

4. Ergebnisse

4.1. Methodische Untersuchungen

4.1.1. Auswahl der Säule

Vorversuche mit der reversed-phase Säule Spherimage-80, ODS2, PC60 ergaben ein Retentionszeitfenster (Abbildung 2) von bis zu 40% für externen Thiaminstandard.

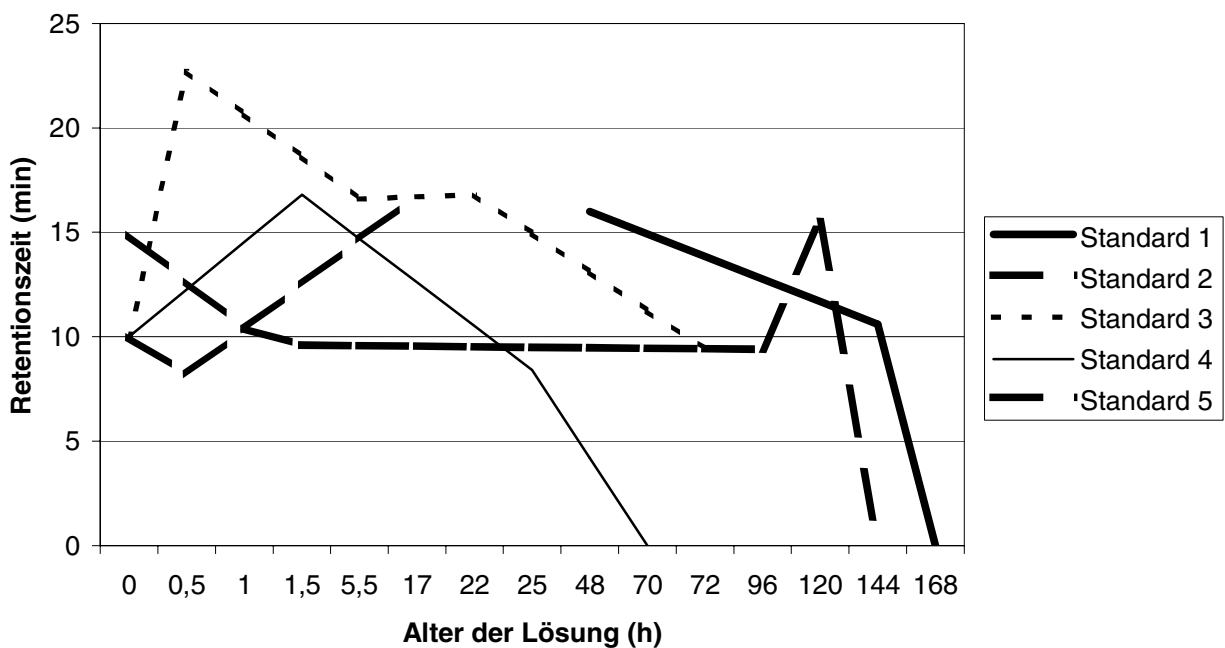


Abb.2: Vitamin B₁ Messung mit Spherimage-80, ODS2, PC60.

Bei der Messung mit der Spherimage-80, ODS2, QE 125 lagen die Ergebnisse für die Standardlösungen der Vitamine B₁ (Fa. Sigma, Steinheim, Art.-Nr.: T-4625), B₁₂ (Fa. Sigma, Steinheim, Art.-Nr.: V-2876) und Folsäure (Fa. Sigma, Steinheim, Art.-Nr.: F-7876) innerhalb des Retentionszeitfensters von maximal 2-3% (Abbildungen 3-5).

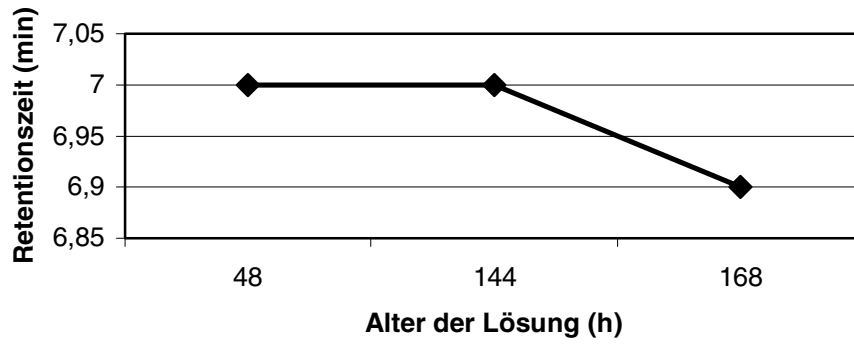


Abb.3: Vitamin B₁₂ Messung mit Sperimage-80, ODS2, QE 125.

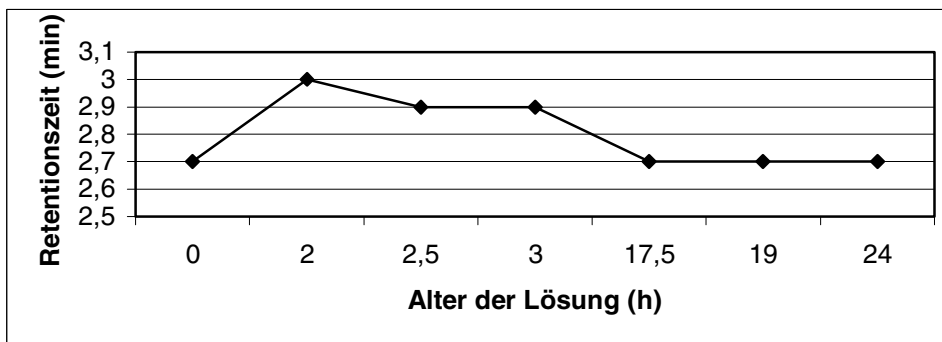


Abb. 4: Vitamin B₁ Messung mit Sperimage-80, ODS2, QE 125.

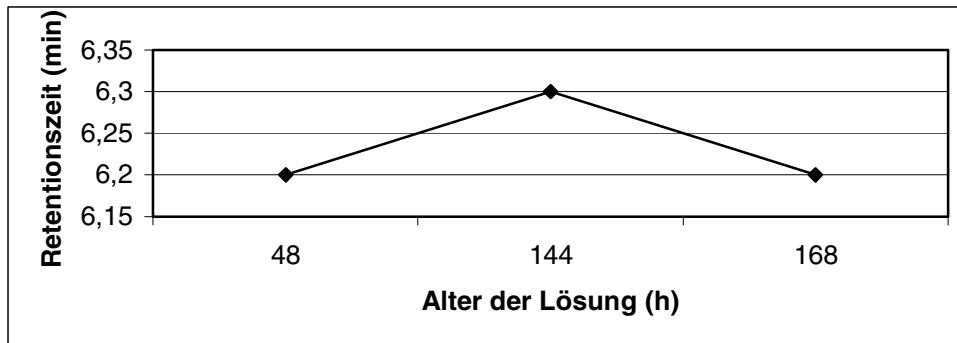


Abb. 5: Folsäuremessung mit Sperimage-80, ODS2, QE 125.

Alle weiteren Versuche basieren auf der Verwendung der Sperimage-80, ODS2, QE 125-Säule.

4.1.2. Versuche zur mobilen Phase

Die Analyse der Vitamine B₁, B₁₂ und Folsäure wurde mit Methanol (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 106009) und Dodecan-1-sulfonsäure-Natriumsalz (LiChropur[®], Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 118308; c=0,5 mmol) als Eluenten durchgeführt.

Versuche, bei welchen Standardgemische aus den Vitaminen B₁, B₁₂ und Folsäure (je 33 mg/l) in Gradientenläufen (Tabellen 17 u. 18) analysiert wurden, ergaben eine schlechte Trennung der Substanzen. Dies betraf besonders Folsäure und Vitamin B₁₂, da die Peaks kaum voneinander differenzierbar waren.

Tab. 17: 1. Versuchsreihe: Gradientenlauf zur Optimierung der Vitamintrennung (Flussrate: 1ml/min).

Zeit (min)	Eluent A Methanol (%)	Eluent B Ionen-Paar-Reagenz (%)
0	5	95
1	5	95
35	95	5
40	95	5
45	5	95

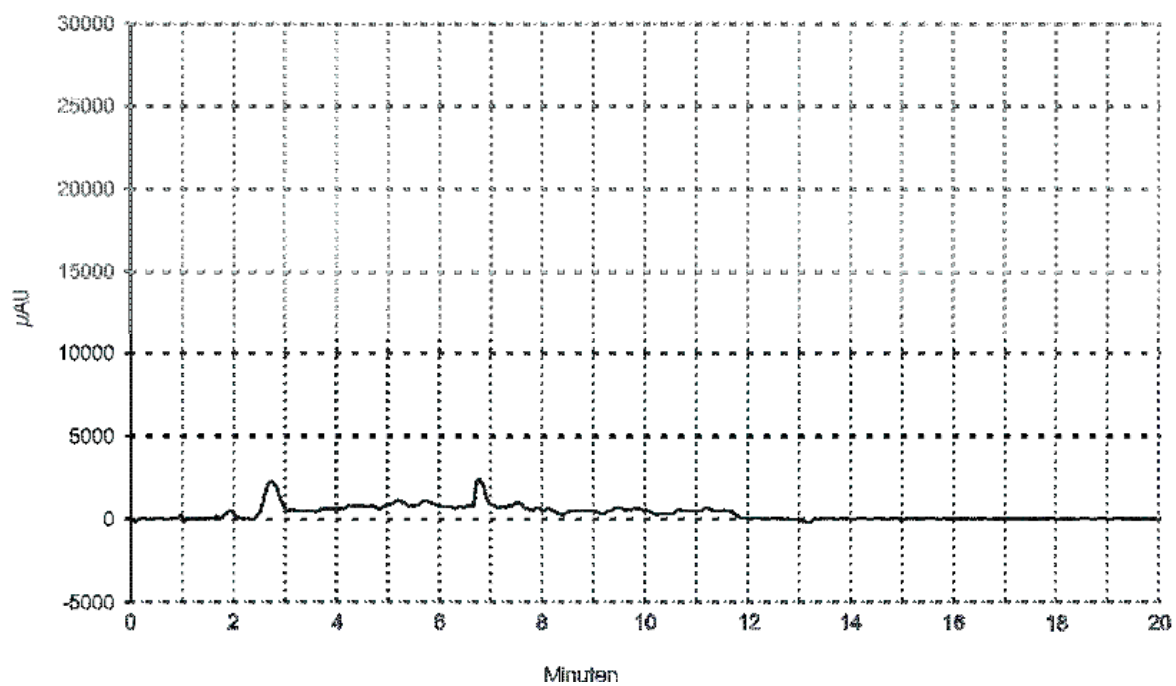
Tab. 18: 2. Versuchsreihe: Gradientenlauf zur Optimierung der Vitamintrennung (Flussrate: 1ml/min).

Zeit (min)	Eluent A Methanol (%)	Eluent B Ionen-Paar-Reagenz (%)
0	5	95
1	20	80
25	95	5
30	95	5
35	5	95

Eine optimale Trennung der einzelnen Vitamine (Abb. 6) konnte mit der Einstellung, wie sie in Tabelle 19 wiedergegeben ist, erreicht werden. Diese bildete die Grundlage für weitere Versuche.

Tab. 19: 3. Versuchsreihe: isokratische Messung (Flussrate: 1,5ml/min).

Zeit (min)	Eluent A Methanol (%)	Eluent B Ionen-Paar-Reagenz (%)
0	25	75
3	25	75
4	70	20
10	70	20
11	25	75
20	25	75

Abb. 6: Chromatogramm der Vitamine B₁ (Ret-Zt.: 6,7min), B₁₂ (Ret-Zt.: 2,8min) und Folsäure (Ret-Zt.: 2,0min) (Konz. je 33mg/l).

4.1.3. Detektion

Mit dem UV-Detektor (K-2501, Fa. Dr. Knauer, Berlin) betrug die untere Nachweisgrenze (Peak mit der dreifachen Höhe des größten Rauschpeaks) für Folsäure 100 mg/l und für Vitamin B₁ und B₁₂ jeweils 20 mg/l.

4.1.2. Standard

4.1.2.1. Haltbarkeit und Empfindlichkeit

Die Haltbarkeit der einzelnen Vitaminstandards bei unterschiedlichen Temperaturen sind den Tabellen 20-22 zu entnehmen.

Folsäure zeigte in A.dest. bei 5-7°C (Tab. 20) nach 18 Stunden einen Konzentrationsverlust von 0,5%. Nach weiteren 4 Stunden war die Folsäurekonzentration um 16% im Vergleich zur Ausgangskonzentration gesunken. Auch Vitamin B₁ zeigte nach 18 Stunden unter gleichen Bedingungen einen Konzentrationsverlust von 4% und nach 22 Stunden um 15,5%. Bei Vitamin B₁₂ fand innerhalb von 22 Stunden ein Konzentrationsverlust von 8,5% statt.

Tab. 20: Versuch zur Haltbarkeit der Standardlösung in A. dest. bei +5 bis +7°C.

Haltbarkeit (h)	Folsäure (mg/l)	Vitamin B ₁ (mg/l)	Vitamin B ₁₂ (mg/l)
0	20	20	20
18	19,9	19,2	20
22	16,7	16,9	18,3

Wurden die Standardlösungen in Methanol angesetzt und bei -20°C aufbewahrt, so zeigte Folsäure nach 96 Stunden einen Konzentrationsverlust von 1,2% und nach 120 Stunden von 70,1%. Auch Vitamin B₁₂ zeigte bei dieser Lagerung Konzentrationsverluste. Nach 96 Stunden sank die Vitamin B₁₂ Konzentration um 9,4% und nach 120 Stunden um 77,9%. Die Vitamin B₁ Konzentration sank innerhalb von 120 Stunden nicht ab (Tab. 21).

Tab. 21: Versuch zur Haltbarkeit der Standardlösung in Methanol bei -20°C.

Haltbarkeit (h)	Folsäure (mg/l)	Vitamin B ₁ (mg/l)	Vitamin B ₁₂ (mg/l)
0	33	33	33
1	33	33	33
1,5	33	33	33
96	32,6	33	29,9
120	9,6	33	7,3

Die Folsäure-, Vitamin B₁- und B₁₂-Konzentrationen sanken im Versuch zur Haltbarkeit des Standards in A.dest. (Tab20) kontinuierlich mit der Zeit der Lagerung ab. Im Parallelversuch (Tab 22) zeigte sich, dass diese Ergebnisse nicht reproduzierbar waren.

Die Vitamin B₁-Konzentration blieb über 22 Stunden gleich. Die Folsäurekonzentration sank nach 3 Stunden von 33 mg/l auf 31,8 mg/l ab. Die Vitamin B₁₂-Konzentration von 33 mg/l auf 31,9 mg/l. Nach weiteren 2,5 Stunden wurden wieder die Ausgangskonzentrationen von 33 mg/l gemessen.

Der Parallelversuch zeigte auch, dass die Konzentrationen an Folsäure und Vitamin B₁₂ langsamer sanken als im 1. Versuch (Tab 20).

Tab. 22: Versuch zur Haltbarkeit der Standardlösung in A. dest. bei +5 bis +7°C.

Haltbarkeit (h)	Folsäure (mg/l)	Vitamin B ₁ (mg/l)	Vitamin B ₁₂ (mg/l)
0	33	33	33
3	31,8	33	31,9
5,5	33	33	33
22	28	33	31,8

4.1.2.2. Nachweisgrenzen

Die unteren Nachweisgrenzen liegen für Vitamin B₁ (Abbildung 7) und B₁₂ (Abbildung 8) bei je 20 mg/l und für Folsäure bei 100 mg/l (Abbildung 9). Um die physiologischen Konzentrationen im Serum messen zu können, muss für Folsäure eine Aufkonzentrierung um 10⁴, für Vitamin B₁ um 10³ und für Vitamin B₁₂ um 10⁵ erfolgen.

