

*Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen*

## **Einfluß von Vitamin E und der Proteinqualität auf die hämolytische Wirkung der *Trigonella-Sapogenine* bei Ratten**

*I. Elmada und M. Koken*

Mit 7 Tabellen

(Eingegangen am 5. September 1980)

In einer früheren Arbeit von uns, in welcher die Qualität von Trigonelllasamenprotein allein und in einer Mischung mit Maismehl untersucht wurde, konnte bei allen mit Trigonelllasamenmehl als Proteinquelle gefütterten Tieren eine verstärkte Hämolyseneigung der Erythrozyten beobachtet werden (7). Dies wird auf den Gehalt der Samen an Sapogeninen zurückgeführt, deren Fraktion sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt: 40,4 % Diosgenin, 16,1 % Yamogenin, 12 % Gitogenin, 10,2 % Tigogenin, 7,8 % Neotigogenin, 5,2 % Yuccagenin und 0,6 % Lilagenin (12). Die Auswertung der darüber bekannten Literatur zeigt, daß die Sapogenine normalerweise in verhältnismäßig geringen Konzentrationen vorkommen (0,98–1,41 % d. TS) (4, 11) und relativ schlecht resorbiert werden (19, 20). Die resorbierten Sapogenine wirken nach den Angaben von Tschesche und Wulf (18, 19) hämolytisch.

Wir vermuteten daher einen Zusammenhang zwischen Höhe und Qualität der Proteinversorgung des Organismus einerseits und dem Grad der Hämolyseneigung der Erythrozyten andererseits, weil eine erhöhte Hämolyserate nur in Verbindung mit einem biologisch minderwertigen Protein auftrat (7).

Es ist denkbar, daß der Tocopherolgehalt des Testfutters ebenfalls von Bedeutung für die Ausprägung einer sapogenininduzierten Hämolyse ist, da Vitamin E aufgrund seiner Funktion als Stabilisator biologischer Membranen die Resistenz der Erythrozytenmembran gegenüber hämolysierend wirkenden Substanzen erhöhen könnte (6, 14).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß dieser beiden Komponenten – die Qualität des zugeführten Proteins sowie die Höhe der Tocopherolzulage – auf die hämolysierende Wirkung der Sapogenine in den Samen von *Trigonella foenum-graecum* untersucht werden. Auch der Frage, inwieweit eine Hitzebehandlung der Samen die Sapogeninwirkung beeinflußt, wurde nachgegangen.

### **Material und Methoden**

Trigonelllasamen aus vorwiegend in Marokko angebauten Sorten wurden fein gemahlen. Ein Teil des Mehls wurde einer feuchten Hitzebehandlung unterzogen

Tab. 1. Zusammensetzung von rohem und erhitztem Trigonellasamenmehl (g/100 g TS).\*)

Bestandteil	Trigonella roh	Trigonella erhitzt
Protein (N × 6,25)	26,4	25,8
Gesamtfett	9,3	8,5
Aschegehalt	4,2	4,0
Rohfaser (chem.)	9,2	9,3

\*) Durchschnittswerte von jeweils drei Parallelbestimmungen.

(10 min bei 70 °C). Die chemische Analyse ergab folgende Resultate (für die hierfür verwendeten Methoden siehe (5)).

Die Untersuchungen wurden in zwei Abschnitten durchgeführt. Ziel des ersten war es, den Einfluß der Proteinqualität auf die Sapogeninwirkung zu untersuchen. Hierzu wurden 5 Testgruppen mit jeweils 7 Tieren gebildet, deren Futter in bezug auf die Zusammensetzung des Proteinanteils folgendermaßen variiert wurde: Gr. I 100 % Trigonella, Gr. II 1/3 Trigonella + 2/3 Maismehl, Gr. III 1/3 Trigonella + 2/3 Casein, Gr. IV 100 % Mais, Gr. V 100 % Casein.

