

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Historische Aspekte

Vitamine sind im klassischen Sinn niedermolekulare Verbindungen, die in kleinsten Mengen lebensnotwendig sind und allen höheren Lebewesen mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Diese klassische Definition gilt heute nur noch mit Einschränkungen, da mittlerweile bekannt ist, dass besonders die wasserlöslichen Vitamine von Mikroorganismen im Verdauungstrakt gebildet werden können. Wiederkäuer und koprophage Tiere können diese dann verwerten. Im Stoffwechsel können auch Vorstufen bestimmter Vitamine (wie z.B. das Provitamin D<sub>3</sub>) gebildet werden.

Vitamine wirken in unterschiedlicher Weise auf den Stoffwechsel. Einige wirken direkt in unveränderter Form (z.B. Vitamin E und C), andere müssen im Stoffwechsel erst in die wirksamen Formen überführt werden (z.B. Vitamin A und D) und ein Teil der Vitamine besitzt Coenzymfunktion (B-Vitamine) (Jeroch et al., 1999; Kirchgeßner, 1987).

Vitamine wie auch die Lebensnotwendigkeit ihrer Zufuhr wurden erst am Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt. Bis Ende des 19. Jahrhunderts galt deshalb die Ernährung von Mensch und Tier, bestehend aus Kohlenhydraten, Fetten, Eiweiß, Wasser und Salz, für die Aufrechterhaltung von Gesundheit, Wachstum und Leistungsfähigkeit als ausreichend.

Erst Untersuchungen des Chemikers Bunge um 1880 und Eijkmann um 1890 führten zu der Erkenntnis der Wichtigkeit von Vitaminen und Krankheit bei Vitaminmangel (z.B. Berberikrankheit des Menschen bei Vitamin B<sub>1</sub>-Mangel oder Scorbut des Menschen bei Vitamin C Mangel).

1912 gab der polnische Biochemiker Funk dieser Substanzgruppe den Namen Vitamine. Er beschrieb Vitamine als unbekannte Substanzen in der Nahrung, die unerlässlich für das Leben sind. Aus dieser Beobachtung resultiert auch ihr Name, da es sich um für das Leben (vita) essentielle Stoffe handelt, die organische Stickstoffbasen (Amine) sind oder solche enthalten. Dass es sich nicht bei allen Vitaminen um Amine handelt, wurde erst viel später bei der Isolierung einzelner Vitamine bekannt.

1915 wurde aus Bierhefe und Getreidekörnern ein wasserlöslicher Faktor B gewonnen, der ebenfalls lebensnotwendig ist. Weitere neu entdeckte Nahrungsfaktoren wurden entweder mit neuen Buchstaben versehen oder einem schon vorhandenen Buchstaben wurde eine Indexzahl hinzugefügt (z.B. Vitamin B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> oder B<sub>12</sub>). Diese Art der Nomenklatur wird heute nicht mehr

in gleicher Form beibehalten. Besonders bei den B-Vitaminen, bei denen sich erst im Laufe der Zeit herausgestellt hat, dass es sich um eine Vielzahl von Substanzen handelt, wird meist der Trivialname der chemischen Substanz zur Benennung verwendet (z.B. Folsäure).

In der Tierernährung ordnet man die Vitamine in die Gruppe der Wirkstoffe ein. Mit dem Begriff „Wirkstoff“ wird zum Ausdruck gebracht, dass es sich um eine Substanz handelt, die in kleinsten Konzentrationen für den Stoffwechsel wichtige Funktionen ausübt (Jeroch et al., 1999; Kirchgeßner 1997).

Die häufigste und aus ernährungsphysiologischer Sicht sinnvolle Einteilung der Vitamine ist die nach ihrer Löslichkeit. Demnach gibt es fett- und wasserlösliche Vitamine. Diese Einteilung trägt auch dem Vorkommen der Vitamine sowie deren Synthesemöglichkeit durch den mikrobiellen Stoffwechsel Rechnung.

Aus biochemischer Sicht werden Vitamine häufig nach deren möglicher Coenzymfunktion eingeteilt.

## 2.2. Bewertung der Vitaminversorgung

Das völlige Fehlen eines oder mehrerer Vitamine wird als **Avitaminose** bezeichnet. Ursachen einer Avitaminose können absolut einseitige Ernährung (Fehlernährung), Resorptions- oder Stoffwechselstörungen, Antivitamine oder eine gestörte Eigensynthese der normalerweise im Organismus selbst gebildeten Vitamine sein. Aus der Humanmedizin sind eine Reihe von Avitaminosen bekannt, so beispielsweise die Avitaminose C (Scurbut) oder die Avitaminose B<sub>1</sub> (Beriberi). Beim Rind kommen Avitaminosen praktisch nicht vor, häufig aber eine Unterversorgung, die so genannten **Hypovitaminosen**. Diese treten dann ein, wenn über einen bestimmten Zeitraum der Bedarf an einem bestimmten Vitamin bzw. an Vitaminen nicht gedeckt wird. Eine Hypovitaminose B<sub>12</sub> tritt beispielsweise beim Wiederkäuer bei einer ungenügenden Versorgung mit Kobalt auf, welches essentiell für die Vitamin B<sub>12</sub>-Synthese benötigt wird. Die meisten Hypovitaminosen sind nur schwer zu diagnostizieren, da sie keine spezifischen Mangelsymptome verursachen. Anzeichen können bei Jungtieren Kümern, verminderte Resistenz gegen Infektionskrankheiten oder erhöhte Tierverluste sein, bei adulten Tieren verminderte Leistung oder ein gestörtes Reproduktionsgeschehen.

Folge einer zu hohen Vitaminzufuhr kann eine **Hypervitaminose** sein. Beim Haustier ist eine Hypervitaminose nur bei den Vitaminen A und D bekannt. Hypervitaminosen treten nur bei

fettlöslichen Vitaminen auf, da wasserlösliche Vitamine bei überhöhter Zufuhr über die Niere ausgeschieden werden.

Aufgrund der Entwicklung neuer Analysetechniken, besonders der chromatographischen Verfahren, ist es heute möglich, den Vitamingehalt im Serum oder Futtermittel direkt quantitativ zu bestimmen. Angaben zum Bedarf oder Vitamingehalt werden demnach in mg gemacht. Da früher eine exakte Mengenermittlung analytisch nicht möglich war, hat man die Vitamine anhand ihrer biologischen Wirkung quantifiziert und dies in sogenannten Internationalen Einheiten (IE) ausgedrückt. So sind z.B. für Vitamin A, E und D noch Angaben in IE üblich, wobei heutzutage Mengenäquivalente definiert sind.

Der **Vitaminbedarf** ist die notwendige tägliche Vitaminzufuhr, um den optimalen Ablauf der physiologischen Stoffwechselforgänge zu gewährleisten. Der **Minimalbedarf** ist zur Aufrechterhaltung der normalen Stoffwechselfunktionen und zur Vermeidung von Mangelsituationen notwendig. Ein **Optimalbedarf** ist erforderlich, um die volle Leistungsfähigkeit eines Tieres auszuschöpfen.

Der Bedarf kann pro Tier und Tag angegeben werden oder pro Masseinheit Futtermittel. Die Bestimmung des Vitamingehaltes im Blut eignet sich bei dem Verdacht auf eine Mangelsituation, hier ist die übliche Maßeinheit mg/l.

Nomenklatur und Einteilung der fett- und wasserlöslichen Vitamine nach Coenzymfunktion sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tab. 1: Namen und Einteilung der fettlöslichen Vitamine (Jeroch et al., 1999).

Abkürzung	Name	mit Coenzymfunktion
Vitamin A	Retinol	-
Vitamin D	Calciferol	-
Vitamin E	Tokopherol	-
Vitamin K	Phyllochinon	+

Tab. 2: Namen und Einteilung der wasserlöslichen Vitamine (Jeroch et al., 1999).

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>	<b>mit Coenzymfunktion</b>
Vitamin B <sub>1</sub>	Thiamin	+
Vitamin B <sub>2</sub>	Riboflavin	+
Vitamin B <sub>6</sub>	Pyridoxin	+
Vitamin B <sub>12</sub>	Cobalamin	+
Niacin	Niacin	+
Pantothensäure	Pantothensäure	+
Folsäure	Folsäure	+
Biotin	Biotin	+
Vitamin C	Ascorbinsäure	-

## 2.3. Vitamine der B-Gruppe

### 2.3.1. Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin)

#### 2.3.1.1. Chemische Struktur

Thiamin besteht aus einem Pyrimidin- und einem Thiazolring (Morrison u. Boyd, 1986). Freies Thiamin ist wegen seinem quartenären N-Atom relativ instabil und wird in Wasser zur Thiolform abgespalten. Thiamin ist in Lösungen mit pH 2-4 stabil. Je höher der pH-Wert steigt, desto instabiler ist das Molekül. Bei Erhitzung ist Thiamin nicht stabil (Song et al., 2000). Die Bindung an ein Protein stabilisiert dieses Vitamin und verhindert weitgehend Lagerungsverluste (Witte, 1998).

