeteilt wird. Die Intensitäten werden dabei aufsummiert, dadurch wird die Fläche jeder dieser Bereiche anstelle der einzelnen Intensitäten der Datenpunkte für die Analyse verwendet. Dies ermöglicht, die Anzahl an Variablen zu reduzieren. Die Bereichsgröße eines Buckets kann dabei frei gewählt werden. Das gesamte Spektrum oder nur ein Teilbereich kann bucketiert werden, indem entweder die Bucketgröße oder die Anzahl der Buckets festgelegt wird (Holmes, Elaine et al., 1994; Sousa et al., 2013). Ein Vorteil des Bucketierens ist neben der Datenreduktion, dass eventuell vorhandene Signalverschiebungen in den Spektren, die durch pH- und Temperaturunterschiede oder gerätetechnische Instabilitäten entstehen können, bei der Auswertung nicht mehr so stark ins Gewicht fallen (Winning et al., 2008).

**Tabelle 3-1: Relevante Parameter der Datenvorbehandlung**

Parameter	Signalbereich [ppm]	Signalzuordnung	Kommentar
<b>Ausschlüsse</b>	3,3 – 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Restwassersignal</li> <li>- Signal des teildeuterierten Methanols</li> <li>- Teilbereich der Phospholipid-signale*</li> <li>- Bereich des Triacylglycerid-grundgerüsts</li> </ul>	Die Signale des Triacylglyceridgrundgerüsts, des teildeuterierten Methanols und des Restwassersignals wurden von der Analyse ausgeschlossen, da sie keinen signifikanten Einfluss auf die Untersuchung haben.

<sup>2</sup> Das vollständige MATLAB-Skript, welches für die Analyse der <sup>1</sup>H NMR Daten verwendet wurde, ist in der digitalen Version dieser Arbeit beigefügt.

<b>Bucketierung</b>	0,5 – 7,2		Ausschluss des Tetramethylsilansignals und des Chloroformsignals, insgesamt werden 2000 Buckets verwendet. Unter Berücksichtigung der Ausschlüsse sind es 1493 Buckets.
<b>Normalisierung</b>	3,57 – 3,63	Methylengruppe des Phosphatidylcholin-signals	s. univariate Datenanalyse

\* nur einige  $^1\text{H}$  Signale der PL von PC und PE befinden sich in diesem Ausschlussbereich. Sie können ausgeschlossen werden, da im Spektrum noch weitere Signale von PC und PE vorhanden sind, die in die weiteren Analysen miteinfließen.

Die  $^1\text{H}$  NMR Eifettspektren wurden im Bereich von 0,5 bis 7,2 ppm in 2000 gleichgroße Buckets aufgeteilt. Vor dem Bucketieren und vor den oben beschriebenen Ausschlüssen bestand ein prozessiertes  $^1\text{H}$  NMR Eifettspektrum aus insgesamt 131072 (SI) Datenpunkten. Dies entspricht 131072 Variablen, die für die anschließende MVDA zur Verfügung stehen. Durch das Bucketieren sind es noch 2000 Buckets oder Variablen, und nach Berücksichtigung der oben genannten Ausschlüsse verbleiben 1493 Buckets, die für die weitere Analysen verwendet wurden.

### Normalisierung

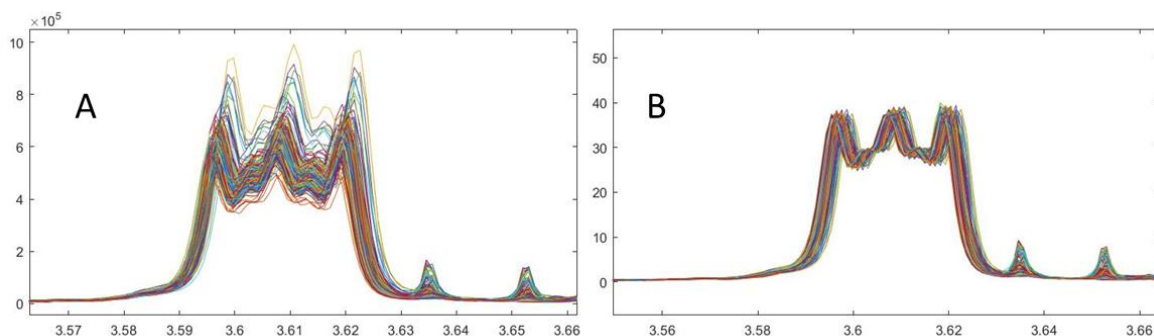
Die Normalisierung der NMR Spektren ist wichtig, da es aufgrund von unterschiedlichen Einwaagen und der Probenpräparation zu Konzentrationsunterschieden und Füllstandvariationen in den Messröhrchen kommen kann. Ein weiterer Einflussfaktor, der sich auf die Reproduzierbarkeit auswirken kann, ist ein nicht gleichbleibender Shim, der zu Intensitätsunterschieden zwischen den Spektren führt. Eine Normalisierung der Spektren wirkt diesen systematischen Fehlern entgegen (Ebrahimi et al., 2017). Ein Nachteil kann dagegen der Eintrag einer falschen Abhängigkeit der Daten sein (Capozzi et al., 2011). Es gibt unterschiedliche Methoden nach denen normalisiert werden kann:

- 1) Bei der Integral-Normalisierung wird davon ausgegangen, dass die Integrale eines Spektrums in direkter Beziehung zu der Konzentration einer Probe stehen. Das heißt, dass bei Spektren einer linearen Konzentrationsreihe auch die Integrale entsprechend linear sind. Bei dieser Methode wird jedes Signal durch das Integral des gesamten Spektrums oder einem Teil davon dividiert. Somit werden alle Signale auf das gleiche Integral normalisiert. Bei dieser Art der Normalisierung werden vor allem Unterschiede durch die Probeneinwaage berücksichtigt.
- 2) Durch die Verwendung eines internen Standards, welcher immer zu gleichen Gehalten enthalten ist oder eines elektronisch erzeugten Signals wie z.B. ERETIC (s. Kapitel 1.6.2). Bei dieser Normalisierungsmethode werden v.a. messtechnische Aspekte wie der Shim berücksichtigt.
- 3) Bei der Probabilistic Quotient Normalisierung wird das Spektrum nach seiner wahrscheinlichsten Verdünnung normalisiert. Diese wird mit Hilfe eines Referenzspektrums ermittelt. Dabei werden die Quotienten verschiedener Amplituden des Spektrums und des Referenzspektrums gebildet und die wahrscheinlichste Verdünnung berechnet. Der Unterschied zu Integral-Normalisierung ist, dass nicht alle Signale eines Spektrums zur Berechnung der Verdünnung miteinbezogen werden, sondern nur die Intensitäten von einigen Signalen. Diese Normalisierungsmethode ist dann geeignet, wenn davon ausgegangen wird, dass einige

Verbindungen in einer Probe Konzentrationsschwankungen aufweisen, wie das beispielsweise bei Urin der Fall sein kann (Dieterle et al., 2006).

Bei der internen Standardmethode kann auch der verwendete Referenzierungsstandard zur Normalisierung verwendet werden. Allerdings muss z.B. bei TSP darauf geachtet werden, dass dieses nicht von Proteinen in der Messlösung komplexiert wird. Eine Normalisierung auf TMS ist nur dann ratsam, wenn sichergestellt werden kann, dass sich die Konzentration aufgrund der Leichtflüchtigkeit nicht ändert. Eine andere Möglichkeit ist es, eine Verbindung zu verwenden, die natürlich in allen Proben in ungefähr gleichen Gehalten vorkommt oder die entsprechend mit etwas Bekannten korreliert werden kann. Ein Beispiel dafür ist Kreatinin, welches in der klinischen Chemie als ein solcher Normierungsstandard eingesetzt wird, da dessen Gehalt proportional zur Muskelmasse ist (Savorani et al., 2013). Diese Art der Normalisierung sollte allerdings nur dann angewendet werden, wenn die zugrundeliegenden biologischen Prozesse bekannt sind. Kreatinin als interner Normierungsstandard sollte beispielsweise nur dann angewendet werden, wenn keine Stoffwechseldysregulation vorliegt (Emwas et al., 2018).

In dieser Arbeit wurden alle  $^1\text{H}$  NMR Eifettspektren auf die Methylengruppe neben der Cholingruppe des PC-Signals (s. Abbildung 4-5 Signal Nr. 6) normalisiert. Durch die univariate Datenanalyse, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben wird, konnte gezeigt werden, dass dieses Signal und demnach diese Verbindung keine signifikante Variation zwischen den unterschiedlichen Haltungsgruppen aufweist und somit gut zur Normalisierung eingesetzt werden kann. Abbildung 3-1 zeigt das PC-Signal vor und nach der Normalisierung der Spektren.



**Abbildung 3-1: Multiplettsignal der Methylengruppe des Phosphatidylcholins bei 3,57 – 3,63 ppm. A zeigt das Signal von mehreren Spektren, die überlagert wurden vor und B nach der Normalisierung**

### Skalierungsmethode

Das Skalieren der Daten wird verwendet, um den Einfluss von Signalen, die bestimmte biologische oder chemische Informationen enthalten und zur Unterscheidung beitragen, bei der Auswertung hervorzuheben und Signale mit weniger Unterscheidungskraft zu minimieren. Die zwei bekanntesten Methoden dafür sind das Autoscaling und das Pareto Scaling, die beide vor allem bei der Auswertung im Bereich der Metabolomik Anwendung finden.

Beim Autoscaling oder auch „Unit Variance Scaling“ wird die Standardabweichung als Skalierungsfaktor verwendet, d.h., dass von allen Variablen jeweils der Mittelwert abgezogen und durch die jeweilige Standardabweichung dividiert wird. Alle Variablen besitzen dadurch eine Standardabweichung von eins und sind somit gleich wichtig. Der Vorteil dieser Art der Skalierung ist, dass kleinere Signale, die eventuell maßgeblich für die Unterscheidung sind, nach der Skalierung den gleichen Einfluss haben wie große Signale. Der Nachteil dieses Skalierungsverfahren liegt darin, dass das Rauschen unter Umständen einen zu großen Einfluss erhält. Beim Pareto Scaling wird stattdessen die Quadratwurzel der Standardabweichung als

Skalierungsfaktor verwendet. Dominierende Signale verlieren dadurch etwas an Einfluss, während kleinere Signale an Bedeutung gewinnen. Allerdings bleibt die Grundstruktur der Daten dadurch in höherem Maße erhalten als beim Autoscaling (Ebrahimi et al., 2017).

Für die weitere Datenanalyse wurden die normalisierten Spektren dem Autoscaling unterzogen.

### **Normalverteilung der Daten**

Die meisten NMR-Daten bei der Untersuchung von Lebensmittelmatrizes oder in Studien der Metabolomik weisen eine rechtsschiefe Verteilung auf. Dies liegt darin begründet, da die Konzentrationen der enthaltenen Substanzen in diesen Matrizes nicht negativ werden können (Schütz, 2012). Für viele statistische Untersuchungen wie z.B. der PCA und LDA ist eine Normalverteilung der Daten allerdings von Vorteil, da dies eine Interpretation der erstellten Modelle erleichtert. Mit Hilfe der Log-Transformation können rechtsschief verteilte Daten zu normalverteilten Daten transformiert werden. Dabei werden die einzelnen Werte der Daten mit dem Logarithmus zur Basis 10 multipliziert. Höhere Werte werden dadurch näher zum Median hin verschoben und niedrige Werte dagegen weiter weg (Kessler, 2007).

### **3.5.2 Univariate Datenanalyse – Kruskal-Wallis Test**

Der Kruskal-Wallis Test ist ein parameterfreier statistischer Test mit dem äquivalent zur Varianzanalyse geprüft wird, ob verschiedene Gruppen sich unterscheiden oder nicht. Die Voraussetzung ist, dass die Daten der Gruppen ordinalskaliert sind, sprich nach einer Rangfolge geordnet werden können (Kruskal & Wallis, 1952). Er findet v.a. dann Anwendung, wenn die Voraussetzung der Normalverteilung der Daten nicht erfüllt ist. Dies trifft auf die die meisten NMR Daten von Lebensmittelmatrizes zu. Die gemessenen <sup>1</sup>H NMR Spektren der Eifettproben können unter Verwendung des Kruskal-Wallis Tests univariat ausgewertet werden, um Unterschiede der Haltungsgruppen im Spektrum zu ermitteln und anzuzeigen. Dafür werden die Spektren in die drei Haltungsgruppen, Bodenhaltung, Freilandhaltung und Biohaltung, unterteilt. Für jede Variable (Bucket) wird der Test einzeln angewendet. Daher muss dieser Test bei NMR Spektren mehrere Male wiederholt werden, sodass alle Buckets über den gesamten ppm Bereich überprüft werden. Bei diesem multiplen Testen in der gleichen Probe muss allerdings die Alpha-Fehler-Kumulierung berücksichtigt werden. Das heißt, je mehr Hypothesen innerhalb eines Datensatzes getestet werden, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine dieser Hypothesen zutrifft. Die sogenannte versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet sich durch folgende Formel:

#### **Formel 11**

$$1 - (1 - \alpha)^k$$

mit  $k$  der Anzahl der zu testenden Nullhypothesen (entspricht den unabhängigen Variablen) und mit  $\alpha$  dem Signifikanzniveau. Wird beispielsweise bei einem unabhängigen Signifikanztest ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  (dies entspricht 5 % eine falsche Entscheidung zu treffen) gewählt und mit  $k = 5$  Variablen innerhalb des gleichen Datensatzes getestet, beträgt die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit 0,23. Das bedeutet, dass anstelle von 5 % aller Proben, 23 % der Proben abgelehnt werden, obwohl sie die Nullhypothese erfüllen. Mit Hilfe der Šidác-Methode kann das multiple oder globale Signifikanzniveau eingehalten werden, wenn das lokale Signifikanzniveau angepasst wird (Bauer, 1991; Bender et al., 2007; Sachs, 1999).

## Formel 12

$$\alpha_{\text{lokal}} = 1 - (1 - \alpha_{\text{global}})^{1/k}$$

Da die Variablen (Buckets) bei NMR-Daten meist voneinander abhängen wäre die Šidác-Methode hier zu defensiv und muss daher manuell angepasst werden (Bender et al., 2007).

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests können bei der späteren Auswertung die Bereiche im Spektrum, die keine Unterschiede zwischen den Haltungsgruppen aufweisen ausgelassen werden. Andererseits können so auch die Spektrenbereiche oder sogar einzelne Signale identifiziert werden, die Unterschiede aufzeigen und somit für die Unterscheidung verantwortlich sind. In Kapitel 4.2.3 (Abbildung 4-15 A, B) ist das Ergebnis einer univariaten Datenanalyse unter Verwendung des Kruskal-Wallis Tests dargestellt. Die drei Haltungsgruppen (Biohaltung, Bodenhaltung, Freilandhaltung) sind jeweils mit den unterschiedlichen Farben rot, blau und grün dargestellt. Die dickeren Linien (Abbildung 4-15 A) zeigen jeweils die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die farbigen Bereiche der zugehörigen Farben, die Schwankungen innerhalb einer Gruppe. Die pinkfarbenen Balken zeigen die Bereiche und Signale, bei denen sich die Gruppen unterscheiden.

### 3.5.3 Hauptkomponentenanalyse, lineare Diskriminanzanalyse

Die PCA gehört zu den multivariaten statistischen Analysetechniken, die dazu verwendet werden, um große Datenmengen mit vielen Variablen gleichzeitig zu analysieren, zu vereinfachen und um vorhandene Zusammenhänge zu verdeutlichen. Bei der Auswertung von NMR basierten Daten findet diese nicht zielgerichtete Analysenmethode immer häufiger Anwendung (Gerhardt et al., 2016; Longobardi et al., 2012; Mannina et al., 2003; Monakhova et al., 2015). Bei der PCA werden die Daten, die sich aus den gemessenen Proben (M) und ihren Variablen (N), den Buckets, zusammensetzen, in einen mehrdimensionalen Raum projiziert. Für eine bessere Veranschaulichung der mehrdimensionalen Daten wird bei der PCA eine Reduktion der Dimensionalität durchgeführt. Aus den Ausgangsdaten werden dabei sogenannte Hauptkomponenten berechnet, die eine Linearkombination der Originalvariablen darstellen. In den Ausgangsdaten wird dazu die Richtung der maximalen Varianz bestimmt. In Abbildung 3-2 A ist eine vereinfachte Darstellung mit drei Dimensionen gezeigt, bei der jeder Punkt für eine Probe steht. Die Koordinatenachsen entsprechen dabei den Variablen oder Buckets. Nun wird eine Gerade oder auch die erste Hauptkomponente (PC1) (siehe Abbildung 3-2 B) so durch die Punkte gelegt, dass die Daten am besten approximiert werden. Der Abstand zwischen Datenpunkt und Hauptkomponente wird als euklidischer Abstand bezeichnet. Die erste Hauptkomponente wird so gelegt, dass die Summe der quadratischen euklidischen Abstände ein Minimum aufweist. Die nächsten und folgenden Hauptkomponenten (s. Abbildung 3-2 C) werden jeweils orthogonal zu der vorherigen gelegt. Nach Berechnung der Hauptkomponenten werden die Ausgangsdaten in das neue, von den Hauptkomponenten beschriebene Koordinatensystem, transformiert. Die Proben (Punkte) werden auf den berechneten Hauptkomponenten abgebildet wodurch die neuen Koordinaten oder auch Scores für den Hauptkomponentenraum erhalten werden (s. Abbildung 3-2 D-E). Der Nullpunkt dieses neuen Koordinatensystems entspricht dem Mittelwert der Variablen (Kessler, 2007). Der Informationsgehalt ist in den ersten Hauptkomponenten am höchsten und nimmt in aufsteigender Reihenfolge ab. Durch die oben beschriebene Rotation des Koordinatensystems in Richtung der maximalen Varianz ist bei diesem Verfahren eine Visualisierung einer mehrdimensionalen Datenmatrix ohne wesentlichen Informationsverlust möglich (s. Abbildung 3-2 F) (Kessler, 2007; Steliopoulos, 2013).

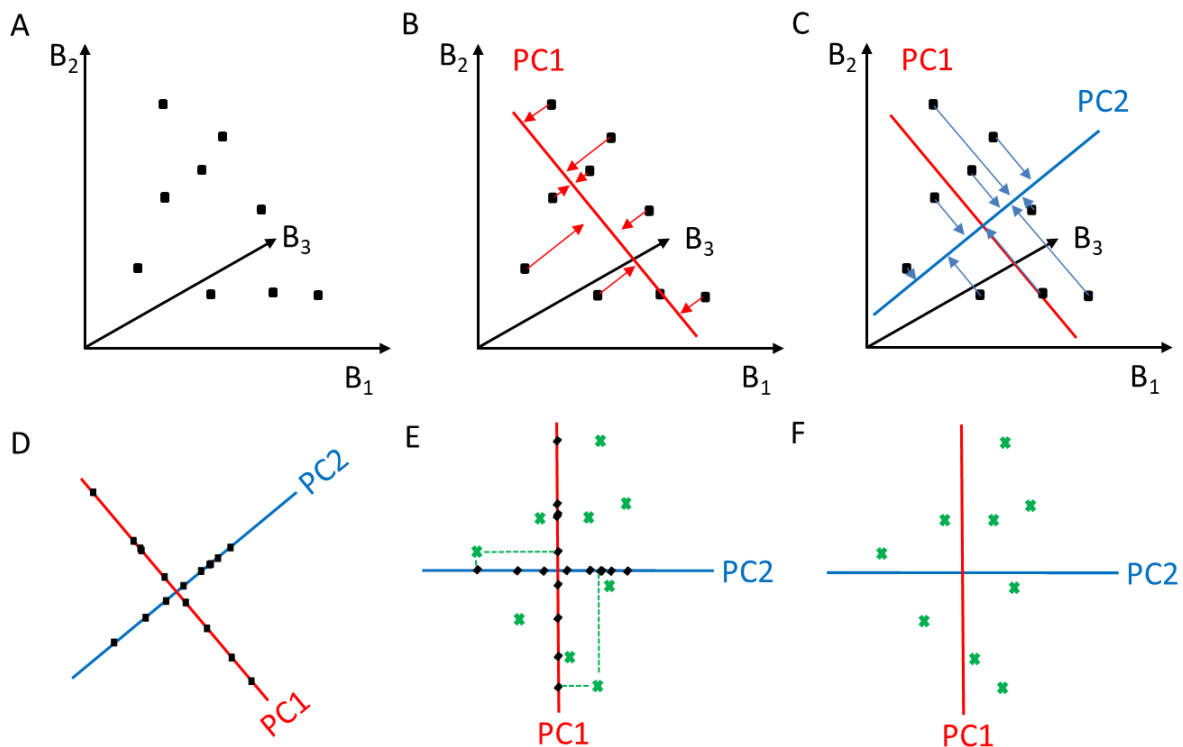


Abbildung 3-2: A zeigt eine Darstellung von Daten in einem dreidimensionalen Raum, jeder Punkt entspricht einer Probe und jede Koordinatenachse einer Variablen ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ). B zeigt die erste Hauptkomponente (PC1), C zeigt die Projektion der Daten auf die zweite Hauptkomponente (PC2), die orthogonal auf der ersten liegt. D zeigt die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1, PC2) im Originalkoordinatensystem. E zeigt die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1, PC2) als neue Koordinatenachsen. Der Nullpunkt des Koordinatensystems wurde in den Mittelpunkt der Daten verschoben. Die grünen Kreuze zeigen die Scores, die durch die Transformation der Ausgangsdaten auf die Hauptkomponenten entstanden sind. F zeigt den Scoreplot der ersten beiden Hauptkomponenten, der auf den Daten von A angewendeten PCA

Mathematisch kann die PCA mit folgender Gleichung beschrieben werden:

Formel 13

$$X = TP^T + E$$

$X$  entspricht dabei der Datenmatrix, die sich aus  $N$  Objekten (Proben) und  $M$  Variablen (Buckets) zusammensetzt.  $T$  ist die Scorematrix, in ihr sind die neuen Koordinatenwerte entsprechend der Anzahl der Objekte ( $N$ ) und der Anzahl der Hauptkomponenten, enthalten. Bei  $P^T$  handelt es sich um eine transponierte Matrix die als Hauptkomponentenmatrix bezeichnet wird. In ihr sind die Loadings der Hauptkomponenten enthalten. Die Loadings können als eine Art „Wegbeschreibung“ vom ursprünglichen Koordinatensystem (s. Abbildung 3-2 D) in das neue Koordinatensystem (s. Abbildung 3-2 E) beschrieben werden. Sie besteht aus der Anzahl der gebildeten Hauptkomponenten und aus der Anzahl der ursprünglichen Variablen. Die Matrix  $E$  ist die sogenannte Residuenmatrix, die ein Gegenstück zur Matrix  $X$  darstellt, da sie genauso viele Zeilen und Spalten wie die Matrix  $X$  Objekte und Variablen besitzt. In ihr ist die Differenz zwischen den Originaldaten in Matrix  $X$  und der Matrizen  $TP^T$  enthalten. Durch die Elemente der Residuenmatrix  $E$  kann die Restvarianz berechnet werden, die einen Aufschluss darüber gibt wie gut die Objekte durch die Hauptkomponenten beschrieben werden. Wenn die Anzahl der errechneten Hauptkomponenten der Anzahl der Variablen ( $M$ ) entspricht, wird keine Residuenmatrix gebildet (Kessler, 2007).



Die LDA gehört bei den multivariaten statistischen Verfahren zu den zielgerichteten Analysetechniken, die als Klassifikationsverfahren angewendet werden kann. Der Unterschied zur PCA ist, dass bei der LDA die Klassen oder Gruppen definiert werden können, und jede Probe genau einer Klasse/Gruppe zugeordnet werden kann. Aus den bekannten Informationen werden die Diskriminanzfunktion und somit die linearen Grenzen ermittelt. Die Diskriminanzfunktion wird dabei so berechnet, dass die Varianz zwischen den Klassen oder Gruppen maximiert und die Varianz innerhalb einer Gruppe oder Klasse minimiert wird. Es werden so viele Diskriminanzfunktionen berechnet, bis das Unterscheidungsproblem gelöst wird. Werden die Diskriminanzfunktionen gegeneinander aufgetragen, kann die Trennung der unterschiedlichen Klassen grafisch dargestellt werden. Für die Klassifizierung unbekannter Objekte wird die errechnete Diskriminanzfunktion auf die neuen Daten angewendet. Die Zuordnung der Objekte zu einer Gruppe erfolgt durch die kürzeste Entfernung des Objektes zum jeweiligen Klassenmittelpunkt der Gruppe. Neue Objekte, mit unbekannter Gruppenzugehörigkeit können so genau einer bestimmten Gruppe zugeordnet werden. Der Nachteil der Methode der genauen Zuordnung ist, dass eine Zuordnung von Objekten zu mehreren Gruppen nicht möglich ist und auch Ausreißer immer genau einer Gruppe zugeordnet werden. Daher ist es besser Objekte einem definierten Varianzbereich von z.B. 95 % einer Gruppe zuzuordnen. Wenn nun das Objekt außerhalb dieses Bereichs liegt, wird es keiner Gruppe zugeordnet. Notwendige Voraussetzungen für die LDA sind eine Normalverteilung der Daten, die Existenz von verschiedenen Gruppenmittelpunkten und die Ähnlichkeit der Varianzen und Kovarianzen der unterschiedlichen Gruppen (Otto, 1999).

Nach Naes, Isaksson und Fearn ist es mit der LDA möglich, gezielt die Variablen zu nutzen, die zwischen den Gruppen unterschiedlich sind. Proben, die nicht zu einer Gruppe gehören bzw. zu einer Gruppe gehören, können so einfacher im Vergleich zur PCA zugeordnet werden. Mit den Funktionen können Klassifikationswerte für jede Probe mit Hinblick auf die Gruppenzugehörigkeit berechnet werden (Naes et al., 2002; Otto, 1999).

NMR Daten besitzen eine hohe Dimensionalität, d.h. die Anzahl an Variablen übersteigt die Anzahl an Proben. Hierbei kann es zu einer Verschlechterung des errechneten Klassifizierungsmodell kommen (Naes et al., 2002). Um dem entgegenzuwirken und um ein sog. „Overfitting“ der Daten zu vermeiden, kann die LDA auf den zuvor generierten Scores der Hauptkomponenten der PCA angewendet werden.

### **3.5.3.1 Monte-Carlo Kreuzvalidierung und Konfusionsmatrix**

Die Monte-Carlo Kreuzvalidierung (MCCV) stellt eine Methode dar, mit der die Vorhersagekraft eines erstellten Modells überprüft werden kann. Dabei wird der vorhandene Datensatz in ein Training-Set und in ein Test-Set aufgeteilt. Das Training-Set wird zum Aufbau des Modells verwendet, und die Daten aus dem Test-Set werden als unabhängige Daten zum Testen des Modells verwendet. Dieser Vorgang wird mehrere Male wiederholt. Die Reihenfolge der Daten zum Testen und für den Aufbau des Modells ist dabei zufällig, lediglich die Anzahl der Daten in den Datenpaketen ist vorgegeben. Alle Daten werden dadurch bei jedem Durchgang genau einmal getestet. Der Unterschied der MCCV zur einfachen k-fachen Kreuzvalidierung (kFCV) ist, dass bei der MCCV mehrere kFCV hintereinander wiederholt werden, wobei die Daten vor jeder kFCV willkürlich vermischt werden.

Die Zuordnung der Test-Proben zu dem Modell, welches mit dem jeweiligen Training-Set erstellt wird, erfolgt mit Hilfe des nearest class mean (NCM). Beim NCM wird das Objekt vom Test-Set der Gruppe zugeordnet, dessen Entfernung zum jeweiligen Gruppenmittelpunkt geringer ist. Der Abstand wird hierbei mit Hilfe eines 95 % Konfidenzintervalls und den Modellmittelpunkten

berechnet. Eine andere Art der Zuordnung ist beispielsweise die k-nächste Nachbar Methode (k-nearest Neighbor Method, KNN). Hierbei wird das Objekt nicht nach dem Abstand zum Gruppenmittelpunkt, sondern nach dem Abstand zum nächsten Nachbarobjekt und dessen zugehörigen Gruppe zugeordnet. k gibt dabei die Anzahl der Nachbarobjekte an, zu denen das Testobjekt zugeordnet werden soll. Beispielsweise wird bei einem k von 3 das Objekt zu den am nächsten gelegenen drei Nachbarobjekten und deren Gruppe zugeordnet. Der Nachteil dieser Methode ist die Abhängigkeit der Klassifizierung von der Anzahl der Objekte in den jeweiligen Gruppen. Im Falle von einer Überschneidung der Datenbereiche der Gruppen, wird das Testobjekt der Gruppe mit einer höheren Objektanzahl zugeordnet. Im Gegensatz zur NCM Methode ist die KNN Methode nicht linear und kann daher auch bei komplexeren Datenverteilungen angewendet werden (Otto, 1999). Die Güte der Zuordnung beider Methoden kann anhand der Häufigkeit der Zuordnung der Test-Proben zur richtigen Gruppe bestimmt und in einer Konfusionsmatrix dargestellt werden.

Für die Untersuchung der  $^1\text{H}$  NMR Spektren wird die PCA zur Dimensionsreduktion eingesetzt. Im Anschluss folgt die LDA auf den berechneten Scores der Hauptkomponenten, um eine maximale Gruppentrennung zwischen der biologischen und der konventionellen Gruppe, bestehend aus den Proben der Bodenhaltung und der Freilandhaltung, zu erhalten. Die so berechneten Funktionen der Klassifizierung werden mit Hilfe der MCCV mit einer Schleife von 10 Durchgängen und einer Gruppeneinteilung der Daten in etwa 10 gleichgroße Datensets, auf ihre Vorhersagekraft hin überprüft. Die Güte der Zuordnung wird mittels NCM und eines 95 % Konfidenzintervalls berechnet und in einer Konfusionsmatrix dargestellt. Für die graphische Darstellung werden die Proben in einem der von insgesamt 100 möglichen Modellen dargestellt. In Abbildung 4-12 in Kapitel 4.2.2 ist die Konfusionsmatrix mit einem zugehörigen Klassifizierungsmodell der ersten drei Diskriminanzfunktionen (LD 1-3), mit einem Konfidenzintervall von 95 %, zu sehen.

Bei der Anwendung des Modells auf neue Proben wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, erfolgt die Zuordnung anhand des NCM und einem Konfidenzintervall von 95 % sowie mit Hilfe des p-Wertes mit einem Signifikanzniveau von 0,05. Der p-Wert oder auch Signifikanzwert genannt ist bei einem Hypothesentest der Wert, bei dem entschieden werden kann, ob die Nullhypothese verworfen oder beibehalten wird. Der p-Wert selbst ist dabei der kleinste Wert, bei dem die Nullhypothese noch verworfen wird (Otto, 1999). Im Fall der Anwendung des Modells auf neue Proben werden die Ergebnisse (Ergebnisse der Diskriminanzfunktionen) mit den Modelldaten einem Hypothesentest in Form eines t-Tests unterzogen. Bei einem Vergleich der erhaltenen Werte kann mit dem zuvor festgelegten p-Wert von 0,05 entschieden werden, ob eine Probe einer bestimmten Gruppe zugeordnet werden kann oder nicht.

### **3.5.4 Validierung von multivariaten Verfahren**

Bei multivariaten statistischen Verfahren ist die Validierung wichtig, um vor allem bei Regressionsmodellen wie der LDA ein Overfitting der Daten zu vermeiden. Bei einem Overfitting werden die Proben durch das erstellte Modell sehr gut beschrieben, bei der Anwendung auf neue Proben ist jedoch keine richtige Vorhersage mehr möglich. Daher stellt sich bei jedem statistischen Modell die Frage, wie gut das Modell auf unbekannte Proben reagiert. Allgemein ist jedes Modell nur so gut, wie die Daten, auf deren Grundlage es aufgebaut wurde. Daher ist es wichtig, viele Proben für den Modellaufbau zu verwenden, die das gesamte Spektrum der „Realität“, also eine hohe Variabilität, aufweisen. Eine optimale Validierung dieser Verfahren besteht aus verschiedenen Überprüfungsansätzen.

Steliopoulos beschäftigte sich ausführlich mit der Validierung von PCA-gestützten Analysemethoden (Steliopoulos, 2013). Dazu verwendete er als Entscheidungsgrenze eine Entscheidungsellipse, die aus den Scores der PCA berechnet wurde. Mit ihrer Fläche umschließt sie die authentischen Proben. Für eine unbekannte Probe kann nun berechnet werden, ob die Probe innerhalb der Entscheidungsellipse liegt oder nicht. Für eine Beurteilung des Nachweisvermögens können authentische Proben einer anderen Sorte und Mischungen aus beiden Sorten getestet werden. Die Scores dieser Test-Sets werden anschließend in einer Prognoseellipse dargestellt. Bei Nicht-Überschneidung der beiden Ellipsen kann davon ausgegangen werden, dass die Methode in der Lage ist, nicht-authentische Proben anzuzeigen (Steliopoulos, 2013). Callao und Ruisánchez schlugen in ihrem Review über multivariate Verfahren, die bei der Aufdeckung von Lebensmittelbetrug eingesetzt werden, ein Schema zur Validierung vor (Callao & Ruisánchez, 2018). Dieses zeigt verschiedene Ansätze unter Berücksichtigung der Probenzahl. Eine Kreuzvalidierung ist einer dieser Ansätze, der v.a. bei geringeren Probenzahlen empfohlen wird. Die Kreuzvalidierung wurde bereits in Kapitel 3.5.3.1 näher beschrieben. In Kombination mit verschiedenen Simulationsverfahren wie der kFCV und der MCCV (siehe Kapitel 3.5.3.1) ist es möglich den gesamten Datensatz für die Kreuzvalidierung zu verwenden. Der Nachteil der Kreuzvalidierung ist, dass diese lediglich vom Umfang und der Variabilität der Originaldaten, auf denen das Modell beruht, abhängt (Callao & Ruisánchez, 2018). Ein weiterer Ansatz ist die Validierung mit einem unabhängigen Test-Set, der allerdings eine große Probenanzahl voraussetzt. Die Proben sind dabei bekannt und repräsentieren die jeweiligen Klassen des Modells. Das Verfahren ist ähnlich der Kreuzvalidierung, allerdings werden unabhängige Proben, die weder zum Modellaufbau noch zur Kreuzvalidierung eingesetzt wurden, zur Überprüfung des Modells verwendet. Das Modell wird auf die unbekanntenen Proben angewendet, und die Güte der Zuordnung wird bestimmt (Breton, 2003; Callao & Ruisánchez, 2018). Nach Schönberger und Mitarbeiter kann die Messrichtigkeit der Kreuzvalidierung oder eines unabhängigen Test-Sets mit Hilfe einer Konfusionsmatrix dargestellt werden. Diese enthält Informationen über die Abhängigkeit der vorgegebenen und der mittels Klassifizierungsmodell zugeordneten Gruppe (Schönberger et al., 2015).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Validierung von multivariaten Analysemethoden ist die Verwendung von Qualitätskontrollproben. Diese stellen sicher, dass die vorangehenden analytischen Verfahren wie Extraktion, Probenpräparation, Messung und die Datenbehandlung stets unter gleichen Bedingungen ablaufen, sodass ein signifikanter statistischer Einfluss ausgeschlossen werden kann. Die Evaluierung einer Qualitätskontrollprobe kann mit Hilfe einer Regelkontrollkarte (Mittelwertkontrollkarte) erfolgen. Hierbei werden verschiedene Grenzen festgelegt, die bei der Kontrolle und Beurteilung der Ergebnisse der Messmethode helfen. Durch eine Vorperiode können die Grenzen definiert werden. Als Vorperiode eignen sich beispielsweise die Messwerte von mehrfachen Messungen der zu überwachenden Qualitätskontrollprobe. Folgende Grenzen werden anhand der Messwerte der Vorperiode festgelegt: der Mittelwert, die obere und untere Warngrenze und die obere und untere Kontrollgrenze. Die obere und untere Warngrenze berechnet sich aus dem Mittelwert  $\pm$  der doppelten Standardabweichung. Die obere und untere Kontrollgrenze berechnet sich aus dem Mittelwert  $\pm$  der dreifachen Standardabweichung. Durch verschiedene Warnhinweise können die Werte der Kontrollkarte kritisch überprüft werden. Ein Warnhinweis wäre z.B. ein Wert, der außerhalb der Kontrollgrenzen liegt, oder zwei von drei aufeinanderfolgenden Werten, die außerhalb der Warngrenzen liegen.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1 Charakterisierung der Fettbestandteile im Hühnerei**

Das im Hühnerei enthaltene Fett befindet sich größtenteils im Dotter. Der im Eiklar enthaltene Anteil ist mit 0,03 % vernachlässigbar gering. Für die Charakterisierung des Fettes muss dieses zuvor mit einer geeigneten Methode extrahiert werden. Aufgrund der Zusammensetzung der Eifettes muss die Fettextraktion entsprechend angepasst werden, um die Gesamtheit aller Verbindungen zu erhalten. In Kapitel 3.2.1 wurde die Entwicklung einer geeigneten Fettextraktionsmethode beschrieben. Es zeigte sich, dass die Methoden nach Folch, Lees und Stanley und Bligh und Dyer, das größte Potential zeigten, um die Gesamtheit der im Eifett vorkommenden Lipide zu extrahieren (Bligh & Dyer, 1959; Folch et al., 1957). Die entwickelte Extraktionsmethode kombiniert beide Methoden, um ein bestmögliches reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Das gefriergetrocknete Eigelb wird mit einem einphasigen Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Chloroform, Methanol und Wasser, extrahiert. Die Phasentrennung wird anschließend mit einer salzhaltigen Lösung erreicht, die dafür sorgt, dass die Lipide mit azidem Anteil, die sich teilweise in der wässrigen Phase befinden, in eine nicht dissoziierte Form überführt werden und somit in die organische Phase übergehen (Folch et al., 1957). Dadurch enthält das extrahierte Fett die unpolaren sowie polaren Fettkomponenten, die im Eidotter enthalten sind.

#### **4.1.1 Charakterisierung des Eifettes mittels $^1\text{H}$ NMR**

In Kapitel 3.3.1 wurde bereits die Entwicklung des Lösungsmittelgemisches für die Untersuchung des Eifettes mittels NMR beschrieben, dieses besteht aus einer Mischung aus  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  im Verhältnis 3:2. Die extrahierten Eifette wurden darin gelöst und mit der optimierten  $^1\text{H}$  NMR Messmethode vermessen. In Abbildung 4-1 ist ein  $^1\text{H}$  NMR Spektrum einer Eifettprobe zu sehen. Die Signalzuordnung erfolgte durch einen Vergleich mit in der Literatur veröffentlichten Daten und Standardsubstanzen.

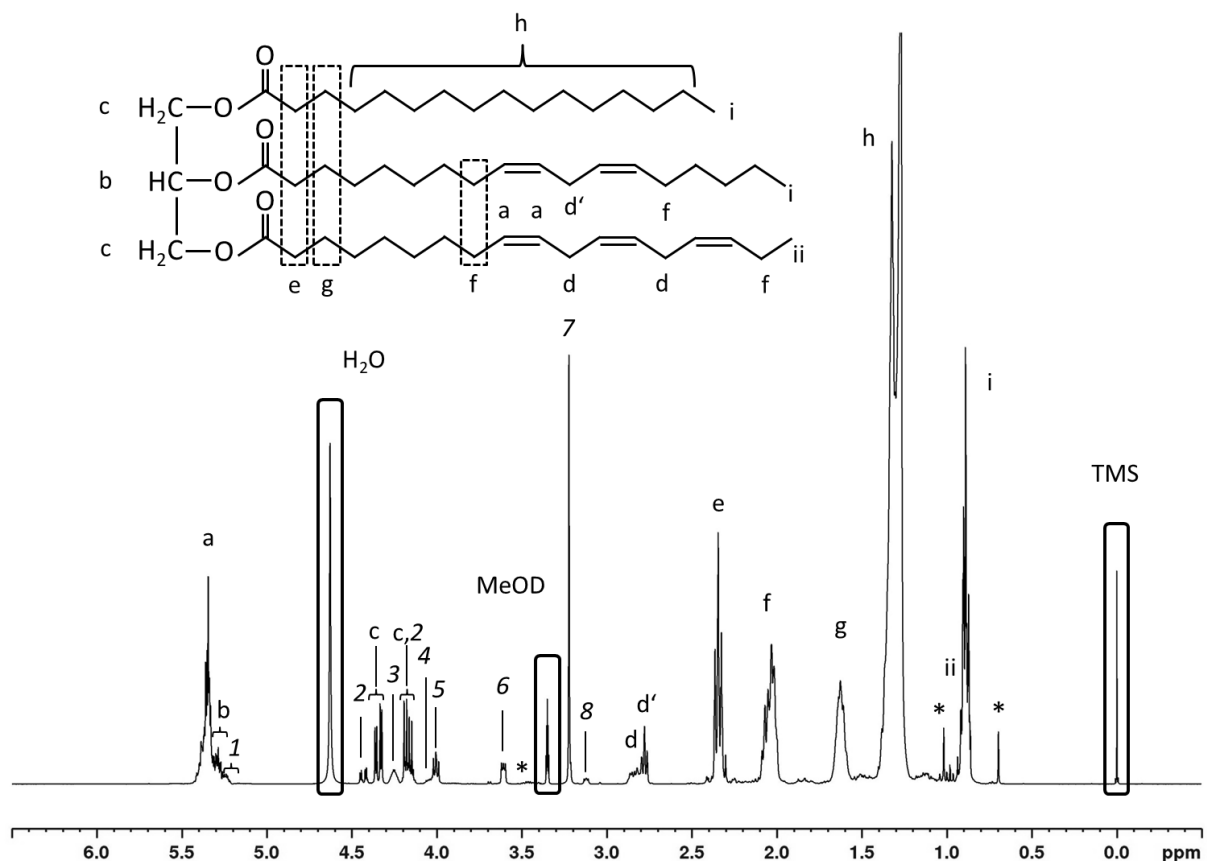
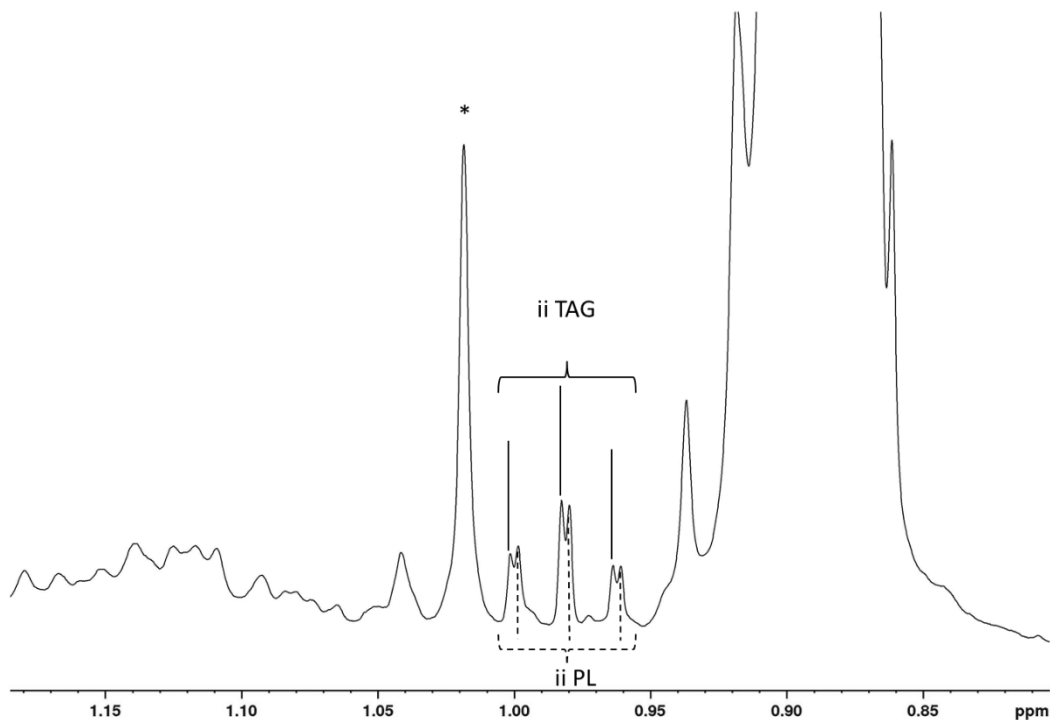


Abbildung 4-1: 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrum einer Eifettprobe mit Zuordnung der Signale

In Tabelle 4-1 ist eine detaillierte Zuordnung der Signale a-ii und 1-8 zu finden. Die Signale a-ii können den FS und dem GlycerinGrundgerüst der TAG zugeordnet werden. Die Signale 1-8 gehören zu den PL, eine genaue Beschreibung der Zuordnung der Signale zu den PL befindet sich in Kapitel 4.1.3. Die Signale in den rechteckigen Kästen (Abbildung 4-1), sind das Restwassersignal ( $\text{H}_2\text{O}$ ), das Methylsignal von teilweise deuteriertem Methanol (MeOD) und das Signal des internen Referenzierungsstandards der chemischen Verschiebung (TMS). Die Signale b und c stammen vom TAG-Grundgerüst, b von der CH Gruppe in Position sn-2 und c von den  $\text{CH}_2$  Gruppen in Position sn-1 und sn-3. Die in c zusammengefassten Signale bei 4,34 ppm und 4,17 ppm setzen sich aus zwei Dublett von Dublett (dd) Signalen zusammen. Das Signal a stammt von den Vinylprotonen der Doppelbindungen der FS, die in den TAG und den PL verestert vorliegen. Das Signal d bei 2,84 ppm (d) stammt von den Methylenprotonen zwischen den Doppelbindungen aller MUFS. Eine Ausnahme bildet die Linolsäure, deren Signal d' hochfeldverschoben bei 2,78 ppm vorliegt. Das Signal e stammt von den Methylenprotonen in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe aller FS. Das Signal e der DHA bildet eine Ausnahme und ist etwas tieffeldverschoben bei 2,4 ppm und kann dadurch von den anderen MUFS unterschieden werden. Die Signale f, g und h sind für alle FS der TAG und PL gleich. Die Signale i und ii bilden eine Ausnahme. i und ii zeigen die Signale der endständigen Methylgruppen der FS, wobei ii von den  $\omega$ -3 FS stammt und i von allen anderen FS. Auffällig bei dem Signal ii ist, dass bei einer Vergrößerung des Spektrums (Abbildung 4-2) in diesem Bereich eine zusätzliche Aufspaltung des Signals zu sehen ist. Diese kommt daher, da die  $\omega$ -3 FS der PL im Vergleich zu den  $\omega$ -3 FS der TAG ein leicht hochfeldverschobenes Signal erzeugen (Monakhova et al., 2016).



