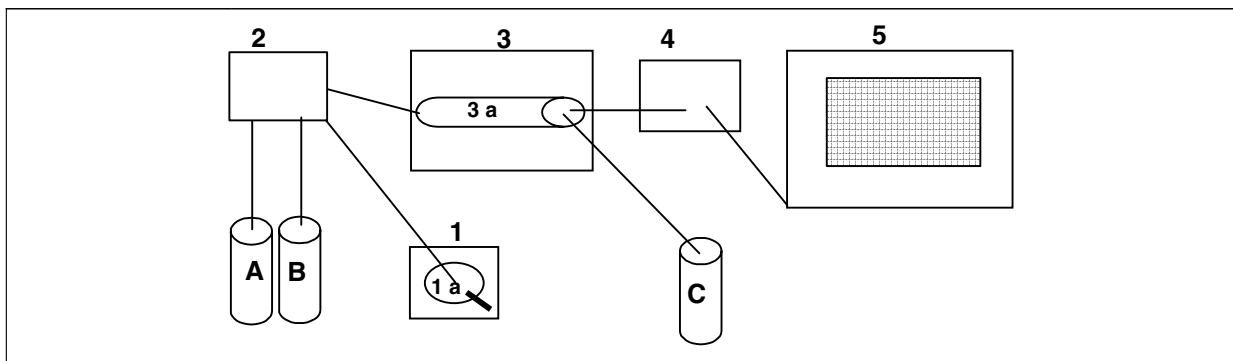


3. Material und Methodik

3.1.1. Vitaminbestimmung mittels HPLC

Zur Etablierung einer HPLC-Methode zur quantitativen Analyse der Vitamine B₁, B₁₂ und Folsäure aus entproteinisiertem Serum stand ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph (HPLC) der Fa. Knauer zur Verfügung.

Gerät	Dr. Ing. H. Knauer GmbH, Scientific Instruments, 14163 Berlin
Detektor	UV, K-2501
Säule	Spherimage-80, ODS2, QE 125
Eluent A	Methanol
Eluent B	Ionen-Paar-Reagenz: Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz
Software	ChromGate, Chromatography Data Systems



1	Einfüllstutzen
A und B	Eluenten
2	Mischbox
3 und 3a	Säule
C	Auffanggefäß für Chemikalien
4	UV-Detektor
5	Computerbildschirm mit Darstellung des Chromatogramms

3.1.2. Probenentnahme und –aufbereitung zur HPLC-Analytik

Alle untersuchten Blutproben stammen von klinisch gesunden Milchkühen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena coccygia media. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen aufgefangen und bei 14000U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und bis zur Analyse im Kühlschrank bei +5 bis +7°C gelagert. Das Serum wurde vor der Analyse entproteinisiert. Hierfür ist 500 µl Serum mit 100 µl 30%iger Trichloressigsäure (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 822342) resp. 500 µl Serum mit 500 µl 10%iger Trichloressigsäure versetzt und durch Schütteln gründlich vermischt worden. Das Gemisch wurde erneut bei 14000U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand konnte dann via Injektionsspritze (10 µl) in die HPLC-Anlage injiziert werden.

3.1.3. Aufkonzentrierung der Vitamine im Serum

Jeweils zwei Milliliter Vitaminstandard (Konzentration je 33 mg/l Vitamin B₁, B₁₂ und Folsäure) und zwei Milliliter Serum wurden im Vakuumverdampfer und im Rotationsverdampfer vollständig verdampft. Der Bodensatz wurde mit 100 oder 200 µl A.dest. aufgenommen, was rein rechnerisch zu einer 20- oder 10-fachen Aufkonzentrierung der Vitamine führt.

Zwei Milliliter Vitaminstandard (Konzentration je 33 mg/l Vitamin B₁, B₁₂ und Folsäure) wurden mit Stickstoff eingengt. Anschließend wurde der Bodensatz mit 200 resp. 100 µl A.dest. aufgenommen (10- bzw. 20-fache Aufkonzentrierung).

Um die Wiederfindung der Vitamine bei der Festphasenextraktion in den einzelnen Arbeitsschritten zu gewährleisten, wurden alle drei Phasen (Probenaufgabe, Wasch- und Elutionsschritt) mittels HPLC analysiert. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden jeweils zwei entproteinisierte Serumproben, zwei gespikete (Serum versetzt mit Vitaminstandard je 33 mg/l B₁, B₁₂ und Folsäure), entproteinisierte Serumproben und zwei Standards (Konzentration 33 mg/l) parallel untersucht. Alle getesteten Kartuschen wurden nach den Angaben des entsprechenden Herstellers verwendet.