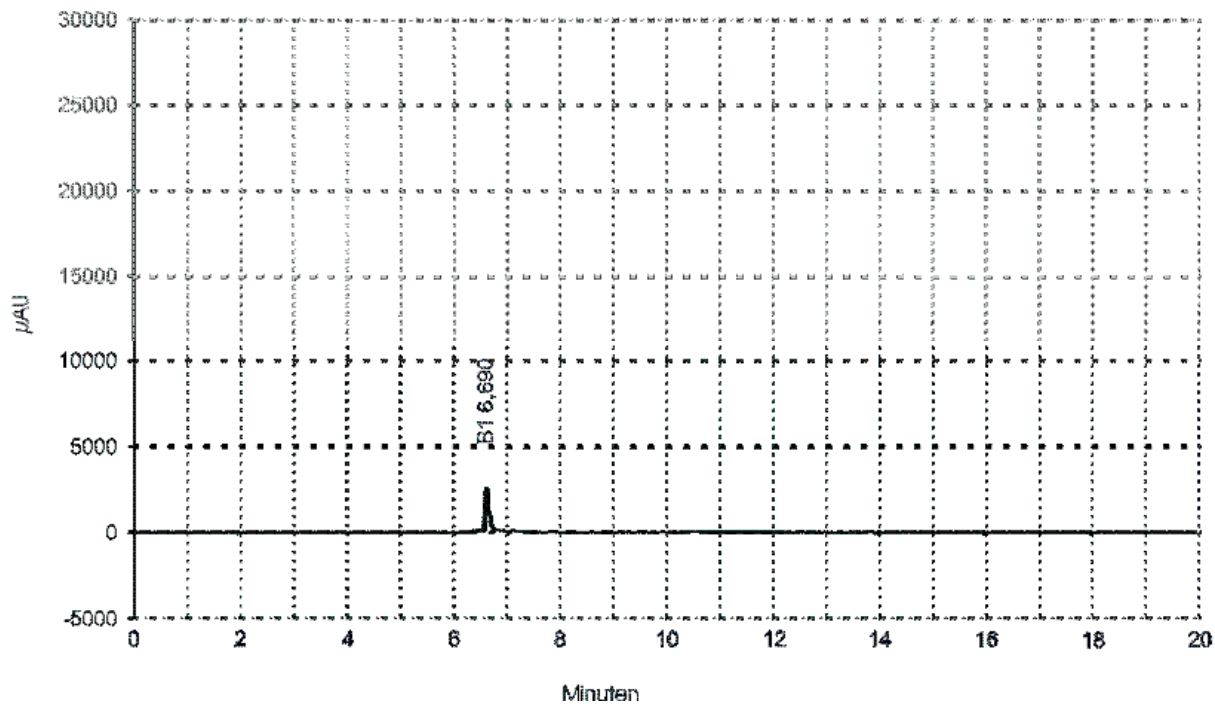


Abb. 7: Standardchromatogramm Vitamin B₁ (Ret-Zt.: 6,7 min) (20 mg/l).

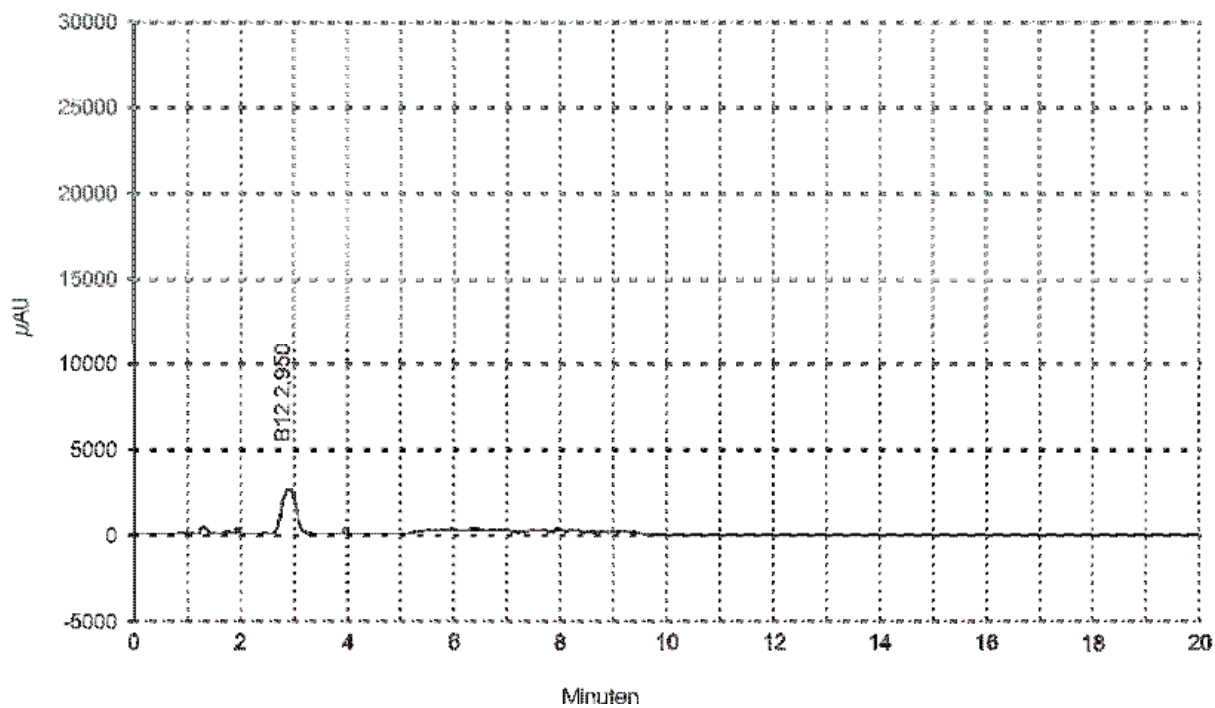


Abb. 8: Standardchromatogramm Vitamin B₁₂ (Ret-Zt.: 2,9 min) (20mg/l).

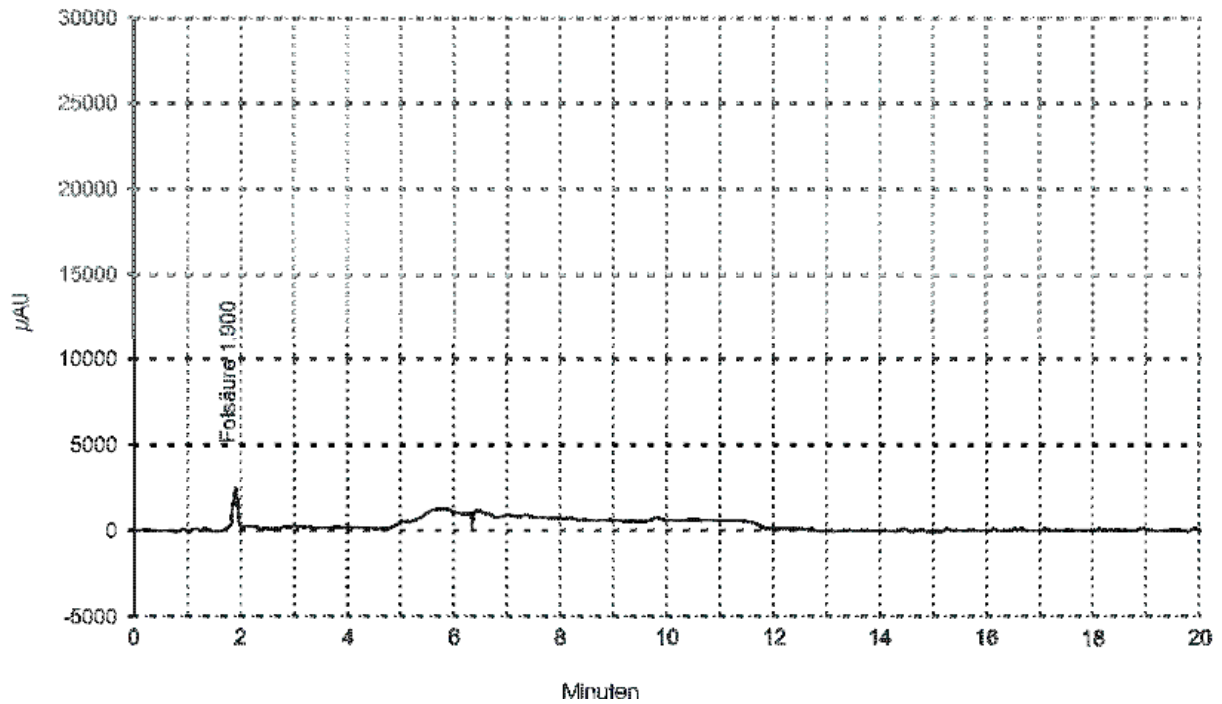


Abb. 9: Standardchromatogramm Folsäure (Ret-Zt.: 1,9 min) (100mg/l).

4.1.3. Entproteinisierung der Matrix

Die quantitative Proteinfällung wurde mittels Proteinfärbung nach Bradford (Roti[®]-Quant, Fa. Roth, Karlsruhe, Art.-Nr.: K01512) überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Versuchsreihe zur Entproteinisierung von Serum mittels Alkohol.

Alkohol	Verhältnis Alkohol/Serum	Proteinfärbung nach Bradford
Methanol (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 106009)	1/1	Überstand mäßig trüb, Proteinfärbung
	2/1	Überstand trüb, Proteinfärbung
Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 100983)	1/1	Überstand fast klar, Proteinfärbung
	2/1	Überstand klar, Proteinfärbung
2-Propanol (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 109634)	1/1	Überstand fast klar, Proteinfärbung
	2/1	Überstand klar, Proteinfärbung
Aceton (Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr.: 100014)	1/1	Überstand mäßig trüb, dezent Proteinfärbung
	2/1	Überstand klar, dezent Proteinfärbung

Die Versuche ließen erkennen, dass es bei den verwendeten Alkoholen Unterschiede bezüglich der quantitativen Fällung der Proteine gab. Generell war die Proteinfällung, unabhängig vom verwendeten Alkohol, bei einem Alkohol/Serum Verhältnis von 2/1 besser als bei einem Verhältnis von 1/1.

Eine vollständige Proteinfärbung war erreicht, wenn der Überstand klar und die Proteine deutlich gefärbt waren. Bei Aceton im Verhältnis 2/1 war die Proteinfärbung nur dezent. Bei Methanol im Verhältnis 2/1 war der Überstand trüb. Die Ergebnisse der Proteinfärbung nach Bradford zeigten, dass Ethanol und 2-Propanol im Verhältnis 2/1 die Proteine im Serum fällten. Bei diesen Versuchen war der Überstand klar und eine deutliche Proteinfärbung erkennbar. Bei der Analyse dieser beiden Seren zeigte sich, dass die HPLC-Säule (Sperimage-80, ODS2, QE 125) durch nicht ausgefällte Proteine verstopft wurde.

4.1.4. Aufkonzentrierung der Vitamine im Serum

Nach der Probeneinengung mit Stickstoff konnten in keiner der realen Proben Peaks im Chromatogramm gefunden werden.

Die Einengung durch Verdampfung zeigte keine Peaks im Chromatogramm, oder die Peaks waren niedriger als die Ausgangskonzentration.

4.1.5. Selektion der Vitamine

4.1.5.1. Festphasenextraktion

Die HPLC-Probenanalyse mit der Festphasenextraktion Chromobond C18ec (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Art.-Nr.: 730015) ergab für die Analyse des Standards und der gespikten Probe lediglich eine 50%ige Wiederfindung für Vitamin B₁. Vitamin B₁₂ und Folsäure konnten nicht nachgewiesen werden. In der Serumprobe konnte keines der Vitamine nachgewiesen werden.

Chromobond C18ec (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Art.-Nr.: 730 013), Strata X (Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, Art.-Nr.: 8B-S100-TAK) und Strata C8 (Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, Art.-Nr.: 8B-S005-EAK-5) wurden ebenfalls auf ihre Tauglichkeit hinsichtlich der Selektion und Aufkonzentrierung der Vitamine B₁, B₁₂ und Folsäure getestet. In Standard und Probe konnte keines der gesuchten Vitamine nachgewiesen werden.

Bei der Festphasenextraktion mit Chromobond SB (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Art.-Nr.: 730079) konnten in allen drei Phasen der Extraktion des Standards Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₁ gefunden werden (Tabellen 24 und 25). In der gespikten Probe konnte in der Probenaufgabe und im Waschschrift Folsäure analysiert werden. Diese wurde durch die Extraktion deutlich aufkonzentriert.

Tab. 24: SPE-Versuch: Chromobond SB, Standardlösung mit Folsäure, B₁ und B₁₂ je 33 mg/l.

Phasen der Extraktion	Folsäure		Vitamin B ₁		Vitamin B ₁₂	
	c (mg/l)	Wiederfindung (%)	c (mg/l)	Wiederfindung (%)	c (mg/l)	Wiederfindung (%)
Probenaufgabe	0	0	33	100	24,4	73,9
Waschschritt	0	0	41,5	125,8	25,1	76,1
Elutionsschritt	0	0	22,2	67,3	16,5	50

Tab. 25: SPE-Versuch: Chromobond SB, gespiktes Serum mit Folsäure, B₁ und B₁₂ je 16 mg/l.

Phasen der Extraktion	Folsäure		Vitamin B ₁		Vitamin B ₁₂	
	c (mg/l)	Wiederfindung (%)	c (mg/l)	Wiederfindung (%)	c (mg/l)	Wiederfindung (%)
Probenaufgabe	929,1	5806,9*	9,2	57,5	0	0
Waschschritt	289,5	1809,4*	0	0	8,7	54,4
Elutionsschritt	0	0	0	0	18,2	113,8

- *Diese Ergebnisse entsprechen einer ca. 300-fachen (Probenaufgabe) oder 100-fachen (Waschschritt) Aufkonzentrierung der Folsäure.
- Keines der beiden Versuchsergebnisse war reproduzierbar.

Weitere Versuche zur Etablierung einer geeigneten Festphasenextraktion beschränkten sich auf die Kartusche Chromobond SB (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Art.-Nr.: 730079), da nur mit ihr alle Vitamine nachgewiesen werden konnten.

Da keine 100%ige Wiederfindung oder eine Aufkonzentrierung der Vitamine erreicht war, schlossen sich Versuche an. Gespikte Proben wurden vor der Probenaufgabe mit Na₂CO₃ auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tab. 26: Versuche zur pH-Einstellung der Probe.

PH-Wert der Probe	5,07			7,3			9,03		
	B ₁	B ₁₂	FS	B ₁	B ₁₂	FS	B ₁	B ₁₂	FS
Probenaufgabe *	0	2,7	0	4,0	0	0	14,6	8,8	323,4
Waschschrift *	2,8	5,8	51,6	0	4,3	0	0	2,2	84,6
Elutionsschritt *	0	0	160,8	0	0	273,3	0	0	104,2

- Konzentration des entspr. Vitamins in mg/l.

Die Versuche zur pH-Einstellung der Probe ergaben für die Vitamine B₁ und B₁₂ eine Wiederfindungsrate unterhalb der Ausgangskonzentrationen von 33 mg/l. Auch in Parallelversuchen waren die Ergebnisse (Tab. 26) nicht reproduzierbar. Es wurden weder die Ausgangskonzentrationen noch die Konzentrationen des ersten Versuches gefunden. Die gemessenen Vitamin B₁ und B₁₂ Konzentrationen ließen kein Wiederfindungsschema in den Fraktionen der Probenaufgabe, des Waschschriftes und des Elutionsschrittes erkennen.

Folsäure wurde bei pH-Verschiebung sowohl im sauren als auch im basischen Bereich deutlich aufkonzentriert. Im neutralen Bereich zeigte die Folsäure eine Aufkonzentrierung um 828% gegenüber einer Ausgangskonzentration von 33 mg/l. Im neutralen Bereich fand sich die Folsäure ausschließlich im Elutionsschritt. Dieses Ergebniss war durch drei weitere Parallelversuche nicht reproduzierbar.

4.2. Laktationsdynamik der B-Vitamine

4.2.1. Vitamin B₁ (Thiamin)

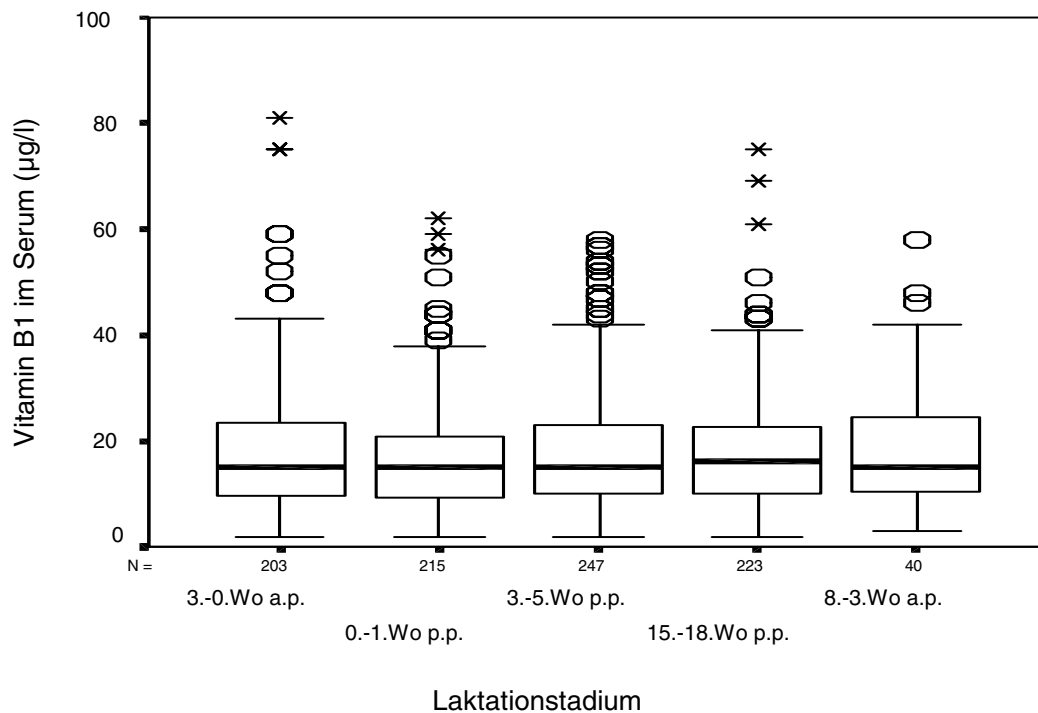
Die im Serum gemessenen Vitamin B₁ Konzentrationen wiesen keine Normalverteilung auf ($p < 0,05$) (Abb.: 10-15).