Neben freiem Thiamin existieren im Stoffwechsel weitere wirksame Formen, wie das Thiaminmono-, Thiamindi- und Thiaminpyrophosphat. Letztere ist als Coenzym die wirksamste Form innerhalb des Stoffwechsels. Der überwiegende Teil liegt im Organismus in dieser Form vor (Jeroch et al., 1999; Zintzen, 1973).

### 2.3.1.2. Vorkommen

Der Thiamingehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Thiamingehalt einzelner Futtermittel (Steinberg u. Kaufmann, 1977).

Futtermittel	mg B <sub>1</sub> /kg TS
Heu	1,6
Gerstenschrot	4,7
Haferschrot	5,3
Soja, gemahlen	7,2
Eiweißkonzentrat	6,0
Haferstroh, lang	1,2
Mineralstoffe	1,2

Empfehlungen über die orale Zufuhr von Thiamin geben Kamphues et al. (1999) für Kälber mit 2,5 mg/kg Futter-TS und Kirchgeßner (1997) mit 2-3 mg/kg Futter-TS an. Angaben zur Versorgung adulter Rinder liegen nicht vor.

Im Vollblut sollte der Thiamingehalt bei 50-70µg/l liegen und in der Milch bei 350-500 µg/l (Stöber, 1994).

Stöber (1994) legt die empfohlene therapeutische Dosis beim adulten Rind mit Thiaminmangel mit 250-1000 mg/Tier/Tag bei parenteraler Gabe fest.

### 2.3.1.3. Stoffwechselfunktion

Thiaminpyrophosphat (TPP) ist Coenzym mehrerer enzymatischer Reaktionen, bei denen Aldehydgruppen auf Akzeptoren übertragen werden (Tabelle 4). Dabei werden die Aldehyde vorübergehend kovalent an den Thiazolring gebunden. Diese Reaktionen sind häufig mit einer Decarboxylierung verbunden (Nelson u. Cox, 2001).

Tab. 4: Bedeutung des Thiamins im Stoffwechsel (Zintzen, 1973).

Stoffwechselweg	Funktion des TPP	Gewebe
Glykolyse Zitronensäurezyklus	Decarboxylierung von $\alpha$ - Ketonsäuren	Leber, Niere Milchdrüse, Erythrozyten
Pentosephosphatweg	Coenzym der Transketolase	Leber, Milchdrüse, Niere, Nebennierenrinde

Thiamin wird zum größten Teil im Pansen synthetisiert und im Dünndarm zu 70 – 90% resorbiert (Poppe, 1958b; Kolb et al., 1999). Einen erhöhten Thiaminbedarf beobachtete Poppe (1958a) bei Tieren mit einem intensiven Stoffwechsel. Der Gehalt an Thiamin in der Milch korreliert nicht damit. Sinkender Milchleistung folgt allerdings ein sinkender Thiamingehalt der Milch (Poppe, 1958b).

#### 2.3.1.4. Klinische Bedeutung

Da Glykolyse, Zitronensäurezyklus und Pentosephosphatweg zu den Hauptabbauwegen der Kohlenstoffgerüste gehören, werden so die schweren Stoffwechselstörungen bei Thiaminmangel verständlich. Häufig fehlen hierbei klar umrissene klinische Manifestationen. Thiaminmangel kann sich in unspezifischen Symptomen, wie Kümern, mangelnder Gewichtszunahme sowie Leistungsabnahme äußern (Coelho, 2002; Rehm et al., 1971).

Ein Thiaminmangel ist andererseits eine der wenigen klassischen Vitaminmangelerkrankungen. Hierbei kommt es zu dem klar umrissenen Krankheitsbild der Zerebrokortikalnekrose (CCN). An der CCN erkranken vor allem Rinder im Alter von 3 – 18 Monaten, aber auch ältere Rinder, insbesondere Kühe, können davon betroffen sein. Das akute klinische Bild der CCN entwickelt sich meist binnen Stunden und äußert sich im Festliegen in Seitenlage, meist mit opisthotonisch gehaltenem Kopf. Anfallsweise Erregungszustände treten häufig auf und äußern sich am festliegenden Tier in Ruderbewegung mit gestreckten Gliedmaßen. Am stehenden Tier sind vorwiegend Muskelzuckungen im Kopfbereich wahrnehmbar. Die Erregungsphasen sind meist durch mechanische oder akustische Reize auslösbar (Stöber, 1994; Eigenmann et al., 1982; Stöber u. Scholz, 2002).

Eine früher angenommene These, dass Sulfitverbindungen die Thiamingehalte oder die Thiaminverfügbarkeit im Pansen negativ beeinflussen, kann heute nicht mehr aufrecht erhalten werden (Höltershinken et al. 2000; Mittrowann, 1999). Verpilztes Futtergras führt zu

einem thiaminasebedingten Abbau des Thiamins im Pansen und kann so für die Entstehung der CNN mitverantwortlich gemacht werden (Plitt, 1995).

### **2.3.1.5. Nachweismethoden**

#### **2.3.1.5.1. Transketolase-Test**

Erythrozyten enthalten reichlich Transketolase, ein Enzym, das für den Pentosephosphatweg essentiell ist und durch welches auch subklinische Vitamin B<sub>1</sub>-Mangelzustände erfasst werden können. Daher wird dieser Test an Erythrozyten bzw. an aus ihnen gewonnenen Hämolysaten durchgeführt. Nach in vitro Zusatz von Thiaminpyrophosphat wird die Transketolaseaktivität gemessen.

Der in vitro Zusatz von TPP bewirkt eine Erhöhung der Transketolaseaktivität im Vergleich zu einer Probe, die ohne Zusatz gemessen wird. Eine bestimmte Erhöhung der Aktivität mit TPP-Zusatz kann als Vitamin B<sub>1</sub>-Mangel (TPP-Effekt) interpretiert werden (Rehm et al., 1971; Eigenmann et al., 1982; Edwin et al., 1979).

#### **2.3.1.5.2. HPLC**

Thiamin und seine Derivate werden mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) analysiert. Hierbei wird das Thiamin mittels Vor- oder Nachsäulenderivatisierung zu Thiochrom oxidiert (Ishii et al., 1979; Sanemori et al., 1980; Kimura et al., 1980; Roser et al., 1978). Thiochrom wird wegen seiner fluoreszierenden Eigenschaften unter Nutzung eines Fluoreszenzdetektors quantitativ bestimmt. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, hat sich die quantitative Thiaminanalyse mittels reversed-phased HPLC unter isokratischen Bedingungen durchgesetzt. Zur Bestimmung von Untersuchungsmaterial mit hoher Thiaminkonzentration (z.B. Urin oder Futtermittel) kann eine UV- statt eine Fluoreszenzdetektion verwendet werden (Hilker u. Clifford, 1982). Die UV-Detektion ist allerdings nicht sensitiv genug für die Bestimmung der Thiaminkonzentration in anderen Körperflüssigkeiten oder -geweben (Song et al, 2000).

Plasma hat nur ca. 10% des Thiamindiphosphatgehaltes von Vollblut, welches den Thiaminversorgungsgrad am besten repräsentiert. Die Untersuchung von Plasma ist problematisch, da die chromatographischen Methoden sensitiver sein müssen als bei der Untersuchung von Vollblut.

Welche Antikoagulantien (EDTA oder Heparin) dem Vollblut zugesetzt werden, ist von untergeordneter Bedeutung (Witte, 1998). Blut muss vor der Analyse entproteinisiert (z.B. mit Trichloressigsäure) und anschließend zentrifugiert werden, damit Thiamin, TMP, TPP und TTP bestimmt werden können (Kimura u. Itokawa, 1983).

### 2.3.2. Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin)

#### 2.3.2.1. Chemische Struktur

Vitamin B<sub>2</sub> ist 7,8-Dimethyl-10-isoalloxazin. Es ist ein orangegelb-fluoreszierendes, wasserlösliches, kristallines Pulver mit einem schwachen Geruch und einem intensiv bitteren Geschmack (Song et al., 2000).

#### 2.3.2.2. Vorkommen

Der Riboflavingehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Riboflavingehalt einzelner Futtermittel in mg/kg TS (Kamphues et al., 1999).

<b>Hoher Gehalt</b>	Tierlebermehl	47
	Futterhefe	45
	Bierhefe	35
	Dorschlebermehl	33
	Trockenmolke	30
<b>Mittlerer Gehalt</b>	Fischextrakt	28
	Magermilch	25
	Trockenmagermilch	20
	Grünfutter	20
	Grünmehl	15-17
<b>Mäßiger Gehalt</b>	Fischmehl	7
	Getreideschlempe, getr.	6
	Sojaextraktionsschrot	3,5
	Kartoffeln	2
	Getreidekörner	1,2 - 2

### 2.3.2.3. Stoffwechselfunktion

Riboflavin ist die Grundsubstanz zur Bildung zahlreicher Coenzyme von denen die wichtigsten FMN (Flavinmononucleotid) und FAD (Flavinadenindinucleotid) sind.

Die FAD oder FMN enthaltenden Enzyme werden als Flavoproteine bezeichnet. Sie sind ubiquitär im Körper vorhanden und sind an vielen Stoffwechselwegen beteiligt (Tabelle 6 und 7).

