



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Untersuchung zur Ausscheidung von Thymol und
Carvacrol nach dermalen Applikation aus ätherischem
Oreganoöl im Harn“

verfasst von / submitted by

Meryem Özmen

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ. Prof. Mag. pharm. Dr. Walter Jäger

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Univ. Prof. Mag. pharm. Dr. Walter Jäger für die Ermöglichung und fachliche Beurteilung dieser Diplomarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Ass. Prof. Mag. pharm. Dr. Iris Stappen sowohl für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes als auch für die stets kompetente und wissenschaftliche Unterstützung, sowie ihr Engagement und bestmögliche Betreuung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Weiters gebührt ein spezieller Dank Dr. Jürgen Wanner, Kurt Kitzing GmbH in Wallerstein, Deutschland, für die Durchführung der HS-SPME-GC/MS Analytik.

Vielen Dank an Firma WADI, etherische Öle von Prof. Wabner, für die Zurverfügungstellung des ätherischen Oregano- und Jojobaöls.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Ziya für die aufopfernde Unterstützung in Krisenzeiten, meiner Mama Fatma für den Rückhalt und die Kraft, meinem Vater für die unendliche bedingungslose Liebe und meinen Brüdern Okan, Sadik, Hasan und Ufuk für die Unterstützung bei all meinen Entscheidungen danken. Danke für den uneingeschränkten Beistand!

Weiterer Dank gebührt meinen Kollegen an der Universität für die unzähligen schönen Erlebnisse und vor allem für ihre Freundschaft.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. ABSTRACT	2
3. EINLEITUNG	3
3.1. Ätherische Öle.....	3
3.2. Wirkung von ätherischen Ölen.....	4
3.3. Wirkmechanismus.....	5
3.4. Resorption	5
3.5. Carvacrol und Thymol.....	9
3.5.1. Metabolismus.....	10
3.5.1.1. Metabolismus von Thymol.....	11
3.5.1.2. Metabolismus von Carvacrol	16
3.5.1.3. Cytochrome bei der Metabolisierung von Thymol und Carvacrol	18
3.5.2. Pharmakologische Aktivität von Carvacrol und Thymol.....	19
4. EXPERIMENTELLER TEIL	21
4.1. Studienhintergrund.....	21
4.1.1. Body-Mass-Index.....	23
4.1.2. Körperfettanteil	24
5. ZIELSETZUNG	25
6. MATERIALIEN UND METHODEN	26
6.1. Chemikalien.....	26
6.2. Materialien.....	26
6.3. Geräte.....	29
6.3.1. Verwendete Messgeräte und Analysenparameter	30
6.4. Methoden.....	31
6.4.1. Festphasenmikroextraktion SPME	31
6.4.2. Probanden	33
6.4.3. Studienablauf.....	34
6.4.4. Probenentnahme	36

7. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
7.1. Analytik	37
7.2. Messung	41
7.3. Ergebnisse.....	42
7.3.1. Proband 1	43
7.3.2. Proband 2	45
7.3.3. Vergleich der Probanden 1 und 2	47
7.3.4. Proband 3	47
7.3.5. Proband 4	49
7.3.6. Vergleich aller Probanden.....	53
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66
10. TABELLENVERZEICHNIS	69

1. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz zahlreicher Studien über den Einsatzbereich ätherischer Öle fehlen wichtige Untersuchungen und Daten zu ihrer Pharmakokinetik. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Menge an Thymol und Carvacrol im Harn vier gesunder Probanden, davon zwei weibliche, nach einmaliger dermalen Applikation eines Oreganoöls quantifiziert. Das hierzu verwendete ätherische Oreganoöl wurde mit Jojobaöl auf 5% (w/w) verdünnt. Ferner wurde eine weitere Untersuchung an einer Probandin nach einmaliger oraler Applikation einer Oreganoöl-Kapsel durchgeführt. Um die Rolle des subkutanen Fettgewebes bei der Elimination von Thymol und Carvacrol festzustellen, nahmen an der Pilotstudie auch Probanden mit hohem BMI teil. Für die Dauer der Studienzeit wurden Harnproben gesammelt. Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels der automatisierten Headspace-Festphasenmikroextraktion. Zur Analytik wurde ein Gaschromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer herangezogen. Zur Bestimmung der Menge des Carvacrols und Thymols im Urin wurde zunächst der freie Anteil, anschließend durch Zusatz einer Amidosulfonsäure zur enzymatischen Spaltung der Konjugate der gebundene Anteil bestimmt. Freies Thymol und Carvacrol konnte im Urin nur in Spuren nachgewiesen werden.

In Bezug auf den hohen BMI konnte folgendes festgestellt werden: Bei der Probandin mit hohem BMI kam es über Nacht zu einer Anreicherung der Verbindungen im subkutanen Fettgewebe, welche am darauffolgenden morgen schubhaft aus dem Fettdepot freigesetzt wurden. Dagegen kam es beim männlichen Probanden mit hohem BMI bereits an Tag eins zu einer nahezu kompletten Ausscheidung. Bei den Probanden mit niedrigerem BMI kam es zu einer geringen, aber dennoch nachweisbaren schubhaften Freisetzung. Nach Applikation einer Einzeldosis einer Oreganokapsel wurde Carvacrol in den ersten 24 h nahezu komplett ausgeschieden. An den weiteren Tagen konnte nur eine geringe Menge an Gesamtcarvacrol quantifiziert werden.

2. ABSTRACT

Although a large variety of studies show a wide range of application options of essential oils, important pharmacokinetic data are largely missing.

The present pilot study sought to quantify the excreted amount of thymol and carvacrol in urine after a single dermal administration of essential oregano oil on four healthy volunteers (two female). In the dermal application condition a 5% (w/w) dilution of oregano oil in jojoba oil was used. Further, another investigation was performed in a female subject after oral application of a single dose of an oregano oil capsule as a comparison to the dermal resorption. The second aim in this study was to determine the role of subcutaneous fat, which is a main storage depot for a number of lipophilic molecules in the elimination of thymol and carvacrol. Therefore, participants with high and normal BMI were included. Urine samples were collected daily during the study period. Determination of thymol and carvacrol in urine was carried out by automated headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography combined with mass spectrometry. The total amount of thymol and carvacrol after enzymatic hydrolysis of the conjugates with sulfamic acid was quantified after quantification of free thymol and carvacrol. Only a small amount of free thymol and carvacrol was detectable in the volunteers' urine. In respect of high BMI, the following was found: There was an accumulation of the compounds in subcutaneous fatty tissue in the female participant with high BMI. In regard to the pharmacokinetic data there was a slow elimination of carvacrol on day one. An accumulation of the compounds over night led to an episodic release on the following morning. However, the male subject with high BMI appears to be the complete opposite as the most was eliminated on the first day. Even though the excreted concentration was very low, subjects with normal BMI showed an episodic release of the lipophilic compounds, as well.

The excretion of carvacrol after application of a single dose oregano oil capsule was very quick, with most being excreted within the first 24 h. On the following days only a very small amount of total carvacrol was quantified.

3. EINLEITUNG

3.1. Ätherische Öle

Ätherische Öle, die aus aromatischen Heilpflanzen gewonnen werden, werden seit Jahrhunderten in der Volksmedizin für Heilzwecke verwendet. Sie stellen ein komplexes Vielstoffkomponentengemisch dar, das sich aus zahlreichen lipophilen, flüchtigen Einzelsubstanzen zusammensetzt. Die Hauptkomponenten sind zumeist Mono- und Sesquiterpene und gehören zur Stoffgruppe der Isoprenoide, auch Terpene bezeichnet. Eine weitere dominante Gruppe sind die Phenylpropanderivate. Isoprenoide sind aus C₅-Isopreneinheiten aufgebaut, wobei die Basiseinheit Monoterpene bilden, die aus zwei C₅-Einheiten, d.h. aus zehn Kohlenstoffatomen, aufgebaut sind (Abbildung 1). Je nach Anzahl der Bausteine unterscheidet man weiters zwischen Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- und Polyterpene, die wiederum innerhalb der Gruppe in zyklische und azyklische Terpene unterteilt werden (Hänsel *et al.*, 2010).

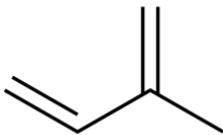


Abbildung 1: Strukturformel von Isopren

Isoprenmoleküle kommen sowohl durch eine 1,4-Verknüpfung (= Kopf-Schwanz-Verknüpfung) als auch durch eine 4,4-Verknüpfung (= Schwanz-Schwanz-Verknüpfung), einer Dimerisierung, zustande (Abbildung 2). Als Bestandteil ätherischer Öle findet man aufgrund ihrer Flüchtigkeit vorwiegend lipophile Mono- und Sesquiterpene (Hänsel *et al.*, 2010).

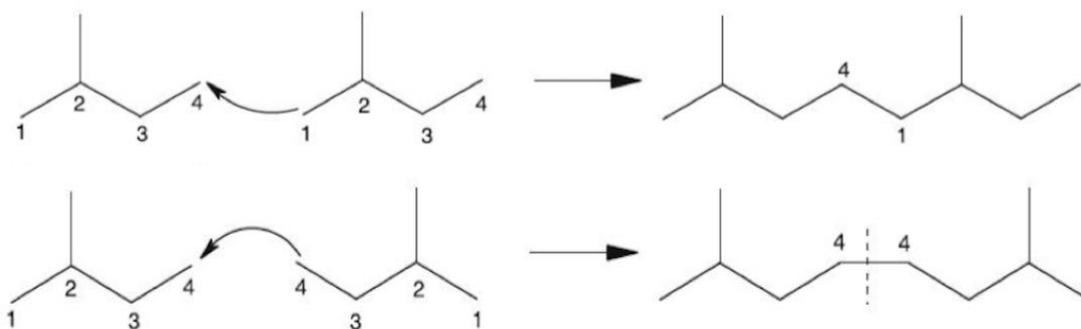


Abbildung 2: Die Verknüpfungs-Arten der Isoprenmoleküle (Hänsel *et al.*, 2010)

3.2. Wirkung von ätherischen Ölen

Ätherische Öle haben aufgrund ihrer Komplexität ein breites Wirkungsspektrum und wirken dosisabhängig (Steflitsch *et al.*, 2013). Sie werden zum Beispiel eingesetzt als Expektorantien, Stomachika, Cholagoga und Carminativa, Rhinologika, in Mundpflege und Gurgelmittel und als Zusatz zu Externa (Hänsel *et al.*, 2010).

Traditionell bekannte Thesen über die Wirkung ätherischer Öle bzw. isolierter Einzelverbindungen konnten in zahlreichen klinischen Studien bestätigt werden. Aufgrund der mukolytischen, sekretomotorischen, expektorierenden, antimikrobiellen und antitussiven Eigenschaften wird 1,8-Cineol bei diversen respiratorischen Erkrankungen eingesetzt. Zahlreiche klinische Studien konnten eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktionsparameter bei chronischer Bronchitis (Mahlo, 1990; Meister *et al.*, 1999), COPD (Wittmann *et al.*, 1998) und Asthma (Juergens *et al.*, 2003) zeigen. Federspil *et al.* demonstrierten im Rahmen einer doppelblinden, randomisierten Multicenterstudie, welche in unterschiedlichen Behandlungszentren ablief, die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Myrtol standardisiert (Gelomyrtol® forte) und einem vergleichbaren ätherischen Öl gegenüber Placebo bei 331 Patienten mit akuten Sinusitiden. Sowohl Myrtol als auch das ätherische Öl, welches nicht näher beschrieben worden ist, waren in Hinsicht auf Wirksamkeit und Verträglichkeit gegenüber Placebo statistisch signifikant überlegen (Federspil, 1997).

Göbel *et al.* zeigten in einer Studie bei 32 gesunden Probanden die schmerzlindernde Wirkung von Pfefferminzöl. Die Studie wurde doppelblind, randomisiert und placebokontrolliert im Cross-over Design durchgeführt. Die Probanden erhielten vier Präparate (Eukalyptusöl und/oder Pfefferminzöl in verschiedenen Konzentrationen in Ethanol), welche großflächig auf Stirn und Schläfen aufgetragen wurden. Pfefferminzöl allein zeigte eine signifikante Linderung der Schmerzintensität bei Spannungskopfschmerzen (Göbel *et al.*, 1995). Weiteres wirkt Pfefferminzöl bei oraler Applikation u.a. bei Reizdarmsyndrom (Rees *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 1997; Cappello *et al.*, 2007).

Eine antivirale und antibakterielle Aktivität zahlreicher ätherischer Öle konnte in *in vitro* Studien mehrfach gezeigt werden (Maruzella *et al.*, 1958; Lee *et al.*, 2017; Shapiro *et al.*, 1994; Pattnaik *et al.*, 1996).

3.3. Wirkmechanismus

Angriffspunkte ätherischer Öle sind Zellmembranen. Die Moleküle interagieren in niedriger Konzentration mit bestimmten Enzymen, Rezeptorzellen, Ionenkanälen und Carriern, indem die spezifische Aktivität dieser beeinflusst wird. In hoher Konzentration üben ätherische Öle eine inhibitorische Wirkung auf die Membran durch Abdichtung aus. Diese Effekte basieren auf den physikochemischen Eigenschaften ätherischer Öle (Teuscher *et al.*, 1990).

3.4. Resorption

Die Therapie mit ätherischen Ölen erfolgt nasal, intern und perkutan (Wabner *et al.*, 2012). Aufgrund der Lipophilie und der kleinen Molekülgröße werden ätherische Öle nach oraler Gabe rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert (Teuscher *et al.*, 1990).

Orale Applikation

Nach wie vor gibt es einen Mangel an Untersuchungen zur Resorption flüchtiger Substanzen nach oraler Applikation (Kohlert, 2001). Diliberto *et al.* untersuchten die Resorption von radioaktiv markiertem ¹⁴C-Citral nach oraler Applikation an männlichen Ratten. Etwa 80-95% der verabreichten Radioaktivität wurden in Atemluft, Urin und Faeces detektiert (Diliberto *et al.*, 1988).

Bounds *et al.* konnten in Ratten und Mäusen über 95% der Radioaktivität des oral verabreichten radioaktiv markierten ¹⁴C-t-Anethols im 24 h Urin wiederfinden (Bounds *et al.*, 1996).

Kohlert *et al.* untersuchten in einer pharmakokinetischen Studie die systemische Verfügbarkeit von Thymol am Menschen. Zwölf Probanden wurde eine Dosis Thymian Trockenextrakt mit einem Thymolgehalt von 1.08 mg pro Tablette verabreicht. Die Resorption lag bei mindestens 16% des applizierten Thymols. Nachzuweisen war Thymol in humanem Plasma und im Urin in Form seiner Metaboliten (Kohlert *et al.*, 2002).

Dermale Applikation

Monoterpene können aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften die Haut gut penetrieren und eine lokale und systemische Wirkung bei dermalen Applikation erzielen. Angewendet werden sie als Badezusatz (Römmelt *et al.*, 1974; Schäfer *et al.*, 1982) oder als halbfeste Zubereitung zur kutanen Anwendung u.a. in Form einer Salbe (Schuster *et al.*, 1986; Langeneckert, 1998). Die Resorption erfolgt rasch, wobei das Ausmaß von diversen Faktoren wie der Größe des behandelten Hautareals, der Hautbeschaffenheit, der Konzentration des Öls und der Expositionszeit abhängt. Die maximalen Plasmakonzentrationen für Campher, Menthol, α -Pinen, Isobornylacetat und radioaktiv markiertem Limonen, die Hauptkomponente von Pinimenthol® Erkältungsbad, wurden bei Mäusen innerhalb von 10 min. nach Applikation erreicht (Schäfer *et al.*, 1982). Für 1,8-Cineol dagegen wurde c_{max} beim Menschen nach einer Stunde beobachtet (Langeneckert, 1998). Die verwendete Massagetechnik während der Applikation des ätherischen Öls hat ebenfalls einen Einfluss auf die pharmakokinetischen Parameter wie von Fuchs *et al.* gezeigt wurde. Hierfür wurde Carvon in Erdnussöl, welches als Trägersubstanz fungierte, im unteren Bereich des Abdomens einer Probandin aufgetragen. Zur Untersuchung der perkutanen Absorption des Carvons wurde das Öl auf drei unterschiedliche Techniken (normale Massage, Irradiationsmassage und Okklusionsmassage) angewandt. Letztere Massagetechnik zeigte einen signifikant höheren Plasmaspiegel (Abbildung 3) und eine um 2.2-2.7fache höhere Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2\beta}$). Die Konstante der Absorptionsrate zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied (Fuchs *et al.*, 1997). Aufgrund der Flüchtigkeit der Verbindungen werden diese schon während der Applikation auf die Haut inhalativ resorbiert. Um ausschließlich die Menge an dermal resorbierten Verbindungen zu quantifizieren verwendeten Friedl *et al.* in ihrer Studie zur Quantifizierung von 1,8-Cineol in humanem Blut und Plasma ein Inhalationsgerät. Dieses verabreichte den Probanden, während der Applikation von 1,8-Cineol in Erdnussöl in den unteren Bereich des Abdomens, frische, geruchlose Luft. Parallel wurden vier weiteren Probanden 1,8-Cineol mit einem dafür vorgesehenen Gerät inhalativ verabreicht. Im Vergleich zur dermalen Applikation wurde die Substanz nach inhalativer Applikation fünf bis zehn Minuten früher und in etwa zehnfach höherer Konzentration im Blut und Plasma detektiert. Dies begründeten die Autoren durch die Kumulation der lipophilen Monoterpene in subkutanem Fettgewebe (Friedl *et al.*, 2015). Auch in einer früher durchgeführten Studie fanden Friedl *et al.* einen

signifikanten Zusammenhang zwischen dem Körperfettanteil und der quantifizierten Menge an (-)-Linalool in humanem Blut. Bei Frauen, welche einen deutlich höheren Körperfettanteil aufwiesen, wurde eine größere Menge an (-)-Linalool quantifiziert (Friedl *et al.*, 2010).

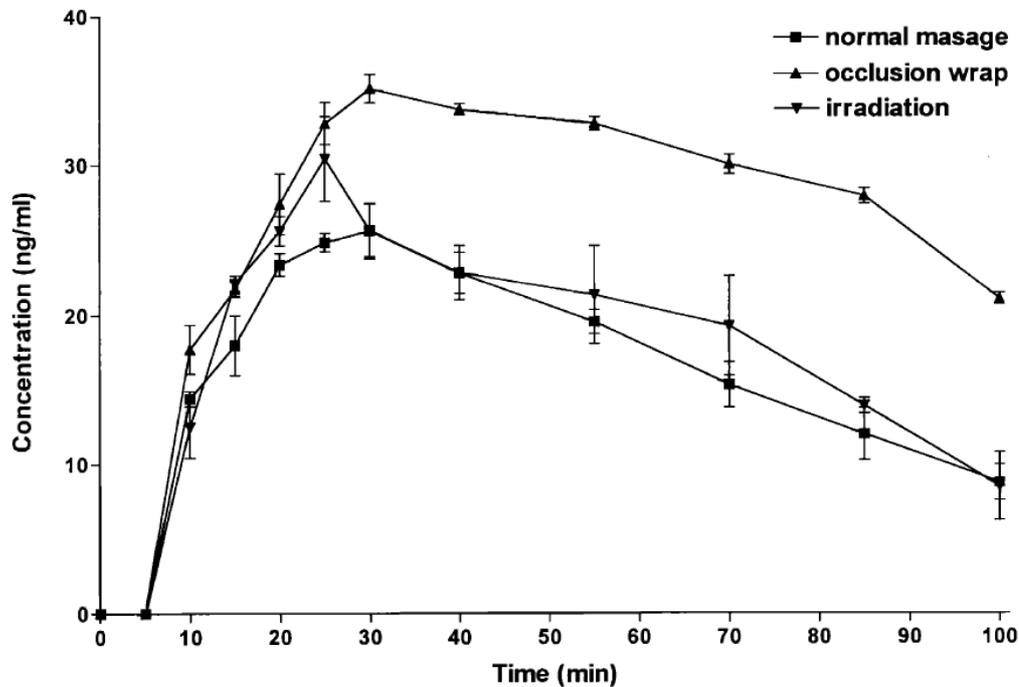


Abbildung 3: Plasmakonzentration des Carvons in Abhängigkeit von drei verschiedenen Massagetechniken (übernommen aus Fuchs *et al.*, 1997)

Nasale und inhalative Applikation

Weitere Anwendungsformen stellen die nasale und inhalative Applikation dar. Hier erfolgt die Resorption sowohl über die Schleimhäute als auch über die Lunge (Teuscher *et al.*, 1990). Zur Therapie von Atemwegserkrankungen, insbesondere bei Infektionen des Respirationstraktes, eignen sich flüchtige Monoterpene (Kohlert, 2001). 1,8-Cineol konnte bereits nach fünf Minuten Inhalation im Blut nachgewiesen werden. Die maximale Plasmakonzentration wurde nach 14-19 min erreicht. Bei allen vier Probanden (zwei weiblich, zwei männlich) waren sowohl die pulmonale Resorption als auch t_{max} vergleichbar. Die Eliminationshalbwertszeit hingegen wies erhebliche intraindividuelle Schwankungen auf. Bei den männlichen Probanden lag diese zwischen 2-4.8 min, bei den weiblichen Probanden zwischen 6.9-13.1 min.

Man nahm an, dass die Eliminationshalbwertszeit bei Frauen aufgrund des höheren Körperfettanteils im Bezug zum Körpergewicht einen 2.5-10mal höheren Wert aufwies. Somit vermuteten die Autoren, dass das subkutane Fettgewebe eine wesentliche Rolle bei der Elimination des 1,8-Cineols spielen könnte (Jäger *et al.*, 1996). Die Halbwertszeit nach oraler Verabreichung von 1,8-Cineol lag bei 5,86 h (Langeneckert, 1998). Friedl *et al.* zeigten in Ihren Untersuchungen, dass lipophile, flüchtige Monoterpene nach inhalativer Applikation früher im Blut detektiert werden konnten, während nach dermalen Applikation eine Detektion etwa fünf bis zehn Minuten später erfolgte (Friedl *et al.*, 2010, 2015). Die pulmonale Resorption lässt sich durch verschiedene Faktoren, wie der Atemtechnik und Art der Verbindung, beeinflussen. Etwa 54-76% der inhalativ verabreichten Dosis von α -Pinen, Menthol und Campher wurden pulmonal resorbiert. Ermittelt wurde dieser Wert durch die Bildung der Differenz eingeatmeter und abgeatmeter Menge. Hierbei wurden bei der Berechnung der absorbierten Menge der Metabolismus vor der Resorption, die Ablagerungen des Inhalats an der Schleimhaut sowie Verteilung in andere Kompartimente nicht berücksichtigt (Römmelt *et al.*, 1978; Römmelt *et al.*, 1988; Levin *et al.*, 1992). Pharmakokinetische Parameter von Verbindungen lassen sich am besten durch die Bestimmung der Plasmakonzentrationen nach intravenöser Injektion bestimmen (Kohlert, 2001). So wurden nur 4-6% der inhalativ applizierten Menge im Blut wiedergefunden (Römmelt *et al.*, 1978).

Trotz jahrhunderter langer Anwendung ätherischer Öle in der Phytomedizin fehlen nach wie vor grundlegende Daten zur Resorptions- und Eliminationsgeschwindigkeit, systemischen Verfügbarkeit und Verteilung auf die einzelnen Organe der wichtigen und zahlreich eingesetzten Terpene. Aus Vergiftungsfällen kann man schlussfolgern, dass die Verteilung der Verbindungen auf alle Organe erfolgt und lipophile Terpenoide auch in das Zentralnervensystem gelangen (Hänsel *et al.*, 2010). Sie können aufgrund ihrer Lipophilie und Molekülgröße mühelos die Blut-Hirn-Schranke passieren. Versuchstiere zeigten nach Inhalation verschiedener Duftkomponente (Baldrianöl, Borneol, Isoborneol, Bornylacetat und Isobornylacetat) eine Reduktion ihrer motorischen Aktivität (Buchbauer *et al.*, 1992). Eine deutliche Steigerung des zerebralen Blutflusses konnte an acht gesunden Probanden mittels Computertomographie festgestellt werden (Nasel *et al.*, 1994).