**Abbildung 4-2:** 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrum einer Eifettprobe mit Detailansicht im Bereich 0,7-1,2 ppm. Die Aufspaltung des Signals ii wird durch unterschiedliche chemische Verschiebung der endständigen Methylgruppe der  $\omega$ -3 Fettsäuren in Triacylglyceriden (TAG) und in Phospholipiden (PL) verursacht

Die Signale des Cholesterins sind in Abbildung 4-1 mit Sternchen gekennzeichnet. Die Signale bei 0,69 ppm und 1,018 ppm, gehören jeweils zu den Methylgruppen an Position C-18 und C-19 (s. Abbildung 1-4). Über diese Signale kann der Gesamtcholesteringehalt bestimmt werden, da diese beiden Signale für freies und verestertes Cholesterin gleich sind. Das Signal bei 3,46 ppm stammt vom Proton an Position C-3 und ist charakteristisch für freies Cholesterin. Das entsprechende Signal des Cholesterinesters liegt weiter tieffeldverschoben (Tynkkynen, 2012). Da aber die Gehalte an Cholesterinestern im Eifett sehr gering sind, kann dieses Signal mittels  $^1\text{H}$  NMR unter diesen Bedingungen nicht erfasst werden. Die restlichen Signale des Cholesterins werden von anderen Signalen der FS, PL und TAG überlagert.

**Tabelle 4-1:** Zuordnung der  $^1\text{H}$  NMR Signale zu verschiedenen Fettkomponenten im Eifett

Bezeichnung	$^1\text{H}$ [ppm]	Proton	Zuordnung
<b>a</b>	5,34 (m) <sup>2</sup>	-CH=CH- Vinylprotonen	ungesättigte Fettsäuren (TAG, PL) <sup>3</sup>
<b>b</b>	5,29 (m)	-CH (Position sn-2)	GlycerinGrundgerüst von TAG
<b>c</b>	4,34 (dd) <sup>2</sup> 4,17 (dd)	-CH <sub>2</sub> (Position sn-1 und sn-3)	GlycerinGrundgerüst von TAG
<b>d</b>	2,84(m)	-CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- Methylenprotonen zwischen Doppelbindungen	alle mehrfachungesättigten Fettsäuren (TAG, PL) (außer 18:2 $\omega$ -6 (Linolsäure))
<b>d'</b>	2,78(m)		18:2 $\omega$ -6 (Linolsäure) <sup>1</sup>
<b>e</b>	2,34(m)	-CH <sub>2</sub> -COOH Methylengruppe in $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe	alle Fettsäuren (TAG, PL) (außer 22:6 $\omega$ -3 (DHA) <sup>3</sup> )
	2,40(m)		22:6 $\omega$ -3 (DHA) <sup>1</sup>

Bezeichnung	<sup>1</sup> H [ppm]	Proton	Zuordnung
<b>f</b>	2,03(m)	-CH=CH-CH <sub>2</sub> - Methylenprotonen der Allylgruppe	alle Fettsäuren (TAG, PL)
<b>g</b>	1,62(m)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH Methylengruppe in β-Position der Carbonylgruppe	alle Fettsäuren (TAG, PL)
<b>h</b>	1,30(m)	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> Methylenprotonen	alle Fettsäuren (TAG, PL)
<b>i</b>	0,89(m)	-CH <sub>3</sub> endständige Methylgruppe der Fettsäuren	alle Fettsäuren außer ω-3 Fettsäuren
<b>ii</b>	0,98 (t) <sup>2</sup>	-CH <sub>3</sub> endständige Methylgruppe der ω-3 Fettsäuren	ω-3 Fettsäuren <sup>1</sup> (TAG, PL)
<b>1</b>	5,24(m)	-CH (Position sn-2)	Glyceringrundgerüst von PL
<b>2</b>	4,43(dd) 4,16(dd)	-CH <sub>2</sub> (Position sn-1)	Glyceringrundgerüst von PL
<b>3</b>	4,25(m)	-O <sub>3</sub> PO--CH <sub>2</sub> - Methylenprotonen neben Phosphatgruppe	PC <sup>3</sup>
<b>4</b>	4,05(m)	-O <sub>3</sub> PO--CH <sub>2</sub> - Methylenprotonen neben Phosphatgruppe	PE <sup>3</sup>
<b>5</b>	4,00(m)	-CH <sub>2</sub> -OPO <sub>3</sub> (Position sn-3)	Glyceringrundgerüst von PL
<b>6</b>	3,60(m)	-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	PC
<b>7</b>	3,22(s) <sup>2</sup>	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	PC, SM <sup>3</sup>
<b>8</b>	3,12(m)	-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	PE
<b>*</b>	0,69(s)	-CH <sub>3</sub> (C-18)	Cholesterin
	1,018(s)	-CH <sub>3</sub> (C-19)	
	3,46(m)	-CH (C-3)	

<sup>1</sup>Zuordnung erfolgte nach Barison et al., 2010, Mannina et al., 2003, Sacchi et al., 1997 und Tynkkynen, 2012.

<sup>2</sup> Multiplett (m), Singulett (s), Triplet (t), Dublett von Dubletts (dd)

<sup>3</sup> Triacylglycerid (TAG), Phospholipid (PL), Docosahexaensäure (DHA), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM)

#### 4.1.2 Charakterisierung des Eifettes mittels <sup>13</sup>C NMR

Die Charakterisierung der Fettkomponenten mittels <sup>13</sup>C NMR bietet den Vorteil, dass es durch die größere spektrale Breite zu weniger Signalüberlagerungen kommt und dadurch die Signalzuordnung eindeutiger ist. Allerdings ist aufgrund der geringeren natürlichen Häufigkeit des <sup>13</sup>C Kerns ein Vielfaches der Messzeit im Vergleich zur <sup>1</sup>H NMR Messung erforderlich, um ein vergleichbares S/N zu erlangen. Gunstone zeigte, dass sich die chemischen Verschiebungen der Carbonylkohlenstoffe von freien FS, deren Methylestern und Glycerinestern unterscheiden. Es ist möglich die Positionen der Carbonyle (sn-1,3 oder sn-2) am TAG-Grundgerüst zu unterscheiden, sowie auch die FS zu bestimmen, die an diesen Stellen verestert sind. Dies liegt an den C-Atomen, die sechs oder mehr Bindungen entfernt liegen und die chemische Verschiebung der Carbonylgruppe noch beeinflussen. So wird z.B. die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoff von der Doppelbindung in Position Δ-9, die acht Kerne entfernt liegt, beeinflusst (Gunstone, 1993b, 1994). Mit der <sup>13</sup>C NMR ist es möglich, für fast jede FS ein separates

Signal zu erhalten. Dadurch kann das Spektrum dazu verwendet werden, die Fettsäurezusammensetzung von Lipiden zu ermitteln und bietet somit eine Alternative zu den chromatographischen Methoden (Gunstone, 1993b, 1994). Ein zusätzlicher Vorteil der  $^{13}\text{C}$  NMR Methode ist, dass sie bei Einhaltung bestimmter Akquisitionsparameter und Bedingungen, wie der T1 und des NOE, quantitativ ist (Diehl & Ockels, 1995). Sacchi, Addeo und Paolillo verwendeten die  $^{13}\text{C}$  NMR für die Untersuchung von Olivenölen. Dabei zeigten sie, dass durch die Analyse der DG eine Aussage über Beimischungen von Olivenöl minderer Qualität gemacht werden kann. Beim Zusatz von raffiniertem Öl, welches verschiedenen Behandlungsverfahren ausgesetzt wurde, wie der Entsäuerung, dem Bleichen, dem Desodorieren oder der Winterisierung, nimmt der Gehalt an DG zu. Trans-FS, die bei der Raffination vermehrt entstehen, können mittels  $^{13}\text{C}$  NMR nachgewiesen werden, da Diastereomere wie cis/trans- Isomere mit Hilfe der NMR unterschieden werden können. Jedoch sind die Gehalte meist nur sehr gering, wodurch die Messzeit sehr lang werden kann. So berichteten sie von einer quantitativen Erfassung von 0,1 % Trielaidin, welches sie der Probe zugesetzt hatten, bei einer Messung mit NS von 30.000. Bei Trielaidin handelt es sich um ein TAG, welches drei Elaidinsäuren (*trans*-9-Octadecensäure) enthält (Sacchi et al., 1997). Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebung der Carbonylsignale, die von der Position der Veresterung der FS am TAG abhängt (sn-1,3 oder sn-2), kann eine Untersuchung und Bestimmung der Umesterung der TAG durchgeführt werden. Bei Olivenölen kann durch die Bestimmung der gesättigten FS in Position sn-2 so eine Aussage über die Umesterung getroffen werden. Der Anteil der gesättigten FS in Position sn-2 liegt bei natürlichen Ölen bei ca. 1,5 % und ist damit eher gering. Je nach Behandlung kann dieser Anteil bis zu 15 % ansteigen (Sacchi et al., 1997).

In Abbildung 4-3 und 4-4 sind verschiedene Ausschnitte eines  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrums von Eifett zu sehen. Der Bereich der Fettkomponenten erstreckt sich über einen Bereich von 10-190 ppm. Die Referenzierung der chemischen Verschiebung erfolgte mit TMS ( $\delta$  0 ppm). In Tabelle 4-2 sind die verschiedenen Bereiche des Spektrums und deren Zuordnung zu verschiedenen Fettkomponenten aufgelistet. Die Signalzuordnung wurde mit Hilfe von Daten aus der Literatur (Diehl & Ockels, 1995; Gunstone, 1993a, 1994; Gunstone & Shukla, 1995; Sacchi et al., 1994, 1997) und mittels Spektren von Standardsubstanzen vorgenommen. Der Carbonylbereich erstreckt sich von 160-190 ppm. In Abbildung 4-3 oben ist ein detaillierter Ausschnitt des Carbonylbereichs zu sehen. Die Signale 1 und 2 können den Carbonyl-Kohlenstoffkernen in sn-1,3 bzw. sn-2 Position zugeordnet werden. Die im Eifett zum größten Teil vorkommenden FS sind Ölsäure, Palmitinsäure und Linolsäure (s. Kapitel 4.1.5). Die Signale bei 174,2 ppm, die den Carbonyl-Kohlenstoffkernen in sn-1,3 Position zugeordnet wurden, stammen von Palmitinsäure und Ölsäure. Das Signal des Carbonyl-Kohlenstoff in Position sn-2 (2) bei 173,7 ppm stammt von Ölsäure, Linolsäure und anderen MUFS. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Aussage von Juneja, dass in sn-1,3 Position überwiegend gesättigte und einfach ungesättigte FS verestert werden und in sn-2 Position die ungesättigte FS (Juneja, 1997).

**Tabelle 4-2: Zuordnung der  $^{13}\text{C}$  NMR Signale zu verschiedenen Fettkomponenten im Eifett**

Bezeichnung	$^{13}\text{C}$ [ppm]	Kohlenstoffkern	Zuordnung <sup>2</sup>
<b>160-190 ppm</b>		<b>Carbonyl-/Carboxylgruppe</b>	
<b>1</b>	174,2	sn-1,3-Position	TAG <sup>1</sup>
<b>2</b>	173,7	sn-2-Position	TAG
<b>115-145 ppm</b>		<b>Ungesättigte Kohlenstoffe</b>	
<b>3</b>	130,45	C-13	Linolsäure
	130,25	C-9	

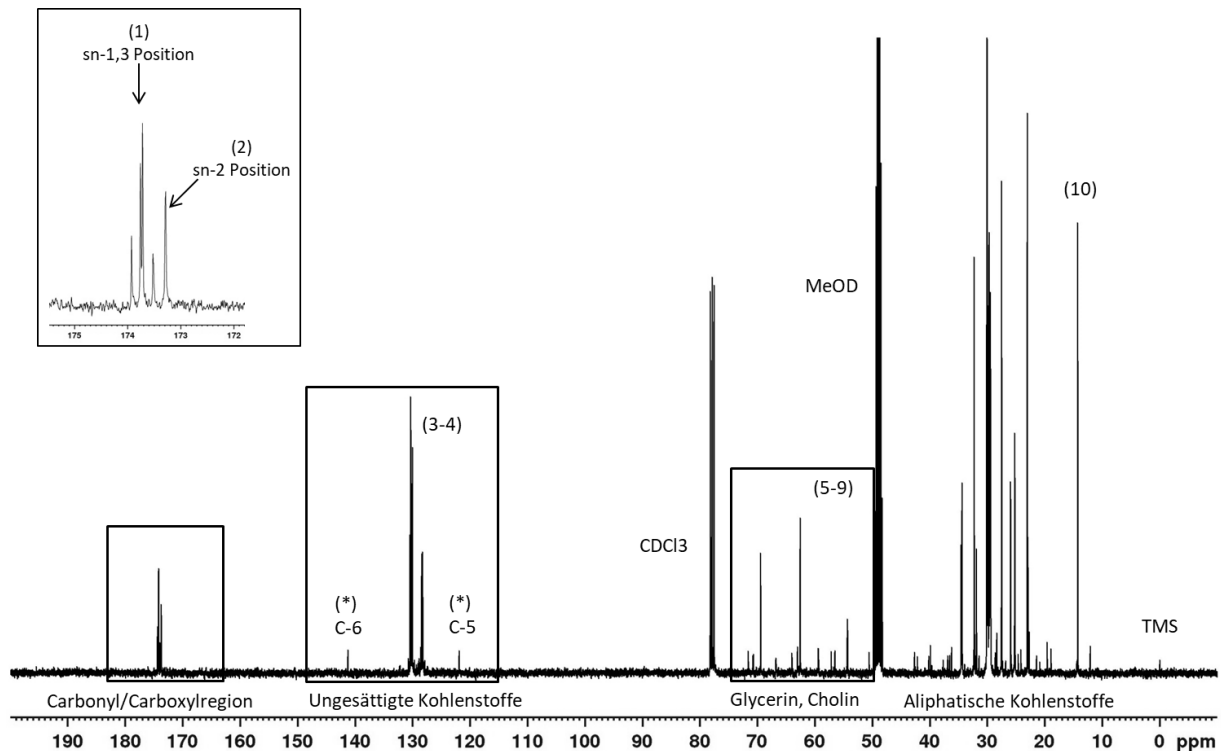


Bezeichnung	<sup>13</sup> C [ppm]	Kohlenstoffkern	Zuordnung <sup>2</sup>
	128,42	C-10	
	128,24	C-12	
<b>4</b>	130,32	C-10	Ölsäure
	130,04	C-9	
<b>(*)</b>	141,79	C-6	Cholesterin
	121,9	C-5	
<b>50-74 ppm</b>		<b>Glycerin, Cholin</b>	
<b>5</b>	69,44	sn-2 (C)-Position	TAG
<b>6</b>	62,55	sn-1,3 (C)-Position	TAG
<b>7</b>	66,76	O <sub>3</sub> PO-CH <sub>2</sub> - Methylene Kohlenstoff neben Phosphat	Cholingroupe von PC, LPC, SM <sup>1</sup>
<b>8</b>	59,39	-CH <sub>2</sub> - N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Methylene Kohlenstoff neben quaternärem Ammonium	Cholingroupe von PC, LPC, SM
<b>9</b>	54,34	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cholin-Methylgruppen	Cholingroupe von PC, LPC, SM
<b>(*)</b>	71,64	-CH (C-3)	Cholesterin
	56,88	Cholesterinsignale, ohne genaue Zuordnung	
	50,60		
<b>10-45 ppm</b>		<b>Methylen-, Methylbereich</b>	
<b>10</b>	14,27	-CH <sub>3</sub> endständige Methylgruppe	alle Fettsäuren

<sup>1</sup> Triacylglycerid (TAG), Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SM)

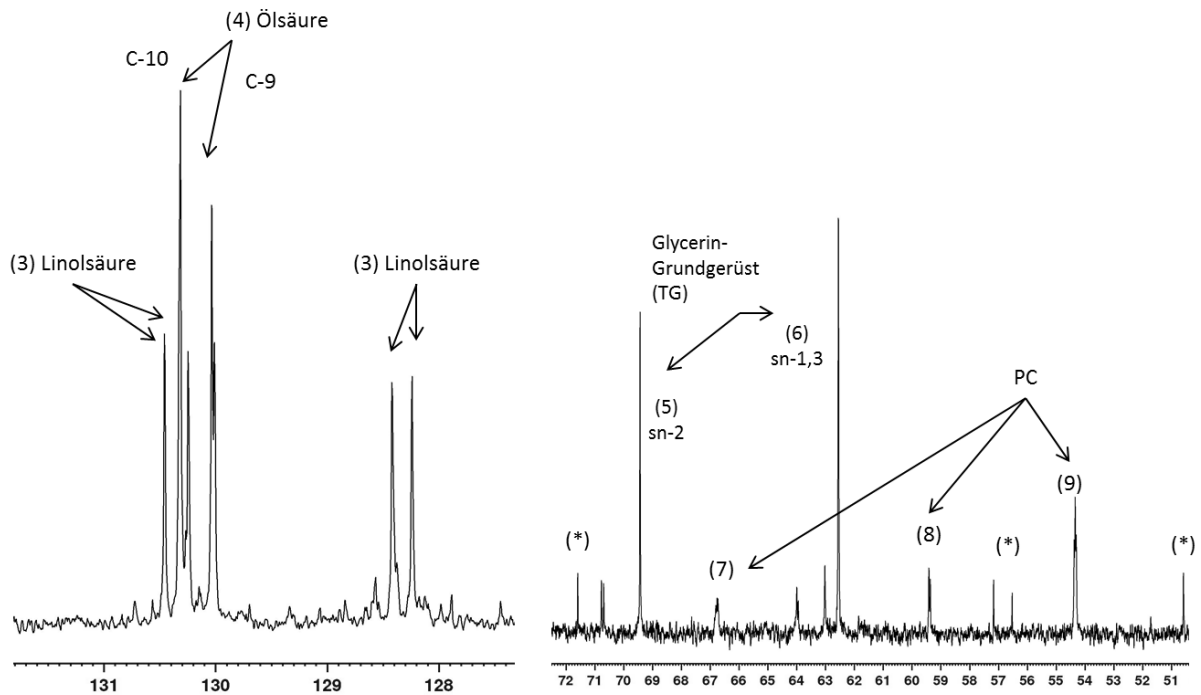
<sup>2</sup> Zuordnung erfolgte nach Zamora et al., 2001 und Gunstone, 1994.

Der Bereich der ungesättigten Kohlenstoffkerne erstreckt sich von 115 bis 145 ppm (Abbildung 4-3). Die beiden mit einem Sternchen markierten Signale stammen von Cholesterin und können den an der Doppelbindung beteiligten Kohlenstoffkernen C-5 und C-6 (s. Abbildung 1-4) zugeordnet werden. Die anderen Signale in dieser Region stammen von den Kohlenstoffkernen der Doppelbindungen der ungesättigten FS. Eine genauere Darstellung ist in Abbildung 4-4 auf der linken Seite zu sehen. Die dominanten Signale wurden auf die ungesättigten FS Öl- und Linolsäure zurückgeführt. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe der Daten von Gunstone (Gunstone, 1994) und Zamora, Alba und Hidalgo (Zamora et al., 2001). Die Linolsäure mit ihren vier ungesättigten Kohlenstoffkernen (C-9, C-10, C-12, C-13) zeigt vier Signale mit ähnlicher Intensität in diesem ppm-Bereich. Die beiden Ölsäuresignale bei 130,32 (C-10) und 130,04 ppm (C-9) können gut anhand ihrer Intensität zugeordnet werden. Da die Ölsäure mengenmäßig die Linolsäure um mehr als das Doppelte im Eidotterfett übersteigt, zeigt sich dies auch in der Intensität ihrer Signale im Vergleich zu den Signalen der Linolsäure.



**Abbildung 4-3: 400 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum einer Eifettprobe mit Zuordnung einiger Signale**

Ein weiterer interessanter Bereich des  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrums wird von den beiden Lösungsmittelsignalen MeOD und  $\text{CDCl}_3$  zwischen 50 und 74 ppm eingerahmt. Die Signale stammen von der Cholingruppe des PC, LPC und SM, von Cholesterin und dem GlycerinGrundgerüst der TAG. Einen genaueren Einblick in diesen Bereich zeigt die Abbildung 4-4 auf der rechten Seite. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Signale stammen von Cholesterin, die beiden größeren Signale bei 69,44 und 62,55 ppm zeigen die Kohlenstoffkernsignale in sn-2 (5) und sn-1,3 (6) Position des GlycerinGrundgerüsts. Die Signale 7, 8 und 9 sind charakteristisch für die Signale der Cholingruppe von PC. Gunstone zeigte, dass sich die chemischen Verschiebungen des Kohlenstoffsignals des GlycerinGrundgerüsts in Position sn-3 von PC, PE und TAG unterscheiden. Auch sind die Signale der Kopfgruppe von PE ( $\text{CH}_2\text{-N}^+\text{H}_3$ , Ethanolamin) und PC ( $\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ , Cholin) sehr verschieden, sodass diese leicht unterschieden werden können (Gunstone, 1994). Allerdings ist die Konzentration von PE und der anderen cholinhaltigen PL zu gering, um unter diesen Messbedingungen Signale zu detektieren. Im Bereich von 10-45 ppm sind die Signale der aliphatischen Kohlenstoffe, wie die der Methylen- und Methylgruppen zu finden. Eine genaue Zuordnung der Signale gestaltet sich schwierig, da dieser Bereich im Vergleich zum Rest des Spektrums sehr signalreich ist. Auch kommt es vermehrt zu Signalüberlagerungen. Das einzige Signal, welches gut zugeordnet werden kann, ist das Signal Nummer 10 der endständigen Methylgruppe der FS.



**Abbildung 4-4:** Ausschnitt eines 400 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrums einer Eifettprobe. Links der Bereich der ungesättigten Fettsäuren, rechts der Bereich des Glycerin-Grundgerüsts und der Cholingruppe der Phospholipide

### 4.1.3 Charakterisierung der Phospholipide im Eifett mittels $^1\text{H}$ , $^{31}\text{P}$ und 2D NMR

Die Identifizierung der PL im Eifett erfolgte mit verschiedenen 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) und 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) NMR Techniken. Die Literatur und der Vergleich mit Standardsubstanzen lieferten erste Anhaltspunkte über die enthaltenen PL. PC und PE sind die PL, die in größeren Anteilen von ca. 70-80 % bzw. 10-20 % im Eifett enthalten sind. Durch die Cholin- bzw. Ethanolamin-Gruppe, welche charakteristische Signale im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zeigen, sind sie leicht zu identifizieren. In Abbildung 4-5 ist ein Ausschnitt eines  $^1\text{H}$  NMR Spektrums einer Eifettprobe zu sehen. Die Signale 3, 6 und 7 können der Cholingruppe von PC (zu geringeren Anteilen auch LPC und SM) und die Signale 4 und 8 der Ethanolamingruppe von PE (zu geringeren Anteilen auch LPE) zugeordnet werden. Die Signale 1, 2 und 5 repräsentieren das Glycerin-Grundgerüst und sind für die beiden PL, PC und PE, sehr ähnlich. Die Signale, die mit der Nummer 2 gekennzeichnet sind, stammen von der  $\text{CH}_2$  Gruppe in Position sn-1. Bei PE ist das rechte Signal etwas tieffeldverschoben, was aufgrund der geringeren Konzentration von PE im Vergleich zu PC allerdings erst bei näherer Betrachtung auffällt. Es handelt sich um ein Dublett vom Dublett, da die Protonen mit dem jeweils anderen Proton der Methylengruppe und mit dem Proton der CH Gruppe in Position sn-2 koppeln. Das Signal 1 der CH Gruppe in Position sn-2 des Glycerin-Grundgerüsts zeigt ein Quartett von Dubletts durch die Kopplung mit vier nicht äquivalenten Protonen in Position sn-1 und sn-3 des Glycerin-Grundgerüsts. Das Signal 1 ist im Vergleich zu Signal b der TAG (Kapitel 4.1.1, Abbildung 4-1) aufgrund der Phosphatgruppe in der Nachbarschaft etwas hochfeldverschoben und kann daher von diesem gut abgegrenzt werden. Das Signal 5 stammt von der  $\text{CH}_2$  Gruppe des Glycerins in Position sn-3. Dieses ist im Vergleich zu Signal 2 aufgrund der polaren Phosphatgruppe hochfeldverschoben und zeigt je nach Phosphatesterrest verschiedene Aufspaltungsmuster. Die Protonen koppeln mit dem jeweils anderen Proton der Methylengruppe am selben Kohlenstoffkern, mit der CH Gruppe in Position

sn-2 und mit dem  $^{31}\text{P}$  Kern des Phosphatrests (Sparling et al., 1989). In Abbildung 4-6 ist ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spektrum von Phosphatidylethanolamin mit entsprechenden Signalzuordnungen zu sehen. Mit Hilfe eines  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY können Verknüpfungen in einem Molekül durch Korrelationssignale sichtbar gemacht werden. So lässt sich beispielsweise gut erkennen, dass die Signale 4 und 5 von verschiedenen Kernen stammen. Signal 5 stammt wie oben beschrieben von der  $\text{CH}_2$  Gruppe in Position sn-3 des Glyceringrundgerüsts und zeigt daher ein Korrelationssignal mit dem Proton in Position sn-2. Das Signal 4 dagegen zeigt ein Korrelationssignal mit der benachbarten Methylengruppe 8. Durch diese Informationen können die Signale des PE eindeutig im Molekül zugeordnet werden. Die Signale 4 und 8 von PE zeigen eine Multipllettstruktur, da sie jeweils mit dem anderen Methylenproton am gleichen Kohlenstoffkern (geminal), mit den Protonen am benachbarten Kohlenstoffkern (vicinal) und mit dem  $^{31}\text{P}$  Kern koppeln (Sparling et al., 1989).

Im Anhang, Kapitel 9.6.4, ist die Zuordnung der Signale von PC mittels  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC zu sehen. Signal 7, ein Singulett bei ca. 3,2 ppm, ist charakteristisch für die neun äquivalenten Methylenprotonen der Cholingruppe. Bei der Eifettprobe zeigt sich auf der rechten Seite des Cholinsignals eine kleine Schulter. Diese stammt von einem anderen cholinhaltigen PL wie z.B. LPC oder SM und liegt aufgrund der anderen chemischen Umgebung etwas hochfeldverschoben. Die Signale 3 und 6 von PC zeigen eine Multipllettstruktur. Sie stammen von den  $\text{CH}_2$  Gruppen zwischen der Trimethylamin- und der Phosphatgruppe. Als einzig weiteres PL zeigt SM Signale im Bereich von 5,4-5,8 ppm (s. Anhang 9.6.3, Abbildung 9-5). Diese stammen von der Doppelbindung im SphingosinGrundgerüst.

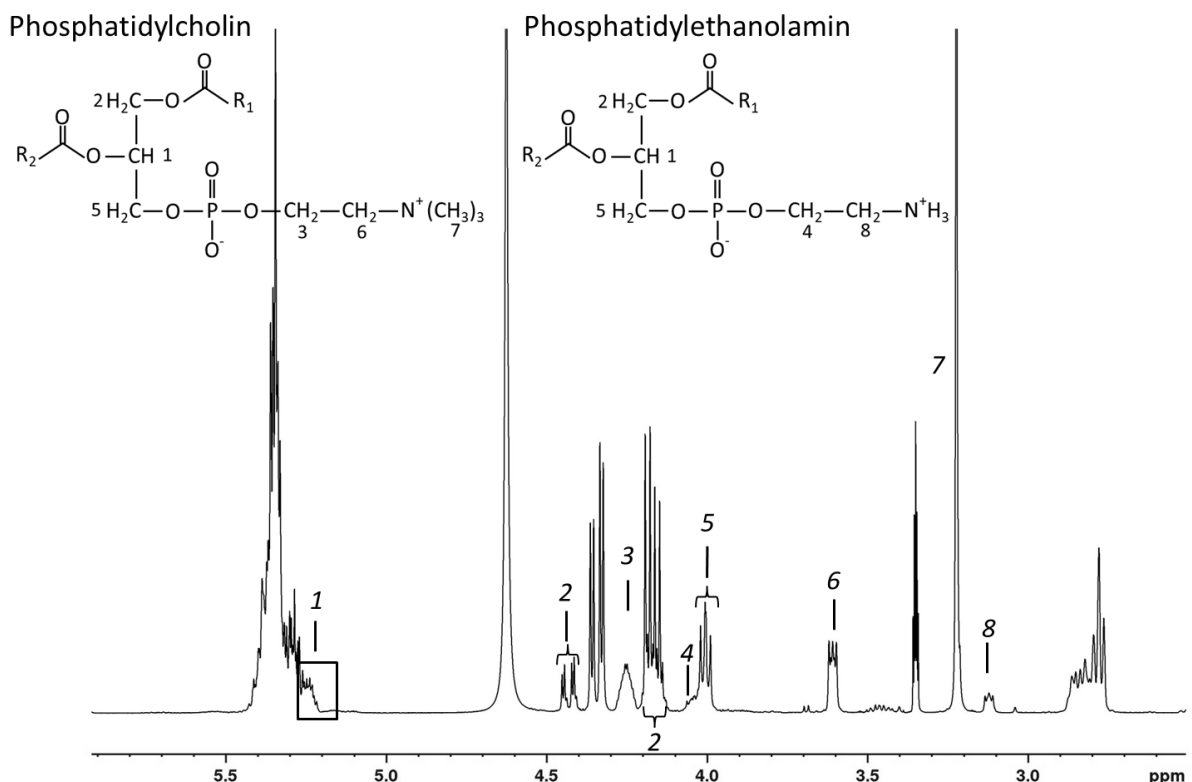
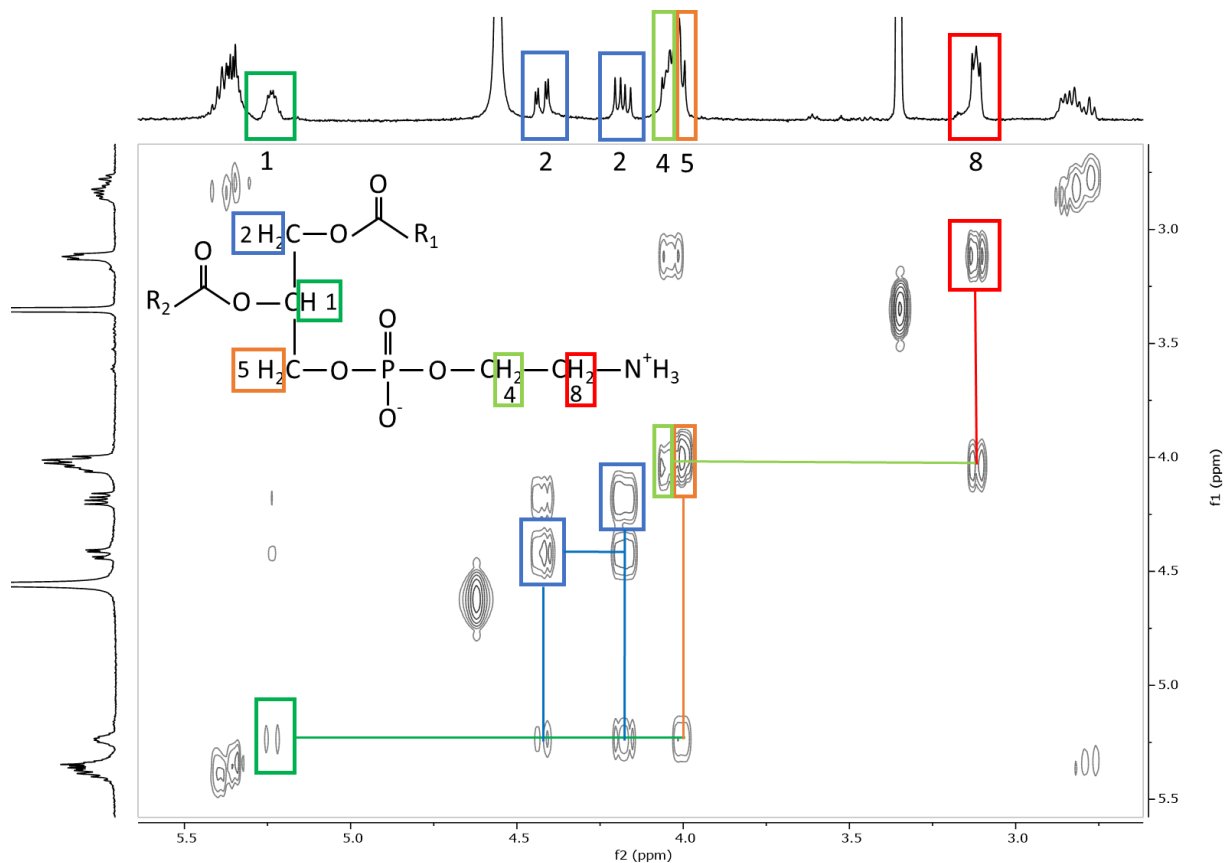


Abbildung 4-5: Ausschnitt eines 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrums einer Eifettprobe. Die Signale 1-8 wurden Phospholipiden zugeordnet. 1, 2 und 5 gehören zu den CH und  $\text{CH}_2$  Gruppen am Glyceringrundgerüst, die Signale 3,6 und 7 stammen von Phosphatidylcholin und die Signale 4 und 8 von Phosphatidylethanolamin



**Abbildung 4-6: Ausschnitt eines  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spektrums von Phosphatidylethanolamin mit Zuordnung der Signale zum Glycerinrundergüst und zum Ethanolaminrest**

Die  $^1\text{H}$  NMR liefert vor allem gut differenzierbare Signale für die Phosphorsäureester von PC und PE. Die anderen PL wie PI, SM, LPC und LPE haben den Nachteil, dass sie nur in geringen Konzentrationen im Eifett vorhanden sind und zudem Überlagerungen mit Signalen der FS und Fettkomponenten zeigen (s. Abbildung 4-1). Daher wird auf die Signale dieser PL bei der Interpretation des  $^1\text{H}$  NMR Spektrums nicht näher eingegangen.

Die  $^{31}\text{P}$  NMR bietet im Vergleich zur  $^1\text{H}$  NMR die Möglichkeit, die einzelnen PL Klassen getrennt voneinander zu analysieren. Der Vorteil zeigt sich vor allem darin, dass jedes PL bei entsprechenden Messeinstellungen nur ein einzelnes Singulettsignal liefert. Sothiros, Herslöf und Kenne war es bereits 1986 gelungen, verschiedene PL in einer kommerziell erhältlichen Eiphospholipidprobe mit Hilfe von hinzudotierten Standardsubstanzen zu identifizieren und anschließend quantitativ zu bestimmen (Sothiros et al., 1986). Auch konnten die PL-Zusammensetzungen in unterschiedlichen Lebensmitteln wie z.B. Milch (Andreotti et al., 2006; Garcia et al., 2012; Murgia et al., 2003), Speiseöl (Hatzakis et al., 2008; Spyros Apostolos & Dais Photis, 2000), Käse und Fisch (Kaffarnik et al., 2013) charakterisiert werden. Ein anderes weit verbreitetes Anwendungsgebiet der  $^{31}\text{P}$  NMR basierten PL Analytik ist die Untersuchung von Zellmembranen und deren Zusammensetzung in verschiedenen Gewebetypen. Im Jahr 2000 veröffentlichten Pearce und Komoroski eine Untersuchung über im Hirngewebe vorkommende PL mittels  $^{31}\text{P}$  NMR (John M Pearce & Komoroski, 2000). Dies zeigt, dass die  $^{31}\text{P}$  NMR mittlerweile eine etablierte Methode bei der Untersuchung von PL in verschiedenen Gewebearten ist.

Eine erste Zuordnung der  $^{31}\text{P}$  NMR Signale der PL im Eifett erfolgte anhand von Daten aus der Literatur. Der Nachteil an diesem Vorgehen ist, dass die PL Signale schon bei kleinsten

Veränderungen der Messtemperatur und des Lösungsmittels große Veränderungen der chemischen Verschiebungen aufweisen. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Literaturwerten ist daher mit Vorsicht zu behandeln. Lutz und Cozzone beschrieben die Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung ausführlich in ihren Publikationen über den Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung, der Wahl des Chelatbildners, der Temperatur, des pH-Wertes und der Konzentration der Messlösung auf die Signalform und die Signallage (Lutz & Cozzone, 2010a, 2010b, 2013). Eine genaue Beschreibung über die verschiedenen Einflüsse und die Optimierung der Messung sind in Kapitel 3.4 beschrieben. Das Lösungsmittelgemisch und die Messung wurden dahingehend optimiert, dass die Signale aller PL-Spezies im Spektrum de Eifettes getrennt voneinander vorliegen. Der Nachteil dieses optimierten Lösungsmittelgemisches ist der Chelatbildner, der eine Verwendung der Probe für die  $^1\text{H}$  NMR Messung ausschließt, da die  $^1\text{H}$  NMR Signale des Chelatbildners mit den Signalen der Fettkomponenten überlagern. Für die Identifizierung und Zuordnung der PL wurden Standardsubstanzen unter gleichen Bedingungen wie die zu untersuchende Probe gemessen. In Abbildung 4-7 ist die Zuordnung der Signale der im Standard-Mix enthaltenen PL zu den Signalen der im Eifett enthaltenen PL zu sehen. PC, PE, LPC, LPE, SM und PI konnten mit Hilfe des Standard-Mix identifiziert werden. Die genauen chemischen Verschiebungen der  $^{31}\text{P}$  Signale der PL sind in Tabelle 9-2 im Anhang 9.6.1 zu finden. Bei den Signalen von LPE, LPC und vor allem bei PI kommt es aufgrund der höheren Konzentration im Standard-Mix zu einer Verschiebung der Signale. Die Identität konnte durch Dotierungsversuche mit den Standardsubstanzen bestätigt werden. Die Konzentrations- bzw. Extraktabhängigkeit der chemischen Verschiebung wurde ebenfalls von Lutz und Cozzone beschrieben (Lutz & Cozzone, 2010a, 2010b). Auch ist zu beachten, dass die chemische Verschiebung von den veresterten FS beeinflusst wird. Je ungesättigter die FS sind, desto mehr wird das Signal in Richtung Hochfeld verschoben (J M Pearce & Komoroski, 1993; Schiller & Arnold, 2002). Der PI-Standard wurde aus Sojabohnen gewonnen und besitzt dadurch eine andere Fettsäurezusammensetzung als PI aus Eigelb, was zusätzlich zur unterschiedlichen Konzentration die chemische Verschiebung beeinflusst. Die anderen Standardsubstanzen wie PC, PE, LPC, LPE und SM wurden laut Zertifikat aus Eigelb extrahiert und sollten demnach ähnliche Fettsäurezusammensetzungen wie die untersuchten Eifettprobe aufweisen.

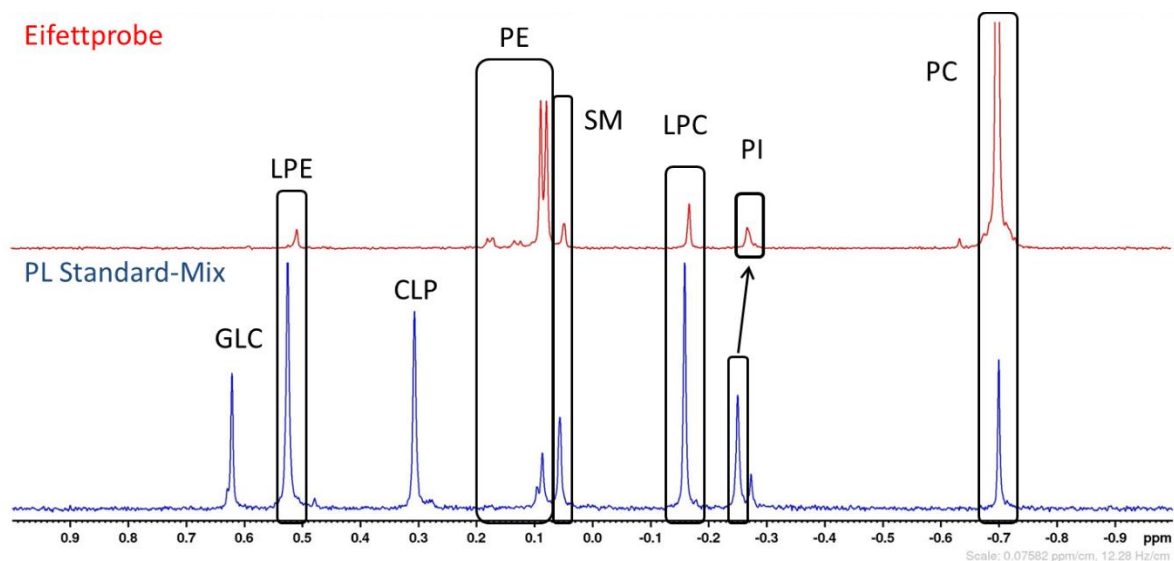


Abbildung 4-7: 400 MHz  $^{31}\text{P}$  NMR Spektrenvergleich einer Eifettprobe mit dem Phospholipid (PL) Standard-Mix für Signalzuordnungszwecke. Zuordnung der Phospholipide im Phospholipid Standard-Mix von links nach rechts: 1-(3-sn-Phosphatidyl)-rac Glycerin (GLC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Cardiolipin (CLP),

## **Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholin (PC)**

Auffällig unterschiedlich im Vergleich zum Standard ist das PE-Signal in der Eifettprobe. Dieses zeigt eine Aufspaltung in zwei Signale bei ca. 0,08 ppm und zwei weitere kleinere Signale, die tieffeldverschoben bei 0,125 und 0,171 ppm zu sehen sind. Bei einem genaueren Vergleich des Spektrums des PE-Standards mit dem PE-Signal der Eifettprobe (s. Anhang 9.6.3 Abbildung 9-6) sind die Signale und Aufspaltungsmuster in geringem Maße auch im Spektrum der Standardsubstanz zu erkennen. Die Aufspaltung der Signale kann ihren Ursprung in unterschiedlichen PE-Spezies haben, die mit verschiedenen FS verestert sind. Pearce und Komoroski fanden bei ihren Untersuchungen an unterschiedlichen PC-Spezies heraus, dass sowohl die Kettenlänge und der Sättigungsgrad als auch die Position der FS am Glyceringrundgerüst der PL einen Einfluss auf die chemische Verschiebung haben (J M Pearce & Komoroski, 1993). Der Unterschied des PE Standards zur Probe könnte an einer unterschiedlichen Extraktionsmethode liegen. Laut Zertifikat wurde der Standard aus Eigelb gewonnen, jedoch ohne genaue Angaben zur verwendeten Extraktionsmethode und zur bestehenden Fettsäureverteilung.<sup>3</sup>

### **4.1.4 Quantifizierung der Phospholipide mittels <sup>31</sup>P NMR**

Für die quantitative Bestimmung der PL im Eifett eignet sich die <sup>31</sup>P NMR gut, da der Anteil der PL am Gesamtfett mit ca. 30 % ausreichend hoch ist. Sotirhos, Herslöf und Kenne untersuchten verschiedene kommerziell erhältliche aus Hühnereier extrahierte PL-Proben mittels <sup>31</sup>P NMR. Sie fanden dabei überwiegend PC und PE, aber auch SM, LPC, LPE und geringe Mengen an Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CLP), die sie unter Verwendung eines internen Standards quantifizierten (Sotirhos et al., 1986). Bei der Identifizierung der PL in Kapitel 4.1.3 waren PC und PE die Haupt-PL in Eifett, daneben wurden LPC, LPE, SM und PI gefunden. PA und CLP konnten auch durch einen Vergleich mit Standardsubstanzen nicht identifiziert werden. Rhodes und Lea untersuchten 1957 mit chromatographischen Methoden das Eigelb auf den Phospholipidgehalt. Sie fanden dabei folgende Anteile: PC (72,8 %), PE (15 %), LPC (5,8 %), LPE (2,1 %), SM (2,5 %) und PI (0,6 %). Dies ist in guter Übereinstimmung mit anderen in der Literatur veröffentlichten Daten über Phospholipidgehalte in Eigelb, wobei die Anteile von PC und PE in den PL teilweise schwanken. Juneja untersuchte die Fettzusammensetzung von Eigelb mittels HPLC und fand dabei rund 80 % PC und ca. 11,9 % PE, daneben 1,9 % LPC und 1,9 % SM (Juneja, 1997). Palacios und Wang fanden in der Lecithinfraktion von Eigelb mittels HPLC-ELSD PC und PE in Anteilen von ca. 80 % und 20 % und geringere Mengen an PE und Plasmalogen (Palacios & Wang, 2005). Die Bestimmung der im Eifett vorkommenden PL erfolgte unter Verwendung eines internen und externen Standards und wird im Folgenden näher beschrieben.