Im zweiten Abschnitt sollte der Einfluß einer Hitzebehandlung der Samen und die Höhe der Tocopherolzulage auf die Sapogeninwirkung untersucht werden. Dafür wurden 7 Gruppen mit jeweils 10 Tieren gebildet, deren Futter eine Trigonella-Casein-Mischung (1/3 Trig. + 2/3 Cas.) als Proteinquelle enthielt. Es erfolgte eine Parallelschaltung der Versuchsgruppen mit rohem (a) und erhitztem (b) Trigonellasamenmehl; diese Gruppenpaare erhielten unterschiedliche Gaben an Vitamin E. Die Tocopheroldosisierung entsprach in den Gruppen VIa und VIb sowie in der Kontrollgruppe IX einer an diesem Vitamin für Ratten (3, 6) als bedarfsdeckend empfohlenen Zufuhrmenge von 9 mg dl- $\alpha$ -Tocopherolacetat pro 100 g Futter. Die Tocopherolzulage im Futter der Gruppen VIIa/VIIb betrug das 10fache (90 mg/100 g Futter), die der Gruppen VIIIa/VIIIb das 50fache (450 mg/100 g Futter).

Die Versuchsdauer betrug im ersten Versuch 6 Wochen, im zweiten 7 Wochen.

Als Versuchstiere wurden ca. 4 Wochen alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Anfangsgewicht von  $65,1 \pm 6$  g (im 1. Versuch) bzw.  $60,2 \pm 6$  g (im 2. Versuch) verwendet. Die Haltung und Fütterung der Versuchstiere entsprach den von uns in einer früheren Publikation angegebenen Versuchsbedingungen (7): Einzelhaltung in Stoffwechselkäfigen, 12stündiger Belichtungsrhythmus, 22 °C Raumtemperatur, 40 % Luftfeuchtigkeit. Trinkwasser und Futter wurden ad libitum verabreicht. Die Gewichtsentwicklung wurde zweimal, der Futterverzehr dreimal pro Woche festgestellt. Die Zusammensetzung der Versuchsdiäten ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Während der Fütterungsperiode erfolgte eine wöchentliche Kontrolle der Hämolyse aller Versuchstiere mit dem Hämolysetest nach Friedman et al. (10). Als Kriterium der Proteinqualität wurde die Protein Efficiency Ration (PER) am Ende der ersten vier Versuchswochen ausgerechnet (1). Nach Dekapitation der Ratten wurden die folgenden Parameter ermittelt: Serum-Protein nach der Biuret-Methode (21), Enzymaktivitäten von GOT und GPT im Serum, Farbtest nach der Vorschrift der Fa. Boehringer, Mannheim, in Anlehnung an die Methode von Reitman, S. und Frankel, S.: Amer. J. Clin. Path. 28, 56 (1957) und G6PDH in Serum und Erythrozyten nach Kornberg et al. (13), Hämoglobin und Hämatokrit, Gesamtlipide (9) und Neutralfette (2) der Leber. Weiterhin wurde eine Erythrozytenzählung vorgenommen und die Größen MCHC, MCH und MCV ermittelt.

Tab. 2. Zusammensetzung der Versuchsdiäten (g/100 g Futter).

Bestandteil	Gruppe	Erster Versuch <sup>1)</sup> (Testgruppen, n = 7)				Zweiter Versuch <sup>2)</sup> (Testgruppen, n = 10)					
		I	II	III	IV	V = Kontr.	VIIa	VIIb	VIIa	VIIb	IX = Kontr.
Protein (= N × 6,25 = 10 % aus:											
Trigonella		37,0	12,3	12,3	-	-	16,5	-	16,5	-	-
roh		-	-	-	-	-	17,2	-	17,2	-	-
erhitzt		-	65,5	-	92,05	-	-	-	-	-	-
Maismehl		-	-	6,9	-	10,37	7,0	7,0	7,0	7,0	11,6
Casein <sup>3)</sup>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fett		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maiskeimöl		4,9	4,16	7,0	3,8	8,0	-	-	-	-	-
Sonnenblumenöl		-	-	-	-	-	6,7	6,7	6,7	6,7	8,0
Cellulose		-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	1,0
Mineralstoffmischg. <sup>4)</sup>		3,5	3,7	4,5	3,0	5,0	4,3	4,3	4,3	4,3	5,0
Vitaminmischg. <sup>5)</sup>		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cholinchlorid		0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Vitamin E <sup>6)</sup>		0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,090	0,090	0,450	0,009
Maisstärke		53,45	13,19	68,15	-	74,48	64,4	63,7	64,4	63,7	72,9

<sup>1)</sup> Proteinanteil 10 g/100 g Futter; setzt sich zusammen aus: Gr. I 100 % Trigonellaprotein, Gr. II 1/4 Trigonella + 2/3 Maisprotein, Gr. III 1/3 Trigonella + 2/3 Casein, Gr. IV 100 % Maisprotein, Gr. V 100 % Caseinprotein.