Tab. 6: Riboflavinabhängige Stoffwechselwege.

FMN-abhängige Reaktionen	D- und L-Aminosäureoxidasen (Aminosäurenabbau)
	NAD(P)H-Dehydrogenasen
FAD-abhängige Reaktionen	Acyl-CoA-Dehydrogenasen ( $\beta$ -Oxidation, Fettsäurenabbau)
	Xanthinoxidase (Purinbasenabbau)
	Lipoatdehydrogenase (Pyruvatdehydrogenase-Reaktionen)
	Succinatdehydrogenase (Citratzyklus)

Tab. 7: Bedeutung des Riboflavins im Stoffwechsel.

Stoffwechselweg	Funktion des Riboflavin	Gewebe
Atmungskette	Elektronenübertragung Auf- und Übertragung von Reduktionsäquivalenten	Alle
Zitronensäurezyklus	Elektronenübertragung Auf- und Übertragung von Reduktionsäquivalenten	Alle

Milchkühe synthetisieren täglich 6,3-8,3 mg Riboflavin /kg TS im Pansen (Flachowsky, 1999). Das Ausmaß der Syntheseleistung ist allerdings abhängig von der Zusammensetzung der Futtermittel und unterliegt individuellen Schwankungen, wobei der Gehalt im Futter zwischen 1-30 mg/kg TS liegt (Jeroch et al., 1999). Die Resorption erfolgt zu 12,2 –38,9% im Dünndarm (Kolb et al., 1999). Riboflavin wird zu 13-29% über den Harn ausgeschieden (Poppe, 1958c). Der Riboflavinegehalt im Blutplasma liegt bei 0,09-9,5 µg/ml (Kolb et al., 1999).

Wie auch beim Thiamin, so hat die Intensität der Riboflavinsynthese keinen Einfluß auf die Konzentration in der Milch. Diese liegt bei 260-380 µg/l (Kirchgeßner, 1997). Bei sinkender Milchleistung nimmt die Konzentration des Riboflavins in der Milch jedoch ab (Poppe, 1958a).

Die Syntheseleistung des Pansens für Riboflavin wurde experimentell schon bei Kälbern im Alter von 20 bis 180 Tagen nachgewiesen (Brisson u. Sutton, 1951). Demnach sind Kälber nicht auf die exogene Zufuhr von Vitamin B<sub>2</sub> angewiesen. Es gibt keine Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Größe oder Alter der Kälber und deren Riboflavinsyntheseleistung. Ebenfalls scheint kein Zusammenhang zwischen Aufnahme und Vitamin B<sub>2</sub>-Konzentration im Pansen zu bestehen (Kesler u. Knodt, 1951).

#### **2.3.2.4. Klinische Bedeutung**

Durch die Oxidation von organischen Substanzen in der Zelle (Wasserstofftransfer) ist Riboflavin maßgeblich an der Energieversorgung der Zelle beteiligt. Der Organismus ist auf eine ausreichende Versorgung mit Riboflavin angewiesen. Bei einem Mangel kommt es neben unspezifischen Symptomen vor allen Dingen zu Störungen des Zellstoffwechsels, die zu starkem Leistungsabfall, zu Wachstumseinbußen sowie zu einer verschlechterten Futtermittelverwertung führen (Kirchgeßner, 1997; Kolb et al., 1999).

Eine experimentelle Mangelversorgung mit Vitamin B<sub>2</sub> führt bei Kälbern zu Dermatitis, rauem, trockenem Haarkleid, Anämie mit Erythro- und Leukozytopenie und Verringerung des Hämoglobingehaltes. Postmortal wurden gehäuft Pneumonie und katarrhalische Enteritiden festgestellt (Coelho, 2002).

Mangelscheinungen oder Sonderwirkungen bei hohen Vitamin B<sub>2</sub>-Gaben sind bei Milchkühen bisher nicht beschrieben (Flachowsky, 1999).

### **2.3.2.5. Nachweismethoden**

#### **2.3.2.5.1. Fluoreszenzmethode**

In der Literatur sind verschiedene Fluoreszenzmethoden beschrieben, deren Grundlage auf der natürlichen Fluoreszenz von Vitamin B<sub>2</sub> (direkte Fluorimetrie) oder einer Umwandlung in Lumiflavin (indirekte Fluorimetrie) beruht. Diese sind abhängig von der Konzentration und dem pH-Wert des Mediums. Bei der photometrischen Messung erfolgt die Extinktion bei 440 nm und die Emission bei 565 nm.

Eine mögliche Fluoreszenzmethode ist die Fluoreszenztitration. Hierbei bindet Flavodoxin, ein niedermolekulares Flavoprotein aus anaeroben Bakterien, FMN (nicht aber FAD oder Riboflavin) in einem nicht-fluoreszierenden Komplex. Dieser wird dann quantitativ, via Fluoreszenztitration, nachgewiesen. In einer zweiten Titration ist es dann möglich, entweder mittels enzymatischer Reaktion FAD quantitativ zu erfassen oder durch die Bindung an ein Protein Riboflavin nachzuweisen (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

#### **2.3.2.5.2. HPLC**

Die Riboflavinbestimmung aus biologischem Material (Futtermitteln, Körperflüssigkeiten und –gewebe) beinhaltet die zumeist saure Hydrolyse von FMN, FAD und anderen gebundenen Riboflavinformen, so dass freies Riboflavin für die Analyse vorliegt (Song et al., 2000).

Eine häufig durchgeführte Methode beruht auf der Anwendung einer C<sub>18</sub> reversed-phase Säule mit einer mobilen Phase, die aus Methanol oder Acetonitril und Wasser oder Puffer besteht (Speek et al., 1982). Auch die Anwendung von Ionenpaarreagenz als mobile Phase ist möglich (Ichinose et al., 1985).

Eine Detektion im Fluoreszenzbereich (Extinktion bei 440-450 nm, Emission bei 530 nm) entspricht den natürlichen Eigenschaften der Riboflavine und ist damit sehr spezifisch und sensitiv. Die Nachweisgrenze liegt hier bei <1 pmol (0,38 ng) (Lopez-Anaya u. Mayersohn, 1987). Die Detektion im UV-Bereich ist möglich, scheitert aber oftmals an Substanzen innerhalb des Extraktionsmediums, die bei gleicher oder ähnlicher Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen (Ashoor et al., 1985; Vidal-Valverde u. Reche, 1990).

Eine simultane Analyse von Thiamin und Riboflavin mittels reversed-phase Chromatographie und anschließender Fluoreszenzdetektion ist erfolgreich etabliert (Hägg, 1994; Hägg u. Kumpulainen, 1993).

### 2.3.3. Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxin)

#### 2.3.3.1. Chemische Struktur

Pyridoxal, Pyridoxol und Pyridoxamin werden allgemein zur Vitamin B<sub>6</sub>-Gruppe zusammengefasst. Sie unterscheiden sich nur durch die Substituenten am p-ständigen Kohlenstoffatom des Pyridinringes (Song et al., 2000).

#### 2.3.3.2. Vorkommen

Der Pyridoxingehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Pyridoxingehalt einzelner Futtermittel in mg/kg TS (Kamphues et al., 1999).

<b>Hoher Gehalt</b>	Maiskeime	55
	Bier- und Futterhefe	30 – 40
	Dorschlebermehl	33
<b>Mittlerer Gehalt</b>	Fischmehl	15
	Sojaextraktionsschrot	8
	Mühlennachprodukte	5 – 30
<b>Mäßiger Gehalt</b>	Erdnußextraktionsschrot	5
	Magermilch	4
	Getreidekörner	1 - 5

#### 2.3.3.3. Stoffwechselfunktion

Pyridoxal wird in den Geweben zu Pyridoxalphosphat (PALP) phosphoryliert. PALP ist ein Coenzym des Aminosäurestoffwechsels, da es eine Aminogruppe einer Aminosäure aufnimmt und überträgt (Tabelle 9) (Nelson u. Cox, 2001).

Tab. 9: Pyridoxalabhängige Stoffwechselwege (Jeroch et al.,1999).

PALP-abhängige Enzyme	Transaminasen (Ketonkörperstoffwechsel)
	Aminosäure-Decarboxylasen (Aminosäurestoffwechsel)
	Aminosäure-Aldolasen (Aminosäurestoffwechsel)
	Sphingosinsynthetasen (Lipidstoffwechsel)

Im Dünndarm werden 70 – 80% des Vitamin B<sub>6</sub> resorbiert (Kolb et al., 1999). Der Blutserumgehalt liegt zwischen 57 - 93 nmol/l (Kolb et al., 1999).

#### 2.3.3.4. Klinische Bedeutung

Ein B<sub>6</sub>-Mangel führt zu einer Störung der entsprechenden Coenzymfunktion. Im besonderen Maße ist hiervon der Aminosäurestoffwechsel, aber auch der Stoffwechsel anderer Hauptnährstoffe gestört. Die Folgen eines solchen Mangels sind Wachstumsstörungen und herabgesetzter Proteinanabolismus (verringerte Milchbildung und Muskelatrophie). Eine fortschreitende Unterversorgung kann bei Kühen zur pathologischen Beeinträchtigung des Nervengewebes führen. Nervöse Störungen wie Gleichgewichtsstörungen, epileptische Anfälle und abnormes Verhalten sind dann zu beobachten (Jeroch et al.,1999).