Ambrosch *et al.* konnten nach einer inhalativen und dermalen Applikation einen Einfluss auf die Gehirnaktivität feststellen. Gesunden Probanden wurden (-)-Linalool und 1,8-Cineol auf inhalativem und dermale Weg verabreicht. Nach dermalen Applikation von 1,8-Cineol konnte wie erwartet eine gesteigerte Gehirnaktivität im Frontalkortex festgestellt werden. Dermal verabreichtes (-)-Linalool führte zu einer gesteigerten zerebralen Durchblutungsrate in den Basalganglien, welche mit einer Magnetresonanztomographie registriert wurde. Zusätzlich wurde die Fehlerquote bei der Durchführung einer Arbeitsgedächtnis-Aufgabe verringert. Nach inhalativer Applikation konnte keine veränderte Gehirnaktivität festgestellt werden (Ambrosch *et al.*, 2017)

3.5. Carvacrol und Thymol

Die Isomere Carvacrol (2-Methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) und Thymol (2-(1-Methylethyl)-5-methyl-phenol) sind monocyclische Monoterpenphenole, die als Inhaltsstoffe verschiedener Arzneipflanzen vorkommen. Mengenmäßig dominierend sind sie im ätherischen Öl in *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) und *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) enthalten. Das Verhältnis beider Monoterpene variiert je nach Herkunft, Erntezeit und Klima (Hänsel *et al.*, 2010).

Die Biosynthese erfolgt über den klassischen, enzymkatalysierten Acetat-Mevalonat-Weg (Abbildung 4). Glucose wird in mehreren Reaktionsschritten zu Phosphoenolpyruvat (PEP) abgebaut. Durch Decarboxylierung und Acetylierung zu Acetyl-CoA wird aus drei Molekülen Acetyl-CoA die Mevalonsäure synthetisiert. Letztere wird zu γ -Terpinen umgewandelt, welches durch Aromatisierung zu *p*-Cymen und in weiterer Folge durch Hydroxylierung zu Carvacrol und Thymol umgewandelt wird (Friedman, 2014).

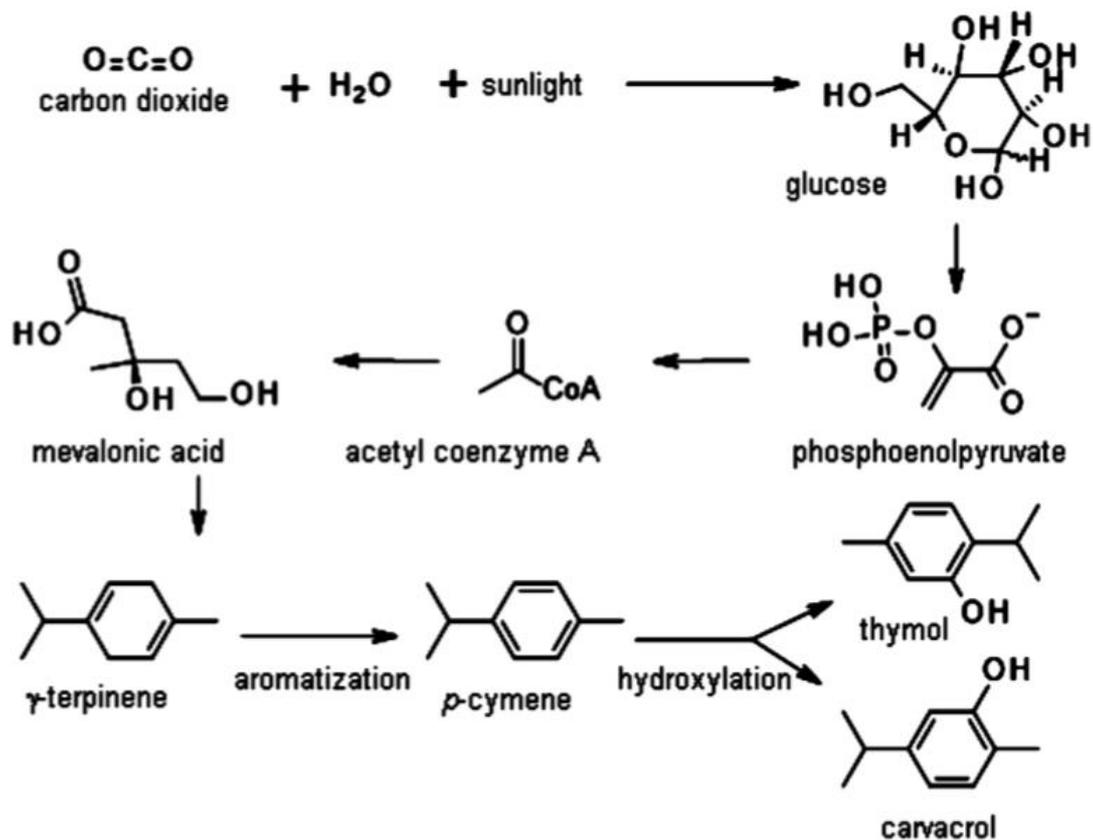


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese von Carvacrol und Thymol in Pflanzen (übernommen aus Friedman, 2014)

3.5.1. Metabolismus

Der Metabolismus von Verbindungen ätherischer Öle hängt von ihrer chemischen Struktur ab. Chemisch unveränderte lipophile Substanzen können nur sehr langsam eliminiert werden. Enzyme wandeln Verbindungen durch Biotransformation in Stoffwechselprodukte um, die schneller ausgeschieden werden können. Bei der Biotransformationsreaktion unterscheidet man zwischen der Phase-I- und Phase-II-Reaktionen. Zu den wesentlichen Phase-I-Reaktionen zählen die Oxidation und Reduktion, sowie die Hydrolyse und Hydratisierung. Es werden entsprechende funktionelle Gruppen freigelegt oder welche an unpolare Moleküle eingeführt. Bei Phase-II-Reaktionen handelt es sich um Konjugationsreaktionen. Hier koppeln Transferasen funktionelle Gruppen mit polaren Molekülen. Man unterscheidet zwischen Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung und Konjugationen mit Glutathion und Aminosäuren. Die daraus entstehenden Metabolite

sind sehr polar und somit gut wasserlöslich, wodurch sie schneller ausgeschieden werden (Eichelbaum *et al.*, 2017). Die Metabolisierung von Monoterpenen erfolgt in der Leber nach bekannten Mechanismen. Lipophile Verbindungen werden hydroxyliert, anschließend an D-Glucuronsäure gepaart und renal ausgeschieden (Hänsel *et al.*, 2010).

3.5.1.1. Metabolismus von Thymol

Takada *et al.* untersuchten bereits vor 40 Jahren die Metabolisierung von Thymol in Kaninchen und am Menschen. Thymol wurde den Kaninchen oral in einer Dosis von 0.5 g/kg appliziert. Anschließend wurde ein 24 h Urin gesammelt und entsprechend extrahiert und fraktioniert. Verglichen wurde der Anteil an Glucuronsäure und Sulfonsäure im Urin vor und nach der Applikation von Thymol (Abbildung 5). Die Autoren kamen zum Schluss, dass überwiegend eine Konjugation des Thymols bzw. seiner Oxidationsprodukte an Glucuronsäure stattfand. Nach etwa 24 h lagen die Werte für die Glucuronsäure zwischen 181.6 mg-183.0 mg, die Sulfonsäure hingegen lag zwischen 40.0 mg und 73.6 mg. Im Urin der zwei Probanden konnte freies Thymol in seiner unkonjugierten Form nur in geringen Mengen wiedergefunden werden. Isoliert wurden Thymolglucuronid und Thymolhydrochinon, der hydroxylierte Metabolit des Thymols. Bestätigt wurden die Identität der Verbindungen durch einen Vergleich mit synthetisierten Referenzprodukten. Thymolsulfat wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion detektiert. Eine Massenspektrometrie wurde nicht durchgeführt (Takada *et al.*, 1979).

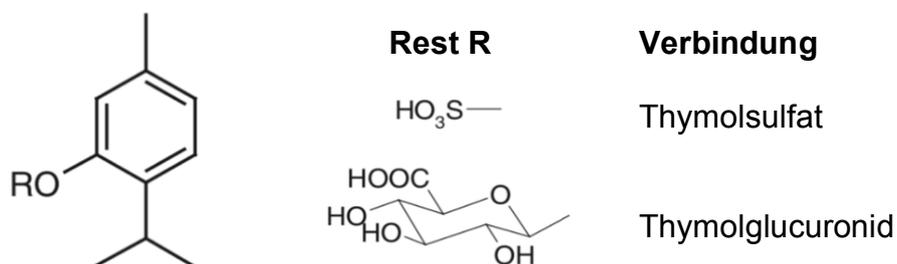
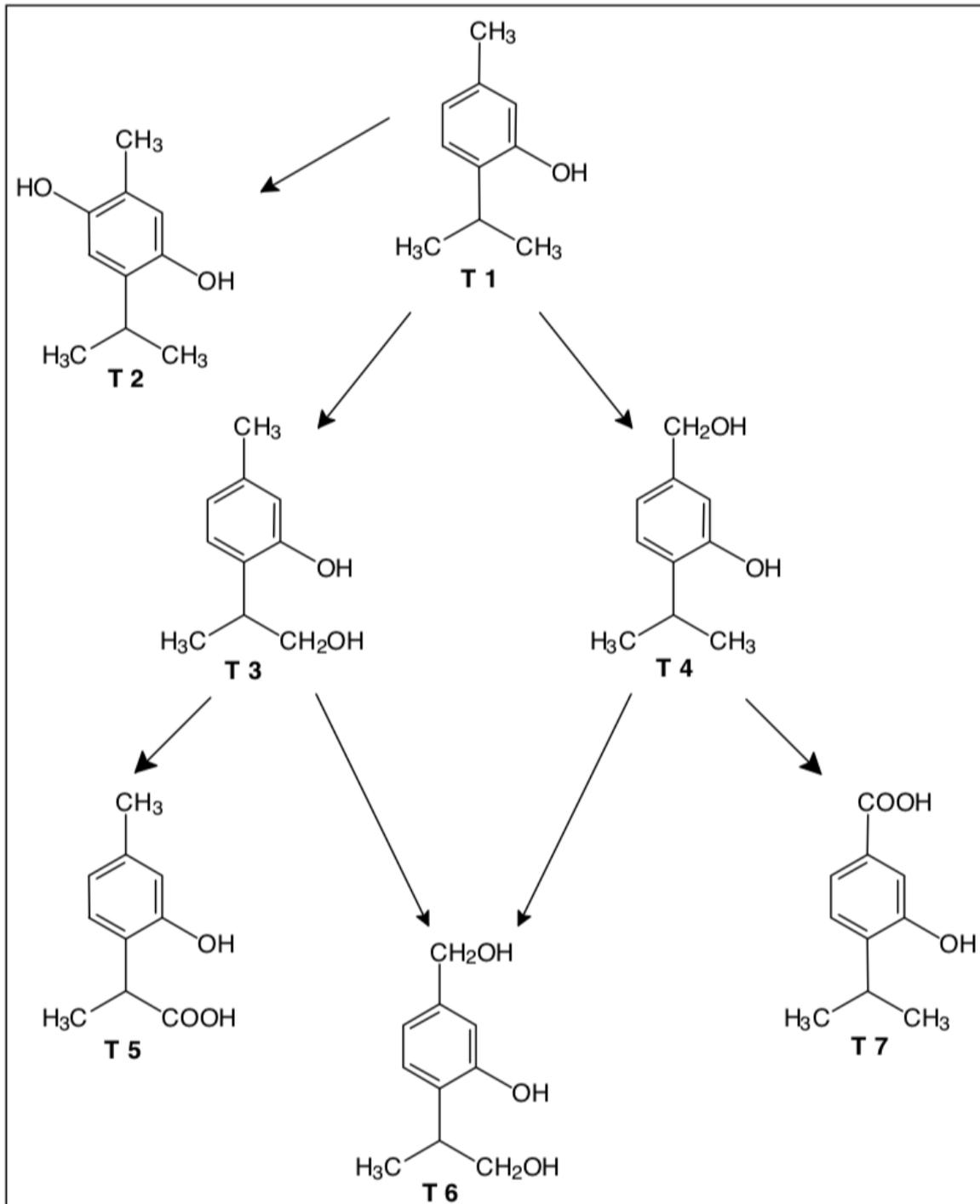


Abbildung 5: Strukturformeln von Thymolsulfat und Thymolglucuronid (Kohlert *et al.*, 2002)

In einem weiteren tierexperimentellen Versuch konnten Austgulen *et al.* (1978) sechs Phase-I-Metaboliten von Thymol im Rattenurin auffinden (Abbildung 6).

Die Applikation erfolgte per Magensonde in einer Dosis von 1 mmol·kg⁻¹ Thymol. Eine Oxidationsreaktion am Aromaten und an der aliphatischen Seitenkette führten zu den Metaboliten. Den Hauptmetaboliten stellte Thymol selbst dar, Thymohydrochinon (T2) dagegen wurde verhältnismäßig in geringen Mengen detektiert. Die Strukturaufklärung der Massenspektrometrie der Thymolmetabolite erfolgte anhand von Fragmentierungsmustern mit *p*-Cymen und nicht mit Referenzsubstanzen. Die Metabolite des *p*-Cymens wurden bereits in einer früher durchgeführten Studie bestimmt (Austgulen *et al.*, 1978). Mit der systematischen Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Thymol nach oraler Applikation im Menschen beschäftigten sich Kohlert *et al.*. Nach Applikation von einer Einzeldosis Bronchipet®TP Tablette entsprechend 1.08 mg Thymol wurde freies Thymol weder im Plasma noch im Urin nachgewiesen. Thymol konnte im Plasma und Urin als Phase-II-Metabolit Thymolsulfat und im Urin ausschließlich als Thymolglucuronid per HPLC-MS/MS identifiziert werden. Die Quantifizierung von Thymol erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse seiner Phase-II-Konjugate. Die Resorption erfolgte rasch und hauptsächlich im oberen Darmabschnitt (Kohlert *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse bestätigten die Versuche mit Ileostomiepatienten von Somerville *et al.*, bei denen die ausgeschiedene Mentholmenge im Urin um nur 6% geringer war im Vergleich zu gesunden Probanden (Somerville *et al.*, 1984).

Thymol war bereits nach 20 min im Plasma, welches enzymatisch behandelt wurde, detektierbar. Der maximale Plasmaspiegel wurde frühestens nach etwa 50 min erreicht, gefolgt von einer zwei stündigen Plateauphase und anschließendem raschen Abfall, der gegen Ende langsamer wurde. Die Plasmakonzentrationen zeigten einen biphasischen kinetischen Verlauf mit einer schnelleren Verteilungsphase und einer langsameren Eliminationsphase. Die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) lag bei 10.2 h. Im Plasma war Thymol etwa 38 h lang detektierbar, wobei das renal eliminierte Thymolglucuronid bereits nach 24 h nicht mehr im Urin nachgewiesen werden konnte. Die Identifizierung der Phase-II-Metabolite erfolgte mit der Tandem-Massenspektrometrie nach der Trennung mittels HPLC. Dieses Verfahren ist ausgesprochen empfindlich und selektiv, wodurch Verbindungen durch charakteristische Tochtterspektren, welche durch eine zweite Ionisierung entstehen, exakt identifiziert werden können, ohne den Einsatz von Referenzsubstanzen (Kohlert *et al.*, 2002).



- | | |
|----|--|
| T1 | Thymol |
| T2 | 2,5-Dihydroxy-p-cymene |
| T3 | 2-(2-Hydroxy-4-methylphenyl)propan-1-ol |
| T4 | 5-(Hydroxymethyl-2-(1-methylethyl)phenol |
| T5 | 2-(Hydroxymethyl-2-hydroxyphenyl)propan-1-ol |
| T6 | 2-(2-Hydroxy-4-methylphenyl)propionic acid |
| T7 | 3-Hydroxy-4-(1-methylethyl)benzoic acid |

Abbildung 6: Aus dem Rattenurin identifizierte Phase-I-Metabolite des Thymols (übernommen aus Austgulen *et al.*, 1978)

In diversen tierexperimentellen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Metabolismus von Menthol ähnlich wie der des Thymols verläuft (Mans *et al.*, 1987; Yamaguchi *et al.*, 1994). Nach oraler Applikation wurde Menthol rasch resorbiert und im Urin konnte hauptsächlich Mentholglucuronid und geringe Mengen Mentholsulfat detektiert werden. Freies Menthol konnte auch hier nicht gefunden werden (Bell *et al.*, 1981). Eine weitere klinische Untersuchung, die sich mit den Phase-I-Metaboliten des Thymols nach oraler Applikation beschäftigte, zeigte, dass beim Menschen primär eine Hydroxylierung am aromatischen Ring des Thymols stattfand (Thalhamer *et al.*, 2011). Identifiziert wurden somit *p*-Cymen-2,5-diol, seine oxidierte Form *p*-Cymen-2,5-dion und kleine Mengen an *p*-Cymen-2,3-diol als monohydroxylierter Phase-I-Metabolit des Thymols im Urin nach einer enzymatischen Behandlung mit β -Glucuronidase. Die Strukturabsicherung erfolgte mit Referenzsubstanzen, die in Abbildung 7 dargestellt sind. Eine Hydroxylierung der Isopropylseitenkette führte zum instabilen *p*-Cymen-3,8-diol und seinem Dehydrationsprodukt *p*-Cymene-8-en-3-ol. Letzteres konnte in allen Urinproben detektiert werden. Die Identifikation von Thymol und seinen diversen Phase-I-Metaboliten erfolgte mit der neuen, äußerst empfindlichen HSSE-Methode kombiniert mit einer TD-GC/MS.

Hydroxylierungen am Ring spielten bei Ratten eine untergeordnete Rolle (Abbildung 8). Austgulen *et al.* konnten ebenfalls *p*-Cymen-2,5-diol und vier weitere Verbindungen, *p*-Cymen-3,9-diol und *p*-Cymen-3,7-diol sowie deren Oxidationsprodukte als Phase-I-Metabolite identifizieren (Austgulen *et al.*, 1978). Die Anwesenheit dieser vier genannten Verbindungen konnten Thalhamer *et al.* in ihrer Studie nicht beobachten (Thalhamer *et al.*, 2011). Hingegen konnten Austgulen *et al.* *p*-Cymen-2,3-diol, *p*-Cymene-3,8-diol und sein Dehydrationsprodukt nicht detektieren. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Autoren keinen direkten Vergleich der Verbindungen mit synthetisierten Referenzsubstanzen durchführten (Austgulen *et al.*, 1978).

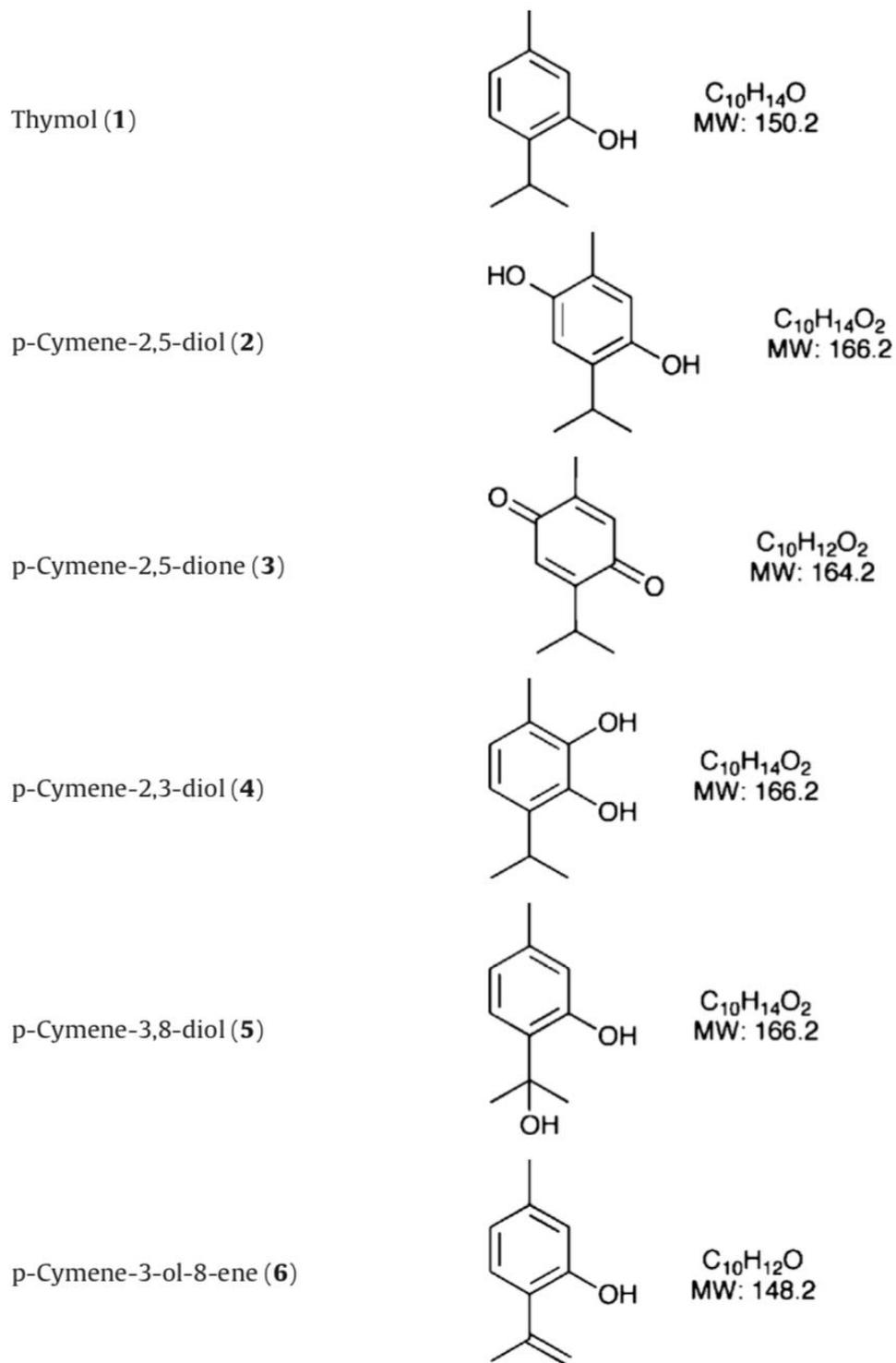


Abbildung 7: Referenzsubstanzen für die Strukturabsicherung und ihre Struktur- und Summenformeln, sowie die Molekulargewichte (übernommen aus Thalhamer *et al.*, 2011)