3.1.4. Auswertung der Chromatogramme

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde unter zu Hilfenahme des Computerprogrammes Chromgate (Chromatography Data Systems, Fa. Dr. Knauer GmbH, Berlin) vorgenommen. Für die Etablierung der HPLC-Methode ist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend (Abb. 1). Diese wurde für jede der drei Standardvitaminlösungen (Konzentration jeweils 100 mg/l) vorgenommen. Die Vitaminkonzentration im Serum konnte dann rechnerisch ermittelt werden.

$$\text{Konz. Probe (mg/l)} = \frac{\text{Peakfläche Probe} * \text{Konz. Kalibrator (mg/l)}}{\text{Peakfläche Kalibrator}}$$

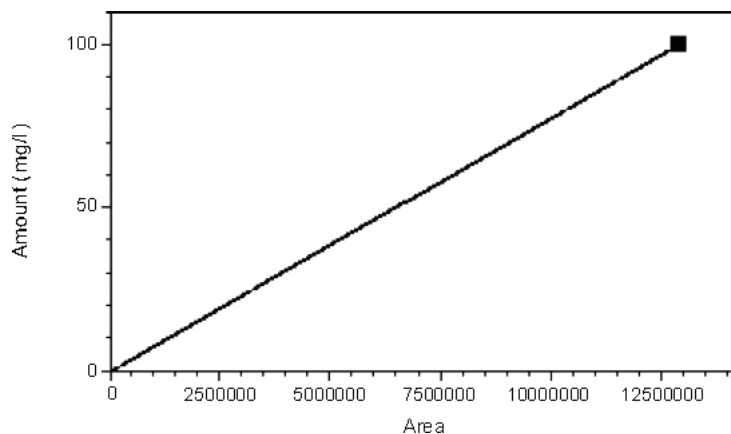


Abb. 1: Eichkurve Folsäure (100 mg/l).

Die Etablierung der HPLC-Methode basierte auf der Grundlage der Validierung von Analyseverfahren (Herbold u. Schmitt, 2000).

3.2.1. Bestandserhebungen

In einer Feldstudie wurde der Nutzen und die Aussagekraft einer Bestimmung der Vitamine des B-Komplex geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Bestandsbetreuung durch die tierärztliche Ambulanz der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin und wurden in Betrieben unterschiedlicher Regionen Mecklenburg-Vorpommerns, Brandenburgs und Sachsen-Anhalts

durchgeführt. Die Betriebe wurden im Rahmen dieser Arbeit ein- bis dreimal besucht. Die Betriebsgrößen variierten von 150 bis 3500 Kühen pro Bestand. Bei den untersuchten Rindern handelte es sich um Tiere der Rasse „Deutsche Schwarzbunte“.

Bei jedem Bestandsbesuch wurde eine Herdenanamnese erhoben und in der Form eines Fragebogens festgehalten. Hierbei wurden besonders Haltungs-, Fütterungs- und Erkrankungsprobleme notiert.

Für die Untersuchungen wurden nur Tiere herangezogen, die keine äußeren Anzeichen einer klinischen Erkrankung aufwiesen und somit den Herdendurchschnitt repräsentierten. Alle für die Untersuchung in Frage kommenden Tiere wurden in Abhängigkeit von den Laktationstagen folgenden Gruppen zugeordnet:

Gruppe 1	Kühe 3 bis 1 Woche ante partum
Gruppe 2	Kühe 0 bis 1 Woche post partum
Gruppe 3	Kühe 3 bis 5 Wochen post partum
Gruppe 4	Kühe 15 bis 18 Wochen post partum
Gruppe 5	Kühe 8 bis 3 Wochen ante partum

Der Stichprobenumfang wurde in Anlehnung an Seidl u. Ehrentraut (1975), Rossow et al. (1976a) und Scholz (1988) mit zehn Tieren pro Untersuchungsgruppe festgelegt. Da in kleineren Betrieben nicht immer zehn Tiere pro Untersuchungsgruppe zur Verfügung standen, hat die Einhaltung der Zeiträume Vorrang gegenüber der Stichprobenzahl (Lehwenich, 1999). Nach Lehwenich (1999) beinhaltet der Poolwert, der sich aus zehn Einzelproben zusammensetzt, die gleichen Informationen wie der Mittelwert. Daher bilden o.g. Arbeiten die Grundlage dieser Untersuchung.

3.2.2. Entnahme und Aufbereitung der Bestandsproben

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena coccygia media. Zum Auffangen des Blutes dienten 10-ml-Serumröhrchen ohne Antikoagulantien (Fa. Sarstedt) und 5-ml-EDTA-Röhrchen (Fa. Sarstedt). Alle Proben wurden ca. 4–6 Stunden nach der Gewinnung im Labor der Klinik für Klautiere der Freien Universität Berlin aufbereitet. Zur Serumgewinnung wurden die Proben 15 Minuten bei 4000U/min abzentrifugiert. Jeweils 1ml Serum von den zehn zu einer Gruppe gehörenden Einzelproben wurde in ein Sammelröhrchen pipettiert und gemischt. Das entstandene Mischserum ergibt die Poolprobe. Die EDTA-Einzelblutproben

wurden analog der Serumproben ebenfalls gepoolt. Alle Poolproben wurden dem Veterinärmedizinischen Labor des Instituts für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH per Kurier zugesandt.