Außerdem wird Pyridoxin, neben Pantothen- und Folsäure, eine wichtige Rolle bei der Immunitätsausbildung zugesprochen. Auch diese Wirkung begründet sich aus der Bedeutung als Coenzym im Nuclein- und Aminosäurestoffwechsel. Ferner besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung der Immunglobulinsynthese unter Pyridoxin-Mangel und einer gestörten Tryptophan- und Tyrosinverwertung (Herlyn u. Glaser, 1976).

Pyridoxin und alle anderen Vitamine der B-Gruppe werden im Pansen synthetisiert. Der Umfang der Synthese steigt mit zunehmender Futteraufnahme (Kolb et al., 1999).

Mangelerscheinungen oder Sonderwirkungen bei hohen Vitamin-B<sub>6</sub>-Gaben sind bei Milchkühen bisher nicht beschrieben (Flachowsky, 1999).

#### 2.3.3.5. Nachweismethoden

Nicht alle Vitamine der B<sub>6</sub>-Gruppe sind gleich sensitiv für eine bestimmte Methode. Daher sollte die Wahl der Methode dem Zweck der Analyse folgen (Song et al., 2000).

### **2.3.3.5.1. Mikrobiologischer Test**

Für den Vitamin-B<sub>6</sub>-Nachweis aus Futtermitteln oder Gewebe wird meist eine mikrobiologische Methode verwendet. Es werden hierfür verschiedene Mikroorganismen eingesetzt. Eine der am häufigsten verwendeten ist *Saccharomyces uvarum*. Die phosphorylierten Vitamin-B<sub>6</sub> Formen müssen vor der Analyse hydrolysiert werden, was mit Säure oder enzymatisch gemacht werden kann.

Mit diesem Test sind jedoch gewisse Unsicherheiten verbunden. Das Wachstum der Mikroorganismen kann von Faktoren im Lebensmittel gehemmt werden. Mutation der Mikroorganismen oder Vitamin B<sub>6</sub>-Formen die im Extraktionsprozess zerstört werden sind weitere Analyseschwachpunkte.

Durch die Kombination verschiedener Mikroorganismen ist es möglich, die drei verschiedenen Vitamin B<sub>6</sub>-Formen separat nachzuweisen (Friedrich, 1988; Song et al., 2000 ).

### **2.3.3.5.2. Enzymatischer Test**

Bei diesem Test werden häufig die Apo-Tryptophanase von *Escherichia coli* oder die Tyrosin-Decarboxylase eingesetzt. Die Reaktionsrate bei Einsatz von Enzym und Substrat ist direkt proportional: bei Einsatz der Tryptophanase zur Pyridoxalphosphatkonzentration, bei Einsatz der Decarboxylase zur Gesamtkonzentration an B<sub>6</sub>-Vitaminen. Die photometrische Messung erfolgt bei 370 nm. Durch enzymatische Transaminierung ist es möglich, Pyridoxamin zuvor in Pyridoxal umzuwandeln (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

### **2.3.3.5.3. Immunoassay**

Um die für diesen Test benötigten Antikörper in Kaninchen zu produzieren, werden Pyridoxyl-Albumin-Konjugate eingesetzt. Diese binden an Pyridoxamin und seine Proteinkonjugate. Eines dieser Konjugate entsteht durch die Verbindung von  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* mit Pyridoxal, welches die Schiff-Base hydrogeniert. Die Anti-Pyridoxal-Antikörper binden mit Pyridoxal- $\beta$ -Galaktosidase-Konjugaten, was die enzymatische Aktivität stoppt. Freies Vitamin verdrängt das Enzym vom Antikörper, so dass die wiedergewonnene Enzymaktivität für die quantitative Bestimmung des Vitamins benutzt werden kann.

Dieser Test ist sehr sensitiv und kann schon Mengen von  $5 \cdot 10^{-8}$  M Pyridoxamin nachweisen. Er ist für Pyridoxin noch 100-fach sensitiver.

Radioimmunoassays werden für die phosphorylierten Formen von Vitamin B<sub>6</sub> eingesetzt (Friedrich, 1988).

#### **2.3.3.5.4. HPLC**

Speziell für die Analyse von Futtermitteln eignen sich die HPLC oder die Gaschromatographie meist besser als die mikrobiologischen Tests (Friedrich, 1988). Die HPLC ist daher die Methode der Wahl für die Vitamin B<sub>6</sub>-Bestimmung (Song et al., 2000).

Mit der HPLC ist die Trennung von Pyridoxal, Pyridoxin, Pyridoxamin und deren Phosphaten gut möglich. Diese können im UV-Licht detektiert werden, aber auch hier ist bezüglich der Selektivität und Sensitivität die Fluoreszenzdetektion die Methode der Wahl (Song et al., 2000).

Die zwei meist benutzten Methoden sind entweder der Kationen-Austausch (Coburn u. Mahuren, 1990 u. 1997) oder die reversed-phase HPLC (Coburn et al., 1988; Gregory u. Feldstein, 1985). Diese Methoden werden auch kombiniert eingesetzt (Song et al., 2000).

#### **2.3.3.5.5. Elektrophorese**

Hochspannungselektrophorese mit dünnsschichtig bezogenen Zellulosepulverplatten werden erfolgreich eingesetzt. Die Detektion erfolgt im UV-Bereich. Die photometrischen Methoden weisen jedoch lediglich Vitamin B<sub>6</sub> nach, eine Trennung der Vitamin B<sub>6</sub>-Gruppe ist aber über den pH-Wert des Mediums möglich (Friedrich, 1988).

### **2.3.4. Vitamin B<sub>12</sub> (Cobalamin)**

#### **2.3.4.1. Chemische Struktur**

Cobalamine sind aus einem komplizierten Ringsystem bestehende Verbindungen, die als Zentralatom Co enthalten, das verschieden substituiert sein kann (Jeroch et al., 1999).

### 2.3.4.2. Vorkommen

Der Cobalamingehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab.10: Cobalamingehalt einzelner Futtermittel in mg/kg TS (Kamphues et al., 1999).

<b>Hoher Gehalt</b>	Dorschlebermehl	900
	Fischextrakt	700
	Tierlebermehl	500
	Fischmehl	200 – 300
	Fleisch- oder Blutmehl	80 – 100
<b>Mittlerer Gehalt</b>	Federmehl	70
	Molke	30 – 40
	Magermilch	40

Die Empfehlung zur alimentären Versorgung mit Vitamin B<sub>12</sub> liegt zwischen 0,01–0,02 mg/kg Trockenmasse für Kälber (Kirchgeßner, 1997; Kamphues et al., 1999).

Der Gehalt im Blut liegt bei 0,2–0,8 µg/l und in der Milch bei 210–360 µg/l. Bei einem Mangel an Cobalamin liegt die empfohlene parenterale Dosis bei 0,025–0,035 mg/Tier/Tag (Staufenbiel, 2002).

### 2.3.4.3. Stoffwechselfunktion

Vitamin B<sub>12</sub> (Cobalamin) besitzt zahlreiche Aufgaben im Stoffwechsel, von denen die Übertragung von Methylgruppen wohl die herausragende ist. Diese Reaktion ist Grundlage des Aufbaus der Kohlenstoffgerüste bestimmter Aminosäuren und damit Voraussetzung für eine ausreichende Aminosäuresynthese (Kirchgeßner, 1997; Nelson u. Cox, 2001).

Die coenzymwirksamen Formen des Cobalamins sind Adenosylcobalamin und Methylcobalamin. Diese sind an Reaktionen der Wasserstoffumlagerung und der Umlagerung organischer Gruppen beteiligt, im Falle der Methylgruppen meist im Zusammenwirken mit Tetrahydrofolsäure (Jeroch et al., 1999). Die dadurch bereitgestellten Methylgruppen sind für die Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin und für die Phosphatidglyzerinsynthese in der Leber notwendig. Ein Mangel an Folsäure oder Cobalamin wirkt sich somit hemmend auf alle mitoseaktiven Gewebe aus (Staufenbiel, 2002).

Eine weitere für den Wiederkäuer unentbehrliche Vitamin-B<sub>12</sub>-abhängige Reaktion ist die

Einschleusung des im Pansen synthetisierten Propionats in den Zitronensäurezyklus oder in die Glukoneogenese (Staufenbiel, 2002; Mykkänen u. Kopela, 1981; Girard, 1997).

In den Vormägen findet bei ausreichender Kobaltversorgung eine hohe mikrobielle Cobalaminsynthese statt. Der Umfang der Synthese liegt bei 1,4 mg/kg verdauter organischer Substanz. Die Resorption erfolgt im Dünndarm, wobei die Nettoverwertung 48% beträgt (Kolb et al., 1999).