<sup>2)</sup> Proteinanteil 10 g/100 g Futter; in allen Futtermischungen d. Gr. VIIa-IX: 1/3 Trigonella + 2/3 Casein

<sup>3)</sup> alkaliösli., E. Merck, Darmstadt

<sup>4),5)</sup> Die genaue Zusammensetzung kann bei den Autoren angefordert werden.

<sup>6)</sup> dl- $\alpha$ -Tocopherolacetat

Tab. 3. Gewichtszunahme und Futterwirkung von Ratten mit verschiedenen Trigonelladiäten im Vergleich zu Casein (Mittelwerte von 7 bzw. 10 Tieren  $\pm$  S).

Gruppen	Anfangsgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (g)	Futterverbrauch (g)	Futterwirkung *
I	65,1 $\pm$ 8,3	89,1 $\pm$ 15,7	19,5 $\pm$ 9,3	294,0 $\pm$ 29,0	11,0 $\pm$ 3,1
II	64,9 $\pm$ 7,0	145,1 $\pm$ 25,4	80,2 $\pm$ 24,3	486,3 $\pm$ 101,9	6,3 $\pm$ 0,8
III	65,4 $\pm$ 6,1	201,6 $\pm$ 12,8	134,7 $\pm$ 15,6	617,2 $\pm$ 62,0	4,6 $\pm$ 0,3
IV	65,1 $\pm$ 5,2	112,4 $\pm$ 9,3	47,4 $\pm$ 9,2	451,9 $\pm$ 31,4	9,7 $\pm$ 1,4
V	64,8 $\pm$ 4,7	231,0 $\pm$ 25,9	166,2 $\pm$ 27,3	667,1 $\pm$ 78,5	4,0 $\pm$ 0,3
VIa	60,8 $\pm$ 7,6	204,3 $\pm$ 15,6	149,3 $\pm$ 23,2	756,8 $\pm$ 83,7	5,2 $\pm$ 0,9
VIb	60,7 $\pm$ 6,8	203,9 $\pm$ 21,1	143,2 $\pm$ 21,6	728,7 $\pm$ 53,7	5,2 $\pm$ 0,5
VIIa	60,5 $\pm$ 6,5	211,5 $\pm$ 15,4	151,1 $\pm$ 12,5	746,7 $\pm$ 55,1	4,9 $\pm$ 0,3
VIIb	60,3 $\pm$ 5,7	209,8 $\pm$ 10,3	149,6 $\pm$ 11,6	738,0 $\pm$ 45,6	4,9 $\pm$ 0,3
VIIIa	59,9 $\pm$ 6,3	209,2 $\pm$ 14,8	150,6 $\pm$ 13,7	732,0 $\pm$ 43,6	4,8 $\pm$ 0,2
VIIIb	59,7 $\pm$ 5,4	208,2 $\pm$ 13,9	148,6 $\pm$ 15,1	742,0 $\pm$ 49,7	5,0 $\pm$ 0,3
IX	59,9 $\pm$ 6,0	211,7 $\pm$ 16,6	161,8 $\pm$ 15,9	625,2 $\pm$ 40,1	4,2 $\pm$ 0,4

\*) Futterwirkung = g Futter/g Gewichtszunahme

### Ergebnisse und Diskussion

Futterverzehr, Gewichtszunahme und Futterwirkung entwickelten sich entsprechend der Proteinqualität des Testfutters. Die niedrigsten Werte wurden mit Diäten erzielt, deren Protein aus Trigonella bzw. Maismehl entstammte, gefolgt von der Trigonella-Mais-Mischung. Die Ergebnisse der Trigonella-Casein-Mischung entsprachen fast denen der Kontrollgruppe. Der konstant niedrige Futterverzehr der Gruppe I (100 % Trigonella) sowie die daraus resultierende Gewichtsstagnation sind z. T. auch auf den intensiven Geruch und leicht bitteren Geschmack roher Bockshornkleesamen - bedingt durch ihren Sapogeningehalt - zurückzuführen. Dieser Effekt wurde durch den Ersatz und die dadurch erzielte Ergänzung des Trigonellaproteins mit Maismehl bzw. Casein weitgehend aufgehoben, nicht jedoch durch die Hitzebehandlung der Samen (Tab. 3).