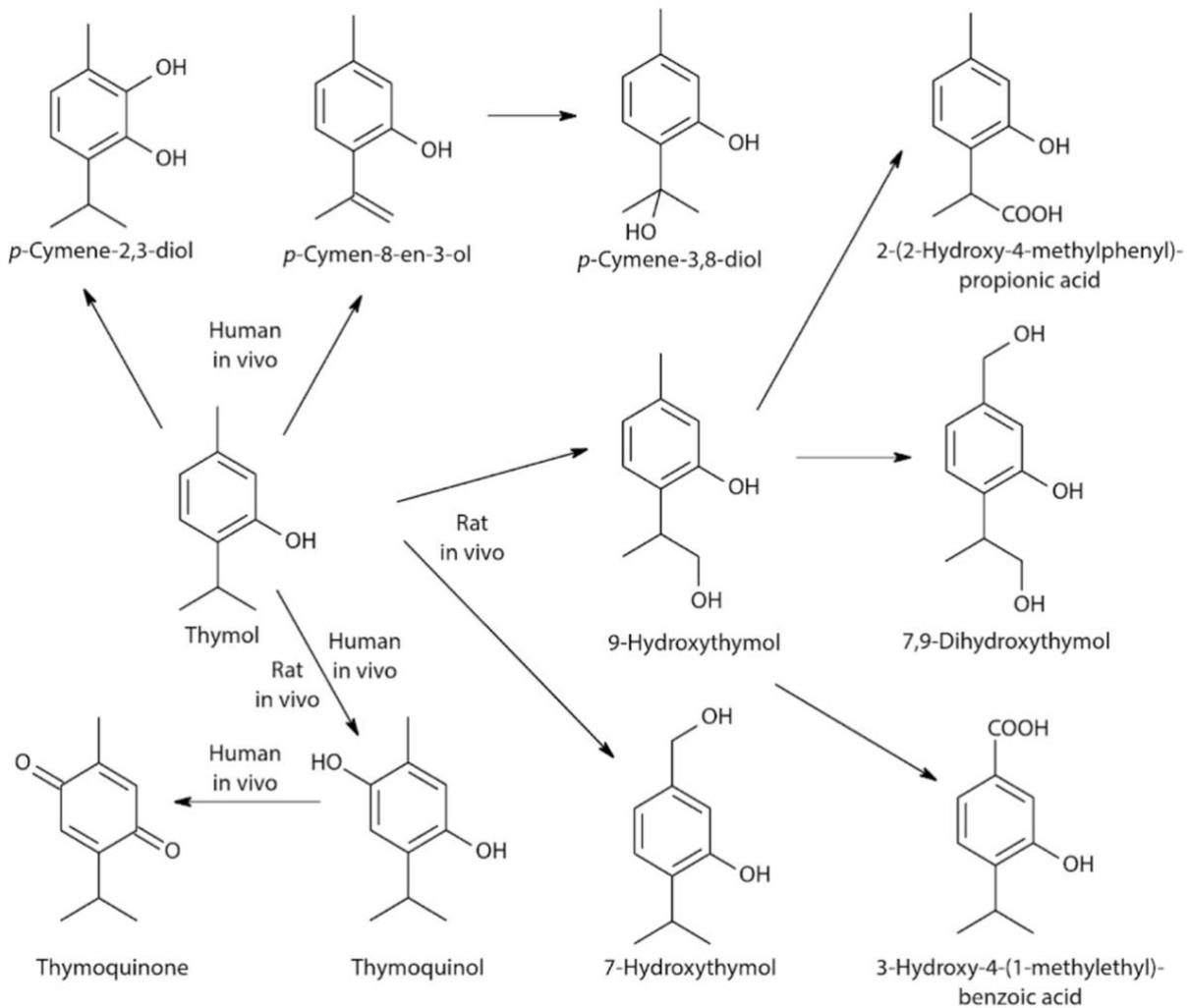


Abbildung 8: Vergleich der potentiellen Metaboliten von Thymol bei Menschen und Ratten (übernommen aus Baser *et al.*, 2016)

3.5.1.2. Metabolismus von Carvacrol

Die Ergebnisse einer an männlichen Wistar-Ratten durchgeführten Studie zeigten, dass die Ausscheidung von unverändertem Thymol und seinem Strukturisomer Carvacrol, 24 h nach oraler Applikation, rasch und nur in geringen Mengen erfolgte (Austgulen *et al.*, 1978). Da die Urinproben vor der GC-Analyse mit den Enzymen β -Glucuronidase und Sulfatase behandelt wurden, lagen Thymol und Carvacrol, ausgehend von nachfolgenden Studien, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in Form seiner Phase-II-Konjugate im Urin vor (Jäger *et al.*, 2016). Das Oxidationsmuster des Carvacrols wies Ähnlichkeiten zu dem des Thymols auf. Analog zu diesem führte eine Hydroxylierung am Ring zu 2-Hydroxycarvacrol, welches allerdings eine weniger bedeutende Rolle bei dem Stoffwechselweg des Carvacrols spielte (Abbildung 9).

Eine weitere Oxidation des 7-Hydroxycarvacrols führte zur Isopropylsalicylsäure. Im Vergleich zu Thymol stellte das Alkoholderivat des Carvacrols den Hauptmetaboliten dar, welches durch eine Oxidationsreaktion an einem der terminalen Methylgruppen der Isopropylseitenkette stattfand (Scheline, 1991).

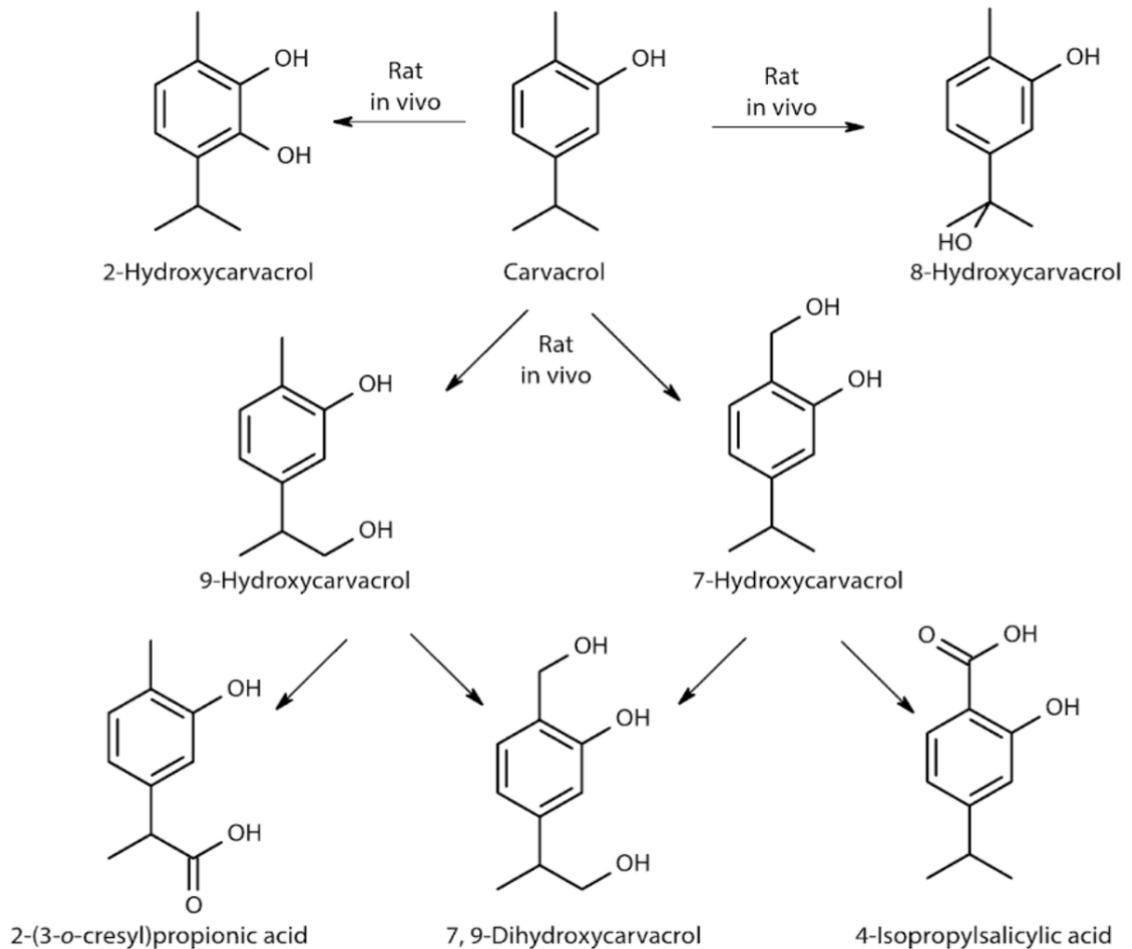
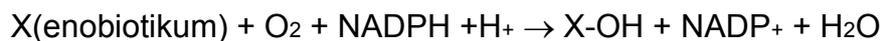


Abbildung 9: Metabolismus und renale Ausscheidung von Carvacrol in Ratten (übernommen aus Baser *et al.*, 2016)

3.5.1.3. Cytochrome bei der Metabolisierung von Thymol und Carvacrol

Eine zentrale Schlüsselrolle bei der oxidativen Phase-I-Reaktion spielt die Familie der Cytochrom-P₄₅₀-Enzyme. Es handelt sich um Hämproteine, die ubiquitär vorkommen, vorrangig aber in den Hepatozyten lokalisiert sind (Guengerich, 2006). Bei der Reaktion wird ein molekulares Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das zweite verwertet indem es zu Wasser reduziert wird. CYP-Enzyme katalysieren sowohl eine Oxidation als auch eine Reduktion (Freissmuth *et al.*, 2016):



Cytochrom-P₄₅₀-Gene werden eingeteilt in Genfamilie, Subfamilie und innerhalb dieser in Isoformen. Die für den humanen Metabolismus relevante CYP-Enzyme gehören zu den Genfamilien 1,2 und 3 an (Freissmuth *et al.*, 2016).

Um Erkenntnisse über die Rolle der CYP-Enzyme bei der Metabolisierung von Thymol und Carvacrol zu erhalten, inkubierten Dong *et al.* diese mit humanen Lebermikrosomen (HLMs) unter Anwesenheit von NADPH. Die Metabolisierung beider Verbindungen in den HLMs gehorchten der Michaelis-Menten-Kinetik. Im Zuge von Studien, bei denen potente CYP-Inhibitoren (ABT, 8-Methoxypsoralen) die Umwandlung von Thymol und Carvacrol in seine jeweiligen Metaboliten hemmte, kamen die Autoren zum Entschluss, dass CYPs die Hauptenzyme in der Metabolisierung von Carvacrol und Thymol waren. Beteiligt waren am Phase-I-Metabolismus die rekombinanten humanen CYP1A2, CYP2A6 und CYP2B6 Enzyme. Eines der bedeutsamsten Enzyme des Phase-II-Metabolismus, das an der Elimination diverser Medikamente und endogener Substanzen wie die Schilddrüsenhormone, Steroidhormone, Gallensäure, Bilirubin und fettlösliche Vitamine beteiligt ist, ist die UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT bzw. UGT). Ferner ist UGT für die Ausscheidung von Carvacrol in Form des Glucuronidderivates verantwortlich (Dong *et al.*, 2012).

In einer weiteren *in vitro* Studie wurde demonstriert, dass die Glucuronidierung durch UGT1A3, 1A6, 1A7, 1A9 und 2B7 erfolgte. Im Zuge der Studie wurde Carvacrol auf die Fähigkeit zur Inhibition des am Metabolismus beteiligten UGTs getestet. Die Inkubation von Carvacrol mit 4-Methylumbelliferon, einem nicht-spezifischen Substrat, und mit Propofol als spezifischem Substrat für UGT1A7, 1A8 und 1A9 zusammen mit

UGT-Isoenzymen in HLMs und HIMs (humane Darmmikrosomen), zeigte Änderungen in der Enzymaktivität.

Carvacrol führte eindeutig zu einer Hemmung des UGT1A9 und zu einer geringfügigen, vernachlässigbaren Hemmung anderer Isoenzyme. Somit kamen die Autoren zum Entschluss, dass das Isoenzym UGT1A9 hauptverantwortlich für die Glucuronidierung von Carvacrol in den HLMs und UGT1A7 in den HIMs ist. Eine mögliche Interaktion bei einer medikamentösen Therapie mit einem Substrat für UGT1A9 und 1A7 in Kombination mit carvacrolhaltigen Präparaten sollte in Betracht gezogen werden (Dong *et al.*, 2012).

3.5.2. Pharmakologische Aktivität von Carvacrol und Thymol

Carvacrol und Thymol haben u.a. eine starke antibakterielle (Crespo *et al.*, 1990; Perez-Conesa *et al.*, 2011), antiphlogistische (Morgenstern, 1998; Landa *et al.*, 2009), antifungale (Ahmad *et al.*, 2008), antivirale (Schwenk, 1998), antioxidative (Youdim und Deans, 1999; Slamenova *et al.*, 2011) und sekretolytische (Weiß, 1991) Wirkung. Ein antikarzinogenes und antigenotoxisches Potenzial konnte in Säugetierzellen demonstriert werden. Carvacrol weist bei Mäusen eine inhibitorische Eigenschaft auf das Wachstum der Myoblastenzellen auf (Zeytinoglu *et al.*, 2003). *In vitro* führt Carvacrol in humanen Lymphozyten zu keiner Induktion des Schwesterchromatidenaustausches (SCE), während es in Kombination mit Mitomycin C (MMC), einem Zytostatikum welches SCE induziert, zu einer Reduktion der SCE-Rate führt (Ipek *et al.*, 2003). Für eine mögliche Anwendung als antikarzinogenes Mittel sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zahlreiche Studien befassten sich mit der bakterio-statischen Wirkung des Thymianöls bzw. der Komponenten Thymol und Carvacrol. Beide Verbindungen haben ein breites Wirkspektrum im Gram-negativen und Gram-positiven Bereich. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung zeigten, dass die antimikrobielle Aktivität von Carvacrol gegenüber Eugenol, Menthol und zwei synthetisierten Derivaten von Carvacrol, Carvacrolmethylether und Carvacrylacetat, deutlich stärker ausgeprägt war. Dies war auf die freie Hydroxylgruppe, den deprotonierten Phenolring und die hydrophobe Eigenschaft zurückzuführen (Ben Arfa *et al.*, 2006). Carvacrol und Thymol können die bakterielle Doppellipidschicht beeinträchtigen, in dem sie die Barrierefunktion

herabsetzen und so die Permeabilität und Membranfluidität sowie den Austritt von ATP, Neukleinsäuren und Ionen erhöhen (Ultee *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 2001). Durch die gesteigerte Permeabilität wurde die Antibiotika Aufnahme in die bakterielle Zelle erhöht (Johnny *et al.*, 2010). Intrazellulärer ATP-Mangel, Änderungen des Membranpotenzials und auch die erhöhte Permeabilität für K⁺-Ionen und Protonen, welche zu einem Verlust des Ionengradienten führt, beeinträchtigt essentielle Stoffwechselprozesse in der Bakterienzelle und führt letztendlich zum Zelltod (Ultee *et al.*, 2002). Eingesetzt werden Carvacrol und Thymol hauptsächlich in der Phytotherapie bei Infektionen der Atemwege (z.B. Bronchipret®), aber auch als Bestandteil in Kosmetika, als Desinfektionsmittel und Fungizid (Andersen, 2006).

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Studienhintergrund

Zur leichteren Lesbarkeit werden in der vorliegenden Diplomarbeit alle genderspezifischen Bezeichnungen in männlicher Sprachform verwendet.

Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität und systemischen Verfügbarkeit pflanzlicher Alternativen leisten in Zeiten einer steigenden Resistenzrate gegenüber Antibiotika einen wesentlichen Beitrag zur sicheren Anwendung von pflanzlichen Arzneimitteln, die ätherische Öle enthalten, bei der Therapie bestimmter Infektionskrankheiten. Im Rahmen einer Pilotstudie, durchgeführt im Rahmen einer Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Chemie, Division für Klinische Pharmazie und Diagnostik (Universität Wien) in Zusammenarbeit mit der Praxisgemeinschaft Dorfinger Urologie und Labor Wien, wurde die antimikrobielle Aktivität von Oreganoöl bei Harnwegsinfektionen (HWI) nach dermalen Applikation untersucht (Pavlovic, 2017). Als Vergleich zwischen dermalen und oraler Resorption bekamen auch zwei Patienten das Oreganoöl in Form einer Kapsel verabreicht. Ziel war es, durch die antimikrobielle und antiphlogistische Eigenschaft des Oreganoöls das Keimwachstum zu unterdrücken und so die Intervalle der Antibiotikagabe zu vergrößern. Ein Nachweis der Reduktion der Keimzahl würde so den Einsatz von Antibiotika reduzieren, was wiederum einen positiven Einfluss auf die Verminderung von Resistenzen haben könnte. Die Pilotstudie befasste sich ausschließlich mit dem bakteriologischen Befund. Die GC-MS Analytik wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Eingeteilt wurden die an der Studie teilnehmenden Patienten in der Arztpraxis in drei Gruppen.

Gruppe 1 wurde zusätzlich zur dermalen Applikation von 5% Oreganoöl in Jojobaöl auf den unteren Bauchbereich mit Ibuprofen 400 mg gegen die Schmerzen behandelt. Die Patienten der Gruppe 2 bekamen zum ätherischen Öl ein Antibiotikum verordnet und Gruppe 3 bekam neben dem Antibiotikum reines Jojobaöl zur topischen Anwendung (Kontrollgruppe). Die Keimzahl und Keimart im Harn wurden an Tag eins (vor Beginn der Behandlung) und Tag acht bestimmt. Die Detektion von Thymol und Carvacrol im Harn erfolgte mittels GC-MS.

In allen drei Gruppen kam es mit wenigen Ausnahmen zu einer Reduktion der Keimzahl und Leukozyten ($p = 0.001$). Zwischen den drei Behandlungsmethoden gab es keinen signifikanten Unterschied (Keimzahl $p = 0.845$, Leukozyten $p = 0.834$).

Eine Reduktion der Keimzahl in Gruppe 1 (ÄÖ + Ibuprofen) - mit Ausnahme von zwei Patienten von sechs - lässt darauf schließen, dass das Oreganoöl antimikrobiell aktiv war (Pavlovic, 2017). Carvacrol und Thymol konnte man zwar im Harn nachweisen, allerdings in freier Form bzw. als Reinsubstanz nur in Spuren. Wie schon aus der Literatur bekannt, lagen die Verbindungen größtenteils als Konjugate vor. Um die Gesamtmenge an Carvacrol und Thymol bestimmen zu können, wurden sie durch Zusatz von Amidosulfonsäure aus den Verbindungen gespalten. In Tabelle 1 wird die Menge an Carvacrol vor und nach der Säurespaltung im Harn an Tag eins und acht dargestellt. Hohe Mengen an Carvacrol an Tag eins könnten durch die Aufnahme von Lebensmitteln zustande gekommen sein. Solch hohe Werte kommen nämlich, wie bei den zwei Patienten ersichtlich, die eine Kapsel eingenommen hatten, durch eine orale Aufnahme zustande. In die Arztpraxis kamen die Patienten ohne Instruktionen bezüglich Nahrungsverhalten und erst am Kontrolltag wurde entschieden, welcher Patient an der Studie teilnehmen konnte. Danach wurden die Patienten explizit darauf hingewiesen keine thymol- und carvacrolhaltige Nahrung aufzunehmen und auf Kosmetika zu verzichten, die diese enthielten. Auf die Einhaltung der Diät kann man durch die Werte an Tag acht, wo weniger Carvacrol nachweisbar war, schließen. Um genauere Aussagen treffen zu können, würde es eines echten Leerharns bedürfen. Die Problematik besteht jedoch darin, dass eine HWI sich im vornhinein nicht bemerkbar macht. Anhand der vorliegenden Daten konnte die GC-MS Analytik nicht in Korrelation mit der antimikrobiellen Wirkung gesetzt werden.

Bei genauerer Auswertung der Ergebnisse der Studie fiel auf, dass es bei zwei Patienten aus der Gruppe 1 und 2 (4/29105 und 3/31848) zu keiner Reduktion der Keimzahl kam. Beide Patienten wiesen interessanterweise einen hohen Body-Mass-Index auf (27.34 und 34.16) (Pavlovic, 2017). Folgende Hypothese wurde aufgestellt: Kleine lipophile Verbindungen können sich im Fettgewebe anreichern. Dadurch werden die lipophilen Substanzen in geringerer Menge resorbiert und können in Folge auf die Keime nicht bzw. gering wirken. Menschen mit einem hohen BMI und Körperfettanteil könnten nach der Penetration nach dermalen Applikation durch die Einlagerung der lipophilen Substanz in das Fettgewebe der Bauchdecke schlechter auf die Therapie mit Carvacrol und Thymol ansprechen. Das Keimwachstum würde dadurch nicht unterdrückt werden. Diese Annahme wurde in der Pilotstudie von zwei Patienten mit einem hohen BMI unterstützt.

Tabelle 1: Ergebnisse der GC-MS Analysen der Urinproben. Konzentration an Carvacrol in ng/mL an Tag eins und acht vor und nach Zusatz der Amidosulfonsäure zur enzymatischen Spaltung der Konjugate.

	SubjID	vor Säurespaltung [ng/mL]		nach Säurespaltung [ng/mL]	
		Tag 1	Tag 8	Tag 1	Tag 8
Gruppe 1					
1.	1/5311	<1	<1	19	18
2.	4/29105	5	<1	18	8
3.	14/26620	<1	3	4	55
4.	18/17479	455.0	<1	431	2.1
5.	21/24034	<1	<1	2.7	<1
6.	22/11505	6.7	<2	0.9	1.2
7.	2/27454	3	4	14	37
Gruppe 2					
1.	3/31848	<1	<1	5	39
2.	7/22247	<1	2	6.7	41
3.	9/3376	2.3	3	34.4	49
4.	11/30562	9.8	<1	16.8	45
5.	19/32485	1.0	<1	2.9	7
6.	20/16564	<1	4.3	118	4.0
Gruppe 3					
1.	5/7832	<1	<1	24	16
2.	6/31889	<1	<1	1	10
3.	8/22561	5.2	<1	6	5
4.	10/31569	4	<1	50	17
5.	13/4000	5.8	<1	21.8	10
6.	24/10425	2.4	<1	2.0	<1
Kapsel					
1.	K1/31985	<1	53.8	3.1	133.6
2.	K2/8771	<1	172	<1	378

4.1.1. Body-Mass-Index

Der Body-Mass-Index (BMI), auch Körpermasseindex (KMI) genannt, definiert Übergewicht und Adipositas. Er stellt den Quotienten aus Körpergewicht in Kilogramm durch die Körpergröße in Meter zum Quadrat dar:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht } kg}{\text{Körpergröße } m^2}$$

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass der BMI bezüglich der Körperzusammensetzung der Person nichts aussagt und als alleiniger Wert zur

Beurteilung des Körpergewichtes nicht herangezogen werden sollte. Demnach können Menschen mit demselben BMI-Wert eine enorme Varianz der Muskel- und Fettmasse aufweisen. Dies trifft besonders bei Kraftsportlern, aber auch bei Querschnittsgelähmten und bei Amputation zu. Weiteres werden weder Alter noch Geschlecht berücksichtigt. Als grober Richtwert, um das Risiko für Übergewicht einzuschätzen, ist er sehr praktikabel und schnell ohne apparativen Aufwand bestimmbar (Tzamaloukas *et al.*, 2005). Tabelle 2 zeigt die Gewichtsklassifizierung anhand des BMI für Erwachsene nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO, Stand 2019).

Tabelle 2: BMI Klassifikation für Erwachsene (WHO, Stand 2019).

BMI [kg/m ²]	Gewichtsklassifizierung
<18.5	Untergewicht
18.5 – 24.9	Normalgewicht
25.0 – 29.9	Präadipositas
30.0 – 34.9	Adipositas Grad I
35.0 – 39.9	Adipositas Grad II
>40	Adipositas Grad III

4.1.2. Körperfettanteil

Um eine bessere Aussage über das Körpergewicht im Vergleich zum BMI machen zu können, wird die Bestimmung des Körperfettanteils (KFA) herangezogen. Der KFA gibt den prozentualen Anteil an angelagertem Körperfett im Verhältnis zur Gesamtkörpermasse an, nicht jedoch ob es sich um Viszeral- oder Unterhautfettgewebe handelt. Letzteres ist direkt sichtbar und fungiert als Wärmeisolator und hat eine Depotfunktion. Das Viszeraalfett umhüllt die inneren Organe, hat teils eine mechanische Schutzfunktion und dient als Energiespeicher (Trippo, 2000). Eine einfache und kostengünstige Bestimmung des Körperfettanteils ist die Messung der Hautfaltendicke anhand eines Messschiebers, einem sogenannten Caliper. Gemessen werden kann mit dem Caliper an verschiedenen Punkten. Daumen und Zeigefinger bilden dabei eine Hautfalte und nach Einrasten der Druckmesshilfe wird der gemessene Wert abgelesen. Anschließend erfolgt die Auswertung des prozentualen Fettanteils mit Hilfe einer Tabelle (Vanhöfen, 2014).