#### **4.1.4.1 Quantifizierung der Phospholipide unter Anwendung eines internen Standards**

Für die Quantifizierung unter Verwendung eines internen Standards wurden zufällig 43 Proben aus dem vorhandenen Probenpool ausgewählt. Davon stammten 17 aus Bodenhaltung, 17 aus Biohaltung und 9 aus Freilandhaltung. Bezüglich der Herkunft wurden nur Proben aus Deutschland ausgewählt. Als interner Standard wurde GPC gewählt. GPC wurde bereits von

---

<sup>3</sup> Bei Untersuchungen von PE und PC im Rahmen einer Masterarbeit von D. Kahl konnte nach Auftrennung der PL mittels SPE gezeigt werden, dass PE im Eifett zu einem großen Anteil mit ungesättigten FS verestert vorliegt (Kahl, 2017).

Glonek und Meneses zur Quantifizierung von PL mittels  $^{31}\text{P}$  NMR verwendet (Meneses & Glonek, 1988). Das GPC-Signal zeigte keine Überlagerung mit anderen PL-Signalen (s. Anhang 9.6.1, Abbildung 9-4). Mit einer chemischen Verschiebung von -0,006 ppm liegt GPC genau zwischen SM und LPC. Eine geringe Distanz zwischen Standard und Analyt bringt bei der Messung den Vorteil mit sich, dass das Aufnahmezeitfenster kleiner gewählt werden kann, wodurch Messzeit gespart wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Offset des Anregungspulses, welches der Frequenzbereich ist, in dem der Puls eingestrahlt wird, zwischen Standard und Analyt liegt. Dadurch können off-resonance Effekte, die zu einer Abschwächung der Signale führen würden, vernachlässigt werden (Claridge, 2009).

Der interne Standard wurde in MeOD gelöst und der Probe als entsprechender MeOD-Anteil des Lösungsmittelgemisches hinzugefügt. Die Integration erfolgte mittels Integrationsvorlage in TopSpin, wodurch ein Fehlereintrag, der durch manuelle Integration entstehen kann, verhindert wird (Weber et al., 2015).

#### Formel 14

$$C_{Analyt} = \left( \frac{M_{Analyt}}{M_{Standard}} \right) * \left( \frac{n^{31}P_{Standard}}{n^{31}P_{Analyt}} \right) * \left( \frac{A_{Analyt}}{A_{Standard}} \right) * C_{Standard}$$

$C_{Analyt}$	Konzentration des Analyten in mg/mL
$C_{Standard}$	Konzentration des Standards (1,94 mg/mL)
$M_{Analyt}$	Molare Masse des Analyten in g/mol
$M_{Standard}$	Molare Masse des Standards (257,22 g/mol)
$n^{31}P_{Analyt}$	Anzahl $^{31}\text{P}$ Atome des Analyten, die für das Signal verantwortlich sind
$n^{31}P_{Standard}$	Anzahl $^{31}\text{P}$ Atome des Standards, die für das Signal verantwortlich sind
$A_{Analyt}$	Fläche des Analytsignals (absolutes Integral)
$A_{Standard}$	Fläche des Standardsignals (absolutes Integral)

Die Berechnung erfolgte nach Formel 11,  $M_{Analyt}$  bezeichnet die molare Masse des Analyten, die berechneten molaren Massen der PL sind im Anhang 9.6.2 in Tabelle 9-3 zu finden. Die Reinheit des internen Standards wurde mittels  $^1\text{H}$  NMR unter Verwendung eines CRM Standards (1,2,4,5-Tetrachlor-3-nitrobenzol) bestimmt und bei der Konzentrationsbestimmung entsprechend berücksichtigt. Aus den ermittelten Konzentrationen wurde der prozentuale Anteil der PL am Gesamtfett und die prozentualen Anteile der einzelnen PL am Gesamtphospholipidgehalt berechnet. Tabelle 4-3 zeigt eine Zusammenfassung der prozentualen PL-Anteile, die unter Verwendung des internen Standards berechnet wurden. Eine Darstellung der prozentualen PL-Anteile in Form eines Balkendiagramms ist im Anhang 9.6.5 in Abbildung 9-8 zu sehen. Die Mittelwerte der drei Haltungsgruppen Boden, Freiland und Bio unterscheiden sich nur geringfügig. PC ist mit ca. 74 % das PL, welches den größten Anteil ausmacht. Danach folgen PE mit 18-19 %, SM und PI mit jeweils rund 2,5 % und LPC mit 1,6 %. LPE weist mit durchschnittlich 0,8 % den geringsten Anteil auf. PC zeigt mit Werten zwischen 0,9-1,1 % den niedrigsten VK und damit die geringste Schwankung bei allen Haltungsgruppen. Das zeigt, dass der prozentuale Anteil von PC am PL-Anteil des Eifettes sehr konstant ist. Die anderen PL dagegen zeigen eine größere Schwankung unabhängig von ihrer Haltungsart. Die PL mit geringeren Anteilen wie LPC, LPE, SPM und PI haben höhere Variationskoeffizienten (VK), was an natürlichen Schwankungen, aber auch am S/N liegen kann. Bei kleineren Signalen wird durch ein schlechtes S/N die Integration erschwert, da die Grenze zwischen Signal und Rauschen nicht mehr eindeutig bestimmt werden kann. Dadurch kann es zu Über- oder Unterbestimmung der Analytkonzentration kommen. Durch die Verwendung einer manuellen statt einer automatischen Integrationsroutine, kann ein zu



großer Eintrag des Rauschens zum Analytsignal vermieden werden. Eine andere mögliche Lösung wäre, mehr Scans bei der Spektrenaufnahme zu verwenden, was allerdings in einer längeren Messzeit resultiert.

**Tabelle 4-3: Phospholipidanteile in Eifett bestimmt unter Verwendung eines internen Standards**

<b>Bodenhaltung</b>	<b>PC<sup>1</sup></b>	<b>PI<sup>1</sup></b>	<b>LPC<sup>1</sup></b>	<b>SM<sup>1</sup></b>	<b>PE<sup>1</sup></b>	<b>LPE<sup>1</sup></b>
Mittelwert [%]	74,3	2,5	1,6	2,5	18,3	0,8
Standardabweichung	0,8	0,2	0,2	0,2	0,9	0,1
Variationskoeffizient [%]	1,0	8,1	11,9	6,7	5,0	6,9
<b>Freilandhaltung</b>	<b>PC</b>	<b>PI</b>	<b>LPC</b>	<b>SM</b>	<b>PE</b>	<b>LPE</b>
Mittelwert [%]	73,9	2,4	1,5	2,5	19,0	0,8
Standardabweichung	0,7	0,1	0,1	0,1	0,9	0,1
Variationskoeffizient [%]	0,9	3,9	8,1	5,2	4,8	9,6
<b>Biologische Haltung</b>	<b>PC</b>	<b>PI</b>	<b>LPC</b>	<b>SM</b>	<b>PE</b>	<b>LPE</b>
Mittelwert [%]	74,6	2,4	1,7	2,6	17,9	0,8
Standardabweichung	0,8	0,2	0,3	0,3	1,3	0,1
Variationskoeffizient [%]	1,1	8,1	15,2	10,9	7,2	9,8

<sup>1</sup> Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylethanolamin (PE), Lysophosphatidylethanolamin (LPE)

In Tabelle 4-4 ist ein Vergleich der berechneten PL-Werte mit Literaturdaten dargestellt. Die Werte für PC, PE und SM zeigen gute Übereinstimmung mit den Daten von Rhodes und Lea und Zhao, Xiong und Curtis. Mittels <sup>31</sup>P NMR wurden für PC-Werte im Bereich von 73,9-75,9 %, für PE zwischen 17,9-20,1 % und für SM 2,5-3,1 % ermittelt. Die Werte von Rhodes und Lea und Zhao, Xiong und Curtis liegen bei PC mit 72,8 bzw. 71,1 % etwas unter den hier ermittelten PC-Anteilen. Jedoch liegen die Werte für PE und SM mit 15 bzw. 18,3 % und 2,5 bzw. 2,3 % sehr nahe an den ermittelten Werten für PE und SM von 17,9-20,1 % bzw. 2,5-3,1 % (Rhodes & Lea, 1957; Zhao et al., 2017). Juneja fand mittels HPLC-UV dagegen höhere Werte für PC und niedrigere für PE. Beide Lyso-PL, LPC und LPE, zeigen deutlich geringere Anteile im Vergleich zu den Daten von Rhodes und Lea mit 5,8 % für LPC und 2,1% für LPE. Die Werte stimmen jedoch mit den Daten von Juneja mit 1,9 % für LPC und den Werten von Zhao, Xiong und Curtis mit 1,1 % für LPE, gut überein. Der Wert für PI ist mit 2,1-2,8 % im Vergleich zu dem Wert von Rhodes und Lea von 0,6 %, relativ hoch, aber im Vergleich zu Zhao, Xiong und Curtis mit 4,0 % dagegen niedrig (Juneja, 1997; Rhodes & Lea, 1957; Zhao et al., 2017).

**Tabelle 4-4: Vergleich der Phospholipidanteile von Eifett mit Literaturdaten**

<b>Anteil Phospholipid [%]</b>	<b>Methode</b>			
	<sup>31</sup> P NMR	HPLC-UV <sup>1</sup>	LC <sup>2</sup>	HILIC**LC-MS/MS <sup>3</sup>
<b>Phosphatidylcholin</b>	73,9-75,9	80,8	72,8	71,1
<b>Phosphatidylethanolamin</b>	17,9-20,1	11,7	15	18,3
<b>Lysophosphatidylcholin</b>	1,4-2,0	1,9	5,8	3,3
<b>Sphingomyelin</b>	2,5-3,1	1,9	2,5	2,3
<b>Lysophosphatidylethanolamin</b>	0,7-0,9	-*	2,1	1,1
<b>Phosphatidylinositol</b>	2,1-2,8	-*	0,6	4,0

<sup>1</sup> Juneja, 1997

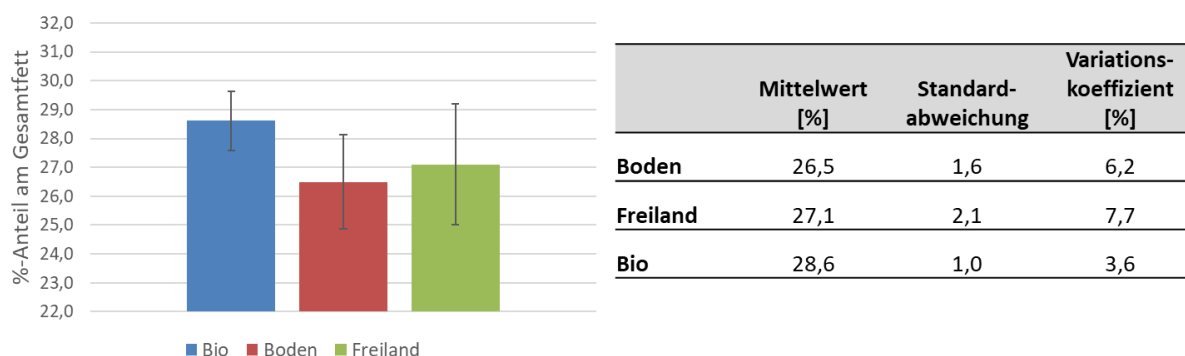
<sup>2</sup> präparative LC, Rhodes & Lea, 1957

<sup>3</sup> Zhao et al., 2017

\*3,7 % andere Lipide, die nicht genauer definiert wurden

\*\* hydrophilic interaction chromatography (HILIC)

Zur Bestimmung des PL-Anteils am Gesamtfett wurde der Gesamtphospholipidgehalt berechnet und auf die Fetteinwaage bezogen. In Abbildung 4-8 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der prozentualen PL-Fettanteile aufgegliedert nach unterschiedlichen Haltungsarten in einem Balkendiagramm dargestellt. Allgemein schwankt der PL-Anteil in Eifett von 26,5 % für Bodenhaltung bis 28,6 % für Eier aus biologischer Haltung. Blesso fand vergleichbare Werte für den PL-Anteil am Gesamtfett von 28 %, Juneja dagegen publizierte höhere Werte von 31 % (Blesso, 2015; Juneja, 1997). Der Mittelwert der PL-Anteile aus biologischen Proben liegt bei 28,6 % und damit höher als die PL-Anteile der Proben aus Boden- und Freilandhaltung mit Werten von 26,5 bzw. 27,1 %. Die PL-Anteile am Gesamtfett der biologischen Proben sind signifikant höher als die PL-Anteile am Gesamtfett von Proben aus Boden- und Freilandhaltung. Bei einem Vergleich der beiden konventionellen Haltungsarten zeigt sich kein signifikanter Unterschied der PL-Anteile am Gesamtfett. Da die Extraktionsmethode für alle die gleiche ist, kann eine Diskriminierung aufgrund der Aufarbeitung ausgeschlossen werden. Auch wurde bei der Extraktion der Proben darauf geachtet, dass Proben unterschiedlicher Haltungsart in einer Serie aufgearbeitet wurden. Die geringe Probenzahl von lediglich 9 Proben aus Freilandhaltung verringert die Aussagekraft über diese Gruppe deutlich.



**Abbildung 4-8:** Das Diagramm links zeigt, die Verteilung des prozentualen Phospholipidanteils am Gesamtfett, bestimmt unter Verwendung eines internen Standards, bezogen auf die Haltungsart. Der blaue Balken zeigt die berechneten Mittelwerte mit Standardabweichung der Eier aus biologischer Haltung, rot aus Bodenhaltung und grün aus Freilandhaltung. In der Tabelle rechts sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten des Phospholipidanteils am Gesamtfett der verschiedenen Haltungsarten dargestellt

#### 4.1.4.2 Quantifizierung der Phospholipide unter Anwendung eines externen Standards

Für die Quantifizierung der PL unter Anwendung eines externen Standards wurden die gleichen Proben, die bereits unter Verwendung eines internen Standards analysiert wurden, verwendet. Dadurch ist es möglich die Proben mit beiden Quantifizierungsarten zu analysieren und die Ergebnisse zu vergleichen. Die externe Standardlösung besteht aus einer Mischung aus GPC und PC gelöst im <sup>31</sup>P NMR Lösungsmittelgemisch. PC wurde in diesem Gemisch für die Referenzierung der chemischen Verschiebung und GPC für die Quantifizierung verwendet. Aus Kostengründen wurde auf einen Quantifizierungsstandard, der alle im Eifett enthaltenen PL enthält, verzichtet.

Die Integration erfolgte wie bereits beim internen Standard mittels Integrationsvorlage in TopSpin.

**Formel 15**

$$R_{Standard} = \frac{n^{31}P_{Standard} * C_{Standard}}{A_{Standard} * M_{Standard}}$$

$$C_{Analyt} = R_{Standard} * \left( \frac{M_{Analyt} * A_{Analyt}}{n^{31}P_{Analyt}} \right)$$

$R_{Standard}$	$^{31}P$ Konzentration pro Integraleinheit
$C_{Standard}$	Konzentration des Standards (1,94 mg/mL)
$C_{Analyt}$	Konzentration des Analyten in mg/mL
$M_{Analyt}$	Molare Masse des Analyten in g/mol
$M_{Standard}$	Molare Masse des Standards (257,22 g/mol)
$n^{31}P_{Analyt}$	Anzahl $^{31}P$ Atome des Analyten, die für das Signal verantwortlich sind
$n^{31}P_{Standard}$	Anzahl $^{31}P$ Atome des Standards, die für das Signal verantwortlich sind
$A_{Analyt}$	Fläche des Analytsignals (absolutes Integral)
$A_{Standard}$	Fläche des Standardsignals (absolutes Integral)

Für die Berechnung der Analytkonzentration ( $C_{Analyt}$ ) unter Verwendung des externen Standards wurde die Formel 12 angewendet. Die Reinheit des externen Standards wurde wie zuvor beim internen Standard in die Konzentration miteinberechnet. Der Unterschied bei der Berechnung der Konzentration bei Verwendung eines internen oder externen Standards besteht lediglich darin, dass für den externen Standard die  $^{31}P$  Konzentration pro Integraleinheit (R) berechnet wird. Dieser wird für jede Messserie einmal berechnet und wird dann als Faktor R für die komplette Serie zur Berechnung der Analytkonzentration eingesetzt.

Aus den berechneten Konzentrationen wurden der prozentuale Anteil der PL am Gesamtfett und die prozentualen Anteile der einzelnen PL am Gesamthospholipidgehalt ermittelt. Die PL-Anteile am Gesamthospholipidgehalt sind in Tabelle 4-5 zu sehen. Das zugehörige Balkendiagramm ist in Abbildung 9-9, Anhang 9.6.5 dargestellt. Der Vergleich der berechneten PL-Anteile zeigt nur minimale Unterschiede zu den PL-Anteilen, die unter Verwendung des internen Standards ermittelt wurden. Der Unterschied zeigt sich v.a. bei unterschiedlichen VK.

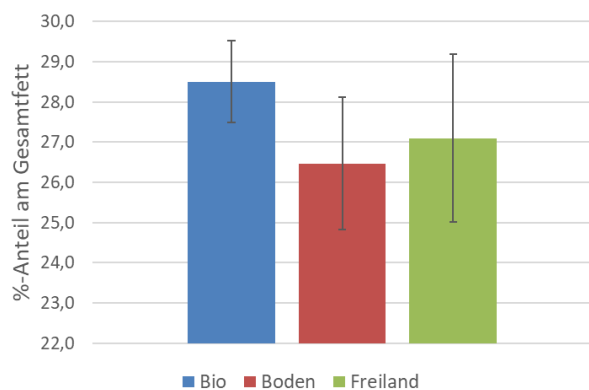
**Tabelle 4-5: Phospholipidanteile in Eifett, bestimmt unter Verwendung eines externen Standards**

<b>Bodenhaltung</b>	<b>PC<sup>1</sup></b>	<b>PI<sup>1</sup></b>	<b>LPC<sup>1</sup></b>	<b>SPM<sup>1</sup></b>	<b>PE<sup>1</sup></b>	<b>LPE<sup>1</sup></b>
Mittelwert [%]	74,3	2,5	1,6	2,5	18,3	0,8
Standardabweichung	0,8	0,2	0,2	0,2	0,9	0,1
Variationskoeffizient [%]	1,1	8,4	12,0	6,5	5,0	8,2
<b>Freilandhaltung</b>	<b>PC</b>	<b>PI</b>	<b>LPC</b>	<b>SPM</b>	<b>PE</b>	<b>LPE</b>
Mittelwert [%]	73,9	2,4	1,5	2,5	19,0	0,8
Standardabweichung	0,7	0,1	0,1	0,1	0,9	0,1
Variationskoeffizient [%]	0,9	3,9	8,1	5,2	4,8	8,9
<b>Biologische Haltung</b>	<b>PC</b>	<b>PI</b>	<b>LPC</b>	<b>SPM</b>	<b>PE</b>	<b>LPE</b>
Mittelwert [%]	74,6	2,4	1,7	2,6	17,9	0,8
Standardabweichung	0,8	0,2	0,3	0,3	1,3	0,1

Variationskoeffizient [%]	1,1	8,1	15,3	10,9	7,2	9,8
---------------------------	-----	-----	------	------	-----	-----

<sup>1</sup> Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylethanolamin (PE), Lysophosphatidylethanolamin (LPE)

Abbildung 4-9 zeigt in einem Balkendiagramm die Mittelwerte und die Standardabweichungen des prozentualen Anteils der PL am Gesamtfett, der Proben aus biologischer Haltung, der Bodenhaltung und der Freilandhaltung. Wie bereits bei der Bestimmung der PL-Anteile am Gesamtfett unter Verwendung eines internen Standards fällt auf, dass die Mittelwerte der Proben aus den beiden konventionellen Haltungsarten um ca. 2 % unter dem Mittelwert der Proben aus biologischer Haltung liegen. Bei einem Vergleich des PL-Anteils am Gesamtfett der biologischen Proben mit den entsprechenden Daten der Proben aus den beiden konventionellen Haltungen mittels T-Test zeigt sich, dass die PL-Anteile am Gesamtfett der konventionellen Proben signifikant niedriger sind. Der VK bei den Proben aus Boden- und Freilandhaltung ist deutlich höher als bei den Proben aus biologischer Haltung, was auf eine stärkere Variation in der Haltung bzw. des Futters bei diesen beiden Haltungsarten hindeutet. In der Literatur wurden keine Hinweise dafür gefunden, dass es bei unterschiedlicher Haltung oder Fütterung zu unterschiedlichen Anteilen an PL am Gesamtfett kommt.



	Mittelwert [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
<b>Boden</b>	26,5	1,6	6,2
<b>Freiland</b>	27,1	2,1	7,7
<b>Bio</b>	28,5	1,0	3,6

**Abbildung 4-9: Prozentuale Anteil der Phospholipide am Gesamtfett, bestimmt unter Anwendung eines externen Standards, bezogen auf die Haltungsart. Der blaue Balken zeigt den berechneten Mittelwert mit Standardabweichung der Eier aus biologischer Haltung, rot aus Bodenhaltung und grün aus Freilandhaltung**

#### 4.1.4.3 Vergleich der beiden Methoden zur Quantifizierung von Phospholipiden

Da die gleichen Proben unter Verwendung eines internen und externen Standards berechnet wurden, können die verschieden bestimmten Ergebnisse der Anteile der einzelnen PL am Gesamtpospholipidgehalt miteinander verglichen werden. In den Tabellen 4-3 und 4-5 sind die prozentualen Anteile der PL, die unter Verwendung eines internen bzw. eines externen Standards bestimmt wurden, dargestellt. Beide Quantifizierungsmethoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Zu bemerken ist, dass gleiche Mittelwerte und Standardabweichungen aus Tabelle 4-3 und 4-5 zu unterschiedlichen VKs führen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Werte gerundet auf die erste Nachkommastelle angegeben wurden. Da sich die Standardabweichungen aber in der zweiten und dritten Nachkommastelle unterscheiden ist dies im VK ersichtlich.

Bei dem VK zeigen sich Unterschiede v.a. bei LPE bei den Proben aus Bodenhaltung und Freilandhaltung. So ist der VK von LPE bei den Proben aus Bodenhaltung unter Verwendung des externen Standards um 1 % höher als bei Verwendung des internen Standards. Umgekehrt ist es

bei den VKs von LPE bei den Proben aus Freilandhaltung. Hier liegt der VK bei Verwendung des internen Standards bei 9,6 % und unter Verwendung des externen Standards bei 8,9 %.

In der Literatur zeigen sich beide Methoden als ebenbürtig. Cullen, Ray und Szabo verglichen verschiedene Quantifizierungsmethoden wie interner, externer Standard und ERETIC miteinander und kamen zum Schluss, dass alle Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Die größte Variabilität kann auf die Vorbereitung der Proben und der Standards sowie auf die Präzision der Messung zurückgeführt werden. Die Methode des externen Standards und das ERETIC-Verfahren zeigen größere Schwankungen als die Methode des internen Standards (Cullen et al., 2013). Ein weiterer Fehler kann durch die NMR Röhren bei der Quantifizierung unter Anwendung eines externen Standards entstehen. Durch eine unterschiedliche Röhrendicke und Innendurchmesser kommt es zu unterschiedlichen Füllhöhen und dadurch zu unterschiedlichen Konzentrationen in der aktiven Messregion, was zu Über- oder Unterbestimmungen in unterschiedlichen Röhrentypen führen kann. Wider und Dreier, sowie Burton, Quilliam und Walter berichten über einen Fehler von  $\pm 1$  %, der bei der Verwendung von Röhren gleichen Fabrikats auftreten kann (Burton et al., 2005; Wider & Dreier, 2006).

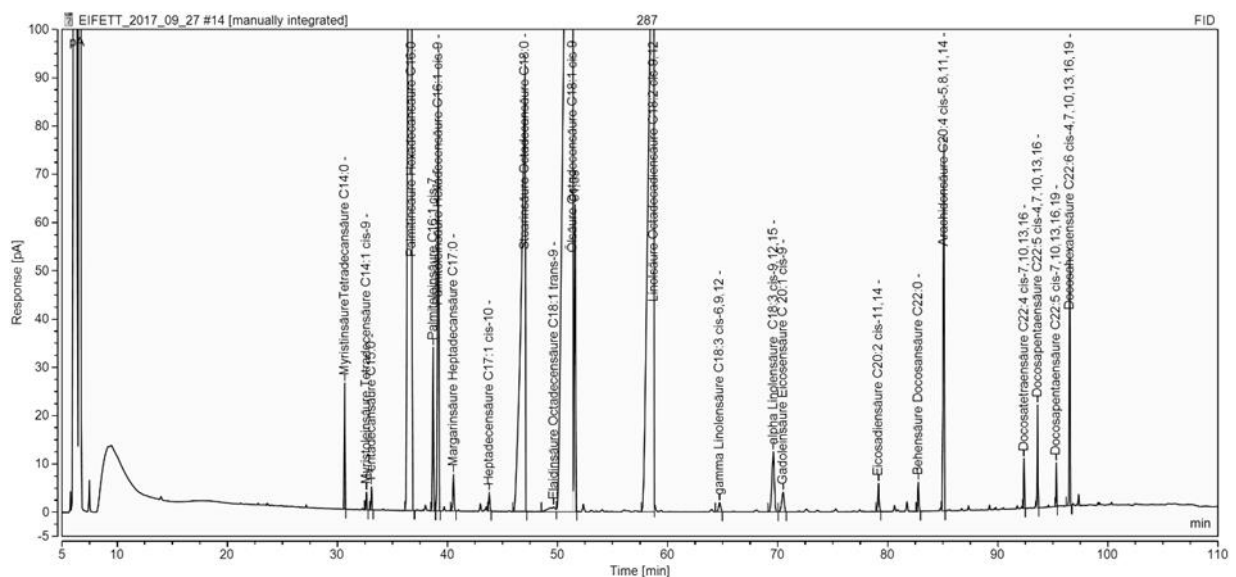
Beim Vergleich des PL-Anteils bezogen auf das Gesamtfett kommen beide Methoden zum gleichen Ergebnis. Die ermittelten Werte der Proben aus biologischer Haltung sind signifikant höher als die Werte der Proben aus konventioneller Haltung. So liegen die Mittelwerte der Proben aus biologischer Haltung, die unter Anwendung eines internen bzw. externen Standards bestimmt wurden bei 28,6 bzw. 28,5 % und der VK beider Methoden bei 3,6 % (s. Abbildung 4-8 und 4-9). Demnach kommen beide Quantifizierungsmethoden zu demselben Ergebnis und sind für diese Art der Untersuchung als gleichwertig zu erachten.

#### **4.1.5 Analyse der Fettsäurezusammensetzung im Eifett mittels GC-FID**

Die Zuordnung der FSME-Peaks erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen. Diese wurden mit jeder Messserie als separate Standardlösungen (Omega-Test und Butter-/Margarinetest) mitanalysiert. Die Chromatogramme der beiden Standardtests sind im Anhang (Abbildung 9-11 (Butter/Margarine-Test) und 9-12 (Omega-Test)) zu finden. Die Peakzuordnung der einzelnen FSME und deren jeweilige Retentionszeiten befinden sich im Anhang (Tabelle 9-4 und 9-5). In Abbildung 4-10 ist ein Chromatogramm der FSME einer Eifettprobe dargestellt. Ein Vergleich der Retentionszeiten der FSME der Eifettprobe mit den Retentionszeiten der Standardsubstanzen befinden sich im Anhang (Tabelle 9-6). Bei einigen FS erfolgte eine zusätzliche Absicherung durch GC-MS und einen Abgleich mit der Literatur. Mit dieser Methode konnten die Palmitoleinsäure (C16:1  $\Delta$ -7), die Vaccensäure (C18:1  $\Delta$ -11), die Docosatetraensäure (C22:4  $\Delta$ -7,10,13,16) und die Docosapentaensäure (C22:5  $\Delta$ -4,7,10,13,16) zugeordnet und verifiziert werden (Brendel, 2016). Die FSME werden der Einfachheit halber im Folgenden mit den Namen der entsprechenden FS bezeichnet. Insgesamt konnten 23 verschiedene FS im Eifett identifiziert werden.

Als Qualitätskontrollprobe oder auch R-Probe wurde eine Packung Eier aus Freilandhaltung bestehend aus insgesamt 10 Eiern verwendet. Diese wurden, wie in Kapitel 8.2 beschrieben, bis einschließlich der Gefrier Trocknung aufgearbeitet und im Tiefkühlschrank bei -20° Celsius gelagert. Durch die R-Probe wurde die Aufarbeitung und Messung der Eifettproben einer ständigen Qualitätskontrolle unterzogen. Die Aufarbeitung der R-Proben erfolgte mit verschiedenen Proben in einer Serie, die aus jeweils 10-20 Proben bestand. Zudem konnte die Reproduzierbarkeit der Methode mit Hilfe der R-Probe gezeigt werden. Diese wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen fünf Mal aufgearbeitet und vermessen. Die Ergebnisse dieser

Überprüfung sind im Anhang (Tabelle 9-7) dargestellt. Der VK zeigt, dass die Streuung bei den meisten FS unter 5 % liegt und die Methode somit als reproduzierbar angesehen werden kann. Eine Ausnahme ist die Myristoleinsäure (C14:1  $\Delta$ -5) mit einem VK von 6,6 %. Der prozentuale Anteil der Myristoleinsäure an den Gesamtfettsäuren ist mit 0,07 % sehr gering, daher wirken sich bereits kleine Unterschiede, beispielsweise verursacht durch die Probenaufarbeitung, sehr stark auf den VK aus. Bei einem Vergleich der R-Proben, die an insgesamt acht unterschiedlichen Tagen mit verschiedenen Proben in einer Serie aufgearbeitet und vermessen wurden, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (s. Tabelle 9-8), mit Ausnahme der Myristoleinsäure, der  $\gamma$ -Linolensäure und DHA. Diese zeigen die größten Schwankungen, die auf ihre geringen Anteile zurückgeführt werden können.



**Abbildung 4-10: Chromatogramm der Fettsäuremethylester einer Eifettprobe mit Zuordnung zu den jeweiligen Fettsäuren**

Insgesamt wurden die Eifettzusammensetzungen von 314 Eifettproben mittels GC-FID analysiert. Davon waren 102 Proben aus biologischer Haltung, 152 Proben aus Bodenhaltung und 60 Proben aus Freilandhaltung. Von den drei untersuchten Haltungssystemen wurden jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und der VK für die verschiedenen FS berechnet. In Tabelle 4-6 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die Ölsäure ist mit ca. 40 % die FS, die den größten Anteil ausmacht. Danach folgt die Palmitinsäure mit rund 25 % und die Linolsäure mit ca. 18 %. Von den gesättigten FS ist die Stearinsäure mit einem Anteil von 8,5 % zu nennen. Mit einem vergleichsweise hohen Anteil von ca. 2 % ist die Arachidonsäure vertreten. Auch erwähnenswert sind die Anteile der beiden  $\omega$ -3 FS,  $\alpha$ -Linolensäure und DHA mit jeweils rund 1 %. Die bestimmten Anteile stimmen gut mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Cherian, Holsonbake und Goeger (Cherian et al., 2002) und Oliveira und Mitarbeiter (Oliveira et al., 2010) überein (s. Tabelle 9-9). Die FS mit geringeren Anteilen sind größeren Schwankungen unterworfen, was sich deutlich an ihrem VK zeigt. Dies kann auch bei allen Haltungssystemen in gleichem Maße beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet die Linolsäure, die trotz eines hohen Anteils an den Gesamtfettsäuren einen vergleichsweise hohen VK aufweist. Dies zeigt, dass die Anteile dieser FS innerhalb einer Haltungssysteme sehr schwanken können. Das kann auf eine unterschiedliche Fütterung innerhalb einer Haltungssysteme, aber auch auf das Alter der Legehennen zurückgeführt werden. Mine zeigte in einer Studie, dass bei Eiern von jungen Legehennen der Anteil an MUFS signifikant höher ist als bei älteren Legehennen (Mine, 2008).

Tabelle 4-6: Prozentuale Anteile der Fettsäuren im Eifett von Eiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen

Fettsäuren	Bio <sup>1</sup> [%]	Std <sup>2</sup>	VK <sup>2</sup> [%]	Boden <sup>1</sup> [%]	Std	VK [%]	Frei- land <sup>1</sup> [%]	Std	VK [%]
Myristinsäure C14:0	<b>0,29</b>	±0,03	10,74	<b>0,33</b>	±0,05	16,57	<b>0,33</b>	0,07	21,58
Myristoleinsäure C14:1 Δ-5	<b>0,05</b>	±0,01	29,26	<b>0,06</b>	±0,02	30,64	<b>0,06</b>	0,02	30,71
Pentadecansäure C15:0	<b>0,08</b>	±0,01	14,82	<b>0,07</b>	±0,01	14,45	<b>0,08</b>	±0,01	13,88
Palmitinsäure C16:0	<b>23,84</b>	±1,02	4,29	<b>25,04</b>	±1,13	4,51	<b>24,84</b>	±1,06	4,25
Palmitoleinsäure C16:1 Δ-7	<b>0,84</b>	±0,16	19,42	<b>0,70</b>	±0,14	20,29	<b>0,74</b>	±0,13	17,66
Palmitoleinsäure C16:1 Δ-9	<b>2,39</b>	±0,46	19,46	<b>2,69</b>	±0,53	19,58	<b>2,67</b>	±0,50	18,54
Margarinsäure C17:0	<b>0,21</b>	±0,03	12,13	<b>0,19</b>	±0,03	15,14	<b>0,20</b>	±0,03	15,93
Heptadecensäure C17:1 Δ-9	<b>0,11</b>	±0,01	9,93	<b>0,11</b>	±0,02	21,94	<b>0,12</b>	±0,03	24,16
Stearinsäure C18:0	<b>7,85</b>	±0,60	7,59	<b>8,54</b>	±0,75	8,75	<b>8,35</b>	±0,74	8,82
Elaidinsäure C18:1 trans Δ-9	<b>0,12</b>	±0,02	15,64	<b>0,16</b>	±0,03	16,77	<b>0,15</b>	±0,03	20,03
Ölsäure C18:1 Δ-9	<b>39,36</b>	±3,44	8,73	<b>39,14</b>	±2,53	6,45	<b>38,33</b>	±3,13	8,18
Vaccensäure C18:1 Δ- 11	<b>1,60</b>	±0,19	11,95	<b>1,83</b>	±0,23	12,61	<b>1,87</b>	±0,35	18,75
Linolsäure C18:2 Δ- 9,12 (ω-6)	<b>18,19</b>	±3,04	16,71	<b>16,50</b>	±2,76	16,75	<b>17,36</b>	±3,08	17,74
γ-Linolensäure C18:3 Δ-6,9,12 (ω-6)	<b>0,11</b>	±0,02	15,25	<b>0,10</b>	±0,02	16,69	<b>0,11</b>	±0,02	18,76
α-Linolensäure C18:3 Δ-9,12,15 (ω-3)	<b>0,92</b>	±0,30	32,16	<b>0,69</b>	±0,26	38,39	<b>0,76</b>	±0,31	40,85
Gadoleinsäure C 20:1 Δ-9	<b>0,23</b>	±0,02	10,55	<b>0,24</b>	±0,03	11,84	<b>0,23</b>	±0,03	12,08
Eicosadiensäure C20:2 Δ-11,14 (ω-6)	<b>0,20</b>	±0,05	23,51	<b>0,17</b>	±0,03	19,71	<b>0,18</b>	±0,04	23,08
Behensäure C22:0	<b>0,17</b>	±0,02	11,30	<b>0,17</b>	±0,03	15,10	<b>0,16</b>	±0,03	19,95
Arachidonsäure C20:4 Δ-5,8,11,14 (ω-6)	<b>1,89</b>	±0,21	11,26	<b>1,87</b>	±0,22	11,60	<b>1,93</b>	±0,30	15,60
Docosatetraensäure C22:4 Δ-7,10,13,16 (ω-6)	<b>0,16</b>	±0,03	18,88	<b>0,15</b>	±0,02	16,63	<b>0,16</b>	±0,03	19,08
Docosapentaensäure C22:5 Δ-4,7,10,13,16 (ω-6)	<b>0,26</b>	±0,09	34,75	<b>0,32</b>	±0,11	35,76	<b>0,34</b>	±0,13	40,20
Docosapentaensäure C22:5 Δ-7,10,13,16,19 (ω-3)	<b>0,15</b>	±0,04	27,27	<b>0,11</b>	±0,03	29,35	<b>0,13</b>	±0,04	28,92
Docosahexaensäure (DHA) C22:6 Δ - 4,7,10,13,16,19 (ω-3)	<b>0,99</b>	±0,21	21,11	<b>0,82</b>	±0,23	28,21	<b>0,87</b>	±0,24	27,81
	Bio <sup>1</sup> [%]	Std <sup>2</sup>	VK <sup>2</sup> [%]	Boden <sup>1</sup> [%]	Std	VK [%]	Frei- land <sup>1</sup> [%]	Std	VK [%]
ω -6 <sup>3</sup>	<b>20,38</b>	±3,14	15,39	<b>18,62</b>	±2,81	15,06	<b>19,59</b>	±3,15	16,05
ω -3 <sup>4</sup>	<b>2,17</b>	±0,42	19,29	<b>1,83</b>	±0,37	20,12	<b>1,97</b>	±0,45	23,00
ω -6/ ω -3	<b>9,57</b>	±1,62	16,87	<b>10,43</b>	±1,94	18,63	<b>10,27</b>	±1,96	19,09

<sup>1</sup>Proben aus biologischer Haltung (Bio), Proben aus Bodenhaltung (Boden), Proben aus Freilandhaltung (Freiland)

<sup>2</sup>Standardabweichung (Std), Variationskoeffizient (VK)

<sup>3</sup>ω-6: Summe aus Linolsäure, Arachidonsäure, Docosatetraensäure und Docosapentaensäure (C22:5 Δ-4,7,10,13,16)

<sup>4</sup>ω-3: Summe aus α-Linolensäure, Docosapentaensäure (C22:5 Δ-7,10,13,16,19) und DHA

Der Anteil an ω-6 FS beruht auf der Summe der Linolsäure, der Arachidonsäure, der Docosatetraensäure und der Docosapentaensäure (C22:5 Δ-4,7,10,13,16). Der ω-3 FS Anteil besteht aus der Summe von α-Linolensäure, Docosapentaensäure (C22:5 Δ-7,10,13,16,19) und DHA. Das ω-6/ω-3-Verhältnis war vergleichbar und lag für alle drei Haltungsgruppen zwischen 9-11. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den von Oliveira und Mitarbeiter veröffentlichten Werte von 11,67 und 11,97, die sie bei einer Zugabe von Sojaöl zum Futter fanden. In ihrer Studie untersuchten sie den Einfluss des Hennenalters und verschiedener Futtermittelzusätzen wie Sojaöl, Sonnenblumenöl und Leinsamenöl auf das ω-6/ω-3-Verhältnis. Für die Berechnung des Gesamt-ω-6 Anteils verwendeten sie Linolsäure, γ-Linolensäure und Arachidonsäure. Den Gesamt-ω-3 Anteil berechneten sie aus Stearidonsäure (C18:4 Δ-6,9,12,15), Eicosatriensäure (C20:3 Δ-11,14,17), Eicosapentaensäure (C20:5 Δ-5,8,11,14,17), Docosapentaensäure (C22:5 Δ-7,10,13,16,19) und DHA. Zudem zeigten sie, dass mit zunehmendem Alter der Hennen das Verhältnis größer wird, da der ω-6 Anteil, welcher zum größten Teil von der Linolsäure abhängt, zunimmt. Des Weiteren konnten sie in ihrer Studie zeigen, dass durch eine spezielle Fütterung mit Leinöl der Wert auf ~ 2 unabhängig vom Alter gesenkt werden kann (Oliveira et al., 2010). Cherian, Holsonbake und Goeger fanden dagegen deutlich höhere Werte von bis zu 27,3 für das ω-6/ ω-3-Verhältnis. Allerdings wurde als ω-3 FS lediglich DHA berücksichtigt, wodurch die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind (Cherian et al., 2002).

## **4.2 Unterscheidung von biologisch und konventionell erzeugten Hühnereiern**

### **4.2.1 Analyse der Phospholipidverteilung/-anteile und der Fettsäureverteilung mit Hinblick auf Haltungsdifferenzierung**

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Phospholipidverteilung und deren Anteile mittels <sup>31</sup>P NMR wurden ausführlich in Kapitel 4.1.4 beschrieben. Bei einem Vergleich mit Literaturwerten (s. Tabelle 4-4) konnten keine großen Unterschiede der PL-Anteile bezogen auf den Gesamtphospholipidgehalt festgestellt werden. In Tabelle 4-3 und 4-5 sind die PL-Anteile der einzelnen PL bezogen auf den Gesamtphospholipidgehalt, die unter Verwendung eines internen bzw. externen Standards bestimmt wurden, dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der PL-anteile zwischen den drei Haltungsgruppen. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen von Kivini und Mitarbeiter, die in ihrer Studie den Einfluss der Zugabe von pflanzlichen Ölen und Fischöl zum Futter untersuchten. Sie stellten eine Änderung der Fettsäurezusammensetzung fest, jedoch keinen Einfluss auf die PL-Anteile (Kivini et al., 2004).

In Abbildung 4-8 und 4-9 sind die Gesamtphospholipidanteile bezogen auf den Gesamtfettgehalt dargestellt. Beide angewendeten Bestimmungsmethoden kamen zum gleichen Ergebnis – der PL-Anteil der biologischen Proben ist im Schnitt um 2 % höher als bei den Proben aus Bodenhaltung. Die Proben aus Freilandhaltung liegen mit ihren PL-Anteilen jeweils zwischen den Werten der biologischen Proben und den Proben aus Bodenhaltung. Auffällig ist, dass die Schwankungen innerhalb einer Gruppe bei den biologischen Proben deutlich geringer sind als bei den beiden konventionellen Haltungsgruppen. In der Literatur gibt es keine Vergleiche bezüglich der Anteile

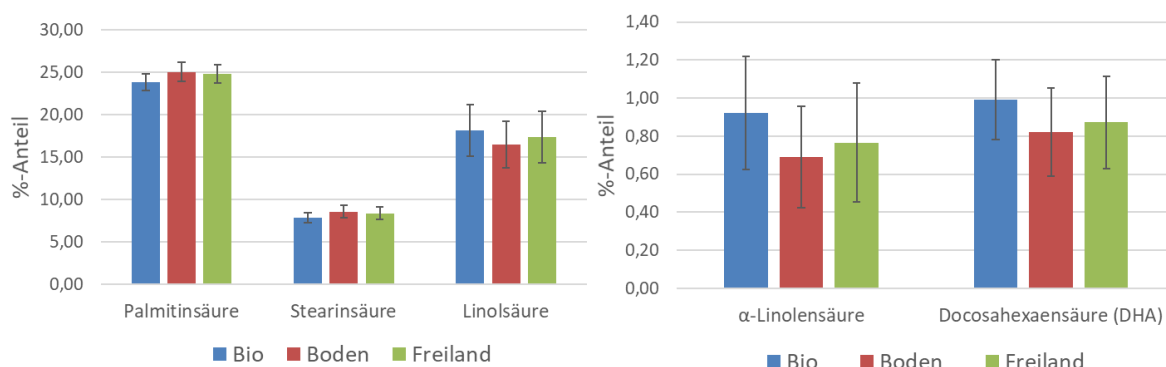


der PL am Gesamtfett bei unterschiedlichen Fütterungs- und/oder Haltungsarten. Es wird lediglich auf die Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung in den TAG und PL eingegangen (Campos et al., 2016; Ginzberg et al., 2010; Gladkowski et al., 2011). Bei der Untersuchung des Gesamtfettgehaltes bei unterschiedlichen Fütterungen fanden Cherian und Quezada in ihrer Studie keine Unterschiede (Cherian & Quezada, 2016).