Der Medianwert der Blutserumkonzentrationen der einzelnen Laktationsgruppen betrug einheitlich 15 µg/l. Lediglich für die Tiere, die sich 15-18 Wochen nach der Kalbung befanden, ergab sich ein Medianwert der Serumkonzentration von 16 µg/l (Tab. 24). Die Vitamin B₁ Konzentration im Serum zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Laktationsgruppen ($p = 0,769$).

Die Probandengröße lag durchschnittlich bei 200-250 Tieren. Ausnahme bildete die Gruppe der Tiere 8-3 Wochen vor dem Partus mit 40 Tieren.

Der überwiegende Teil der Tiere hatte in der einzelnen Laktationsgruppen einen Vitamin-B₁-Serumgehalt zwischen 10-20 µg/l (Abb. 11-15). Die minimalen Blutserumkonzentrationen lagen einheitlich bei 2 µg/l. Die maximalen Blutserumkonzentrationen schwankten zwischen 58-81 µg/l.

Das 5%-95%-Perzentil lässt eine Steuung der Vitaminkonzentrationen um knapp 50 µg/l erkennen (Tab. 27). Mit einer Häufigkeit von 50 wurde bei Gruppe 1 ein Wert zwischen 5-15 µg/l und bei den Gruppen 2 und 4 zwischen 15-20 µg/l (Abb. 12 und 14) erreicht. Die Tiere der Gruppe 3 hatten mit einer Häufigkeit von fast 60 einen Wert zwischen 15-20 µg/l (Abb. 13). Mit einer Häufigkeit von 11 lag bei den Tieren der 5. Gruppe die Vitamin B₁-Blutserumkonzentration zwischen 10-20 µg/l (Abb. 15).



Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [µg/l]	Median [µg/l]	s [µg/l]	X _{min} [µg/l]	X _{max} [µg/l]
3.-0.Wo a.p.	203	18,3	15,0	13,5	2,0	81,0
0.-1.Wo p.p.	215	17,1	15,0	11,2	2,0	62,0
3.-5.Wo p.p.	247	18,8	15,0	12,8	2,0	58,0
15.-18.Wo p.p.	223	18,1	16,0	11,9	2,0	75,0
8.-3.Wo a.p.	40	19,0	15,0	12,3	3,0	58,0

Abb. 10: Verhalten des Vitamin B₁ (im Serum) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab.27: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Vitamin B₁ (im Serum).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile [µg/l]	16%-84%-Perzentile [µg/l]
3.-0.Wo a.p.	4,0-47,0	7,0-28,4
0.-1.Wo p.p.	4,0-41,0	7,0-26,0
3.-5.Wo p.p.	4,0-48,0	7,0-30,0
15.-18.Wo p.p.	4,0-40,0	7,0-28,0
8.-3.Wo a.p.	6,1-47,9	8,0-28,4

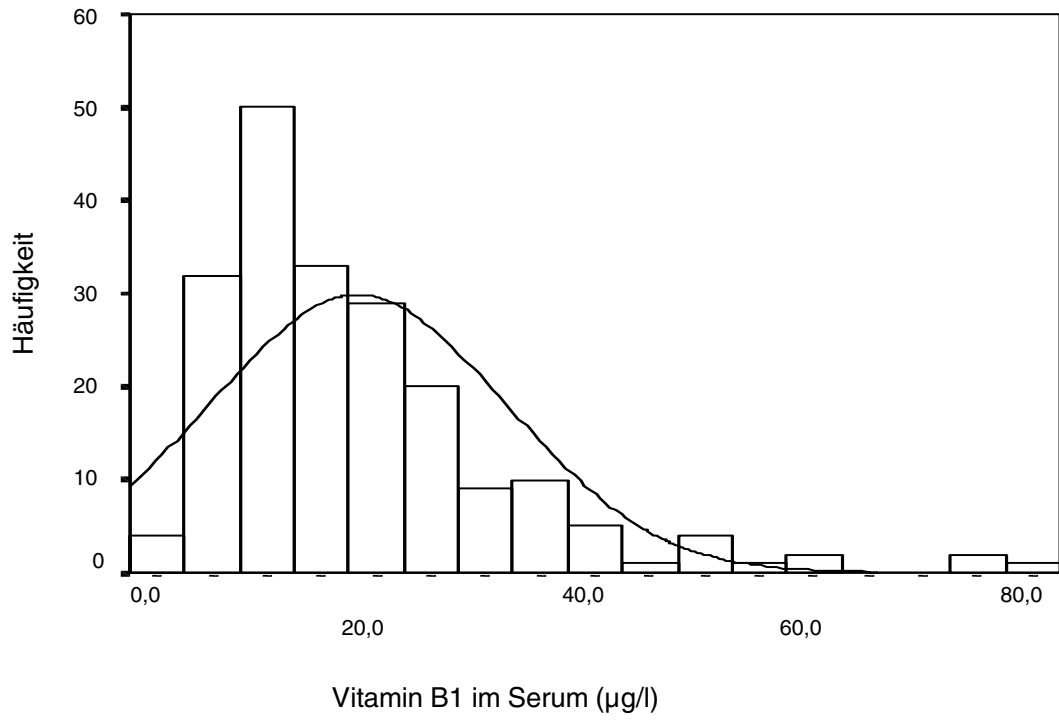


Abb.11: Histogramm Vitamin B₁ im Serum (3.-0. Woche a.p.).

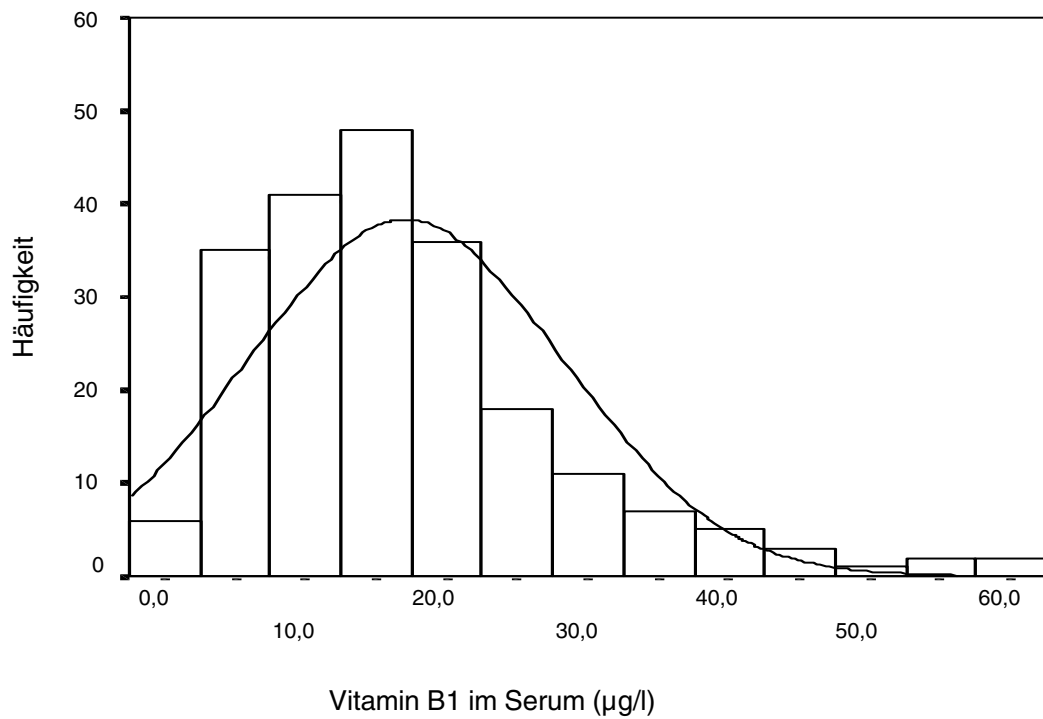


Abb.12: Vitamin B₁ im Serum (0.-1. Woche p.p.).

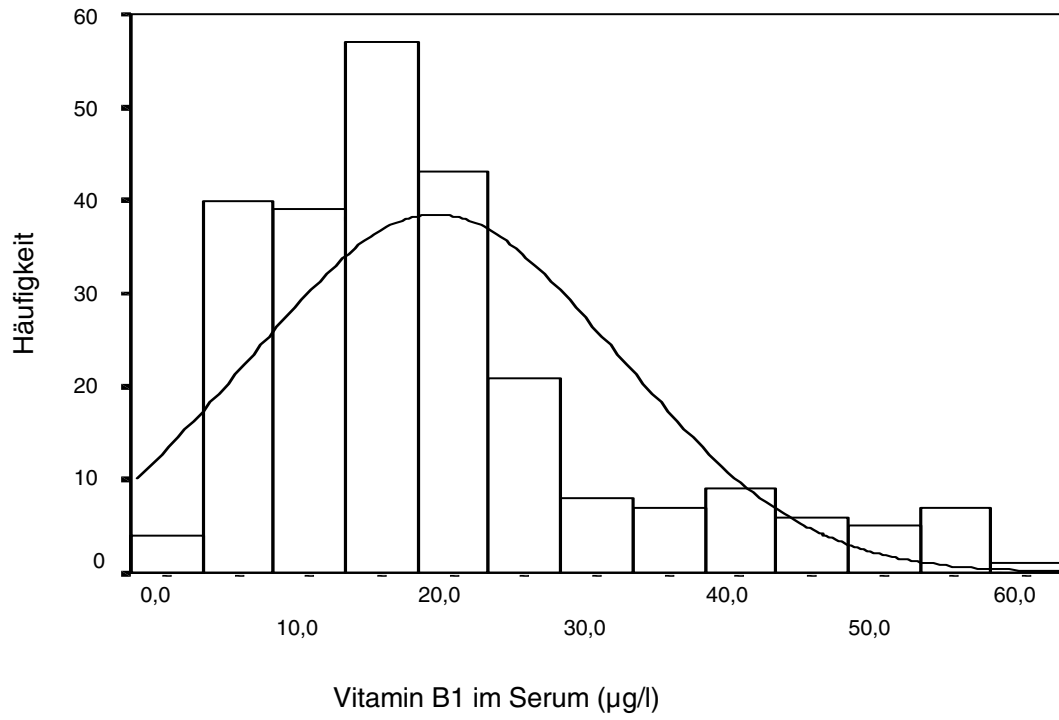


Abb.13: Histogramm Vitamin B₁ im Serum (3.-5. Woche p.p.).

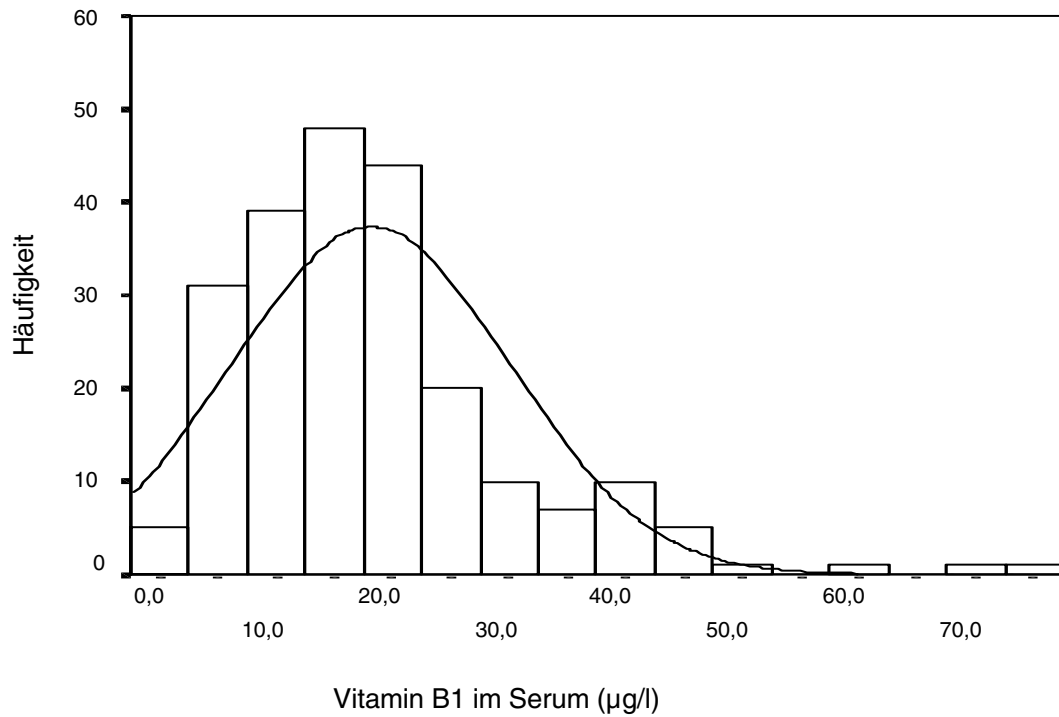


Abb.14: Histogramm Vitamin B₁ im Serum (15.-18. Woche p.p.).

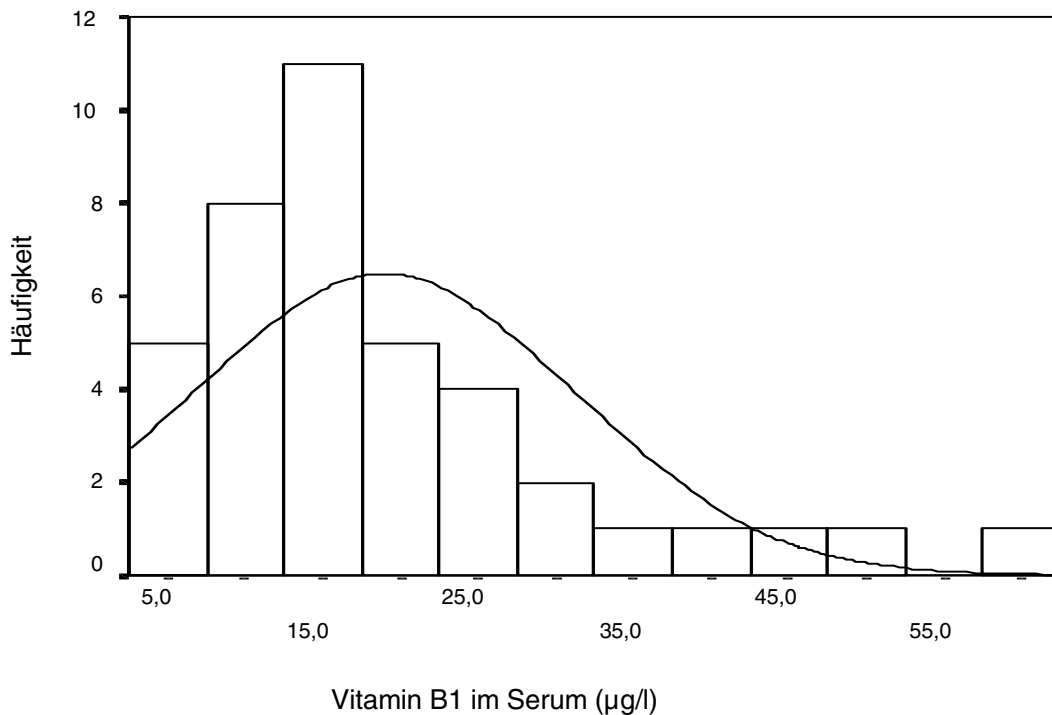


Abb.15: Histogramm Vitamin B₁ im Serum (8.-3. Woche a.p.).

Die Vitamin-B₁-Konzentrationen lagen im Vollblut zwischen 41% und 48% höher als im Serum.

Eine Normalverteilung lag bei Vitamin B₁ im Vollblut in den Gruppen 1-4 vor. Die Vitamin B₁-Konzentration bei Tieren, die sich 15-18 Wochen nach dem Partus befanden, waren nicht normalverteilt (Tab. 14 und Abb. 20).

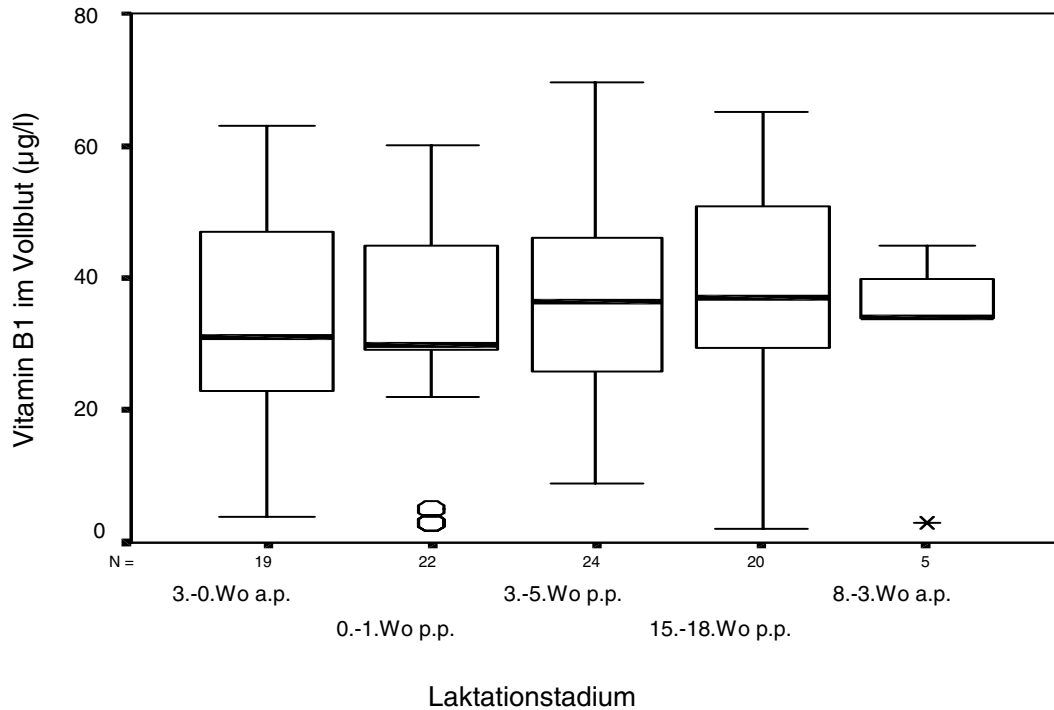
Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Laktationsgruppen ($p = 0,792$).