5. ZIELSETZUNG

Trotz der großen Anzahl an Studien über die mikrobielle Aktivität von Carvacrol und Thymol fehlen wichtige Untersuchungen zur Pharmakokinetik. Derartige pharmakokinetische Untersuchungen nach dermalen und oraler Applikation würden einen erheblichen Beitrag zur Sicherheit in der Anwendung von ätherischen Ölen leisten und eine Alternative zur antibiotischen Therapie von rezidivierenden HWI bieten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es Carvacrol und Thymol nach dermalen und oraler Applikation eines Oreganoöls im Harn nachzuweisen. Um die in der Arbeit von Pavlovic über die „Untersuchung der Wirkung von ätherischem Oreganoöl auf die Keimzahl im Harn nach dermalen Applikation“ aufgestellte Hypothese über die Depotfunktion des subkutanen Fettgewebes für lipophile Verbindungen Carvacrol und Thymol bei Menschen mit einem hohen BMI näher zu betrachten (Pavlovic, 2017), sollte die Rolle des subkutanen Fettgewebes bei der Elimination, im Rahmen einer Pilotstudie mit Probanden mit einem hohen und normalen BMI, aufgeklärt werden. Dabei wurde die mit dem Harn ausgeschiedene Menge an Carvacrol und Thymol nach einer Probenaufarbeitung mittels GC-MS quantifiziert.

6. MATERIALIEN UND METHODEN

6.1. Chemikalien

• Amidosulfonsäure (H ₃ NSO ₃ , kristallin, pH = 0)	Bernd Kraft GmbH, D-Duisburg
• Carvacrol 98% (C ₁₀ H ₁₄ O, flüssig)	J&K Scientific Ltd
• Thymol 99% (C ₁₀ H ₁₄ O, kristallin)	Kurt Kitzing GmbH

6.2. Materialien

• 20 mL Vials	ThermoScientific Chromacol™
• Finnpiquette Digital 2-10 mL	Labsystems
• Pipettenspitzen 2-20 mL	Finntip 63 Labsystems
• Caliper	blupalu
• Personenwaage	Withings Body+ WLAN-Körperwaage für Körperzusammensetzung Nokia

Oreganoöl und Oreganokapsel

Das für die Pilotstudie verwendete ätherische Öl wurde von der Firma WADI GmbH – Ätherische Öle von Prof. Wabner zur Verfügung gestellt. Die Kapsel stammte von BIOVEA. Die genauen chemischen Zusammensetzungen der jeweiligen Produkte sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt. Abbildung 10 und Abbildung 11 stellen die GC-MS Spektren dar. Das Oreganoöl enthielt 75.7% Carvacrol und Thymol, die Oreganokapsel 65.2% dieser Mischung bezogen auf das gesamte Öl. Vor Beginn der Untersuchung wurde das Oreganoöl mit Jojobaöl auf 5% (w/w) verdünnt, in Braunglas Pipettenflaschen abgefüllt und als Pflegeöl bezeichnet.

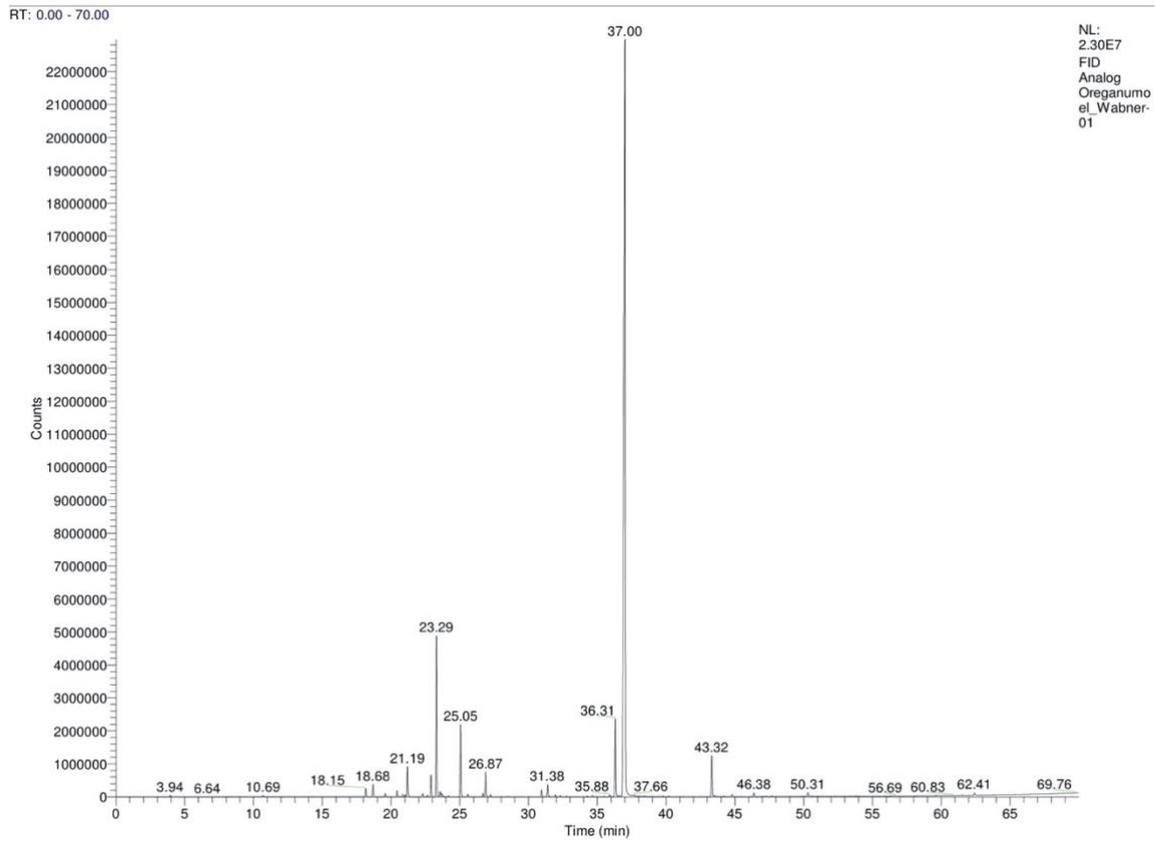


Abbildung 10: GC-Spektrum des ätherischen Oreganoöls von Fa. Wabner

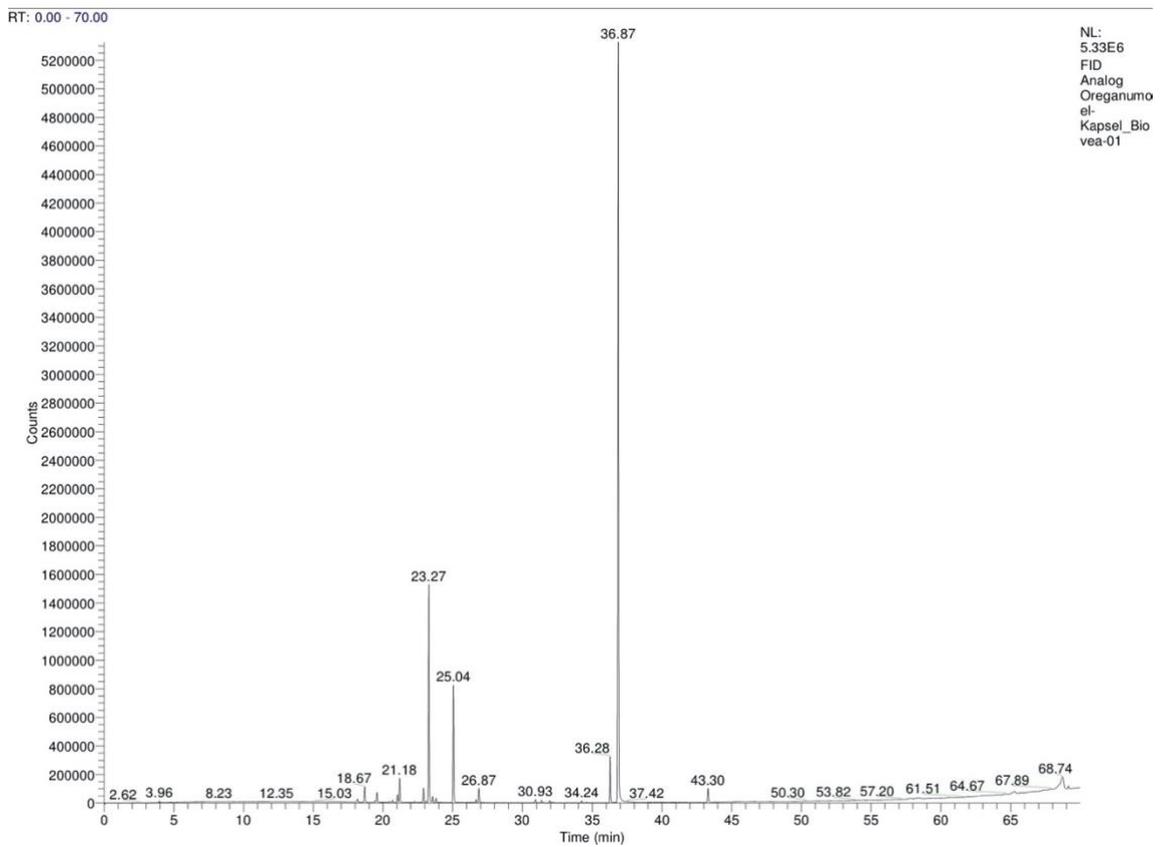


Abbildung 11: GC-Spektrum der Oreganokapsel von BIOEVA

Tabelle 3: Zusammensetzung des Oreganoöls von Fa. Wabner

Substanzbez.:	Apex RT	Ri#	%Area_{FID}
2-Methyl- methylbutyrat	10.63	773	0.1
α -Thujen	18.15	934	0.4
α -Pinen	18.68	944	0.7
Camphen	19.57	961	0.2
1-Octen-3-ol	20.43	978	0.3
3-Octanon	20.85	986	0.1
β -Pinen	21.04	990	0.1
Myrcen	21.19	993	1.5
α -Phellandren	22.28	1014	0.2
δ -3-Caren	22.64	1020	0.1
α -Terpinen	22.9	1025	1.1
<i>p</i> -Cymen	23.29	1033	8.1
Limonen	23.56	1038	0.3
β -Phellandren	23.69	1041	0.2
1,8-Cineol	23.8	1043	tr.
(<i>E</i>) - β -Ocimen	24.18	1050	0.1
γ -Terpinen	25.05	1067	3.7
<i>cis</i> -Sabinenhydrat	25.57	1077	0.1
Terpinolen	26.67	1098	0.2
Linalool	26.87	1102	1.3
<i>trans</i> -Sabinenhydrat	27.23	1109	0.1
Borneol	30.93	1183	0.4
Terpinen-4-ol	31.38	1192	0.7
<i>p</i> -Cymen-8-ol	31.52	1194	0.1
α -Terpineol	31.95	1203	0.1
<i>cis</i> -Dihydrocarvon	32.3	1210	0.1
<i>trans</i> -Dihydrocarvon	32.75	1220	tr.
Carvacrolmethylether	34.25	1251	0.1
Carvon	34.64	1259	0.1
Carvenon	35.46	1276	0.1
Thymolmethylether	35.88	1285	0.1
Thymol	36.31	1294	4.3
Carvacrol	37	1309	71.4
Eugenol	39.74	1369	tr.
Carvacrylacetat	40.2	1380	tr.
(<i>E</i>) - β -Caryophyllen	43.32	1451	2.4
Aromadendren	44.16	1471	tr.
α -Humulen	44.79	1486	0.1
β -Bisabolen	46.38	1524	0.2
(<i>E</i>) - α -Bisabolen	47.69	1556	tr.
Caryophyllenoxid	50.31	1622	0.2
Summe			99.1

tr. = trace (<0.05%)

#50 m x 0.25 mm x 1.0 μ m SE-52

Tabelle 4: Zusammensetzung der Oreganoöl Kapsel von BIOEVA (Inhalt der Kapsel 150 mg Oreganoöl)

Substanzbez.:	Apex RT	RI#	%Area_{FID}
α-Thujen	18.15	934	0.2
α-Pinen	18.67	944	1.2
α-Fenchen	19.43	958	0.1
Camphen	19.57	961	0.8
1-Octen-3-ol	20.44	978	0.1
Sabinen	20.67	982	0.1
β-Pinen	21.03	989	0.6
Myrcen	21.18	992	1.7
α-Phellandren	22.27	1013	0.1
α-Terpinen	22.89	1025	1.0
<i>m</i> -Cymen	23.08	1029	0.1
<i>p</i> -Cymen	23.27	1033	15.6
Limonen	23.55	1038	0.5
1,8-Cineol	23.78	1042	0.4
γ-Terpinen	25.04	1067	8.5
Terpinolen	26.65	1098	0.2
Linalool	26.87	1102	1.1
Borneol	30.93	1183	0.3
Terpinen-4-ol	31.37	1191	0.2
α-Terpineol	31.95	1203	0.2
Carvacrolmethylether	34.24	1251	0.1
Carvon	34.59	1258	0.1
Thymol	36.28	1293	3.6
Carvacrol	36.87	1306	61.6
(<i>E</i>)-β-Caryophyllen	43.3	1451	1.2
Caryophyllenoxid	50.3	1622	0.1
Summe			99.5

6.3. Geräte

Die Analyse von Carvacrol und Thymol im Harn erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) kombiniert mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einer Massenspektrometrie (MS), die Probenaufarbeitung mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion (headspace solid-phase microextraction; HS-SPME).

6.3.1. Verwendete Messgeräte und Analysenparameter

Festphasenmikroextraktion

• Gerät	Autosampler Thermo Scientific TriPlus RSH
• SPME-Faser	PDMS/DVB/CAR (Art. 57298-U Supelco, SPME fiber assembly Polydimethylsiloxane/Divinylbenzen/Carboxen)
• Anreicherungszeit und -temperatur	60 min bei 80°C, manuell

Gaschromatographie

• Gerät	TraceGC Ultra ThermoScientific gekoppelt mit Quadrupol-Massenspektrometer (MS) ThermoScientific ISQ
• GC-Trennsäule	Polydimethylsiloxan 95%, Diphenylpolysiloxan 5% Innendurchmesser 50 m x 0.25 mm Filmdicke 1.0 µm Säulenausgang simultan gesplittet auf MS- und FID-Detektor
• Trägergas	Helium 5.0 Durchflussrate 2 mL/min
• Injektor	Split/Splitless-Injektor, 250°C
• Starttemperatur	60°C
• Aufheizrate	10°C/min
• Endtemperatur	230°C

MS-Detektor

• Scanbereich	45-500 amu
• Scanrate	0.5/sec
• Transfer line	280°C
• Ionisation	EI 70 eV

FID-Detektor 250°C

Zur Auswertung und Identifizierung der Massenspektren wurden zum einen full scan Massenspektren verwendet und mit Massenspektrenbibliotheken als auch mit der eigenen Riechstoffbibliothek der Firma Kurt Kitzing verglichen und zum anderen die gemessenen Retentionsindices mit Referenzsubstanzen und mit Literaturdaten verglichen. Zur Identifizierung kamen folgende Datenbanken zum Einsatz:

- NIST 08, Wiley 8th Edition
- Adams "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition
- König WA, Joulain D, Hochmuth DH: GC-MSGC-MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils
- Shimadzu "Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds GC-MSGC-MS Library 2"

Die Quantifizierung erfolgte über die Berechnung der Peakflächen.

6.4. Methoden

6.4.1. Festphasenmikroextraktion SPME

SPME ist eine simple Methode ohne großen Aufwand, die die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung, Extraktion, Anreicherung und Probenaufgabetechnik, vereint und ohne organische Lösungsmittel durchgeführt wird (Abbildung 12). Entwickelt und vorgestellt wurde die Methode 1989 von Pawliszyn. Das Kernstück stellt eine Quarzglasfaser (fused-silica) dar, welche mit einem Polymermaterial als stationäre Phase beschichtet ist. Das Prinzip beruht auf einer Gleichgewichtseinstellung des Analyten in der Probe (Pawliszyn, 1997). Die Faser befindet sich in einer Spritze und wird für die Extraktion aus der Nadel herausgedrückt und so lange dem Medium ausgesetzt bis sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Probe und Faserbeschichtung oder zwischen Probe, Gasraum und Beschichtung der Faser einstellt. Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei Methoden, wo die Faser entweder direkt in die flüssige Probe eingetaucht wird (Immersion Sampling) oder so positioniert wird, dass sie sich in der Gasphase über dem Medium befindet, in welche die flüchtigen Verbindungen wandern (Headspace Sampling) (Abbildung 13). Nach einer Gleichgewichtseinstellung wird die Faser in die Kanüle rückgeführt und für die GC-Analyse in den Injektor des Gaschromatographen eingeführt (Junker, 2004).

Mit Hilfe der SPME lassen sich flüssige, gasförmige und feste Substanzen extrahieren. Letztere ist geeignet für die HS-Technik. Bei dieser Methode bewirkt der Einsatz eines Magnetrührers eine kürzere Analysenzeit, da durch die homogene Durchmischung der Transport der Analyten aus der flüssigen Probe in den Dampfraum beschleunigt wird, wodurch es zu einer schnelleren Gleichgewichtseinstellung kommt (Grote, 1999). Desweiteren sorgt der Zusatz von Salzen, ein niedriger pH-Wert oder das Erhitzen ebenfalls zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit v.a. bei Phenolen, wie z.B. Thymol. Durch diese Methoden setzt sich die Löslichkeit des Phenols herab und der Analyt gelangt in den Dampfraum (Buchholz und Pawliszyn 1994). Die SPME bzw. HS-SPME hat heute u.a. in der Nahrungs- und Umweltanalytik, forensischen Analytik und Analytik für Arznei- und toxischen Stoffen aus biologischen Matrices einen besonderen Stellenwert (Hall *et al.*, 1998; Ulrich *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Letztere eignet sich vor allem für die HS-SPME Technik, sofern die Analyten zur Genüge flüchtig sind.

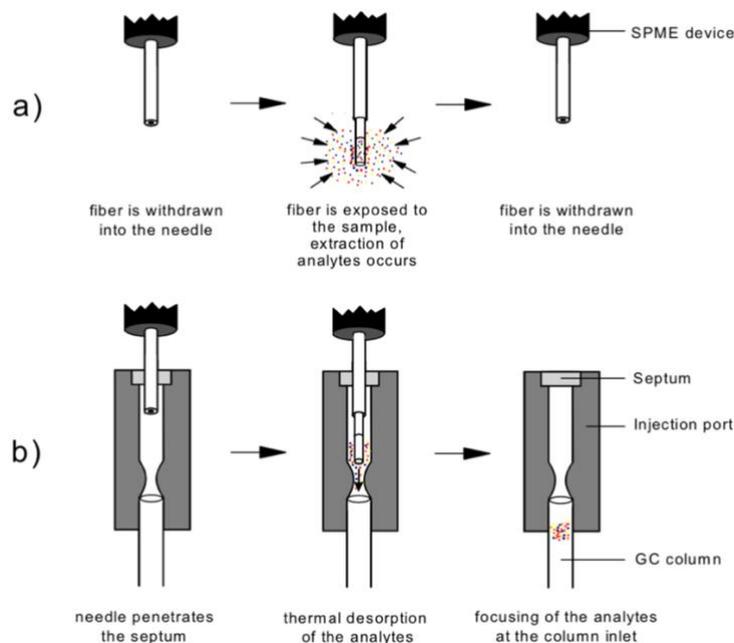


Abbildung 12: Ablauf der Festphasenmikroextraktion (SPME)

a) Extraktion der Analyten b) Desorption in GC-Injektor (übernommen aus Grote *et al.*, 1997)

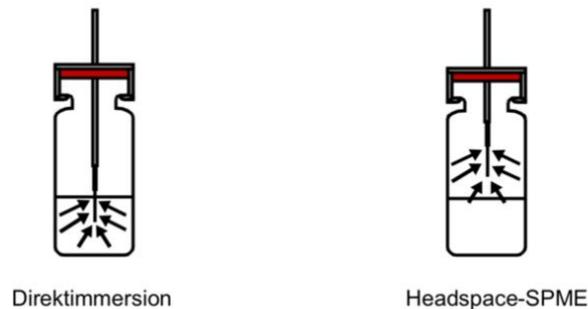


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Methoden der Probenahme während der SPME-Analytik (übernommen aus Junker, 2004)

Die SPME lässt sich mit verschiedenen Analysetechniken, wie z.B. mit chromatographischen Methoden wie GC-MS, HPLC, HPLC-MS, SFC (Hirata *et al.*, 1994; Medvedovici *et al.*, 1997) oder CE (Nguyen *et al.*, 1997) oder spektroskopischen Detektoren wie UV- und IR-Spektroskopie oder AED und anderen koppeln. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopplung HS-SPME/GC-MS verwendet.

6.4.2. Probanden

Die Untersuchung wurde mit je zwei gesunden weiblichen und männlichen Probanden unterschiedlichen BMIs durchgeführt. Um die Rolle des subkutanen Fettgewebes bei der Elimination von Carvacrol und Thymol beurteilen und etwaige geschlechtsspezifische Daten erheben zu können, wurden ein weiblicher und männlicher Proband mit hohem BMI und KFA und ein weiterer weiblicher und männlicher Proband mit normalem BMI und KFA ausgewählt. Die demographischen Daten sind aus der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Demographischen Daten der Probanden

Probandenkürzel	Geschlecht	Alter [Jahre]	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	BMI [kg/m ²]	KFA [%]
1	w	22	172	120	40.1	40
2	m	27	180	117	36.1	50
3	m	30	184	80	23.6	21
4	w	26	162	53	20.2	19

Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 35 Jahren
- keine Anwendung von thymian- und oreganohaltigen Kosmetika, Nahrungsergänzungsmittel oder Speisen
- kein Konsum stark gewürzter Speisen
- max. Flüssigkeitszufuhr 2 L pro Tag
- Durchführungsbedingungen beachtet

Ausschlusskriterien

- Schwangerschaft/Stillzeit
- Medikamenteneinnahme
- Erkrankungen
- Rauchen

6.4.3. Studienablauf

Zum Nachweis von Carvacrol und Thymol im humanen Urin nach transdermaler Applikation von Oreganoöl wurde eine Woche lang der Urin (sechsmal am Tag eins und je einmal der Morgenharn an Tag zwei bis sieben) der Probanden gesammelt. Im weiteren Verlauf der Studie nahm eine Probandin nach abgeschlossener Urinsammlung nach transdermaler Applikation am zweiten Teil der Untersuchung teil. Um einen Vergleich zwischen dermalen und oraler Applikation zu erhalten wurde der Probandin Oreganoöl in Form einer Weichkapsel verabreicht. Die Urinsammlung erfolgte nach der gleichen Methode.

Vor Beginn der Studie wurden die Teilnehmer gründlich mündlich über den Ablauf, Zweck und über die Kriterien und Verpflichtungen aufgeklärt. Jeder Teilnehmer hatte das Recht vor Ablauf der Studie diese ohne Angabe von Gründen abzubrechen. Um Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen wurde den Probanden drei Tage vor Beginn der Studie und für die Dauer der Studie der Verzehr von oregano- und thymianhaltigen Nahrungsmitteln (z.B. Pizza) untersagt. Damit die Ergebnisse und die gewonnenen Informationen miteinander vergleichbar waren, wurden die Probanden darauf hingewiesen die Flüssigkeitszufuhr für die Dauer der Studie konstant zu halten (max. 2 L pro Tag) und ungefähr zur gleichen Zeit eine Harnprobe abzugeben.