## Fettsäureverteilung

Dass sich die Fettsäurezusammensetzung des Eifettes durch die Fütterung beeinflussen lässt, ist schon länger bekannt. Erste Literatur darüber gab es bereits 1912 von McCollum, Halpin und Drescher, die die Synthese von Lecithin in der Legehennen untersuchten und dabei unterschiedliche Fettsäurezusammensetzungen in Abhängigkeit des Futters beobachteten (McCollum et al., 1912).

In der folgenden Untersuchung wurden die prozentualen FS-Anteile von insgesamt 314 untersuchten Eifettproben mit Hinblick auf die unterschiedlichen Haltungssysteme (Bio, Boden, Freiland) ausgewertet. In Abbildung 4-11 sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Palmitinsäure, der Stearinsäure, der Linolsäure, der  $\alpha$ -Linolensäure und DHA aller Bio-, Boden- und Freilandhaltungsproben in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Mittelwerte der Anteile an Palmitinsäure, Stearinsäure, Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure und DHA zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Haltungsgruppen. Bei den beiden gesättigten FS Palmitinsäure und Stearinsäure liegt der Mittelwert der Proben aus biologischer Haltung bei 23,84 % bzw. 7,85 %, wohingegen die Werte der Proben für Bodenhaltung bei 25,04 % bzw. 8,54 % und für Freilandhaltung bei 24,84 % bzw. 8,35 % liegen. Für die Proben der beiden konventionellen Haltungsarten liegen die ermittelten Anteile für Palmitinsäure und Stearinsäure signifikant über den Anteilen der Proben aus biologischer Haltung. Umgekehrt verhält es sich bei der Linolsäure, der  $\alpha$ -Linolensäure und DHA. Bei diesen FS liegen die Mittelwerte der Proben aus biologischer Haltung bei 18,19 % für die Linolsäure, 0,92 % für  $\alpha$ -Linolensäure und 0,99 % für DHA. Bei den Proben aus Bodenhaltung liegt der Mittelwert der Linolsäure bei 16,50 %, für  $\alpha$ -Linolensäure bei 0,69 % und für DHA bei 0,82 %. Die Mittelwerte der Linolsäure, der  $\alpha$ -Linolensäure und DHA der Proben aus Freilandhaltung liegen bei 17,36 %, 0,76 % und 0,87 %. Die Proben aus biologischer Haltung zeigen bei diesen drei ungesättigten FS signifikant höhere Anteile als bei den beiden konventionellen Haltungsarten.



**Abbildung 4-11: Prozentualer Anteil der Palmitin-, Stearin-, Linol-,  $\alpha$ -Linolensäure und Docosahexaensäure (DHA) aller Proben aus biologischer Haltung (Bio), aus Bodenhaltung (Boden) und Freilandhaltung (Freiland). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung**

Um das Ausmaß der Streuung abzubilden, ist die Standardabweichung in Abbildung 4-11 als Fehlerbalken dargestellt. Die Standardabweichungen sind bei allen drei untersuchten Haltungsgruppen sehr hoch, vor allem aber bei der  $\alpha$ -Linolensäure. Dies zeigt sich auch bei den

zugehörigen VK in Tabelle 4-6. Die Proben aus biologischer Haltung besitzen den niedrigsten VK von 32 %, die Proben aus Freilandhaltung zeigen einen VK von 38 % und die Proben aus Bodenhaltung besitzen den höchsten VK von 41 %. Das zeigt, dass die Variation der  $\alpha$ -Linolensäure im Eifett dieser Eier sehr hoch ist, was unterem anderem durch die methodische Varianz bei den Minor-FS verursacht wird. Das Eigelb und das darin enthaltene Fett werden in der Leber der Henne synthetisiert. Dadurch ist der Gesamtfettgehalt im Eigelb nicht über den Fettanteil im Futter zu beeinflussen. Die Zusammensetzung der FS dagegen ist eine Kombination aus *de novo* Synthese und Einbau der FS aus dem Futter. In der Leber der Henne werden u.a. aus Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure verschiedene langkettige FS wie z.B. EPA, DPA und DHA selbst hergestellt. Somit kann durch Fütterung v.a. der Anteil an MUFS im Eifett gezielt beeinflusst werden (Sirri & Meluzzi, 2011).

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Anteile von einigen FS bei Eiern aus biologischer Legehennenhaltung und bei Eiern aus konventioneller Legehennenhaltung signifikante Unterschiede aufweisen. Bei den biologischen Proben zeigte sich dieser Unterschied in signifikant höheren Anteilen der  $\alpha$ -Linolensäure und DHA. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mugnai und Mitarbeiter, die bei ihrer Studie einen erhöhten Anteil an  $\omega$ -3 FS durch einen vermehrten Grünfutterkonsum feststellten. In ihrer Studie wurden Legehennen in drei verschiedene Gruppen einteilen. Die erste Gruppe wurde unter konventionellen Bedingungen in Käfigen gehalten und diente als Kontrollgruppe, die beiden anderen Gruppen wurden unter biologischen Bedingungen gehalten. Diese hatten einmal Zugang zu 4 m<sup>2</sup> Auslauf (O-Gruppe) mit Grünfläche und einmal 9 m<sup>2</sup> Auslauf mit Grünfläche (OP-Gruppe) pro Henne. Das sonstige Futter variierte nicht. Untersucht wurde der Carotinoid-,  $\alpha$ -Tocopherol-, der Flavonoidgehalt und die Fettsäureverteilung im Eigelb. Der Gehalt an Carotinoiden,  $\alpha$ -Tocopherol und Flavonoiden zeigte sich v.a. bei den Eiern der OP-Gruppe deutlich erhöht. Bei der Fettsäurezusammensetzung zeigten die Eier aus der OP-Gruppe niedrigere Anteile an Linolsäure und deutlich höhere Anteile an  $\omega$ -3 FS. Die gesättigten FS zeigten in keiner der Gruppen eine Veränderung (Mugnai et al., 2014). In einer weiteren Studie von Filipiak-Florkiewicz und Mitarbeitern wurden Eier aus unterschiedlichen Haltungssystemen (biologische Haltung, konventionelle Haltung (Käfighaltung)) auf ihre chemischen Grundparameter (Wasser-, Protein-, Fett-, Asche- und Mineralstoffgehalt), und auf die FS-Verteilung untersucht. Zudem untersuchten sie Eier, die durch eine spezielle Fütterung mit  $\omega$ -3 FS angereichert wurden. Sie fanden, dass Eier von Legehennen die  $\omega$ -3 FS angereichertes Futter bekamen, höhere Anteile an  $\omega$ -3 FS und niedrigere Anteile an gesättigten FS aufwiesen. Die Fettsäurezusammensetzungen der Eier von Legehennen aus den verschiedenen Haltungsgruppen ohne spezielle Fütterung unterschieden sich dagegen nur geringfügig (Filipiak-Florkiewicz et al., 2017). Die Ergebnisse der Proben, bei denen die Legehennen mit  $\omega$ -3 FS angereichertes Futter bekamen, zeigten eine gute Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen der Proben aus biologischer Haltung. Jedoch ist der Nachteil dieser Studie ihre geringe Probenzahl, so wurden lediglich 10 Proben je Haltungsart untersucht, was die Aussagekraft der Studie deutlich mindert. In einer anderen Studie von Campos und Mitarbeitern wurden verschiedene Haltungssysteme und deren Einfluss auf die Lipidzusammensetzung im Ei untersucht. Bei der Produktion biologisch erzeugter Eier erhielten die Legehennen ausschließlich Futter pflanzlichen Ursprungs. In konventioneller Produktion war ein größerer Anteil an Futter tierischen Ursprungs enthalten. Die Untersuchungen zeigten bei den konventionell produzierten Eiern höhere Anteile an Linolsäure im Vergleich zu den biologisch produzierten Eiern. Bei diesen war allerdings der Anteil an Ölsäure signifikant höher (Campos et al., 2016). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen. In dieser Arbeit wurden signifikant höhere Anteile an Linolsäure bei den Proben aus biologischer Haltung

gefunden und nicht bei den Proben aus konventioneller Haltung. Auch ist bei dem Anteil der Ölsäure (s. Abbildung 9-13 und Tabelle 4-6) kein größerer Unterschied zwischen den Proben aus biologischer Haltung, Bodenhaltung und Freilandhaltung zu erkennen. Ein großes Manko der Studie von Campos und Mitarbeiter ist zum einen die geringe Probenzahl, da von jeder Haltungsart lediglich vier Proben untersucht wurden, und zum anderen die Annahme, dass bei der biologischen Haltung kein Futter tierischen Ursprungs verwendet wird. Nach Verordnung (EG) Nr. 834/2007 ist die Fütterung mit Futter tierischen Ursprungs bei biologisch gehaltenen Legehennen erlaubt (VO(EG) Nr. 834, 2007; VO(EG) Nr. 889, 2008). Daher wird die Aussagekraft der genannten Studie eher gering eingeschätzt.

Bei einem Vergleich mit Studien aus der Literatur, die den Einfluss spezieller Fütterung auf die Lipidzusammensetzung untersuchten, zeigte sich, dass die Veränderungen der untersuchten FS v.a. bei den MUFS zu sehen sind. Die Gemeinsamkeit der Studien ist die Fütterung mit Futter, welches höhere Gehalte an MUFS enthielt (Cherian & Quezada, 2016; Ginzberg et al., 2010; Gladkowski et al., 2011; Rhodes, 1958).

Eine Schlussfolgerung für die hier beschriebenen Ergebnisse im Kontext der Literaturdaten wäre demnach, dass Legehennen in biologischen Haltungssystemen einen besseren Zugang zu Futtermitteln mit höheren Gehalten an MUFS haben als Legehennen in konventionellen Haltungssystemen. Um eine Aussage über den Einfluss der Haltung auf die Fettsäurezusammensetzung treffen zu können, müsste dies in einer Studie mit unterschiedlichen Haltungsarten und gleichem Futter gezielt untersucht werden.

## **4.2.2 Multivariate Analyse der $^1\text{H}$ NMR Daten**

Mit dem hohen Informationsgehalt und der Vielzahl an Variablen, welche die NMR Analyse mit sich bringt, sind die meisten Auswertetechniken überfordert. Für die gesamte Analyse der meist komplexen Spektren werden daher Verfahren der Mustererkennung (Pattern Recognition Techniques) benötigt. Ein gutes Beispiel, bei dem diese Verfahren schon längere Zeit erfolgreich eingesetzt werden, ist die Nahinfrarotspektroskopie. Mit Hilfe von chemometrischen Verfahren wurde die Nahinfrarotspektroskopie, die selbst eine schnelle nichtinvasive Analysentechnik darstellt, zur Qualitätskontrolle von Milch sowie Getreide- und Fleischprodukten und bei Wein erfolgreich etabliert (Ebrahimi et al., 2017).

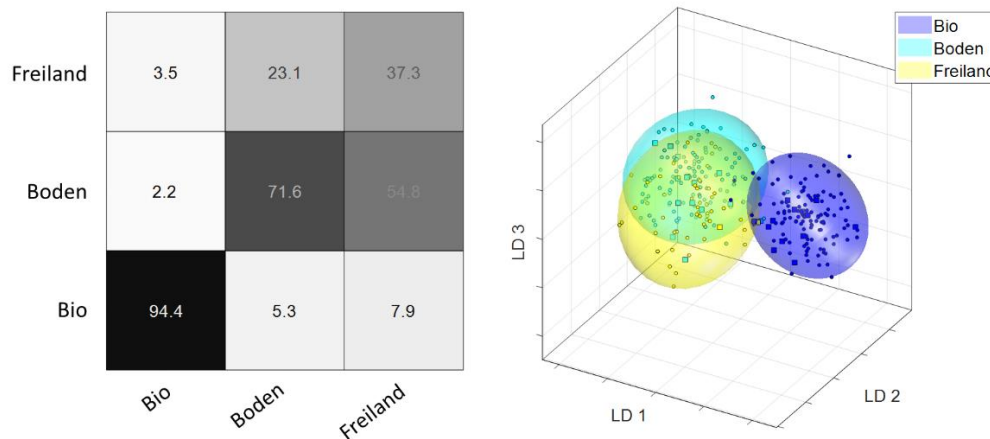
### **4.2.2.1 Erstellung eines Klassifizierungsmodells mittels**

#### **Hauptkomponentenanalyse und linearer Diskriminanzanalyse (PCA-LDA)**

Für die multivariate Datenanalyse wurden insgesamt 316 Proben verwendet. Dies entspricht 83 % der gesamten Proben, die restlichen Proben wurden für externe Validierungszwecke eingesetzt. Von den 316 Proben stammen 134 Proben aus der Bodenhaltung, 52 aus Freilandhaltung und 130 aus biologischen Haltungssystemen.

Vor der multivariaten Analyse wurden die  $^1\text{H}$  NMR Spektren verschiedenen Verfahren der Datenvorbehandlung unterzogen. Diese wurden bereits in Kapitel 3.6.1 näher beschrieben. Dazu gehört die Datenreduktion mittels Bucketieren und die Normalisierung der Signale auf die Intensität der Methylengruppe des PC-Signals (s. Abbildung 4-5, Signal Nr. 6). In Abbildung 3-1 ist der Normalisierungseffekt an diesem Signal dargestellt. Die Skalierung der Spektren erfolgte mittels Autoscaling. Im Anschluss an die Datenvorbehandlung folgte eine PCA, durchgeführt, um die Anzahl der Variablen weiter zu reduzieren. Die nachfolgende LDA mit MCCV wurde auf die generierten Scores der Hauptkomponenten der PCA angewendet. Durch die Kombination aus PCA

und LDA konnte so ein Klassifizierungsmodell erstellt werden. Mit Hilfe der MCCV war es möglich die Aussagekraft des Klassifizierungsmodells zu beurteilen. Für die Güte der Zuordnung wurden die „richtig“ bzw. „falsch“ zugeordneten Proben in einer Konfusionsmatrix dargestellt.



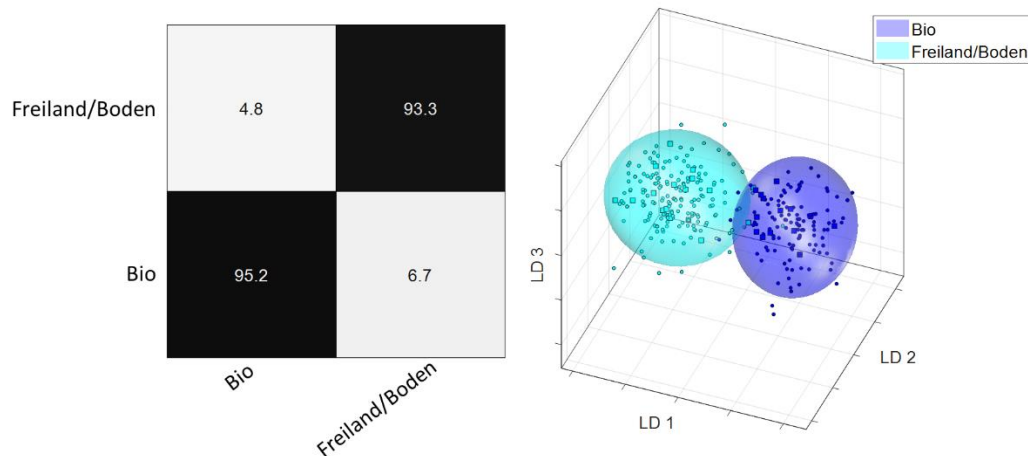
**Abbildung 4-12: Konfusionsmatrix (links) und bildliche Darstellung des Klassifizierungsmodells (rechts) der ersten drei linearen Diskriminanzfunktionen (LD1-3) mit allen drei Haltungsgruppen (biologische Haltung (Bio), Bodenhaltung (Boden), Freilandhaltung (Freiland))**

In einer ersten Evaluierung der <sup>1</sup>H NMR Daten wurde versucht ein Klassifizierungsmodell mit allen drei Haltungsgruppen zu erstellen. In Abbildung 4-12 ist das Ergebnis dieses Klassifizierungsmodells dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist die Konfusionsmatrix mit den Klassifizierungsergebnissen und auf der rechten Seite eine bildliche Darstellung des Klassifizierungsmodells in Form eines Wolkenmodells dargestellt. Zur Vereinfachung werden die Haltungsgruppen im Folgenden als Bio-Gruppe für die biologische Haltung, Boden-Gruppe für die Bodenhaltung und Freiland-Gruppe für die Freilandhaltung bezeichnet. Für die LDA wurden insgesamt die Scores der ersten 50 Hauptkomponenten verwendet. Diese beschreiben insgesamt 99,99 % der Varianz der Daten. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Modell eine Abgrenzung der Bio-Gruppe von den beiden konventionellen Gruppen zulässt. 94,4 % der biologisch erzeugten Proben wurden bei diesem Modell richtig der Bio-Gruppe zugeordnet. Dagegen wurden 2,2 % der Boden-Gruppe und 3,5 % der Proben aus der Freiland-Gruppe falsch zugeordnet. Umgekehrt wurden 71,6 % der Proben aus Bodenhaltung richtig aber auch, 23,1 % fälschlicherweise der Freiland-Gruppe und 5,3 % der Bio-Gruppe zugeordnet. Bei den Proben aus Freilandhaltung wurden lediglich 37,3 % der Proben richtig der Freiland-Gruppe zugeordnet. Dagegen wurden 54,8 % der Proben der Boden-Gruppe und 7,9 % der Bio-Gruppe fälschlicherweise zugeordnet. Das Wolkenmodell in Abbildung 4-12 rechts zeigt eine bildliche Darstellung der PCA-LDA. Die einzelnen Gruppen sind dabei in Wolken, die die Proben mit einem 95 % Konfidenzintervall umschließen, zu sehen. Auch hier ist deutlich die Überlagerung der Boden-Gruppe (türkis) und der Freiland-Gruppe (gelb) zu erkennen. Die Bio-Gruppe (blau) scheint dagegen fast separiert von den beiden anderen zu sein.

Bei einer zweiten Evaluierung der Daten wurden die beiden konventionellen Haltungsgruppen zu einer Freiland-/Boden-Gruppe zusammengefasst. Abbildung 4-13 zeigt die Konfusionsmatrix und das zugehörige Wolkenmodell. Für die LDA wurden insgesamt die Scores der ersten 90 Hauptkomponenten verwendet. Diese beschreiben insgesamt 99,99 % der Varianz der Daten. Die Konfusionsmatrix auf der linken Seite in Abbildung 4-13 zeigt, dass 95,2 % der biologisch

erzeugten Proben der Bio-Gruppe richtig zugeordnet wurden. 4,8 % der Proben wurden dagegen fälschlicherweise der Freiland-/Boden-Gruppe zugeordnet. Insgesamt wurden 93,3 % der konventionellen Proben der Freiland-/Boden-Gruppe richtig zugeordnet. 6,7 % der konventionell erzeugten Proben wurden fälschlicherweise der Bio-Gruppe zugeordnet.

Das hier gezeigte Modell ist somit in der Lage, eine richtige Klassifizierung von rund 95 % der Proben aus biologischer Haltung und von rund 93 % der Proben aus konventioneller Haltung zu liefern.



**Abbildung 4-13: Konfusionsmatrix (links) und bildliche Darstellung des Klassifizierungsmodells (rechts) der ersten drei linearen Diskriminanzfunktionen (LD1-3) mit den verschiedenen Haltungsgruppen. Die beiden konventionellen Haltungsgruppen Bodenhaltung, Freilandhaltung wurden in einer Gruppe als Freiland/Boden zusammengefasst, die biologische Haltung wird als Bio bezeichnet**

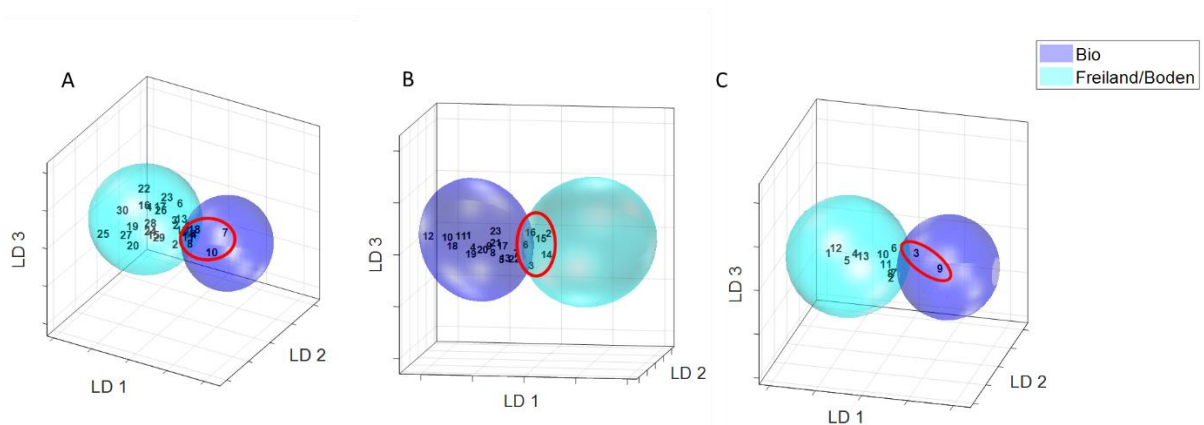
#### 4.2.2.2 Anwendung des Modells auf neue Proben

Die Anwendung des Modells auf neue Proben entspricht der Validierung mit externen Proben. Insgesamt wurden 17 % aller Proben, was 66 Proben entspricht, zur externen Validierung eingesetzt. Davon waren 30 Proben aus Bodenhaltung, 23 Proben aus biologischen Haltungssystemen und 13 Proben aus Freilandhaltung. Diese 66 Proben wurden nicht dazu verwendet, um das Modell aufzubauen (vgl. Kapitel 4.2.2.1), sondern das Klassifizierungsmodell wurde auf diese Proben angewendet. Die Spektren wurden derselben Datenvorbehandlung (Bucketieren, Normalisierung und Skalierung) wie die der Proben, die für die Modellerstellung verwendet wurden, unterzogen. In Abbildung 4-14 sind die Wolkenmodelle der externen Validierung zu sehen.

Die Abbildung 4-14A zeigt das Ergebnis der Anwendung des Modells auf die Proben aus Bodenhaltung, 4-14B auf die Proben aus biologischer Haltung und 4-14C auf die Proben aus Freilandhaltung. Die Zuordnung wird unter Verwendung des p-Wertes und der Entfernung zum jeweiligen Modellmittelpunkt (Bio-Gruppe und Freiland-/Boden-Gruppe) bestimmt. Die zugehörigen Werte sind in den Tabellen 9-10, 9-11 und 9-12 im Anhang zu finden.

Falsch zugeordnete Proben mit p-Werten  $< 0,05$  wurden in Abbildung 4-14 A-C durch eine rote Ellipse gekennzeichnet. Die Ellipse in Abbildung 4-14 A umschließt insgesamt vier Proben (7, 10, 11 und 18) aus Bodenhaltung, die aufgrund ihrer p-Werte der biologischen Haltung zugeordnet wurden (s. Tabelle 9-10). Die Probe mit der Nummer 8 besitzt einen p-Wert von 0,05 sowohl für die konventionelle als auch für die biologische Gruppe. Bei diesen fünf Proben (7, 8, 10, 11, 18) wurde in den Metadaten nach Informationen für die Falschzuordnung gesucht. Es zeigte sich, dass die Proben 7, 8, 10 und 18 alle aus Deutschland stammten. Auffällig war, dass die Proben 7 und 8

bei der Aufarbeitung bereits über ihrem Mindesthaltbarkeitsdatum lagen. Die Proben 8 und 18 stammten aus Betrieben, die auch biologische Eier produzieren. Der Verdacht liegt hier nahe, dass eventuell das gleiche Futter oder Anteile des gleichen Futters für beide Haltungsarten verwendet wurde und dadurch die Proben den biologisch erzeugten Proben ähnlicher sind. Die Probe 11 stammte aus den Niederlanden. Da das Modell zum größten Teil mit Proben, die aus Deutschland stammen, aufgebaut wurde, kann das ein möglicher Grund dafür sein, dass Proben aus dem Ausland nicht richtig zugeordnet werden können. Um diese Aussage bestätigen zu können, müsste das Modell auf weitere Proben, die aus dem Ausland stammen, angewendet werden. Bei Probe 10, die aus Deutschland stammt, konnte keine mögliche Ursache für die Falschzuordnung in den Metadaten gefunden werden.



**Abbildung 4-14: Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Proben. A zeigt die Proben aus Bodenhaltung, B die Proben aus biologischer Haltung und C die Proben aus Freilandhaltung. Die rote Ellipse umschließt falsch zugeordnete Proben**

In Abbildung 4-14B sind alle externen Proben, die aufgrund ihrer Metadaten zu der Gruppe der biologischen Haltung zählen, zu sehen. Alle Proben mit Ausnahme der Proben 2 und 15 wurden richtig der Bio-Gruppe zugeordnet. Diese besitzen kleinere p-Werte als das Signifikanzniveau von 0,05 (s. Tabelle 9-11).

Die Proben 3, 6, 16 und 14 liegen bei Betrachtung der Grafik sehr nahe am Rande des 95 % Konfidenzintervalls, welches die konventionellen Proben in einer Art Wolke umschließt. Die p-Werte dieser vier Proben liegen alle über oder auf dem Signifikanzniveau von 0,05. Bei einem Abgleich mit den Metadaten dieser Proben zeigte sich, dass die Proben 2, 3, 14, 15 und 16 alle aus dem europäischen Ausland stammen. So kommen die Proben 2, 3 und 16 aus Spanien, Probe 14 aus Dänemark und Probe 15 aus Litauen. Lediglich die Probe 6 stammt aus Deutschland, ihr p-Wert liegt bei 0,05, was dem Signifikanzniveau entspricht. Dies bestätigt die Annahme von oben, dass das Modell für eine Zuordnung von Proben aus dem Ausland nur bedingt geeignet ist.

Die Zuordnung der externen Proben aus Freilandhaltung ist in Abbildung 4-14C dargestellt. Alle Proben bis auf die 3 und 9 wurden richtig der konventionellen Gruppe zugeordnet. Ein Abgleich mit den Metadaten ergab, dass beide Proben aus den Niederlanden stammen.

Bei der Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Proben zeigte sich, dass dieses in der Lage ist konventionell und biologisch erzeugte Hühnereier richtig zuzuordnen. Schwierigkeiten gab es vor allem bei Proben, die nicht aus Deutschland stammen. Dies war zu erwarten, da das Klassifizierungsmodell zum größten Teil auf Grundlage deutscher Proben aufgebaut wurde. Um

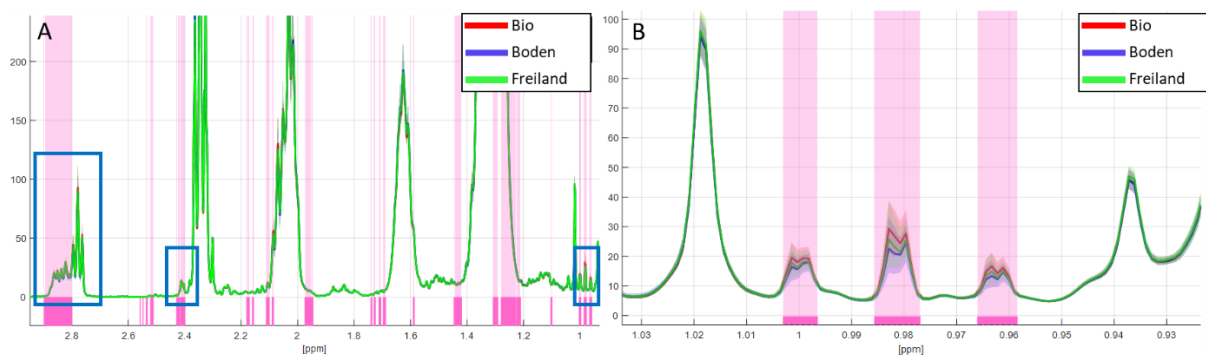
eine bessere Klassifizierung von ausländischen Proben zu erzielen, müsste das Modell mit einer größeren Anzahl dieser Proben trainiert werden.

### 4.2.3 Identifizierung und Analyse der für die Trennung verantwortlichen Parameter

Mit Hilfe der univariaten Datenanalyse basierend auf dem Kruskal-Wallis Test wurden die  $^1\text{H}$  NMR Spektren der drei Haltungsgruppen auf Unterschiede hin untersucht. Diese Form der Analyse wurde unter anderem von Godelmann und Mitarbeiter bei der Rebsortendifferenzierung (Godelmann et al., 2013) und von Longobardi und Mitarbeiter bei der Ursprungs klassifizierung von Olivenölen (Longobardi et al., 2012) eingesetzt. Die Unterschiede werden in Abbildung 4-15 in Form von pinkfarbenen Balken aufgezeigt. Ein vollständiges Spektrum mit den Ergebnissen der univariaten Datenanalyse ist in Anhang (Abbildung 9-14) zu sehen. Einige der Unterschiede können bestimmten Verbindungsklassen zugeordnet werden. In Abbildung 4-15A sind drei Signale mit einem Rahmen versehen. Alle eingerahmten Signale repräsentieren ungesättigte FS. Das Signal um 2,9 ppm repräsentiert die bis-allylische  $\text{CH}_2$  Gruppen. Das Signal bei 2,4 ppm gehört zu der Methylengruppe, welche in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe der DHA lokalisiert ist. Das Triplet bei 0,98 ppm kann der endständigen Methylgruppe der  $\omega$ -3 FS zugeordnet werden. In Abbildung 4-15B ist dieses Signal in einem Detailausschnitt dargestellt. Die Mittelwerte aller Proben der drei Haltungsgruppen (biologische Haltung, Bodenhaltung und Freilandhaltung) sind als kräftige Linien in der jeweiligen Farbe der Haltungsgruppe dargestellt. Die helleren Farbbereiche zeigen die Schwankungen innerhalb einer Gruppe. Sie unterscheiden sich in ihren Signalintensitäten. Der Mittelwert der Proben aus biologischer Haltung (rot) liegt deutlich über dem Mittelwert der Proben aus den beiden konventionellen Haltungsgruppen (Bodenhaltung – blau, Freilandhaltung – grün). Die beiden letzteren überlagern stark. Die Signalintensitäten der Proben aus biologischer Haltung zeigen eine geringere Schwankungsbreite als die Signalintensitäten der Proben aus den konventionellen Haltungsformen. Ein ähnliches Muster ist auch bei den beiden anderen gekennzeichneten Signalen der ungesättigten FS zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass die Proben aus biologischer Haltung höhere Gehalte an MUFS aufweisen als die konventionellen Proben. Das dominante Signal der  $\text{CH}_2$  Gruppen im Bereich von 1,2-1,4 ppm zeigt dagegen, dass der Mittelwert bei diesem Signal bei den Proben aus konventioneller Haltung höher ist als bei den Proben aus biologischer Haltung. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass der Anteil an gesättigten FS in den konventionellen Proben im Mittel höher ist als bei den Proben aus biologischer Haltung. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FS-Verteilung in Kapitel 4.2.

Andere weniger deutliche Unterschiede können keiner speziellen Verbindungsklasse oder Verbindung zugeordnet werden, da die Signale sehr klein und eine Zuordnung dadurch erschwert wird. Die Trennung zwischen den Haltungsgruppen, die durch die multivariate Datenanalyse deutlich wird, ist daher nicht an der Abwesenheit oder dem Vorhandensein einzelner Signale oder bestimmter Verbindungen festzumachen, vielmehr ist es ein Zusammenspiel aus unterschiedlichen Verbindungen.





**Abbildung 4-15: Univariate Datenanalyse der  $^1\text{H}$  NMR Spektren der Eifettproben aller drei Haltungsgruppen (biologische Haltung (rot), Bodenhaltung (blau), Freilandhaltung (grün)). Die Bereiche, in denen Unterschiede erkannt werden, sind mit pinkfarbenen Balken hinterlegt. A zeigt den Bereich zwischen 0,5-3 ppm, die Signale in den blau umrandeten Kästen können den mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugeordnet werden (Signal der bis-allylischen  $\text{CH}_2$  Gruppen, Signale der Methylengruppe in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe der Docosahexaensäure (DHA) und Signale der Methylgruppe der  $\omega$ -3 Fettsäuren). B zeigt einen detaillierten Ausschnitt um 1 ppm, in welchem das Signal und die unterschiedlichen Intensitäten des Signals der Methylgruppe der  $\omega$ -3 Fettsäuren deutlicher zu sehen sind**

#### 4.2.4 Vergleich mit den Ergebnissen der Fettsäureverteilung

Die GC-FID Analyse der Fettsäurezusammensetzung (s. Kapitel 4.1.5 Tabelle 4-6) zeigt, dass die FS der untersuchten Proben sich nur in wenigen der insgesamt 23 untersuchten FS im Hinblick auf die Haltung unterscheiden. Diese sind die Palmitin-, Stearin-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure sowie die DHA. In Abbildung 4-11 sind die fünf FS der unterschiedlichen Haltungsgruppen mit ihren prozentualen Anteilen bezogen auf die Gesamtfettsäuren und ihren Standardabweichungen, zu sehen. Die Anteile der beiden gesättigten FS Palmitin- und Stearinsäure sind in beiden konventionellen Haltungsarten leicht erhöht, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der  $^1\text{H}$  NMR Untersuchung ist. Bei der univariaten Analyse wurden höhere mittlere Intensitäten im Bereich der  $\text{CH}_2$  Signale für Proben der konventionellen Haltungsgruppe gefunden, was auf höhere Anteile der gesättigten FS schließen lässt. Umgekehrt zeigten sich bei den Signalen, die durch die Anwesenheit von Doppelbindungen entstehen, höhere mittlere Intensitäten bei den Proben aus biologischer Haltung. Diese  $^1\text{H}$  NMR Signale konnten den ungesättigten FS zugeordnet werden. Auch zeigten die Signale der endständigen Methylgruppe der  $\omega$ -3 FS sowie das Signal der DHA bei 2,4 ppm ebenfalls bei den Proben aus biologischer Haltung eine höhere Intensität im Vergleich zu den beiden anderen Haltungsgruppen. Zu den  $\omega$ -3 FS im Eifett zählen die  $\alpha$ -Linolensäure, die Docosapentaensäure (C22:5  $\Delta$ -4,7,10,13,16) und die DHA. Bei der Analyse der Fettsäurezusammensetzung zeigte sich, dass die  $\alpha$ -Linolensäure sowie die DHA höhere prozentuale Anteile an den Gesamtfettsäuren der biologischen Proben innehaben. Die GC Analyse und die  $^1\text{H}$  NMR zeigen bei den genannten Beispielen somit vergleichbare Ergebnisse.

### 4.3 Validierung und Qualitätskontrolle des Klassifizierungsmodells

Die Validierung des in Kapitel 4.2.2.1 beschriebenen Klassifizierungsmodells erfolgte unter Anwendung verschiedener Methoden. Eine Art interne Validierung wurde mit Hilfe der MCCV durchgeführt, wodurch eine Beurteilung der Aussagekraft der Klassifizierung möglich ist. Durch die Anwendung des Modells auf unbekannte Proben, wie in Kapitel 4.2.2.2 näher aufgezeigt, kann die Leistungsfähigkeit des erstellten Klassifizierungsmodells weiter bewertet werden.



Im nächsten Abschnitt wird auf die Validierung der Aufarbeitung und der  $^1\text{H}$  NMR Messung mit Hilfe der R-Probe näher eingegangen. Die Validierung im Rahmen der GC-FID Messung mit Hilfe der R-Probe wurde bereits in Kapitel 4.1.5 näher beschrieben.

### 4.3.1 Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung

Wie in Kapitel 4.1.5 bereits beschrieben, wurde die R-Probe dazu verwendet, die Aufarbeitung, welche die Probenpräparation, Fettextraktion, sowie die Messung mittels  $^1\text{H}$  NMR beinhaltet, zu evaluieren. Für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden mehrfache Aufarbeitungen und Messungen von mehreren Proben an verschiedenen Tagen durchgeführt. Zusätzlich wurde die R-Probe bei jeder neuen Probenserie mitextrahiert und vermessen. So konnte sichergestellt werden, dass Aufarbeitung und Messung einwandfrei funktionieren und reproduzierbar sind.

Für die Evaluierung der Reproduzierbarkeit wurde die R-Probe fünf Mal an drei verschiedenen Tagen aufgearbeitet und mittels  $^1\text{H}$  NMR vermessen und ausgewertet.

#### Erstellung von Mittelwertkontrollkarten der $^1\text{H}$ NMR Messung

Um die Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und der  $^1\text{H}$  NMR Messung zu überprüfen, wurden insgesamt acht Signale im Eifettspektrum ausgewählt und in TopSpin eine Integrationsvorlage zur automatischen Integration erstellt. Die acht Signale sind in Abbildung 4-16 zu sehen.

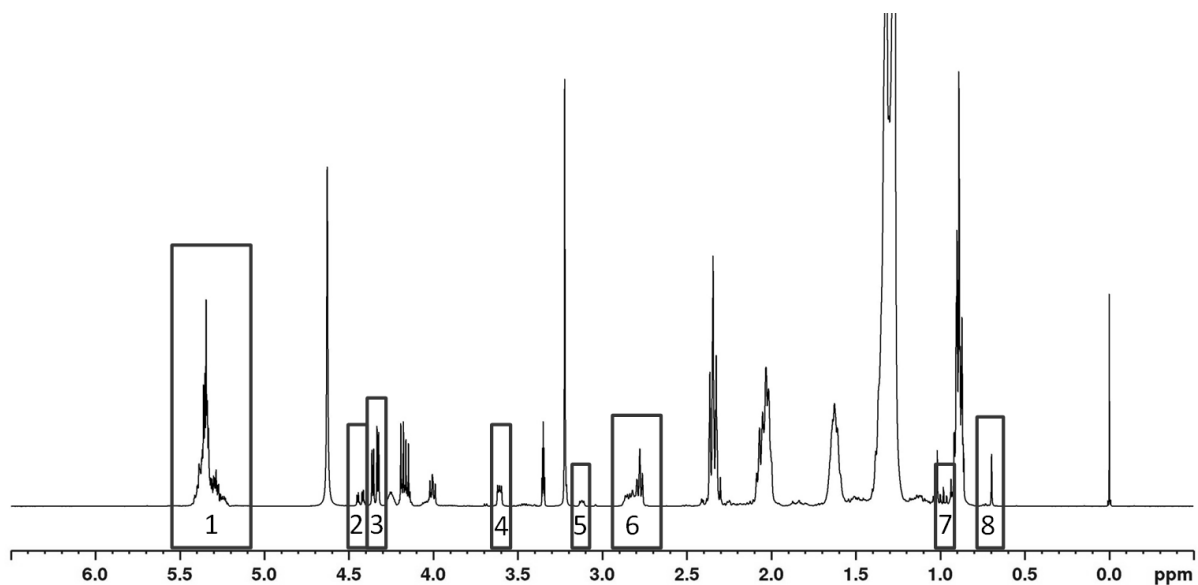
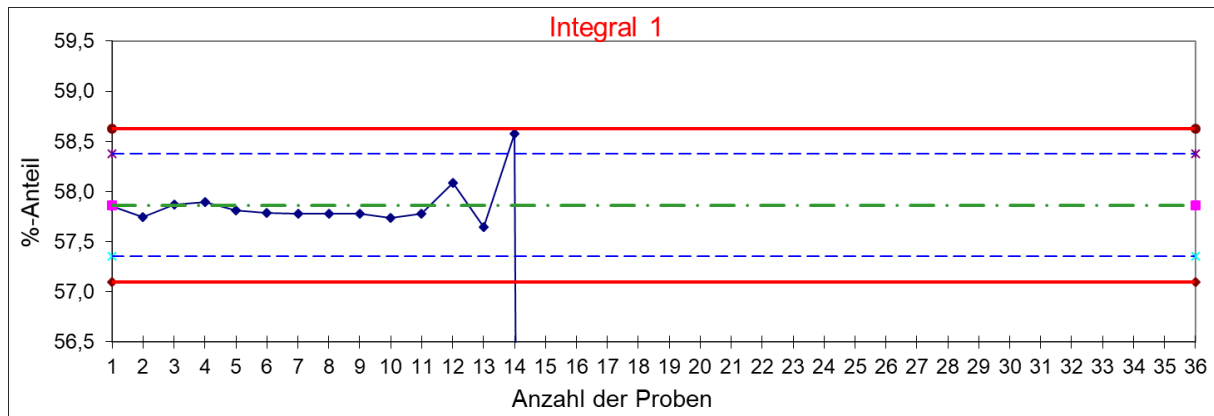


Abbildung 4-16: 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrum der R-Probe. Die umrandeten acht Bereiche zeigen die zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und zum Erstellen der Regelkontrollkarte verwendeten Signale. Bereich 1 umfasst die Signale der Ethylengruppen der ungesättigten Fettsäuren, sowie Signale des GlycerinGrundgerüsts der Triacylglyceride und Phospholipide, Bereich 2 und 3 beinhaltet die Signale des GlycerinGrundgerüsts der Phospholipide bzw. der Triacylglyceride, Bereich 4 beinhaltet ein Signal des Phosphatidylcholin und Bereich 5 ein Signal von Phosphatidylethanolamin, Bereich 6 umfasst die Signale der Methylenprotonen der ungesättigten Fettsäuren, Bereich 7 beinhaltet die Signale der Methylgruppen der  $\omega$ -3 Fettsäuren und Bereich 8 umfasst die Signale einer Methylgruppe des Cholesterins

In Tabelle 9-13 im Anhang sind die Signale den jeweiligen Verbindungen zugeordnet. Die Signale wurden so ausgewählt, dass alle vorherrschenden Substanzklassen wie PL, TAG und Cholesterin, die im Eifett vorkommen, vertreten sind. Zudem wurden die Signale entsprechend ihrer Lage so gewählt, dass der gesamte Bereich der chemischen Verschiebung abgedeckt wird. Die Integrale der acht Signalbereiche wurden summiert und die prozentualen Anteile jedes Integrals bestimmt. Die Ergebnisse der Mehrfachaufarbeitung und Messung an unterschiedlichen Tagen der R-Probe ist in Tabelle 9-13 dargestellt. Der VK ist bei allen acht Signalen unter 5 %, was zeigt, dass

Aufarbeitung und Messung reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die berechneten prozentualen Anteile der Mehrfachaufarbeitung und Messung wurden als Vorperiode zur Berechnung der Grenzen der Kontrollkarte verwendet. In Abbildung 4-17 ist eine Mittelwertkontrollkarte für das Integral 1 dargestellt.



**Abbildung 4-17: Mittelwertkontrollkarte für Integral 1. Die blauen Quadrate entsprechen den Proben, die grüne Punkt-Strich-Gerade zeigt den Mittelwert der Vorperiode, die blauen gestrichelten Linien zeigen die obere und untere Warngrenze, die dem Mittelwert  $\pm 2$ \*Standardabweichung entspricht. Die roten Linien zeigen die obere und untere Kontrollgrenze (Mittelwert  $\pm 3$ \*Standardabweichung)**

Die berechneten prozentualen Anteile der ersten 14 R-Proben, die bei der Aufarbeitung und Messung von verschiedenen Probenserien mitgemessen wurden, wurden in die Mittelwertkontrollkarte für das Integral 1 eingetragen. Mit dieser Vorgehensweise kann überprüft werden, ob Aufarbeitung und Messung der Serien korrekt verlaufen sind. In Abbildung 4-17 sind diese Proben als blaue Quadrate, die mit einer Linie miteinander verbunden sind, zu sehen. Die roten Geraden zeigen die obere und untere Kontrollgrenzen. Sie werden aus dem Mittelwert (grüne Punkt-Strich-Gerade) der Mehrfachbestimmungen und der dreifachen Standardabweichung berechnet. Die blauen gestrichelten Geraden bilden die obere und untere Warngrenzen. Diese ergeben sich aus dem Mittelwert, von dem die zweifache Standardabweichung addiert bzw. subtrahiert wird.

