

neben organischen Stoffen auch Carbonate liefern, d. h., Carbonate in der Asche auch tatsächlich gefunden werden. In diesem Falle erhielten wir bis 900 °C 3,8 mg, zwischen 900 °C und 1000 °C 6,4 mg, bzw. um 1000 °C 0,81 mg/min Verlust. Der Schmelzpunkt des Systems lag bei 600 °C.

Die Untersuchungen der Salzgemische bestätigten, daß die Verluste während des Aufheizens niedriger sind, als im Falle der separaten Untersuchung der Komponenten. Dies bedeutet, daß die Werte, welche wir bei den Untersuchungen 1–15 erhalten haben, höher sind als bei den Salzgemischen.

In der Tab. 4 haben wir zum besseren Vergleich die Daten der untersuchten Alkalichloride zusammengestellt, und zwar in fallender Reihe hinsichtlich der Temperaturen, ab der die Verdampfung beginnt.

NaCl	Anal. Chim. Acta	2,	97 (1948)
KCl	Anal. Chim. Acta	2,	105 (1948)
KBr	Anal. Chim. Acta	23,	541 (1960)
KJ	Anal. Chim. Acta	15,	223 (1956)
Na ₂ SO ₄	Anal. Chim. Acta	2,	97 (1948)
K ₂ CO ₃	Anal. Chem.	32,	1566 (1960)
Na ₂ CO ₃	Anal. Chim. Acta	13,	32 (1955)
RbCl	Anal. Chim. Acta	2,	110 (1948)
Rb ₂ CO ₃	Anal. Chem.	32,	1566 (1960)
CsCl	Anal. Chim. Acta	2,	205 (1948)

Anschrift des Verfassers:

Dr. BELA LORANT, Institut für Chemie und Lebensmitteluntersuchung, Városház u. 9–11, Budapest V (Ungarn)

*Aus dem Institut für Tierzucht und Tierfütterung der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. Havermann)*

Kobalt- und Vitamin B₁₂-Stoffwechsel

VII. Resorption, Retention und intestinaler Abbau des ⁶⁰Co-2-Methyladenin-cobamids (Faktor A) beim Huhn

Von B. MARQUERING und K. H. MENKE

Mit 2 Tabellen

(Eingegangen am 15. Juni 1967)

Untersuchungen über die bakterielle Synthese von Corrinoiden im Darmtrakt haben ergeben, daß sowohl im Pansen von Rindern (1–3) und Schafen (4) als auch im Blinddarm von Schweinen (5, 6) und Hühnern (7, 8) vorwiegend Purincobamide gebildet werden. Innerhalb dieser Gruppe dominiert das 2-Methyladenin-cobamid (MAC). Die enterale Synthese der Corrinoiden ähnelt somit weitgehend der bei anaerober Vergärung von Faulschlamm (9, 10). Im Gegensatz zum 5,6-Dimethylbenzimidazol-cobamid (Vitamin B₁₂) haben Purincobamide jedoch nur bei Mikroorganismen eine biologische Wirkung (11). Beim Tier sind sie völlig wirkungslos (11–13). In vitro werden Purincobamide zwar ebenso wie Vitamin B₁₂ an den Intrinsic Factor gebunden, die indirekt

über die Beeinflussung der ^{60}Co -B₁₂-Resorption ermittelte Resobierbarkeit der Purincobamide ist jedoch sehr gering (14, 15). Die Retention bzw. Organaffinität des MAC wurde, ebenfalls auf indirektem Wege, mit etwa 50% der des Vitamins B₁₂ ermittelt (14). Direkte Untersuchungen über das Stoffwechselverhalten des MAC konnten bisher nicht durchgeführt werden, da hierfür eine Markierung mit relativ hoher spezifischer Aktivität erforderlich ist.

In den nachstehend beschriebenen Versuchen wurde ^{60}Co -MAC durch in-vitro-Vergärung von $^{60}\text{CoCl}_2$ mit einer Bakterienpopulation aus dem Enddarm des Schweines synthetisiert und nach chromatographischer Reinigung oral an Hühner verabreicht, um die Resorption und Organaffinität direkt bestimmen zu können.

