

J. Benedikt
D.A. Roth-Maier
M. Kirchgeßner

Untersuchungen zum Einfluß einer unterschiedlichen Vitamin-B₆-Versorgung auf den Vitamin-B₆-Status (Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin) der Leber und des Körpers laktierender Ratten

Investigations on the effect of different vitamin B₆ supply on vitamin B₆ status (pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine) in liver and body of lactating rats

Zusammenfassung 80 weibliche Sprague-Dawley Ratten erhielten während der Gravidität eine semisynthetische Diät mit einer Zulage von 5 mg Vitamin B₆/kg Diät. Die tägliche Futteraufnahme betrug 14 g pro Tier. Für den Zeitraum bis zum 14. Tag der Laktation wurden je acht Tiere mit insgesamt zehn verschiedenen Vitamin-B₆-Zulagestufen versorgt (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 36, 360 und 3 600 mg/kg Diät). Das Futter wurde ad libitum vorgelegt. Am 14. Tag der Laktation wurden die Tiere dekapitiert. Als Parameter zur Bestimmung des Vitamin-B₆-Status wurden die Konzentrationen von Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin in der Leber und im Körper mittels HPLC bestimmt. Als Körper wurde der vom Magen-Darm-Trakt befreite

Tierkörper bezeichnet, der in Restkörper (extrahepatische Kompartimente ohne Leber) und Gesamtkörper (extrahepatische Kompartimente plus Leber) unterteilt wurde.

Das Organgewicht der Leber war über alle Zulagestufen gleich und betrug im Durchschnitt 13 g bei einem Trockensubstanzgehalt von 33 %. Die Vitamin-B₆-Konzentration bewegte sich zwischen 5,0 µg/g Frischmasse (FM) in der niedrigsten Zulagestufe und 10,9 µg/g FM in der höchsten Zulagestufe. Das Gesamtvitamin B₆ setzte sich im Durchschnitt aus 38 % Pyridoxal und 62 % Pyridoxamin zusammen und war nur in der höchstdosierten Zulagestufe durch einen Anteil von 20 % Pyridoxin zuungunsten von Pyridoxamin signifikant verschoben. Das Restkörpergewicht zeigte keine Unterschiede zwischen den Vitamin-B₆-Zulagestufen und lag im Durchschnitt bei 212 g, bei einem Trockensubstanzgehalt von 31 %. Die Vitamin-B₆-Konzentration bewegte sich in den Zulagestufen 0 bis 360 mg Vitamin B₆/kg Diät in einem kleinen Intervall zwischen 2,1 µg/g FM und 2,8 µg/g FM, bei einer Zulage von 3 600 mg/kg Diät ergab sich eine signifikante Erhöhung auf 7,5 µg/g FM. Die Zusammensetzung des Gesamtvitamins bestand im Durchschnitt zu 63 % aus Pyridoxal und zu 37 % aus Pyridoxamin und zeigte sich nur in der hochdosierten Zu-

lagestufe durch einen Anteil von 56 % Pyridoxin zuungunsten von Pyridoxal und Pyridoxamin signifikant verändert. Insgesamt zeigte sich die Vitamin-B₆-Konzentration der Leber als leichter durch die alimentäre Versorgung zu beeinflussen. Die quantitativ größte Menge an Vitamin B₆, lokalisiert im Restkörper, stellte sich als schwerer zu beeinflussen heraus. Im Gesamtkörper ergaben sich ähnliche Verhältnisse wie im Restkörper, der etwa 95 % des Vitamin-B₆-Bestandes enthält. Anhand zweier mathematischer Modelle wurde eine statistische Bedarfsableitung durchgeführt und die generelle Eignung der Parameter für die Bedarfsableitung überprüft. Aufgrund der Ergebnisse ergibt sich während der Laktation bei Verwendung der beschriebenen Diät eine bedarfsgerechte Vitamin-B₆-Versorgung bei 5 bis 6 mg pro kg Diät.

Summary Eighty female Sprague-Dawley rats were fed a semisynthetic diet during gravidity which was supplemented with 5 mg vitamin B₆ per kg diet. The daily food intake was 14 g. During the following lactation the rats were assigned to one of 10 vitamin B₆ treatment groups (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 36, 360 and 3 600 mg per kg diet). The feed was given ad libitum. At day 14 of lactation the rats were decapitated.

Eingegangen: 4. Oktober 1995
Akzeptiert: 4. Dezember 1995

J. Benedikt · D.A. Roth-Maier ·
Prof. Dr. h.c. mult. M. Kirchgeßner (✉)
Institut für Ernährungsphysiologie
Technische Universität München
85350 Freising-Weihenstephan

Parameters for determination of the vitamin B₆ status were concentration of pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine in liver and body analyzed by using HPLC. Body was defined without the gastroenteral tract that was divided into carcass (extrahepatic compartments without liver) and total body (extrahepatic compartments plus liver).