84% der Tiere in Gruppe 1, 68% der Tiere in Gruppe 2, 54% der Tiere in Gruppe 3 und 80% der Tiere in Gruppe 4 wiesen einen Thiamingehalt im Vollblut auf, der unterhalb des angegebenen Referenzwertes von $>40 \mu\text{g/l}$ lag (Abb. 17-21 und Tab. 28).

Die minimalen Vitaminkonzentrationen schwankten bei Werten zwischen $2-9 \mu\text{g/l}$, stärker als die Minimalwerte im Serum. Die Maximalwerte lagen mit Werten zwischen $45-69 \mu\text{g/l}$, außer in Gruppe 3, meist unterhalb der Vitaminkonzentrationen im Serum (Abb. 16). Die Medianwerte lagen zwischen $30-37 \mu\text{g/l}$, wobei Tiere der 15.-18. Woche post partum den höchsten Medianwert ($37 \mu\text{g/l}$) hatten. Die Mittelwerte der Laktationsgruppen 1,2 und 4 lagen $0-5 \mu\text{g/l}$ höher als die Medianwerte (Abb. 16).

Die Histogramme (Abb. 17-21) zeigten höhere Vitamin-B₁-Konzentrationen im Vollblut als im Serum. Tiere in der 3-0 Wochen vor dem Partus hatten mit einer Häufigkeit von 6 Werte zwischen $15-25 \mu\text{g/l}$.

Die relativen Häufigkeiten lagen im Vollblut zwischen 2-7 und waren damit deutlich geringer als im Serum.



Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [µg/l]	Median [µg/l]	s [µg/l]	x_{\min} [µg/l]	x_{\max} [µg/l]
3.-0.Wo a.p.	19	35,1	31,0	17,9	4,0	62,9
0.-1.Wo p.p.	22	32,6	30,0	16,2	3,0	60,0
3.-5.Wo p.p.	24	36,4	36,5	17,7	9,0	69,0
15.-18.Wo p.p.	20	39,1	37,0	15,6	2,0	65,0
8.-3.Wo a.p.	5	31,2	34,0	16,4	3,0	45,0

Abb. 16: Verhalten des Vitamin B₁ (im Vollblut) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab. 28: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Vitamin B₁ (im Vollblut).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile [µg/l]	16%-84%-Perzentile [µg/l]
3.-0.Wo a.p.	4,0-62,9	22,0-56,0
0.-1.Wo p.p.	3,0-60,0	16,6-53,6
3.-5.Wo p.p.	9,0-69,6	20,0-62,0
15.-18.Wo p.p.	3,2-65,0	25,7-57,5
8.-3.Wo a.p.	3,0-45,0	3,0-45,0

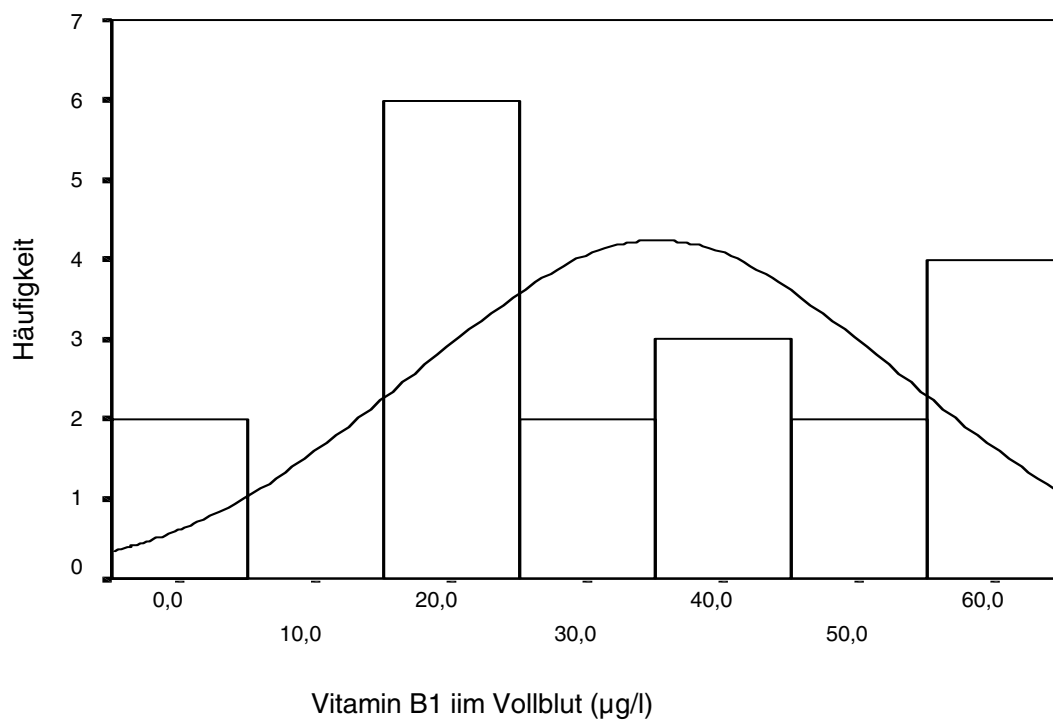


Abb.17: Histogramm Vitamin B₁ im Vollblut (3.-0. Woche a.p.).

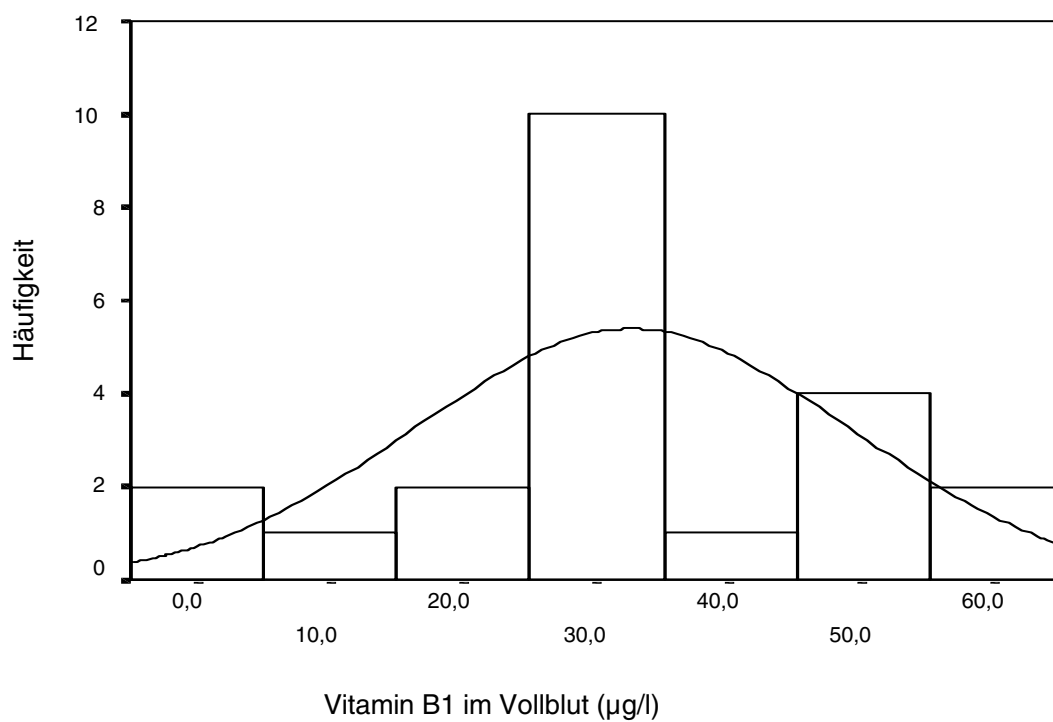


Abb.18: Histogramm Vitamin B₁ im Vollblut (0.-1. Woche p.p.).

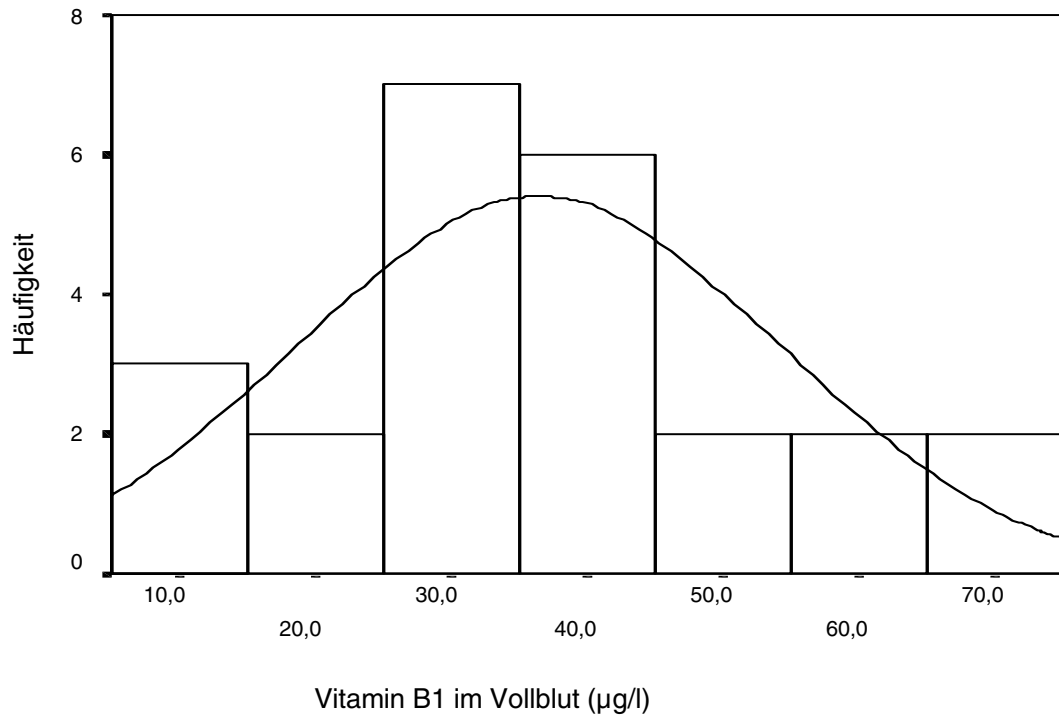


Abb.19: Histogramm Vitamin B₁ im Vollblut (3.-5. Woche p.p.).

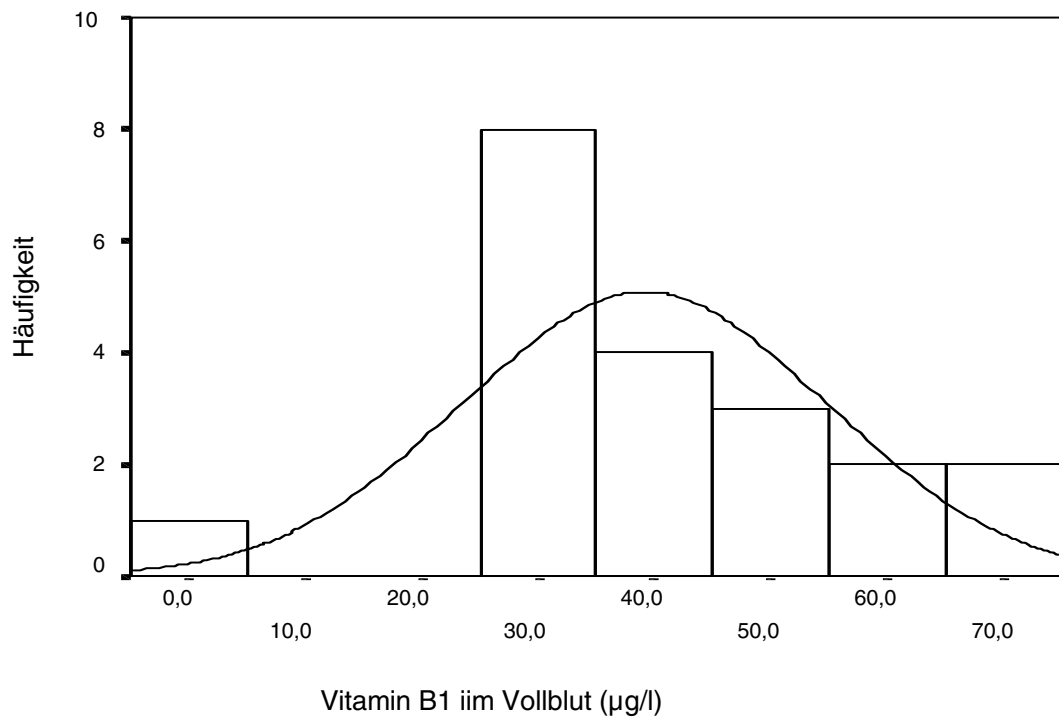


Abb.20: Histogramm Vitamin B₁ im Vollblut (15.-18. Woche p.p.).

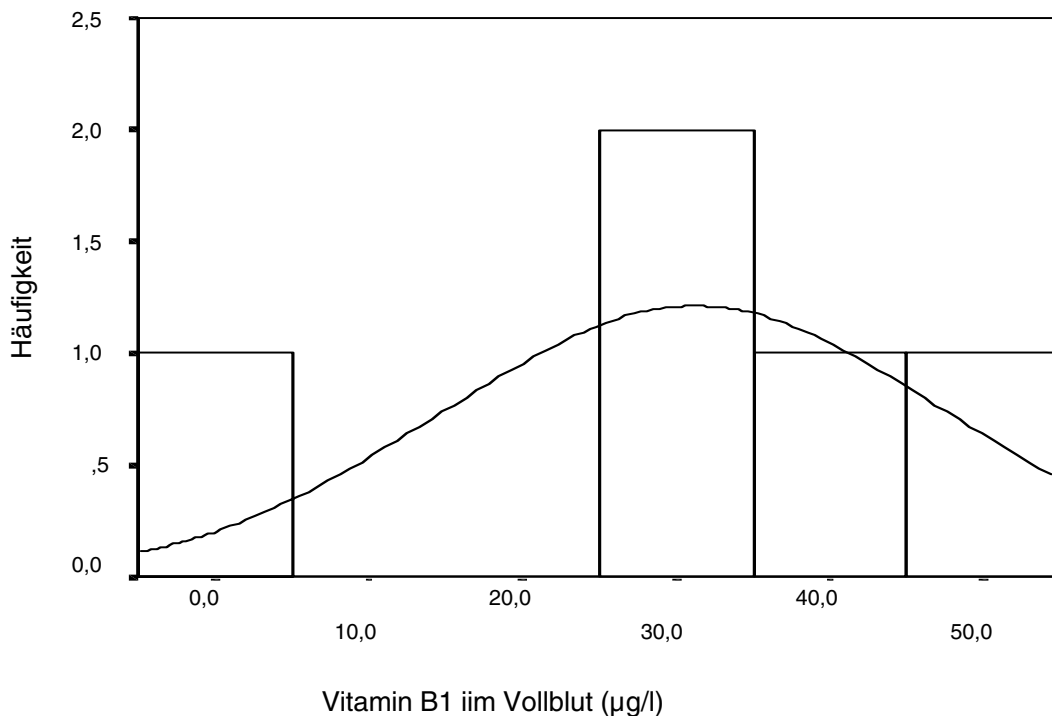


Abb.21: Histogramm Vitamin B₁ im Vollblut (8.-3. Woche a.p.).

