

## Über die Beeinflussung der Dotterfarbe von Hühnereiern durch Zusätze von Carotinoiden zum Futter\*

### III. Mitteilung\*\*

#### Zusatz von $\beta$ -Apo-8'-carotinal, $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester, Canthaxanthin und Paprika

I. WILDFEUER, L. ACKER, A. MEHNER und W. RAUCH

*Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster/Westf. und der Bundesforschungsanstalt für Kleintierzucht in Celle*

Eingegangen am 31. Juli 1967

In der vorigen Mitteilung wurde über zwei Versuche berichtet, die Dotterfarbe von Hühnereiern durch Zusätze von  $\beta$ -Carotin und von Bixin zum Futter zu steigern. Beide Carotinoide hatten keinen bzw. praktisch keinen Einfluß auf den Carotinoidgehalt der Dotter ausgeübt.

In dieser Mitteilung werden fünf weitere, in gleicher Weise durchgeführte Fütterungsversuche mit je 4 Versuchsgruppen (VG) unter Zusatz von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal,  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester, Canthaxanthin (Strukturformeln vgl. I. Mitt.) und Paprika beschrieben.

#### Zusatz von $\beta$ -Apo-8'-carotinal

Bei diesem Versuch wurde dem Futter 7 Wochen lang ein 5%iges stabilisiertes Präparat (Hoffmann-La Roche) zugesetzt in Mengen von 5, 10 und 20 mg/kg, bezogen auf reines Carotinal. Diese Fütterung führte zu einer deutlichen Intensivierung der Dotterfarbe, wobei nach 2 Wochen in jeder Gruppe die maximale Farbtiefe erreicht war. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden — entsprechend der Carotinaldosierung — deutliche Farbunterschiede. In allen Fällen wirkte der Farbton durchaus natürlich.

#### Zur Methode

Die Gesamtcarotinoide wurden wie zuvor (Vorschrift vgl. II. Mitt.) bestimmt. Zur vollständigen Erfassung der Pigmente mußte im Anschluß an die Extraktion mit Petroläther-Aceton (4:1) zusätzlich noch mehrmals reines Aceton verwendet werden; trotzdem blieb der Rückstand etwas gelber als der der Kontrollgruppe. Bei der Säulenchromatographie erleichterte die rotorange Farbe, mit der  $\beta$ -Apo-8'-carotinal an Aluminiumoxid adsorbiert wird und durch die es sich von den

\* Auszug aus der Dissertation von I. WILDFEUER: „Über die Beeinflussung der Dotterfarbe von Hühnereiern durch Zusätze von Carotinoiden zum Futter“. Universität Münster 1967.

\*\* I. Mitt. diese Z. **133**, 341 (1967); II. Mitt. diese Z. **136**, 129 (1968).

natürlichen Dottercarotinoiden unterscheidet, seine Identifizierung. Bei der Untersuchung von Dotterextrakten mit Carotinalzusatz trat die Carotinalzone beim Entwickeln mit Petroläther unmittelbar unterhalb der Xanthophyllesterfraktion auf. Mit 5—10 ml Benzol-Petroläther (3:2) konnten beide Zonen auf etwa 1 cm getrennt werden; das genügte zur Isolierung der Carotinalfraktion durch Zerschneiden der Säule.

Um Störungen durch mitextrahierte Dotterbestandteile zu vermeiden und schärfere Carotinalzonen zu erzielen, wurde doppelte Säulenchromatographie durchgeführt und das Carotinal erst von der 2. Säule isoliert (vgl. Arbeitsvorschrift).

Beim Ablösen der Carotinoide von der Säule durch polare Solventien wie Aceton, Äthanol, Methanol blieb bei den Pigmenten der Versuchsgruppen II—IV am Säulenkopf eine starke gelbe Fraktion zurück, die den Hauptteil der gesamten Carotinoide ausmachte und die mit äthanolischer Lauge eluiert werden konnte. Dieses Carotinoide ließ sich nicht aus alkalischer, sondern nur aus saurer Lösung in Petroläther, leichter noch in Äther überführen. Demnach lag hier eine Carotinsäure vor, die vom Huhn nach der Verfütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal gebildet worden war; es war daher in erster Linie  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30) zu erwarten.

Nähere Untersuchungen dieser Fraktion durch Säulen- und Dünnschichtchromatographie (über Einzelheiten vgl. 1) und die Übereinstimmung der Absorptionskurve mit der der reinen  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure bestätigten diese Vermutung. Außerdem wurde in getrocknetem Material noch eine zweite saure Fraktion beobachtet, bei der es sich vermutlich um  $\beta$ -Apo-10'-carotinsäure (C 27) handelt. Da ihr Anteil gering war und kein frisches Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen zur Verfügung stand, wurde der an sich interessante Frage nach sauren Abbauprodukten bei der Carotinalfütterung nicht nachgegangen.

Bei den hier angegebenen Carotinsäurewerten wurde die saure Fraktion stets als Ganzes erfaßt und als  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30) berechnet.

#### Arbeitsvorschrift

Im Anschluß an die Bestimmung der Gesamtcarotinoide wird die eingeeengte Lösung auf eine Aluminiumoxidsäule (Säulentyp vgl. Abb. 1b, II. Mitt., Füllhöhe 10—12 cm) gegeben und das Carotin mit Petroläther herausgewaschen. Bevor die rote Carotinalzone an das Säulenende gelangt, wird mit Aceton eluiert (Vorlage wechseln!); die am Säulenkopf zurückbleibende gelbe Carotinsäure wird mit 15 ml Äthanol nachgewaschen — dieser Durchlauf wird verworfen —, aus der Säule gestoßen und unter Äthanol zur Bestimmung aufbewahrt.