Cobalamin ist das einzige wasserlösliche Vitamin, das eine Speicherkapazität in Leber und geringgradig in der Muskulatur besitzt. Überschüssiges Cobalamin und Kobalt wird meist mit dem Kot ausgeschieden (Staufenbiel, 2002; Girard, 1997).

#### **2.3.4.4. Klinische Bedeutung**

Die Synthese von Vitamin B<sub>12</sub> im Pansen wird durch eine ausreichende Versorgung mit Kobalt und Stärke gefördert. Kobaltmangel, hochgradige Schädigung der Vormagenmikroorganismen durch schwerwiegende alimentäre Indigestionen, Intoxikationen oder langandauernder Verweigerung der Futteraufnahme führen zu einem Mangel an Cobalamin (Staufenbiel, 2002; Girard et al., 2001).

Bei Unterschreiten einer bestimmten Kobaltkonzentration im Pansen (0,1 ppm Kobalt/TS im Pansensaft) treten erhebliche qualitative und quantitative Verschiebungen der für die Vormagenverdauung wichtigen Bakterien- und Infusorienarten auf. Hierdurch wird vor allen Dingen der Propionsäurestoffwechsel gehemmt, was zur Inappetenz, Verminderung der Futteraufnahme und allgemeiner Leistungsdepression führt. Neben den Ernährungsstörungen führt ein Kobaltmangel auch zur Anämie, da eine ausreichende Kobaltversorgung Voraussetzung für eine normale Produktion der roten Blutkörperchen im Knochenmark ist (Stöber, 1994).

Eine unzureichende Kobaltversorgung führt erst Wochen bis Monate später zu klinischen Symptomen. Kälber sind empfindlicher als adulte Rinder. Die klinischen Symptome sind schwerer. Die Symptome reichen von schlechtem Ernährungszustand, unbefriedigender Milchleistung, Lecksucht (Aufnehmen von Wurzeln, Erde, Streu, Mist, Jauche), struppigem, rauhem Haarkleid bis zu Verdauungs- und Fruchtbarkeitsstörungen. Bei längerandauerndem Kobaltmangel werden die Tiere lustlos, träge und ermüden leicht bei körperlicher Anstrengung, sie magern schließlich bis zum Skelett ab (Staufenbiel, 2002).

Untersuchungen zur Laktationsdynamik zeigen, dass der Serumcobalamingehalt ante partum signifikant höher ist als post partum. Das heißt, die Körperreserven an Vitamin B<sub>12</sub> werden

bei Milchkühen in der frühen Laktation durch die hohe Milchleistung erschöpft, was zu einer Milchleistungsdepression führen kann (Girard, 1997; Mykkänen u. Korpela, 1981).

### **2.3.4.5. Nachweismethoden**

#### **2.3.4.5.1. Mikrobiologischer Test**

Der mikrobiologische Test basiert auf der Tatsache, dass Mikroorganismen auf die Präsenz von Vitamin B<sub>12</sub> im Medium angewiesen sind. Der Test hat eine große Sensitivität, da die Nachweisgrenze bei  $10^{-15}$  g B<sub>12</sub>/ml liegt. Die Durchführung ist mit diversen Mikroorganismen wie z. B. *Lactobacillus latius*, *E. coli* (Mutante 113-3) oder *Euglena gracillis* möglich (Friedrich, 1988).

#### **2.3.4.5.2. Isotopen-Verdünnungs Test**

Der Isotopen-Verdünnungs-Test ist die am häufigsten angewandte Nachweismethode. Er ist schneller durchzuführen als der mikrobiologische Test und entspricht diesem in der Sensitivität. Kommerzielle Testkits sind erhältlich.

Eine unbekannte Menge von nicht radioaktiv markiertem Cobalamin wird mit einer bekannten Menge radioaktiv markiertem Cobalamin gemischt. Ein Cobalaminbinder wird in so geringen Mengen zugesetzt, dass nicht alles Cobalamin gebunden werden kann. Das freie Cobalamin wird danach entfernt. Nun wird das radioaktiv markierte, gebundene Cobalamin gemessen und mit einer Kontrolle verglichen, die eine definierte Menge nicht radioaktiv markiertes Cobalamin enthält. Die Konzentration der zu bestimmenden Probe wird rechnerisch ermittelt (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

### **2.3.5. Biotin**

#### **2.3.5.1. Chemische Struktur**

Chemisch gesehen ist Biotin cis-Tetrahydro-2-oxothienoimidazolin-4-n-Valeriansäure. Es ist empfindlich gegenüber UV-Licht. Starke Oxidationsmittel sowie starke Säuren und Laugen inaktivieren Biotin. In mäßig sauren oder neutralen Lösungen ist Biotin allerdings mehrere

Monate stabil. In Lösungen mit einem pH >9 ist es instabil. Biotin ist thermostabil und mäßig löslich in Wasser und 95%igem Alkohol (Song et al., 2000).

### 2.3.5.2. Vorkommen

In pflanzlichem Material befindet sich Biotin vor allem in Blättern (Jeroch et al., 1999). Biotinreiche Futtermittel sind Hefen, Zuckerrohrmelasse, (Mager)Milch, Luzerne sowie Oelsaatschrote (Gropp, 1987).

Der Gehalt an Biotin in der Milch liegt bei 20-50 µg/l, der der Kolostralmilch bei 20–80 µg/l sowie im Blut bei >400 ng/l (Rosenberger, 1994). Eine orale Zufütterung von 20 mg/Tier/Tag halten Distl u. Schmid (1994) bei einem Biotinmangel für ausreichend.

### 2.3.5.3. Stoffwechselfunktion

Biotin ist Coenzym von Enzymen, die Carboxylierungsreaktionen katalysieren. Dabei geht die Carboxylgruppe des Biotins mit der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Apoenzyms eine Bindung ein. In der Coenzymfunktion ist Biotin in der Lage, unter Energieaufwand (ATP-Spaltung) eine Carboxylgruppe aufzunehmen (Carboxylbiotin) und auf diese Weise den Übertragungsvorgang zu katalysieren (Tabelle 11).

Biotinabhängige Reaktionen sind bedeutsam bei der Fettsäuresynthese. Der Überführung von Propionat zu Methylmalonat kommt für den Stoffwechsel der Wiederkäuer eine wichtige Funktion zu.

Tab. 11: Bedeutung des Biotins im Stoffwechsel (Jeroch et al., 1999).

<b>Enzyme, die Biotin als Coenzym enthalten:</b>	Acetyl-CoA-Carboxylase	Acetyl-CoA + CO <sub>2</sub> ↔ Malonyl-CoA
	Propionyl-CoA-Carboxylase	Propionyl-CoA + CO <sub>2</sub> ↔ Malonyl-CoA
	Pyruvatcarboxylase	Pyruvat + CO <sub>2</sub> ↔ Oxalacetat

Biotin wird von den Mikroorganismen des Pansens synthetisiert, so dass eine intestinale Versorgung gewährleistet ist (Jeroch et al., 1999). Durch eine höhere orale Biotinzufuhr werden die biotinbildenden Bakterien in den Vormägen gefördert. Biotin wird in den Vormägen offenbar nur in geringem Umfang abgebaut (Kolb et al., 1999).

Die Resorption erfolgt im Dünndarm. Biotin ist im Darmgewebe sowie in Leber und Niere begrenzt speicherfähig.

Die Zunahme des Gehaltes an Biotin im Dünndarm ist auf die Aktivität der Darmflora (Laktobacillen, Streptokokken) zurückzuführen. Dieses enteral gebildete Biotin ist in den Zellen der Bakterien enthalten und wird offenbar nicht resorbierbar, wie die hohe Ausscheidung mit den Fäzes zeigt (Kolb et al., 1999).

#### **2.3.5.4. Klinische Bedeutung**

Ein experimentell erzeugter Biotinmangel führt bei Schweinen zu Haarausfall, Abnahme der Haardichte und Nekrosen im Stratum corneum von Haut, Zunge und Klauen. Die pathologischen Veränderungen, die die Tiere zeigen, sind jedoch individuell unterschiedlich stark ausgebildet. Krustöses, borkiges Horn, das vor allem am Saum- und Kronsegment, zum Teil aber auch am Ballen auftritt, kann als charakteristisches Merkmal von Tieren gesehen werden, die einem Biotinmangel unterliegen (Geyer et al., 1982). Wegen der reichlichen intestinalen Synthese ist ein Biotinmangel relativ selten und der exogene Bedarf ist daher schwierig festzulegen (Gropp, 1987).

Bei neugeborenen Kälbern kann ein experimentell erzeugter Biotinmangel zu Inkoordination, Umfallen, Lähmungen der Nachhand und Festliegen führen (Stöber, 1994). Kolb et al. (1999) stellen bei Kälbern mit Biotinmangel ferner eine Hemmung des Wachstums, Diarrhoen und Haarausfall fest.

Einigkeit herrscht über die Empfehlung einer prophylaktischen Zufütterung von 20mg Biotin/Tier/d bei hochleistenden Milchkühen und Tieren mit schlechter Hornqualität (Lowell et al., 1996; Coelho, 2002; Flachowsky, 1999; Girard, 1997; Hedges et al., 2002).