The mean weight of liver was 13 g with a dry mass of 33 %; there was no difference between the treatment groups. The vitamin B₆ concentration was lowest in rats fed 0 mg vitamin B₆/kg diet (5 µg/g fresh matter, FM) and highest in the rats fed 3 600 mg vitamin B₆/kg diet (10.9 µg/g FM). The total vitamin B₆ consisted on the average of 38 % pyridoxal and 62 % pyridoxamine. This was only

changed significantly at the highest supplementation level, where 20 % pyridoxine were detected instead of pyridoxamine.

The mean weight of carcass averaged 212 g at a dry matter content of 31 %. The vitamin B₆ concentration ranged in the treatment groups from 0 mg to 360 mg vitamin B₆/kg diet between 2.1 µg/g FM and 2.8 µg/g FM. It was highest in the 3 600 mg vitamin B₆ treatment group at 7.5 µg/g FM. The total vitamin B₆ consisted of 63 % pyridoxal and 37 % pyridoxamine. It was only significantly affected in the 3 600 mg vitamin B₆ treatment group, where also pyridoxine could be found in the amount of 56 %.

The results indicate that alimentary vitamin B₆ supply had more influence on liver vitamin B₆

concentration than on carcass concentration. Total body concentration is very similar as carcass concentration, as 95 % of vitamin B₆ is located there. The suitability of the parameters for the evaluation of the vitamin B₆ requirement was confirmed by the comparison of two statistical methods. It is concluded that a vitamin B₆ supply of 5 to 6 mg/kg diet is necessary to meet the requirements during lactation.

Schlüsselwörter Vitamin-B₆-Status – Pyridoxin – Pyridoxal – Pyridoxamin – Laktation – Ratte

Key words Vitamin B₆ status – pyridoxine – pyridoxal – pyridoxamine – lactation – rat

Einleitung

Der Vitamin-B₆-Status des Organismus kann anhand der Bestimmung verschiedener indirekter Parameter, die in einer bekannten Weise am Vitamin-B₆-Stoffwechsel beteiligt sind, definiert werden (1, 17). Die Untersuchungen sind in der Regel sehr praktikabel in der Durchführung und auch in der Humanmedizin leicht anwendbar. Im Gegensatz dazu stehen direkte Konzentrationsbestimmungen des entsprechenden Vitamins in den verschiedenen Körperkompartimenten. Hierbei ergeben sich insbesondere Fragen der Speicherung, der Mobilität und der Zusammensetzung des Gesamtvitamins aus den Vitameren (siehe z.B. 16). In der vorliegenden Untersuchung sollte dabei der laktierende Organismus einer besonderen Betrachtung unterzogen werden, weil die Vitamin-B₆-Versorgung während der Stillzeit sowohl für den maternalen Organismus, als auch für die Entwicklung der Nachkommen eine große Bedeutung hat.

Material und Methoden

Zur Beantwortung der Fragen wurde ein Versuch mit zehn unterschiedlichen Vitamin-B₆-Zulagen von 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 36, 360 und 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät während der Laktation geplant. Als Versuchstiere dienten 80 weibliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 12 Wochen. Während der achtwöchigen Versuchsperiode wurde den Tieren eine semisynthetische Diät nach Pallauf und Kirchgeßner (11) verfüttert. Diese Diät war mit ei-

nem analysierten Gehalt von 0,2 mg/kg praktisch Vitamin-B₆-frei (1). Der Gesamtversuch wurde in die drei Abschnitte Vorperiode, Gravidität und Laktation unterteilt. Während der dreiwöchigen Vorperiode erhielten die Tiere täglich 25 g energiereduziertes Futter mit einem Rohproteingehalt von 18,6 % und einem Gehalt an umsetzbarer Energie von 14,3 MJ ME/kg T, bei einer einheitlichen Vitamin-B₆-Zulage von 3 mg/kg Diät. Nach der Paarung wurden an die Tiere 14 g Futter verfüttert, mit einem Rohproteingehalt von 20,8 %, einem Gehalt an umsetzbarer Energie von 17,4 MJ ME/kg T und einer Vitamin-B₆-Zulage von 5 mg/kg Diät. Nach der Geburt der Jungtiere (Tag 1 der Laktation) erfolgte die Einteilung der Tiere in zehn Vitamin-B₆-Zulagegruppen. Die jeweilige Zulagestufe wurde an acht Muttertiere über 14 Tage der Laktation verabreicht. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Haltung der Tiere erfolgte, bei einer Temperatur von 23 °C und 60 % relativer Luftfeuchte, in einem vollklimatisierten Raum. In der Zeit von 6.00 bis 18.00 Uhr wurden die Ratten mit Dämmerlicht, sonst bei Dunkelheit gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen, als Einstreu diente keimarmes Weichholzgranulat.