Das Acetoneluat wird zur Trockene eingedampft (Benzolzusatz zur Entfernung des miterfaßten Wassers). Der Rückstand wird mit etwa 5 ml Petroläther aufgenommen und erneut an Aluminiumoxid chromatographiert. Dabei wird nur mit möglichst wenig Petroläther nachgewaschen und anschließend mit Petroläther-Benzol (2:3) entwickelt (5—10 ml), bis sich die Carotinalzone auf etwa 1 cm von den Xanthophyllestern getrennt hat. Die Säule wird mit einem Glasstab vorsichtig aus dem Adsorptionsrohr geschoben, die Carotinalfraktion selbst ausgestoßen und sofort mit Aceton bedeckt. Durch ein Allihnsches Rohr wird das in Lösung gegangene  $\beta$ -Apo-8'-carotinal mit Aceton in einen Meßkolben gesaugt (25 oder 50 ml, Wittscher Topf) und die Extinktion im Spektralphotometer bei 458 nm gegen Aceton gemessen. Die Berechnung erfolgt mit  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2580$ .

Zur Bestimmung der Carotinsäure wird die äthanolische Aluminiumoxidaufschwemmung mit soviel 2n-Natronlauge versetzt, daß etwa gleiche Teile Äthanol und Lauge vorliegen, und auf dem Wasserbad leicht erwärmt. Das carotinsäure Natrium wird durch ein Allihnsches Rohr abgesaugt und das Aluminiumoxid bis zur vollständigen Elution des Pigments mit Äthanol-2n-Natronlauge (1:1) nachgewaschen. Der Durchlauf wird mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure eben angesäuert und sofort mit Petroläther quantitativ ausgeschüttelt. Die vereinten Petrolätherphasen werden säurefrei gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und durch ein Allihnsches Rohr (kein Filterpapier!) in einen Meßkolben filtriert. Die Extinktion der aufgefüllten Lösung wird bei 448 nm bestimmt und mit Hilfe von  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2515$  auf  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure umgerechnet.

#### Ergebnisse

In Übereinstimmung mit der visuellen Beurteilung zeigten die Werte für die Gesamtcarotinoide (Tab. 1) von der dritten Versuchswoche an weitgehende Konstanz

innerhalb jeder Gruppe. Ferner ist die Abhängigkeit der Dotterfarbe von der Höhe der eingesetzten Carotinalmenge eindeutig.

Der aus der Fütterung resultierende Gehalt an  $\beta$ -Apo-8'-carotinal im Dotter ist gering und liegt in einem Bereich um 1,0 mg/kg und damit in derselben Größenordnung wie die Ablagerung von  $\beta$ -Carotin. Die Ausnutzungsrate des Carotinals als Carotinal beträgt lediglich 0,23%.

Dagegen wurde, wie zuvor beschrieben, als Umwandlungsprodukt des Carotinals  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure festgestellt, und zwar in erheblicher Menge. Da sich ihr Anteil aus den ermittelten Werten für Gesamtcarotinoide und  $\beta$ -Apo-8'-carotinal (vgl. Tab. 1) nur indirekt errechnen läßt, wurde sie zur Kontrolle in einigen Fällen direkt bestimmt. In VG III wurden 11,1, in VG IV 15,4–17,2 mg/kg gefunden; errechnete und ermittelte Werte stimmen also überein. Damit beruht der bei diesem Fütterungsversuch festgestellte Anstieg im Gesamtcarotinoidgehalt auf der Ablagerung von freier Carotinsäure im Dotter; das Carotinal ist also vom Huhn zur entsprechenden Säure oxydiert worden. Für das Auftreten eines weiteren, nicht sauren Umwandlungsproduktes des Carotinals bot sich kein Anhaltspunkt.

Tabelle 1. Ergebnisse der Fütterungsversuche mit verschiedenen Zusätzen von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal (4 Versuchsgruppen, Mittelwerte aus je 2–3 Bestimmungen; VG = Versuchsgruppe)

$\beta$ -Apo-8'-carotinal- zusatz zum Futter		Gehalt an Carotinoiden in mg/kg Dotter					
		Versuchswochen		3.	4.	5.	6. + 7.
mg/kg	VG	1.	2.				
<i>1. Gesamtcarotinoide, berechnet als <math>\beta</math>-Carotin</i>							
0	I	2,40	2,31	2,65	2,34	2,74	3,21
5	II	4,11	7,37	8,25	9,06	8,79	9,87
10	III	5,39	11,5	14,0	14,6	14,7	14,8
20	IV	6,07	19,0	21,3	23,6	22,2	21,1
<i>2. <math>\beta</math>-Apo-8'-carotinal</i>							
0	I	0,15	0,12	0,13	0,16	0,22	0,16
5	II	0,18	0,39	0,29	0,28	0,25	0,24
10	III	0,29	1,07	0,64	0,58	0,60	0,55
20	IV	0,24	1,33	0,91	0,95	0,83	0,78

Da  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure nach Carotinalfütterung das dominierende Dottercarotinoid darstellt, wurden die Ausnutzungsraten aus dem als  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure ausgedrückten Gesamtcarotinoidgehalten errechnet (1). Sie betragen bei den Versuchsgruppen II–IV 8,0, 8,7 und 6,4%.

Vitamin A wurde bei dieser Fütterung lediglich für die letzte Versuchswoche ermittelt. Dabei ergab die Methode nach BUDOWSKI und BONDI (2) keine nennenswerte Steigerung durch den Carotinalgehalt des Futters, obwohl  $\beta$ -Apo-8'-carotinal 70% der Provitaminwirkung von  $\beta$ -Carotin aufweist (3).

TIEWS (4) fand dagegen nach Verfütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal eine Zunahme des Vitamin A-Gehaltes im Dotter. Bei einem Vergleich der Werte zeigt sich, daß der Vitamin A-Gehalt unserer Kontrollgruppe bereits in demselben Bereich lag, der bei TIEWS erst nach der Verfütterung von 20 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinal/kg Futter erreicht wurde. Hinzu kommt, daß bei der Bestimmung nach BUDOWSKI und BONDI spezifisch Vitamin A-Alkohol erfaßt wird, nicht jedoch Vitamin A-Aldehyd, der im Dotter ebenfalls vorhanden ist (5). Es kann festgestellt werden, daß sich der Gehalt an

Vitamin A-Alkohol im Dotter durch Verfütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal nicht erhöht, wenn die Hennen gut mit Vitamin A selbst versorgt werden.