Der positive Effekt einer Biotinsupplementierung gilt besonders für Klauenerkrankungen, die mit mangelnder Hornqualität assoziiert sind, da Biotin prosthetische Gruppe für die Keratinyase ist (Distl u. Schmid, 1994; Lowell et al., 1998; Fitzgerald et al., 2000; Hedges et al., 2001). In Feldversuchen konnte eine signifikante Senkung des Anteils an lahmen Kühen und eine Senkung des Antibiotikumsatzes innerhalb der Herden bei einer Biotinsupplementierung von über drei Monaten erreicht werden (Fitzgerald et al., 2000; Hedges et al., 2001; Hedges et al., 2002).

Mülling et al. (1999) stellten in einem Fütterungsversuch fest, dass Biotin essentiell für den Metabolismus der Keratinisierung in den Epidermiszellen der Rinderklaue ist.

Ferner zeigen experimentelle Untersuchungen an mehrkalbigen Milchkühen, dass eine orale

Gabe von 20mg Biotin/Tier/d zu einer Steigerung der Milchleistung führt. Biotin hat jedoch keinen Einfluss auf die Milchinhaltsstoffe, Trockensubstanzaufnahme oder das Lebendgewicht der Tiere (Magerison et al., 2002; Zimmerly u. Weiss, 2001). Über die Steigerung der Milchleistung gibt es widersprüchliche Resultate. Zimmerly u. Weiss (2001) wiesen eine Steigerung nach und begründen diese mit der Steigerung der Glukoseproduktion und der besseren Rohfaserverdaulichkeit während der Zufütterung. Fitzgerald et al. (2000) und Girard (1997) negieren eine Steigerung der Milchleistung generell. Eine Biotinzulage von 20 mg/Tier/d führt zu einer signifikanten Zunahme des Biotingehaltes der Milch (Kolb et al., 1999).

### **2.3.5.5. Nachweismethoden**

#### **2.3.5.5.1. Mikrobiologischer Test**

Der mikrobiologische Test ist der kommerziell am häufigsten genutzte Test. Bei diesem werden biotinabhängige Bakterien oder Pilze eingesetzt (z.B. *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Allescheria boydii*, *Streptococcus faecalis*).

Ist Biotin im Untersuchungsmedium gebunden, so wird es zuvor mittels saurer Hydrolyse in freies Biotin überführt (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

#### **2.3.5.5.2. Enzymatischer Test**

Der enzymatische Test benutzt die Apo-Pyruvat-Carboxylase und das Holoenzym der Synthetase von *Saccharomyces cerevisiae*, welche hierfür auf biotinfreiem Medium gezüchtet wird.

Oxalacetat wird durch NADH in säurestabiles [<sup>14</sup>C]Malat reduziert. Nach Ansäuerung des Mediums und Reinigung von [<sup>14</sup>C]Kohlensäureüberschuss kann die Radioaktivität des [<sup>14</sup>C]Malat gemessen werden (Friedrich, 1988).

#### **2.3.5.5.3. Avidin-bindungs Assay**

Zahlreiche Methoden basieren auf der Tatsache, dass Biotin die Bindungskapazität und die Fluoreszenzeigenschaften von Avidin verändert. 4-hydroxyazobenzen-2-carboxyl-Säure hat,

wenn sie an Avidin gebunden ist, ihr Absorptionsmaximum bei 500 nm. Biotin bindet Avidin fester als der Farbstoff. Die Absorption sinkt bei 500 nm, so dass die Menge an zugegebenem Biotin proportional zur Absorptionsdifferenz ist. Auch die Messung im Fluoreszenzbereich ist möglich.

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 ng Biotin (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

#### **2.3.5.5.4. HPLC**

Die Trennung verschiedener Biotinanaloga wird durch Anionen-Austausch-HPLC oder reversed-phase HPLC erreicht (Chastain et al., 1985; Desbene, 1983). Letztere kann mehr Analoga separieren als die anionenaustausch HPLC. Methoden der reversed-phase Chromatographie sind gut für die Analyse von Serum und Urin etabliert (Mock, 1997).

Die Detektion ist sowohl im UV-Bereich (Zempleni et al., 1996; Chastain et al., 1985) als auch im Fluoreszenzbereich (Stein et al., 1992) möglich.

### **2.3.6. Folsäure**

#### **2.3.6.1. Chemische Struktur**

Folsäure besteht aus einem Pteridinrest, p-Aminobenzoesäure und einem Glutaminsäurerest. Es gibt weitere vitaminwirksame Verbindungen, die ähnlich aufgebaut sind und ebenfalls in die Gruppe der Folate gehören. Sie besitzen lediglich mehrere Glutaminsäurereste. Es ist ein mikrokristallines, orangegelbes Pulver (Merck, 1962).

#### **2.3.6.2. Vorkommen**

Folsäure kommt besonders in Bakterien und Pflanzen (folium = das Blatt) vor. Reich an Folsäure sind Hefen, Luzerne und Sojaschrot (Scheunert u. Trautmann, 1987).

#### **2.3.6.3. Stoffwechselfunktion**

Die biologisch aktive Form der Folsäure, die Tetrahydrofolsäure, ist das Coenzym bei C<sub>1</sub>-Übertragungen. Von der Folsäure abhängige Reaktionen sind z.B. die Purinsynthese, der Start

der Proteinsynthese (durch Bereitstellung der Formylgruppe zur Synthese der N-Formyl-Methionin-t-RNA) sowie die Bereitstellung des Kohlenstoffs für die Umwandlung von Glycin zu Serin (Jeroch et al., 1999).

Der Umfang der Folsäuresynthese in den Vormägen ist gering. Die mikrobielle Nettosynthese liegt bei Jungrindern bei 0,42 mg Folsäure/kg verdauter organischer Substanz. Bei einer konzentratereichen Fütterung ist die mikrobielle Synthese von Folsäure größer als bei einer rauhfutterreichen Fütterung (Kolb et al., 1999).

Folsäure wird im Dünndarm (Jejunum) resorbiert. Der Transport im Blutplasma erfolgt mittels Proteinbindung. Der Gehalt im Serum liegt bei 16,7 mg/l (Girard u. Matte, 1998).

#### **2.3.6.4. Klinische Bedeutung**

Bei einem Mangel an Folsäure sind Wachstum und Teilung von Zellen beeinträchtigt. Dies gilt insbesondere für Zellen mit hoher Mitoserate. Auffällige Befunde sind daher die makrozytäre Anämie mit Megaloblasten, Leuko- sowie Thrombozytopenie (Coelho, 2002; Girard, 1997). Schleimhautveränderungen im Bereich des Verdauungskanals können zu Resorptionsstörungen und Durchfällen führen (Gropp, 1987).

Folsäure besitzt eine Laktationsdynamik. Diese zeigt ab dem Zeitpunkt der Kalbung einen kontinuierlichen Anstieg der Serumfolsäurekonzentration, die ihr Maximum zwei Monate post partum erreicht, um dann wieder bis zum nächsten Geburtstermin stetig zu sinken (Girard et al., 1998). Daher ist eine Supplementierung der Folsäure in der letzten Hälfte (14.-28. Woche) der Trächtigkeit sinnvoll. In der frühen Laktation hat eine Folsäuresupplementierung keinen Einfluß auf die Serum- und Milchfolsäurekonzentrationen (Girard et al., 1998).

Folsäure besitzt einen diaplastaren und kolostralen Übertritt, was aber keinen Einfluss auf Hämoglobinkonzentration, Wachstum oder Futteraufnahme des Kalbes hat (Girard et al., 1995; Girard u. Matte, 1999).

Zu keiner Zeit hat eine orale Supplementierung Einfluß auf die ruminalen Konzentrationen von Acetat, Butyrat oder die mikrobielle Proteinsynthese; die Konzentration von Propionat im Pansen ist aber erhöht (Girard, 1997).

Alle Effekte einer Folsäuresupplementierung beziehen sich auf Mehrkalbinnen, was an höherer Milchleistung und Geburtsgewichten des Kalbes zu liegen scheint. Bei Erstkalbinnen konnte kein Effekt einer Supplementierung festgestellt werden (Girard et al., 1995).

### **2.3.6.5. Nachweismethoden**

Der Folsäurenachweis schafft immer noch immense Schwierigkeiten in der quantitativen Analyse. Dies liegt an der hohen Zahl natürlicher Folate (ca. 140), der geringen Konzentration derselben in natürlichen Medien, ihrer Instabilität und dem weit verbreiteten Vorkommen von Enzymen, die die C<sub>1</sub>-Substituenten verändern und damit die Polyglutamylketten verringern.

Um die Zerstörung der Folate durch Luftsauerstoff zu verhindern, wird i.d.R. ein Antioxidans, meist ein Ascorbat, verwendet. Ohne dieses geht die Aktivität der Folate bei Raumtemperatur in 24 Stunden verloren. Mit Zusatz von einem Antioxidans (z.B. 5 g Ascorbat/l) sind sie 4 Tage stabil. Für die Untersuchung von Serum eignet sich Ascorbinsäure gut (Friedrich, 1988).