4.2.2 Vitamin B₁₂ (Cobalamin)

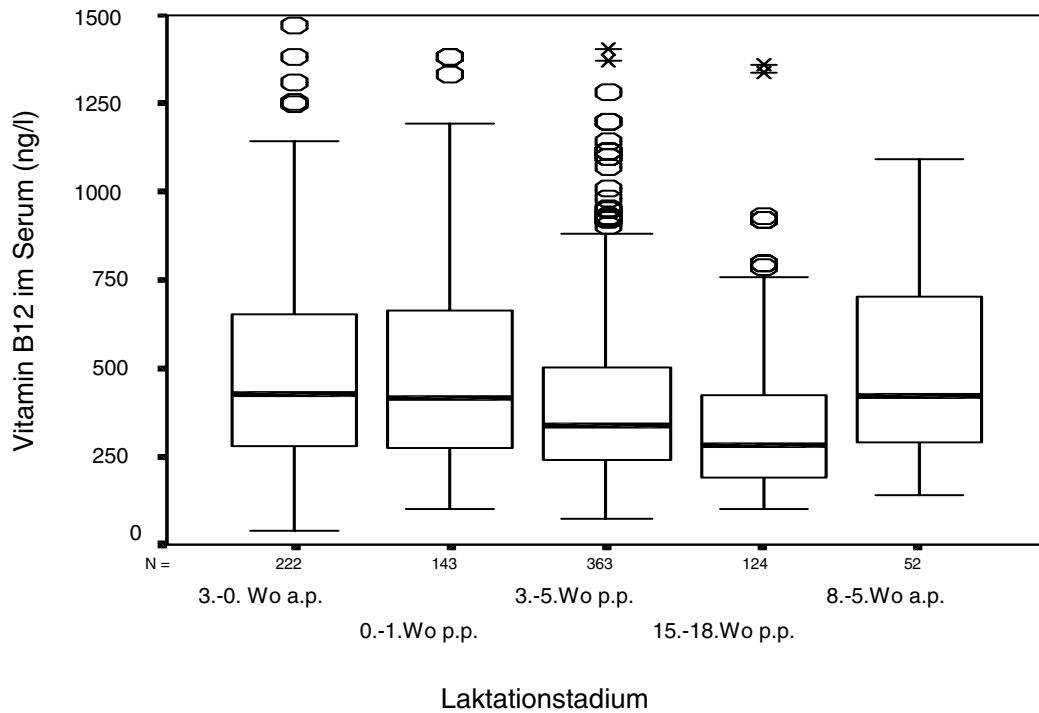
Die Zahl der Probanden variierte bei den Vitamin B₁₂-Messungen zwischen 52 in Gruppe 1 und 363 in Gruppe 3 (Abb. 22).

In keiner Laktationsgruppe waren die Vitamin-B₁₂-Konzentrationen normalverteilt (Tab. 14). 11% der Tiere in Gruppe 1, 14% der Tiere in Gruppe 2, 13% der Tiere in Gruppe 3, 28% der Tiere in Gruppe 4 und 6% der Tiere in Gruppe 5 wiesen einen Vitamin B₁₂-Spiegel unterhalb des angegebenen Referenzwertes von 200 ng/l auf (Abb. 23-27). Die Medianwerte lagen in allen Laktationsgruppen oberhalb des angegebenen Referenzwertes von 200 ng/l.

Das 5%-95%-Perzentil (Tab. 29) zeigte eine breite Streuung der Vitaminkonzentrationen, die zwischen 127 und 2000 ng/l lag.

Signifikante Unterschiede zwischen den Laktationsgruppen waren bei 7 Gruppen vorhanden. Tiere, die sich 15-18 Wochen nach dem Partus befanden, unterschieden sich hinsichtlich ihres Vitamin-B₁₂-Serumgehaltes signifikant von Tieren um den Partus (8. Woche a.p. - 5. Woche p.p.).

Die Histogramme (Abb. 23-27) wiesen eine durchweg schiefe Verteilung auf. Mit einer relativen Häufigkeit zwischen 40-80 zeigten die Probanden eine B₁₂-Serumkonzentration von 200-500 ng/l. Bei Tieren, die sich 8-3 Wochen vor dem Partus befanden, lagen die Werte meist zwischen 300-500 ng/l. Die relative Häufigkeit betrug 11 (Abb. 27).

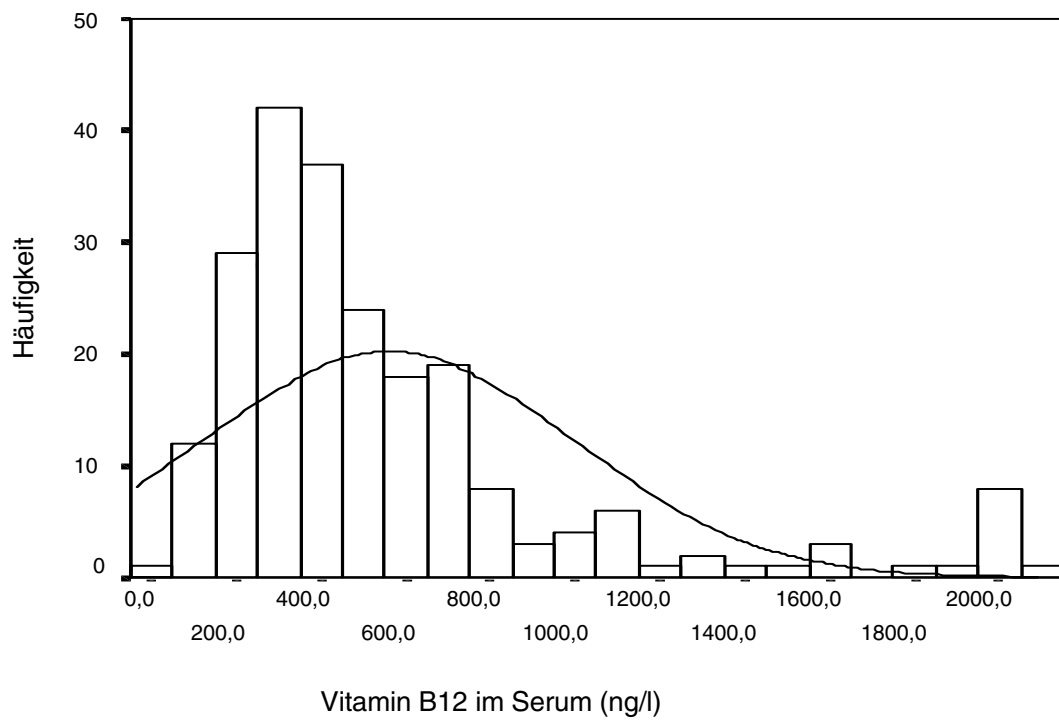


Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [ng/l]	Median [ng/l]	s [ng/l]	x_{\min} [ng/l]	x_{\max} [ng/l]	Zeitraum				
							1	2	3	4	5
3.-0. Wo a.p.	222	558,5	427,5	436,7	38,0	2075,0			*	*	
0.-1. Wo p.p.	143	570,0	414,0	615,9	100,0	5850,0			*	*	
3.-5. Wo p.p.	363	432,4	337,0	322,7	75,0	2001,0				*	*
15.-18. Wo p.p.	124	389,6	280,0	350,1	100,0	2000,0					*
8.-3. Wo a.p.	52	577,2	420,5	456,4	138,0	2031,0					

Abb. 22: Verhalten des Vitamin B₁₂ (im Serum) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab. 29: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Vitamin B₁₂ (im Serum).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile [ng/l]	16%-84%-Perzentile [ng/l]
3.-0.Wo a.p.	142,0-1755,4	231,0-799,6
0.-1.Wo p.p.	146,2-1993,2	208,0-741,4
3.-5.Wo p.p.	153,6-1099,2	210,0-591,8
15.-18.Wo p.p.	127,8-1237,3	174,0-578,0
8.-3.Wo a.p.	185,7-2000,0	252,0-904,4

Abb.23: Histogramm Vitamin B₁₂ im Serum (3.-0. Woche a.p.).

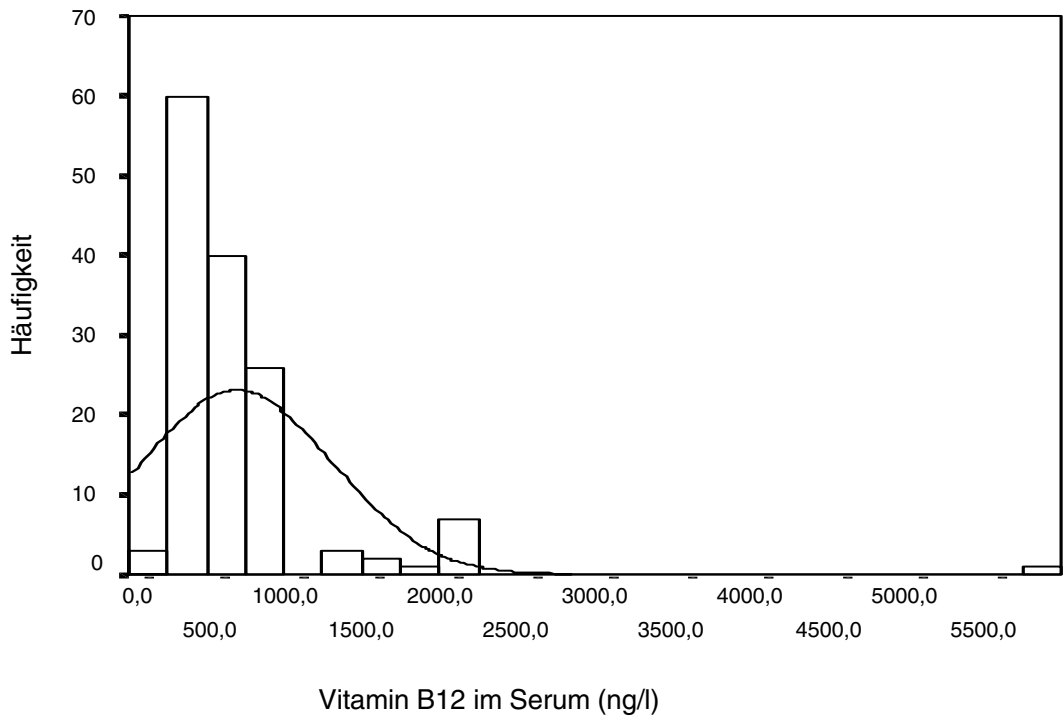


Abb.24: Histogramm Vitamin B₁₂ im Serum (0.-1. Woche p.p.).

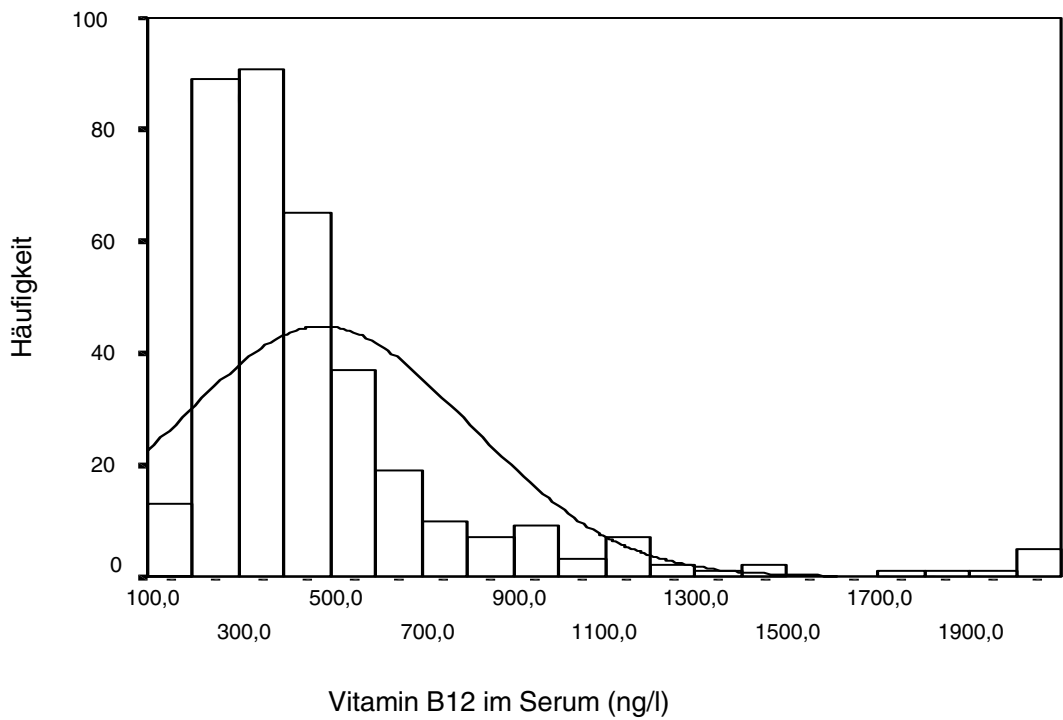


Abb.25: Histogramm Vitamin B₁₂ im Serum (3.-5. Woche p.p.).

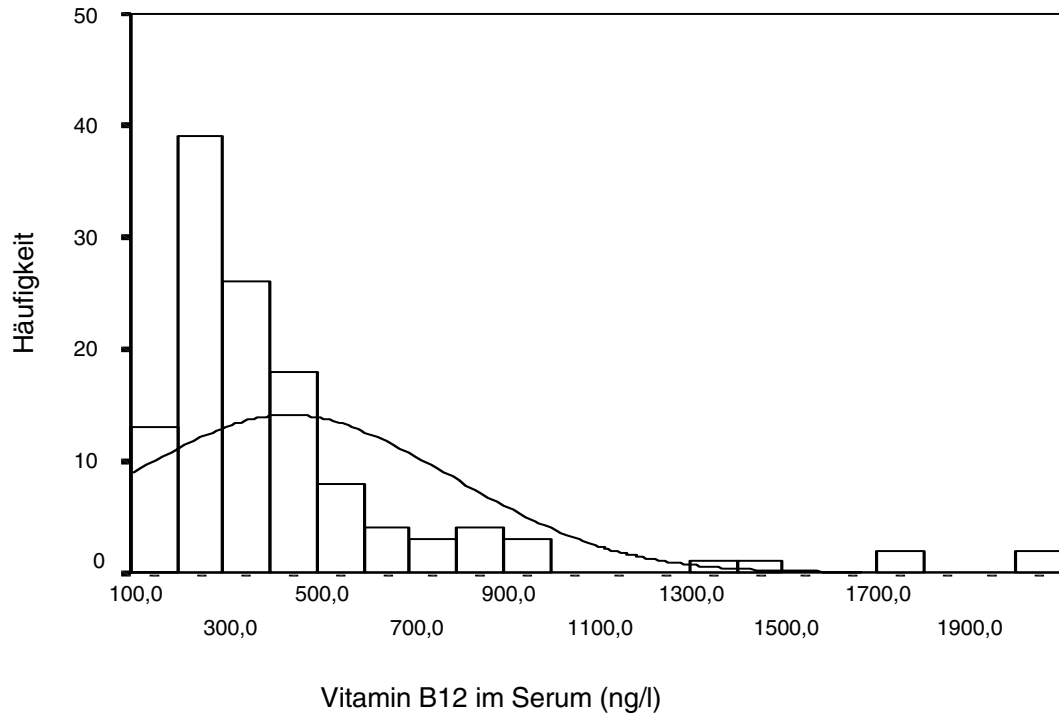


Abb.26: Histogramm Vitamin B₁₂ im Serum (15.-18. Woche p.p.).

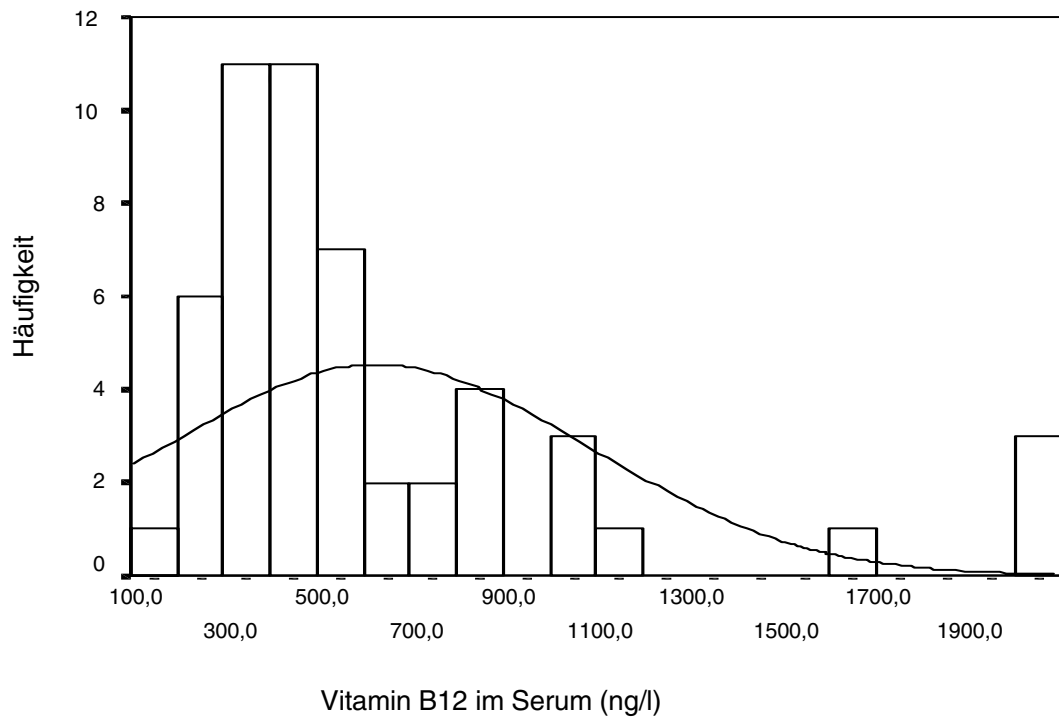


Abb.27: Histogramm Vitamin B₁₂ im Serum (8.-3. Woche a.p.).

Vitamin B₁₂ wurde in der Milch bestimmt und ist auch hier nicht normalverteilt ($p < 0,05$) (Abb.: 22-32). Es bestehen auch in Milch signifikante Unterschiede zwischen den Vitaminkonzentrationen der einzelnen Laktationsgruppen ($p < 0,05$). In 2 Gruppenkombinationen wurden bei Vitamin B₁₂ in Milch (Abb.: 28) signifikante Unterschiede der Vitamin B₁₂-Konzentrationen festgestellt.