Die Probanden führten ein Miktions-, aber kein Trinkprotokoll. Aufgrund der schlechten Compliance wurde das Miktionsprotokoll nicht in die Untersuchung miteinbezogen. Die Teilnehmer gaben an, dass eine Aufzeichnung nicht immer möglich gewesen war, da sie dadurch ihren alltäglichen Verpflichtungen nicht nachkommen würden. Vor Beginn der Applikation wurde ein Leerharn abgegeben. Die Körpergröße und das Körpergewicht der Teilnehmer wurden bestimmt und der BMI ermittelt. Mithilfe eines Calipers wurde der KFA ermittelt. Zusätzlich wurde bei den Probanden mit hohem BMI eine Körperanalysewaage genutzt und die Werte dieser verwendet. Die Messung der Hautfaltendicke wurde etwa 2.5 cm oberhalb des rechten Hüftknochens im Stehen vorgenommen (Abbildung 14). Die Messung wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert ermittelt. Anhand der Auswertungstabelle wurde der prozentuale Fettanteil abgelesen (Abbildung 15). Anschließend bekamen die Probanden die Anweisung 2 mL des ätherischen Oreganoöls für mindestens 5 min auf den unteren Bauchbereich einzumassieren. Um eine transdermale Resorption nur über den Unterbauch zu ermöglichen, verwendeten die Probanden für die Einreibung einen Einweghandschuh. Nach dem Einreiben wurde das Öl am Körper belassen (leave on). Am ersten Studientag wurden nach der Applikation des Öls fünf weitere Harnproben gesammelt. An den folgenden sechs Studientagen wurde jeweils der Morgenharn gesammelt. Um Ergebnisverfälschungen im Harn durch Restausscheidung von Carvacrol und Thymol nach transdormaler Applikation auszuschließen wurde der Versuch zur oralen Resorption von Carvacrol und Thymol nach einer zweiwöchigen Pause durchgeführt. Nach der Abgabe eines Leerharns am Morgen wurde der Probandin MOE eine Weichkapsel mit 150 mg Oreganoöl verabreicht. Anschließend erfolgte die Harnsammlung nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben.

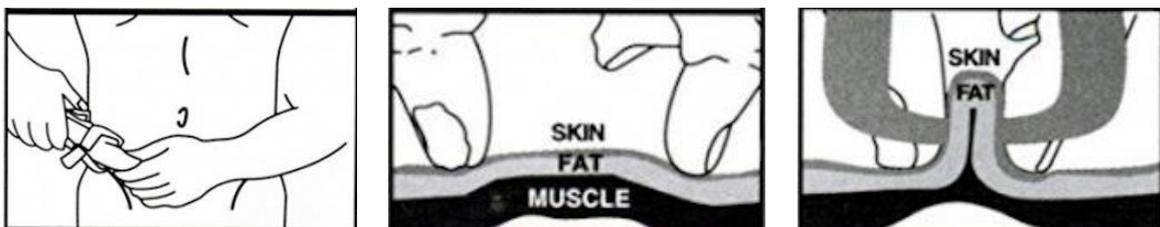


Abbildung 14: Anleitung zur Messung der Hautfaltendicke mit Hilfe eines Calipers (Körperfettzange) (Bedienungsanleitung der Körperfettzange blupalu)

Körperfettauswertung – MÄNNER

HAUTFALTEN MESSERGEBNIS IN MILLIMETERN																	
Alter	2-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15	16-17	18-19	20-21	22-23	24-25	26-27	28-29	30-31	32-33	34-36
Bis 20	2.0	3.9	6.2	8.5	10.5	12.5	14.3	16.0	17.5	18.9	20.2	21.3	22.3	23.1	23.8	24.3	24.9
21--25	2.5	4.9	7.3	9.5	11.6	13.6	15.4	17.0	18.6	20.0	21.2	22.3	23.3	24.2	24.9	25.4	25.8
26--30	3.5	6.0	8.4	10.6	12.7	14.6	16.4	18.1	19.6	21.0	22.3	23.4	24.4	25.5	25.9	26.5	26.9
31--35	4.5	7.7	9.4	11.7	13.7	15.7	17.5	19.2	20.7	22.1	23.4	24.5	25.5	26.3	27.0	27.5	28.0
36--40	5.6	8.1	10.5	12.7	14.8	16.8	18.6	20.2	21.8	23.2	24.4	25.6	26.5	27.4	28.1	28.6	29.0
41--45	6.7	9.2	11.5	13.8	15.9	17.8	19.6	21.3	22.8	24.7	25.5	26.6	27.6	28.4	29.1	29.7	30.1
46--50	7.7	10.2	12.6	14.8	16.9	18.9	20.7	22.4	23.9	25.3	26.6	27.7	28.7	29.5	30.2	30.7	31.2
51--55	8.8	11.3	13.7	15.9	18.0	20.0	21.8	23.4	25.0	26.4	27.6	28.7	29.7	30.6	31.2	31.8	32.2
56& +	9.9	12.4	14.7	17.0	19.1	21.0	22.8	24.5	26.0	27.4	28.7	29.8	30.8	31.6	32.3	32.9	33.3
MAGER				IDEAL				DURCHSCHNITTLICH				FETTLIBIG					

Körperfettauswertung - FRAUEN

HAUTFALTEN MESSERGEBNIS IN MILLIMETERN																	
Alter	2-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13	14-15	16-17	18-19	20-21	22-23	24-25	26-27	28-29	30-31	32-33	34-36
Bis 20	11.3	13.5	15.7	17.7	19.7	21.5	23.2	24.8	26.3	27.7	29.0	30.2	31.3	32.3	33.1	33.9	34.6
21--25	11.9	14.2	16.3	18.4	20.3	22.1	23.8	25.5	27.0	28.4	29.6	30.8	31.9	32.9	33.8	34.5	35.2
26--30	12.5	14.8	16.9	19.0	20.9	22.7	24.5	26.1	27.6	29.0	30.3	31.5	32.5	33.5	34.4	35.2	35.8
31--35	13.2	15.4	17.6	19.6	21.5	23.4	25.1	26.7	28.2	29.6	30.9	32.1	33.2	34.1	35.0	35.8	36.4
36--40	13.8	16.0	18.2	20.2	22.2	24.0	25.7	27.3	28.8	30.2	31.5	32.7	33.8	34.8	35.6	36.4	37.0
41--45	14.4	16.7	18.8	20.8	22.8	24.6	26.3	27.9	29.4	30.8	32.1	33.3	34.4	35.4	36.3	37.0	37.7
46--50	15.0	17.3	19.4	21.5	23.4	25.2	26.9	28.6	30.1	31.5	32.8	34.0	35.0	36.0	36.9	37.6	38.3
51--55	15.6	17.9	20.0	22.1	24.0	25.9	27.6	29.2	30.7	32.1	33.4	34.6	35.6	36.6	37.5	38.3	38.9
56& +	16.3	18.5	20.7	22.7	24.6	26.5	28.2	29.8	31.3	32.7	34.0	35.2	36.3	37.2	38.1	38.9	39.5
MAGER				IDEAL				DURCHSCHNITTLICH				FETTLIBIG					

Abbildung 15: Tabelle zur Auswertung des Körperfetts nach der Messung der Hautfaltendicke in Millimeter mit Hilfe des Calipers. Der prozentuale Fettanteil ist der Schnittpunkt von Alter und Messergebnis der Hautfaltendicke in Millimeter (Bedienungsanleitung der Körperfettzange blupalu).

6.4.4. Probenentnahme

Urinproben

Je 10 mL der Urinproben wurden in je 20 Vials für Autosampler mittels einer Finnpiquette pipettiert. Die Vials wurden mit Aluminiumkappen mit Hilfe einer Bördelzange fest verschlossen und bei -20°C gelagert. Da es sich bei Carvacrol und Thymol um flüchtige Monoterpene handelt, musste der Vorgang des Pipettierens zügig erfolgen. Die Urinproben wurden folgendermaßen kodiert:

- Probandenkürzel: Initialen der Probanden
- LH = Leerharn
- T = Tag
- H = Harn

T1H4 würde demnach die vierte Harnprobe am ersten Studientag bedeuten.

7. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

7.1. Analytik

Vor der eigentlichen Analytik erfolgte die Kalibrierung der Geräte. Die Kalibrierfunktion von Carvacrol und Thymol war linear im unteren Messbereich von 1-256 ng/mL (Abbildung 16 und Abbildung 17). Bei hohen Werten (1-2048 ng/mL) näherte man sich asymptotisch einer Sättigungskonzentration (Abbildung 18 und Abbildung 19). Um im linearen Messbereich bleiben zu können mussten die Proben verdünnt werden. Sowohl die Probenaufarbeitung als auch die Analytik wurden von Dr. Jürgen Wanner, Kurt Kitzing GmbH in Wallerstein, Deutschland, durchgeführt.

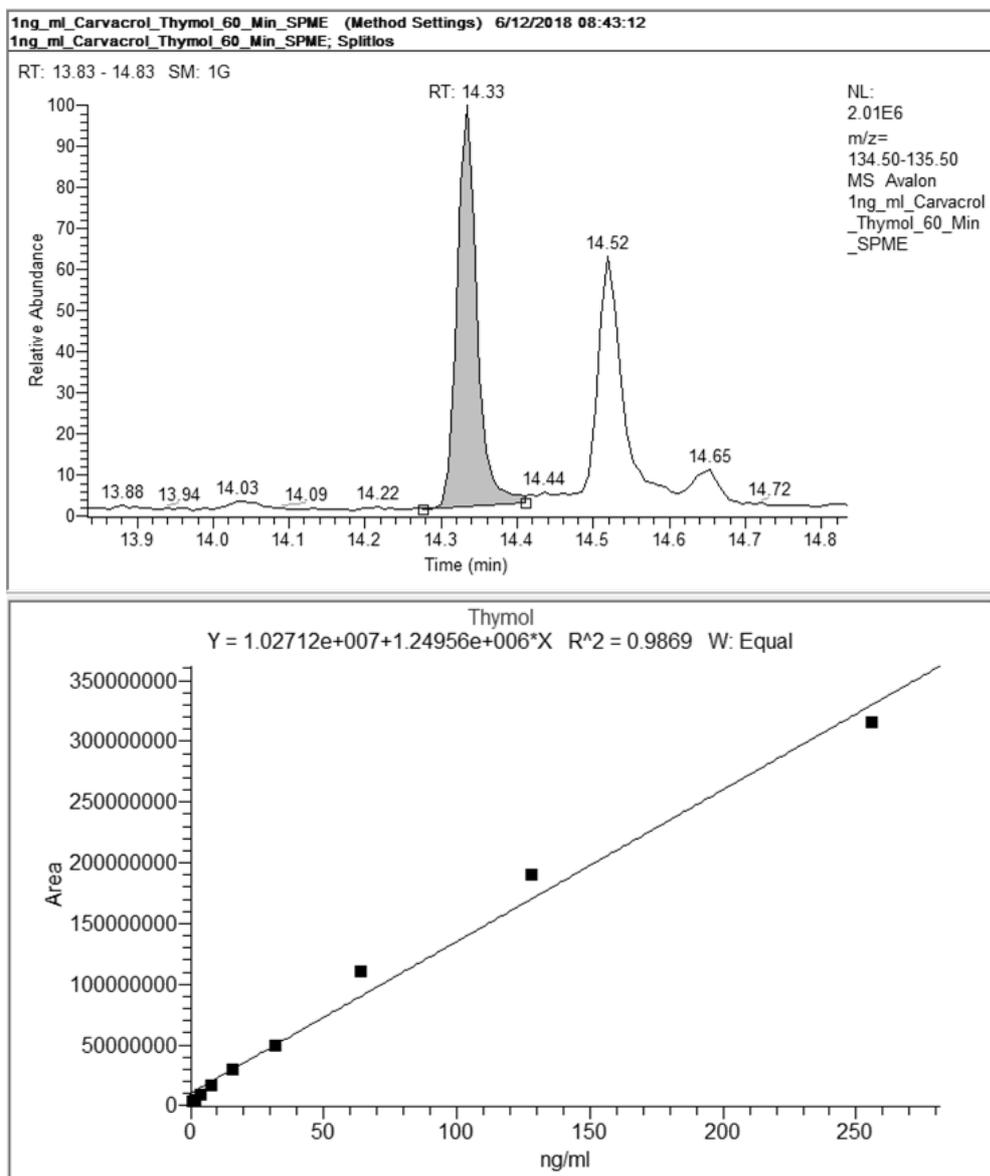


Abbildung 16: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Thymol im Bereich von 1 ng/mL – 256 ng/mL

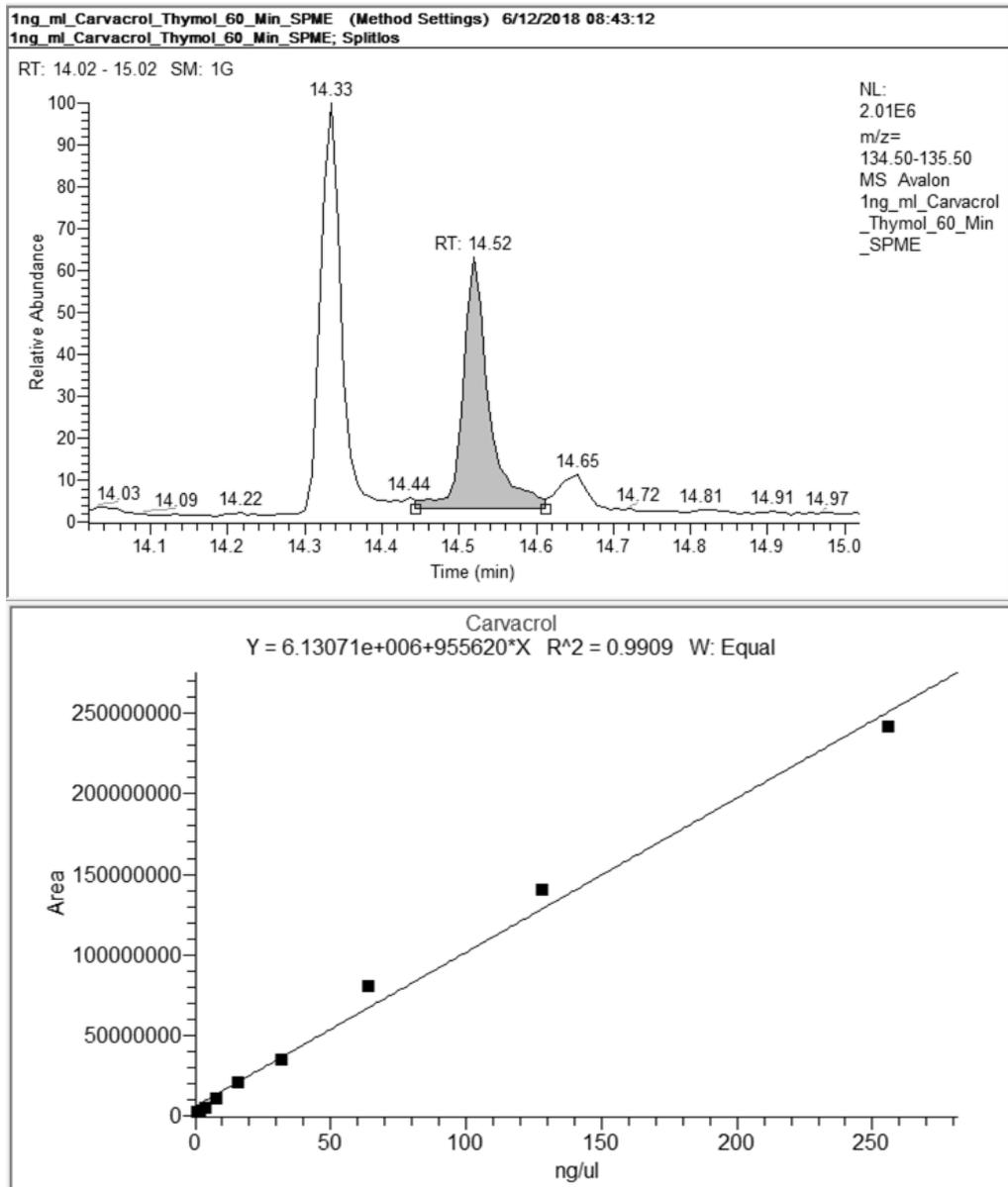


Abbildung 17: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Carvacrol im Bereich von 1 ng/mL – 256 ng/mL

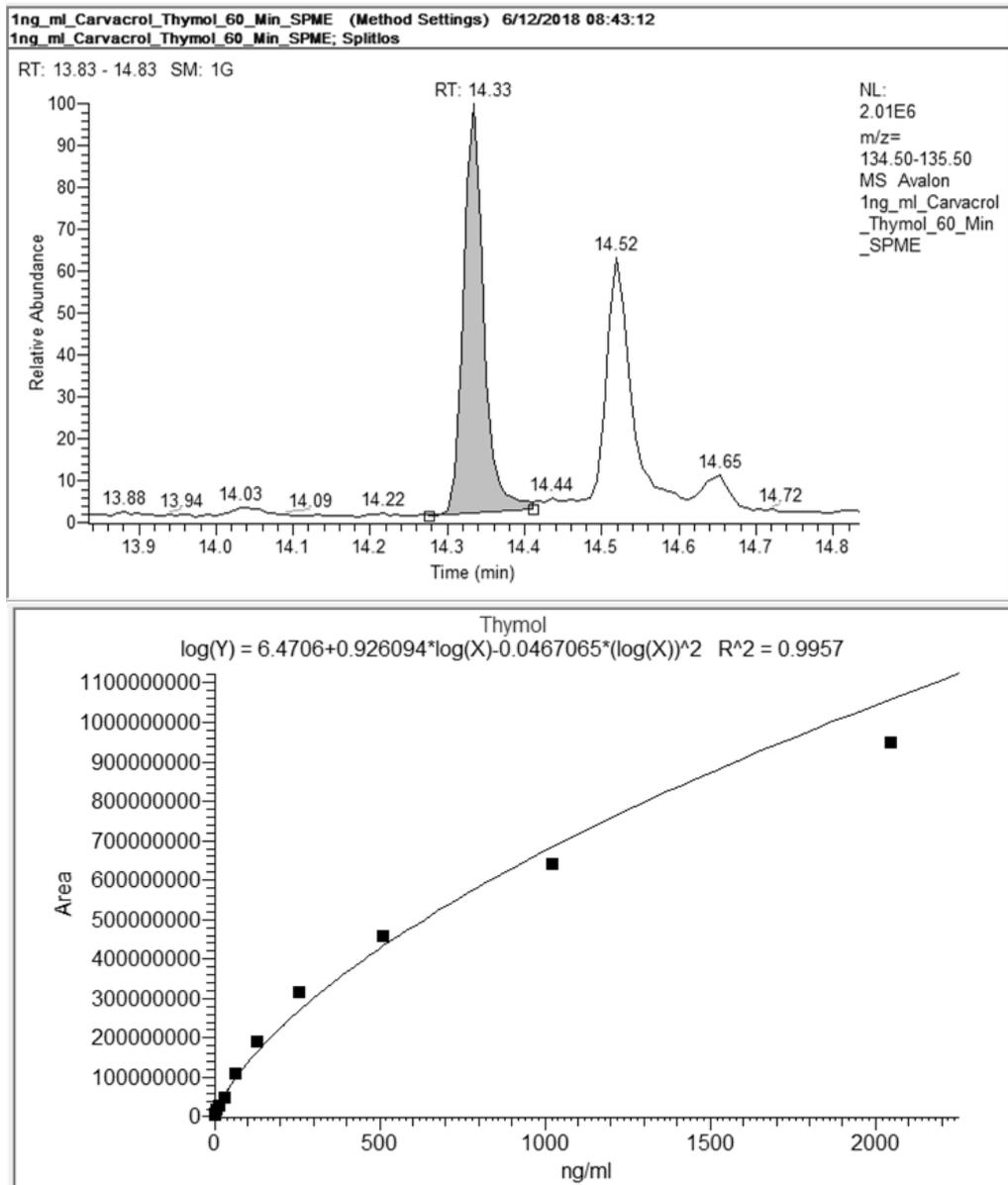


Abbildung 18: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Thymol im Bereich von 1 ng/mL – 2048 ng/mL

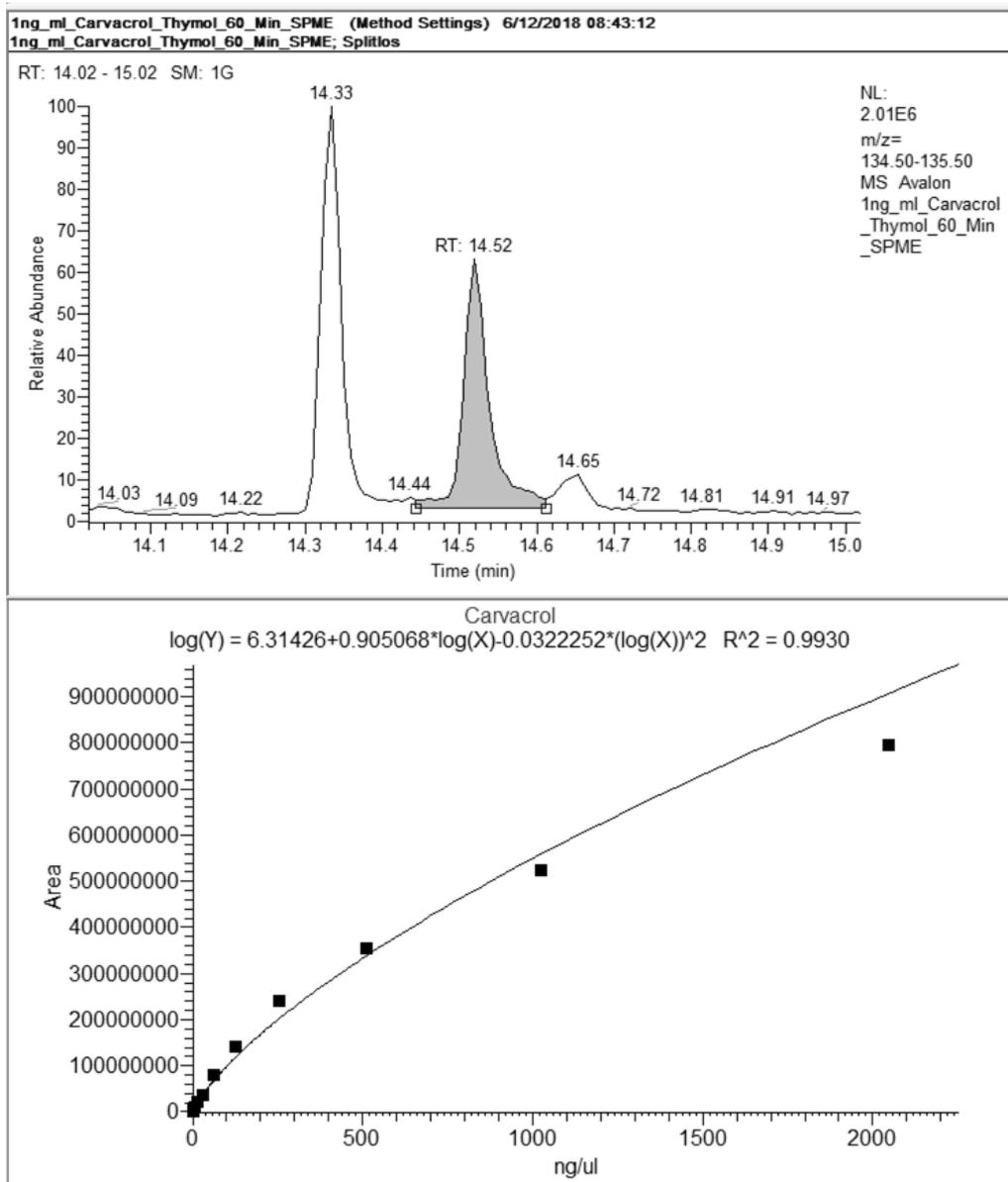


Abbildung 19: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Carvacrol im Bereich von 1 ng/mL – 2048 ng/mL

7.2. Messung

Nach dem Auftauen der Urinproben wurde zunächst eine Messung zur Bestimmung des freien Anteils von Thymol und Carvacrol durchgeführt. Anschließend wurden die 10 mL Urinproben in den 20 mL Headspacefläschchen mit je 1 g Amidosulfonsäure (pH = 0) versetzt. Die Amidosulfonsäure ist eine starke Säure in kristalliner Form, die sich zur enzymatischen Spaltung eignet. Dass Thymol und Carvacrol durch die Biotransformation im humanen Urin und im Urin von Ratten und Kaninchen als seine Phase-II-Konjugate vorliegen, wurde in zahlreichen Studien belegt (Takada *et al.*, 1979; Austgulen *et al.*, 1987; Kohlert *et al.*, 2002). Um diese Stoffe für die Detektion zugänglich zu machen, müssen glucuronidierte und sulfonierte Verbindungen gespalten werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Spaltung eine Probenaufarbeitung und Anreicherung per HS-SPME mit anschließender GC-FID-MS durchgeführt.