Bei unserem Versuch liegt die Ausnutzungsrates für  $\beta$ -Apo-8'-carotinal bei 8%. Aus der Literatur sind für stabilisiertes Carotinal höhere Werte bekannt; TIEWS und ZUCKER (6) berichteten von einer Ausnutzung von durchschnittlich 14,1%, BUNNELL, MARUSICH und BAUERNFEIND (7) von 12,8—15,5%. RAUCH (8) kommt, allerdings in Form einer Überschlagsrechnung, ebenfalls auf 8%.

Angaben über eine Veränderung des  $\beta$ -Apo-8'-carotinals durch das Huhn sind dagegen der Literatur nur vereinzelt zu entnehmen. Unser Versuch hat eindeutig ergeben, daß die Henne  $\beta$ -Apo-8'-carotinal nur in geringfügigen Mengen unverändert im Dotter ablagert, die Hauptmenge wird als Carotinsäure deponiert. Der Nachweis der dem C 30-Carotinal entsprechenden  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30) ist gesichert.

BRUBACHER, GLOOR und WISS (9) erwähnten einen Ester der  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30), den sie nach Fütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal im Eidotter fanden. THOMMEN (10) gibt etwas ausführlicher an, daß nach Verfütterung von 15,15'-tritiertem  $\beta$ -Apo-8'-carotinal  $\frac{9}{10}$  der gesamten Radioaktivität in einem Ester der  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure lokalisiert waren, der Rest lag als freie Säure vor. Dieses Ergebnis konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden. Es gab keinerlei Anhaltspunkte für das Auftreten eines Carotinsäureesters, der sich bei der Säulenchromatographie in seinem Verhalten ganz wesentlich von dem der freien Carotinsäure unterscheiden mußte.

THOMMEN erwähnte weiter, daß nach Verfütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal an Rhesusaffen in deren Leber neben unverändertem Carotinal und C 30-Carotinsäure ein Metabolit nachgewiesen wurde, der einer Carotinsäure mit 24—25 C-Atomen zu entsprechen schien. Diese Angabe ist im Hinblick auf die bei uns beobachtete zweite saure Komponente im Dotter von Interesse.

#### Zusatz von $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester

$\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester wurde in stabilisierter Form als „Carophyll 10“ (Hoffmann-La Roche) in Dosen von 5, 15 und 50 mg/kg — berechnet als reiner Ester — mit dem Futter vermischt.

Wie beim Zusatz von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal wurde die Dotterfarbe auch hier bereits in der ersten Fütterungswoche kräftiger und blieb nach 14 Tagen weitgehend konstant. Die Dotter der Versuchsgruppe II wiesen einen warmen goldgelben Ton auf, die der Gruppe IV ein sehr intensives Rotorange, das nicht natürlich wirkte. Die Eier der dritten Gruppe nahmen eine Zwischenstellung ein, aber auch ihre Dotter sahen zu stark orange aus.

#### Zur Methode

Die Gesamtcarotinoide wurden in der üblichen Weise ermittelt (vgl. II. Mitt.). Um sie vollständig zu erfassen, war gegen Ende der Extraktion ein erhöhter Acetonzusatz nötig.

$\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester wurde durch Elution abgetrennt. In reiner Form wanderte er gut mit Petroläther-Benzol (1:1). Beim Zusatz von Dotterextrakten verhielt er sich infolge der Belastung der Säule durch die Lipide wie Carotin und wurde wie dieses — aber meist nicht quantitativ — bereits durch Petroläther eluiert. Eine vollständige Trennung von der Carotinfraction war bei der verwendeten Säule mit einer Füllhöhe von 10—12 cm nicht möglich; sie war im Rahmen dieser Versuchsserie wegen der minimalen Carotingehalte auch nicht erforderlich. Um die teilweise Elution des Esters durch Petroläther zu vermeiden, wurde auch hier doppelt chromatographiert und der Ester von der 2. Säule mit Petroläther-Benzol (1:1) eluiert.

#### Arbeitsvorschrift

Im Anschluß an die Bestimmung der Gesamtcarotinoide wird die gesamte Petrolätherlösung bzw. ein aliquoter Teil am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Das Vakuum wird durch Einleiten von Stickstoff aufgehoben.

Die konzentrierte Carotinoidlösung wird an  $\text{Al}_2\text{O}_3 + 8\% \text{H}_2\text{O}$  chromatographiert unter Verwendung des in Abb. 1b (II. Mitt.) dargestellten Säulentyps. Die Füllhöhe beträgt 10–12 cm. Nach Eindringen der Carotinoidlösung in die Säule wird diese mit nur soviel Petroläther gewaschen wie zum Ausspülen des Kolbens erforderlich ist. Anschließend wird mit Petroläther-Benzol (1:1) entwickelt. Bevor die meist breitgezogene Esterzone das Säulenende erreicht, wird die Vorlage gegen einen Meßkolben (25–50 ml) ausgetauscht und der Ester mit dem Petroläther-Benzol-Gemisch quantitativ eluiert. Die Lösung wird zur Marke aufgefüllt und ihre Extinktion im Spektralphotometer bei 451 nm gegen Petroläther-Benzol (1:1) bestimmt. Die Berechnung erfolgt auf der Grundlage  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2415$ .

Durch organische Solventien konnten nicht alle Carotinoide von der Säule abgelöst werden; am Säulenkopf blieb vielmehr stets eine saure Pigmentfraktion zurück. Untersuchungen (1) bestätigten die naheliegende Vermutung, daß es sich dabei um  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure handele. Außerdem ergaben auch hier — wie beim Fütterungsversuch mit  $\beta$ -Apo-8'-carotinal — die Analysen aus getrocknetem Material Anhaltspunkte für das Vorliegen von geringen Mengen eines weiteren sauren Carotinoide.

### Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Für die Gesamtcarotinoide ergab sich ein starker Anstieg in allen drei Fütterungsgruppen.

Tabelle 2. Ergebnisse der Fütterungsversuche mit verschiedenen Zusätzen von  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure-äthylester (4 Versuchsgruppen, Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen; VG = Versuchsgruppe)

$\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester-Zusatz z. Futter		Gehalt an Carotinoiden in mg/kg Dotter						
		Versuchswochen						
mg/kg	VG	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.

#### 1. Gesamtcarotinoide, gemessen bei 452 nm in Petroläther, berechnet als $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure äthylester

0	I	2,53	6,56*	3,01	2,81	3,10	3,35	3,38
5	II	6,4	28,2*	19,3	20,9	19,9	19,3	23,1
15	III	12,2	57,0	57,5	53,3	48,1	46,4	57,6
50	IV	30,1	144	169	167	186	172	175

#### 2. $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester

0	I	0,16	3,52*	0,56*	0,16	0,26	0,13	0,12
5	II	4,0	24,6*	15,9	17,8	15,9	15,8	18,3
15	III	9,6	54,0	52,0	50,1	45,5	41,3	52,0
50	IV	26,8	139	160	159	179	166	169

\* Die erhöhten Werte erklären sich durch eine Verwechslung des Futters.

Da der Verlauf der Absorptionskurve der Gesamtcarotinoide durch den hohen Anteil an  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester bestimmt wurde, wurden die Gesamtcarotinoide als Ester berechnet. Dies geschah durch Multiplikation der zunächst errechneten Angaben als  $\beta$ -Carotin mit dem Faktor 1,08, der dem Verhältnis der Extinktionen der Gesamtcarotinoidlösung bei 444 nm und 452 nm entspricht.

Die saure Fraktion wurde für VG III mit 2,4 und 2,5 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure ermittelt, für VG IV mit 6,3–6,7 mg/kg.

$\beta$ -Apo-8'-carotinsäure besitzt etwa 20% der Provitamin A-Wirkung des all-trans- $\beta$ -Carotins (9, 11). Um festzustellen, ob die Verfütterung des Esters auch den Vitamin A-Gehalt der Dotter beeinflusst, wurde am Versuchsende Vitamin A in den Gruppen I und IV bestimmt. Nach den Ergebnissen — 6,2 bzw. 5,1 mg/kg Dotter — ist kein Anstieg zu verzeichnen.

Die Ausnutzungsraten für  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester wurden aus den als Ester berechneten Gesamtcarotinoiden ermittelt; sie fielen mit 24,6 (VG II), 15,3 (VG III) und 17,1 % (VG IV) unterschiedlich, aber durchweg hoch aus.

Der starke Pigmentierungseffekt der  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureester wurde schon von mehreren Seiten festgestellt und durch visuelle Bewertungen mit dem Farbfächer (12, 13, 14) und Remissionsmessungen belegt (8, 14, 15, 16, 17). TAGWERKER, STREIFF und BRUBACHER (13) führten in einer graphischen Darstellung nach unveröffentlichten Angaben von MARUSICH die prozentuale Ablagerung des Esters im Dotter mit knapp 35 an.

RAUCH (8) teilte bei Verfütterung von 3 und 4,5 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester/kg außer Remissionsangaben auch die Extinktionsmessungen an einigen Dottern dieser Eier mit und errechnete daraus überschlagsmäßig die Ausnutzungsrate mit 20%.

Die aus unserem Versuch errechneten Werte bewegen sich ebenfalls um 20%.

### Zusatz von Canthaxanthin und $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester

In diesem Versuch, der sich über 5 Wochen erstreckte, wurden zwei Carotinoide miteinander kombiniert, nämlich Canthaxanthin und  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester. Außerdem wurden die Dosen wesentlich niedriger gewählt als bisher. Sie betragen pro kg Futter 3 mg Canthaxanthin (VG II), 2 mg Canthaxanthin + 3 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester (VG III) und 1 mg Canthaxanthin + 6 mg Ester (VG IV). Beide Carotinoide wurden als 10%ige stabilisierte Präparate (Hoffmann-La Roche) eingesetzt.

Die Dotterfarbe verstärkte sich bald nach Fütterungsbeginn. Der Canthaxanthinzusatz allein (VG II) verursachte milchig rotorange Dotter, die ausgesprochen unnatürlich waren. Bei VG III rief der Anteil an Carotinsäureester eine Verschiebung nach Orange hervor; in VG IV überwog der Einfluß des Esters, die Dotter sahen goldgelb aus mit einem geringen Stich ins Rötliche.

### Zur Methode

Die Gesamtcarotinoide wurden in derselben Weise wie bisher bestimmt und der Ester wie zuvor nach doppelter Säulenchromatographie mit Petroläther-Benzol (1:1) eluiert. Dabei trennte sich die stärker als der Ester adsorbierte rote Canthaxanthin-Zone scharf von den Xanthophyllen; mit einigen ml Petroläther-Benzol (2:3) ließ sich der Abstand etwas vergrößern und Canthaxanthin nach Zerteilen der Säule isolieren. Es wurde mit Aceton eluiert und seine Extinktion bei 472 nm ermittelt (prozentuale Extinktion vgl. II. Mitt.). Bei dieser Arbeitsweise wurde neben Canthaxanthin auch die Xanthophyllester- und Kryptoxanthinfraktion erfaßt. Ihr Gehalt lag in unserem Fall bei 0,20 mg/kg (gemessen und berechnet als Canthaxanthin), wie der Blindwert zeigt. Eine weitgehende Abtrennung dieser Begleitcarotinoide ist durch die zeitlich aufwendigere Chromatographie an MgO nach OSADCA, DE RITTER und BUNNELL (18) möglich.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche (vgl. Tab. 3) zeigen einen Anstieg für die Gesamtcarotinoide, für Canthaxanthin und für den Ester entsprechend der Dosierung. Als Umwandlungsprodukt des Esters wurde — wie nach unseren früheren Versuchen zu erwarten war — eine geringe Menge Carotinsäure gefunden (0,7—1,0 mg/kg bei VG IV). Carotinoide, die durch eine Umwandlung des Canthaxanthins entstanden sein könnten, wurden nicht beobachtet.