Die Laktationsgruppen 2 und 3, sowie 2 und 4 wiesen in Milch und Serum signifikante Unterschiede auf. Die Gruppenkombinationen 1 und 3, 3 und 4, sowie 1 und 4 zeigten nur im Serum einen signifikanten Unterschied. In den Gruppen 3 und 5, sowie 4 und 5 wurden im Serum signifikante Konzentrationsunterschiede gefunden.

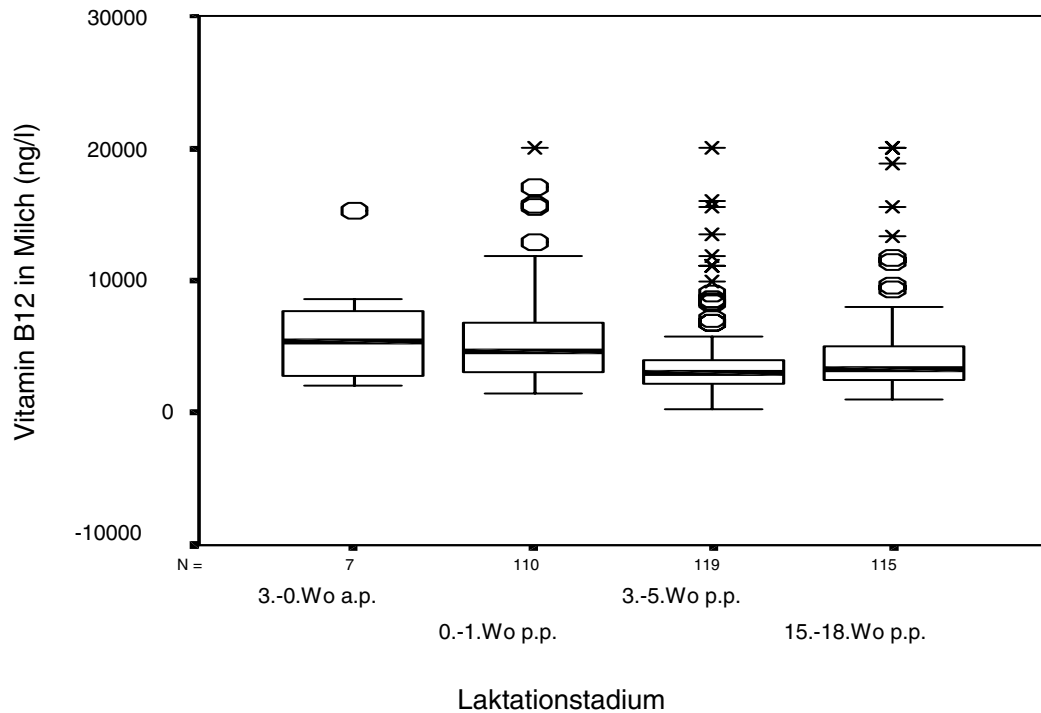
In allen Laktationsgruppen (Abb. 29-32 und Tab. 30) lag der Vitamin B₁₂-Gehalt in Milch oberhalb des angegebenen Referenzwertes von 200 ng/l.

Der Medianwert lag zwischen 3020 und 5411 ng/l und war in der Milch in Gruppe 1 und 4 92%, in Gruppe 2 91% und in Gruppe 3 89% höher als im Serum.

Die Gruppe der Tiere 3-0 Wochen vor dem Partus war mit 7 Tieren die kleinste des gesamten Versuchs.

Die Histogramme (Abb. 29-32) zeigten eine symmetrische Verteilung der Werte, mit Ausnahme der Tiere der 3.-0. Woche ante partum.

Mit einer relativen Häufigkeit von 3 fanden sich in dieser Gruppe Vitamin B₁₂-Konzentrationen zwischen 2000 und 3500 ng/l. Die übrigen Laktationsgruppen wiesen mit einer relativen Häufigkeit zwischen 25-40 Vitaminkonzentrationen ähnlicher Höhe auf.



Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [ng/l]	Median [ng/l]	s [ng/l]	X _{min} [ng/l]	X _{max} [ng/l]	Zeitraum			
							1	2	3	4
3.-0.Wo a.p.	7	6253,1	5411,0	4668,6	2000,0	15334,0				
0.-1.Wo p.p.	110	5518,8	4578,0	3354,5	1470,0	20000,0			*	*
3.-5.Wo p.p.	119	3926,9	3020,0	3159,6	279,0	20000,0				
15.-18Wo p.p.	115	4364,4	3310,0	3466,9	1070,0	20000,0				

Abb.28: Verhalten des Vitamin B₁₂ (in Milch) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab. 30: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Vitamin B₁₂ (in Milch).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile	16%-84%-Perzentile
	[ng/l]	[ng/l]
3.-0.Wo a.p.	2000,0-15334,0	2173,6-13428,9
0.-1.Wo p.p.	2000,0-12344,0	2544,6-8684,0
3.-5.Wo p.p.	1413,0-11161,0	2015,8-5547,8
15.-18.Wo p.p.	1616,0-12000,0	2157,8-5879,2

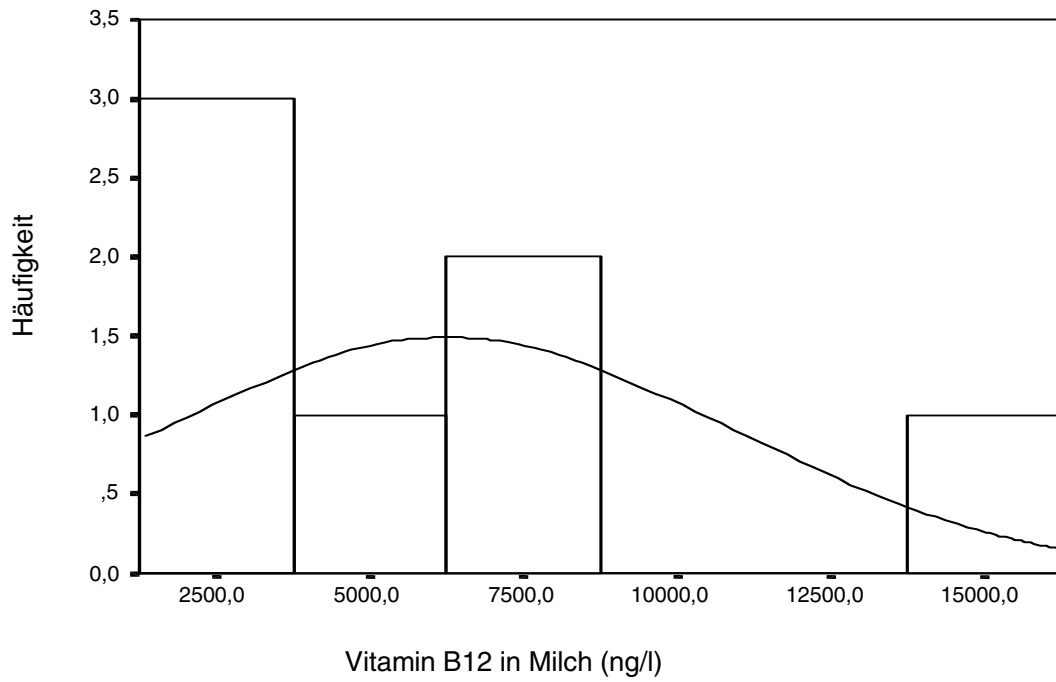


Abb.29: Histogramm Vitamin B₁₂ in Milch (3.-0. Woche a.p.).

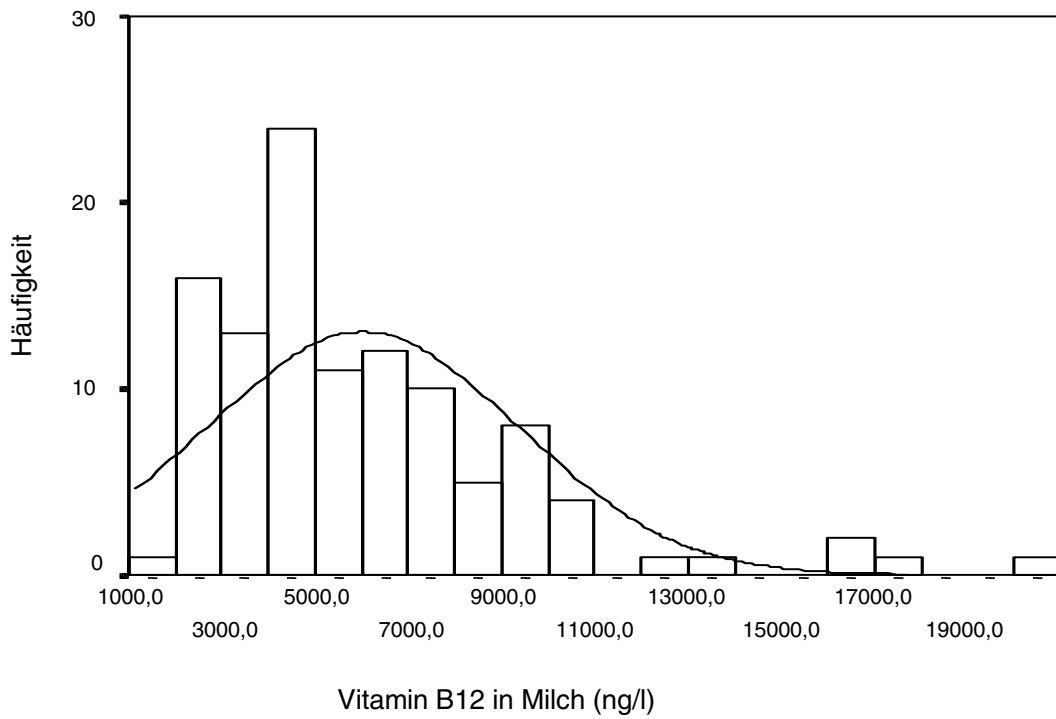


Abb.30: Histogramm Vitamin B₁₂ in Milch (0.-1. Woche p.p.).

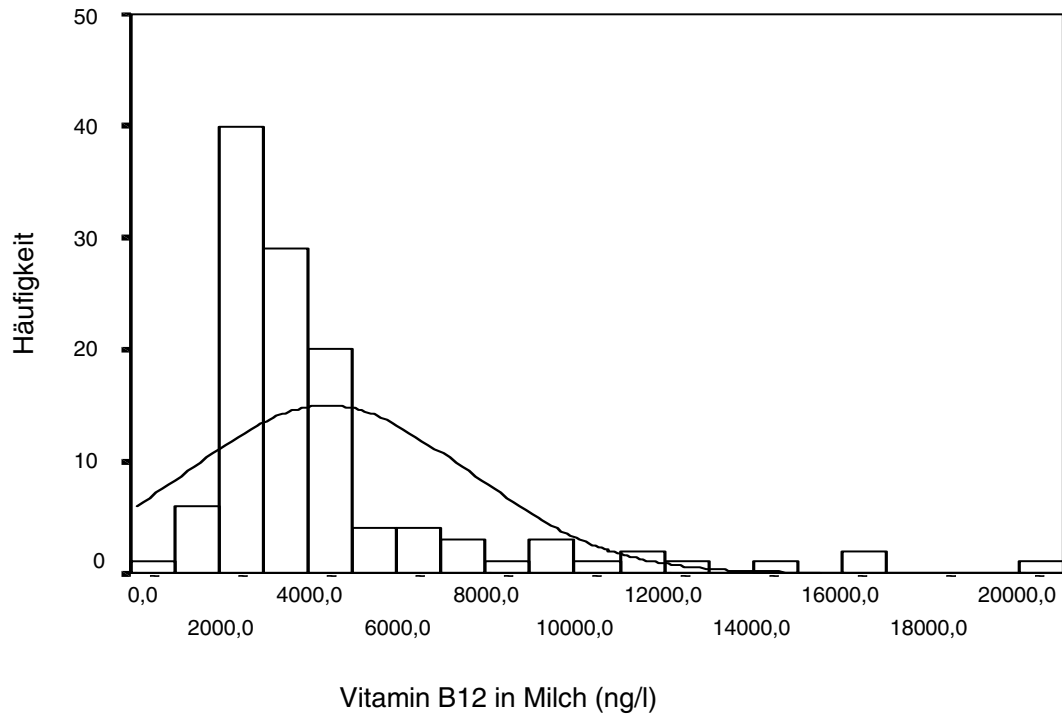


Abb.31: Histogramm Vitamin B12 in Milch (3.-5. Woche p.p.).

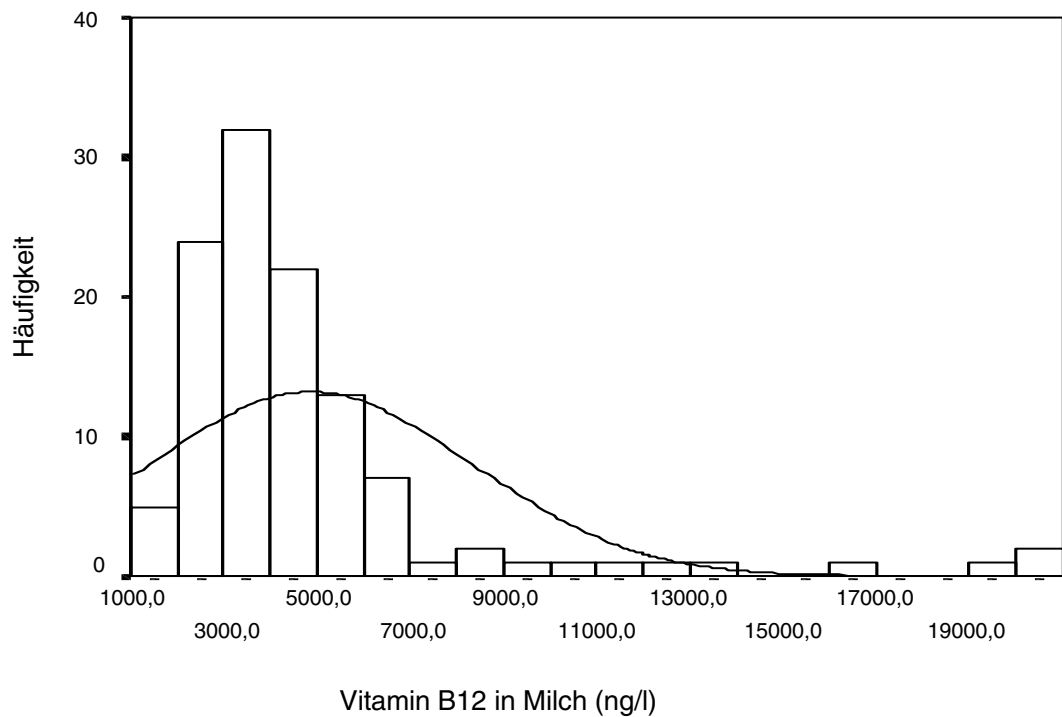


Abb.32: Histogramm Vitamin B₁₂ in Milch (15.-18. Woche p.p.).

4.2.3. Biotin

Auch für die Biotinkonzentrationen im Serum lag keine Normalverteilung innerhalb der Laktationsgruppen vor (Abb.: 33-38). Die Laktationsgruppen 1 und 4, 1 und 5, 3 und 4, sowie 3 und 5 unterschieden sich signifikant hinsichtlich der Biotinkonzentrationen im Serum (Abb.: 33).

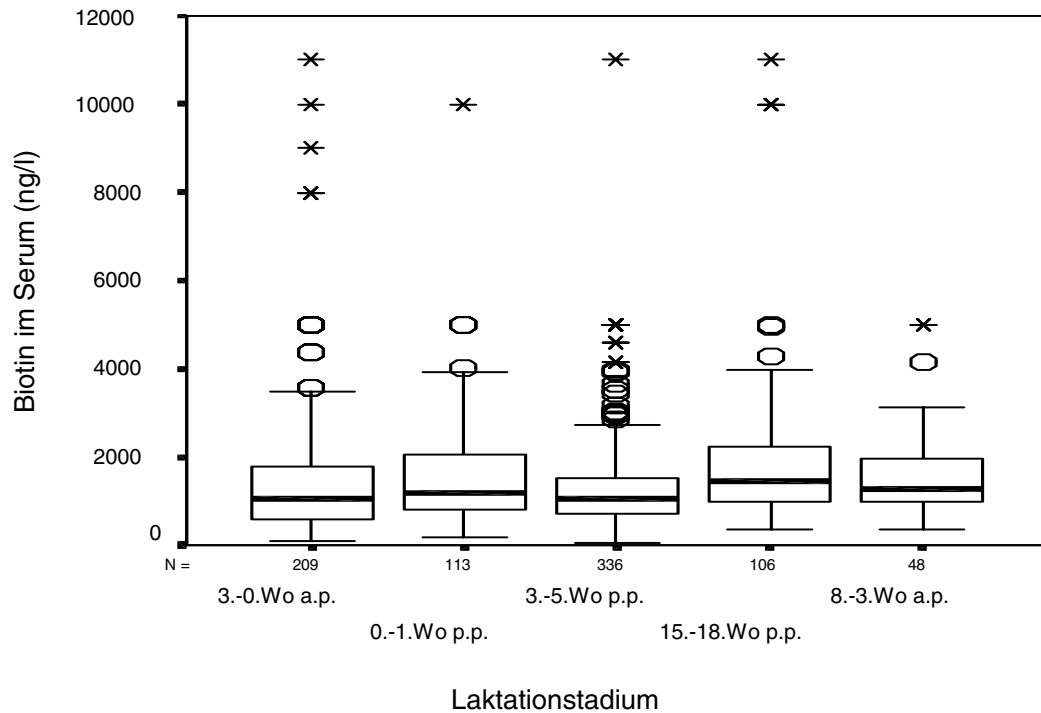
11% der Tiere in Gruppe 1, 4% der Tiere in Gruppe 2, 9% der Tiere in Gruppe 3, 1% der Tiere in Gruppe 4 und 2% der Tiere in Gruppe 5 wiesen einen Biotinspiegel im Serum auf, der unterhalb des angegebenen Referenzwertes von >400 ng/l lag (Abb. 34-38 und Tab. 31).