Die PER-Bestimmung (bezogen auf die ersten 28 Fütterungstage) führte zu den in Tabelle 4 niedergelegten Resultaten.

Ein Vergleich der PER-Werte der verschiedenen Trigonellamischungen mit einer reinen Mais- bzw. Caseindiät unterstreicht die Eignung des Bockshornkleesproteins, dessen Aminosäuremuster gekennzeichnet ist durch seinen hohen Gehalt an Lysin und Tryptophan und seinen niedrigen Gehalt an s-haltigen Aminosäuren zur Aufbesserung und Ergänzung von Getreideprotein (5, 7).

Bei der Verabreichung reinen Trigonellasamen- (I) bzw. Maismehles (IV) als alleinige Proteinkomponente ergaben sich niedrige Serumproteinwerte von 4,98 bzw. 4,73 g/100 ml, während die Proteinwerte im Serum der Tiere der Trigonellamischungen fast dem Ergebnis der Kontrollgruppe entsprachen (Tab. 5). Hier zeigt sich deutlich, daß das Serumprotein eine von der Qualität des aufgenommenen Proteins abhängige Größe ist.

Die Hämolseneigung der Erythrozyten entwickelte sich im ersten Versuch entsprechend der Proteinqualität der verabreichten Trigonelladiäten: In den Gruppen I und II (100 % Trigonella bzw.  $\frac{1}{3}$  Trigonella +  $\frac{2}{3}$  Maismehl) trat vom Beginn der zweiten Versuchwoche an bei 3 bzw. 2 von 7 Tieren eine erhöhte Hämolyserate auf, welche dann im Verlauf der dritten und vierten Versuchwoche kontinuierlich anstieg und zu Versuchsende jeweils 4 von 7 Tieren betraf. Bei der Verabreichung der biologisch höherwertigen Trigonella-Casein-Mischung konnte nur bei einem Tier eine erhöhte Hämolseneigung der Erythrozyten (bis zu 16 %) beobachtet werden; bei der reinen Maisdiät war eine Hämolyserate < 2 % festzustellen, obwohl das Maisprotein eine relativ schlechte Qualität aufweist. Dies geht mit den Angaben von *Tschesche* und *Wulf* (18) konform, die angeben, daß die Sapogenine des Bockshornklees aufgrund ihrer chemischen Struktur nur eine mittelgradige bis schwach ausgeprägte hämolytische Wirksamkeit besitzen. Nach *Tschesche* und *Wulf* (18, 19) und *Segal* et al. (16, 17) kann die hämolytische Wirkung der Trigonella-sapogenine auf eine Komplexbildung zwischen Sapogenin und dem Cholesterin der Erythrozytenmembran, die eine Beeinträchtigung der Permeabilität und somit der Stabilität der Erythrozytenmembran zur Folge hat, zurückgeführt werden.

Ein Einfluß der eingeschalteten Hitzebehandlung (10 min bei 70 °C) des Samenmehls auf die hämolytische Wirkung der Sapogenine ließ sich nicht feststellen.

Tab. 4. PER-Werte verschiedener Trigonelladiäten im Vergleich zu Casein.

PER	1. Versuch n = 7					2. Versuch n = 10						
	I	II	III	IV	V	VIa	VIb	VIIa	VIIb	VIIIa	VIIIb	IX
absolut	1,00 ± 0,4	1,80 ± 0,3	2,41 ± 0,1	1,26 ± 0,2	2,76 ± 0,1	2,58 ± 0,3	2,54 ± 0,3	2,67 ± 0,2	2,66 ± 0,1	2,67 ± 0,2	2,56 ± 0,2	3,28 ± 0,2
korrigiert*)	0,9 ± 0,3	1,63 ± 0,2	2,18 ± 0,1	1,14 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,5
relativ (% d. Kontr.)	36	65,2	87,2	45,2	100	80	80	84	80	84	80	100

V, III > II > IV > I  
(P < 0,01)

VIa - VIIIb < IV  
(P < 0,01)

\*) PER der Kontrollgruppe = 2,6  
\*\*) PER der Kontrollgruppe = 100

Tab. 5. Serum-Protein (g/100 ml) verschiedener Trigonelladiäten im Vergleich zu Casein (Mittelwerte von 7 bzw. 10 Tieren ± S).