Methodik

Gewinnung des ^{60}Co -MAC

150 g Enddarminhalt vom Schwein wurden in vitro bei 38 °C unter N₂-Atmosphäre mit 110 μC $^{60}\text{CoCl}_2$ (202 μg Co) vergoren (6) und die synthetisierten Corrinoiden nach Phenol-Extraktion in mehreren Schritten an einer Dowex-50×4-Säule chromatographisch getrennt (6, 16, 17). Die im Durchfluß-Szintillationszähler bestimmten MAC-Gipfel aus mehreren Chromatogrammen wurden gesammelt und erneut gereinigt. Die papierchromatographische und elektrophoretische Kontrolle zeigte nach dreifacher Chromatographie einen Anteil von 15% MAC-Monocarbonsäure, die sich am Ionenaustrauscher nicht entfernen ließ, da sie gleichzeitig mit dem MAC ausläuft. Weitere Verunreinigungen konnten nicht nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 0,5%). Die spezifische Aktivität des ^{60}Co -MAC wurde mit 275 mC/mMol bestimmt.

Versuchsdurchführung

Je 1,6 μC des markierten MAC wurden am Versuchstage morgens um 10 Uhr in 2 ml Wasser oral an zwei 7 Monate alte Hennen der Rasse NICHOLS-LOHMAN verabreicht. Die Versuchstiere wurden vor und während des Versuchs mit einer optimal zusammengesetzten Legehennenration gefüttert. 6 bzw. 24 Std. nach Versuchsbeginn wurden die Tiere getötet und die Radioaktivitäten in den Darmabschnitten sowie in Leber, Niere und Blut gemessen. Der im Kot ausgeschiedene ^{60}Co -Gehalt wurde nach 2, 4, 6 und 24 Std. ermittelt. Die Bestimmung des Corrinoidanteils und der Zusammensetzung der Corrinoidfraktion geschah nach den früher beschriebenen Methoden (6, 16, 17).

Versuchsergebnisse und Diskussion

Radioaktivitätsverteilung

Tab. 1 zeigt die Radioaktivitätsgehalte in den Darmabschnitten, den Organen und Ausscheidungen, sowie die daraus berechnete Resorption bzw. Retention nach 6 und 24 Std. Innerhalb von 6 Std. erscheinen etwa 30% der Dosis im Kot, nach 24 Std. haben 60% den Körper wieder verlassen. Im Dünndarm liegen nach 6 Std. noch etwa 12%, nach 24 Std. weniger als 0,5% vor. MAC scheint damit den Dünndarm etwas langsamer zu passieren als anorganisches Kobalt, das in früheren Untersuchungen (8) nach 6 Std. diesen Darmteil schon zu 95% verlassen hatte. Diese Verzögerung dürfte mit der bekannten Affinität der Purincobamide zum Intrinsic Factor zusammenhängen (14). Zugleich kann diese Beobachtung als Bestätigung für die in (8)

Tab. 1. Resorption, Retention und Ausscheidung des ⁶⁰Co-MAC in Prozent der Dosis

	Henne I Versuchsdauer 6 Stunden	Henne II Versuchsdauer 24 Stunden
<i>Faeces</i>		
0 bis 2 Std.	0,03	—
2 bis 4 Std.	16,42	3,16
4 bis 6 Std.	15,47*)	22,77
0 bis 6 Std.	31,92	25,93
6 bis 24 Std.	—	36,82*)
0 bis 24 Std.	—	62,75
<i>Darmabschnitte mit Inhalt</i>		
Magen	0,54	0,05
Duodenum	1,24	0,01
Jejunum/Ileum	10,42	0,44
Caecum	44,88	29,34
	57,08	29,84
<i>Gewebe</i>		
Leber	0,17	0,17
Niere	0,08	0,28
Blut	0,17	0,06
Restkörper (berechnet)	10,58	6,90
	11,00	7,41
Gesamtaktivität	100,00%	100,00%

*) Faeces einschließlich Rectuminhalt.

ausgesprochene Deutung gelten, daß bei Verabreichung von anorganischem Kobalt schon im Dünndarm vollständige Cobamide auftreten, die den Darmtrakt langsamer passieren und daher vom anorganischen Kobalt abgetrennt werden. In den Caeca wird MAC ebenso stark fixiert wie anorganisches Kobalt. Selbst nach 24 Std. finden sich hier noch 30% der Dosis.

Insgesamt befinden sich im Darmtrakt und in den Ausscheidungen nach 6 Std. 89%, nach 24 Std. 92,5%, so daß unter den vorliegenden Bedingungen die Resorption nicht größer als 11% gewesen sein kann. Die Radioaktivitätsgehalte in Leber, Niere und Blut liegen mit 0,1 bis 0,3% der Dosis in der gleichen Größenordnung wie nach Verabreichung von anorganischem Kobalt (7), dessen Resorbierbarkeit ebenfalls mit 5 bis 20% ermittelt wurde (18).