3.2.3. Analyse der Bestandsproben

Die routinemäßige Bestimmung der Vitamine Folsäure, Biotin, B₁₂ und B₁ erfolgte im Veterinärmedizinischen Labor des Instituts für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH.

Folsäure und Vitamin B₁₂ sind mittels Radioimmunassay (RIA) (Girard et al., 1989, Girard et al., 2002; Girard u. Matte, 1999) und Biotin mittels Enzym-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) (Midla et al., 1998) aus Serum bestimmt worden. Das Grundprinzip des RIA besteht in der Konkurrenz zwischen radioaktiv markiertem Vitamin hinsichtlich der spezifischen Bindung an einen Antikörper. Der ELISA ist ein Enzym-Immuntest, bei welchem immuno- und enzymologische Verfahren kombiniert werden.

Thiamin und seine Derivate wurden aus Vollblut mittels HPLC analysiert. Hierbei wurde das Thiamin mittels Vorsäulenderivatisierung 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.

3.2.4. Statistische Methoden

Die Erfassung und Auswertung der erzielten Werte erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.0. Die Auswertung umfasste die Betrachtung der Poolwerte und das Verhalten der Poolwerte in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Für die graphische Darstellung der Poolwerte wurden Box-and-Whisker-Plots erstellt. Die Box wird vom ersten und dritten Quartil begrenzt und umfasst so 50% der Werte. Die innere Linie repräsentiert den Median. Die Whiskers erstrecken sich bis zum kleinsten und größten Wert, sofern sie keine Ausreißer sind. Ausreißer sind Werte, die um mehr als anderthalb Boxenlängen außerhalb liegen. Sie werden mit einem Kreis markiert. Werte, die um mehr als drei Boxenlängen außerhalb liegen, werden als Extremwerte bezeichnet und mit einem Stern gekennzeichnet.

In den dazugehörenden Tabellen (Tab. 27-32; Abb. 12, 18, 24, 30, 35 und 41) ist für jedes der untersuchten Vitamine nach Laktationsgruppen getrennt der Mittelwert der Poolwerte (\bar{x}), der Median, Minimum und Maximum, die Standardabweichung (s), das 5%-95% Perzentil und das 16%-84% Perzentil für die entsprechenden Gruppenwerte aufgeführt.

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde für die Poolwerte jedes Vitamins getestet, ob eine Normalverteilung innerhalb der einzelnen Laktationsgruppen vorausgesetzt werden kann (Tab.14). Das Signifikanzniveau ist auf 0,05 festgelegt worden. Ist das Ergebnis des K-S-Anpassungstests $<0,05$, so ist die Entscheidung gegen eine Normalverteilung des entsprechenden Vitamins getroffen worden. Ist ein Parameter in nur einer Laktationsgruppe $<0,05$ (z.B. Vitamin B₁ im Vollblut), so gilt der Parameter als nicht normalverteilt.

Tab. 14: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests.

	B ₁ /Vollblut	B ₁ /Serum	B ₁₂ /Serum	B ₁₂ /Milch	FS/Serum	Biotin/Serum
Gruppe 1	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
Gruppe 2	0,051	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
Gruppe 3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gruppe 4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gruppe 5	0,026	0,003	0,0	-	0,0	0,001

Bei den fünf untersuchten Zeiträumen sind 10 (im Falle von Vitamin B₁₂ in der Milch 6) Gruppenkombinationen möglich, zwischen denen signifikante Unterschiede bestehen können. Daher schloss sich der Kruskal-Wallis-Test an (Tab. 15).

Tab. 15: Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests.

Vitamin	B ₁ /Vollblut	B ₁ /Serum	B ₁₂ /Serum	B ₁₂ /Milch	Folsäure	Biotin
Asympt.Sign.	0,792	0,769	0,0	0,0	0,0	0,0

Bei signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Laktationsgruppen ($p < 0,05$) wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei diesem paarweisen Gruppenvergleich wurde ermittelt, welche Laktationsgruppen sich signifikant unterschieden (Tab. 16). Als Signifikanzniveau wurde $0,05/\text{Anzahl der Laktationsgruppen}$ festgelegt.

Tab. 16: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests.

Gruppen	B₁₂/Milch	B₁₂/Serum	Folsäure	Biotin
1/2	0,918	0,619	0,178	0,078
1/3	0,155	0,0	0,0	0,871
1/4	0,237	0,0	0,0	0,0
1/5	-	0,815	0,779	0,007
2/3	0,0	0,005	0,014	0,063
2/4	0,0	0,0	0,001	0,042
2/5	-	0,542	0,291	0,168
3/4	0,069	0,001	0,021	0,0
3/5	-	0,008	0,0	0,003
4/5	-	0,0	0,0	0,578
Signif-Niveau	0,0125	0,01	0,01	0,01