#### **2.3.6.5.1. Mikrobiologische Methode**

Für den mikrobiologischen Nachweis der Folate werden verschiedene Mikroorganismen (z.B. *L. casei*, *S. faecum* oder *Pediococcus cerevisiae*) verwendet. Deren gemeinsame Eigenschaft ist es, Folsäure nicht synthetisieren zu können und somit auf ihre Zufuhr angewiesen zu sein.

Die Ungenauigkeit eines mikrobiologischen Tests liegt in der Tatsache begründet, dass langkettige C<sub>1</sub>-substituierte oder unsubstituierte Folate gemessen und mit einer Standardkurve berechnet werden, welche für Folate mit definierten C<sub>1</sub>-Substituenten etabliert worden ist. Außerdem sind einige Folate und Mikroorganismen empfindlich gegenüber pH- und Temperaturschwankungen oder bezüglich des Inkubationsmediums.

Für die Analyse von Serum eignet sich *L. casei* am besten (Friedrich, 1988).

#### **2.3.6.5.2. Radioisotopen-Test**

Der Radioisotopentest beruht auf einer kompetitiven Bindung, bei dem ein radioaktives Substrat verwendet wird. Es existiert ein sehr effektives, spezifisches Bindungsprotein für Folate.

Probleme gibt es auch hier beim Folsäurenachweis in Körpergeweben und -flüssigkeiten, da diese meist aus einem Gemisch verschiedener Folsäureanaloga bestehen. Der Idealfall, dass das Folat in diesem Test identisch mit dem radioaktiven Molekül ist oder dieselbe Affinität zum Rezeptor hat, wird auch hier nicht erfüllt.

Dennoch ist der Radioimmunassay (RIA) für den Folsäurenachweis in Plasma, Erythrozyten und Urin gut etabliert. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,1 µg/ml (Friedrich, 1988).

### 2.3.6.5.3. Chromatographische Methode

Auch bei der chromatographischen Analyse der Folate ist es wichtig, die Matrix mit Antioxidantien zu versetzen, um eine quantitative Analyse überhaupt erst zu ermöglichen. Mit der HPLC ist es möglich, die verschiedenen Folate separat quantitativ nachzuweisen. Dies wird meist mit Fluoreszenzdetektion und Ionenaustauschchromatographie gemacht (Friedrich, 1988).

### 2.3.7. Pantothersäure

#### 2.3.7.1. Chemische Struktur

Pantothersäure ist D-N- $\beta$ -Alanin. Sie ist ein hellgelbes, visköses, hygroskopisches Öl. Freie Pantothersäure ist unbeständig. In saurer oder alkoholischer Lösung und durch Hitze wird sie rasch zerstört. In Form ihrer Salze ist sie wesentlich beständiger (Song et al., 2000).

#### 2.3.7.2. Vorkommen

Der Pantothersäuregehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Pantothersäuregehalt einzelner Futtermittel in mg/kg TS (Kamphues et al., 1999).

<b>Hoher Gehalt</b>	Bierhefe	110
	Fischextrakt	95
<b>Mittlerer Gehalt</b>	Erdnusrückstände	50
	Trockenmolke	45
	Dorschlebermehl	45
	Tierlebermehl	45
<b>Mäßiger Gehalt</b>	Magermilch	35
	Erbsen, Kartoffeln	30
	Mühlennachprodukte	20
	Sojaextraktionsschrot	17
	Fischmehl	10
	Getreidekörner	6 - 13

### **2.3.7.3. Stoffwechselfunktion**

Die Pantothersäure ist für den Stoffwechsel von außerordentlicher Bedeutung, da sie Bestandteil des Coenzym A (CoA) ist. Die SH-Gruppe des CoA geht mit den zu aktivierenden Verbindungen eine energiereiche Thioesterbindung ein. Dadurch werden eine Reihe wichtiger Reaktionen, wie Kettenverlängerung bei der Fettsäuresynthese und Oxidationsreaktionen bei der  $\beta$ -Oxidation, ermöglicht.

Die mit dem Futter aufgenommene Pantothersäure wird zum großen Teil von den Mikroorganismen im Vormagen abgebaut. Dort findet aber auch eine umfangreiche Neusynthese statt. Pantothersäure wird im Dünndarm resorbiert (Kolb et al., 1999). Der Blutserumgehalt liegt zwischen 128 – 164 nmol/l (Kolb et al., 1999).

### **2.3.7.4. Klinische Bedeutung**

Ein Pantothersäuremangel kann nur experimentell herbeigeführt werden. Die klinischen Symptome manifestieren sich zum großen Teil im Haut und Schleimhautbereich, in Dermatitis, Depigmentierung oder Veränderung der Schleimhaut (Nelson u. Cox, 2001; Jeroch et al., 1999). Wachstumsstillstand, Ataxien und Lähmungen können ebenfalls auftreten. Diese resultieren aus der Degeneration der Nervenbahnen unter Entmyelinisierung. Bei der Verabreichung einer pantothersäurearmen Diät ist die Immunglobulinbildung gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Antigene beeinträchtigt (Gropp, 1987).

Mangelercheinungen oder Sonderwirkungen bei hohen Pantothersäuregaben sind bei Milchkühen bisher nicht beschrieben (Flachowsky, 1999).

### **2.3.7.5. Nachweismethoden**

Die Auswahl der Analyseverfahren hängt von dem Analysemedium und von der Form ab, in der Pantothersäure in diesem vorliegt. So sind die chemischen Methoden dann anzuraten, wenn Pantothersäure in freier Form vorliegt, wie z.B. in pharmakologischen Präparaten. Hier sind auch die Störungen durch andere Substanzen im Untersuchungsmedium gering. Mikrobiologische Tests oder Immunassays werden für die Analyse von Futtermitteln oder biologischem Material häufig eingesetzt, da diese sehr sensitiv sind und die Nachweisgrenze sehr niedrig ist (Song et al., 2000).

#### **2.3.7.5.1. Mikrobiologischer Test**

In biologischen Material liegt Pantothenensäure meist gebunden, oft als Coenzym A (CoA) vor, daher ist dieser Test nicht immer anwendbar. Gebundene Pantothenensäure muß dann durch Säure oder Base in freie Pantothenensäure überführt werden.

Oft benutzte Mikroorganismen sind *Saccharomyces carlsbergensis*, *Lactobacillus casei* oder *L. plantarum*. Je nach verwendetem Mikroorganismus liegt die Nachweisgrenze zwischen 0,025 – 0,05 µg Pantothenensäure/ml (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

#### **2.3.7.5.2. Enzymatischer Test**

Die spezifische bakterielle Amidase Pantothenase spaltet Pantothenensäure reversibel in  $\beta$ -Alanin und Pantothenyl-Enzym. Diese Reaktion ist Grundlage des enzymatischen Testes. [ $^{14}\text{C}$ ] $\beta$ -Alanin verbindet sich mit Pantothenensäure, und die Radioaktivität dieses Moleküls ist messbar (Friedrich, 1988).

#### **2.3.7.5.3. Radioimmunasay**

Der RIA ist eine einfache, sensitive Methode zum Pantothenensäurenachweis bis zu einer Grenze von 0,05 µg/ml. Kommerzielle Testkits für Blut, Urin und Gewebe sind erhältlich (Friedrich, 1988).

Die quantitative Analyse von freier Pantothenensäure basiert auf der kompetitiven Bindung zwischen Antikörper und einer definierten Menge an radioaktiv markierten Antigenen sowie einer unbekannt Menge nicht radioaktiv markierter Antigene (Song et al., 2000).

#### **2.3.7.5.4. Chromatographische Methoden**

Für den Pantothenensäurenachweis in Lösungen mit hoher Konzentration sind HPLC-Methoden etabliert, die meist auf der Ionenaustauschchromatographie beruhen (Friedrich, 1988).

Mit der Gaschromatographie ist der Nachweis der Ethylester der Pantothenensäure oder des Pantothenolacetates möglich (Tesmer et al., 1980).

Fluorimetrisch (Panalaks u. Campbell, 1962) oder spektrophotometrisch ((Roy u. Buccafuri, 1978) ist der Nachweis von CoA aus tierischem Gewebe möglich.

### 2.3.8. Niacin (Nicotinsäure)

#### 2.3.8.1. Chemische Struktur

Niacin ist die allgemeine Bezeichnung für alle Pyridin-3-carboxylsäure-Formen, die die gleiche biologische Aktivität wie Nicotinsäure besitzen. Die beiden bedeutendsten Niacine sind Nicotinsäure und Nicotinsäureamid. Nicotinsäure ist ein weißes, kristallines Pulver, das fast keinen Geruch und einen bitteren Geschmack besitzt (Song et al., 2000).

#### 2.3.8.2. Vorkommen

Der Nicotinsäuregehalt einzelner Futtermittel ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Nicotinsäuregehalt einzelner Futtermittel in mg/kg TS (Kamphues et al., 1999).