Die SPME Faser, mit einer Beschichtung aus Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen/Carboxen (PDMS/DVB/CAR), wurde dem Gasraum über der Probe für 60 min bei 80°C ausgesetzt.

Abbildung 20 stellt die zeitliche Abhängigkeit der Anreicherung von Carvacrol an der DVB/Car/PDMS-SPME-Faser dar. Anschließend erfolgte die Überführung in den Injektorblock. Bei manueller Anreicherung war die Faser kalt, da eine kalte bzw. gekühlte Faser zu einer wesentlichen Steigerung der Empfindlichkeit und Extraktionsausbeute führte. Bei der automatischen Anreicherung der Probe waren sowohl die Faser als auch die Probe warm, da der Autosampler prinzipiell immer beide erhitzt. Die Extraktionsausbeute unterschied sich um den Faktor zehn.

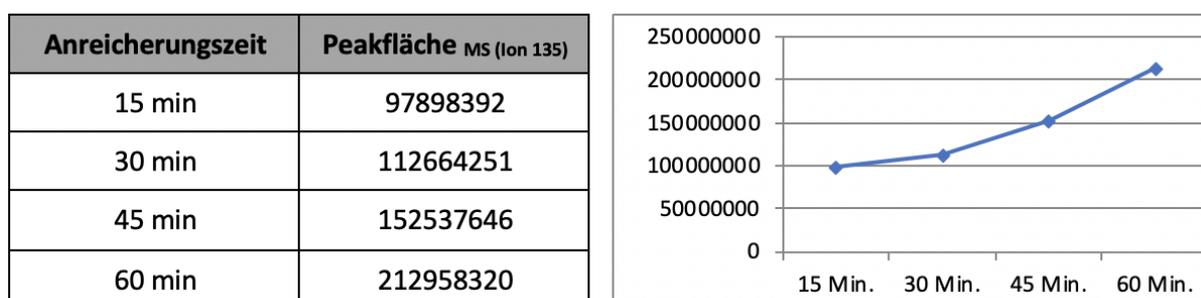


Abbildung 20: Zeitliche Abhängigkeit der Anreicherung von Carvacrol an der DVB/Car/PDMS-SPME-Faser

7.3. Ergebnisse

Der Gesamtthymol- und Gesamtcarvacrolgehalt wurde sowohl vor als auch nach Zusatz der Amidosulfonsäure zur enzymatischen Spaltung der Konjugate bestimmt. Um einen Vergleich zwischen der transdermalen und oralen Resorption ziehen zu können wurde die Menge an Carvacrol und Thymol im Harn nach einer dermalen Applikation des Oreganoöls auf den unteren Bauchbereich und nach einer oralen Applikation einer Weichkapsel mit Oreganoöl quantifiziert. Im Urin wurde sowohl nach einer einmaligen dermalen Applikation des Öls als auch nach einer einmaligen Einnahme einer Weichkapsel Thymol und Carvacrol über einen Zeitraum von sieben Tagen detektiert. Freies Thymol wurde nur in Spuren im untersten ng-Bereich quantifiziert. Die Bestimmung der Phase-II-Konjugate erfolgte nach einer enzymatischen Spaltung durch Zugabe von Amidosulfonsäure. Die Ausscheidung der renal eliminierten Menge wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen quantifiziert. Zu jedem Probanden wurde eine graphische Darstellung der individuellen Konzentration von Carvacrol und Thymol im Urin mittels SigmaPlot 13.0 erstellt. Auf der Ordinate wurde die Konzentration der Verbindungen in ng/mL aufgetragen, auf der Abszisse die Harnprobe. Der in der Arbeit von Pavlovic aufgestellten Hypothese zufolge, müssten Menschen mit einem hohen BMI bzw. KFA die lipophilen Verbindungen im Fettgewebe angereichert haben, wodurch weniger Thymol und Carvacrol in der Anfangsphase mit dem Harn ausgeschieden werden müsste. Im weiteren Verlauf müsste es zu einer schubhaften Freisetzung der Stoffe aus dem Fettdepot kommen, wodurch dies durch die ausgeschiedene Menge im Harn ersichtlich werden müsste (Pavlovic, 2017).

7.3.1. Proband 1

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden nur die Werte an Gesamtcarvacrol herangezogen, da Thymol nur in geringen Mengen im Harn nachweisbar war. Wie in der Graphik ersichtlich kam es an Tag eins zu einer geringen Ausscheidung von Carvacrol mit abnehmender Tendenz (Tabelle 6; Abbildung 21 und Abbildung 22). Allerdings muss der bereits hohe Carvacrolgehalt im Leerharn berücksichtigt werden. Dieser könnte durch den Verzehr carvacrolhaltiger Lebensmittel zustande gekommen sein. An Tag zwei stieg die Konzentration wieder an. Es lässt sich vermuten, dass Carvacrol über Nacht schubhaft aus dem Depot freigesetzt wurde, wodurch eine höhere Konzentration im Morgenharn (T2H1) im Vergleich zum Harn am Abend davor (T1H5) vorlag.

Tabelle 6: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 1 vor und nach der Säurespaltung

Proband 1				
	vor Säurespaltung		nach Säurespaltung	
Harnprobe	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]
LH	0.067	1.741	3.325	50.289
T1H1	0.078	1.634	2.145	17.543
T1H2	0.056	1.446	3.209	13.649
T1H3	0.056	1.192	3.936	12.516
T1H4	0.067	0.984	1.186	2.183
T1H5	0.033	0.689	1.012	3.173
T2H1	0.064	0.619	2.469	9.061
T3H1	0.053	0.558	1.676	7.448
T4H1	0.059	0.308	2.845	4.325
T5H1	0.021	0.108	2.02	0.997
T6H1	0.032	0.573	3.082	54.367
T7H1	0.157	2.183	2.667	18.612

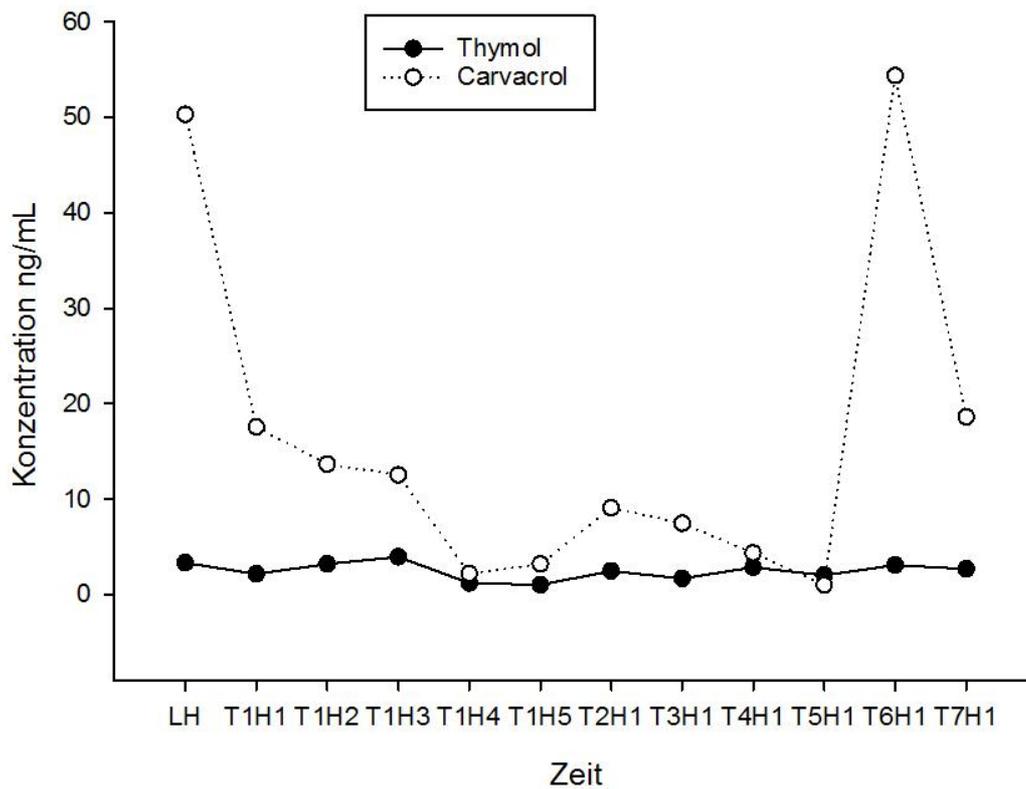


Abbildung 21: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 1

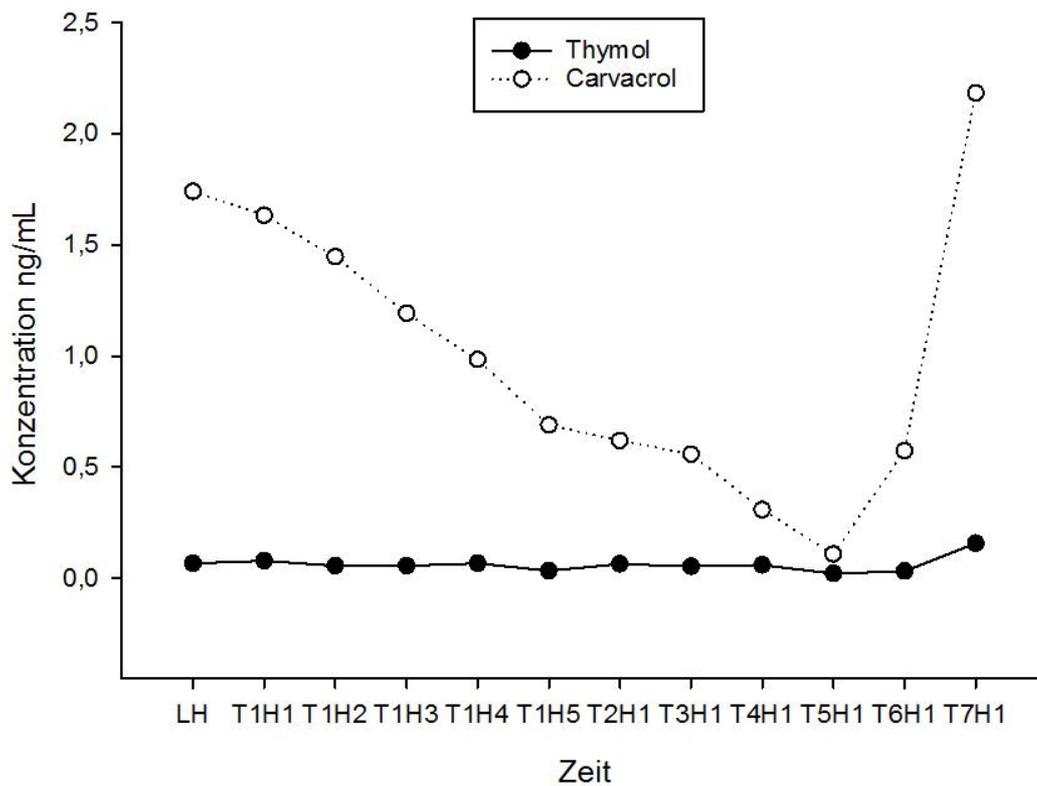


Abbildung 22: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 1

7.3.2. Proband 2

Proband 2 war das Gegenbeispiel dazu. Hier kam es zu einer schnellen Elimination, weshalb es zu keiner Kumulation gekommen sein dürfte. Bereits an Tag eins hatte der Proband Carvacrol größtenteils ausgeschieden. Die Konzentration fiel rasch ab, um dann nur noch langsam zu sinken. Eine schubhafte Freisetzung wie bei Proband 1 blieb an den weiteren Studientagen aus. Dies könnte auf das deutlich größere Abdominalfett von Proband 1 zurückzuführen sein (Tabelle 7; Abbildung 23 und Abbildung 24).

Tabelle 7: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 2 vor und nach der Säurespaltung

Proband 2				
	vor Säurespaltung		nach Säurespaltung	
Harnprobe	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]
LH	0.031	0.681	1.189	4.422
T1H1	0.122	3.359	2.2631	10.015
T1H2	0.103	3.204	2.752	21.273
T1H3	0.021	0.388	3.016	22.784
T1H4	0.061	0.079	2.22	8.502
T1H5	0.117	0.157	1.418	2.412
T2H1	0.081	0.107	0.896	1.666
T3H1	0.025	0.173	2.798	1.657
T4H1	0.052	0.1	1.995	0.561
T5H1	0.026	0.094	1.933	1.0
T6H1	0.034	1.407	2.022	33.558
T7H1	0.038	0.259	1.281	1.556

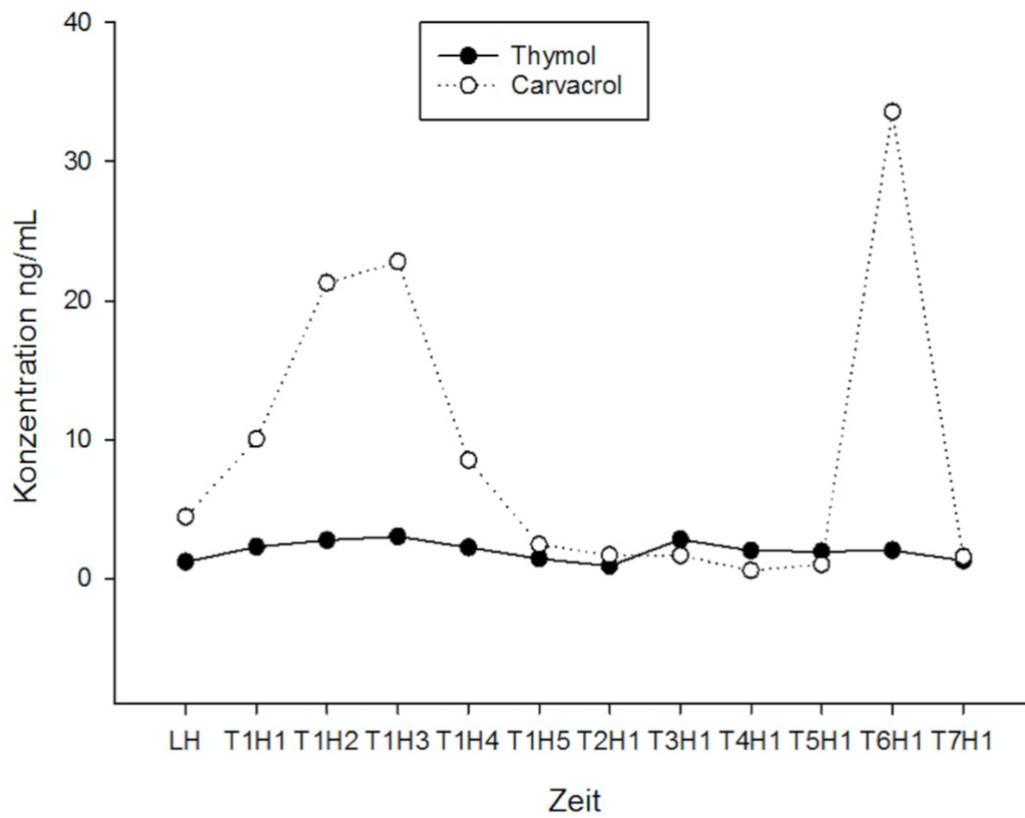


Abbildung 23: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 2

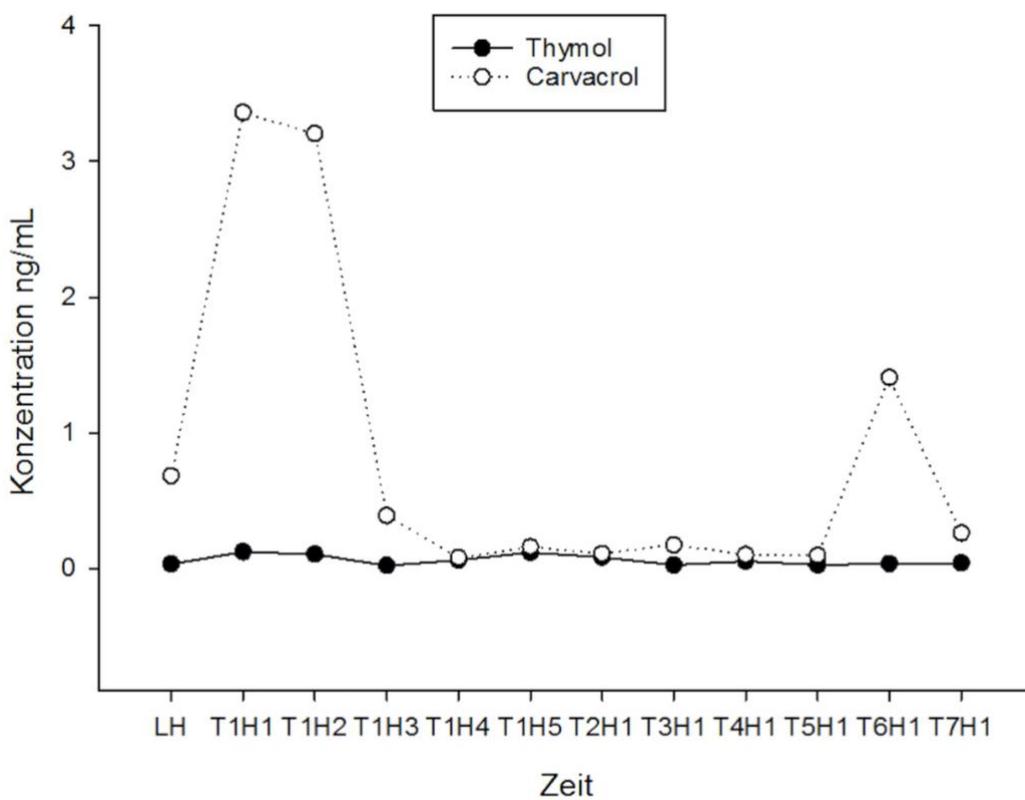


Abbildung 24: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 2

7.3.3. Vergleich der Probanden 1 und 2

Bei Proband 1 und 2 geht aus den Graphiken deutlich hervor, dass an Tag sechs eine Spitzenkonzentration erreicht wurde. Wenn man diese Spitze mit der Graphik zur Kapseleinnahme vergleicht, könnte eine orale Resorption von Carvacrol und Thymol der Grund für diese Spitzenkonzentration sein. Da es sich bei diesen Probanden um ein Ehepaar handelt, ist es naheliegend, dass ein gemeinsamer Verzehr carvacrol- und thymolhaltiger Lebensmittel stattgefunden haben könnte. Leider wird sehr oft unterschätzt, dass in vielen Lebensmitteln Thymian, Oregano oder Bohnenkraut, die die Monoterpene Carvacrol und Thymol enthalten, als Gewürz eingesetzt werden. Trotz der Untersagung solcher Lebensmittel kam es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem unbewussten Verzehr.

7.3.4. Proband 3

Bei Proband 3 war in der ersten Harnprobe nach Applikation des Oreganoöls auf den unteren Bauchbereich ein deutlicher Anstieg der Konzentration zu verzeichnen. Im Laufe des Tages nahm die eliminierte Menge an Carvacrol ab. An Tag zwei kam es zu einer schubhaften Freisetzung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Carvacrol über Nacht aus dem Depot freigesetzt wurde, wie schon bei Proband 1 beobachtet wurde (Tabelle 8; Abbildung 25 und Abbildung 26).