Die Zunahme der Gesamtcarotinoide setzt sich bei den VG III und IV additiv aus im Dotter abgelagertem Canthaxanthin und  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester sowie Carotinsäure zusammen.

Tabelle 3. Ergebnisse der Fütterungsversuche mit verschiedenen Zusätzen von Canthaxanthin und  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester (4 Versuchsgruppen; Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen; VG = Versuchsgruppe)

Zusatz zum Futter			Gehalt an Carotinoiden in mg/kg Dotter					
Cantha- xanthin	Ester mg/kg	VG	Vor- periode	Versuchswochen				
				1.	2.	3.	4.	5.
<i>1. Gesamtcarotinoide, berechnet als <math>\beta</math>-Carotin</i>								
0	0	I	2,31	2,63	2,64	2,40	2,02	2,18
3	0	II	2,18	7,45	7,88	7,86	7,98	7,87
2	3	III	2,52	13,4	15,2	15,3	15,0	13,9
1	6	IV	2,62	10,8	19,9	18,5	19,4	20,0
<i>2. Canthaxanthin</i>								
0	—	I	—	0,19	0,20	0,20	0,19	0,19
3	—	II	0,29	2,88	5,81	6,13	6,24	6,06
2	—	III	—	3,23	4,17	3,97	3,88	4,11
1	—	IV	—	2,90	2,32	2,27	2,30	2,29
<i>3. <math>\beta</math>-Apo-8'-carotinsäureäthylester</i>								
—	0	I	—	0,12	0,12	0,12	0,09	0,08
—	3	III	—	7,16	8,99	8,89	8,92	8,21
—	6	IV	—	7,87	15,9	15,4	16,0	16,2

Bei einem Vergleich der zugesetzten Komponenten wird die stärkere Wirkung des Esters deutlich: 3 mg Canthaxanthin/kg Futter verursachen eine Zunahme von durchschnittlich 5,9 mg/kg Dotter, 3 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester dagegen einen Anstieg um durchschnittlich 8,7 mg. Dieser Unterschied tritt auch bei den Ausnutzungsraten auf. Sie betragen für Canthaxanthin bei VG II, III und IV 16,5, 18,6 und 18,2%, für  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester für die Gruppen III und IV dagegen 28,0 und 22,6%. Bei diesen Angaben ist der — allerdings geringe — Gehalt an Carotinsäure noch nicht berücksichtigt. Zieht man die Ergebnisse des früheren Fütterungsversuchs mit  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester zur Beurteilung mit heran, so ergibt sich, daß dem niedrigsten Esterzusatz die höchste Ausnutzungsrate entspricht. Im übrigen liegt nach diesen spektralphotometrischen Messungen der isolierten Fraktionen die Ausnutzungsrate für den Ester etwas höher als für Canthaxanthin.

Ähnliche, wenn auch etwas höhere Ausnutzungsraten sind auch einer graphischen Darstellung bei TAGWERKER, STREIFF und BRUBACHER (13) zu entnehmen: für Canthaxanthin knapp 20%, für  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester fast 35%. Sehr hohe Ausnutzungsraten für Canthaxanthin fanden MARUSICH, DE RITTER und BAUERNFEIND (19) mit durchschnittlich 26 und maximal 29,6%.

THOMMEN, GLOOR und WISS (20) wiesen nach der Verfütterung von radioaktiv markiertem Canthaxanthin an Hühner durch säulenchromatographische Technik und Szintillationsmessungen nach, daß Canthaxanthin ohne erkennbaren Abbau ausschließlich im Eidotter angereichert wird, und zwar zu ungefähr 30% der verarbeiteten Menge.

CZERNICKI und WEISER (21) stellten durch farbmessige Messungen nach dem Spektralverfahren fest, daß Canthaxanthin ebenso wie Paprika nur eine Rotverschiebung des Farbtons hervorruft, ohne sichtbar zur Sättigung beizutragen.

Nach Angabe von DE GROOTE (22) soll Canthaxanthin als Dotterpigmentierungsmittel 6,8mal so wirksam sein wie  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester. In einem anderen

Versuch (16) verfütterte DE GROOTE Ester + Canthaxanthin in den Mengen 7,5 + 0, 4 + 1,5, 4 + 1, 3 + 1,5, 3 + 1 und 2,5 + 1 mg/kg Futter. In allen Fällen lagen die Remissionswerte der Dotter nahe beieinander. DE GROOTE schloß daraus, daß sich durch Kombination der beiden Carotinoide 3,0 mg Carotinoid/kg gegenüber der alleinigen Verwendung von Ester einsparen lassen und somit 33% der Kosten. Unsere spektralphotometrischen Bestimmungen der isolierten Canthaxanthin- und Esterfraktionen widersprechen diesen Ergebnissen. Nach diesen Resultaten kann man davon ausgehen, daß sich die Ausnutzungsraten für Canthaxanthin und Ester etwa gleichen. Daher müssen sich die Dottercarotinoidgehalte nach Verfütterung von 7,5 mg Ester pro kg Futter einerseits und 2,5 mg Ester + 1 mg Canthaxanthin andererseits annähernd wie 7,5 : 3,5 verhalten. Hier ergeben sich also deutliche Differenzen zwischen Carotinoidbestimmungen durch Spektralphotometrie und durch Remissionsmessung.

#### Zusatz von Canthaxanthin und $\beta$ -Apo-8'-carotinal zum Futter

In analoger Weise wie eben beschrieben wurde Canthaxanthin zusammen mit  $\beta$ -Apo-8'-carotinal verfüttert (2 + 3 bzw. 1 + 6 mg/kg). Die dritte Gruppe erhielt nur Carotinal (9 mg/kg). Die Dotter sahen insgesamt heller aus als bei dem vorigen Versuch, und die durch den Canthaxanthinanteil bedingte Rotkomponente trat stärker hervor.