Serum-Prot. (g/100 ml)	1. Versuch n = 7					2. Versuch n = 10					
	I	II	III	IV	V	VIa	VIb	VIIa	VIIb	VIIIa	VIIIb
4,98 ± 0,2	5,21 ± 0,3	5,28 ± 0,3	4,73 ± 0,4	5,64 ± 0,3	5,72 ± 0,3	5,79 ± 0,3	5,66 ± 0,4	5,64 ± 0,3	5,68 ± 0,3	5,73 ± 0,4	6,39 ± 0,2
I, IV < V II, III > IV (P < 0,01)											

VIa - VIIIb < IX  
(P < 0,01)

Tab. 6 Hämolyserate\* (%) von Rattenerthrozyten – Versuche mit rohen Trigonellasamen in Mischungen mit Maismehl bzw. Casein bei konstanter Vitamin-E-Zufuhr (1. Versuch) und rohen bzw. hitzebehandelten Samen in einer Mischung mit Casein bei unterschiedlich hohen Vitamin-E-Gaben.

Versuchsgruppe	1. Versuch				2. Versuch							
	I	II	III	IV	V	VIa	VIb	VIIa	VIIb	VIIIa	VIIIb	IX
Anzahl der Tiere pro Gruppe	7	7	7	7	7	10	10	10	10	10	10	10
hämolyt. Tiere i. d. letzten Vers.-Woche (Hämolys über 7%)	4	3	1	–	–	3	1	–	–	–	–	–
Hämolysrate % (am Versuchsende)	17,5 ± 9,9	69,7 ± 11,6	22,2	–	–	14,1 ± 10,7	16,7	–	–	–	–	–

\* ) = der Hämolysetest verlief negativ

Im zweiten Versuch trat in den ersten beiden Gruppen (VIa, VIb) mit der einfachen Tocopherolgabe vereinzelt eine allerdings geringfügige Hämolyserate auf; bei den Versuchsgruppen mit 10- bzw. 50facher Tocopherolzulage verlief der Test eindeutig negativ. Damit wird deutlich, daß durch eine Erhöhung der Vitamin-E-Gabe auf etwa 900 mg dl- $\alpha$ -Tocopherolacetat pro Kilogramm Futter (der Trigonellasamenanteil beträgt ca. 135 g) der sapogenininduzierten Hämolyse entgegengewirkt werden kann. Dieser Trend läßt sich anhand der gemessenen G6PDH-Aktivitäten (vgl. Tab. 7) bestätigen.

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) im Hämolsat zeigte einen signifikanten Anstieg bei den Gruppen VIa, VIIa und VIIIa, die rohes Trigonellasamenmehl in ihren Diäten erhielten, im Vergleich zu den korrespondierenden Gruppen, deren Diäten hitzebehandeltes Trigonellasamenmehl enthielten.

Die G6PDH-Werte im Serum waren gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls mäßig erhöht, auch hier wurden die höchsten Aktivitäten bei den Tieren der Gruppen VIa und VIb festgestellt. In diesem an sich empfindlicheren Test der Membranpermeabilität als der Hämolysetest mit Dialursäure wird die positive Wirkung der Hitzebehandlung auf Sapogeninwirkung deutlich, nicht jedoch bei der niedrigsten Tocopherolgabe der Gruppen VIa und VIb.

Der Anstieg der G6PDH-Aktivität im Serum weist auf eine möglicherweise sapogeninbedingte erhöhte Permeabilität der Erythrozytenmembran hin, während die erhöhte G6PDH-Aktivität im Hämolsat eine Kom-

Tab. 7. Enzymaktivitäten von GOT, GPT und G6PDH (mU/ml) von Ratten mit unterschiedlich behandeltem Trigonellasamenmehl im Vergleich zu Casein (n = Anzahl der untersuchten Tiere).

Gruppe	n	GOT	GPT	n	G6PDH-Serum	n	G6PDH-Hämolsat
VIa	7	163,2 ±13,4	10,0 ±2,8	5	25,7 ±6,2	7	154,8 ±17,8
VIb	7	151,4 ±18,4	9,1 ±2,9	4	26,1 ±5,1	9	147,8 ±17,1
VIIa	7	137,1 ±15,8	10,5 ±3,1	4	19,9 ±8,4	9	153,3 ±13,7
VIIb	7	133,9 ±6,9	8,5 ±2,3	5	17,9 ±3,4	10	147,8 ±19,9
VIIIa	7	134,2 ±21,3	11,7 ±1,3	4	20,6 ±7,9	9	149,8 ±12,2
VIIIb	7	135,7 ±11,2	7,8 ±2,1	5	20,5 ±4,5	9	143,5 ±12,0
IX	7	144,3 ±23,2	10,2 ±2,6	4	16,1 ±7,8	9	128,6 ±14,9
VIb - IX < I (P < 0,05)				VIa, VIIa, VIIIa > IX P < 0,05			

pensation der Saponinhämolyse durch eine vermehrte Erythrozytenneuproduktion vermuten läßt.