In Abbildung 4-18 sind die Kontrollkarten für das Integral 3 und 5 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass sich alle R-Proben, mit Ausnahme der Probe 14, innerhalb der Warngrenzen befinden und um den Mittelwert streuen. Die Probe 14 liegt bei der Kontrollkarte des Integrals 3 über der oberen Kontrollgrenze, bei der Kontrollkarte des Integrals 5 auf der unteren Kontrollgrenze und bei der Kontrollkarte des Integrals 1 (s. Abbildung 4-17) unter der oberen Kontrollgrenze. In Kapitel 3.6.4 wurde ein entsprechender Warnhinweis so definiert, dass bei Überschreitung der Kontrollgrenze eine kritische Überprüfung der Ergebnisse erforderlich ist.

Bei einem Spektrenvergleich, wobei mehrere Spektren übereinandergelegt wurden, zeigte sich, dass das Spektrum der R-Probe 14 bei den PL-Signalen einen Shift aufweist. Ein solcher Shift kann z.B. durch eine abweichende Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches, welches für die NMR Messung eingesetzt wurde, durch eine unterschiedliche Messtemperatur oder durch eine abweichende Einwaage verursacht werden.

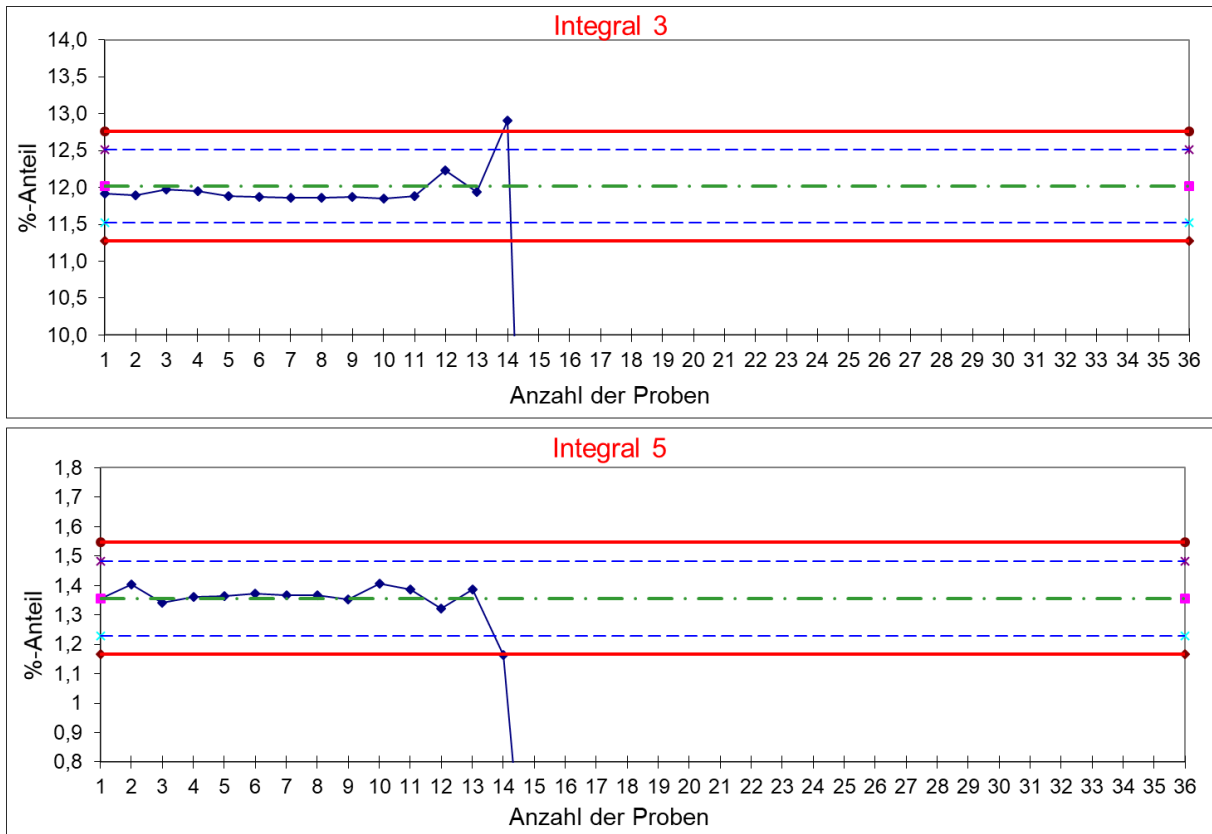


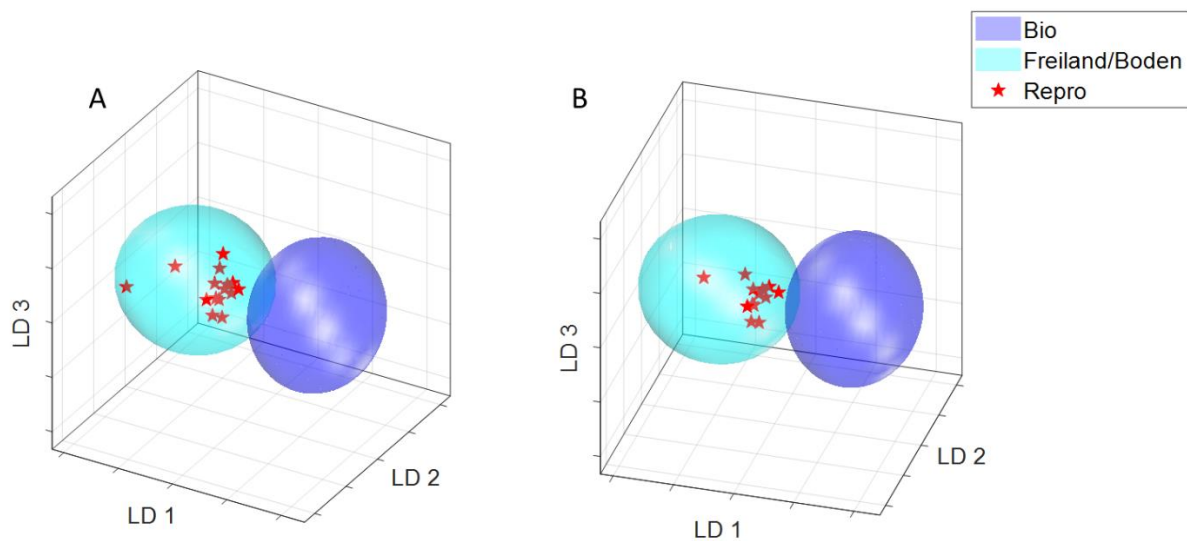
Abbildung 4-18: Mittelwertkontrollkarte für die Integrale 3 und 5 mit den Werten von 14 R-Proben, die bei der Aufarbeitung und Messung mitgeführt wurden

### 4.3.2 Validierung der multivariaten Datenanalyse

In der vorliegenden Studie wurden alle drei der oben genannten Ansätze zur Validierung verwendet. Das erstellte Klassifizierungsmodell (s. Kapitel 4.2.2.2) wurde auf das Validierungsset der 66 unabhängigen Proben angewendet und die Zuordnung überprüft.

Die Abbildung 4-19 zeigt die Anwendung des Klassifizierungsmodells auf die R-Proben. In den beiden Abbildungen 4-19A und B sind die R-Proben mit einem roten Stern markiert. Alle R-Proben wurden der Gruppe Freiland/Boden korrekt zugeordnet. Die meisten R-Proben, befinden sich in einem ähnlichen Bereich der Klassifizierungswolke. Bei der etwas weiter entfernten Probe handelt es sich um die R-Probe 14. Die komplette Probenserie, die zusammen mit dieser R-Probe aufgearbeitet wurde, zeigte einen ähnlichen Shift der PL-Signale. Bei der Anwendung des Modells auf diese Proben wurden die meisten dieser Proben falsch zugeordnet. Für die Praxis bedeutet dies, dass Proben einer solchen Serie weder für den Aufbau eines Modells noch für Auswertung mit einer nachfolgenden Beurteilung verwendet werden dürfen.

In Abbildung 4-19B sind alle R-Proben (insgesamt 13) ohne die oben beschriebene R-Probe 14 zu sehen. Mit Hilfe der R-Probe und einer Kontrollkarte, mit der verschiedene Bereiche in einem Spektrum überprüft werden können, ist es somit möglich Abweichungen der Probenpräparation festzustellen.



**Abbildung 4-19: Klassifizierungsmodell der gemessenen Reproduzierbarkeitsproben (Repro). A zeigt 14 Reproduzierbarkeitsproben, B zeigt 13 Reproduzierbarkeitsproben ohne R-Probe 14**

In Kapitel 4.2.2.2 wurde die Anwendung des Modells auf neue Proben bereits beschrieben. In den Abbildungen 4-14A, B und C sind die Zuordnungen des unabhängigen Test-Sets, bestehend aus insgesamt 66 Proben zu sehen. Bei den Proben aus biologischer Haltung und den Proben aus Freilandhaltung wurden nur Proben aus dem europäischen Ausland nicht korrekt zugeordnet. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da das Modell selbst zum Größten Teil aus deutschen Proben, vor allem aus Baden-Württemberg, aufgebaut wurde. Um eine bessere Aussagekraft und eine Anwendbarkeit auf ausländische Proben zu garantieren, müssten pro Land mindestens 50-100 Proben jeder Haltungsart in das Modell integriert werden.

## 4.4 Zusammenfassende Diskussion

Die klassische Charakterisierung der Inhaltsstoffe im Eifett wird vor allem dadurch bestimmt, dass nach der Extraktion des Fettes eine Auftrennung in die unterschiedlichen Lipidklassen oder Komponenten erfolgt, um sie dann mit verschiedenen analytischen Techniken zu untersuchen. Palacios und Wang sowie Galanos und Kapoulas entwickelten für die Auftrennung des Fettes spezielle Extraktionsmethoden. Mit Hilfe verschiedener polarer Lösungsmittel konnten sie die Fettkomponenten entsprechend ihrer Polarität trennen (Galanos & Kapoulas, 1962; Palacios & Wang, 2005). Kuksis und Marai wie auch Rhodes und Lea verwendeten dagegen für die Auftrennung des Fettes in die einzelnen Komponenten präparative chromatographische Methoden (Kuksis & Marai, 1967; Rhodes & Lea, 1957). Für die anschließende Untersuchung der getrennten Komponenten finden vor allem chromatographische Untersuchungsmethoden wie die HPLC und die GC mit unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten Anwendung. So können beispielsweise die isolierten TAG chromatographisch nach ihrer Kettenlänge oder dem Grad der Ungesättigtheit aufgetrennt werden. Eine klassische Untersuchungsmethode von Fetten ist die Analyse der Fettsäureverteilung mittels GC-FID. Die genannten Verfahren sind sehr zeitintensiv, da jeweils mehrere Arbeitsschritte nach der eigentlichen Fettextraktion für die Analyse vonnöten sind. Die NMR bietet hier eine Alternative, da die Hauptkomponenten des Fettes, die in ausreichender Konzentration vorhanden sind, für die Analyse nicht voneinander getrennt werden

müssen. Mittels  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie können die verschiedenen Komponenten im Eifett wie die TAG, die PL und das Cholesterin leicht identifiziert werden. Auch ist es möglich, Aussagen über einzelne FS, wie z.B. Linolsäure, DHA, und den Anteil an  $\omega$ -3 FS zu treffen. Andere FS können nur als Summenparameter in Form von gesättigten und ungesättigten FS berechnet werden, da die Signale zu stark überlagern. Mittels  $^{13}\text{C}$  NMR wird dagegen für fast jede FS ein separates Signal erhalten. Der Nachteil der  $^{13}\text{C}$  NMR Methode ist die lange Messzeit, die durch die geringe natürliche Häufigkeit der  $^{13}\text{C}$  Kerne, das kleine gyromagnetische Verhältnis, die lange T1 und den Wegfall des NOE bei quantitativen Messungen bedingt ist.

Die polaren Eifettbestandteile werden vor allem von den PL dominiert. Durch unterschiedliche Grundbausteine und die zusätzliche funktionelle Gruppe am Phosphorsäureester unterscheiden sich diese Verbindungen untereinander. Bei der konventionellen PL Analytik werden diese amphiphilen Fettkomponenten zuvor abgetrennt und anschließend analysiert. Wie bei den TAG werden vor allem chromatographische Methoden wie die HPLC angewendet. Je nach Fragestellung wird mit unterschiedlichen Säulenmaterialien und Detektoren gearbeitet. So kann eine Auftrennung nach der Länge der veresterten FS, deren Sättigungsgrad oder dem Phosphatester erfolgen. Allerdings muss bei allen genannten Methoden mit entsprechenden Standardsubstanzen gearbeitet werden (Pati et al., 2016). Bei der Untersuchung von Eifett mittels  $^1\text{H}$  NMR kommt es durch die FS-Signale zu starken Signalüberlagerungen im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum, weshalb nur einige PL wie PC, PE und SM identifizierbar sind. Bei der  $^{31}\text{P}$  NMR dagegen können alle im Eifett vorhandenen PL-Klassen identifiziert werden. Durch die unterschiedliche chemische Umgebung am und um das Phosphoratom weist jede PL-Klasse ein separates  $^{31}\text{P}$  NMR Signal auf. Daher können PL ohne vorherige Abtrennung von den anderen Lipidkomponenten bestimmt werden. Es muss lediglich darauf geachtet werden, dass bei dem verwendeten Lösungsmittel nach dem Lösen keine Phasentrennung entsteht, dass sich die Konzentrationen in einem ähnlichen Bereich befinden und Temperatur und pH-Wert genau eingehalten werden, da die  $^{31}\text{P}$  NMR Messung sehr empfindlich auf diese Parameter reagiert. Bei der  $^{31}\text{P}$  NMR werden zudem die Standardsubstanzen nur einmal zur Identifizierung benötigt. Danach werden diese nicht mehr gebraucht, insofern die oben genannten Bedingungen der Probenpräparation und Messung eingehalten werden. Durch die vereinfachte Aufarbeitung im Vergleich zu den chromatographischen Methoden und die Möglichkeit der Quantifizierung findet die  $^{31}\text{P}$  NMR im Gebiet der PL Analytik bereits weite Verbreitung.

Mit Hilfe eines hergestellten Standard-Mix, bestehend aus verschiedenen PL-Standardsubstanzen, konnten folgende PL im Eifett mittels  $^{31}\text{P}$  NMR identifiziert werden: PC, PE, LPC, LPE, SM und PI. Sothiros, Herslöf und Kenne fanden bei ihrer  $^{31}\text{P}$  NMR Untersuchung von verschiedenen kommerziell erhältlichen Ei-PL-Proben kein PI, stattdessen aber geringe Mengen an PA und Cardiolipin (Sotirhos et al., 1986). Die beiden letzteren waren bei dieser Arbeit allerdings auch mit Hilfe von Standardsubstanzen im Eifett mittels  $^{31}\text{P}$  NMR nicht zu identifizieren. Die chromatographischen Untersuchungen von Eifett durch Rhodes und auch von Zhao, Xiong und Curtis zeigen dagegen gute Übereinstimmung mit den hier identifizierten PL (Rhodes, 1958; Zhao et al., 2017).

Die Quantifizierung der PL erfolgte unter Anwendung eines internen bzw. externen Standards. Als externer Standard wurde GPC gewählt, welches zuvor schon von Glonek und Meneses für die Quantifizierung von PL verwendet wurde (Meneses & Glonek, 1988). GPC zeichnet sich dadurch aus, dass es nicht natürlich im Eifett vorkommt, eine ähnlich lange T1 wie die anderen PL besitzt und im Spektrum keine Überlagerung mit anderen PL-Signalen aufweist. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Distanz in den  $^{31}\text{P}$  NMR Spektren zwischen GPC und den zu quantifizierenden

Analyten, wodurch das Aufnahme Fenster verringert werden kann und mögliche off-resonanz Effekte vermieden werden (Claridge, 2009). Die Quantifizierung unter Verwendung eines externen Standards bietet die Vorteile, dass auf mögliche Signalüberlagerungen nicht geachtet werden muss, es zu keinerlei Wechselwirkungen zwischen Analyten, Lösungsmittel und Standard kommt und die Probe nicht verunreinigt wird. Dadurch kann die verwendete Messlösung auch für weiterführende Analysen verwendet werden. Ein Nachteil ist die zusätzliche Messung, die Nichtbeachtung von Matrixeffekten und die Schwankung des Innendurchmessers der NMR-Röhrchen. Letzteres kann je nach Hersteller und Spezifikation einen beachtlichen Einfluss auf die Quantifizierung haben.

Die prozentualen Anteile der individuellen PL bezogen auf die Gesamt-PL zeigten keine Unterschiede in Abhängigkeit der Quantifizierungsmethode. Die bestimmten Anteile an PC, PE und SM (~75 %, ~18,5 %, ~2,5 %) sind mit den publizierten Werten von Juneja, Rhodes und Zhao, Xiong und Curtis, die die PL mittels verschiedener HPLC-Methoden untersuchten, vergleichbar (Juneja, 1997; Rhodes, 1958; Zhao et al., 2017). Unterschiede zu den Werten der Literatur zeigten dagegen die niedriger konzentrierten PL wie LPC, LPE und PI. Jedoch sind die Werte dieser PL auch in der Literatur nicht konsistent. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Werte könnten die Extraktionsmethode, die verschiedenen Bestimmungsmethoden oder die Proben selbst sein. So waren beispielsweise das Herkunftsland der Proben, sowie das Futter der Legehennen in den genannten Studien, verschieden.

Der prozentuale PL-Anteil am Gesamtfett, bestimmt unter Verwendung eines internen bzw. externen Standards lag, bei 26,5 % für Eier aus Bodenhaltung und 28,6 % bzw. 28,5 % für Eier aus biologischen Haltungssystemen. Die Werte, die unter Verwendung des externen Standards berechnet wurden, zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Werten, die unter Verwendung des internen Standards bestimmt wurden. Für die Proben aus Freilandhaltung lagen die Mittelwerte bei 27,1 % und somit zwischen den Werten der Proben aus biologischen Haltungssystemen und der Proben aus Bodenhaltung. Dies steht im Widerspruch zu Cullen und Mitarbeitern, die von größeren Schwankungen bei der Quantifizierung unter Verwendung eines externen Standards im Vergleich zu einem internen Standard, berichteten (Cullen et al., 2013).

Bei Proben aus beiden konventionellen Haltungsarten wurden signifikant niedrigere Anteile an PL im Gesamtfett als bei den Proben aus biologischer Haltung bestimmt. In der Literatur berichtete Blesso von einem PL-Anteilen am Gesamtfett von 28 %, Juneja von 31 % und Anton von 33 % (Anton, 2007; Blesso, 2015; Juneja, 1997). Bei keiner dieser Studien wurde eine Differenzierung zwischen verschiedenen Haltungsarten vorgenommen. Auch wurde nicht von der Verwendung von speziellem Futter berichtet, wodurch ein Vergleich mit den erzielten Ergebnissen erschwert wird.

Bei der Untersuchung der Fettsäureverteilung mittels GC-FID zeigten sich bei einigen FS Unterschiede in den Proben der verschiedenen Haltungssysteme. So waren die Anteile der beiden gesättigten FS Palmitin- und Stearinsäure im Mittel bei den Proben aus konventionellen Haltungssystemen signifikant höher als bei den Proben aus biologischer Haltung. Dagegen waren die Werte der Linolsäure, der  $\alpha$ -Linolensäure und der DHA im Mittel bei den Proben aus biologischer Haltung signifikant höher als bei den Proben aus konventioneller Haltung. Dass sich die Fettsäurezusammensetzungen des Eifettes durch die Fütterung beeinflussen lässt, ist schon seit über 100 Jahren bekannt. McCollum, Halpin und Drescher untersuchten 1912 die Lecithinsynthese in Legehennen und fanden dabei, dass sich die Fettsäurezusammensetzungen in Abhängigkeit des Futters ändert (McCollum et al., 1912). Dies legte die Grundlage für viele Studien, die durch unterschiedliche Fütterungen versuchten, die Fettzusammensetzung des Hühnereis anzupassen. Bei den FS werden vor allem die MUFS wie die Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure

und die DHA durch das Futter beeinflusst, was allerdings auch dem eingesetzten Futter geschuldet ist, welches meist einen hohen Anteil an diesen MUFS enthält wie z.B. Leinöl, Fischöl und Lebertran (Cherian & Quezada, 2016; Gladkowski et al., 2011). Der Einfluss der Haltung war in den meisten dieser Studien nicht von Interesse, da Fütterungsversuche unter kontrollierten Bedingungen im Fokus standen. Campos und Mitarbeiter dagegen untersuchten die Lipidzusammensetzung von Eiern aus unterschiedlichen Haltungssystemen. Sie fanden höhere Anteile an Linolsäure in den konventionell hergestellten Eiern und höhere Anteile an Ölsäure bei den biologisch erzeugten Eiern (Campos et al., 2016). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorgestellten Arbeit, da die Linolsäure im Mittel bei den Proben aus biologischer Haltung signifikant höher war als bei den Proben aus konventioneller Haltung. Der Anteil an Ölsäure wurde dagegen nicht durch die Haltung beeinflusst. Allerdings wurden bei der Studie von Campos und Mitarbeiter lediglich vier Proben von jeder Haltungsart untersucht, was die Aussagekraft deutlich mindert. Mugnai und Mitarbeiter verglichen in ihrer Studie die Eier aus verschiedenen Haltungssystemen in Bezug auf den Carotinoid-, den  $\alpha$ -Tocopherol-, den Flavonoidgehalt und die Fettsäureverteilung. Sie konnten bei Eiern von Hühnern, die viel Grünfläche zur Verfügung hatten, höhere Gehalte an Carotinoiden,  $\alpha$ -Tocopherol, Flavonoiden und höhere Anteile an  $\omega$ -3 FS feststellen. (Mugnai et al., 2014). Allgemein können höheren Anteile an MUFS in Eiern aus biologischer Haltung darauf hindeuten, dass die Hühner in diesen Haltungssystemen einen besseren Zugang zu diesen FS haben.

Die Ergebnisse der genannten Studien zeigen, dass es nicht eine einzelne Markerverbindung gibt, mit der sich die Haltungsarten voneinander unterscheiden lassen. Vielmehr ist es ein Zusammenspiel von mehreren Verbindungen und Verbindungsklassen, die sich in den Verhältnissen zueinander beeinflussen und verändern. Ein großes Manko der meisten Studien sind die Probenzahlen, diese sind meist zu gering, um eine aussagekräftige Unterscheidung treffen zu können. Daher ist die Untersuchung einer größtmöglichen Probenzahl, die viel Variabilität aufweist, mit einer Methode, die die Gesamtheit erfassen kann, von Vorteil. Die  $^1\text{H}$  NMR in Kombination mit multivariaten statistischen Verfahren bietet die Möglichkeit, Zusammenhänge und Abhängigkeiten von Verbindungen darzustellen, die nicht direkt zu erkennen sind. So kann die Gesamtheit der Daten in die Auswertung mit einbezogen und der Informationsverlust so gering wie möglich gehalten werden (Steliopoulos, 2013).

Insgesamt wurden 316 Eierproben unterschiedlicher Haltung und Herkunft dazu verwendet, mittels PCA-LDA ein Modell zu erstellen, mit dem es möglich ist, zwischen konventionell und biologisch erzeugten Hühnereiern zu unterscheiden. Schon in der Vergangenheit wurde diese Art der Analyse auf verschiedene Lebensmittelmatrizes erfolgreich angewendet (Gerhardt et al., 2016; Godelmann et al., 2013; Spraul et al., 2009). Die  $^1\text{H}$  NMR Daten wurden verschiedenen Vorbehandlungen wie dem Bucketieren, der Normalisierung und der Skalierung unterzogen. Dadurch kann verschiedenen externen Einflüssen, die z.B. durch die Probenaufarbeitung und Messung entstehen können, entgegengewirkt werden. Die angewandte PCA sorgt für eine Dimensionsreduktion ohne Informationsverlust bei gleichzeitiger Verbildlichung der Abhängigkeiten (Steliopoulos, 2013). Mit Hilfe der PCA war es möglich die Anzahl der Dimensionen von 1493 (Buckets) auf 90 PCA (Scores) zu reduzieren. Die nachfolgende LDA, welche auf die Scores der PCA angewendet wurde, kann die Unterschiede der Gruppen so hervorheben und nutzen, dass diese voneinander getrennt werden. Die Vorhersagekraft des erstellten Klassifizierungsmodells wurde mittels MCCV untersucht und beurteilt. Dabei wurden die Daten der 316 Proben zufällig verteilt. 90 % der Daten wurden als Training-Set verwendet. Aus ihnen wurde das Klassifizierungsmodell aufgebaut. Die restlichen 10 % der Daten wurden als

Test-Set verwendet, wobei das generierte Klassifizierungsmodell auf diese Daten angewendet wurde, bis alle Daten einmal im Test-Set waren. Dieser Vorgang wurde durch eine Monte-Carlo-Schleife insgesamt 10 mal wiederholt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Daten vor jedem der 10 Durchgänge zufällig ausgewählt werden. Die Ergebnisse dieser internen Validierung sind in einer Konfusionsmatrix dargestellt, mit der die Vorhersagekraft des Modells beurteilt werden kann. Bei der Erstellung eines Klassifizierungsmodells, welche alle Proben aller drei Haltungsgruppen berücksichtigte, zeigte sich eine starke Überlagerung der Proben der beiden konventionellen Haltungsgruppen, allerdings auch eine klare Abgrenzung dieser zu den Proben der biologischen Haltungsgruppe. Daraufhin wurden die Proben der konventionellen Haltungsarten zu einer Gruppe zusammengefasst. Das so erstellte Modell ist in der Lage, biologische und konventionell hergestellte Eier mit einer Vorhersagekraft von über 95 % richtig zu klassifizieren.

Das erstellte Klassifizierungsmodell wurde mit insgesamt 66 Proben auf dessen Vorhersagekraft getestet. Diese Testproben wurden weder zum Modellaufbau noch zum Testen mittels MCCV eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Klassifizierung von biologisch und konventionell erzeugten Eiern aus Deutschland sehr gut funktioniert. Insgesamt wurden lediglich vier Proben aus Deutschland durch des Klassifizierungsmodells falsch zugeordnet. Dies entspricht einer Falschzuordnung von 3 % der Proben. Bei der Klassifizierung von ausländischen Proben kam das Modell an seine Grenzen. Von insgesamt neun Proben aus dem europäischen Ausland wurden fünf davon falsch klassifiziert. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da für den Modellaufbau zum größten Teil Proben aus Deutschland verwendet wurden. Eine andere Problematik, die sich zeigte, ist die Klassifizierung von Eiern, die aus Betrieben stammen, die sowohl biologische als auch konventionelle Legehennenhaltung betreiben. Hier kann ähnliches oder gleiches Futter der Legehennen eventuell zu einer Falsch-Klassifizierung führen. Um diese Schwierigkeiten beherrschbar zu machen, müsste das Modell mit mehreren dieser Proben trainiert und getestet werden.

Um die Unterschiede der Proben aus konventioneller Haltung und der Proben aus biologischer Haltung auf Ebene der Inhaltsstoffe zu analysieren, wurde eine univariate Datenanalyse basierend auf einem Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Es zeigte sich, dass die  $^1\text{H}$  NMR Signale der ungesättigten und gesättigten FS der Proben aus den verschiedenen Haltungsarten Unterschiede in ihren Intensitäten und damit im Gehalt aufweisen. So waren beispielsweise die Intensitäten der Signale der ungesättigten FS bei den biologisch produzierten Proben im Mittel höher als bei den konventionell erzeugten Proben. Diese Beobachtung zeigte sich besonders deutlich bei den Signalen der  $\omega$ -3 FS bei 0,98 ppm und dem Signal der DHA bei 2,4 ppm. Umgekehrt zeigte das Signal der  $\text{CH}_2$  Gruppen bei 1,2-1,4 ppm im Mittel eine höhere Intensität bei den konventionell erzeugten Proben. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fettsäureverteilung, die mittels GC-FID bestimmt wurde. Hier konnte der Unterschied der Haltungssysteme auf unterschiedliche Anteile an gesättigten und ungesättigten FS zurückgeführt werden. So zeigten die Palmitin- und Stearinsäure im Mittel signifikant höhere Anteile bei den konventionell hergestellten Proben. Linolsäure, DHA und vor allem  $\alpha$ -Linolensäure dagegen zeigten im Mittel signifikant höhere Anteile bei den biologisch erzeugten Proben. Mugnai und Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie, dass u.a. höhere Anteile der  $\omega$ -3 FS auf den zusätzlichen Verzehr von Grünfutter zurückgeführt werden kann (Mugnai et al., 2014). Da bei der biologischen Haltung nach Verordnung (EG) Nr. 834/2007 ein Mindestauslauf ins Freie vorgeschrieben ist, könnte diese zusätzliche Futterquelle einen Beitrag zur unterschiedlichen Zusammensetzung des Eifettes leisten.



Andere Unterschiede, die durch die univariate Analyse angezeigt wurden, konnten auf keine bestimmten Verbindungen oder Verbindungsklassen zurückgeführt werden, da die Signale teilweise sehr klein und die Intensitätsunterschiede nur gering waren. Es wird davon ausgegangen, dass die mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse aufgezeigten Unterschiede der Haltungssysteme mit den unterschiedlichen Gehalten der FS zusammenhängen, aber auch durch andere Verbindungen und deren Zusammenspiel von teilweise erhöhten oder erniedrigten Gehalten verursacht werden.

Die Validierung eines multivariaten Modells erfordert nach Callao und Ruisánchez verschiedene Ansätze. So wird eine Kreuzvalidierung vor allem bei geringeren Probenzahlen empfohlen, wodurch eine Beurteilung des Modells und des Vorhersagefehlers möglich ist. Zudem ist es sinnvoll, das Modell mit einer größeren Zahl unabhängiger Proben zu testen (Callao & Ruisánchez, 2018). Insgesamt bestand die Validierung des vorgestellten Modells aus drei verschiedenen Ansätzen: der internen Validierung mittels MCCV, der externen Validierung unter Verwendung eines unabhängigen Proben-Sets und dem Mitführen einer Qualitätskontrollprobe. Die beiden erstgenannten Validierungsansätze wurden bereits im oberen Abschnitt diskutiert und es wurde gezeigt, dass das Klassifizierungsmodell gut geeignet ist, biologische und konventionell erzeugte Hühnereier zu unterscheiden. Mit dem Einführen der Qualitätskontrollprobe wurde sichergestellt, dass Extraktion, Probenpräparation, Messung und Datenbehandlung stets unter gleichen Bedingungen abläuft und somit reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zudem wurde die Qualitätskontrollprobe dazu verwendet, die  $^1\text{H}$  NMR und GC-FID Analysen im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit zu evaluieren. Dazu wurde die Qualitätskontrollprobe an unterschiedlichen Tagen mehrfach aufgearbeitet, vermessen und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Überprüfung wurden als Vorperiode bei der Erstellung der Regelkontrollkarte zur Berechnung der Kontrollgrenzen genutzt. Bei jeder Probenserie wurde die Qualitätskontrollprobe neu aufgearbeitet, vermessen und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in der Regelkontrollkarte festgehalten. So konnte überprüft und gezeigt werden, dass die Methode valide Ergebnisse produziert.

## 5 Zusammenfassung

Hühnereier sind weltweit ein wichtiger Proteinlieferant in der menschlichen Ernährung. Das Hühnerei lässt sich in drei Kompartimente, die Schale, das Eiklar und das Eigelb, einteilen. Während die Schale vor allem aus mineralischem Material besteht, dominieren im Eiklar neben dem Wasser die Proteine. Das Eigelb besteht aus einer Öl-in-Wasser-Emulsion mit bis zu 36 % Lipiden.

Die Produktion von Hühnereiern ist in der Europäischen Union gesetzlich geregelt. Insgesamt gibt es vier offizielle Haltungsformen, deren Anforderungen an Platzangebot, Ausstattung des Stalls, Futter und Auslauf in EU-Verordnungen geregelt sind. Diese Haltungsarten sind die Käfighaltung, die Bodenhaltung, die Freilandhaltung und die biologische Haltung. Letztere unterliegt speziellen Regelungen, die sie u.a. durch Anforderungen an Herdengröße, Platzangebot und den speziell geregelten Einsatz von Arzneimitteln von den konventionellen Haltungsarten abgrenzt. Zudem muss bei biologischer Haltung das eingesetzte Futter zu einem großen Anteil aus biologisch hergestellten Rohstoffen bestehen. Ein weiterer Aspekt ist der Zugang zu Grünfutter, der durch einen größeren Auslauf im Freien ermöglicht wird. Diese gesetzlich festgelegten Forderungen führen zu höheren Produktionskosten und dementsprechend zu höheren Preisen für Eier aus biologischer Haltung. Die Dokumentation der Haltungsart erfolgt in der Regel über den Erzeugercode, der vor Verkauf auf die Eierschale aufgedruckt wird. Eine Überprüfung der angegebenen Haltungsart mittels analytischer Methoden ist nach heutigem Stand nicht möglich.

Durch gezielte Fütterungsversuche wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass sich die Fettzusammensetzung und vor allem die Fettsäureverteilung im Ei durch das Futter beeinflussen lässt. Die besonderen Anforderungen des Futters in der biologischen Haltung im Vergleich zu den konventionellen Haltungsarten machen es wahrscheinlich, dass sich dies in der Fettzusammensetzung widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fettbestandteile von Eiern aus den in Deutschland dominierenden drei Haltungssystemen, biologische Haltung, Bodenhaltung und Freilandhaltung mittels  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Methoden untersucht und charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit Hinblick auf eine Haltungsdifferenzierung genauer analysiert.

Der Großteil der untersuchten Proben stammte aus Deutschland. Einige Proben kamen aus dem europäischen Ausland, dabei handelte es sich v.a. um Eierproben aus den deutschen Nachbarländern Frankreich und den Niederlanden. Für die Analyse wurde das Eigelb gefriergetrocknet und anschließend das Fett extrahiert. Die Extraktion erfolgte mittels eines Lösungsmittelgemisches, mit welchem die unpolaren sowie die polaren amphiphilen Fettbestandteile aus dem Eigelb extrahiert werden können. So wurde sichergestellt, dass die Gesamtheit der im Eifett enthaltenen Verbindungen, erfasst wird. Für die  $^1\text{H}$  NMR Messung wurde das verwendete Lösungsmittel und das Messprogramm so angepasst, dass es zu keinen Überlagerungen von Signalen der Eifettkomponenten mit den Signalen der Lösungsmittel und dem Restwasser kam. Die Identifizierung und Charakterisierung der Signale erfolgte mit Hilfe von Standardsubstanzen, verschiedener 2D NMR Experimente und durch Vergleiche mit Spektren und Daten aus der Literatur. Das  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von Eifett wird dominiert von den Signalen der Triacylglyceride, die mit einem Anteil von ca. 65 % in der Trockenmasse den größten Anteil im Eifett einnehmen. Der größte Unterschied zu anderen tierischen und pflanzlichen Fetten ist der hohe Anteil an Phospholipiden. Durch  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC Experimente konnten die Verbindungen der Phospholipide sehr gut im Eifett identifiziert und deren Signale anschließend im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zugeordnet werden. Die dominierenden Phospholipide sind

Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Durch ihre veresterten Reste an der Phosphatgruppe sind diese leicht von den dominierenden Signalen der Fettsäuren und dem Triacylglyceridgrundgerüst zu unterscheiden. Andere Phospholipide wie Sphingomyelin und Phosphatidylinositol sind nur in geringen Mengen im Eifett enthalten, und ihre Signale waren zu stark von Signalen anderer Fettkomponenten überlagert, um diese im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum zu identifizieren. Einzelne Signale konnten auch Cholesterin und speziellen Fettsäuren wie Linolsäure und Docosahexaensäure (DHA) zugeordnet werden. Auch war es möglich Signale von bestimmten Fettsäuregruppen wie den  $\omega$ -3 Fettsäuren zu identifizieren.

Mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren wurde versucht weitere Verbindungen, deren Signale sich im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum überlagern, zu identifizieren. Zudem wurden die  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren auf eventuelle Unterschiede bezüglich der Inhaltsstoffe der Proben der verschiedenen Haltungsarten hin untersucht. Allerdings zeigten die  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren, trotz quantitativer Messbedingungen und langer Messzeit, in dieser Hinsicht keinen Zugewinn. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  waren die Signale meist zu klein, um Unterschiede zwischen den Haltungsarten feststellen zu können.

Die  $^{31}\text{P}$  NMR ist sehr gut geeignet die im Eifett vorhandenen Phospholipide zu untersuchen. Das extrahierte Eifett konnte ohne weitere Vorbehandlung direkt zur  $^{31}\text{P}$  NMR Messung eingesetzt werden. Das verwendete Lösungsmittel wurde auf die Fettkomponenten im Eifett so angepasst, dass es beim Lösen des Eifettes zu keiner Phasentrennung durch die Phospholipide kam. Eine Phasentrennung hätte einen negativen Effekt auf die Quantifizierung der Phospholipide, da diese sich zu unterschiedlichen Anteilen in den verschiedenen Lösungsmittelphasen und in der Grenzschicht verteilen würden. Ein weiteres Problem ist die Bildung von größeren Mizellen durch die Phospholipide. Diese resultieren in breiten Phospholipidsignalen, welche eine Signalzuordnung und Quantifizierung deutlich erschweren. Mit einer Mischung aus unterschiedlich polaren Lösungsmitteln, Chelatbildner und einem definierten pH-Wert konnten das Eifett und die darin enthaltenen Phospholipide gut gelöst werden. Die Messbedingungen wurden so gewählt, dass sie quantitativ sind und die Signale der Phospholipide keine Überlagerungen zeigten. Für die Identifizierung der Phospholipide wurden entsprechende Standardsubstanzen verwendet. Die Quantifizierung erfolgte unter Anwendung eines internen und externen Standards. Als Quantifizierungsstandard (intern und extern) wurde Glycerophosphatidylcholin gewählt, welches nicht natürlich im Eifett vorkommt und dessen Relaxationszeit mit denen der im Eifett enthaltenen Phospholipide vergleichbar ist. Ein weiterer Vorteil von Glycerophosphatidylcholin ist, dass es keine Signalüberlagerung mit den Phospholipidsignalen im Eifett zeigte und die chemische Verschiebung in der Nähe der zu quantifizierenden Phospholipide lag. Insgesamt konnten sechs verschiedene Phospholipide im Eifett identifiziert werden: Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin, Lyso-Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol. Der Gesamtgehalt an Phospholipiden im Eifett und die Anteile der einzelnen Phospholipide bezogen auf den Gesamtphospholipidgehalt wurden bestimmt. Die Ergebnisse beider Quantifizierungsmethoden wurden miteinander und mit Literaturwerten verglichen. Beide Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung. Die prozentualen Phospholipidanteile bezogen auf den Gesamtphospholipidgehalt zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Haltungsarten. Bei der Untersuchung des prozentualen Phospholipidanteils am Gesamtfett konnten bei den biologischen Proben signifikant höhere Gehalte als bei den beiden konventionellen Haltungsarten festgestellt werden. In der Literatur konnte jedoch keine Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden.

Für die Untersuchung der Fettsäureverteilung wurden die im Eifett enthaltenen Fettsäuren mittels kalter alkalischer Umesterung mit Kaliummethylat zu Fettsäuremethylestern umgeestert. Nach erfolgter gaschromatographischer Trennung und Detektion mittels Flammenionisationsdetektor (GC-FID) wurden die verschiedenen Fettsäuremethylester mit Hilfe von Standardsubstanzen zugeordnet. Insgesamt konnten 23 verschiedene Fettsäuren im Eifett identifiziert und deren Anteile bezogen auf den Gesamtgehalt bestimmt werden. Es zeigte sich, dass bei insgesamt fünf Fettsäuren signifikante Unterschiede im Anteil bezüglich der Haltungsart zu erkennen sind. Diese sind die Palmitinsäure, die Stearinsäure, die Linolsäure, die  $\alpha$ -Linolensäure und die DHA. Die Anteile beider gesättigten Fettsäuren, Palmitin- und Stearinsäure, waren im Mittel bei den Proben aus konventioneller Haltung signifikant höher als bei den Proben aus biologischer Haltung. Umgekehrt waren die Anteile der drei ungesättigten Fettsäuren Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure und DHA bei den Proben aus biologischer Haltung signifikant höher als bei den Proben aus konventioneller Haltung.

Die statistische Analyse der  $^1\text{H}$  NMR Daten mit Hinblick auf die Haltungsdifferenzierung erfolgte mit Hilfe von multivariaten Verfahren. Um mögliche externe Einflüsse, die beispielsweise durch die Aufarbeitung und die Messung entstehen können, zu berücksichtigen, wurden die Daten verschiedenen Vorbehandlungen unterzogen. Zur Datenreduktion wurden die Spektren in einem definierten Bereich in gleich große Buckets aufgeteilt. Die Signale der Lösungsmittel und des Restwassers wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zur Normalisierung wurde das Signal der Methylengruppe des Phosphatidylcholins bei 3,57-3,63 ppm verwendet. Es zeigte keine Überlagerung mit anderen Signalen und wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Haltungsarten auf. Skaliert wurde mittels Autoscaling, wodurch die Variablen intensitätsunabhängig eine gleiche Gewichtung bekamen. Zur Erstellung eines Klassifizierungsmodells der Haltungsart wurde eine Kombination aus Hauptkomponentenanalyse (PCA) in Kombination mit einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) gewählt. Die PCA ermöglichte eine erste Gruppierung bei gleichzeitiger Dimensionsreduktion der Daten. Durch die anschließende LDA erfolgte eine Klassifizierungsanalyse, wobei die Unterschiede der vordefinierten Gruppen genutzt wurden, um eine maximale Trennung zwischen den Haltungsarten Bodenhaltung, Freilandhaltung und biologische Haltung zu erhalten. Die Güte der Klassifizierung wurde mittels Monte Carlo Kreuzvalidierung bestimmt und in einer Konfusionsmatrix dargestellt. Es zeigte sich, dass die Proben der beiden konventionellen Haltungsarten Freiland- und Bodenhaltung sehr ähnlich sind und eine Klassifizierung zwischen diesen beiden Haltungsarten nur bedingt möglich ist. Dagegen zeigten die Proben dieser beiden konventionellen Haltungsarten eine gute Abgrenzung zu den Proben aus biologischer Haltung. Daher wurden die Daten der Proben aus Freiland- und Bodenhaltung zu einer Gruppe zusammengefasst. Das erhaltene Klassifizierungsmodell zeigte eine richtige Zuordnung von rund 95 % der biologischen und konventionellen Proben. Mit Hilfe einer univariaten Datenanalyse, welche auf einem Kruskal-Wallis Test basierte, konnten die Unterschiede in den Daten der Haltungsgruppen im  $^1\text{H}$  NMR Spektrum untersucht werden. Über das gesamte  $^1\text{H}$  NMR Spektrum verteilt zeigten mehrere Signale Intensitätsunterschiede zwischen den drei Haltungsgruppen. Einige dieser Signale konnten bestimmten Fettkomponenten zugeordnet werden. Diese sind die bis-allylischen  $\text{CH}_2$  Gruppen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die Methylengruppe in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe der DHA und das Signal der endständigen Methylgruppen der  $\omega$ -3 Fettsäuren. All diese Signale haben die Gemeinsamkeit, dass ihre Intensität im Mittel bei den Proben aus biologischer Haltung höher waren als bei den Proben aus konventioneller Haltung. Umgekehrt zeigt das Signal der Methylengruppen aller Fettsäuren im Bereich von 1,2-1,4 ppm eine geringere Intensität bei den Proben aus biologischer Haltung als bei den Proben aus

konventioneller Haltung. Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der Fettsäureverteilung, die mittels GC-FID ermittelt wurden, überein. Weitere  $^1\text{H}$  NMR Signale des Eifettes, die zur Unterscheidung der Haltungsgruppen beitragen, konnten nicht genauer identifiziert werden, da die Gehalte zu gering waren und die Signale sehr stark überlagern.