Der Medianwert der einzelnen Laktationsgruppen lag mit Werten zwischen 1029-1428 ng/l 61%-69% oberhalb des Referenzwertes.

Der Maximalwert der Biotinkonzentration lag in den Laktationsgruppen 1, 3 und 4 bei 11000 ng/l, in der 2. Laktationsgruppe bei 10000 ng/l und in der 5. Laktationsgruppe bei 5000 ng/l.

Die Medianwerte lagen 100 bis 500 ng/l unterhalb der Mittelwerte (Abb. 33).

Die Histogramme aller Gruppen (Abb. 34-38) zeigten eine schiefe Verteilung der Werte. In den Gruppen 1-3 fanden sich bei einer relativen Häufigkeit zwischen 40 und 100 Werte zwischen 1000-2000 ng/l. In den Gruppen 4 und 5 waren die Biotinkonzentrationen zwischen 500-15000 ng/l bei einer Häufigkeit von 17-25.



Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [ng/l]	Median [ng/l]	s [ng/l]	X _{min} [ng/l]	X _{max} [ng/l]	Zeitraum				
							1	2	3	4	5
3.-0.Wo a.p.	209	1529,0	1029,0	1631,1	77,0	11000,0				*	*
0.-1.Wo p.p.	113	1549,9	1175,0	1278,8	165,0	10000,0					
3.-5.Wo p.p.	336	1334,0	1047,5	1123,9	45,0	11000,0				*	*
15.-18.Wo p.p.	106	1879,2	1428,0	1721,7	361,0	11000,0					
8.-3.Wo a.p.	48	1621,6	1287,5	1002,1	375,0	5000,0					

Abb. 33: Verhalten des Biotins (im Serum) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab. 31: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Biotin (im Serum).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile	16%-84%-Perzentile
	[ng/l]	[ng/l]
3.-0.Wo a.p.	250,0-5000,0	498,0-2538,4
0.-1.Wo p.p.	422,3-3908,9	625,2-2300,1
3.-5.Wo p.p.	305,3-3703,3	252,0-2014,6
15.-18.Wo p.p.	503,9-4708,0	820,6-2576,4
8.-3.Wo a.p.	657,6-4620,2	919,4-2175,8

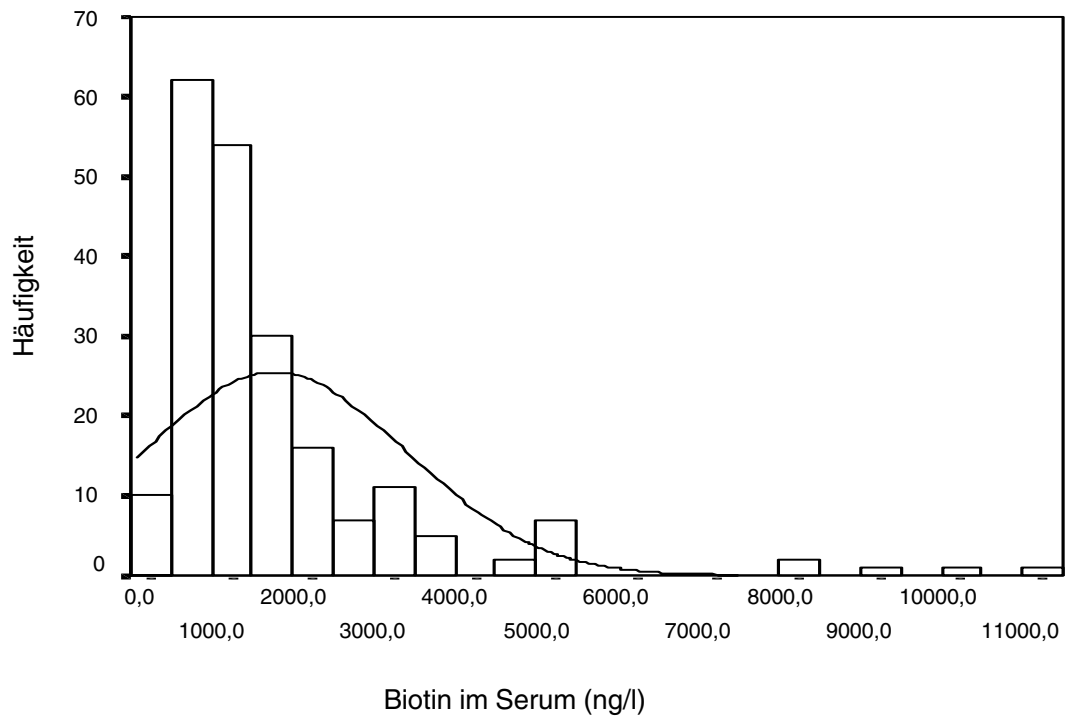


Abb.34: Histogramm Biotin im Serum (3.-0. Woche a.p.).

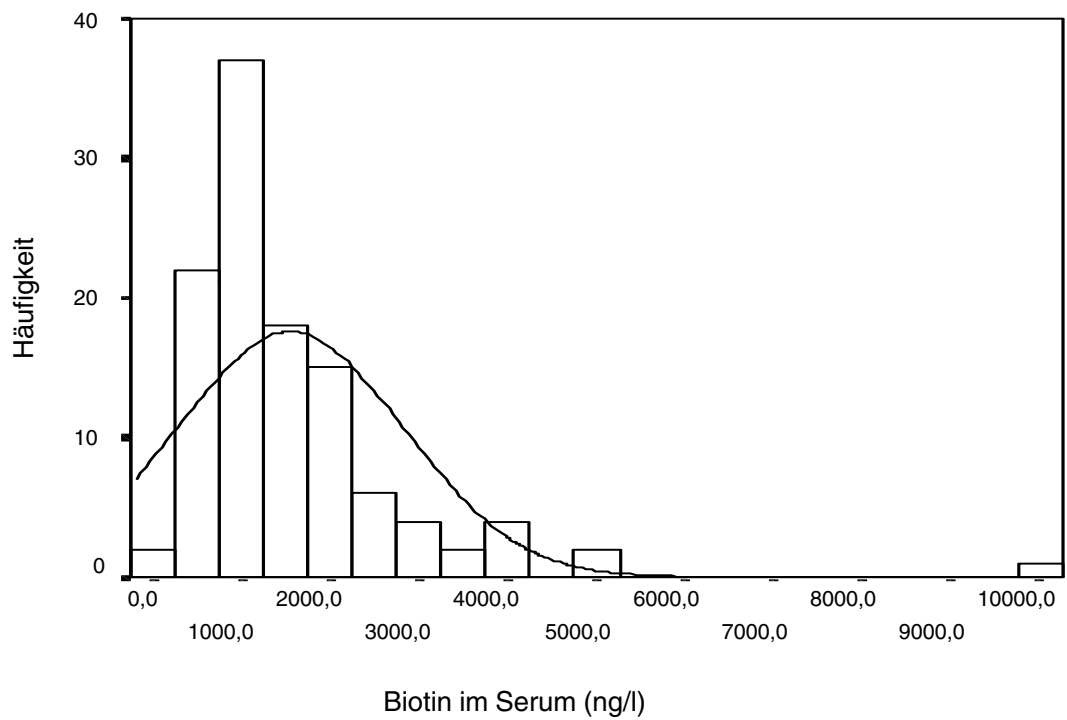


Abb.35: Histogramm Biotin im Serum (0.-1. Woche p.p.).

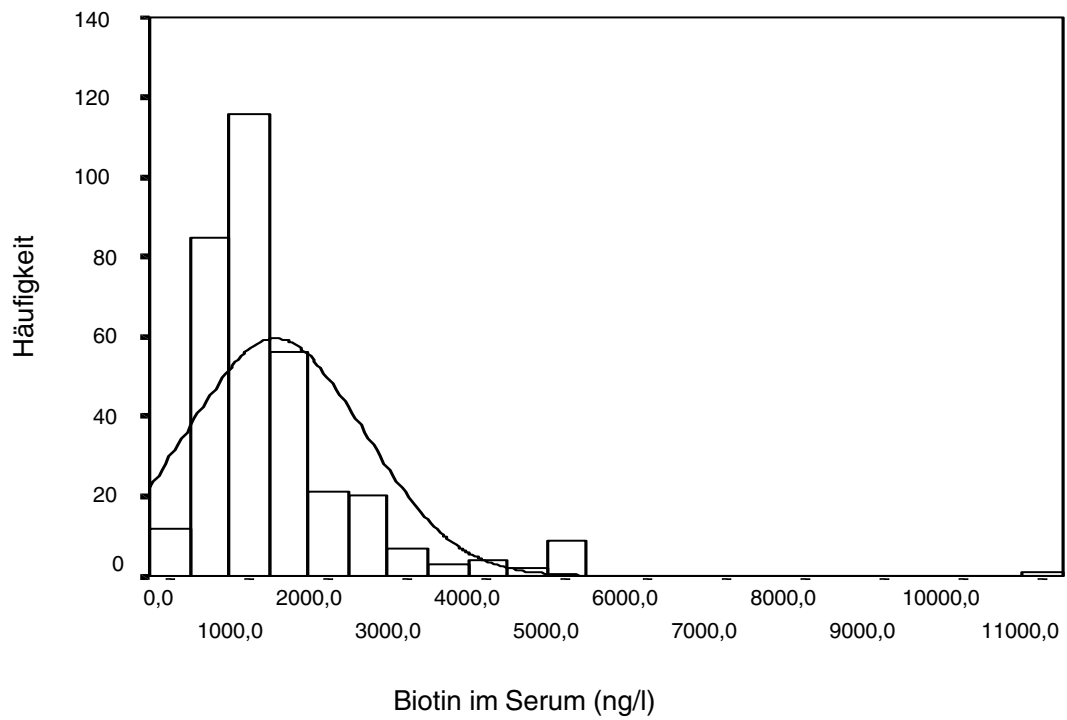


Abb.36: Histogramm Biotin im Serum (3.-5. Woche p.p.).

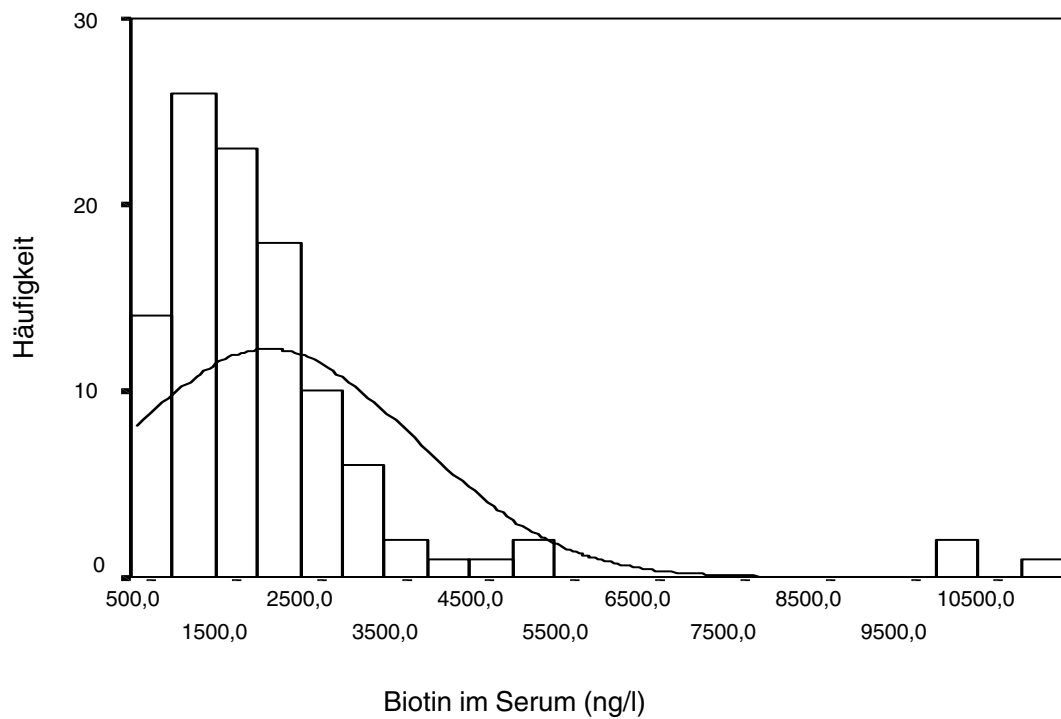


Abb.37: Histogramm Biotin im Serum (15.-18. Woche p.p.).

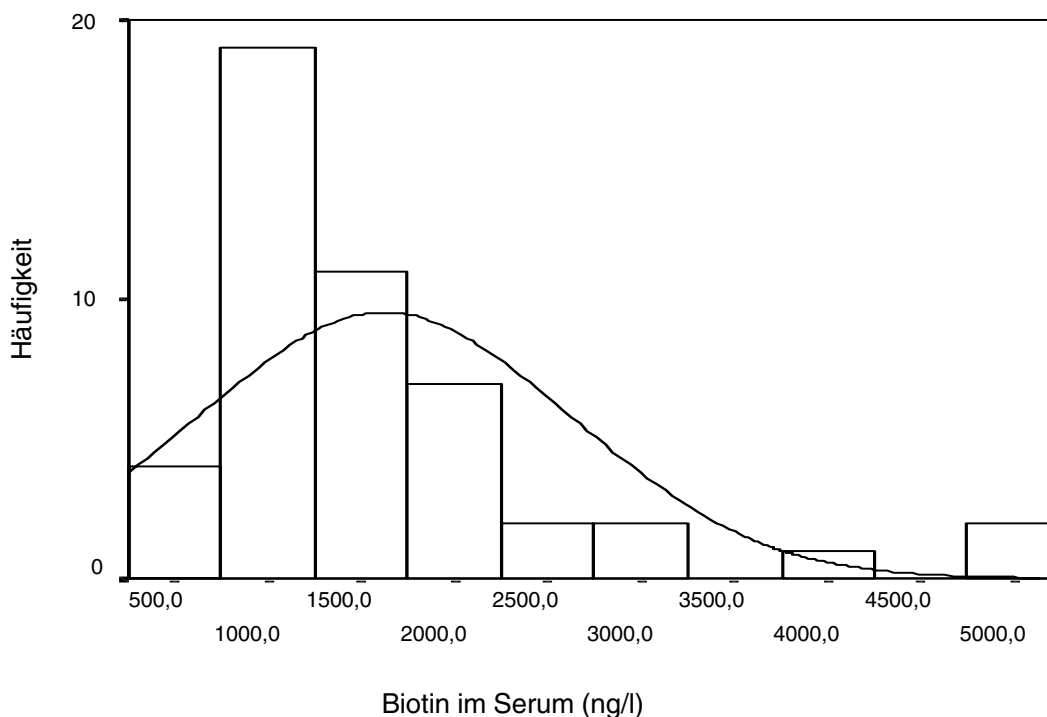


Abb.38: Histogramm Biotin im Serum (8.-3. Woche a.p.).

4.2.4. Folsäure

Die Folsäurekonzentrationen innerhalb der Laktationsgruppen lassen keine Normalverteilung erkennen (Abb.: 39-43). Die Gruppenkombinationen 1 und 3, 1 und 4, 2 und 4, 3 und 5, sowie 4 und 5 wiesen signifikante Unterschiede der Folsäurekonzentrationen im Serum auf (Abb.: 39).