Die Bestimmung der Aktivität der Transaminasen im Serum zeigte bei der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) keine Abweichungen vom Normalbereich. Die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) war nur in den beiden Versuchsgruppen mit der einfachen Vitamin-E-Gabe (VIa und VIb) leicht erhöht, welches eine gesteigerte Stoffwechselbelastung der Leber möglicherweise im Zusammenhang mit der Sapogeninwirkung vermuten läßt.

Die Bestimmung weiterer hämatologischer Parameter zeigte keine pathologischen Veränderungen. Die Hämoglobinkonzentrationen (12,0–14,2 g/100 ml) sowie die Hämatokritwerte (34,0–43,5 Vol.-%) der Versuchstiere lagen alle im Normalbereich, ebenso die Erythrozytenanzahl ( $6,18 \times 10^6$ – $6,75 \times 10^6$ ) sowie die daraus berechneten Größen des Erythrozyteneinzolvolumens (MCV 50,6–57,9  $\mu^3$ ), der mittleren HB-Konzentration (MCHC 31,7–43,1 %) und des absoluten HB-Gehaltes der Einzelerythrozyten (MCH 18,1–21,5 pg).

Auch die im zweiten Versuch durchgeführten Analysen des Neutralfettgehaltes (7,9–9,1 g/100 g TS) und der Gesamtlipide (16,8–18,0 g/100 g TS) der Leber ergaben keine Abweichungen vom Normalbereich, die auf eine mögliche Beeinträchtigung der Leberfunktion schließen ließen.

### Zusammenfassung

In Experimenten an Ratten wurde der Einfluß der Verfütterung von unterschiedlichen Mengen roher bzw. hitzebehandelter (70 °C 10 min) Bockshornkleesamen (*Trigonella foenum-graecum*) in Abhängigkeit von der Qualität zugeführten Proteins und der Höhe der Tocopherolzulage (9, 90 und 450 mg dl- $\alpha$ -Tocopherolacetat/100 g Futter) auf die hämolytische Wirkung der in den *Trigonellasamen* enthaltenen Sapogenine untersucht.

Eine signifikant erhöhte Hämolyserate trat infolge der Verfütterung folgender Proteinkomponenten auf:  $\frac{1}{3}$  Trigonella +  $\frac{2}{3}$  Mais ( $69,7 \pm 11,6$  % Hämolyserate), 100 % Trigonella ( $21,0 \pm 8,6$  % Hämolyserate),  $\frac{1}{3}$  Trigonella +  $\frac{2}{3}$  Casein ( $14,1 \pm 10,7$  % Hämolyserate). Das Futter der o. g. Gruppen enthielt jeweils bedarfsdeckende Mengen an Vitamin E (9 mg/100 g Futter). Bei dieser Tocopherolgabe hat die eingeschaltete Hitzebehandlung der gemahlenen Samen keinen eindeutigen Einfluß auf die Sapogeninwirkung. In den Gruppen mit einer 10- bzw. 50fachen Tocopherolzulage verlief der Hämolysetest mit Dialursäure negativ.

Bei der Verwendung von Bockshornkleesamen in der Tierfütterung erscheinen demnach eine qualitativ gute Proteinversorgung sowie ausreichende Gaben an Vitamin E geeignet, die hämolsierende Wirkung der Sapogenine zu unterbinden.

### Summary

The influence of vitamin E (9, 90, 450 mg dl- $\alpha$ -tocopherol acetate/100 g diet), protein quality and temperature (70 °C for 10 min) on the sapogenin-induced hemolysis was studied in rats fed with diets containing different amounts of fenugreek-seed seedflour.