Für die Validierung des erstellten Klassifizierungsmodells wurde eine Eierprobe als sogenannte Qualitätskontrollprobe definiert. Mit Hilfe dieser Probe wurden die verschiedenen Aufarbeitungsschritte und die Messung mittels  $^1\text{H}$  NMR und GC-FID validiert und auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Zudem wurde diese Probe bei jeder neuen Probenserie mit aufgearbeitet, vermessen und ausgewertet. Dies stellte sicher, dass Aufarbeitung, Messung und Datenvorbehandlung stets unter vergleichbaren Bedingungen ablaufen. Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden einzelne  $^1\text{H}$  NMR Signale ausgewertet, und die Ergebnisse wurden in einer Regelkontrollkarte festgehalten. Ein zusätzlicher Validierungsansatz beinhaltete die Validierung mit externen Proben. Dafür wurde das Klassifizierungsmodell auf Proben aus biologischen und konventionellen Haltungssystemen, die nicht bei dem Aufbau des Modells verwendet wurden, angewendet. Der Großteil dieser Testproben wurde richtig zu der jeweiligen Haltungsgruppe zugeordnet. Dies zeigte, dass das Klassifizierungsmodell in der Lage ist zwischen Eiern aus biologischer und konventioneller Haltung zu unterscheiden. Die Grenzen des Klassifizierungsmodells zeigten sich bei Proben aus dem europäischen Ausland. Dies war zu erwarten, da das Modell hauptsächlich aus Proben aus Deutschland aufgebaut wurde. Für eine Haltungsüberprüfung von Eiern aus dem europäischen Ausland müssten mehr dieser Proben in das Klassifizierungsmodell integriert werden.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mittels  $^1\text{H}$  NMR und multivariater Datenanalyse zwischen biologisch und konventionell erzeugten Hühnereiern aus Deutschland zu unterscheiden. Es konnten einige Verbindungen im Eifett identifiziert werden, die zu dieser Unterscheidung beitragen. Allerdings sind mehrere Verbindungen und Verbindungsklassen als die in dieser Arbeit dargestellten für die Differenzierung verantwortlich. Um alle Verbindungen zu identifizieren, müssten verschiedenste analytische Trenntechniken und Analysemethoden angewandt werden. Ob und inwieweit die Unterschiede mit der Haltung und/oder der Fütterung zusammenhängen, müsste in Studien mit gezielten Fütterungsversuchen untersucht werden. Mit diesen könnten beispielsweise der Einfluss von biologisch erzeugtem Futter, von Grünfütter und die Auswirkungen des Auslaufs im Freien analysiert werden. Auch könnte eine Analyse des Eiklars und der darin enthaltenen Proteine zusätzliche Informationen darüber geben, ob die Haltung einen Einfluss auf die Eizusammensetzung hat oder ob die Unterschiede lediglich auf das Futter zurückzuführen sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, 71(13), 2554–2557.
- Alum, M. F., Shaw, P. A., Sweatman, B. C., Ubhi, B. K., Haselden, J. N., & Connor, S. C. (2008). 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate (DSA), a promising universal internal standard for NMR-based metabolic profiling studies of biofluids, including blood plasma and serum. *Metabolomics*, 4(2), 122–127.
- Andreotti, G., Trivellone, E., & Motta, A. (2006). Characterization of buffalo milk by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 843–849.
- Anton, M. (2007). Yolk, composition and structure of hen egg. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*. Springer.
- Balsgart, N. M., Mulbjerg, M., Guo, Z., Bertelsen, K., & Vosegaard, T. (2016). High throughput identification and quantification of phospholipids in complex mixtures. *Analytical Chemistry*, 88(4), 2170–2176.
- Barantin, L., Pape, A. Le, & Akoka, S. (1997). A new method for absolute quantitation MRS metabolites. *Magnetic Resonance in Medicine*, 38(2), 179–182.
- Barison, A., Pereira da Silva, C. W., Campos, F. R., Simonelli, F., Lenz, C. A., & Ferreira, A. G. (2010). A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48, 642–650.
- Basmacioğlu, H., Çabuk, M., Ünal, K., Özkan, K., Akkan, S., & Yalçın, H. (2003). Effects of dietary fish oil and flax seed on cholesterol and fatty acid composition of egg yolk and blood parameters of laying hens. *South African Journal of Animal Sciences*, 33(4), 266–273.
- Bauer, P. (1991). Multiple testing in clinical trials. *Statistics in Medicine*, 10(6), 871–890.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6.Auflage). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Belton, P. S., Lyster, R. L. J., & Richards, C. P. (1985). The <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectrum of cows' milk. *Journal of Dairy Research*, 52(1), 47–54.
- Bender, R., Lange, S., & Ziegler, A. (2007). Multiples Testen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2007), 132, 26–29.
- Beyer, T. (2011). *Quantitative NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik Identität, Reinheit und Gehalt von Arzneistoffen*.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 35(May), 5–26.
- Bharti, S. K., Sinha, N., Joshi, B. S., Mandal, S. K., Roy, R., & Khetrapal, C. L. (2008). Improved quantification from <sup>1</sup>H-NMR spectra using reduced repetition times. *Metabolomics*, 4(4), 367–376.
- Bioland e.V. (2018). *Bioland - Richtlinien*. Bioland e.V. [http://www.bioland.de/fileadmin/dateien/HP\\_Dokumente/Richtlinien/Bioland-Richtlinien\\_23\\_Maerz\\_2015\\_web.pdf](http://www.bioland.de/fileadmin/dateien/HP_Dokumente/Richtlinien/Bioland-Richtlinien_23_Maerz_2015_web.pdf)
- Blesso, C. N. (2015). Egg phospholipids and cardiovascular health. *Nutrients*, 7(4), 2731–2747.

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bologa, M., Pop, I. M., Gabriela, C., & Rusu, R. (2014). The assessment of certain heavy metals content in table eggs laid in relation to the production systems (organic vs. conventional). *Journal of Biotechnology*, 185, S72–S125.
- Bölükbaşı, Ş. C., Erhan, M. K., & Kaynar, Ö. (2008). The effect of feeding thyme, sage and rosemary oil on laying hen performance, cholesterol and some proteins ratio of egg yolk and *Escherichia coli* count in feces. *Archiv Für Geflügelkunde*, 72(5), 231–237.
- Bosco, M., Culeddu, N., Toffanin, R., & Pollesello, P. (1997). Organic solvent systems for <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance analysis of lecithin phospholipids: Applications of two-dimensional gradient-enhanced <sup>1</sup>H-detected heteronuclear multiple quantum coherence experiments. *Analytical Biochemistry*, 47(245), 38–47.
- Bovšková, H., Míková, K., & Panovská, Z. (2014). Evaluation of egg yolk colour. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(3), 213–217.
- Braun, S., Kalinowski, H.-O., & Berger, S. (2000). *150 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course, 2nd Edition* (Vol. 77). American Chemical Society.
- Brendel, R. (2016). *Untersuchung des Eifettes von Hühnereiern zur Authentizitätsprüfung mittels <sup>1</sup>H-NMR*. Karlsruhe Institute of Technology.
- Bundesinformationszentrum Landwirtschaft. (2018). *Bericht zur Markt- und Versorgungslage Eier*. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.
- Burton, I. W., Quilliam, M. A., & Walter, J. A. (2005). Quantitative <sup>1</sup>H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry*, 77(10), 3123–3131.
- Callao, M. P., & Ruisánchez, I. (2018). An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control*, 86(4), 283–293.
- Campos, A. M., Ricardo, F., Alves, E., Reis, A., Couto, D., Domingues, P., & Domingues, M. R. M. (2016). Lipidomic investigation of eggs' yolk: Changes in lipid profile of eggs from different conditions. *Food Research International*, 89, 177–185.
- Capozzi, F., Ciampa, A., Picone, G., Placucci, G., & Savorani, F. (2011). Normalization is a necessary step in NMR data processing: Finding the right scaling factors. *Magnetic Resonance in Food Science, The Royal Society of Chemistry*, 332, 147–160.
- Castejón, D., Mateos-Aparicio, I., Molero, M. D., Cambero, M. I., & Herrera, A. (2014). Evaluation and optimization of the analysis of fatty acid types in edible oils by <sup>1</sup>H-NMR. *Food Analytical Methods*, 7(6), 1285–1297.
- Cherian, G., Holsonbake, T. B., & Goeger, M. P. (2002). Fatty acid composition and egg components of specialty eggs. *Poultry Science*, 81(1), 30–33.
- Cherian, G., & Quezada, N. (2016). Egg quality, fatty acid composition and immunoglobulin Y content in eggs from laying hens fed full fat camelina or flax seed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1–8.
- Claridge, T. D. W. (2009). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, 2nd Edition*. Elsevier Science.
- Coorey, R., Novinda, A., Williams, H., & Jayasena, V. (2014). Omega-3 fatty acid profile of eggs from

- laying hens fed diets supplemented with chia, fish oil and flaxseed. *Journal of Food Science*, 80(1), 180–187.
- Cullen, C. H., Ray, G. J., & Szabo, C. M. (2013). A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(11), 705–713.
- Cullis, P. . R., & De Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional Roles of Lipids in. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559, 399–420.
- Demeter. (2018). *Demeter Richtlinien, Erzeugung und Verarbeitung*. Demeter e.V.
- Diehl, B. W. K., & Ockels, W. (1995). Ermittlung der Fettsäureverteilung durch 13C-NMR-Spektroskopie. *Fat Science Technology*, 97(3), 115–118.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., & Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Analytical Chemistry*, 78(13), 4281–4290.
- Ebrahimi, P., Viereck, N., Bro, R., & Engelsen, S. B. (2017). Chemometric analysis of NMR spectra. In *Webb G. (eds) Modern Magnetic Resonance* (pp. 1–20). Springer, Cham.
- Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Ryan, D., Brennan, L., Tenori, L., Luchinat, C., Gao, X., Zeri, A. C., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Steinbeck, C., Salek, R. M., & Wishart, D. S. (2016). Recommendations and standardization of biomarker quantification using NMR-based metabolomics with particular focus on urinary analysis. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 360–373.
- Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, 14(3), 1–23.
- EU Council Directive 1999/74/EC. (1999). Council Directive 1999/74/EC, July 19, 1999. In *Official Journal of the European Communities*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31999L0074>
- Filipiak–Florkiewicz, A., Dereń, K., Florkiewicz, A., Topolska, K., Juszczak, L., & Cieślík, E. (2017). The quality of eggs (organic and nutraceutical vs. conventional) and their technological properties. *Poultry Science*, 96(7), 2480–2490.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Friebolin, H. (2014). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. Fünfte, vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Gadian, D. G., & Robinson, F. N. H. (1979). Radiofrequency losses in NMR experiments on electrically conducting samples. *Journal of Magnetic Resonance*, 34(2), 449–455.
- Galanos, D. S., & Kapoulas, V. M. (1962). Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *Journal of Lipid Research*, 3, 134–136.
- Garcia, C., Lutz, N. W., Confort-Gouny, S., Cozzone, P. J., Armand, M., & Bernard, M. (2012). Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by 31P NMR: Towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, 135(3), 1777–1783.
- Gerhardt, N., Birkenmeier, M., Kuballa, T., Ohmenhaeuser, M., Rohn, S., & Weller, P. (2016).



- Differentiation of the botanical origin of honeys by fast, non-targeted <sup>1</sup>H-NMR profiling and chemometric tools as alternative authenticity screening tool. *Proceedings of the XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*, 33–37.
- Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-Moriah, U. A., Shany, S., Rosenshtrauch, A., & Arad, S. (Malis). (2010). Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*, 12, 1–5.
- Giraudeau, P. (2014). Quantitative 2D liquid-state NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52(6), 259–272.
- Gladkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trzisyka, T., Dobrzanski, Z., & Wawrzenczyk, C. (2011). Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations. *Food Chemistry*, 126(3), 1013–1018.
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and nontargeted wine analysis by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. differentiation of important parameters: Grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619.
- Gorenstein, D. G. (1984). Phosphorous-31 NMR: Principles and applications. In D. G. Gorenstein (Ed.), *Academic Press*.
- Grahn, H. (1986). *Paramagnetic relaxation reagents, NMR studies of preferential solvation*. Umea University.
- Gunstone, F. D. (1993a). <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of fatty acids and derivatives. *LIPIDLIBRARY*, 193, 1–2.
- Gunstone, F. D. (1993b). High-resolution <sup>13</sup>C NMR spectra of long-chain acids, methyl esters, glycerol esters, wax esters, nitriles, amides, alcohols and acetates. *Chemistry and Physics of Lipids*, 66(3), 189–193.
- Gunstone, F. D. (1994). High resolution <sup>13</sup>C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. *Progress in Lipid Research*, 33(1–2), 19–28.
- Gunstone, F. D., & Shukla, V. K. S. (1995). NMR of Lipids. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 31, 219–237.
- Harris, R. K., Becker, E. D., De Cabral Menezes, S. M., Granger, P., Hoffman, R. E., & Zilm, K. W. (2008). Further Conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC recommendations 2008). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(6), 582–598.
- Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., & Dais, P. (2008). Determination of phospholipids in olive oil by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6232–6240.
- Haugh, R. R. (1937). The Haugh unit for measuring egg quality. *U.S. Egg Poultry Magazine*, 43, 552–555.
- Hawke, J. C. (1959). The fatty acids of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine from hen's egg. *The Biochemical Journal*, 71(3), 588–592.
- Helmerich, G., & Koehler, P. (2003). Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6645–6651.

- Hesse, M., Meier, H., & Zeeh, B. (2012). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (8., überar). Georg Thieme Verlag.
- Hidalgo, A., Rossi, M., Clerici, F., & Ratti, S. (2008). A market study on the quality characteristics of eggs from different housing systems. *Food Chemistry*, *106*(3), 1031–1038.
- Holmes, Elaine, Foxall, P. J. D., Nicholson, J. K., Neild, G. H., Brown, S. M., Beddell, C. R., Sweatman, B. C., Rahr, E., Lindon, J. C., & Spraul, M. (1994). Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Analytical Biochemistry*, *220*(2), 284–296.
- Holub, B. J., & Kuksis, A. (1971). Differential distribution of orthophosphate- <sup>32</sup>P and glycerol-<sup>14</sup>C among molecular species of phosphatidylinositols of rat liver in vivo. *Journal of Lipid Research*, *12*(6), 699–705.
- Hoult, D. I. (2011). The principle of reciprocity. *Journal of Magnetic Resonance*, *213*(2), 344–346.
- Huopalathi, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., & Schade, R. (2007). *Bioactive Egg Compounds*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hurd, R. E. (1990). Gradient-enhanced spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, *87*(2), 422–428.
- Jancke, H. (1998). NMR als primäre analytische Meßmethode. *Nachrichten Aus Der Chemie*, *46*(7-8), 720–722.
- Juneja, L. R. (1997). Egg yolk lipids. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, H. Hatta, & M. Kim (Eds.), *Hen eggs, basic and applied science* (pp. 73–98). CRC Press.
- Kaffarnik, S., Ehlers, I., Gröbner, G., Schleucher, J., & Vetter, W. (2013). Two-dimensional <sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H NMR spectroscopic profiling of phospholipids in cheese and fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(29), 7061–7069.
- Kahl, D. (2017). *Charakterisierung von Eihaltstoffen mittels NMR*. Karlsruhe Institute of Technology.
- Ke-Shun, L. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*(11), 1179.
- Kessler, W. (2007). *Multivariate Datenanalyse*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Kivini, H., Järvenpää, E. P., Aro, H., Huopalahti, R., & Ryhänen, E.-L. (2004). Qualitative and quantitative liquid chromatographic analysis methods for the determination of the effects of feed supplements on hen egg yolk phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(13), 4289–4295.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, *47*(260), 583–621.
- Kuksis, A., & Marai, L. (1967). Determination of the complete structure of natural lecithins. *Lipids*, *2*(3), 217–224.
- L 06.00-6 BVL. (2014). Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleischerzeugnissen; Gravimetrisches Verfahren nach Weibull-Stoldt, Referenzverfahren. *Amtliche Methodensammlung § 64 LFGB No L 06.00-6*.
- L 13.00-45 BVL. (2018). Tierische und pflanzliche Fette und Öle; Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern; Teil 1: Leitfaden für die moderne Gaschromatographie von

Fettsäuremethylesterne. *Amtliche Methodensammlung § 64 LFGB, L 13.00-45.*

- Langevin, D. (1992). Micelles and microemulsions. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43(1), 341–369.
- Larive, C. K., Jayawickrama, D., & Orfi, L. (1997). Quantitative analysis of peptides with NMR spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 51(10), 1531–1536.
- Led, J. J., & Gesmar, H. (1991). Application of the linear prediction method to NMR spectroscopy. *Chemical Reviews*, 91(7), 1413–1426.
- Lendrath, G., Bonekamp-Nasner, A., & Kraus, L. (1991). Analytische Möglichkeiten zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Phospholipide in Lecithinen unterschiedlicher Herkunft. *Lipid / Fett*, 93(2), 53–61.
- Li-Chan, E. C. Y., Powrie, W. D., & Nakai, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. In W. J. Stadelman, D. Newkirk, & L. Newby (Eds.), *Egg Science and Technology* (4th editio, p. 105). Food Product Press.
- Liu, X., Zhao, H. L., Thiessen, S., House, J. D., & Jones, P. J. H. (2010). Effect of plant sterol-enriched diets on plasma and egg yolk cholesterol concentrations and cholesterol metabolism in laying hens. *Poultry Science*, 89(2), 270–275.
- Löfgren, L., Ståhlman, M., Forsberg, G.-B., Saarinen, S., Nilsson, R., & Hansson, G. I. (2012). The BUMÉ method: A novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1690–1700. <https://doi.org/10.1194/jlr.D023036>
- London, E., & Feigenson, G. W. (1979). Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents. *Journal of Lipid Research*, 20(3), 408–412.
- Longobardi, F., Ventrella, A., Napoli, C., Humpfer, E., Schütz, B., Schäfer, H., Kontominas, M. G., & Sacco, A. (2012). Classification of olive oils according to geographical origin by using <sup>1</sup>H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 130(1), 177–183.
- Lutz, N. W., & Cozzone, P. J. (2010a). Multiparametric optimization of <sup>31</sup>P NMR spectroscopic analysis of phospholipids in crude tissue extracts. 1. Chemical shift and signal separation. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5433–5440.
- Lutz, N. W., & Cozzone, P. J. (2010b). Multiparametric optimization of <sup>31</sup>P NMR spectroscopic analysis of phospholipids in crude tissue extracts. 2. Line width and spectral resolution. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5433–5440.
- Lutz, N. W., & Cozzone, P. J. (2013). Principles of multiparametric optimization for phospholipidomics by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Biophysical Reviews*, 5(4), 295–304.
- Mahmoud, K., Gharaibeh, S., & Qatramiz, A. (1984). Effect of garlic (*allium sativum*) supplementation on egg quality and yolk cholesterol in layer hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 23(11), 1–6.
- Malewicz, B., & Baumann, W. J. (1996). Alk-1-enylacyl, alkylacyl, and diacyl subclasses of native ethanolamine and choline glycerophospholipids can be quantified directly by phosphorus-<sup>31</sup> NMR in solution. *Lipids*, 31(11), 1189–1195.
- Malz, F. (2003). *Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren in der analytischen Chemie*. Humboldt-Universität Berlin.
- Mannina, L., Sobolev, P. A., & Segre, A. (2003). Olive oil as seen by NMR and chemometrics.

*Spectroscopy Europe*, 15(3), 6–14.

- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl- *tert* -butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 1137–1146.
- McCollum, E. V., Halpin, J. G., & Drescher, A. H. (1912). Synthesis of lecithin in the hen and the character of the lecithins produced. *The Journal of Biological Chemistry*, 13, 219–224.
- McLaughlin, A. C., Cullis, P. R., Berden, J. A., & Richards, R. E. (1975). <sup>31</sup>P NMR of phospholipid membranes: Effects of chemical anisotropy at high magnetic field strengths. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 20(1), 146–165.
- Meneses, P., & Glonek, T. (1988). High resolution <sup>31</sup>P NMR of extracted phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 29(5), 679–689.
- Mine, Y. (2008). *Egg Bioscience and Biotechnology*. Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Monakhova, Y. B., Betzgen, M., & Diehl, B. W. K. (2016). <sup>1</sup>H NMR as a release methodology for the analysis of phospholipids and other constituents in infant nutrition. *Analytical Methods*, 8(41), 7493–7499.
- Monakhova, Y. B., Ruge, W., Kuballa, T., Ilse, M., Winkelmann, O., Diehl, B., Thomas, F., & Lachenmeier, D. W. (2015). Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 182, 178–184.
- Mooney, J. R. (1989). *Analytical NMR* (L. D. Field & S. Sternhell (eds.)). John Wiley & Sons, Chichester.
- Mugnai, C., Sossidou, E. N., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., Mattioli, S., Castellini, C., Bosco, D., Ruggeri, S., & Castellini, C. (2014). The effects of husbandry system on the grass intake and egg nutritive characteristics of laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 459–467.
- Müller, E. (2006). Welchen Marktwert hat artgerecht Tierhaltung? *Verbraucherzentrale Bundesverband e.V.*
- Murgia, S., Mele, S., & Monduzzi, M. (2003). Quantitative characterization of phospholipids in milk fat via <sup>31</sup>P NMR using a monophasic solvent mixture. *Lipids*, 38(5), 585–591.
- Na, J.-C., Song, J.-Y., Lee, B.-D., Lee, S.-J., Lee, C.-Y., & An, G.-H. (2004). Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 117(3), 305–315.
- Naes, T., Isaksson, T., & Fearn, T. (2002). *A user friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester, UK.
- Naturland. (2014). *Naturland Richtlinien Erzeugung*. Naturland - Verband für ökologischen Landbau e. V.
- Oliveira, D. D., Baião, N. C., Cançado, S. V., Grimaldi, R., Souza, M. R., Lara, L. J. C., & Q Lana, A. M. (2010). Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. *Poultry Science*, 89(11), 2484–2490.
- Otto, M. (1999). *Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry*.
- Palacios, L. E., & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(8), 571–578.

- Pati, S., Nie, B., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2016). Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomedical Chromatography*, *30*(5), 695–709.
- Pauli, G. F., Gödecke, T., Jaki, B. U., & Lankin, D. C. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR. Development and potential of an analytical method: An update. *Journal of Natural Products*, *75*(4), 834–851.
- Pauli, G. F., Jaki, B. U., & Lankin, D. C. (2005). Quantitative <sup>1</sup>H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products*, *68*(1), 133–149.
- Pearce, J. T. M., Athersuch, T. J., Ebbels, T. M. D., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Keun, H. C. (2008). Robust algorithms for automated chemical shift calibration of 1D <sup>1</sup>H NMR spectra of blood serum. *Analytical Chemistry*, *80*(18), 7158–7162.
- Pearce, J. M., & Komoroski, R. A. (1993). Resolution of phospholipid molecular species by <sup>31</sup>P NMR. *Magnetic Resonance in Medicine*, *29*(6), 724–731.
- Pearce, J. M., & Komoroski, R. A. (2000). Analysis of phospholipid molecular species in brain by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, *44*(2), 215–223.
- Radin, N. S., Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, *426*(1), 420–426.
- Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G. J., Mohd Fauzi, N., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2013). A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *Journal of Lipid Research*, *54*(7), 1812–1824.
- Rhodes, D. N. (1958). Phospholipids. 5. The effect of cod-liver oil in the diet on the composition of hen's egg phospholipids. *The Biochemical Journal*, *68*(2), 380–384.
- Rhodes, D. N., & Lea, C. H. (1957). On the composition of hen's egg phospholipids. *Biochemical Journal*, *65*(3), 526–531.
- Roberts, J. R. (2004). Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science*, *41*(3), 161–177.
- Rogers, K. M. (2009). Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(10), 4236–4242.
- Rogers, K. M., Ruth, S. Van, Alewijn, M., van Ruth, S., Alewijn, M., Philips, A., & Rogers, P. (2015). Verification of egg farming systems from the Netherlands and New Zealand using stable isotopes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(38), 8372–8380.
- Sacchi, R., Addeo, F., & Paolillo, L. (1997). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *35*(13), S133–S145.
- Sacchi, R., Medina, I., Paolillo, L., & Addeo, F. (1994). High-resolution <sup>13</sup>C-NMR olefinic spectra of DHA and EPA acids, methyl esters and triacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, *69*(1), 65–73.
- Sachs, L. (1999). *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden* (9th ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Salma, U., Miah, A. G., Maki, T., Nishimura, M., & Tsujii, H. (2007). Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poultry Science*, *86*(9), 1920–1926.
- Savorani, F., Rasmussen, M. A., Mikkelsen, M. S., & Engelsen, S. B. (2013). A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*, *54*(1),

1131–1145.

- Schiller, J., & Arnold, K. (2002). Application of high resolution  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy to the characterization of the phospholipid composition of tissues and body fluids - a methodological review. *Medical Science Monitor*, 8(11), 205–222.
- Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2006). Xanthophylls in commercial egg yolks: Quantification and identification by HPLC and LC-(APCI)MS using a C30 phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2267–2273.
- Schreiner, M., Moreira, R. G., & Hulan, H. W. (2005). Positional distribution of fatty acids in egg yolk lipids. *Journal of Food Lipids*, 13(2006), 36–56.
- Schütz, B. (2012). *Toleranzbereiche für  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Neugeborenenurinen*.
- Sheppard, A. J., & Iverson, J. L. (2012). Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatographic Science*, 13(9), 448–452.
- Sirri, F., & Meluzzi, A. (2011). 14-Modifying egg lipids for human health. In F. Van Immerseel, Y. Nys, & M. Bain (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* (pp. 272–288). Woodhead Publishing.
- Skiera, C., Steliopoulos, P., Kuballa, T., Holzgrabe, U., & Diehl, B. (2012). Determination of free fatty acids in edible oils by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Lipid Technology*, 24(12), 279–281.
- Soininen, P., Haarala, J., Vepsäläinen, J., Niemitz, M., & Laatikainen, R. (2005). Strategies for organic impurity quantification by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy: Constrained total-line-shape fitting. *Analytica Chimica Acta*, 542(2), 178–185.
- Sotirhos, N., Herslöf, B., & Kenne, L. (1986). Quantitative analysis of phospholipids by  $^{31}\text{P}$ -NMR. *Journal of Lipid Research*, 27(4), 386–392.
- Sousa, S. A. A., Magalhães, A., & Ferreira, M. M. C. (2013). Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 122, 93–102.
- Sparling, M. L., Zidovetzki, R., Muller, L., & Chan, S. I. (1989). Analysis of membrane lipids by 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR. *Analytical Biochemistry*, 178(1), 67–76.
- Speake, B. K., Murray, A. M. B., & C. Noble, R. (1998). Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Progress in Lipid Research*, 37(1), 1–32.
- Spraul, M., Schütz, B., Humpfer, E., Mörtter, M., Schäfer, H., Koswig, S., & Rinke, P. (2009). Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47, 130–137.
- Spyros, A., & Dais, P. (2009).  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 54(3–4), 195–207.
- Spyros Apostolos, & Dais Photis. (2000). Application of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in food analysis. 1. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 48(3), 802–805.
- Stadelman, W. J., Newkirk, D., Newby, L., & Cotterill, O. J. (1995). *Egg science and technology* (4th editio). Food Product Press.
- Steliopoulos, P. (2013). Validierung PCA-gestützter Analysemethoden zur Authentizitätskontrolle von Lebensmitteln. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 8(1–2), 71–77.

- Suárez, E. R., Mugford, P. F., Rolle, A. J., Burton, I. W., Walter, J. A., & Kralovec, J. A. (2010).  $^{13}\text{C}$ -NMR regioisomeric analysis of EPA and DHA in fish oil derived triacylglycerol concentrates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*(12), 1425–1433.
- Takagi, T., & Ando, Y. (1991). Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols by chiral high-performance liquid chromatography. *Lipids*, *26*(7), 542–547.
- Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung. (2015). Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung. In *Bundesgesetzblatt*.
- Tynkkynen, T. (2012).  *$^1\text{H}$  NMR analysis of serum lipids* [University of Eastern Finland]. [http://epublications.uef.fi/pub/urn\\_isbn\\_978-952-61-0839-1/urn\\_isbn\\_978-952-61-0839-1.pdf](http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_978-952-61-0839-1/urn_isbn_978-952-61-0839-1.pdf)
- U.S. Department of Agriculture. (2000). *Egg grading manual* (75th ed.). [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Egg Grading Manual.pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Egg%20Grading%20Manual.pdf)
- Van Ruth, S., Alewijn, M., Rogers, K., Newton-Smith, E., Tena, N., Bollen, M., & Koot, A. (2010). Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, *126*(3), 1299–1305.
- VO(EG) Nr. 834. (2007). Council Regulation (EC) No 834/2007, June 28, 2007. In *Official Journal of the European Union*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32007R0834>
- VO(EG) Nr. 889. (2008). Commission Regulation (EC) No 889/2008. In *Official Journal of the European Communities*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32008R0889>
- Vogel, H. J., Lundberg, P., Fabiansson, S., Rudéus, H., & Tornberg, E. (1985). Post-mortem energy metabolism in bovine muscles studied by non-invasive phosphorus- $^{31}$  nuclear magnetic resonance. *Meat Science*, *13*(1), 1–18.
- Wang, Y., & Hollingsworth, R. I. (1995). A solvent system for the high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of membrane lipids. *Analytical Biochemistry*, *225*(2), 242–251.
- Weber, M., Hellriegel, C., Rueck, A., Wuethrich, J., Jenks, P., & Obkircher, M. (2015). Method development in quantitative NMR towards metrologically traceable organic certified reference materials used as  $^{31}\text{P}$  qNMR standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(11), 3115–3123.
- Wider, G., & Dreier, L. (2006). Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(8), 2571–2576.
- Winning, H., Larsen, F. H., Bro, R., & Engelsen, S. B. (2008). Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *Journal of Magnetic Resonance*, *190*(1), 26–32.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., & Sykes, B. D. (1995).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, *6*(2), 135–140.
- Xia, W., Budge, S. M., & Lumsden, M. D. (2015). New  $^1\text{H}$  NMR-based technique to determine epoxide concentrations in oxidized oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(24), 5780–5786.
- Yang, P. K., Tian, Y. D., Sun, G. R., Jiang, R. R., Han, R. L., & Kang, X. T. (2013). Deposition rule of yolk

cholesterol in two different breeds of laying hens. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 5786–5792.

Zamora, R., Alba, V., & Hidalgo, F. J. (2001). Use of high-resolution <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(1), 89–94.

Zhao, Y., Xiong, Y., & Curtis, J. M. (2017). Measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry : The determination of choline containing compounds in foods measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography co. *Journal of Chromatography A*, 1218(32), 5470–5479.



# 7 Chemikalien und Instrumente

## 7.1 Chemikalien

Für alle Experimente, die in Kapitel 8 aufgeführt sind, wurden Chemikalien von höchstmöglicher Reinheit, mindestens aber mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ verwendet. Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde soweit nicht anders angegeben demineralisiertes Wasser verwendet.

Tabelle 7-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	GHS-Symbol/e	H-Sätze	P-Sätze
<b>1-(3-sn-Phosphatidyl)-rac-glycerol Natriumsalz aus Eigelb Lecithin (≥ 99,0 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Arachidonsäuremethylester (&gt; 99,5 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Arachinsäuremethylester (≥ 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Behensäuremethylester (&gt; 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Caesiumhydroxid 50 wt. % in H<sub>2</sub>O (99%)</b>	Sigma-Aldrich	GHS05, GHS07	H302, H314	P280, P305+P351+P338, P310
<b>Cardiolipin Natriumsalz aus Rinderherz (≥ 97 %) CDTA</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Chlorform-<i>d</i>1 (99,8 Atom % D, stabilisiert mit Ag)</b>	Roth	GHS06, GHS08	H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372	P201, P260, P264, P280, P304+P340+P312, P403+P233
<b>Chloroform (≥ 99,8 %)</b>	Merck	GHS06, GHS08	H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372	P201, P260, P264, P280, P304+P340+P312, P403+P233
<b>Cholesterin aus Lanolin (≥ 99,9 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Docosadiensäuremethylester (&gt; 98 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Docosahexaensäuremethylester (98 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Docosapentaensäuremethylester (&gt; 97 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Docosatetraensäure (≥ 98 %)</b>	Cayman Cemical (Michigan, USA)	-	-	-
<b>Eicosadiensäuremethylester</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-

Chemikalien	Hersteller	GHS-Symbol/e	H-Sätze	P-Sätze
( > 98 %)				
<b>Eicosapentaensäuremethylester (&gt; 98,5 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Eicosensäuremethylester (&gt; 98 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Erucasäuremethylester (&gt; 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Gamma-Linolensäuremethylester (&gt; 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Lignocerinsäuremethylester (&gt; 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Linolensäuremethylester (-)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Linolsäuremethylester (-)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Lysophosphatidylcholin aus Hühnerei</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>L-<math>\alpha</math>- Glycerophosphorylcholin (&gt;99,9%)</b>	Carbosynth (Compton, United Kingdom)	-	-	-
<b>L-<math>\alpha</math>- Lysophosphatidylethanolamin aus Eigelb (<math>\geq</math> 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>L-<math>\alpha</math>- Phosphatidylcholin aus Eigelb (<math>\geq</math> 99 %), lyophilisiert</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>L-<math>\alpha</math>- Phosphatidylethanolamin aus Eigelb (<math>\geq</math> 97 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Methanol (<math>\geq</math> 99,9 %)</b>	Merck	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301+H311+H331, H370	P210, P280, P302+P352+P312, P304+P340+P312, P370+P378, P403+P235
<b>Methanol-<i>d</i>4 (<math>\geq</math> 99,8 % Atom D)</b>	Merck	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301+H311+H331, H370	P210, P280, P302+P352+P312, P304+P340+P312, P370+P378, P403+P235
<b>Natriumchlorid (<math>\geq</math> 99,5 %)</b>	Merck	-	-	-
<b><i>n</i>-Heptan (<math>\geq</math> 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225, H304, H315, H336, H410	P210, P301+P310, P331, P370+P378, P403+P235

Chemikalien	Hersteller	GHS-Symbol/e	H-Sätze	P-Sätze
<b>n-Hexan (zur Analyse)</b>	Merck	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225-H304-H315-H336-H361f-H373-H411	P201, P210, P273, P301+P310, P308+P313, P331
<b>Nonadecansäuremethylester (&gt; 99,5 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Ölsäuremethylester (puriss)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Önanthsäuremethylester (&gt; 99 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Phosphatidylinositol Natriumsalz aus Soja (≥98 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Salzsäure, 37 %ig</b>	Sigma-Aldrich	GHS05, GHS07	H290, H314, H335	P261, P280, P305+P351+P338, P310
<b>Sphingomyelin aus Eigelb (≥ 98,0 %)</b>	Sigma-Aldrich	-	-	-
<b>Tert-Butylmethylether (≥ 99,5 % p.a.)</b>	Roth	GHS02, GHS07	H225, H315	P210, P280, P302+P352
<b>Tetramethylsilan (≥ 99,9 %)</b>	Roth	GHS02	H224	P210
<b>trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure Monohydrat (CDTA) (≥99 %)</b>	Roth	GHS07	H315, H319	P280, P302+P352, P305+P351+P338, P337+P313
<b>Trimethylsulfoniumhydroxid in Methanol</b>	Roth	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301+H311+H331, H370	P210, P280, P301+P310, P303+P361+P353, P308+P311
<b>Triphenylphosphat (≥99 %)</b>	Sigma-Aldrich	GHS09	H410	P273, P501

## 7.2 Hergestellte Lösungen und Reagenzien

Tabelle 7-2: Lösungen und Reagenzien der Eifettextraktion und der <sup>1</sup>H NMR Messung

Lösung	Herstellung
<b>Chloroform-<i>d</i>1 mit 0,1 % Tetramethylsilan</b>	500 ml Chloroform- <i>d</i> 1 mit 0,5 ml Tetramethylsilan versetzen
<b>Messlösung für <sup>1</sup>H NMR</b>	Chloroform- <i>d</i> 1 (Tetramethylsilan)/Methanol- <i>d</i> 4 im Verhältnis (v/v) 3:2 mischen
<b>CDTA-Pufferlösung 0,2 M, pH 6</b>	1,822 g CDTA in 25 mL demineralisiertem Wasser lösen, mit CsOH und HCL auf pH 6 einstellen
<b>Interner Standard gelöst in MeOH-<i>d</i>4 für die <sup>31</sup>P NMR Messung</b>	116,155 mg Glycerophosphatidylcholin in 20 mL MeOH- <i>d</i> 4 lösen

Lösung	Herstellung
<b>Messlösung mit internem Standard für die <sup>31</sup>P NMR Messung</b>	Chloroform- <i>d</i> 1 (Tetramethylsilan)/Methanol- <i>d</i> 4 (Glycerophosphatidylcholin)/CDTA-Pufferlösung (0,2 M, pH 6) im Verhältnis (v/v/v, 582/358/60) mischen
<b>Messlösung für <sup>31</sup>P NMR</b>	Chloroform- <i>d</i> 1 (Tetramethylsilan)/Methanol- <i>d</i> 4/CDTA-Pufferlösung (0,2 M, pH 6) im Verhältnis (v/v/v, 582/358/60) mischen
<b>Eifettextraktionslösung</b>	Chloroform/Methanol/demineralisiertes Wasser im Verhältnis (v/v/v) 10:5:1 mischen
<b>Natriumchloridlösung (0,05 mol/l)</b>	0,146 g Natriumchlorid in 50 ml demineralisiertem Wasser lösen

Tabelle 7-3: Lösungen und Reagenzien für die gaschromatische Untersuchung der Fettsäuremethylester

Lösung	Herstellung
<b>Methanolische Kalilauge (2 M)</b>	1,122 g Kaliumhydroxid in 10 ml Methanol lösen
<b>Referenzstammlösung 1 „Butter-Margarine-Test“</b>	Butter und gehärtete Pflanzenmargarine zu circa gleichen Teilen miteinander schmelzen und mit Natriumsulfat trocknen. 10 % Nachtkerzenöl und 2 % Ricinusöl hinzufügen und mischen. 100 mg der Fettmischung mit 2,5 ml Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung versetzen und über Nacht stehen lassen.
<b>Referenzstammlösung 2 „Butter-Margarine-Test“</b>	Jeweils 10-20 mg der folgenden Fettsäuremethylester in 10 ml <i>tert</i> -Butylmethylether lösen: Docosahexaensäuremethylester C22:6 ( $\Delta$ -4,7,10,13,16,19) Behensäuremethylester C22:0 Eicosensäuremethylester C20:1 ( $\Delta$ -11) Eicosadiensäuremethylester C20:2 ( $\Delta$ -11,14) Eicosapentaensäuremethylester C20:5 ( $\Delta$ -5,8,11,14,17) Erucasäuremethylester C22:1 ( $\Delta$ -13) Lignocerinsäuremethylester C24:0 Önanthsäuremethylester C7:0 Nonadecansäuremethylester C19:0 Arachinsäuremethylester C20:0
<b>Referenzlösung „Butter-Margarine-Test“</b>	4 ml der Referenzstammlösung 1 und 1 ml der Referenzstammlösung 2 vermischen
<b>Referenzstammlösung „Omega-Test“ (1-5 mg/ml)</b>	Jeweils 10 - 50 mg der folgenden Fettsäuremethylester in 10 ml <i>n</i> -Heptan lösen: Ölsäuremethylester C18:1 $\Delta$ -9 Linolsäuremethylester C18:2 $\Delta$ -9,12 gamma-Linolensäuremethylester C18:3 $\Delta$ -6,9,12 alpha-Linolensäuremethylester C18:3 $\Delta$ -9,12,15 Arachidonsäuremethylester C20:4 $\Delta$ -5, 8,11,14 Docosadiensäuremethylester C22:2 $\Delta$ -13,16 Eicosapentaensäuremethylester C20:5 $\Delta$ -5,8,11,14,17 Docosapentaensäuremethylester C22:5 $\Delta$ -7,10,13,16,19 Docosahexaensäuremethylester C22:6 $\Delta$ -4,7,10,13,16,19
<b>Referenzlösung „Omega-Test“ (100-500 µg/ml)</b>	100 µl Referenzstammlösung „Omega-Test“ mit 900 µl <i>n</i> -Heptan auf 1 ml auffüllen

## 7.3 Instrumente und Materialien

Tabelle 7-4: Verwendete Instrumente

<b>Instrumentbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Probenaufarbeitung</b>	
<b>Gefriertrockner</b>	VaCo 5, Zirbus technology (Drehschieberpumpe RV8 von Edwards) (Bad Grund, Deutschland)
<b>Thermischer Verdampfer</b>	Techne Sample Concentrator Dri Block DB-3D, Biostep (Burkhardtsdorf, Deutschland)
<b>Vakuumverdampfer</b>	Syncore Polyvap R-12, Büchi Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland)
<b>Reagenzglasschüttler</b>	Multi Reax, Heidolph (Schwabach, Deutschland)
<b>NMR</b>	
<b>NMR Spektrometer</b>	Bruker 400 MHz AVANCE III HD NanoBay Spektrometer (Rheinstetten, Deutschland)
<b>Probengeber</b>	SampleXpress, Bruker Biospin (Rheinstetten, Deutschland)
<b>Probenkopf</b>	5 mm BBO mit z-Gradientenspulen, Bruker Biospin (Rheinstetten, Deutschland)
<b>GC</b>	
<b>Gaschromatograph GC/FID</b>	GC System 7890 B Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
<b>Autosampler GC</b>	Autosampler 7693, Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
<b>Säule GC</b>	DB-225, 30 m x 0,25 mm, 0,25µm, Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

Tabelle 7-5: Verwendete Materialien

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Faltenfilter (Durchmesser 150 mm)</b>	Macherey - Nagel (Düren, Deutschland)
<b>Glasperlen (Durchmesser 7 mm)</b>	Marienfeld Superior (Lauda Königshofen, Deutschland)
<b>Kunststoffröhrchen mit Drehverschluss (50 mL)</b>	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
<b>NMR Probenröhrchen (5 ml) Boro 400-5-7</b>	Deutero (Kastellaun, Deutschland)

# 8 Arbeitsvorschriften

## 8.1 Ausgangsmaterialien

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 382 Eierproben für die Untersuchung und Validierung verwendet. Tabelle 8-1 gibt einen Überblick über die Herkunft und die Legehennenhaltungssysteme der untersuchten Hühnereierproben.

Tabelle 8-1: Überblick über die Herkünfte und die Legehennenhaltung der untersuchten Eierproben

<b>Bundesländer (Deutschland)</b>	<b>Bio</b>	<b>Boden</b>	<b>Freiland</b>	<b>Gesamt</b>
Baden-Württemberg (BW)	63	96	32	191
Bayern (BY)	11	7	4	22
Brandenburg (BB)	2	1	1	4
Hamburg (HH)	-	1	2	3
Hessen (HE)	2	3	1	6
Mecklenburg-Vorpommern (MV)	15	-	-	15
Niedersachsen (NI)	34	11	2	47
Nordrhein-Westfalen (NRW)	2	10	1	13
Rheinland-Pfalz (RP)	1	4	2	7
Saarland (SL)	1	-	-	1
Sachsen (SN)	1	2	-	3
Sachsen-Anhalt (ST)	-	1	2	3
Schleswig-Holstein (SH)	-	5	1	6
Thüringen (TH)	2	2	2	6
<b>Europäisches Ausland</b>	<b>Bio</b>	<b>Boden</b>	<b>Freiland</b>	<b>Gesamt</b>
Niederlande (NL)	11	16	11	38
Spanien (ES)	4	-	-	4
Slowenien (SI)	1	-	-	1
Finnland (FIN)	1	1	-	2
Österreich (AT)	-	2	-	2
Polen (PL)	-	1	-	1
Kroatien (HR)	-	1	-	1
Italien (IT)	-	-	3	3
Belgien (B)	-	-	1	1
Dänemark (DK)	1	-	-	1
Litauen (LT)	1	-	-	1
<b>Gesamt</b>	<b>153</b>	<b>164</b>	<b>65</b>	<b>382</b>
<b>R-Probe</b>	-	-	1 (*)	

\* Eier aus Freilandhaltung, aus Baden-Württemberg

## 8.2 Extraktion des Eifettes aus Hühnereigelb

### 8.2.1 Aufarbeitung für frische Eier

- Die Eier aus einer Packung (6-20 Stück abhängig von der Packungsgröße) aufschlagen
- Eiklar und Eigelb voneinander trennen
- Beide Komponenten einzeln mittels Schneebesen o.ä. homogenisieren
- Das homogenisierte Eiklar in ein geeignetes Behältnis überführen, dicht verschließen und bei -20 °C tiefkühlen

- Vom homogenisierten, aufgetauten Eigelb ca. 20-30 g für die Gefriertrocknung entnehmen, in 2-3 Petrischalen umfüllen und bei -20 °C tiefkühlen

## 8.2.2 Aufarbeitung für gefrorenes Eigelb

- Das tiefgefrorene Eigelb über Nacht im Kühlschrank oder ca. 4 h bei Raumtemperatur auftauen
- Das zähflüssige Eigelb mit einem geeigneten Spatel in 1-2 Petrischalen ausstreichen und bei -20 °C tiefkühlen

## 8.2.3 Gefriertrocknung

- Das tiefgefrorene Eigelb mit den Petrischalen zusammen auf den Stellflächen des Gefriertrockners verteilen
- Es wird folgendes Temperaturprogramm eingestellt: Programm 1, CVUA EI

Tabelle 8-2: Temperatur- und Druckprogramm für die Gefriertrocknung von Eigelb

Vakuum [mbar]	Stellflächentemperatur [°C]	Zeit [h]
3,4	0	6
1,0	15	6
0,5	30	6

- Das gefriergetrocknete Eigelb nach der Gefriertrocknung vorsichtig aus den Petrischalen entnehmen
- Klein zerteilen und in ein dicht verschließbares Probenbehältnis, bei -20 °C tiefkühlen
- Im tiefgekühlten Zustand mit einem Mörser fein vermahlen
- Die anschließende Lagerung erfolgt in einem geeigneten Probenbehältnis bei -20 °C

## 8.2.4 Extraktion des Eifettes

Die Extraktion des gefriergetrockneten Eigelbs ist in Abbildung 8-1 schematisch dargestellt.