Tabelle 8: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 3 vor und nach der Säurespaltung

Proband 3				
	vor Säurespaltung		nach Säurespaltung	
Harnprobe	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]
LH	0.162	0.711	1.474	0.547
T1H1	0.249	1.583	2.926	19.156
T1H2	0.054	0.253	2.761	11.297
T1H3	0.089	0.288	3.436	8.287
T1H4	0.044	0.428	1.212	2.888
T1H5	0.066	0.619	1.511	5.599
T2H1	0.081	2.479	2.002	6.624
T3H1	0.06	0.336	1.64	1.768
T4H1	0.077	0.166	3.107	3.375
T5H1	0.04	0.108	3.144	3.136
T6H1	0.105	0.637	2.098	4.143
T7H1	0.071	0.143	2.373	1.111

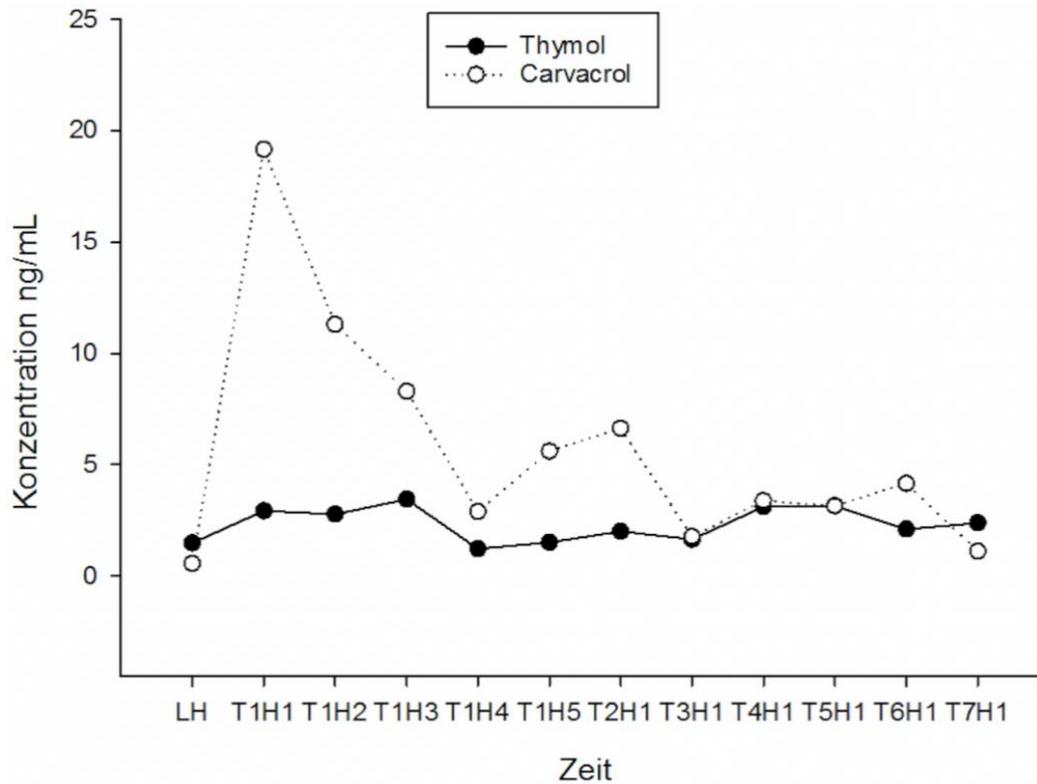


Abbildung 25: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 3

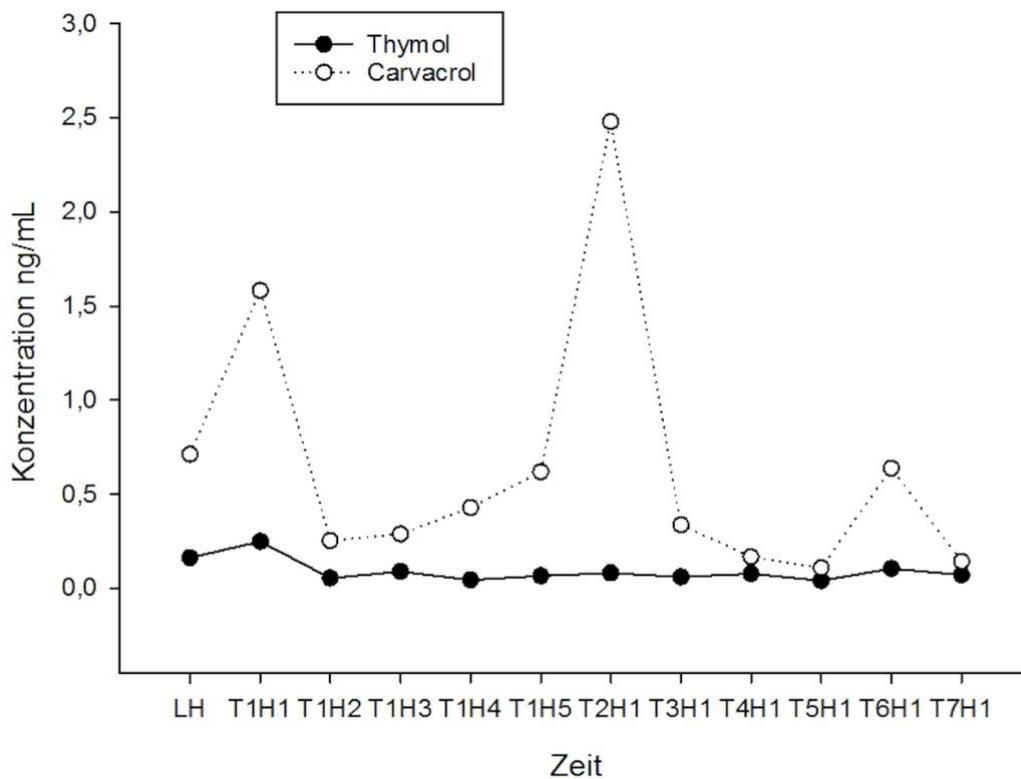


Abbildung 26: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 3

7.3.5. Proband 4

In den Harnproben von Proband 4 wurden Carvacrol und Thymol nach topischer Applikation nur in sehr geringen Mengen detektiert (0.122 – 3.944 ng/mL). Dennoch kann man aus der Grafik entnehmen, dass es auch hier zu einer schubhaften Freisetzung aus dem Fettgewebe gekommen war (Tabelle 9, Abbildung 27 und Abbildung 28). Die geringe Ausscheidung der Monoterpene könnte durch eine niedrige Resorption aufgrund einer kleineren Resorptionsfläche im Vergleich zu den anderen Probanden, die einen größeren Bauchumfang hatten, stammen. Ferner könnten die Hauteigenschaft und die Expositionszeit eine Rolle spielen. Um eindeutige Schlussfolgerungen ziehen zu können bedarf es allerdings Untersuchungen an einem größeren Gesamtkollektiv. Neben einer renalen Ausscheidung könnte es auch zu einer pulmonalen Elimination gekommen sein. Aufgrund der leichten Flüchtigkeit der Monoterpene war anzunehmen, dass ein Teil abgeatmet werden könnte. Die kleine Molekülgröße und Lipophilie erlauben zudem eine dermale Elimination. Eine Exkretion über die Faeces wäre ebenfalls möglich. Den Hauptausscheidungsweg von dermal appliziertem radioaktiv markiertem ¹⁴C-Citral bei Ratten, stellte die renale Elimination dar. Etwa 8.5% der verabreichten Dosis wurden renal eliminiert, 3.3% wurden als ¹⁴CO₂ und 2.8% unmetabolisiert über die Lunge abgeatmet. Die Ausscheidung über die Faeces mit 3.48% spielte eine eher untergeordnete Rolle (Diliberto *et al.*, 1988).

Tabelle 9: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 4 vor und nach der Säurespaltung

Proband 4				
	vor Säurespaltung		nach Säurespaltung	
Harnprobe	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]
LH	0.062	0.094	0,7278	3.701
T1H1	0.029	0.158	2.768	1.972
T1H2	0.027	0.186	1.945	2.453
T1H3	0.026	0.117	2.132	1.922
T1H4	0.038	0.194	0.408	1.679
T1H5	0.067	0.413	1.181	3.944
T2H1	0.027	0.102	1.358	3.531
T3H1	0.049	1.815	1.335	3.067
T4H1	0.057	0.051	0.265	0.162
T5H1	0.074	0.2	0.621	0.817
T6H1	0.016	0.069	1.026	2.457
T7H1	0.139	0.463	1.027	1.023

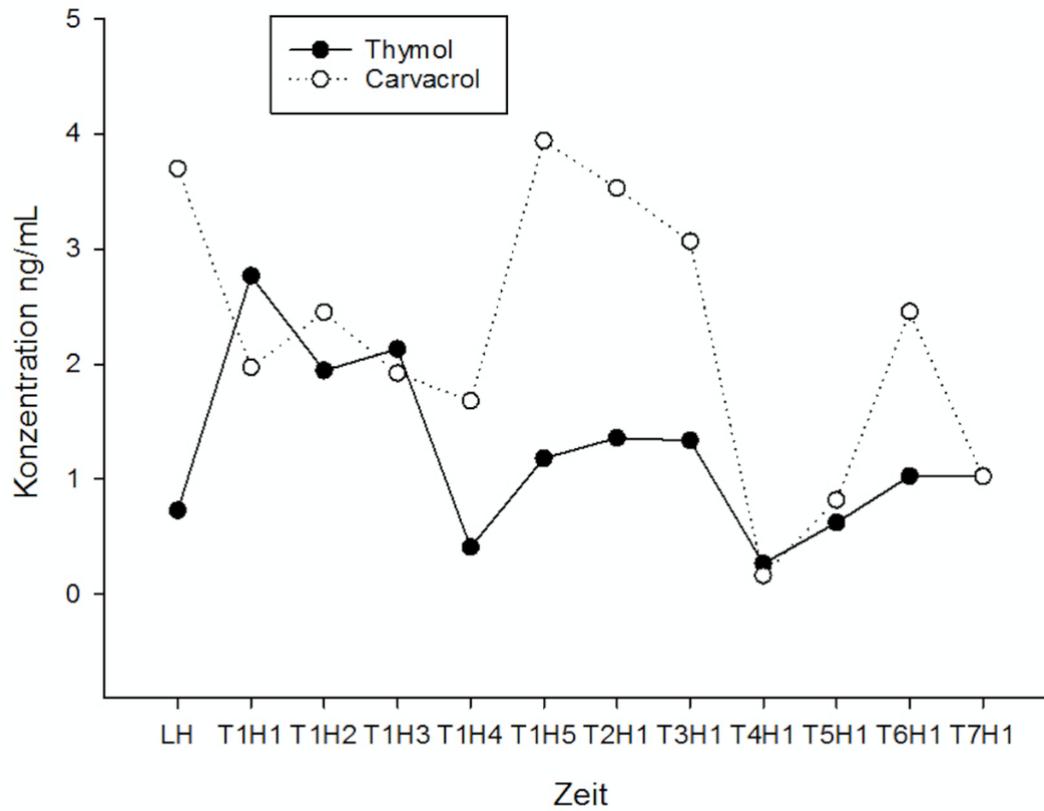


Abbildung 27: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 4

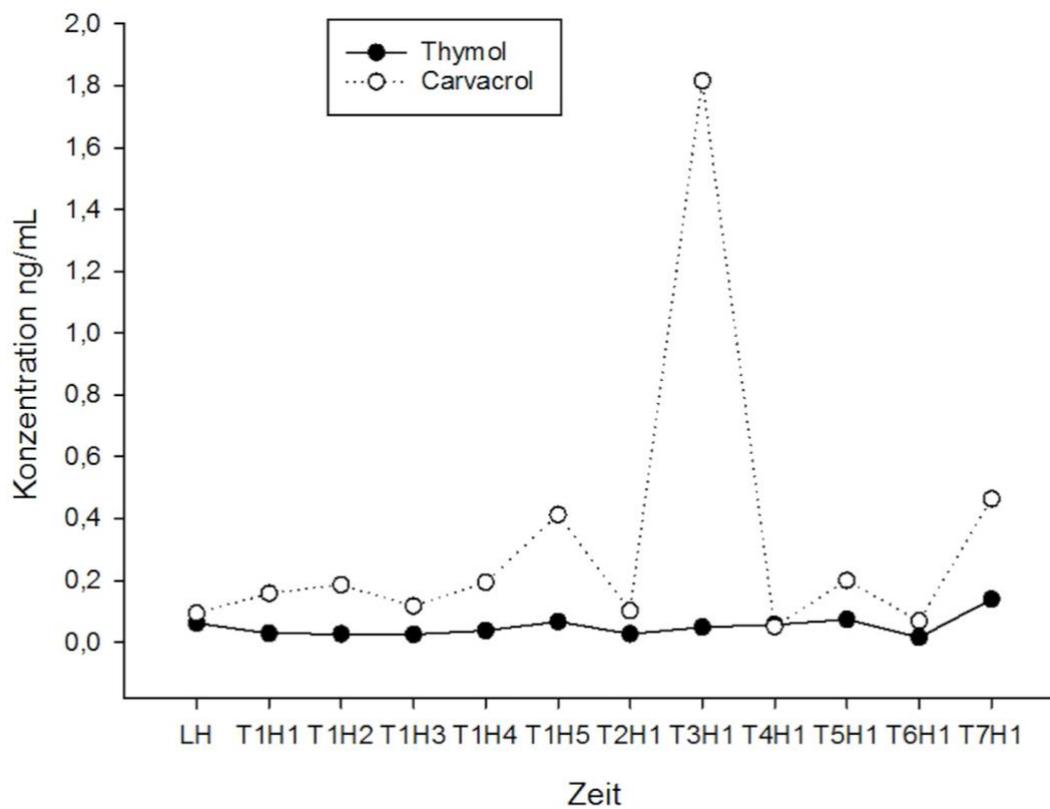


Abbildung 28: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 4

Das oral applizierte Oreganoöl in Form einer Weichkapsel wurde innerhalb der ersten 24 h nahezu komplett ausgeschieden (Tabelle 10; Abbildung 29 und Abbildung 30). An den restlichen Studientagen konnte nur eine geringe Menge an Gesamtcarvacrol quantifiziert werden. An Tag vier (T4H1 9.456 ng/mL) stieg die Konzentration im Harn im Vergleich zu Tag drei (T3H1 1.153 ng/mL) an. Eventuell kam es über Nacht zu einer Freisetzung der Terpene. Allerdings muss bei der Beurteilung berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um sehr geringe Mengen handelte und aufgrund des geringeren Körperfettanteils und BMIs eine Kumulation im Fettgewebe eher unwahrscheinlich war.

Tabelle 10: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 4 nach oraler Applikation vor und nach der Säurespaltung

Proband 4 Kapsel				
	vor Säurespaltung		nach Säurespaltung	
Harnprobe	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]	Thymol [ng/mL]	Carvacrol [ng/mL]
LH	0.363	2.671	2.279	5.954
T1H1	2.923	646.511	11.184	1383.46
T1H2	0.956	2.919	9.553	204.709
T1H3	1.09	9.306	8.296	170.207
T1H4	1.311	2.834	2.217	12.134
T1H5	0.29	4.395	3.493	15.102
T2H1	0.289	2.694	6.087	13.149
T3H1	0.449	0.996	1.504	1.153
T4H1	0.294	0.914	1.761	9.456
T5H1	3.276	1.831	7.033	2.94
T6H1	0.307	0.561	3.77	2.693
T7H1	0.946	5.342	2.81	2.53

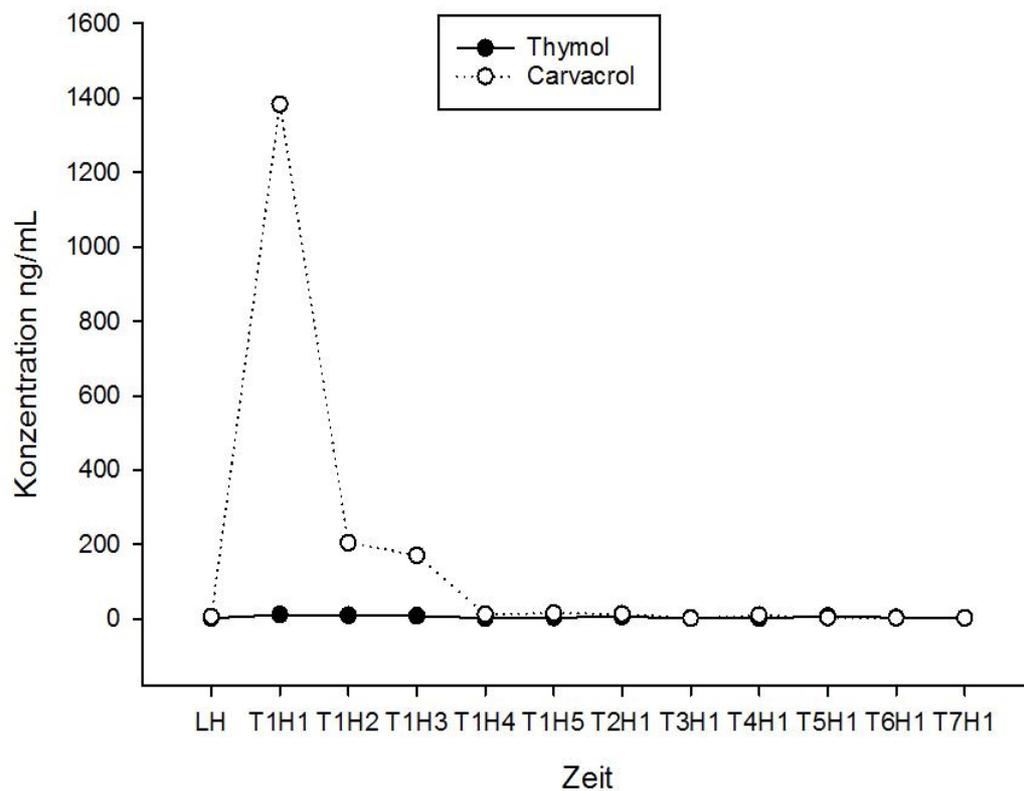


Abbildung 29: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 4 nach oraler Applikation

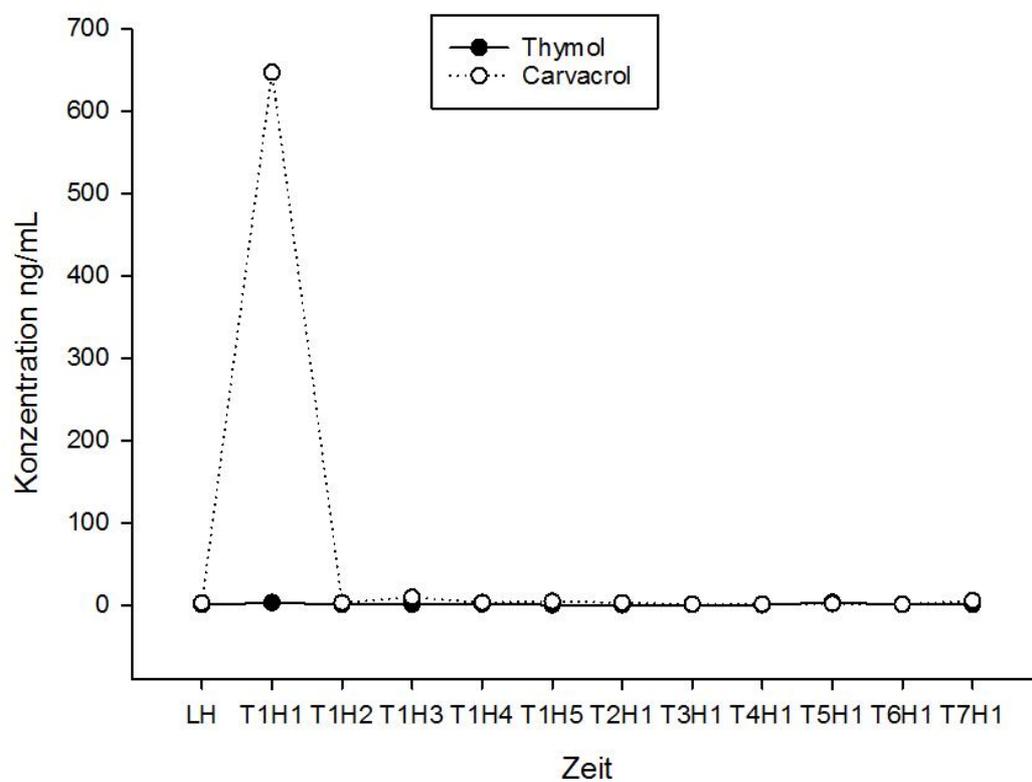


Abbildung 30: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 4 nach oraler Applikation

7.3.6. Vergleich aller Probanden

Abbildung 31 und Abbildung 32 stellen zusammenfassend die Kinetikkurven aller Probanden (ausschließlich jene Kurven nach der oralen Applikation) dar. Tabelle 11 stellt die Gesamtcarvacrol-Konzentrationen der einzelnen Probanden im Vergleich dar.

Auffällig ist, dass in den Leerhamproben aller Probanden Thymol und Carvacrol sowohl vor als auch nach der enzymatischen Spaltung der Konjugate nachweisbar waren. Besonders hoch war die Konzentration von Proband 1. Wenn man diesen Wert mit jenen der Probanden an Tag eins in Tabelle 1 und mit den Werten nach der Kapseleinnahme in Tabelle 10 vergleicht, könnte dieser durchaus durch eine Lebensmittelkontamination stammen. Wie bereits erwähnt kamen bei der vorherigen Pilotstudie die Patienten ohne jegliche Instruktionen aufgrund von Beschwerden, verursacht durch eine Harnwegsinfektion, in die Arztpraxis und wurden vom Urologen ad hoc bei einer Untersuchung gewählt und bekamen erst danach die Anweisung auf thymol- und carvacrolhaltige Lebensmittel und Kosmetika zu verzichten (Pavlovic, 2017). Ein direkter Vergleich zwischen den Tabellen zur GC-MS dieser Patienten und jene in der vorliegenden Arbeit kann nicht gezogen werden, da die Bedingungen unterschiedlich waren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Oreganoöl nur einmal an Tag eins einmassiert, wobei die Studienteilnehmer in der Arbeit von Pavlovic zur Untersuchung der Keimzahl im Harn das Öl acht Tage lang täglich zweimal einmassiert hatten. Hier könnte es durchaus zu einer Kumulation im Fettgewebe gekommen sein. Da nur Harnproben von vor der Applikation des Oreganoöls und von Tag acht vorlagen, kann die renale Ausscheidung der Monoterpene nicht beurteilt werden. Die höhere Ausscheidungsrate im Vergleich zu den Probanden 1, 2, 3 und 4 könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit entweder durch die wiederholte Massage des Öls während der Dauer der Studie oder durch eine Kontamination während der Anwendung begründet sein. Da das Öl nach dem Applizieren nicht entfernt wurde (leave on), ist unter Umständen eine Verschleppung bzw. Kontamination durch Körperkontakt oder Kleidung nicht auszuschließen.

Tabelle 11: Konzentrationen von Carvacrol im Harn von allen vier Probanden vor und nach der Säurespaltung

Harnprobe	Gesamtcarvacrolgehalt [ng/mL]			
	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
LH	50.289	4.422	0.547	3.701
T1H1	17.543	10.015	19.156	1.972
T1H2	13.649	21.273	11.297	2.453
T1H3	12.516	22.784	8.287	1.922
T1H4	2.183	8.502	2.888	1.679
T1H5	3.173	2.412	5.599	3.944
T2H1	9.061	1.666	6.624	3.531
T3H1	7.448	1.657	1.768	3.067
T4H1	4.325	0.561	3.375	0.162
T5H1	0.997	1	3.136	0.817
T6H1	54.367	33.558	4.143	2.457
T7H1	18.612	1.556	1.111	1.023

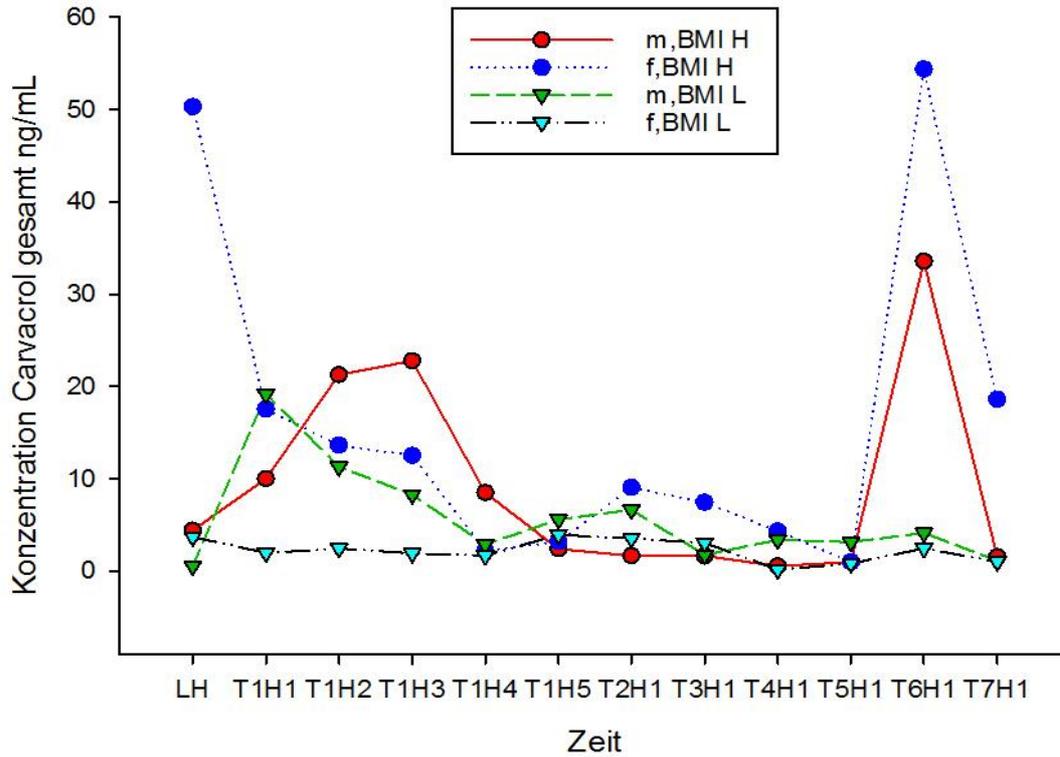


Abbildung 31: Vergleich der Kinetikkurven von Gesamtarvacrol und -thymol aller Probanden
 m = male, f = female, H = high, L = low