Canthaxanthin lag auch hier wieder unverändert im Dotter vor,  $\beta$ -Apo-8'-carotinal dagegen fast vollständig als Carotinsäure; dabei handelte es sich — zumindest überwiegend — um  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure.

Die Ausnutzungsrate betrug für Canthaxanthin 24,9 bzw. 15,8% und für  $\beta$ -Apo-8'-carotinal 11,5%. Ein Vergleich der Ergebnisse dieses<sup>1</sup> und des vorigen Versuchs macht deutlich, daß Canthaxanthin beide Male in etwa gleichem Maße im Dotter auftritt, daß aber  $\beta$ -Apo-8'-carotinal vom Huhn wesentlich schlechter zur Dotterpigmentierung verwertet wird als  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester. Dies zeigt sich sowohl in der Ausnutzungsrate — Carotinal 11,5%, Ester 22,6—28,0% — als auch in der unterschiedlichen Höhe der Gesamtcarotinoide nach mengenmäßig gleichen Zusätzen: 6 mg Carotinal + 1 mg Canthaxanthin pro kg Futter erzeugen einen Gesamtcarotinoidgehalt von durchschnittlich 12 mg/kg Dotter, 6 mg Ester + 1 mg Canthaxanthin jedoch von 19—20 mg/kg.

#### Zusatz von Paprika

Als letztes soll der Zusatz von Paprikagewürz (Rosenscharf, Szegediner Art) zum Hühnerfutter beschrieben werden.

Es wurde 4 Wochen lang in Mengen von 1 (VG II), 3 (VG III) und 6% (VG IV) eingesetzt; das entspricht 16,2, 48,6 und 97,2 mg Paprikacarotinoiden (berechnet als  $\beta$ -Carotin)/kg Futter. Der Paprika wirkte sich rasch auf die Dotterfarbe aus. Das Eigelb von VG II glich farblich dem der reinen Canthaxanthinfütterung (3 mg/kg); es war wie dieses milchig rotorange. Bei VG III und IV war der Rotton intensiver ausgebildet, die Dotter sahen kräftig bis tief orange aus und erweckten bei den meisten Betrachtern die Assoziation „blutig“.

Die Gesamtcarotinoide des Dotters wurden in der üblichen Weise ermittelt. Die erhaltenen Werte sind aus Tab. 4 zu ersehen. Zur Berechnung der Ausnutzungsraten wurde von den im Paprika enthaltenen Carotinoiden (1,62 g/kg) ausgegangen; die Ablagerung im Dotter beträgt für die Gruppen II—IV nur 2,6, 3,6 und 2,2%. Die

<sup>1</sup> Über Einzelheiten vgl. (1).

dotterpigmentierende Wirkung des Paprikas ist also gering und der resultierende Farbton ohne Verwendung weiterer Carotinoidquellen unnatürlich.

Tabelle 4. *Ergebnisse der Fütterungsversuche mit verschiedenen Zusätzen von Paprika* (4 Versuchsgruppen; Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen; VG = Versuchsgruppe)

Paprika-Zusatz zum Fütter		Gesamtcarotinoide, ber. als $\beta$ -Carotin, in mg/kg Dotter				
g/kg	VG	Vorperiode	Versuchswochen			
			1.	2.	3.	4.
0	I	1,94	2,01	2,01	2,08	2,01
10	II	2,62	4,88	7,28	6,85	7,22
30	III	2,48	13,5	19,6	20,0	20,1
60	IV	2,21	13,4	30,6	29,2	30,2

Der Paprikafarbstoff setzt sich aus verschiedenen Carotinoiden zusammen. CHOLNOKY (23) zählte Capsanthin, Capsorubin,  $\beta$ -Carotin, Kryptoxanthin, Zeaxanthin, Antheraxanthin und  $\beta$ -Carotinmonoepoxid auf; diese Verbindungen liegen in der Frucht überwiegend als Ester höherer Fettsäuren vor (24). Säulen- und Dünnschichtchromatogramme der eingesetzten Paprikacarotinoide sowie der resultierenden Dottercarotinoide brachten eine Trennung in verschiedene gelbe, orange und rote Zonen. Interessanterweise differierten die Chromatogramme der nativen Paprikacarotinoide und der Dottercarotinoide ganz erheblich, dagegen zeigten sie weitgehende Übereinstimmung zwischen verseiften Paprikacarotinoiden und Dottercarotinoiden; d. h., die verfütterten Carotinoidester waren vom Huhn gespalten worden.

Es war nicht Ziel dieser Versuche, die einzelnen Carotinoide des Paprika und des Dotters zu isolieren und zu identifizieren. Deshalb wurden nur einige interessierende Zonen quantitativ erfaßt und — soweit ihre prozentualen Extinktionen in den verwendeten Lösungsmitteln nicht bekannt waren — als  $\beta$ -Carotin angegeben. Charakteristisch für die Dotter nach Paprikafütterung waren die stark adsorbierten Fraktionen Capsanthin und Capsorubin<sup>1</sup>. Der Capsanthinanteil (ber. als Capsanthin) wurde in VG III mit 6,7, in VG IV mit 12,1 mg/kg bestimmt. Capsorubin betrug dagegen nur 1,5 bzw. 1,8 mg/kg. Mengenmäßig dominierte neben Capsanthin die Xanthophyllfraktion mit 5,8 (VG III) und 7,7 (VG IV) mg/kg. Die übrigen Carotinoide lagen in geringeren Konzentrationen vor.

In der Literatur finden sich verschiedentlich Angaben über den roten Dotterfarbton, den Paprika bei der Verfütterung an Legehennen hervorruft (u. a. 17, 19, 21, 25, 26).