Abbau des MAC im Darmtrakt

Die in den Darmabschnitten und Ausscheidungen vorliegenden ⁶⁰Co-haltigen Corrinoide wurden nach der Phenol-Extraktion chromatographisch getrennt (6, 16). Wie Tab. 2 zeigt, führt der mikrobielle Abbau des MAC nur zu 1 bis 2% zum anorganischen Kobalt, 86 bis 96% der Radioaktivität liegen auch nach der Passage durch den Darmtrakt in einer Corrinoidbindung vor, die mit Phenol extrahierbar ist. Die Differenz von 4 bis 14% wurde im Rückstand gemessen, der das MAC in einer schwer abtrennbaren Bindung enthält. Der Anteil in dieser Bindung ist im Caecum geringer als im Kot.

Die chromatographische Trennung der Corrinoidfraktion in den Ausscheidungen zeigt im Zeitraum bis zu 6 Std. nach Versuchsbeginn noch einen MAC-Anteil von 92 bis 95%. Eine Umwandlung in andere Purincobamide findet nur in sehr geringem Umfang statt, ebenso liegt der Abbau zum basenfreien Cobamid, zum Cobinamid und zur Cobyrssäure bei nur 1%. Hingegen tritt mit 3 bis 4% eine Fraktion auf, die bisher nicht identifiziert werden konnte. Aufgrund früherer Untersuchungen wurde sie aber als cobamidhaltig erkannt, da sie nach wiederholter Chromatographie in basenfreies Cobamid gespalten wird (8). Der Anteil an dieser Fraktion steigt mit zunehmender Vergärung: Dünndarm (6 Std.) 5,3%, Kot (6–24 Std.) 5,9%, Caecum (6 Std.) 11,5%, Caecum (24 Std.) 14,7%.

Tab. 2. Zusammensetzung der Corrinoidfraktion im Kot, Dünndarm- und Caecuminhalt.

Substanz	Inkuba- tions- zeit/h	⁵⁵ Co- Corr.- Gehalt	⁵⁵ Co ⁺⁺ - Gehalt	MAC	andere Purin- Cobam.	B ₁₂	Cob- amid	Cobin- amid	Cobyr- säure	N. C.
Henne I (Versuchsdauer 6 Std.)										
Kot	2–4	86,9	1,6	92,3	1,9	—	1,3	0,7	0,4	3,4
Kot	4–6	89,4	1,8	94,6	0,7	—	0,4	0,7	0,3	3,3
Dünndarm- inhalt	6	85,8	2,3	80,6	4,5	—	6,9	1,7	1,0	5,3
Caecum- inhalt	6	96,0	0,6	60,9	8,8	—	0,7	15,5	2,6	11,5
Henne II (Versuchsdauer 24 Std.)										
Kot	4–6	88,9	1,2	92,6	0,8	—	0,7	1,5	0,4	4,0
Kot	6–24	90,5	2,2	54,8	8,1	0,8	1,3	26,9	2,2	5,9
Caecum- inhalt	24	90,6	1,4	46,9	10,8	—	1,4	25,2	1,0	14,7

MAC = 2-Methyladenin-cobamid; andere Purin-Cobamide = Adenin-cobamid + 2-Methylmercaptoadenin-cobamid + Guanin-cobamid; B₁₂ = Vitamin B₁₂; N.C. = Nicht identifizierte kobalthaltige Verbindungen.

Zugleich sinkt mit steigender Inkubationszeit der Anteil an markiertem MAC unter 50%. Zum überwiegenden Teil wird das MAC durch Abspaltung des Nukleotids in Cobinamid überführt, das im Caecum nach 6 Std. 15% und nach 24 Std. 25% ausmacht. Diesen Abbauweg beobachteten wir in schwächerem Maße schon in früheren in-vitro-Versuchen (6). Eine Abtrennung der Purinbase scheint nur im Dünndarm zu erfolgen. Ebenso findet eine Desaminierung zur Cobinamid-monocarbonsäure nur in sehr geringem Umfang statt.

Bemerkenswert ist hingegen die Umwandlung des MAC in andere Purin-cobamide, die im Caecum und in den Ausscheidungen (6–24 Std.) mit 8 bis 10% verbreitet sind. Im Kot werden überdies bei der Lagerung an der Luft Spuren von Vitamin B₁₂ gebildet, wie dies auf indirektem Wege schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (19).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die gewährte Sachbeihilfe.