<b>Hoher Gehalt</b>	Reisfuttermehl	600
	Futterhefe	500
	Fischextrakt	300
	Tierlebermehl	200
	Grünfutter	80 – 200
	Roggen- und Weizenkleie	190 – 200
	Erdnussrückstände	190
<b>Mittlerer Gehalt</b>	Fischmehl	65
	Kartoffeln	60
<b>Mäßiger Gehalt</b>	Sojaextraktionsschrot	30
	Getreidekörner	10 - 60

#### 2.3.8.3. Stoffwechselfunktion

Nicotinsäure und Nicotinsäureamid besitzen Vitaminfunktion, da Nicotinsäure im Organismus in seine Amidform überführt werden kann. Niacin wird entweder aus dem Darm resorbiert oder im Intermediärstoffwechsel aus Tryptophan gebildet. Daher begünstigen tryptophanarme Futtermittel einen Niacinmangel (Gropp, 1987).

Eine orale Substitution ist mit Nicotinsäure und Nicotinsäureamid möglich, da

Nicotinsäureamid von den Mikroorganismen des Pansens in Nicotinsäure umgewandelt wird (Campbell et al., 1994). Andere experimentelle Arbeiten belegen jedoch, daß einer Nicotinsäureamidsupplementierung der Vorzug gegeben werden sollte, da im Vergleich zu einer Nicotinsäuresupplementierung höhere Milchleistung und Blutglukosekonzentrationen sowie ein niedrigerer Spiegel der freien Fettsäuren im Blut vorhanden ist (Jaster u. Ward, 1990).

Nicotinsäureamid ist Bestandteil der Coenzyme Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>). Sie sind Redoxsysteme und wirken als Elektronenüberträger in Reaktionen der Glykolyse, des Citronensäurezyklus, der Atmungskette und bei Syntheseprozessen (Nelson u. Cox, 2001; Jeroch et al., 1999).

Experimentell wurden schon bei 2 – 14 Wochen alten Kälbern Nicotinsäurekonzentrationen gemessen, die diejenigen der Futtermittel, mit denen sie gefüttert wurden, überstiegen. Es lagen jedoch große individuelle Schwankungen vor. Daraus wurde geschlossen, dass es weder einen Zusammenhang zwischen Vitamin-B-Status des Tieres oder dem Körpergewicht und der Nicotinsäureaufnahme und Konzentration im Pansen gibt (Keßler u. Knodt, 1951).

Nicotinsäure wird durchschnittlich zu 79% im Dünndarm resorbiert (Kolb et al., 1999). Der Blutserumgehalt liegt bei 1,3 – 2,6 µg/l (Cervantes et al., 1996).

#### **2.3.8.4. Klinische Bedeutung**

Die klinischen Veränderungen bei einem Mangel an Niacin sind eher unspezifisch, wie beispielsweise Hautveränderungen, rauhes Haarkleid, Freßunlust, Durchfall und allgemeine Schwäche (Stöber, 1994). Ferner kann es zu Entzündung des Verdauungstrakts, Störung des ZNS, Gewichtsverlust, Anämie und Exsikkose kommen (Gropp, 1987).

Die negative Energiebalance in der frühen Laktation führt bei hochleistenden Milchkühen oftmals zu einer meist subklinischen Ketose. Die hierbei einsetzende Lipolyse im Fettgewebe bedingt eine verstärkte Ketogenese im Lebergewebe. Dies äußert sich im Absinken der Blutglukosekonzentration sowie einem Anstieg der Ketonkörper und der  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (Flachowsky, 1996).

Die orale Gabe von Niacin führt experimentell zu höheren Milchleistungen, was auf einer Senkung der Ketoseinzidenz beruht, zu erhöhten Blutglukosekonzentrationen sowie zu einem Absinken der  $\beta$ -Hydroxybuttersäure und der freien Fettsäuren im Blut (Cervantes et al., 1996; Dufva et al., 1983; Zimmermann et al., 1992; Saleh et al., 2002). Niacin wird somit ein

antiketo- und antilipolytischer Effekt zugeschrieben, da es bei einer oralen Supplementation von Niacin zu einer verstärkten Glukosemobilisierung und einer Verminderung der Buttersäurekonzentration kommt. Ebenso kommt es zu einer verstärkten Synthese von Propionsäure im Pansen, da die Zahl der Protozoen und die mikrobielle Proteinsynthese steigt (Flachowsky, 1996; Zimmermann et al., 1992; Kolb et al., 1999). Dies ist auch eine mögliche Erklärung für eine absolute und prozentuale Erhöhung des Milchproteins unter Niacingabe (Horner et al., 1988; Ridaell, 1980; Cervantes et al., 1996; Girard, 1997; Erickson et al., 1992). Ein Fütterungsversuch, bei welchem die Ration 0,03% Niacin und 15 % Baumwollsaamen enthielt, bestätigt dies ebenfalls. Denn trotz des hohen Fettgehaltes in der Ration der Milchkühe, vermag Niacin den Rückgang des Milchproteingehaltes abzufangen (Horner et al., 1986). Belibasaki u. Tsigogianni (1996) konnten in ihrem Fütterungsversuch an 20 Frisian Kühen keinen bezug zur Milchleistung, Milchproteingehalt und Glukosekonzentration im Blut unter Niacinsupplementation herstellen. Sie stellen jedoch einen erhöhten Milchfettgehalt und einen erniedrigten Harnstoffgehalt im Serum fest. Eine orale Gabe von 6-12g Niacin/Tier/d wird daher hinsichtlich einer Ketoseprophylaxe von vielen Autoren präferiert (Girard, 1997; Coomer, 1998; Flachowsky, 1999; Saleh, 2002; Zimmermann et al., 1992; Dufva et al., 1983). Auch bei schon an Ketose erkrankten Milchkühen führt die Gabe von 12g Niacin/Tier/d experimentell nach 5-9 d zur Rückkehr der freien Fettsäuren,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure und Blutglukosekonzentration zu den Normwerten (Fronk u. Schulz, 1979).

### **2.3.8.5. Nachweismethoden**

#### **2.3.8.5.1. Photometrische Methode**

Nicotinsäure, Nicotinsäureamid, NAD(P) und NAD(P)H besitzen ein ähnliches Absorptionsmaximum bei 261 nm. Die Trennung der Substanzen ist aber über den pH-Wert der Lösung möglich. Daher basiert der Nachweis von Nicotinsäure gewöhnlich auf der sogenannten König-Reaktion. Hierbei wird der Pyridinring der Nicotinsäure geöffnet und an CNBr gekoppelt. Anschließend reagiert er mit einem aromatischen Amin zu einem gelben Farbkomplex (Polyen).

Nicotinamid muss vor Eintritt in diese Reaktion enzymatisch oder durch saure oder basische Hydrolyse desaminiert werden.

Nicotinsäure kann dann colorimetrisch, entweder manuell oder semiautomatisch, oder aber

mikrobiologisch nachgewiesen werden. Ferner besteht die Möglichkeit einer Titration mit Perchlorsäure (Friedrich, 1988; Song et al., 2000).

#### **2.3.8.5.2. HPLC**

Mit Hilfe der HPLC ist es möglich, bis zu acht verschiedene Niacine zu trennen und quantitativ zu bestimmen (Song et al., 2000).

Die am häufigsten verwendete HPLC-Methode basiert auf einer reversed-phase Säule und Ionen-Paar-Reagenz, als einem Teil der mobilen Phase (Valverde u. Reche, 1991). Da Niacin ein polares Molekül ist, hat die reversed-phase Chromatographie im Vergleich zur normal-phase Chromatographie den Vorteil, dass die Analysezeit deutlich verkürzt werden kann. Diese liegt dann bei < 10 Minuten. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,11µg Niacin/ml Untersuchungsmedium (Song et al., 2000). Ist die Untersuchungsmatrix Plasma, so muß dieses vor der Analyse entproteinisiert werden, was mit Methanol möglich ist (Stratfort u. Dennis, 1992).

Die Fluoreszenzdetektion erweist sich auch bei den Niacinen als die am geeignetste Methode (Hirayama et al., 1985; Shibata, 1987). Eine Nachsäulenderivatisierung, die für Nicotinsäure und Nicotinamid auf der König Reaktion basiert, erhöht die Sensitivität der Methode und mindert die Zahl der Störpeaks durch andere in der Matrix enthaltene Substanzen (Stein et al., 1995).

#### **2.3.8.5.3. Enzymatische Methode**

Bei der enzymatischen Methode macht man sich die Stereospezifität des Wasserstofftransfers am Nicotinamidring zunutze, an welchem die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen angreifen. Mit der Massenspektroskopie gelingt dann der Nachweis von Mengen im µg-Bereich (Friedrich, 1988).

#### **2.3.8.5.4. Mikrobiologischer Test**

Die Funktionsweise dieses Testes beruht auf der Tatsache, dass sich Mikroorganismen ohne die Anwesenheit eines bestimmten Vitamins nicht vermehren oder wachsen können (Song et al., 2000).

Der Protozoe *Tetrahymena pyriformis* oder *Lactobacillus plantarium* wird für die

Bestimmung von Nicotinsäure und –amid eingesetzt. Andere Mikroorganismen, die spezifisch Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid, auch in Kombination, nachweisen, sind als radiometrisch-mikrobiologischer Test für die Analyse von Futtermitteln und Blut etabliert (Friedrich, 1988).