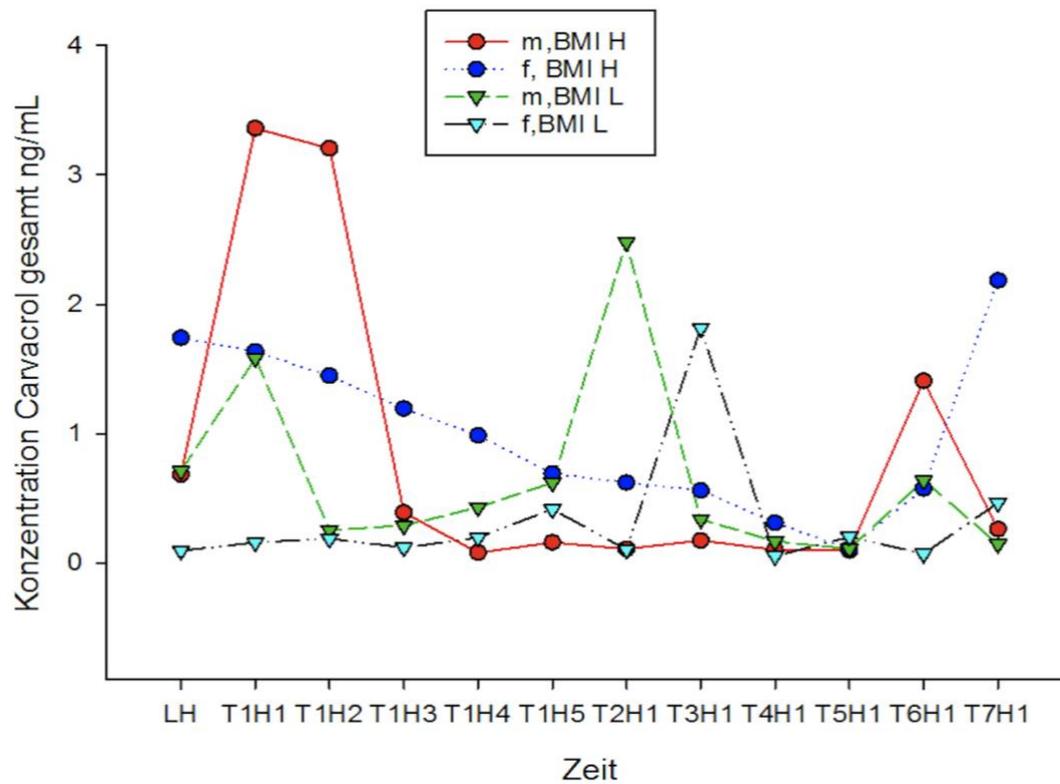


Abbildung 32: Vergleich der Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol aller Probanden

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass an Hand der ermittelten Daten durchaus Hinweise zur Anreicherung von lipophilen Monoterpenen im Abdominalfett vorhanden sind. Auch in den Ergebnissen anderer Studien zum Nachweis von Monoterpenen in biologischen Matrices wurde mehrmals darauf hingewiesen, dass eine geringe Konzentration oder verzögerte Detektion der Verbindungen im Blut oder Urin durch die Einlagerung im subkutanen Fettgewebe begründet sein könnte (Jäger *et al.*, 1996, Fewell *et al.*, 2007; Friedl *et al.*, 2010). Unterschiede in der Körperzusammensetzung der Probanden in puncto Körperfettanteil, in der Resorption oder die Nichteinhaltung der Verpflichtungen für die Dauer der Studie könnten die Ursache für interindividuelle Schwankungen in der ausgeschiedenen Carvacrolmenge sein. Während der Massage des Oreganoöls in den unteren Bereich des Bauches wurden Untersuchungshandschuhe zur Verhinderung der Resorption über die Handfläche verwendet. Die pulmonale Resorption der flüchtigen Substanzen wurde allerdings vernachlässigt. Durch die Anwendung einer Atemmaske hätte man die inhalative Aufnahme verhindern können. Langeneckert zeigte 1998 in seinen Untersuchungen, dass bei dermalen Applikation ein großer Teil der flüchtigen Verbindungen auch pulmonal resorbiert wurde. Darüber hinaus wäre die Mitgabe eines Ernährungsplans, der ausschließlich die Speisen enthält, welche vor Beginn der Studie und für die Zeit der Studiendauer verzehrt werden dürfen, durchaus sinnvoll. So könnte man gewährleisten, dass die Analytik durch Kontamination nicht beeinträchtigt wird. Für signifikante Belege wären Untersuchungen mit einer größeren Probandengruppe unter kontrollierten Bedingungen von wesentlicher Bedeutung.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad A., Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L. A., Manzoor N., 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; 30: 41–50

Eichelbaum M., Schwab M., 2017. „Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: allgemeine Pharmakokinetik“, in: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (12. Auflage), Aktories K., Förstemann U., Hoffmann F. B., Starke K. (eds.). Urban & Fischer München; S. 39

Ambrosch S., Duliban C., Heger H., Moser E., Laistler E., Windischberger C., Heuberger E., 2018. Effects of 1,8-cineole and (-)-linalool on functional brain activation in a working memory task. *Flavour and Fragrance Journal*; 33: 235-244

Andersen A., 2006. Final report on the safety assessment of sodium *p*-chloro-*m*-cresol, *p*-chloro-*m*-cresol, chlorothymol, mixed cresols, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, isopropyl cresols, thymol, *o*-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*; 25(Suppl 1): 29–127

Austgulen L., Solheim E., Scheline R., 1987. Metabolism in rats of *p*-cymene derivatives: Carvacrol and Thymol. *Pharmacology & Toxicology*; 61: 98-102

Bell G., Henry D., Richmond C., 1981. A specific g.l.c. assay for menthol in urine. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 12: 281

Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*; 43(2): 149–154

Bounds S. V., Caldwell J., 1996. Pathways of metabolism of [1'-14C]-trans-anethole in the rat and mouse. *Drug Metabolism and Disposition*; 24(7): 717-724

Buchbauer G., Jäger W., Jirovetz L., Meyer F., Dietrich H., 1992. Wirkungen von Baldrianöl, Borneol, Isoborneol, Bornylacetat und Isobornylacetat auf die Motilität von Versuchstieren (Mäusen) nach Inhalation. *Pharmazie*; 47: 620-622

- Buchholz K., Pawliszyn J., 1994. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry*; 66: 160-167
- Cappello G., Spezzaferro M., Grossi L., Manzoli L., Marzio L., 2007. Peppermint oil (Mintol®) in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective double-blind placebo-controlled randomized trial. *Digestive and Liver Disease*; 39: 530-536
- Crespo M. E., Jimenez J., Gomis E., Navarro C., 1990. Antibacterial activity of the essential oil of *Thymus serpylloides subspecies gadorensis*. *Microbios*; 61: 181-184
- Diliberto J. J., Usha G., Birnbaum L. S., 1988. Disposition of citral in male Fischer rats. *Drug Metabolism and Disposition*; 16(5): 721-727
- Dong R.-H., Fang Z.-Z., Zhu L.-L., Ge G.-B., Cao Y.-F., Li X.-B., Hu C.-M., Yang L., Liu Z.-Y., 2012. Identification of CYP isoforms involved in the metabolism of thymol and carvacrol in human liver microsomes (HLMs). *Pharmazie*; 67: 1002-1006
- Federspil P., Wulkow R., Zimmermann T., 1997. Wirkung von Myrtol standardisiert bei der Therapie der akuten Sinusitis - Ergebnisse einer doppelblinden, randomisierten Multicenterstudie gegen Placebo. *Laryngo- Rhino-Otologie*; 76: 23-27.
- Fewell F., McVicar A., Gransby R., Morgan P., 2007. Blood concentration and uptake of d-limonene during aromatherapy massage with sweet orange oil. A pilot study. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*; 1: 97-102
- Freissmuth M., 2016. „Pharmakokinetik“, in: *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (2. Auflage), Freissmuth M. Offermanns S., Böhm S.. Springer-Verlag; S. 16-19
- Friedl S. M., Oedendorfer K., Kitzler S., Reznicek G., Sladek G., Heuberger E., 2010. Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC-MS analysis for the quantification of (-)-linalool in human whole blood samples. *Natural Product Communications*; 5(9): 1447-52

Friedl S. M., Heuberger E., Oedendorfer K., Kitzer S., Jaganjac L., Stappen I., Reznicek G., 2015. Quantification of 1,8-cineole in human blood and plasma and the impact of liner choice in head-space chromatography. *Current Bioactive Compounds*; 11: 49-55

Friedman M., 2014. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl- 2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 62: 7652–7670

Fuchs N., Jäger W., Lenhardt A., Böhm L., Buchbauer I., Buchbauer G., 1997. Systemic absorption of topically applied carvone: Influence of massage technique. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*; 48: 277-282

Göbel H., Fresenius J., Heinze A., Dworschak M., Soyka D., 1996. Effektivität von *Oleum menthae piperitae* und von Paracetamol in der Therapie des Kopfschmerzes vom Spannungstyp. *Nervenarzt*; 67(8): 672-681

Grote C., 1999. Entwicklung und Validierung eines automatisierten Systems zur quasi-kontinuierlichen Analyse organischer Wasserinhaltsstoffe mittels Festphasenmikroextraktion (SPME). Dissertation. Universität Hannover

Grote C., Pawliszyn J., 1997. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Human Breath. *Analytical Chemistry*; 69: 587-596

Guengerich F. P., 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS Journal*; 8(1): E101-E111

Hall B. J., Satterfield-Doerr M., Parikh A. R., Brodbelt J. S., 1998. Determination of cannabinoids in water and human saliva by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*; 70(09): 1788-1796

Hänsel R., Sticher O., 2010. *Pharmakognosie – Phytopharmazie* (9. Auflage). Springer Medizin Verlag; S. 738-741, 941, 948, 956-959

Hirata Y., Pawliszyn J., 1994. Solvent-free sample introduction for supercritical fluid chromatography using polymer coated fibres. *Journal of Microcolumn Separations*; 6: 443-447

Ipek E., Tuylu B. A., Zeytinoglu H., 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*; 43: 145–148

Jäger W., Höferl M., 2016. „Metabolism of terpenoids in animal models and humans”, in: *Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications (2. Auflage)*, Baser K. H. C., Buchbauer G. (eds). CRC Press, Taylor & Francis Group; S. 274

Jäger W., Nasel B., Nasel C., Binder R., Stimpfl T., Vycudilik W., Buchbauer G., 1996. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in humans during inhalation. *Chemical Senses*; 21: 477-480

Johny A. K., Hoagland T., Venkitanarayanan K., 2010. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica serovar Typhimurium* DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*; 7: 1165–1170

Juergens U. R., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H., 2004. Inhibitory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*; 97: 250-256

Junker H. P., 2004. Einsatzmöglichkeiten der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) zum Nachweis von forensisch-toxikologisch relevanten Verbindungen in biologischen Matrices. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Kohlert C., Schindler G., März R. W., Abel G., Brinkhaus B., Derendorf H., Grafe E. U., Veit M., 2002. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*; 42: 731-737

Kohlert C., 2001. Systematische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Thymol nach oraler Applikation einer thymianhaltigen Zubereitung im Menschen. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G.-E. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*; 91: 453–462
- Landa P., Kokoska L., Pribylova M., Vanek T., Marsik P., 2009. *In vitro* anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. *Archives of Pharmacal Research*; 32: 75–78
- Langeneckert A., 1998. Untersuchungen zur Pharmakokinetik und relativen Bioverfügbarkeit von alpha-Pinen, 1,8-Cineol und Menthol nach dermalen, inhalativer und peroraler Applikation ätherischer Öle. Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Lee J. H., Kim Y. G., Lee J., 2017. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*; 123: 1420-1428
- Lee X., Kumazawa T., Kondo K., Sato K., Suzuki O., 1999. Analysis of methanol of formic acid in body fluids by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B*; 734: 155-162
- Levin J. O., Eriksson K., Falk A., Lof A., 1992. Renal elimination of verbenols in man following experimental alpha-pinene inhalation exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*; 63(8): 571-573
- Liu J. H., Chen G. H., Yeh H. Z., Huang C. K., Poon S. K., 1997. Enteric-coated peppermint-oil capsules in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective, randomized trial. *Journal of Gastroenterology*; 32(6): 765-768
- Mahlo H. D., 1990. Obstruktive Atemwegserkrankungen. Mit Cineol die Lungenfunktionsparameter verbessern. *Therapiewoche*; 35: 3157-3162
- Mans M., Pentz R., 1987. Pharmacokinetics of menthol in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*; 335: R6
- Maruzella J. C., Liguori L., 1958. The *in vitro* antifungal activity of essential oils. *Journal of the American Pharmaceutical Association*; 47(4): 250-254

Medvedovici A., Sandra P., David F., 1997. Construction of an Interface for SPME-PCSF. *Journal of High Resolution Chromatography*; 20: 619-620

Meister R., Wittig T., Beuscher N., de May C., 1999. Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. Study Group Investigators, *Arzneimittelforschung*; 49(4): 35-8

Morgenstern E., 1998. „Die antiphlogistische Wirkung von Bronchipret und seiner Komponenten im Rattenpfoten-Ödem-Modell“, in: *Bronchitis - Neue Erkenntnisse zu Wirkungen und Wirksamkeit von Arzneipflanzen*, R. März (ed.). Freiburg, Karger Verlag: 1-8

Nasel C., Nasel B., Samec P., Schindler E., Buchbauer G, 1994. Short Communication: Functional imaging of effects of fragrances on the human brain after prolonged inhalation. *Chemical Senses*; 19 (4): 359-364

Nguyen A. L., Luong J. H. T., 1997. Separation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by solid phase microextraction/cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*; 69: 1726-1731

Pattnaik S, Subramanyam V. R., Kole C., 1996. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios.*; 86: 237-246

Pavlovic S., 2017. Untersuchung der Wirkung von ätherischem Oreganoöl auf die Keimanzahl im Harn nach dermalen Applikation. Diplomarbeit. Universität Wien.

Pawliszyn J., 1997. *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*. Ontario, John Wiley & Son; S. 11-20

Perez-Conesa D., Cao J., Chen L., McLandsborough L., Weiss J., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection*; 74: 55–62

Rees W. D. W., Evans B. K., Rhodes J., 1979. Treating irritable bowel syndrome with peppermint oil. *British Medical Journal*; 2: 835-836

Römmelt H., Drexel H., Dirnagl K., 1978. Wirkstoffaufnahme aus pflanzlichen Badezusätzen. *Die Heilkunst*; 91: 249-254

Römmelt H., Schnitzer W., Swoboda M., Senn E., 1988. Pharmakokinetik ätherischer Öle nach Inhalation mit einer terpenhaltigen Salbe. Zeitschrift für Phytotherapie; 9: 14-16

Römmelt H., Zuber A., Dirnagl K., Drexel H., 1974. Zur Resorption von Terpenen aus Badezusätzen. Münchner Medizinische Wochenschrift; 116(11): 537-540

Schäfer R., Schäfer W., 1982. Die perkutane Resorption verschiedener Terpene - Menthol, Campher, Limonen, Isobornylacetat, α -Pinen - aus Badezusätzen. Arzneimittelforschung; 32(1): 56-58

Scheline R. R., 1991. Handbook of Mammalian Metabolism of Plant Compounds. CRC Press, Taylor & Francis Group; S. 58-61

Schuster O., Haag F., Priester H., 1986. Transdermale Absorption von Terpenen aus den ätherischen Ölen der Pinimenthol-S-Salbe. Die Medizinische Welt; 37: 100-102

Schwenk U., 1998. „Antivirale Wirkung von Bronchipret-Tropfen und Thymianextrakt“, in: Bronchitis - Neue Erkenntnisse zu Wirkungen und Wirksamkeit von Arzneipflanzen, März R. (ed.). Freiburg, Karger Verlag: 20-25

Shapiro S., Meier A., Guggenheim B., 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. Oral Microbiology and Immunology 9(4): 202-208

Slamenova D., Horvathova E., Chalupa I., Wsolova L., Navarova J., 2011. *Ex vivo* assessment of protective effects of carvacrol against DNA lesions induced in primary rat cells by visible light excited methylene blue (VL+MB). Neoplasma; 58: 14–19

Somerville K. W., Richmond C. R., Bell G. D., 1984. Delayed release peppermint oil capsules (Colpermin) for the spastic colon syndrome: a pharmacokinetic study. British Journal of Clinical Pharmacology; 18(4): 638-640

Steflitsch W. 2013. „Einführung in die Welt der ätherischen Öle“, in: Aromatherapie in Wissenschaft und Praxis (1. Auflage), Steflitsch W., Wolz D., Buchbauer G. (eds). Stadelmann Verlag; S. 8-9

Takada M., Agata I., Sakamoto M., Yagi N., Hayashi N., 1979. On the metabolic detoxification of thymol in rabbit and man. *The Journal of Toxicological Sciences*; 4: 341-350

Teuscher E., Melzig M., Villmann E., Möritz K. U., 1990. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus ätherischer Öle. *Zeitschrift für Phytotherapie*; 11: 87-92

Thalhamer B., Buchberger W., Waser M., 2011. Identification of thymol phase I metabolites in human urine by headspace sorptive extraction combined with thermal desorption and gaschromatography massspectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 56: 64-69

Trippo U., 2000. "Körperbau, Körperzusammensetzung und Ernährungsgewohnheiten bei Erwachsenen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht". Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Potsdam

Tzamaloukas A. H., Murata G. H., Vanderjagt D. J., 2005. „Limitations and pitfalls of body mass index“, in: *Body Mass Index and Health*, Ferrera L. A. (ed). Nova Science Publishers, Inc., New York; S. 61, 69

Ulrich S., Martens J., 1997. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *Journal of Chromatography B*; 696(2): 217-234

Ultee A., Bennik M. H., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*; 68: 1561–1568

Ultee A., Kets E. P. W., Smid E. J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*; 65: 4606–4610

Vanhöfen S., 2014. Bestimmung der Fettverteilung und des Nebennierenvolumens bei gesunden Männern und Frauen sowie depressiven Patientinnen mittels MRT und Korrelation mit anthropometrischen Daten bzw. Hautwiderstandsmessungen. Inaugural-Dissertation. Universität Tübingen

Wabner D., Beier C., 2012. Aromatherapie (2. Auflage). Urban & Fischer München; S. 1

Wanner J., 2017. GC-MSGC-MS-Analytik des Oreganoöls, Kurt Kitzing GmbH, Wallerstein, Deutschland

Weiß R. F., Fintelmann V., 2006. Lehrbuch der Phytotherapie (11. Auflage). Stuttgart, Hippokrates Verlag; S. 219

WHO: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> (aufgerufen am 08.09.2019)

Wittmann M., Petro W., Kaspar P., Reppes R., Dethlefsen U., 1998. Zur Therapie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen mit Sekretolytika. Atemw.-Lungenkrank.; 24: 67-74

Yamaguchi T., Caldwell J., Farmer P. B., 1994. Metabolic fate of [3H]-l-menthol in the rat. Drug Metabolism and Disposition; 22(4): 616-624

Youdim K., Deans S., 1999. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. Mechanisms of Ageing and Development; 109: 163-175

Zeytinoglu H., Incesu Z., Baser K. H., 2003. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. Phytomedicine; 10(4): 292–299

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel von Isopren.....	3
Abbildung 2: Die Verknüpfungs-Arten der Isoprenmoleküle (Hänsel <i>et al.</i> , 2010).....	3
Abbildung 3: Plasmakonzentration des Carvons in Abhängigkeit von drei verschiedenen Massagetechniken (übernommen aus Fuchs <i>et al.</i> , 1997)	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese von Carvacrol und Thymol in Pflanzen (übernommen aus Friedman, 2014)	10
Abbildung 5: Strukturformeln von Thymolsulfat und Thymolglucuronid (Kohlert <i>et al.</i> , 2002)	11
Abbildung 6: Aus dem Rattenurin identifizierte Phase-I-Metabolite des Thymols (übernommen aus Austgulen <i>et al.</i> , 1978).....	13
Abbildung 7: Referenzsubstanzen für die Strukturabsicherung und ihre Struktur- Und Summenformeln, sowie die Molekulargewichte (übernommen aus Thalhamer <i>et al.</i> , 2011)	15
Abbildung 8: Vergleich der potentiellen Metaboliten von Thymol bei Menschen und Ratten (übernommen aus Baser <i>et al.</i> , 2016)	16
Abbildung 9: Metabolismus und renale Ausscheidung von Carvacrol in Ratten (übernommen aus Baser <i>et al.</i> , 2016).....	17
Abbildung 10: GC-Spektrum des ätherischen Oreganoöls von Fa. Wabner	27
Abbildung 11: GC-Spektrum der Oreganokapsel von BIOEVA	27
Abbildung 12: Ablauf der Festphasenmikroextraktion (SPME)	32
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Methoden der Probenahme während der SPME-Analytik (übernommen aus Junker, 2004)	33
Abbildung 14: Anleitung zur Messung der Hautfaltendicke mit Hilfe eines Calipers (Körperfettzange) (Bedienungsanleitung der Körperfettzange blupalu)	35

Abbildung 15: Tabelle zur Auswertung des Körperfetts nach der Messung der Hautfaltendicke in Millimeter mit Hilfe des Calipers. Der prozentuale Fettanteil ist der Schnittpunkt von Alter und Messergebnis der Hautfaltendicke in Millimeter (Bedienungsanleitung der Körperfettzange blupalu).	36
Abbildung 16: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Thymol im Bereich von 1 ng/mL – 256 ng/mL.....	37
Abbildung 17: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Carvacrol im Bereich von 1 ng/mL – 256 ng/mL.....	38
Abbildung 18: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Thymol im Bereich von 1 ng/mL – 2048 ng/mL.....	39
Abbildung 19: Massenspektrum und Kalibrierkurve von Carvacrol im Bereich von 1 ng/mL – 2048 ng/mL.....	40
Abbildung 20: Zeitliche Abhängigkeit der Anreicherung von Carvacrol an der DVB/Car/PDMS-SPME-Faser	41
Abbildung 21: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 1.....	44
Abbildung 22: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 1.....	44
Abbildung 23: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 2.....	46
Abbildung 24: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 2.....	46
Abbildung 25: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 3.....	48
Abbildung 26: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 3.....	48
Abbildung 27: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 4.....	50
Abbildung 28: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 4.....	50
Abbildung 29: Kinetikkurven von Gesamtcarvacrol und -thymol von Proband 4 nach oraler Applikation	52

Abbildung 30: Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol von Proband 4 nach oraler Applikation	52
Abbildung 31: Vergleich der Kinetikkurven von Gesamtarvacrol und -thymol aller Probanden.....	55
Abbildung 32: Vergleich der Kinetikkurven von freiem Carvacrol und Thymol aller Probanden.....	55

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ergebnisse der GC-MS Analysen der Urinproben. Konzentration an Carvacrol in ng/mL an Tag eins und acht vor und nach Zusatz der Amidosulfonsäure zur enzymatischen Spaltung der Konjugate.	23
Tabelle 2: BMI Klassifikation für Erwachsene (WHO, Stand 2019).	24
Tabelle 3: Zusammensetzung des Oreganoöls von Fa. Wabner.....	28
Tabelle 4: Zusammensetzung der Oreganoöl Kapsel von BIOEVA (Inhalt der Kapsel 150 mg Oreganoöl).....	29
Tabelle 5: Demographischen Daten der Probanden	33
Tabelle 6: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 1 vor und nach der Säurespaltung	43
Tabelle 7: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 2 vor und nach der Säurespaltung	45
Tabelle 8: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 3 vor und nach der Säurespaltung	47
Tabelle 9: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 4 vor und nach der Säurespaltung	49
Tabelle 10: Konzentrationen von Thymol und Carvacrol im Harn von Proband 4 nach oraler Applikation vor und nach der Säurespaltung.....	51
Tabelle 11: Konzentrationen von Carvacrol im Harn von allen vier Probanden vor und nach der Säurespaltung	54