Zusammenfassung

2,94 µg ^{60}Co -2-Methyladenin-cobamid (MAC) wurden nach oraler Verabreichung an zwei erwachsene Hennen innerhalb von 6 und 24 Std. zu ca. 30 bzw. 60% wieder ausgeschieden und nur zu 11 bzw. 8% resorbiert. Die Gehalte in Leber, Niere und Blut lagen zusammen unter 0,5% der verabreichten Dosis. Im Caecum sind auch nach 24 Std. noch 30% der Radiaaktivität konzentriert. Durch bakteriellen Abbau werden im Caecum innerhalb von 24 Std. 50 bis 60% des ^{60}Co -MAC in Cobinamid (25%), andere Purin-cobamide (10%) und in eine nicht identifizierte cobamidhaltige Fraktion (15%) überführt. Nur 2% werden bis zum anorganischen Kobalt abgebaut. Markiertes Vitamin B_{12} entstand im Kot während der Lagerung an der Luft zu 0,8%, wohingegen es im Darmtrakt nicht nachzuweisen war.

Literatur

1. FORD, J. E., S. K. KON und J. W. G. PORTER, Biochem. J. **50**, 9 (1951). — 2. MENKE, K. H., F. KNAPPEN und B. MARQUERING, Z. Tierphys., Tierernähr. und Futtermittelkde. **19**, 89 (1963). — 3. PORTER, J. W. G. In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, Hrsg. H. C. HEINRICH, S. 43 (Stuttgart 1957). — 4. MENKE, K. H. und B. MARQUERING, In: Radio-isotopes in Animal Nutrition and Physiologie. Int. Symposium Prag, Int. Atomic Energy Agency, S. 373 (Wien 1965). — 5. BROWN, F. B., J. C. CAIN, D. E. GANT, L. F. J. PARKER und E. L. SMITH, Biochem. J. **59**, 82 (1955). — 6. MARQUERING, B., Dissertation (Bonn 1965). — 7. MENKE, K. H., Habilitationsschrift (Bonn 1960). — 8. MENKE, K. H., B. MARQUERING und D. GRÄFE, Z. Tierphys., Tierernähr. und Futtermittelkde. **20**, 264 (1965). — 9. BERNHAUER, K., O. MÜLLER und F. WAGNER, In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, Hrsg. H. C. HEINRICH, S. 37 (Stuttgart 1962). — 10. BERNHAUER, K., O. MÜLLER und F. WAGNER, Angew. Chemie **75**, 1145 (1963). — 11. COATES, M. E. und S. K. KON, s. Ref. (3), S. 72. — 12. HOPPER, J. H. und B. C. JOHNSON, J. Anim. Sci. **12**, 921 (1953). — 13. FIRTH, J. and B. C. JOHNSON, Science **120**, 352 (1954). — 14. HEINRICH, H. C. und E. E. GABBE, s. Ref. (9), S. 252. — 15. FORD, J. E., E. S. HOLDSWORTH und J. W. G. PORTER, Proc. Nutrition Soc. **12**, 11 (1953). — 16. MENKE, K. H., Z. Physiol. Chemie **336**, 257 (1964). — 17. MENKE, K. H., J. Chromatography (Amst.) **7**, 86 (1962). — 18. SMITH, E. L., In: Mineral Metabolism, 2. Bd. Teil B, Hrsg. COMAR-BRONNER, S. 349 (New York 1962). — 19. MENKE, K. H. und B. MARQUERING, Z. Ernährungswiss. **6**, 77 (1965).

Anschriften der Verfasser:

Dr. B. MARQUERING, Institut für Tierzucht und Tierfütterung der Universität, 53 Bonn, Endenicher Allee 15
und

Prof. Dr. K. H. MENKE, Institut für Tierernährungslehre der Landwirtschaftlichen Hochschule, 7 Stuttgart-Hohenheim

BUCHBESPRECHUNGEN

Handbuch der Lebensmittelchemie. Von J. SCHORMÜLLER. Band II/2. Teil: Analytik der Lebensmittel. XXXII, 1552 Seiten mit 162 Abbildungen (Berlin-Heidelberg-New York 1967, Springer-Verlag). Preis: geb. DM 389,—.

Bezüglich der Neuauflage des bekannten Handbuchs der Lebensmittelchemie wurden in dieser Zeitschrift schon einige allgemeine Beobachtungen gemacht und die zwei 1965 erschienenen Bände besprochen [diese Z. **6**, 280 (1966) und **7**, 135 (1966)].

Jetzt liegt schon Band II/2. Teil vor. Das Inhaltsverzeichnis enthält folgende Kapitel (zwischen Klammern der Umfang in Seitenzahl): Wasserbestimmung (45), Mineralstoffe, Aufbereitung der Proben, Gesamtasche, einzelne Mineralstoffe (36), Mineralstoffe: Spuren-