Significant increased hemolysis rates were found in rats on diets with the following protein components:  $\frac{1}{3}$  Trigonella +  $\frac{2}{3}$  Cornflour ( $69.7 \pm 11.6$  % hemolysis), 100 % Trigonella ( $21.0 \pm 8.6$  % hemolysis),  $\frac{1}{3}$  Trigonella +  $\frac{2}{3}$  Casein ( $14.1 \pm 10.7$  % hemolysis). The diets of these groups of animals contained raw Trigonella seeds and 9 mg vitamin E/100 g diet, which covers the requirements of rats on this vitamin. With this tocopherol supplement the applied heat treatment

had no influence on the sapogenin effects on the erythrocytes. In the groups with the 10th fold and 50th fold of the vitamin E supplementation no significant hemolysis rate was observed.

From these results we conclude that when fenugreek seeds are to be used in animal nutrition, a qualitative good protein supply as well as a sufficient intake of vitamin E should be considered in order to compensate the hemolytic effect of *Trigonella* sapogenins.

#### Literatur

1. Association of Official Agricultural Chemists, Official Methods of Analysis, ed. 12, Washington D.C. 1975. – 2. *Beythien-Demair*: Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker, 7. Auflage, S. 33, Dresden-Leipzig (1957). – 3. *Cornelius, E.*: Untersuchungen an Ratten über die Auswirkung der Verfütterung von Maillard-Produkten auf die Entstehung einer Fettleber. Diss. Gießen (1971). – 4. *Dawidar, A. M., A. A. Saleh, S. L. Elmotei*: Steroid Sapogenin Constituents of Fenugreek Seeds. *Planta Med.* **24**, 367 (1973). – 5. *Elmadfa, I.*: Über das Trigonellaprotein. *Die Nahrung* **19**, 683 (1975). – 6. *Elmadfa, I.*: Beitrag zur Wirkungsweise, Bedarfsermittlung und Hypervitaminose von Tocopherol; Untersuchung an Meerschweinchen. *Habilitationsschrift*, Gießen 1975. – 7. *Elmadfa, I., B. Kuhl*: The Quality of Fenugreek Seed Protein tested alone and in a Mixture with Corn Flour. *Nutr. Rep. Int.* **14**, 165 (1976). – 8. *Fazili, F. R. Y., R. Hardman*: Isolation and Characterisation of Steroids and other Constituents from *Trigonella Foenum Graecum*. *Phytochemistry* **10**, 2497 (1971). – 9. *Folch, J., M. Lees, W. Sloane, G. H. Stanley*: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 4 (1957). – 10. *Friedmann, L., W. Wiess, F. Wherry, D. L. Kline*: Bioassay of vitamin E by the dialuric acid hemolysis method. *J. Nutr.* **65**, 143 (1958). – 11. *Hardman, R., F. R. Y. Fazili*: Studies in the Steroidal Sapogenin Yield from *Trigonella Foenum Graecum*. *Planta Med.* **21**, 322 (1972). – 12. *Knight, J. F.*: Analysis of Fenugreek Sapogenins by Gas-liquid Chromatography. *J. Chrom.* **133**, 222 (1977). – 13. *Kornberg, A. et al.*: Methods in Enzymology 1. S. 323. Academic Press (New York 1975). – 14. *Lucy, I. A.*: Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **203**, 4 (1972). – 15. *Sauvaise, Y., J. C. Baccou*: Nutritional Value of the Proteins of a Leguminous Seed: Fenugreek. *Nutr. Rep. Int.* **14**, 527 (1976). – 16. *Segal, R., I. L. Goldzweig*: New aspects on the hemolytic properties of plant saponins. *Harakeach Haivri* **14**, 352 (1971). – 17. *Segal, R., P. Shatkovsky, I. L. Goldzweig*: On the Mechanism of Saponin Hemolysis I and II. *Biochem. Pharm.* **23**, 975 (1974). *Biochem. Pharm.* **24**, 77 (1975). – 18. *Tschesche, W., G. Wulff*: Konstitution und Eigenschaften der Saponine. *Planta Med.* **12**, 272 (1964). – 19. *Tschesche, W., G. Wulff*: Chemie und Biologie der Saponine. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **30**, 461 (1973). – 20. *Vogel, G.*: Zur Pharmakologie von Saponinen. *Planta Med.* **3**, 382 (1963). – 21. *Weichselbaum, T. E.*: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path.* **16**, 40 (1946).

#### Für die Autoren:

Prof. Dr. *I. Elmadfa*, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität, Wilhelmstraße 20, D-6300 Gießen