BROWN (27) berichtete, daß bei Zusatz von Pimiento-Pericarp zum Futter nur 1% des eingesetzten Capsanthins im Dotter auftrat, und zwar in freier Form. Da BROWN nur bei der Analyse des Pimiento, nicht aber bei der Bestimmung des Capsanthins im Dotter verseift hatte, wurde auch hier die Hydrolyse von Carotinoidestern durch das Huhn, speziell von Capsanthinestern, beobachtet.

MARUSICH, DE RITTER und BAUERNFEIND (19) setzten in Fütterungsversuchen isoliertes Capsanthin in Mengen zwischen 0,4 und 1,6 mg pro Huhn und Tag ein und erhielten als Ausnutzungsrate i.M. 6,2%.

DE GROOTE und REYNTENS (14) bezeichneten Paprika als wirksames Pigmentierungsmittel; sie gaben auf Grund von Remissionsmessungen an, daß 160 g Paprika

<sup>1</sup> Die Firma Deutsche Hoffmann-La Roche (Grenzach) überließ uns Reinpräparate von Capsanthin und Capsorubin, wofür wir auch an dieser Stelle danken.

die gleiche Dotterfarbe erzeugen wie 100 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester oder wie 1 kg Luzernemehl. Dazu muß gesagt werden, daß in Belgien eine rötliche Dotterfarbe durchaus handelsüblich ist, während sie bei uns vom Verbraucher abgelehnt wird. Von dem in unserem Versuch verwendeten Paprika wären nicht nur 160 g, sondern etwa 600 g notwendig, um den gleichen Gesamtcarotinoidgehalt zu erzeugen wie durch 100 mg  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester.

### Diskussion der Ergebnisse

Bei unseren Fütterungsversuchen wurden  $\beta$ -Apo-8'-carotinal,  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester und Canthaxanthin sowie die Carotinoide des Paprika im Dotter abgelagert, Bixin und  $\beta$ -Carotin hatten sich dagegen als wirkungslos erwiesen. Diese Unterschiede sind insofern erstaunlich, da es sich in allen Fällen um Carotinoide, also um Verbindungen mit gleichen Strukturmerkmalen handelt.

Die Ergebnisse aller bisher bekannt gewordenen Fütterungsversuche, bei denen die verschiedensten Carotinoide eingesetzt worden sind, führen zu dem Schluß, daß die Eidotterfarbe auf einem unspezifischen Deponieren von Carotinoiden beruht und keine erkennbare physiologische Bedeutung besitzt (28). Weder eine Kettenlänge von 40 C-Atomen noch ein oder zwei Iononringe im Molekül sind für die dotterpigmentierende Wirkung von Carotinoiden erforderlich. Dennoch zeichnet sich aus der Fülle des Versuchsmaterials eine Voraussetzung für die Ablagerung im Ei ab: das Carotinoid muß sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen wie Hydroxyl-, Keto- und Estergruppierungen besitzen, die ihm mäßig polaren Charakter verleihen. Weder im Futter enthaltene oder ihm zugesetzte Carotinkohlenwasserstoffe — die keinerlei funktionelle Gruppen aufweisen — noch saure Carotinoide — deren Polarität zu stark ausgeprägt ist — gehen in nennenswertem Maße in die Dotter über.

Bemerkenswert ist, daß manche Carotinoide nicht einfach resorbiert werden, sondern dabei auch Veränderungen erfahren. Allgemein wurde bei unseren Untersuchungen die Spaltung von Carotinoidestern beobachtet; dabei wirkte es sich nur graduell unterschiedlich aus, ob das Carotinoid die saure oder die alkoholische Komponente stellte. Nach Verfütterung von  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester lag im Dotter  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure neben viel Ester vor; bei Paprikazusatz zum Futter wurden die Ester des Capsanthins und Capsorubins weitgehend hydrolysiert. Fast quantitativ verändert wurde das dem Futter zugesetzte  $\beta$ -Apo-8'-carotinal im Dotter vorgefunden: in Form seines Oxydationsproduktes  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure. Es bestehen außerdem Anzeichen dafür, daß ein Teil dieser  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure abgebaut wird.

Aus diesen aufgezeigten Veränderungen ergibt sich für den Analytiker die Möglichkeit, eine nachträgliche Auffärbung von Eiprodukten zu unterscheiden von Eigelb, dessen Carotinoide dem Huhn ausschließlich mit dem Futter zugeführt worden sind.

Bei unseren Untersuchungen schwanken die ermittelten Ausnutzungsraten für ein und dasselbe Carotinoid bei den verschiedenen Dosierungen erheblich. Durchweg liegen sie bei der höchsten Dosierung niedriger als bei geringeren Zusätzen. Weiterhin scheint die Legetätigkeit einen Einfluß auszuüben; die Ausnutzungsraten steigen im allgemeinen mit der Zahl der gelegten Eier. Beide Trends — die Abnahme der Ausnutzungsraten mit steigender Dosierung und die Zunahme mit höherer Legetätigkeit — sind unverkennbar, eine strenge Korrelation läßt sich aber mit dem vorliegenden Material nicht aufstellen; es spielen offenbar noch weitere Faktoren eine Rolle.

Berücksichtigt man bei den eingesetzten Carotinoiden die Ausnutzungsraten, so konzentriert sich das Interesse an den genannten Stoffen als Futterzusätze — auch im Hinblick auf die bequeme Art der Dosierung — auf  $\beta$ -Apo-8'-carotinal,  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester und Canthaxanthin. Die ersten beiden Verbindungen verleihen dem Dotter eine natürlich wirkende goldgelbe Farbe, auch wenn sie alleinige Pigmentquelle sind.

Die Ausnutzungsrate des  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylesters lag bei den verschiedenen Versuchen zwischen 15,3 und 28,0%, die des Carotinals zwischen 6,4 und 11,5%; für Canthaxanthin betrug sie 15,8—24,9%. Für die Praxis empfiehlt sich danach  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester als der günstigste dieser Zusätze. Wie Untersuchungen an Eiern des Handels ergaben, wird dieses Carotinoid auch tatsächlich schon verwendet.