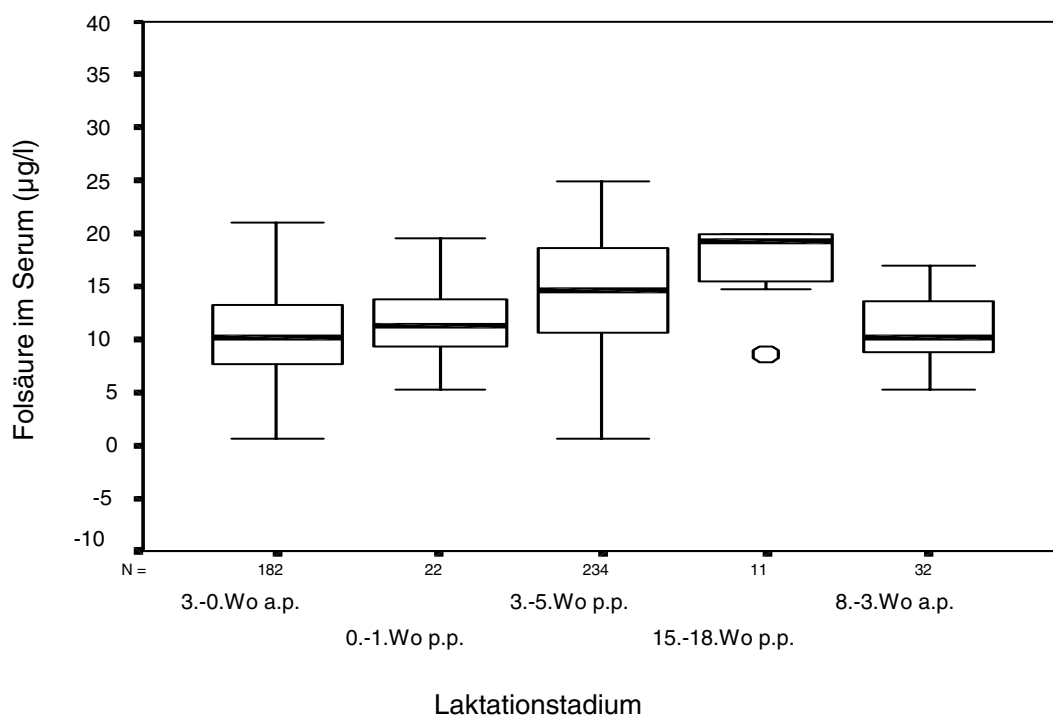
Lediglich bei den Tieren, die sich bis zu einer Woche nach der Kalbung befanden (Abb. 41), lag eine Näherung an die Normalverteilung vor. Bei den übrigen Laktationsgruppen (Abb. 40-44) lag die Folsäurekonzentration im Serum zwischen 0-100 $\mu\text{g/l}$. 88% der Tiere in Gruppe 1, 81% der Tiere in Gruppe 2, 58% der Tiere in Gruppe 3, 27% der Tiere in Gruppe 4 und 93% der Tiere in Gruppe 5 besaßen eine Serumkonzentration der Folsäure, die unterhalb des angegebenen Referenzwertes von $>16 \mu\text{g/l}$ lag.

Bei Tieren, die sich 15-18 Wochen nach der Kalbung befanden (Abb. 39), wurde ein Medianwert (19,2 $\mu\text{g/l}$) oberhalb des Referenzwertes gemessen. Tiere in der ersten Woche nach der Geburt zeigten eine geringere Steuerung der Folsäurekonzentrationen (Tab. 32 und Abb. 39). Hier lag der Maximalwert der Folsäurekonzentration bei 19,6 $\mu\text{g/l}$. Alle anderen Gruppen zeigten Maximalwerte zwischen 7500-12100 $\mu\text{g/l}$.

Der Median lag in allen Gruppen zwischen 10 und 19 $\mu\text{g/l}$. Deutliche Unterschiede wiesen die Mittel- und Medianwerte auf. In der Gruppe 2 lagen Mittel- und Medianwert dicht aneinander (Mittelwert = 11,9 $\mu\text{g/l}$; Median = 11,3 $\mu\text{g/l}$). In der Gruppe 4 wichen Mittel- und Medianwert deutlich voneinander ab (Mittelwert = 2213,8 $\mu\text{g/l}$; Median = 19,2 $\mu\text{g/l}$).

Auch die 5%-95%-Perzentile zeigten, dass in Gruppe 4 die Folsäurekonzentrationen stark differieren (8,5-12100 $\mu\text{g/l}$).

Bei einer relativen Häufigkeit von 9 hatten die Tiere Werte zwischen 0-1000 $\mu\text{g/l}$, und mit einer Häufigkeit von 2 Werte zwischen 11000-1300 $\mu\text{g/l}$.



Laktations- zeitraum	n	\bar{x} [$\mu\text{g/l}$]	Median [$\mu\text{g/l}$]	s [$\mu\text{g/l}$]	x_{\min} [$\mu\text{g/l}$]	x_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	Zeitraum				
							1	2	3	4	5
3.-0.Wo a.p.	182	51,9	10,3	555,2	0,6	7500,0			*	*	
0.-1.Wo p.p.	22	11,9	11,3	3,9	5,3	19,6				*	
3.-5.Wo p.p.	234	111,5	14,6	1050,4	0,6	11400,0					*
15.-18.Wo p.p.	11	2213,8	19,2	4887,9	8,5	12100,0					*
8.-3.Wo a.p.	32	244,6	10,2	1324,0	5,2	7500,0					

Abb. 39: Verhalten der Folsäure (im Serum) in Abhängigkeit vom Laktationszeitraum.

Tab. 32: 5%-95%-Perzentile und 16%-84%-Perzentile von Vitamin B₁ (im Vollblut).

Laktations- zeitraum	5%-95%-Perzentile [µg/l]	16%-84%-Perzentile [µg/l]
3.-0.Wo a.p.	5,5-18,9	6,9-15,2
0.-1.Wo p.p.	5,3-19,6	9,1-17,2
3.-5.Wo p.p.	6,4-20,0	9,1-20,0
15.-18.Wo p.p.	8,5-12100,0	14,2-12100,0
8.-3.Wo a.p.	5,5-2636,1	8,0-14,4

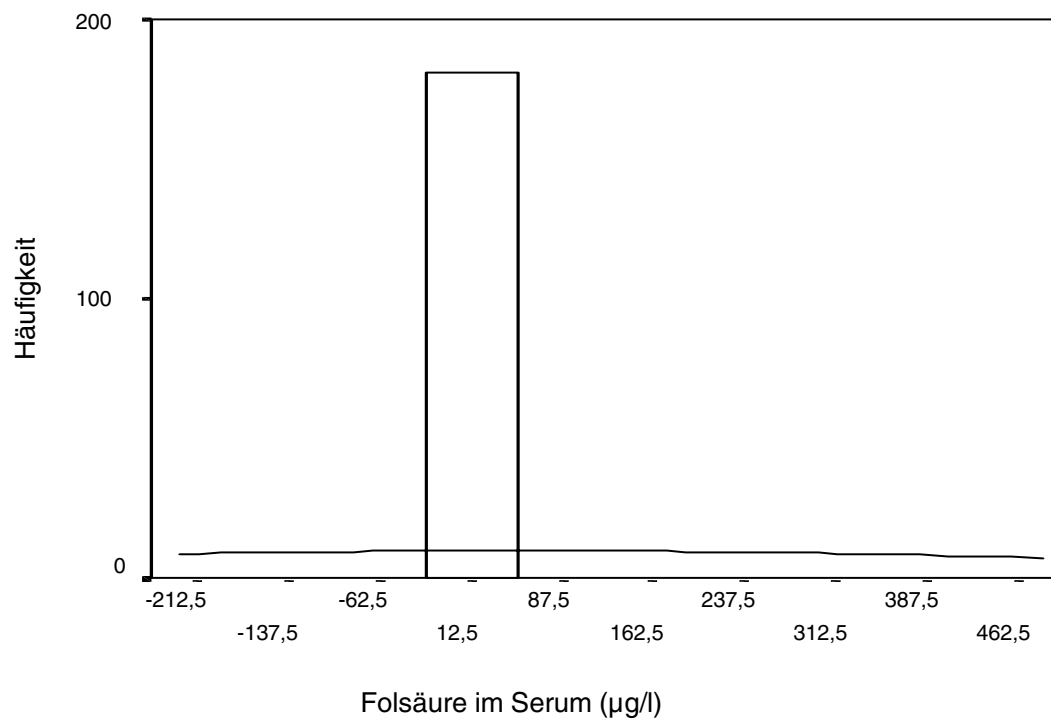


Abb.40: Histogramm Folsäure im Serum (3.-0. Woche a.p.).

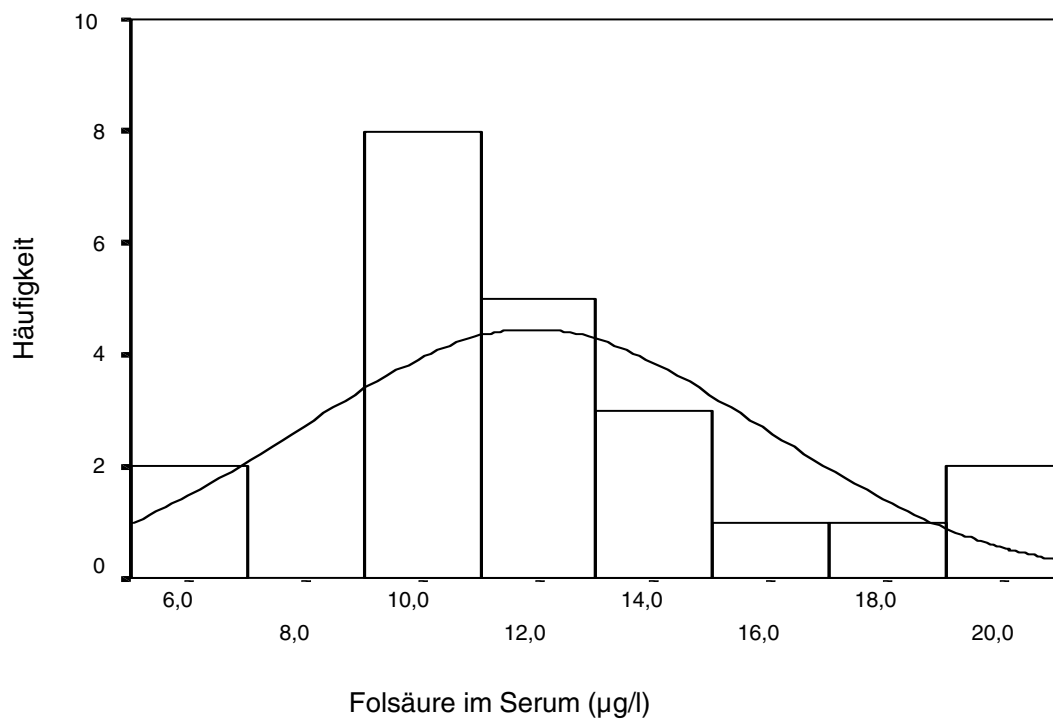


Abb.41: Histogramm Folsäure im Serum (0.-1. Woche p.p.).

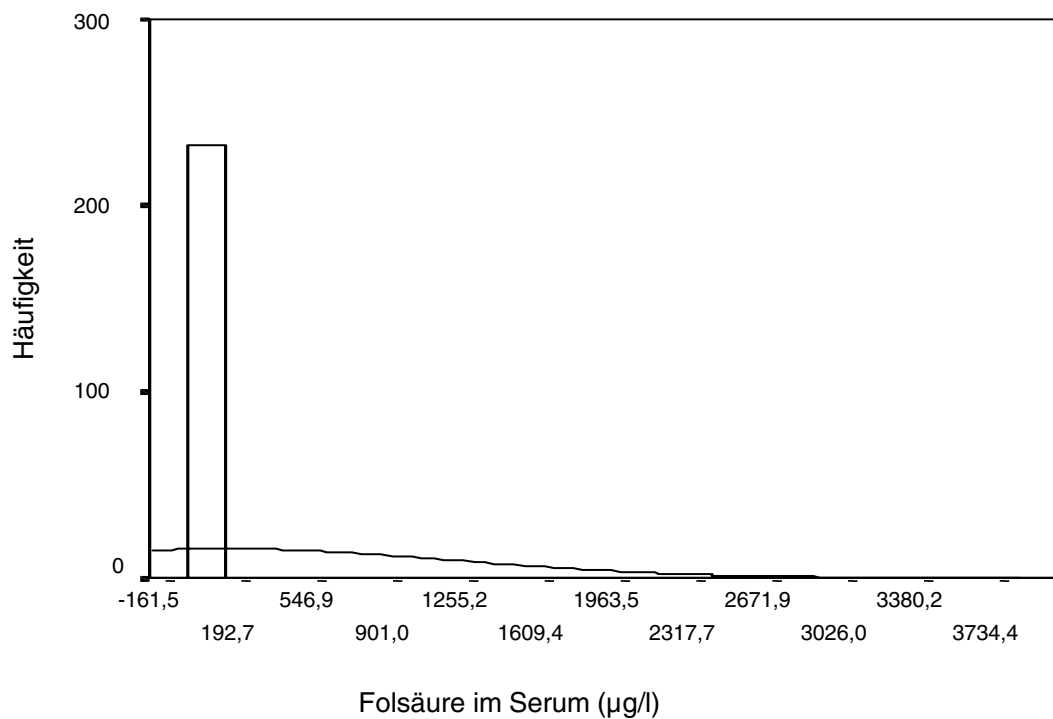


Abb.42: Histogramm Folsäure im Serum (3.-5. Woche p.p.).

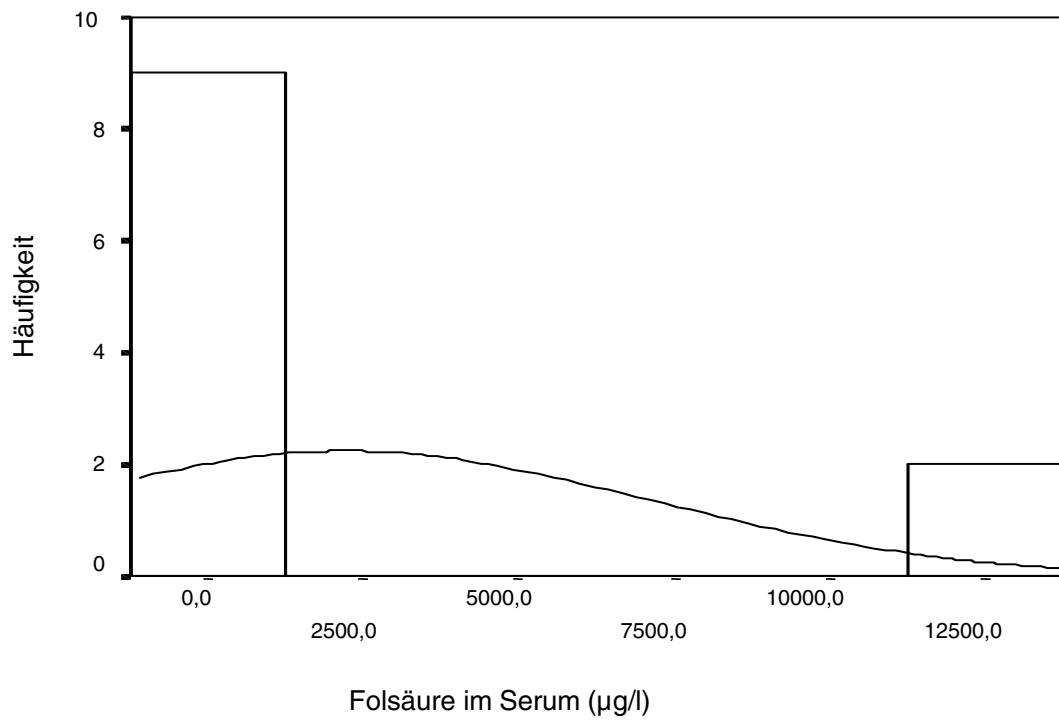


Abb.43: Histogramm Folsäure im Serum (15.-18. Woche p.p.).

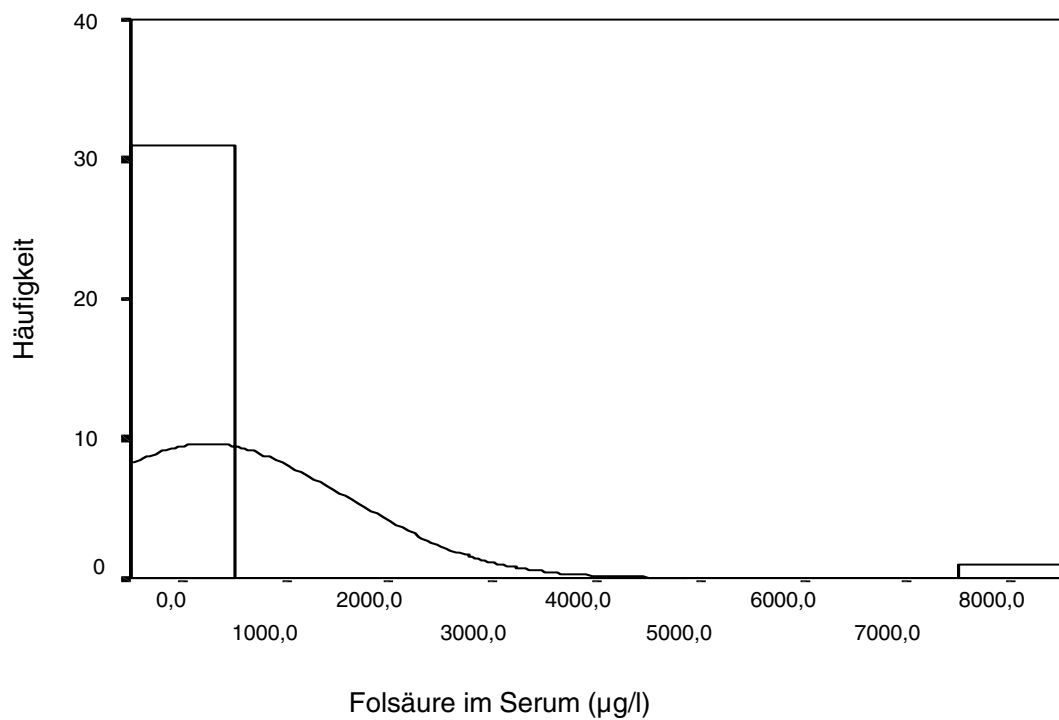


Abb.44: Histogramm Folsäure im Serum (8.-3. Woche a.p.).