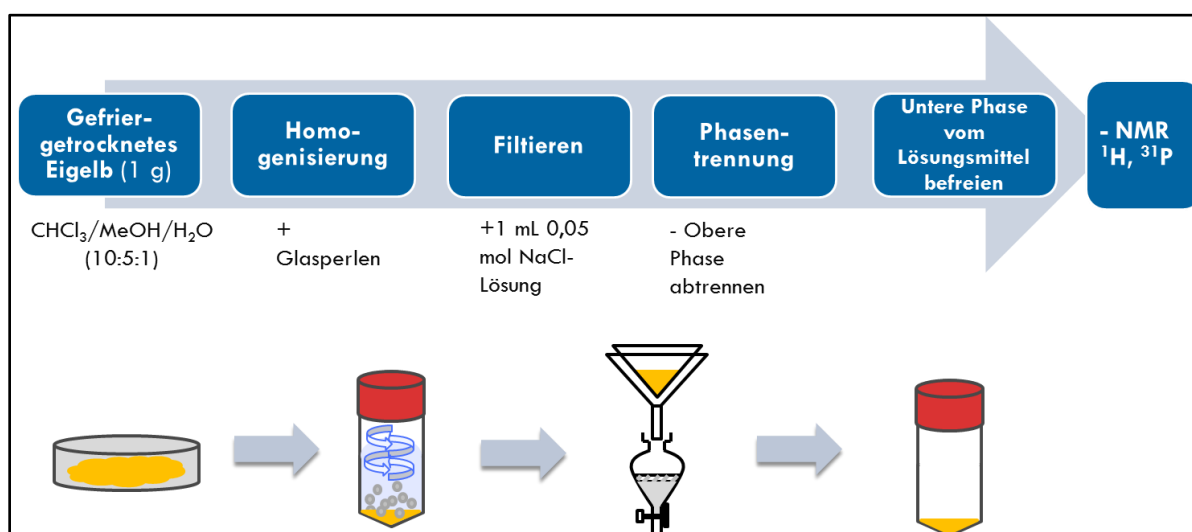


Abbildung 8-1: Schematische Darstellung der Extraktion des gefriergetrockneten Eigelbs

- 1 g gefriergetrocknetes Eigelb in einem 50 mL Kunststoffröhrchen einwiegen und mit 10 Glasperlen versetzen

- 10 mL des Extraktionsgemisches aus Chloroform/Methanol/Wasser 10:5:1 (v/v/v) hinzugeben und 10 Minuten mittels Reagenzglasschüttlers (ca. 1600 U/min) homogenisieren
- Das Homogenisat durch einen Faltenfilter in einen 250 mL Schütteltrichter filtrieren
- Mit 5 mL Fett-Extraktionsgemisch nachspülen und über den Faltenfilter zur Probenlösung hinzugeben
- 1 mL NaCl-Lösung (0,05 mol/L) in den Schütteltrichter zur Phasentrennung hinzu pipettieren
- Das Gemisch mehrere Male schütteln und anschließend 20 Minuten zur Phasentrennung stehen lassen
- Die untere Phase bis kurz vor der Phasengrenze ablassen
- Das Lösungsmittel mittels Syncore Polyvap (Büchi) entfernen (50 °C, 300 rpm, 3 Stunden und 11 Minuten)

Tabelle 8-3: Vakuumgradient zur Lösungsmittelentfernung unter Verwendung eines Vakuumverdampfers

Stufe	Startvakuum [mbar]	Endvakuum [mbar]	Zeitintervall [Minuten]
1	200	100	30
2	100	40	1
3	40	30	160

- Die abgedampften Proben in 4 mL CHCl<sub>3</sub> vollständig lösen und in ein 50 mL Kunststoffröhrchen überführen
- Die Proben mittels thermischen Verdampfers unter Stickstoffstrom bei 50 °C vollständig vom Restlösungsmittel befreien
- Das isolierte Fett bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei ca. 5-8 °C lagern

## 8.3 Messung der Eifettproben

### 8.3.1 <sup>1</sup>H NMR Messung

- 50 mg des extrahierten Eifettes in 1 mL Messlösungsmittelgemisch bestehend aus CDCl<sub>3</sub>/MeOD (3:2) lösen
- 600 µL davon in ein 5 mm NMR Röhrchen überführen und messen
- Die Akquisitionsparameter sind in Tabelle 8-4 aufgeführt

Tabelle 8-4: Akquisitionsparameter für die <sup>1</sup>H NMR Messung von Eifett

<b><sup>1</sup>H NMR Akquisitionparameter</b>			
<b>NMR Spektrometer</b>	Ascend, 400 MHz	<b>D1 [sec]</b>	3,0
<b>Messprogramm</b>	1H_Eifett	<b>Puls [µsec]</b>	9,51
<b>Pulsprogramm</b>	zg30	<b>RG</b>	45,2
<b>NS</b>	128	<b>Temperatur [K]</b>	290
<b>DS</b>	2	<b>TD</b>	131072



<b>Spektrale Breite [ppm]</b>	15,0191	<b>Solvent</b>	CDCl <sub>3</sub> +MeOD
<b>AQ [sec]</b>	10,905	<b>Digmod</b>	baseopt

- Die Prozessierungsparameter sind in Tabelle 8-5 dargestellt
- Die Prozessierung der Spektren erfolgt mit einer automatischen Phasen- und Basislinienkorrektur

Tabelle 8-5: Prozessierungsparameter für die <sup>1</sup>H NMR Spektren von Eifett

<b><sup>1</sup>H NMR Prozessierungsparameter</b>			
<b>Software</b>	TopSpin 3.2	<b>GB</b>	0,01
<b>SI</b>	131072	<b>Phasenkorrektur</b>	apk/apk0
<b>WDW</b>	GM	<b>Basislinienkorrektur</b>	absn
<b>LB</b>	-0,01	<b>Macro</b>	exam_Ei

- Die Qualität der Spektren an der Halbwertsbreite des TMS-Signals überprüfen
- Die Halbwertsbreite des TMS-Signals darf maximal 1,2 Hz betragen
- Proben mit größerer Halbwertsbreite als 1,2 Hz am TMS-Signal nicht für die Auswertung verwenden, sondern erneut messen bzw. aufarbeiten

### 8.3.2 <sup>13</sup>C NMR Messung

- 50 mg des extrahierten Eifettes in 1 mL Messlösungsmittelgemisch bestehend aus CDCl<sub>3</sub>/MeOD (3:2) lösen
- 600 µL davon in ein 5 mm NMR Röhrchen überführen und messen
- Die Akquisitionsparameter sind in Tabelle 8-6 aufgeführt

Tabelle 8-6: Akquisitionsparameter für die <sup>13</sup>C NMR Messung von Eifett

<b><sup>13</sup>C NMR Akquisitionparameter</b>			
<b>NMR Spektrometer</b>	Ascend, 400 MHz	<b>D1 [sec]</b>	2
<b>Messprogramm</b>	13C_Eifett	<b>Puls [µsec]</b>	8,2
<b>Pulsprogramm</b>	zgig	<b>RG</b>	181
<b>NS</b>	2048	<b>Temperatur [K]</b>	290
<b>DS</b>	4	<b>TD</b>	65536
<b>Spektrale Breite [ppm]</b>	250	<b>Solvent</b>	CDCl <sub>3</sub> +MeOD
<b>AQ [sec]</b>	1,3	<b>Digmod</b>	baseopt

- Die Prozessierung der Spektren erfolgt mittels Bruker Standard AU-Programm proc\_1d

### 8.3.3 <sup>31</sup>P NMR Messung der Phospholipide

- 30 mg des extrahierten Eifettes in 1 mL Messlösungsmittelgemisch bestehend aus CDCl<sub>3</sub>/MeOD/CDTA-Puffer (0,2 mol/L, pH 6) (v/v/v, 582/358/60) lösen
- 600 µL davon in ein 5 mm NMR Röhrchen überführen und messen
- Die Akquisitionsparameter sind in Tabelle 8-7 aufgeführt

Für den Vergleich der Quantifizierung unter Verwendung eines internen bzw. externen Standards wurde die interne Standardlösung bestehend aus GPC in MeOD als MeOD Anteil im Messlösungsmittelgemisch ersetzt (CDCl<sub>3</sub>/MeOD mit internem Standard GPC/CDTA-Puffer (0,2 mol/L, pH 6)).

Tabelle 8-7: Akquisitionsparameter für die <sup>31</sup>P NMR Messung von Eifett

<b><sup>31</sup>P NMR Akquisitionsparameter</b>			
<b>NMR Spektrometer</b>	Ascend, 400 MHz	<b>D1 [sec]</b>	5
<b>Messprogramm</b>	31P_egg_PL	<b>Puls [µsec]</b>	9,75
<b>Pulsprogramm</b>	zgig	<b>RG</b>	196,42
<b>NS</b>	800	<b>Temperatur [K]</b>	295
<b>DS</b>	8	<b>TD</b>	8098
<b>Spektrale Breite [ppm]</b>	4,9998	<b>Solvent (Lock)</b>	MeOD
<b>AQ [sec]</b>	4,9997	<b>Digmod</b>	digital

- Die Prozessierungsparameter sind in Tabelle 8-5 dargestellt
- Die Prozessierung der Spektren erfolgt mit einer automatischen Phasen- und Basislinienkorrektur

Tabelle 8-8: Prozessierungsparameter für die <sup>31</sup>P NMR Spektren von Eifett

<b>NMR Prozessierungsparameter</b>			
<b>Auswerte Software</b>	TopSpin 3.2	<b>GB</b>	0,01
<b>SI</b>	65536	<b>Phasenkorrektur</b>	apk
<b>WDW</b>	GM	<b>Spektrenkalibrierung*</b>	sref
<b>LB</b>	-0,01	<b>Macro</b>	exam_31P

\* auf PC-Signal bei -0,7 ppm

## 8.4 Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels NMR

### 8.4.1 Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels $^1\text{H}$ NMR und $^{13}\text{C}$ NMR

- 2-3 mg der PL-Standardsubstanz bzw. des Cholesterinstandards jeweils in ein Glasvial einwiegen
- Mit 1 mL einer Mischung aus  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  (3/2) lösen
- 600  $\mu\text{L}$  davon in ein 5 mm NMR Röhrchen überführen und messen
- Die Messprogramme und Akquisitionsparameter sind dem Abschnitt 8.3.1 und 8.3.2 zu entnehmen

### 8.4.2 Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels $^{31}\text{P}$ NMR

- 2-3 mg der PL-Substanz jeweils in ein Glasvial einwiegen
- Mit 1 mL des  $^{31}\text{P}$  Messlösungsmittelgemisches für PL ( $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  mit internem Standard TPP)/CDTA-Puffer (0,2 mol/L, pH 6) (v/v/v, 582/358/60) lösen
- 600  $\mu\text{L}$  davon in ein 5 mm NMR Röhrchen überführen und messen
- Die Prozessierungsparameter sind der Tabelle 8-8 dargestellt

Tabelle 8-9: Akquisitionparameter der  $^{31}\text{P}$  NMR Messung der Phospholipidstandardsubstanzen

<b><math>^{31}\text{P}</math> NMR Akquisitionparameter</b>			
<b>NMR Spektrometer</b>	Ascend, 400 MHz	<b>D1 [sec]</b>	15
<b>Messprogramm</b>	31P	<b>Puls [<math>\mu\text{sec}</math>]</b>	9,75
<b>Pulsprogramm</b>	zgig	<b>RG</b>	196,42
<b>NS</b>	1000	<b>Temperatur [K]</b>	295
<b>DS</b>	8	<b>TD</b>	65788
<b>Spektrale Breite [ppm]</b>	40,0551	<b>Solvent (Lock)</b>	MeOD
<b>AQ [sec]</b>	5,070	<b>Digmod</b>	digital

Für die interne Referenzierung der chemischen Verschiebung wurde bei den PL-Standardsubstanzen TPP verwendet. Zusätzlich zu den einzelnen Standardsubstanzen wurde eine Mischung mit allen PL-Standardsubstanzen wie oben beschrieben hergestellt, gelöst und vermessen.

### 8.4.3 Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels 2D NMR Experimente

Für die Charakterisierung der hergestellten Standardsubstanzen wurden verschiedene 2D NMR Experimente verwendet. Die aufgeführten NMR Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt.

Experimentname	Pulssequenz
JRES	jresgpprqf
1H-1H COSY	cosygpppqf
1H-13C HSQC	hsqcetgp

## 8.5 Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylesterverteilung in Eifett

### 8.5.1 Umesterung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern

- 400 µL der <sup>1</sup>H NMR Messlösung (Abschnitt 8.3.1) unter Stickstoffstrom mittels thermischen Verdampfers (55°C) vollständig vom Lösungsmittel befreien
- Den Rückstand in 500 µL *n*-Heptan lösen und mit 250 µL methanolischer Kaliumhydroxidlösung (2 M) versetzen
- Die Lösung für 15 Minuten auf eine Schüttelvorrichtung geben
- 200-300 µL der oberen Phase anschließend entnehmen und in ein Glasvial mit Insert zur Gaschromatographie abfüllen

### 8.5.2 Messbedingungen

Tabelle 8-10: Messbedingungen der Fettsäuremethylestermessung mittels GC/FID

<b>Gaschromatograph:</b>	Kapillar-GC FISIONS GC 8000 (GC20)
<b>Injektion:</b>	- „Hot empty needle“-Technik - Injektortemperatur: 250 °C - Split: 1:20 - Injektionsvolumen: 1 µl
<b>Detektor:</b>	Flammenionisationsdetektor (FID) Temperatur: 250°C
<b>Säule:</b>	100 m * 0,25 mm SP-2560 (Filmdicke 0,20 µm, 100 %-Cyanopropyl-Polysiloxan)
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff mit 170 kPa Vordruck (1,5 ml/min, bei Raumtemperatur)
<b>Temperaturprogramm:</b>	50 °C – 12 min – 15 °C/min auf 160 °C – 50 min – 3 °C/min auf 230 °C – 22 min isotherm

## 9 Anhang

### 9.1 Vergleich verschiedener Haltungssysteme für Legehennen

Tabelle 9-1: Vergleich von verschiedenen Haltungssystemen für Legehennen in Europa

Haltungssystem	Rechtliche Grundlage	Anforderungen
<b>Ausgestaltete Käfighaltung</b>	Richtlinie 1999/74/EG	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pro Henne mind. 750 cm<sup>2</sup></li> <li>- bis 60 Tiere pro Abteil</li> <li>- ein Nest pro Käfig mit Einstreu und Sitzstange</li> </ul>
<b>Bodenhaltung</b>	Richtlinie 1999/74/EG, TierSchNutzV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- max. 9 Hennen/m<sup>2</sup></li> <li>- nicht mehr als 6000 Hennen ohne räumliche Trennung</li> <li>- je 7 Hennen ein Einzelnest, oder max. 120 Hennen 1 m<sup>2</sup> Nestfläche</li> <li>- spezielle Anforderungen an Trink- und Futtertröge und Sitzstangen</li> </ul>
<b>Freilandhaltung</b>	Richtlinie 1999/74/EG, TierSchNutzV, VO(EG) Nr. 589/2008 (EiMarktVO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alle Anforderungen an Bodenhaltung</li> <li>- zusätzlich Zugang zu Auslauffläche im Freien (mind. 4 m<sup>2</sup> pro Henne)</li> <li>- im Freien müssen Unterschlupfmöglichkeiten, ggf. Unterstände und geeignete Tränken vorhanden sein</li> </ul>
<b>Biologische Haltungsformen</b>	VO(EG) Nr. 834/2007, VO(EG) Nr. 889/2008 und zusätzliche Richtlinien versch. biologischer Anbauverbände wie z.B. Bioland, Naturland, Demeter	<ul style="list-style-type: none"> <li>- max. 6 Hennen/m<sup>2</sup></li> <li>- max. 3000 Legehennen pro Stall</li> <li>- Futter aus ökologischer Landwirtschaft</li> <li>- spezielle Anforderungen an Trink- und Futtertröge und Sitzstangen gemäß VO(EG) Nr. 834/2007</li> <li>- ständiger Zugang zum Freiland (mind. 4 m<sup>2</sup> pro Henne), mind. 1/3 der Lebensdauer</li> <li>- im Freien müssen Unterschlupfmöglichkeiten, ggf. Unterstände und geeignete Tränken vorhanden sein</li> </ul>

### 9.2 Eierkennzeichnung

Die Eierkennzeichnung erfolgt nach Verordnung (EG) Nr. 589/2008 und VO (EU) Nr. 1308/2013, der entsprechenden Durchführungsbestimmung mit einem Erzeugercode, welcher in Richtlinie 2002/4/EG definiert wird. Der Code enthält siehe Abbildung 9-1 eine Zahl, die das Haltungssystem definiert, jeweils zwei Buchstaben, die den Code des Registrierungsmitgliedstaats wiedergeben und eine weitere Zahlenfolge, die es den jeweiligen Behörden ermöglicht den Erzeugerbetrieb genau zu identifizieren. Zudem wird festgelegt, dass Hühnereier „innerhalb von 10 Tagen nach dem Legen sortiert, gekennzeichnet und verpackt“ werden müssen.

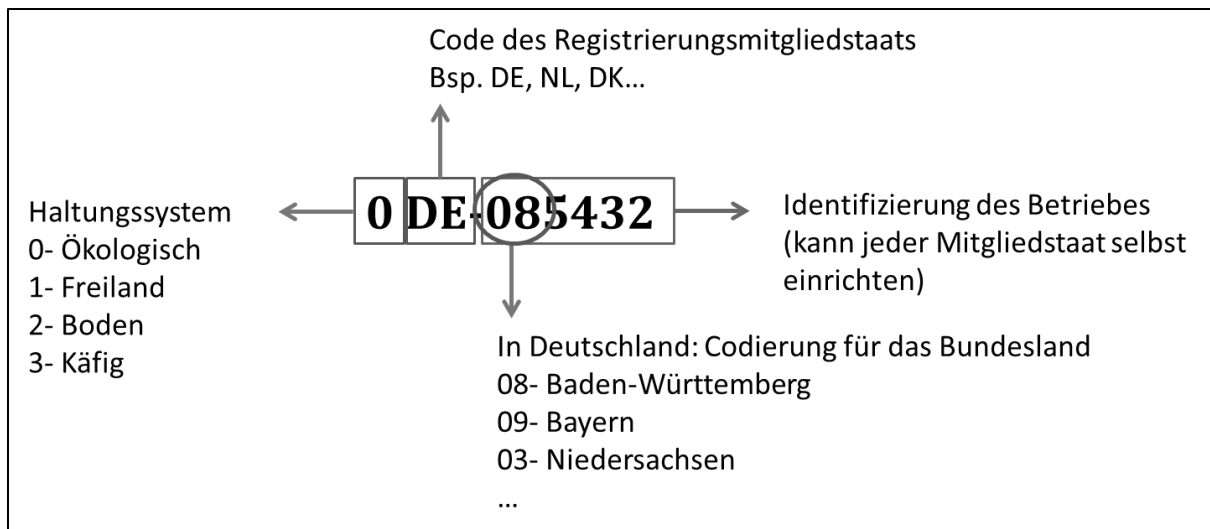


Abbildung 9-1: Kennzeichnung von Eiern mit dem Erzeugercode

### 9.3 Metadaten der Proben

Folgende Metadaten wurden, falls vorhanden zu jeder Probe gesammelt:

- Haltungssystem
- Erzeugercode
- Packstellenummer
- Herkunftsland
- Postleitzahl Hersteller
- Bundesland
- Postleitzahl des Inverkehrbringer

### 9.4 Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur bei der $^1\text{H}$ NMR Messung

Eine Eifettprobe wurde mit einer Mischung aus unterschiedlichen Anteilen  $\text{CDCl}_3$  und MeOD ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) gelöst und jeweils bei 290 K gemessen. In Abbildung 9-2 sind die Auswirkungen der unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnisse auf die Signalform der Eifettkomponenten und die Signalüberlagerung mit dem Restwassersignal dargestellt. Das beste Ergebnis wurde bei einem  $\text{CDCl}_3$ - und MeOD-Anteil von 3:2 erreicht. Bei diesem Lösungsmittelverhältnis war die Überlagerung von Signalen der Eifettkomponenten mit dem Restwassersignal am geringsten, gleichzeitig war keine Beeinträchtigung der Signaltbreite und Form zu beobachten (Brendel, 2016).

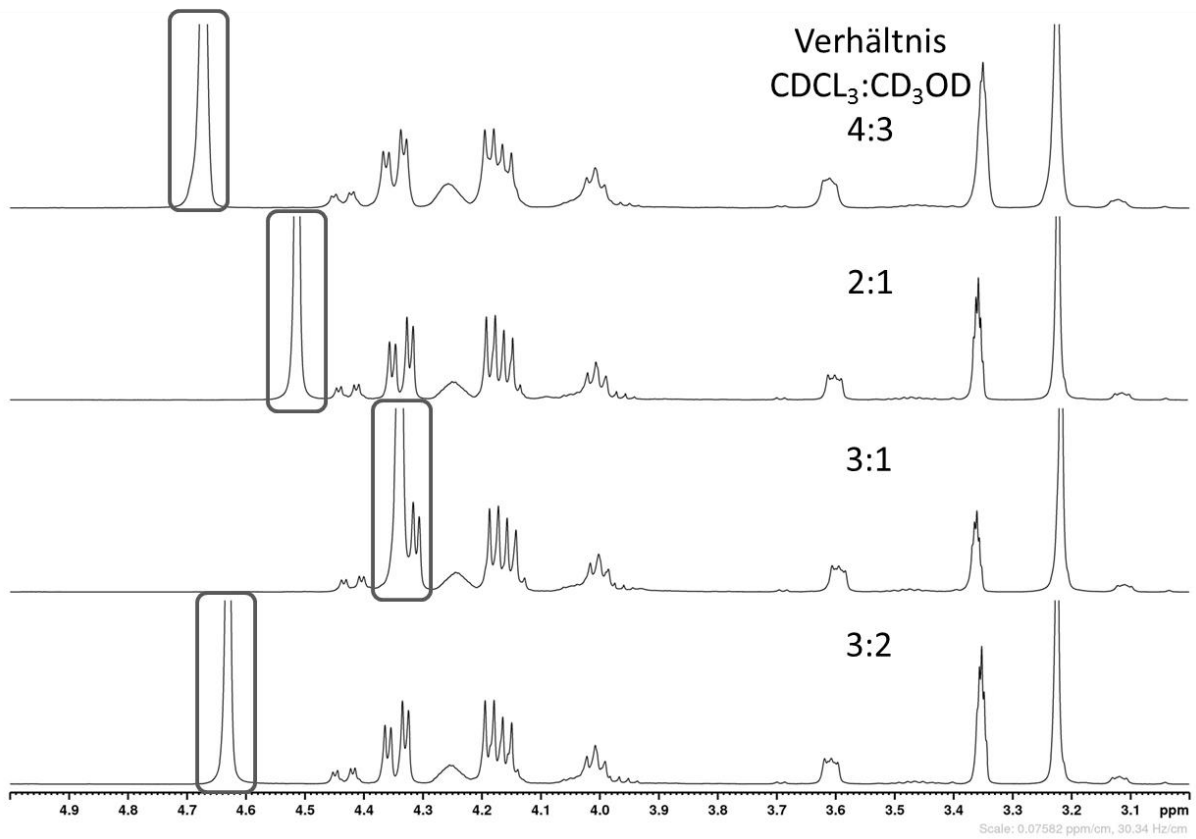


Abbildung 9-2: 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrenausschnitte (2,9 - 5,0 ppm) einer Eifettprobe, die den Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung von deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) und deuteriertem Methanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) auf Signalform und Signalüberlagerungen zeigen. Das Signal im rechteckigen Kasten zeigt jeweils das Restwassersignal und dessen Lage bei den unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen (4:3, 2:1, 3:1, 3:2)

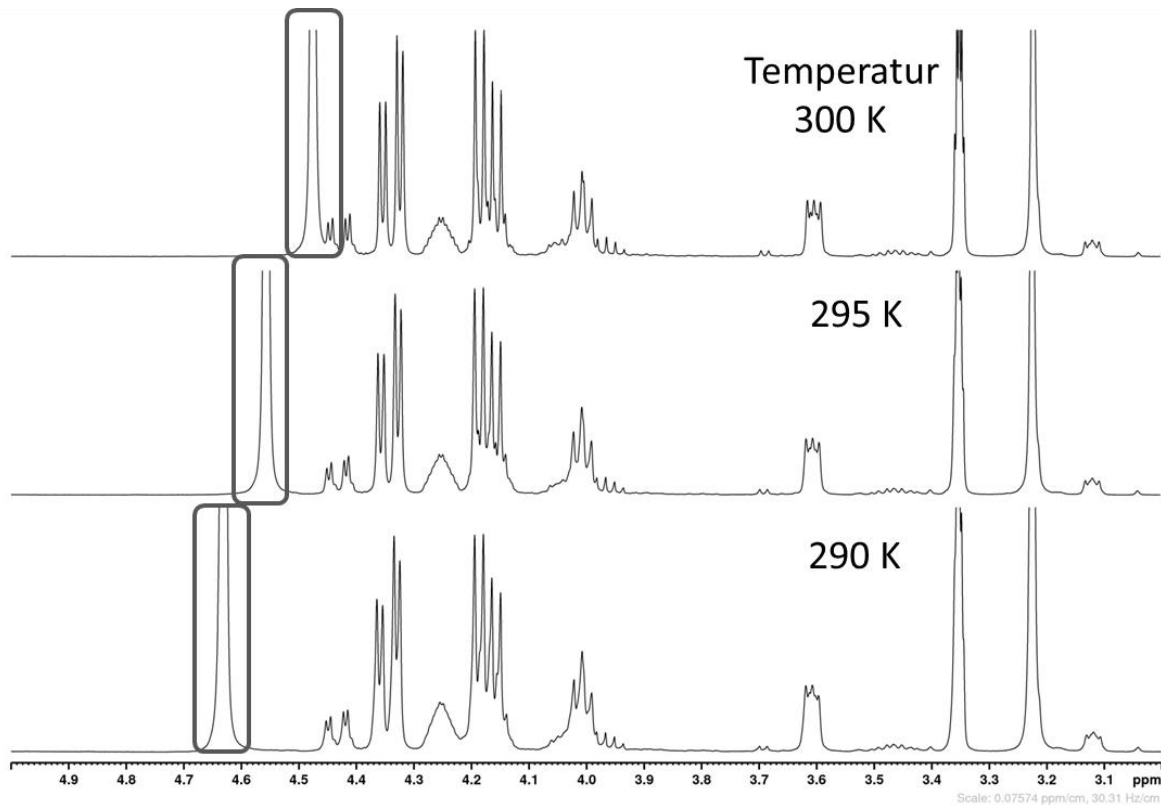


Abbildung 9-3: 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR Spektrenausschnitte (2,9 - 5,0 ppm) einer Eifettprobe, die den Einfluss der Messtemperatur auf die Signallage zeigen. Das Signal im rechteckigen Kasten zeigt das Restwassersignal und dessen chemische Verschiebung bei den unterschiedlichen Temperaturen (300 K, 295 K, 290 K). Bei 290 K wurde das beste Ergebnis erzielt, da das Restwassersignal am weitesten von den Lipidsignalen entfernt liegt und dadurch den geringsten Einfluss auf die Signale der Eifettkomponenten ausübt

## 9.5 Verwendete NMR Experimente

### 9.5.1 $^1\text{H}$ NMR Standard Experiment

$^1\text{H}$  NMR Spektren ermöglichen es eine Aussage über die Protonenanzahl einer Verbindung, die chemische Umgebung und die Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen zu treffen. Das  $^1\text{H}$  NMR Experiment „zg30“ gehört zu den Standardexperimenten. Dabei wird zur Anregung der  $^1\text{H}$  Atome ein  $30^\circ$  Puls verwendet.

Die chemische Verschiebung ( $\delta_{\text{Substanz}}$ ) wird bei der Auswertung in ppm angegeben und ergibt sich aus

Formel 16

$$\delta_{\text{Substanz}} [\text{ppm}] = \frac{\vartheta_{\text{Substanz}} - \vartheta_{\text{Referenz}} [\text{Hz}]}{\vartheta_{\text{Referenz}} [\text{MHz}]}$$

der Frequenz der Substanz ( $\vartheta_{\text{Substanz}}$ ) und der Frequenz einer ausgewählten Referenzsubstanz ( $\vartheta_{\text{Referenz}}$ ) (Friebolin, 2014).



## 9.5.2 <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P NMR Messung mit inverse gated decoupling

Die Messung von Heterokernen wie <sup>13</sup>C und <sup>31</sup>P geben Aufschluss darüber wie viele dieser Kerne in einer Verbindung oder Mischung vorhanden sind und über deren Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen.

Um Kopplungen mit <sup>1</sup>H Kernen zu vermeiden, werden <sup>13</sup>C und <sup>31</sup>P Spektren mit <sup>1</sup>H Breitbandentkopplung aufgenommen (Friebolin, 2014).

Bei der Verwendung des inverse gated decoupling Pulsprogramm (zgig) erfolgt die Protonenkopplung nur während der AQ. Dadurch findet kein Polarisationstransfer (NOE) von <sup>1</sup>H zu <sup>13</sup>C oder <sup>31</sup>P statt und die generierten Spektren können zur Quantifizierung genutzt werden (Friebolin, 2014).

## 9.5.3 Longitudinale Relaxationszeitbestimmung

Die T1-Bestimmung erfolgt mittels inversion recovery Experiment. Dabei wird eine Reihe von <sup>1</sup>H Spektren mit bestimmter Impulsfolge (180° - τ - 90°) und variierendem Zeitabständen τ aufgenommen. Durch einen 180° Puls wird die Gleichgewichtsmagnetisierung M<sub>0</sub> auf die -z-Achse ausgelenkt. Nach Relaxation um die Zeit τ wird mit einem 90° Puls die verbliebene Magnetisierung (M<sub>z</sub>) auf die y'-Achse gedreht wodurch die Quermagnetisierung M<sub>y</sub> aufgenommen werden kann. Die Intensität der NMR Signale, die nach Fourier-Transformation erhalten wird, ist proportional zum Magnetisierungsvektor M<sub>y</sub>.

Durch die Gleichung

**Formel 17**

$$\ln(I_0 - I_z) = \ln 2 I_0 - \frac{t}{T_1}$$

mit I<sub>0</sub>, der maximalen gemessenen Intensität und I<sub>z</sub>, der Intensität bei t = τ, kann nach Auftragung von ln(I<sub>0</sub> - I<sub>z</sub>) gegen t (t entspricht den diskreten Werten für τ), die Steigung der Geraden abgelesen und T1 bestimmt werden (Friebolin, 2014).

Die T1-Bestimmung von <sup>13</sup>C bzw. <sup>31</sup>P Kernen erfolgt wie oben beschrieben, allerdings wird während der oben genannten Pulsabfolge jegliche <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C - bzw. <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P -Kopplung durch eine <sup>1</sup>H Breitbandentkopplung eliminiert. Dies wird mittels „t1irpg“- Pulsprogramm erreicht.

## 9.5.4 2D NMR Experimente

### Heteronuclear single quantum coherence - HSQC

Bei dem <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC handelt es sich um ein zweidimensionales invers korreliertes Experiment. Die Kohärenzen werden dabei im Kanal des unempfindlicheren Kerns (<sup>13</sup>C) erzeugt und auf den empfindlicheren Kern (<sup>1</sup>H) übertragen und auch dort gemessen. Dies wird mit einer Pulsabfolge erreicht, bei der eine Übertragung und Verstärkung der <sup>1</sup>H Magnetisierung auf die <sup>13</sup>C Magnetisierung stattfindet. Nach Entwicklung der Magnetisierungsvektoren, wird die Magnetisierung anschließend auf die <sup>1</sup>H Atome zurück transferiert und die <sup>1</sup>H Resonanzen gemessen. In diesem Experiment werden die direkten <sup>1</sup>J-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C -Verknüpfungen aufgezeigt. In einem 2D Konturplot ist das <sup>1</sup>H Spektrum oben und das <sup>13</sup>C Spektrum auf der linken Seite zu sehen (Friebolin, 2014).

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mittels „hsqcetgp“ Pulsprogramm unter Verwendung von Gradientenpulsen.

## Correlation Spectroscopy - COSY

Bei einem  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY werden auf beiden Frequenzachsen im Spektrum die  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebungen miteinander korreliert. Das Spektrum liefert Informationen über Molekülfragmente und Verknüpfungen. Das COSY-Standardexperiment besteht aus einer Folge von zwei Pulsen, die durch eine Wartezeit ( $t_1$ ), die inkrementell verändert wird, getrennt sind ( $90^\circ - t_1 - \theta_x$ ). Im 2D Konturplot entsprechen die Signale auf der Diagonalen dem  $^1\text{H}$  NMR Spektrum. Die symmetrisch angeordneten Korrelationssignale zeigen die skalare Kopplung zwischen geminalen und vicinalen Protonen (Friebolin, 2014).

Das „gradient selected“ COSY wird mittels „cosygpppqf“-Pulsprogramm aufgenommen. Die Buchstaben „gp“ stehen für Gradientpuls, „pp“ für Purge-Puls und „qf“ für den magnitude Mode. Der Vorteil eines gradient selected COSY ist, dass unerwünschte z-Magnetisierungen und ihre zugehörigen axialen Signale durch gepulste Feldgradienten zerstört werden. Dadurch entfallen die Wartezeiten zwischen den Phasenzyklen und die Spektren können schneller aufgenommen werden (Friebolin, 2014; Hurd, 1990).

## 9.6 NMR Daten der Standardsubstanzen

### 9.6.1 $^{31}\text{P}$ NMR Zuordnung der Phospholipidstandardsubstanzen

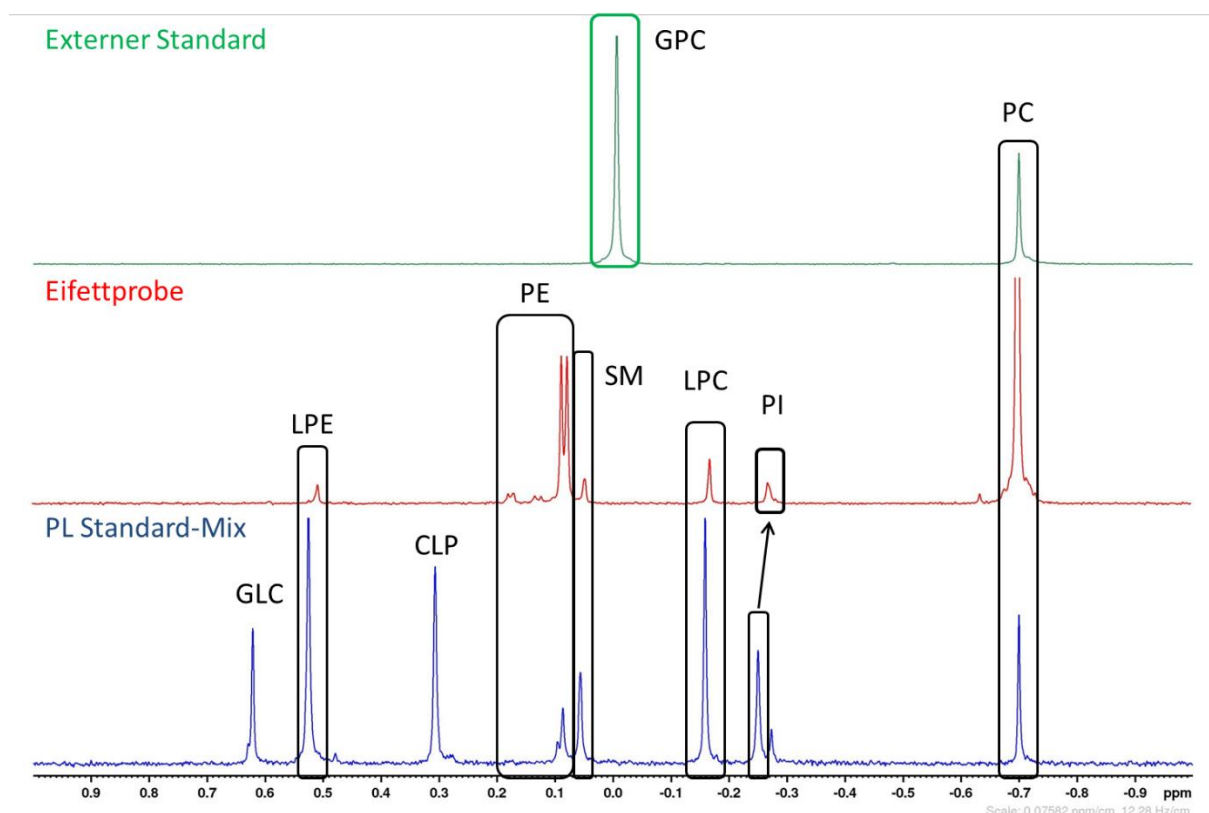


Abbildung 9-4: 400 MHz  $^{31}\text{P}$  NMR Spektren mit Zuordnung der Phospholipidstandardsubstanzen (PL Standard-Mix) zu den Phospholipiden in einer Eifettprobe. Benennung der einzelnen Phospholipide im unteren blauen Spektrumsausschnitt, von links nach rechts 1-(3-sn-Phosphatidyl)-rac Glycerin (GLC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Cardiolipin (CLP), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM), Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC). Im oberen grünen Spektrumsausschnitt, Glycerophosphatidylcholin (GPC). GPC wurde für die Quantifizierung als interner Standard verwendet. GPC und PC sind in der Standardlösung für die externe Quantifizierung enthalten.

Aufgrund der höheren Konzentration im PL Standard-Mix sind die Signale von LPE und PI verschoben, da die Konzentration einen Einfluss auf die chemische Verschiebung hat

Tabelle 9-2: Zuordnung und Beschreibung der Phospholipidsignale im <sup>31</sup>P NMR Spektrum

Chemische Verschiebung [ppm]	Signalform	Phospholipid	Abkürzung
-0,70	Singulett	Phosphatidylcholin	PC
-0,27	Singulett	Phosphatidylinositol	PI
-0,167	Singulett	Lyso-Phosphatidylcholin	LPC
-0,15	Singulett	Glycerophosphatidylcholin	GPC
0,051	Singulett	Sphingomyelin	SM
0,066- 0,116	Mehrere Singulettssignale, aufgrund unterschiedlicher Fettsäurereste	Phosphatidylethanolamin	PE
0,3	Singulett	Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin)	CLP
0,51	Singulett	Lyso-Phosphatidylethanolamin	LPE
0,62	Singulett	1-(3-sn-Phosphatidyl)-rac-glycerol Natriumsalz	GLC

## 9.6.2 Berechnung der molaren Masse der Phospholipide

Tabelle 9-3: Berechnungsgrundlage und berechnete mittlere molare Masse der Phospholipide

Phospholipid	Mittlere Fettsäurezusammensetzungen	Literatur	Berechnete mittlere Molare Masse [g/mol]	
<b>Phosphatidylcholin</b>	16:0	36 %	(Hawke, 1959) (Schreiner et al., 2005)	767,29
	18:0	14 %		
	18:1	34 %		
	18:2	16 %		
<b>Phosphatidylethanolamin</b>	16:0	20 %	(Hawke, 1959) (Schreiner et al., 2005)	739,02
	18:0	40 %		
	16:1n-7	15 %		
	18:2n-6	7,5 %		
	20:4n-6	7,5 %		
	22:6n-3	10 %		
<b>Lyso-Phosphatidylcholin*</b>	16:0	70 %	Werte wurden aus dem Zertifikat des Standards übernommen, da dieser aus Eifett extrahiert wurde	503,99
	18:0	27 %		
	18:1	3 %		
<b>Lyso-Phosphatidylethanolamin*</b>	16:0	40 %	Werte wurden aus dem Zertifikat des Standards übernommen da dieser aus Eifett extrahiert wurde	470,38
	18:0	60 %		

Phospholipid	Mittlere Fettsäure- zusammensetzungen	Literatur	Berechnete mittlere Molare Masse [g/mol]
<b>Sphingomyelin</b>	16:0	85 %	(Hawke, 1959; Holub & Kuksis, 1971; Juneja, 1997)
	18:0	15 %	
<b>Phosphatidylinositol</b>	16:0	5 %	**(Holub & Kuksis, 1971)
	18:0	45 %	
	18:1	15 %	
	20:4n-6	35 %	

\*Die Fettsäure an Position sn-2 des GlycerinGrundgerüsts, die zum größten Teil ungesättigte Fettsäuren enthält, fehlt.

\*\*Es konnten keine Vergleichswerte für die Fettsäurezusammensetzungen des Phosphatidylinositol im Eifett, in der Literatur, gefunden werden. Daher wurde der Mittelwert der Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylinositol aus anderen tierischen Gewebearten berechnet.