Während Carotinale als ubiquitäre Spurencarotinoide anzusehen sind und Canthaxanthin u. a. im Pfifferling auftritt, wurde  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure bisher in der Natur noch nicht aufgefunden. Zu der lebensmittelrechtlichen Frage, die sich aus dem Zusatz von synthetischen Carotinoiden zum Hühnerfutter als Mittel zur Dotterfärbung ergibt, hat der Ausschuß für lebensmittelrechtliche Fragen der Fachgruppe Lebensmittelchemie der GDCh in einem Beschluß Stellung genommen (29).

#### Zusammenfassung

Zusätze von  $\beta$ -Apo-8'-carotinal,  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester, Canthaxanthin und Paprika zum Hühnerfutter beeinflussten die Dotterfarbe in unterschiedlichem Umfang. Die ersten beiden Carotinoide führten zu goldgelben, Canthaxanthin und Paprika zu rötlichen Dottern. Die Ausnutzungsraten betrugen für  $\beta$ -Apo-8'-carotinal 6,4—11,5, für den Ester 15,3—28,0, für Canthaxanthin 15,8—24,9 und für die Paprikacarotinoide 2,2—3,6%. Von den eingesetzten Carotinoiden wurde lediglich Canthaxanthin in unveränderter Form im Dotter abgelagert. Dem Futter zugesetztes  $\beta$ -Apo-8'-carotinal ließ sich nur in Spuren als solches im Dotter nachweisen, dagegen lagen erhebliche Mengen seines Oxydationsproduktes  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30) vor.  $\beta$ -Apo-carotinsäureäthylester trat im Dotter überwiegend unverändert auf, neben geringen Mengen von freier  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäure (C 30). Die mit dem Paprikazusatz zugeführten durchweg veresterten Carotinoide wurden erst nach Hydrolyse deponiert. Die Provitamine  $\beta$ -Apo-8'-carotinal und  $\beta$ -Apo-8'-carotinsäureäthylester bewirkten unter den gegebenen Fütterungsbedingungen keinen Vitamin A-Anstieg im Dotter.

#### Literatur

1. WILDFEUER, I.: Über die Beeinflussung der Dotterfarbe von Hühnereiern durch Zusätze von Carotinoiden zum Futter. Dissertation Universität Münster 1967.
2. BUDOWSKI, P., u. A. BONDI: *Analyst* **82**, 751 (1957).
3. MARUSICH, W., E. DE RITTER, J. VREELAND u. R. KRUKAR: *J. agric. Food Chem.* **8**, 390 (1960).
4. TIEWS, J.: In: Carotine und Carotinoide. Hrsg. v. L. LANG. S. 235. Darmstadt: Dietrich Steinkopff 1963.
5. *Handbuch der Lebensmittelchemie*, 2. Aufl. Bd. II/2, S. 696, 1967.
6. TIEWS, J., u. H. ZUCKER: *Tierärztl. Umschau* **18**, 590 (1963).
7. BUNNELL, R. H., W. L. MARUSICH u. J. C. BAUERNFEIND: *Poultry Sci.* **41**, 1109 (1962).
8. RAUCH, W.: *Arch. Geflügelkde.* **24**, 417 (1960).
9. BRUBACHER, G., U. GLOOR u. O. WISS: *Chimia (Zürich)* **14**, 19 (1960).
10. THOMMEN, H.: *Chimia (Zürich)* **15**, 433 (1961).
11. WISS, O., u. H. THOMMEN: In: Carotine und Carotinoide. Hrsg. v. K. LANG. S. 179. Darmstadt: Dietrich Steinkopff 1963.
12. STEINEGGER, P., u. G. ZANETTI: *Arch. Geflügelkde.* **23**, 166 (1959).
13. TAGWERKER, F. J., K. STREIFF u. G. BRUBACHER: *Proc. 12th. World's Poultry Congress, Sydney, Section Papers 1962.* S. 177—181.

14. DE GROOTE, G., u. N. REYNTENS: *Rev. Agric. (Bruxelles)* **16**, 249 (1963).
15. SCHOLTYSSSEK, S., G. LORENZ u. H. ERFANI: *Arbeiten der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim Bd. I: Untersuchungen über aktuelle Probleme der Tierzucht und Tierhaltung aus dem Institut für Tierzuchtlehre* S. 77. Stuttgart: Eugen Ulmer 1961.
16. DE GROOTE, G.: *Rev. Agric. (Bruxelles)* **16**, 1617 (1963).
17. RAUCH, W.: *Arch. Geflügelkde.* **29**, 1 (1965).
18. OSADCA, M., E. DE RITTER u. R. H. BUNNELL: *J. Ass. off. analytic. Chem.* **49**, 1078 (1966).
19. MARUSICH, W., E. DE RITTER u. J. C. BAUERNFEIND: *Poultry Sci.* **39**, 1338 (1960).
20. THOMMEN, H., U. GLOOR u. O. WISS: *Helv. physiol. Acta* **21**, 345 (1963).
21. CZERNICKI, B., u. H. WEISER: *Zbl. Veterinärmed.* **9**, 899 (1962).
22. DE GROOTE, G.: *Publ. No. 7 Station voor Kleinveeteelt, Gontrode, Belg.* (1962).
23. CHOLNOKY, L.: *Kisérletügyi Közlemények* **40**, 173 (1937); zit. nach L. BENEDEK: *diese Z.* **107**, 228 (1958).
24. ZECHMEISTER, L.: *Carotinoide*. Berlin: Julius Springer 1934.
25. BENEDEK, L.: *diese Z.* **107**, 228 (1958).
26. TITUS, H. W., J. C. FRITZ u. W. R. KAUFFMAN: *Poultry Sci.* **17**, 38 (1938).
27. BROWN, W. L.: *J. biol. Chem.* **122**, 655 (1937/38).
28. STEINEGGER, P., K. STREIFF u. P. ZELLER: *Mitt. Lebensmitteluntersuch. Hyg.* **48**, 445 (1957).
29. *diese Z.* **130**, (Ges. u. VO) 118 (1966).