### 9.6.3 1D <sup>1</sup>H NMR Zuordnung der Phospholipidstandardsubstanzen

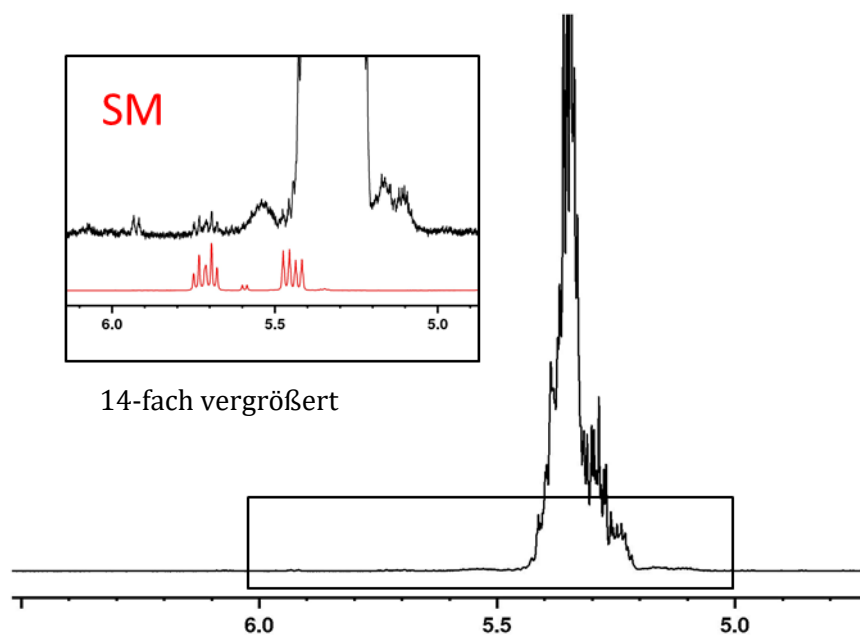


Abbildung 9-5: 400 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektrumsausschnitt einer Eifettprobe (schwarz) mit Vergleich der Signale des Sphingomyelinstandards (SM) (rot). Die Spektren wurden für den Vergleich 14-fach vergrößert

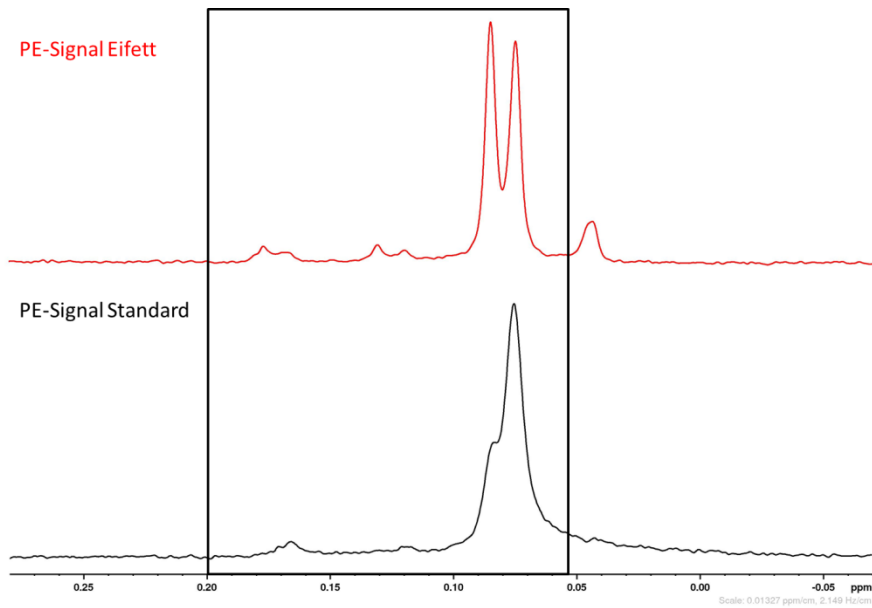


Abbildung 9-6 400 MHz  $^{31}\text{P}$  NMR Spektromausschnitt einer Eifettprobe (schwarz) und des Phosphatidylethanolamstandards (rot). Der eingerahmte Bereich zeigt die Signale des Phosphatidylethanolamins im Standard (PE-Signal Standard) und im Eifett (PE-Signal Eifett)

#### 9.6.4 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC NMR Signalzuordnung von Phosphatidylcholin

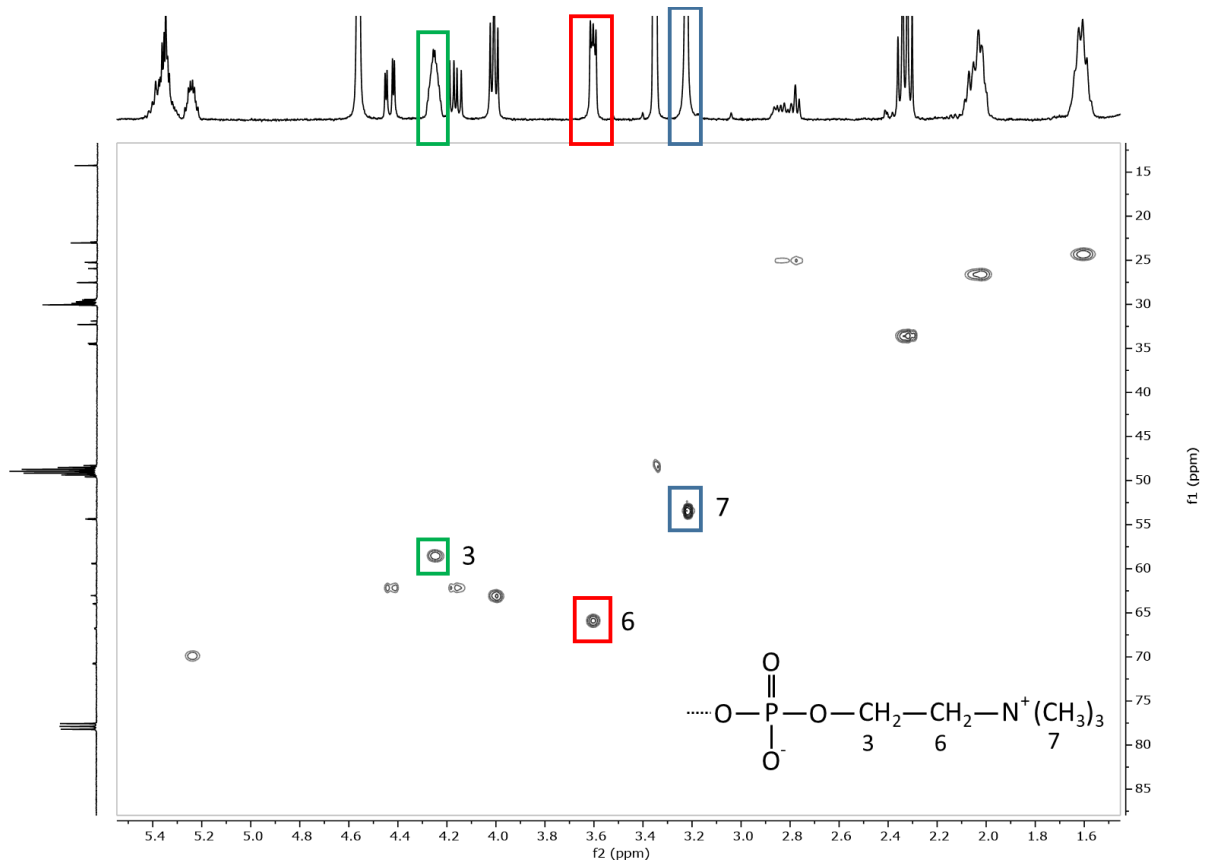


Abbildung 9-7: Ausschnitt eines  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC Spektrums von Phosphatidylcholin mit Zuordnung der Signale zum Ethanolaminrest

### 9.6.5 Berechnete Anteile der Phospholipide am Gesamtphospholipidgehalt in Eifett

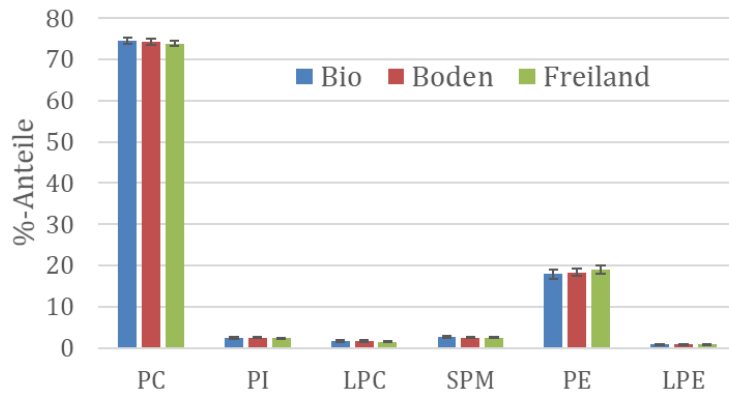


Abbildung 9-8: Prozentuale Anteile der Phospholipide in Eifett von Hühnereiern aus unterschiedlicher Legehennenhaltungssystemen (biologische Haltung (Bio), Bodenhaltung (Boden), Freilandhaltung (Freiland)), berechnet unter Verwendung eines externen Standards. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Lyso-Phosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SPM), Phosphatidylethanolamin (PE), Lyso- Phosphatidylethanolamin (LPE)

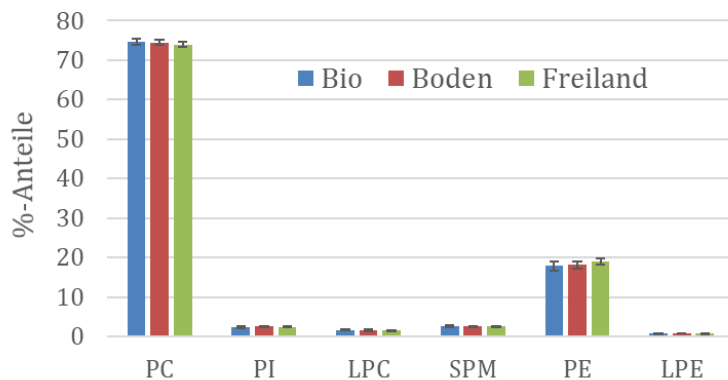


Abbildung 9-9: Prozentuale Anteile der Phospholipide in Eifett von Hühnereiern aus unterschiedlicher Legehennenhaltungssystemen (biologische Haltung (Bio), Bodenhaltung (Boden), Freilandhaltung (Freiland)), berechnet unter Verwendung eines internen Standards. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Lyso-Phosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SPM), Phosphatidylethanolamin (PE), Lyso- Phosphatidylethanolamin (LPE)

## 9.6.6 Zuordnung der Fettsäuremethylester der GC-FID Analyse zu den entsprechenden Fettsäuren

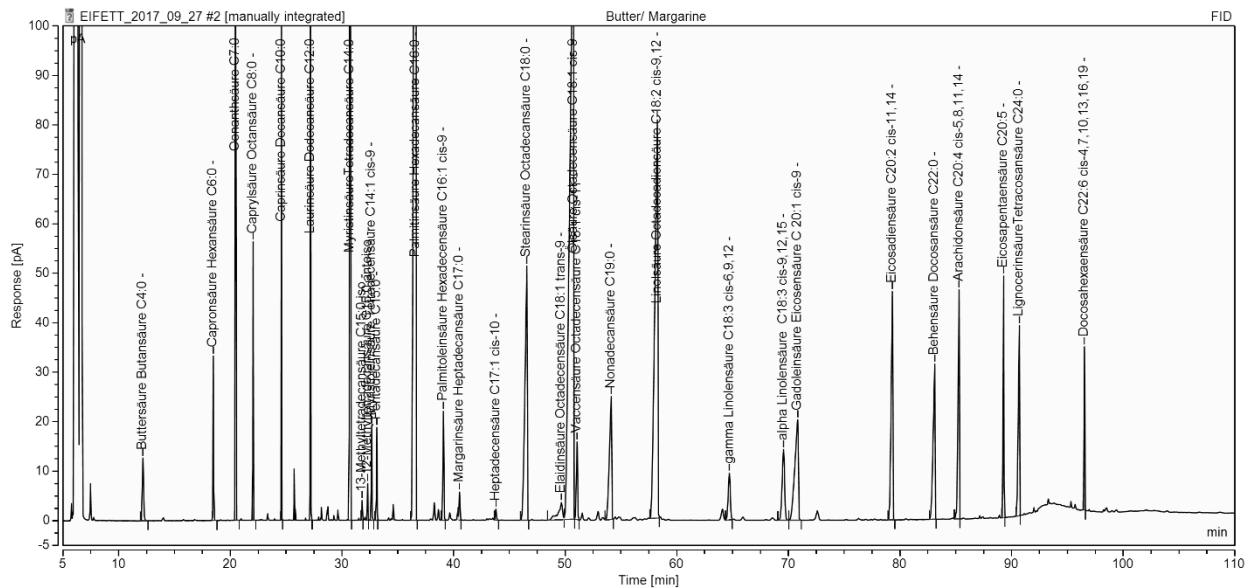


Abbildung 9-8: GC-FID Chromatogramm der Fettsäuremethylester des Butter-/Margarine-Tests mit Zuordnung zu den jeweiligen Fettsäuren

Tabelle 9-4: Peakzuordnung der Fettsäuremethylester des Butter-/Margarine-Tests zu den entsprechenden Fettsäuren

Fettsäure	Retentionszeit [min]
Buttersäure C4:0	12,16
Capronsäure C6:0	18,47
Oenanthensäure C7:0	20,47
Caprylsäure C8:0	22,03
Caprinsäure C10:0	24,57
Laurinsäure C12:0	27,19
Myristinsäure C14:0	30,73
13-Methyltetradecansäure C15:0 iso	31,8
12-Methyltetradecansäure C15:0 anteiso	32,3
Myristoleinsäure C14:1 Δ-9	32,66
Pentadecansäure C15:0	33,12
Palmitinsäure C16:0	36,61
Palmitoleinsäure C16:1 Δ-9	39,09
Margarinsäure C17:0	40,53
Heptadecansäure C17:1 Δ-10	43,8
Stearinsäure C18:0	46,56
Elaidinsäure C18:1 trans Δ-9	49,66
Ölsäure C18:1 Δ-9	50,74
Vaccensäure C18:1 Δ-11	51,07
Nonadecansäure C19:0	54,13
Linolsäure C18:2 Δ-9,12 (ω-6)	58,26
γ-Linolensäure C18:3 Δ-6,9,12 (ω-6)	64,72
α-Linolensäure C18:3 Δ-9,12,15 (ω-3)	69,57
Gadoleinsäure C 20:1 Δ-9	70,83
Eicosadiensäure C20:2 Δ-11,14 (ω-6)	79,32
Behensäure C22:0	83,11

Fettsäure	Retentionszeit [min]
Arachidonsäure C20:4 $\Delta$ -5,8,11,14 ( $\omega$ -6)	85,3
Eicosapentaensäure C20:5 $\Delta$ -5,8,11,14,17 ( $\omega$ -3)	89,28
Lignocerinsäure C24:0	90,7
Docosahexaensäure C22:6 $\Delta$ -4,7,10,13,16,19 ( $\omega$ -3)	96,53

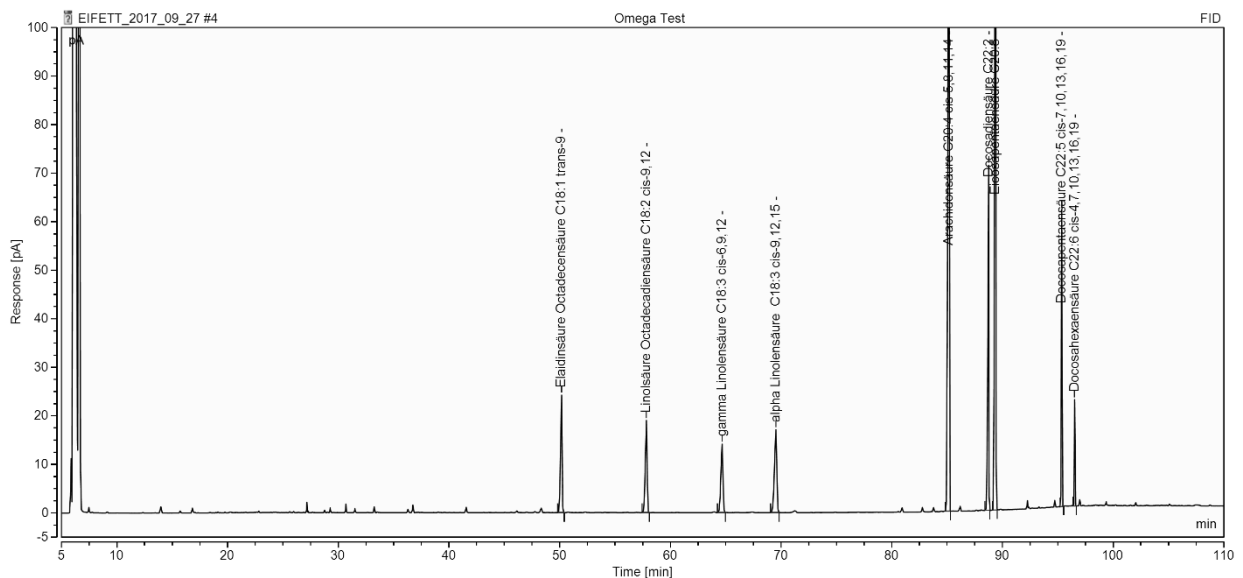


Abbildung 9-9: GC-FID Chromatogramm der Fettsäuremethylester des Omega-Tests mit Zuordnung zu den jeweiligen Fettsäuren

Tabelle 9-5: Peakzuordnung der Fettsäuremethylester des Omega-Tests zu den entsprechenden Fettsäuren

Fettsäure	Retentionszeit [min]
Elaidinsäure C18:1 trans $\Delta$ -9	50,17
Linolsäure C18:2 $\Delta$ -9,12 ( $\omega$ -6)	57,83
$\gamma$ -Linolensäure C18:3 $\Delta$ -6,9,12 ( $\omega$ -6)	64,67
$\alpha$ -Linolensäure C18:3 $\Delta$ -9,12,15 ( $\omega$ -3)	69,53
Arachidonsäure C20:4 $\Delta$ -5,8,11,14 ( $\omega$ -6)	85,17
Docosadiensäure C22:2 $\Delta$ -13,16 ( $\omega$ -6)	88,75
Eicosapentaensäure C20:5 $\Delta$ -5,8,11,14,17 ( $\omega$ -3)	89,38
Docosapentaensäure C22:5 $\Delta$ -7,10,13,16,19 ( $\omega$ -3)	95,35
Docosahexaensäure C22:6 $\Delta$ -4,7,10,13,16,19 ( $\omega$ -3)	96,52



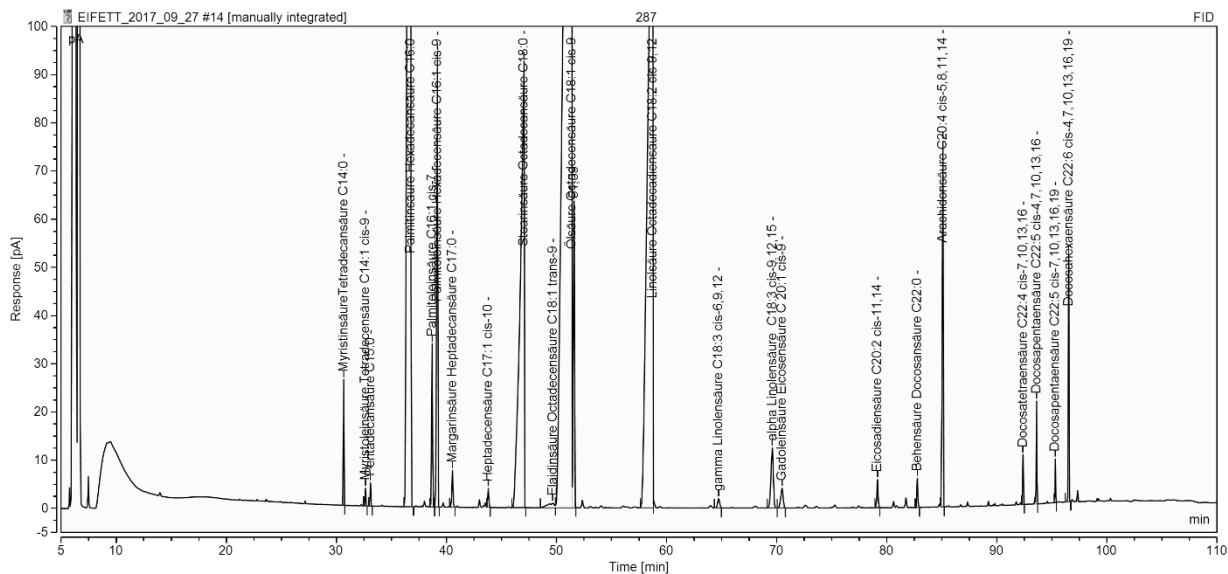


Abbildung 9-10: GC-FID Chromatogramm der Fettsäuremethylester einer Eifettprobe mit Zuordnung zu den jeweiligen Fettsäuren

Tabelle 9-6: Peakzuordnung der Fettsäuremethylester einer Eifettprobe und Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Standard-Tests

Fettsäure	Eifettprobe Retentionszeit [min]	Butter- /Margarine-Test Retentionszeit [min]	Omega-Test Retentionszeit [min]
Myristinsäure C14:0	30,66	30,73	-
Myristoleinsäure C14:1 Δ-5	32,64	32,66	-
Pentadecansäure C15:0	33,1	33,12	-
Palmitinsäure C16:0	36,74	36,61	-
Palmitoleinsäure C16:1 Δ-7	38,71*	-	-
Palmitoleinsäure C16:1 Δ-9	39,17	39,09	-
Margarinsäure C17:0	40,53	40,53	-
Heptadecensäure C17:1 Δ-9	43,8	43,8	-
Stearinsäure C18:0	47,04	46,56	-
Elaidinsäure C18:1 trans Δ-9	49,69	49,66	50,17
Ölsäure C18:1 Δ-9	51,45	50,74	-
Vaccensäure C18:1 Δ-11	51,66*	51,07	-
Linolsäure C18:2 Δ-9,12 (ω-6)	58,77	58,26	57,83
γ-Linolensäure C18:3 Δ-6,9,12 (ω-6)	64,74	64,72	64,67
α-Linolensäure C18:3 Δ-9,12,15 (ω-3)	69,64	69,57	69,53
Gadoleinsäure C 20:1 Δ-9	70,52	70,83	-

<b>Fettsäure</b>	<b>Eifettprobe Retentionszeit [min]</b>	<b>Butter- /Margarine-Test Retentionszeit [min]</b>	<b>Omega-Test Retentionszeit [min]</b>
<b>Eicosadiensäure C20:2 Δ-11,14 (ω-6)</b>	79,16	79,32	-
<b>Behensäure C22:0</b>	82,78	83,11	-
<b>Arachidonsäure C20:4 Δ- 5,8,11,14 (ω-6)</b>	85,1	85,3	85,17
<b>Docosatetraensäure C22:4 Δ- 7,10,13,16 (ω-6)</b>	92,38 *	-	-
<b>Docosapentaensäure C22:5 Δ- 4,7,10,13,16 (ω-6)</b>	93,61 *	-	-
<b>Docosapentaensäure C22:5 Δ- 7,10,13,16,19 (ω-3)</b>	95,32	-	95,35
<b>Docosahexaensäure C22:6 Δ- 4,7,10,13,16,19 (ω-3)</b>	96,54	96,53	96,52

\* Die Zuordnung und Verifizierung erfolgte mittels GC-MS im Rahmen einer Masterarbeit von R. Brendel (Brendel, 2016)

Tabelle 9-7: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der GC-FID Analyse der Fettsäuremethylester unter Verwendung der Reproduzierbarkeitsprobe (R-Probe)

<b>Fettsäure</b>	<b>Mittelwert* [%]</b>	<b>Standardabweichung* [%]</b>	<b>Variationskoeffizient* [%]</b>
<b>Myristinsäure C14:0</b>	0,33	0,01	2,3
<b>Myristoleinsäure C14:1 Δ-5</b>	0,07	0,00	6,6
<b>Pentadecansäure C15:0</b>	0,08	0,00	0,0
<b>Palmitinsäure C16:0</b>	24,89	0,13	0,5
<b>Palmitoleinsäure C16:1 Δ-7</b>	0,66	0,01	1,5
<b>Palmitoleinsäure C16:1 Δ-9</b>	3,29	0,04	1,3
<b>Margarinsäure C17:0</b>	0,19	0,00	0,0
<b>Heptadecensäure C17:1 Δ-9</b>	0,13	0,00	1,9
<b>Stearinsäure C18:0</b>	7,89	0,15	1,9
<b>Elaidinsäure C18:1 trans Δ-9</b>	0,16	0,00	2,1
<b>Ölsäure C18:1 Δ-9</b>	37,38	0,20	0,5
<b>Vaccensäure C18:1 Δ-11</b>	2,15	0,02	0,8
<b>Linolsäure C18:2 Δ-9,12 (ω-6)</b>	17,84	0,06	0,3
<b>γ-Linolensäure C18:3 Δ- 6,9,12 (ω-6)</b>	0,09	0,00	4,5
<b>α-Linolensäure C18:3 Δ- 9,12,15 (ω-3)</b>	1,19	0,02	1,3
<b>Gadoleinsäure C 20:1 Δ- 9</b>	0,23	0,00	1,1
<b>Eicosadiensäure C20:2 Δ-11,14 (ω-6)</b>	0,19	0,00	2,4
<b>Behensäure C22:0</b>	0,16	0,00	2,8

<b>Fettsäure</b>	<b>Mittelwert*</b> [%]	<b>Standardabweichung*</b>	<b>Variationskoeffizient*</b> [%]
<b>Arachidonsäure C20:4 Δ-5,8,11,14 (ω-6)</b>	1,68	0,06	3,4
<b>Docosatetraensäure C22:4 Δ-7,10,13,16 (ω-6)</b>	0,13	0,00	3,5
<b>Docosapentaensäure C22:5 Δ-4,7,10,13,16 (ω-6)</b>	0,20	0,01	3,4
<b>Docosapentaensäure C22:5 Δ-7,10,13,16,19 (ω-3)</b>	0,16	0,00	2,3
<b>Docosatetraensäure C22:6 Δ-4,7,10,13,16,19 (ω-3)</b>	0,95	0,04	4,5

\* Die R-Probe wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils fünf Mal aufgearbeitet und mittel GC-FID analysiert

Tabelle 9-8: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der GC-FID Analyse der Fettsäuremethylester unter Verwendung der Reproduzierbarkeitsprobe (R-Probe) an acht unterschiedlichen Tagen

<b>Fettsäure</b>	<b>Mittelwert</b> [%]	<b>Standardabweichung</b>	<b>Variationskoeffizient</b> [%]
<b>Myristinsäure C14:0</b>	0,32	0,01	2,2
<b>Myristoleinsäure C14:1 Δ-5</b>	0,07	0,00	4,6
<b>Pentadecansäure C15:0</b>	0,08	0,00	0,0
<b>Palmitinsäure C16:0</b>	24,91	0,16	0,6
<b>Palmitoleinsäure C16:1 Δ-7</b>	0,66	0,01	0,8
<b>Palmitoleinsäure C16:1 Δ-9</b>	3,26	0,03	0,8
<b>Margarinsäure C17:0</b>	0,19	0,00	2,6
<b>Heptadecensäure C17:1 Δ-9</b>	0,13	0,00	0,0
<b>Stearinsäure C18:0</b>	7,99	0,04	0,5
<b>Elaidinsäure C18:1 trans Δ-9</b>	0,17	0,01	3,0
<b>Ölsäure C18:1 Δ-9</b>	37,28	0,14	0,4
<b>Vaccensäure C18:1 Δ-11</b>	2,10	0,02	1,1
<b>Linolsäure C18:2 Δ-9,12 (ω-6)</b>	17,81	0,03	0,2
<b>γ-Linolensäure C18:3 Δ-6,9,12 (ω-6)</b>	0,09	0,01	5,9
<b>α-Linolensäure C18:3 Δ-9,12,15 (ω-3)</b>	1,19	0,01	0,7
<b>Gadoleinsäure C 20:1 Δ-9</b>	0,23	0,01	2,6
<b>Eicosadiensäure C20:2 Δ-11,14 (ω-6)</b>	0,19	0,00	2,3
<b>Behensäure C22:0</b>	0,16	0,00	2,1
<b>Arachidonsäure C20:4 Δ-5,8,11,14 (ω-6)</b>	1,71	0,03	1,5
<b>Docosatetraensäure C22:4 Δ-7,10,13,16 (ω-6)</b>	0,14	0,01	3,7

Fettsäure	Mittelwert [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Docosapentaensäure C22:5 Δ-4,7,10,13,16 (ω-6)	0,21	0,01	3,2
Docosapentaensäure C22:5 Δ-7,10,13,16,19 (ω-3)	0,16	0,00	0,0
Docosahexaensäure C22:6 Δ-4,7,10,13,16,19 (ω-3)	1,00	0,02	2,3

Tabelle 9-9: Vergleich der Fettsäureanteile der dominanten Fettsäuren im Eifett mit Literaturwerten

Fettsäure	Ergebnisse GC-FID [%]	(Cherian et al., 2002) [%]	(Oliveira et al., 2010) [%]
Ölsäure C18:1 Δ-9	35-42	42,6	42,29
Palmitinsäure C16:0	22-26	26,1	25,2
Linolsäure C18:2 Δ-9,12 (ω-6)	24-21	16,2	12,18
Stearinsäure C18:0	7-9	8,9	9,7
Arachidonsäure C20:4 Δ-5,8,11,14 (ω-6)	~2	2,0	2,17
α-Linolensäure C18:3 Δ-9,12,15 (ω-3)	0,5-1	-	0,23
Docosahexaensäure C22:6 Δ-4,7,10,13,16,19 (ω-3)	0,6-1,2	0,7	0,54

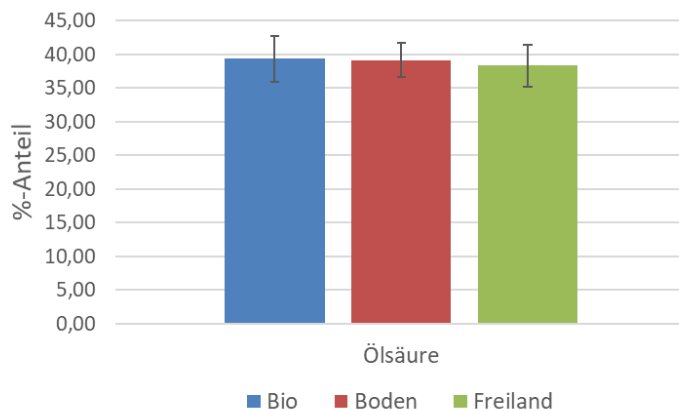


Abbildung 9-11: Prozentualer Anteil der Ölsäure an den Gesamtfettsäuren aller Proben aus biologischer Haltung (Bio), Bodenhaltung (Boden) und Freilandhaltung (Freiland)

## 9.6.7 Univariate Analyse der $^1\text{H}$ NMR Spektren

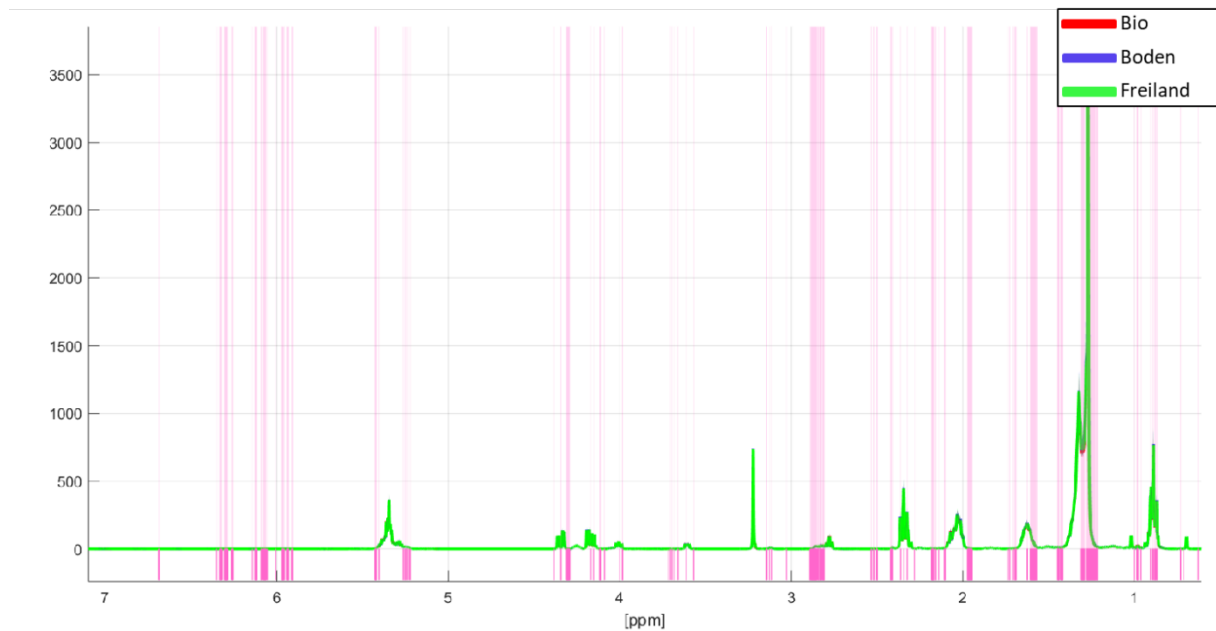


Abbildung 9-12: Univariate Analyse der  $^1\text{H}$  NMR Spektren von Eifett. Die pinkfarbenen Balken zeigen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Haltunggruppen (biologische Haltung (Bio), Bodenhaltung (Boden), Freilandhaltung (Freiland))

## 9.6.8 Die Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Proben

Tabelle 9-10: Ergebnis der Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Eierproben aus Bodenhaltung. Die Zuordnung der Proben zu den Haltungsklassen erfolgt über den jeweiligen p-Werte und dem Abstand zum Modellmittelpunkt innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls. Die Metadaten geben Informationen bezüglich der Herkunft der Proben

Nr.	p - Wert (Bio)	p -Wert (Freiland/ Boden)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Bio, 0,95 % KI*)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Freiland/Boden, 0,95 % KI)	Metadaten:	
					Land	Bundesland
1	0,04	0,11	1,05	0,89	Deutschland	Baden-Württemberg
2	0,02	0,27	1,26	0,67	Deutschland	Niedersachsen
3	0,01	0,32	1,34	0,59	Deutschland	Baden-Württemberg
4	0,00	0,69	1,73	0,22	Deutschland	Niedersachsen
5	0,05	0,08	1,01	0,93	Deutschland	Sachsen
6	0,03	0,17	1,17	0,77	Deutschland	Bayern
7	0,32	<b>0,01</b>	0,50	1,44	Deutschland	Bayern
8	0,05	<b>0,05</b>	0,95	0,99	Deutschland	Baden-Württemberg
9	0,04	0,11	1,03	0,90	Deutschland	Baden-Württemberg
10	0,45	<b>0,01</b>	0,39	1,56	Deutschland	Niedersachsen
11	0,10	<b>0,03</b>	0,79	1,15	Niederlande	

Nr.	p - Wert (Bio)	p -Wert (Freiland/Boden)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Bio, 0,95 % KI*)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Freiland/Boden, 0,95 % KI)	Metadaten:	
					Land	Bundesland
12	0,01	0,34	1,39	0,55	Deutschland	Baden-Württemberg
13	0,01	0,34	1,38	0,55	Deutschland	Baden-Württemberg
14	0,04	0,13	1,08	0,85	Deutschland	Baden-Württemberg
15	0,00	0,85	1,86	0,11	Deutschland	Baden-Württemberg
16	0,00	0,81	2,03	0,13	Deutschland	Bayern
17	0,00	0,40	1,45	0,49	Deutschland	Rheinland-Pfalz
18	0,15	<b>0,02</b>	0,67	1,28	Deutschland	Bayern
19	0,00	0,48	2,33	0,40	Deutschland	Baden-Württemberg
20	0,00	0,89	2,00	0,10	Deutschland	Baden-Württemberg
21	0,03	0,13	1,09	0,85	Deutschland	Niedersachsen
22	0,00	0,76	2,06	0,16	Deutschland	Baden-Württemberg
23	0,00	0,47	1,51	0,42	Deutschland	Baden-Württemberg
24	0,00	0,89	1,92	0,10	Deutschland	Baden-Württemberg
25	0,00	0,16	2,70	0,78	Deutschland	Baden-Württemberg
26	0,00	0,90	1,87	0,09	Deutschland	Nordrhein-Westfalen
27	0,00	0,40	2,41	0,49	Deutschland	Nordrhein-Westfalen
28	0,00	0,80	1,80	0,14	Deutschland	Baden-Württemberg
29	0,00	0,62	1,63	0,30	Deutschland	Bayern
30	0,00	0,44	2,37	0,45	Deutschland	Baden-Württemberg

\* Konfidenzintervall (KI)

**Tabelle 9-11: Ergebnis der Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Eierproben aus biologischer Haltung. Die Zuordnung der Proben zu den Haltungsklassen erfolgt über den jeweiligen p-Werte und dem Abstand zum Modellmittelpunkt innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls. Die Metadaten geben Informationen bezüglich der Herkunft der Proben**

Nr.	p Wert (Bio)	p -Wert (Freiland/Boden)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Bio, 0,95 % KI*)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Freiland/Boden, 0,95 % KI)	Metadaten:	
					Land	Bundesland
1	0,86	0,00	0,11	2,05	Deutschland	Nordrhein-Westfalen
2	<b>0,01</b>	0,30	1,31	0,62	Spanien	
3	<b>0,05</b>	0,04	0,93	1,01	Spanien	
4	0,85	0,00	0,12	2,04	Deutschland	Niedersachsen
5	0,38	0,01	0,46	1,49	Deutschland	Mecklenburg-Vorpommern
6	<b>0,05</b>	0,04	0,92	1,02	Deutschland	Mecklenburg-Vorpommern
7	0,41	0,01	0,41	1,54	Deutschland	Niedersachsen
8	0,39	0,01	0,42	1,53	Deutschland	Mecklenburg-Vorpommern
9	0,47	0,01	0,37	1,57	Deutschland	Niedersachsen
10	0,13	0,00	0,70	2,66	Deutschland	Bayern
11	0,47	0,00	0,37	2,33	Deutschland	Bayern
12	0,07	0,00	0,89	2,85	Deutschland	Baden-Württemberg
13	0,44	0,01	0,39	1,55	Deutschland	Niedersachsen
14	0,07	0,04	0,89	1,05	Dänemark	
15	<b>0,03</b>	0,15	1,15	0,79	Litauen	
16	0,07	0,04	0,89	1,05	Spanien	
17	0,48	0,01	0,37	1,58	Deutschland	Baden-Württemberg
18	0,38	0,00	0,46	2,41	Deutschland	Bayern
19	0,59	0,00	0,27	2,22	Deutschland	Baden-Württemberg
20	0,82	0,00	0,13	2,02	Deutschland	Baden-Württemberg
21	0,78	0,00	0,15	2,05	Deutschland	Niedersachsen
22	0,32	0,01	0,49	1,45	Deutschland	Mecklenburg-Vorpommern
23	0,60	0,00	0,27	1,68	Deutschland	Bayern

\* Konfidenzintervall (KI)

Tabelle 9-12: Ergebnis der Anwendung des Klassifizierungsmodells auf externe Eierproben aus Freilandhaltung. Die Zuordnung der Proben zu den Haltungsklassen erfolgt über den jeweiligen p-Werte und dem Abstand zum Modellmittelpunkt innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls. Die Metadaten geben Informationen bezüglich der Herkunft der Proben

Nr.	p - Wert (Bio)	p -Wert (Freiland/ Boden)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Bio, 0,95 % KI*)	Entfernung zum Modellmittelpunkt (Freiland/Boden, 0,95 % KI*)	Metadaten Land	Bundesland
1	0,00	0,89	1,95	0,09	Deutschland	Rheinland-Pfalz
2	0,05	0,08	1,00	0,93	Niederlande	
3	0,28	<b>0,01</b>	0,55	1,39	Niederlande	
4	0,00	0,71	1,74	0,19	Deutschland	Baden-Württemberg
5	0,00	0,99	1,91	0,07	Deutschland	Niedersachsen
6	0,03	0,15	1,15	0,79	Deutschland	Baden-Württemberg
7	0,04	0,11	1,04	0,90	Deutschland	Bayern
8	0,02	0,28	1,29	0,64	Deutschland	Bayern
9	0,42	<b>0,01</b>	0,40	1,55	Niederlande	
10	0,00	0,40	1,44	0,49	Deutschland	Baden-Württemberg
11	0,00	0,39	1,42	0,51	Deutschland	Bayern
12	0,00	0,70	2,13	0,20	Deutschland	Baden-Württemberg
13	0,00	0,78	1,79	0,15	Deutschland	Baden-Württemberg

\* Konfidenzintervall (KI)

### 9.6.9 Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung

Tabelle 9-13: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung mit Hilfe von 8 verschiedenen Signalen von unterschiedlichen Eifettkomponenten im <sup>1</sup>H NMR Spektrum der Reproduzierbarkeitsprobe (R-Probe)

Integral Nr.	Signal	Zuordnung	Mittelwert* [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
1	Multiplett	Ethylengruppen der ungesättigten Fettsäuren, Glyceringrundgerüst von TAG <sup>1</sup> und PL <sup>2</sup>	57,87	0,25	0,43
2	Dublett von Dublett	Glyceringrundgerüst der PL	3,04	0,12	3,88
3	Dublett von Dublett	Glyceringrundgerüst der TAG	12,02	0,24	2,00



<b>Integral Nr.</b>	<b>Signal</b>	<b>Zuordnung</b>	<b>Mittelwert* [%]</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Variationskoeffizient [%]</b>
<b>4</b>	Multipllett	Phosphatidylcholin (CH <sub>2</sub> -Gruppe neben N-Triplett (mit Kopplungen zu <sup>31</sup> P))	4,83	0,18	3,73
<b>5</b>	Multipllett	Phosphatidylethanolamin	1,36	0,06	4,51
<b>6</b>	Multipllett	Methylenprotonen zwischen den Doppelbindungen ( $\omega$ -3 und $\omega$ -6 Fettsäuren)	15,56	0,08	0,54
<b>7</b>	Triplett,	Methylgruppe der $\omega$ -3 Fettsäuren von PL und TAG	2,97	0,04	1,18
<b>8</b>	Singulett	Methylgruppe von Cholesterin (C-18)	2,36	0,03	1,06

\*Mittelwert der Integrale des jew. Signals bezogen auf die Summe der absoluten Integrale aller acht Signale

<sup>1</sup>Triacylglycerid (TAG)

<sup>2</sup>Phospholipid (PL)

# Publikationsliste

## Publikationen

01/2019

„NMR-based differentiation of conventionally from organically produced chicken eggs in Germany“, Ackermann, SM, Lachenmeier, DW, Kuballa, T, Schütz, B, Spraul, M, Bunzel (2019) Magnetic Resonance in Chemistry

09/2017

„Application of <sup>19</sup>F NMR spectroscopy for content determination of fluorinated pharmaceuticals“, A.O. Okaru, T.S. Brunner, S. Ackermann, T. Kuballa, S.G. Walch, M. Kohl-Himmelseher, D.W. Lachenmeier (2017) Analytical Methods in Chemistry

05/2017

„Automated Multicomponent Analysis of Soft Drinks Using 1D <sup>1</sup>H and 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H J-resolved NMR Spectroscopy“, S.M. Ackermann, K. Dolsophon, Y.B. Monakhova, T. Kuballa, H. Reusch, T. Thongpanchang, M. Bunzel, D.W. Lachenmeier, (2017) Food Analytical Methods, 10, 827-836

08/2016

„Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update“, T. Pflaum, T. Hausler, C. Baumung, S. Ackermann, T. Kuballa, J. Rehm, D.W. Lachenmeier, (2016) Archives of Toxicology, 90:2349-2367

## Vorträge

11/2018

„Authentizität bei Hühnereiern – Bio oder nicht Bio?“, 3. LGL Kongress Lebensmittelsicherheit „Herausforderungen der Lebensmittelüberwachung im 21. Jahrhundert“, November 21- 22, 2018, Erlangen/Germany

09/2018

„Conventionally vs. Organically Produced Eggs: Differentiation with NMR“, 14th International Conference on Application of Magnetic Resonance in Food Science (MRFood2018), September 17-21, 2018, Rennes/France

11/2017

„Application of NMR in Official Food Control in Germany“, Sino-German Workshop on Food and Nutrition – Strategies and Research, November 30, 2017, Beijing/China

02/2017

„Investigation of Egg Yolk Lipids with NMR“, PANIC, Februar 20-23, 2017, Hilton Head Island/USA

07/2016

„NMR – Anwendung in der amtlichen Lebensmittelüberwachung“, GDCH Kolloquium, Juli 05, 2016, Universität Darmstadt/Germany

06/2016

„Automatised Determination of Ingredients in Non-Alcoholic Beverages with NMR“, MR in Food, Juni 06-08, 2016, Karlsruhe/Germany

## **Posterbeiträge**

09/2018

„Differenzierung von konventionell und ökologisch erzeugten Hühnereiern mittels NMR-Spektroskopie“, Svenja Ackermann, Poster 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September, 17 - 19, 2018, Berlin

09/2017

„Untersuchung von Eidotterlipiden in Hinblick auf Haltungsdifferenzierung“, Poster 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September, 25 - 27, 2017, Würzburg/Germany

09/2016

„Qualitative und quantitative Bestimmung von Inhaltsstoffen in alkoholfreien Getränken mittels NMR“, Poster 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September, 14 - 16, 2016, Karlsruhe/Germany

09/2012

„Phytolgehalt in biologisch und konventionell erzeugten Milchprodukten“, Poster 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September, 10 - 12, 2012, Münster/Germany

# Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Mirko Bunzel, danke ich besonders für die Unterstützung und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Arbeitskreis; zudem für die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen Denkanstöße, die für die Richtung und Struktur der Arbeit sehr hilfreich waren.

Hon. Prof. Dr. Kuballa danke ich für die Bereitstellung des interessanten und spannenden Themas, sowie die Unterstützung auf fachlicher wie auch persönlicher Ebene. Die zahlreichen Herausforderungen ermöglichten es mir mich stetig weiterzuentwickeln. Darüber hinaus bin ich für die Übernahme des Korreferats sehr dankbar.

Ein großer Dank geht an Dr. Manfred Spraul und die Firma Bruker BioSpin für die Bereitstellung von Drittmitteln, die diese Arbeit erst ermöglichten. Im Besonderen danke ich Dr. Birk Schütz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Außerdem geht mein Dank an das gesamte NMR-Team des CVUA Karlsruhe für die Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen – in diesem Zusammenhang danke ich vor allem Margit Boehm und Britta Hauser für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Proben. Ein weiterer Dank geht an Irene Straub und das GC-Team für die Unterstützung bei den GC-FID Messungen. Weiter bedanke ich mich bei all meinen Kolleginnen und Kollegen am CVUA Karlsruhe für die große Hilfsbereitschaft und die harmonische Zusammenarbeit.

Beim CVUA Freiburg bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben, der zugehörigen Metadaten und die gute Zusammenarbeit insbesondere bei Dr. Sarah Erich, Sandra Schill, Miriam Meier, Dr. Eva Annweiler und Dr. Norbert Martin.

Für das Korrekturlesen des Manuskriptes bedanke ich mich bei Katharina Sommerfeld, Patric Scholz und Markus Wenig.

Ein besonderer Dank geht an meine Mutter Sigrid Ackermann und an meine gesamte Familie, die mich in allen meinen Vorhaben immer unterstützt hat. Vielen Dank an Markus Wenig, der mich immer zu motivieren wusste und mir half den Fokus auf das Wesentliche zu richten.