Am 14. Tag der Laktation wurden die Tiere dekapiert. Die Bauchhöhle wurde geöffnet, um die Leber und den Magen-Darm-Trakt zu entfernen. Der Körper war der vom Magen-Darm-Trakt befreite Tierkörper und wurde in Restkörper (extrahepatische Kompartimente ohne Leber) und Gesamtkörper (extrahepatische Kompartimente und Leber) unterteilt. Bis zur Analyse wurden die Proben tiefgekühlt (-25 °C) gelagert. Die zu untersuchenden Le-

berproben wurden bei -40 °C für 90 Stunden gefriergetrocknet (Freeze Mobile Fa. Vertis, New York) und anschließend mit einer mahlgutgekühlten Universal-Mühle (Fa. Janke & Kunkel, Staufen) pulverisiert. Um den Restkörper in einen vollständig homogenen Zustand zu überführen, wurde die gefrostete Probe mit einem Kutter (Fa. Hobart, Troy, Ohio) zerkleinert und anschließend gefriergetrocknet (Freeze Mobile Fa. Vertis, New York). Der getrocknete Restkörper wurde daraufhin mit einer Moulinette (Electronic 899, Moulinex, Paris) ca. 3 Sekunden lang homogenisiert und anschließend mit einer Universal-Mühle (Janke & Kunkel, Staufen) pulverisiert.

Die analytische Bestimmung von Vitamin B₆ wurde in den untersuchten Kompartimenten mittels der Hochdruck-Flüssigchromatographie durchgeführt. Dabei kam eine Methode nach Bognar (4) zur Anwendung, wobei die drei Komponenten Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin getrennt erfaßt und anschließend zum Gesamtvitamin-B₆-Gehalt aufsummiert wurden. Die Registrierung der einzelnen Peaks erfolgte durch den quantitativen und qualitativen Vergleich mit einem Standardgemisch, bestehend aus Pyridoxamin, Pyridoxal und Pyridoxin (Fa. Sigma, St. Louis), jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml.

Zur Ermittlung des Trockensubstanzgehaltes des Körpers und der Leber wurden 3 g beziehungsweise 1 g der zerkleinerten und gefriergetrockneten Probenmasse für 3 Stunden bei 105 °C getrocknet. Aus der Gewichtsdivergenz vor und nach der Trocknung wurde der Trockensubstanzgehalt in Prozent errechnet. Zusammen mit der Gewichtsdivergenz während des Gefrieretrocknens ergab sich daraus der gesamte Trockensubstanzgehalt.

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit dem Statistikprogramm Minitab, Version 7. Mit dem F-Test wurden die Behandlungseffekte auf Signifi-

kanz geprüft. Bei signifikanten F-Werten ($p < 0,05$) wurde ein multipler Mittelwertvergleich nach Tukey durchgeführt. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte wurden mit unterschiedlichen Hochbuchstaben gekennzeichnet, gleiche oder fehlende Hochbuchstaben zeigen an, daß sich die Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Abhängigkeit der Vitamin-B₆-Konzentrationen von der Vitamin-B₆-Aufnahme wurde anhand von Regressionsanalysen über die Gruppenmittelwerte errechnet. Bei der Darstellung der entsprechenden Kurven wurde ein logarithmisch transformierter Maßstab des Abszisse in der Form Vitamin-B₆-Zulage + 1 verwendet, um den breiten Bereich der Vitamin-B₆-Versorgung in übersichtlicher Form erfassen zu können.

Ergebnisse

Zum Zeitpunkt des Deckens wiesen die Rattenweibchen ein Durchschnittsgewicht von 212 ± 19 g auf. Nach der Geburt der Jungtiere lag das Durchschnittsgewicht bei 242 ± 17 g. Während der Laktation kam es zu keiner wesentlichen Gewichtsveränderung, am 14. Tag der Laktation wogen die Tiere im Mittel 251 ± 23 g, wobei die unterschiedlichen Vitamin-B₆-Zulagen keine Unterschiede zwischen den Gruppen hervorriefen. Die Reproduktionsleistung ergab je Wurf durchschnittlich 13 ± 2 Jungtiere mit einem mittleren Einzelgewicht von $5,3 \pm 0,3$ g.

Im Durchschnitt über alle Tiere betrug das Organgewicht der Leber $12,7 \pm 2,2$ g bei einem mittleren Trockensubstanzgehalt von $33,46 \pm 2,28$ %. Beim Vergleich der Gruppenmittelwerte zeigten sich für beide Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zulagestufen. Die Versorgung der Tiere mit Vitamin B₆ spiegelte sich jedoch in der Vitamin-B₆-Konzentration der

Tab. 1 Vitamin-B₆-Konzentration (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin) in der Leber am 14. Tag der Laktation in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, µg/g FM*

Vitamin-B ₆ -Zulage in der Laktation, mg/kg										
	0	3	6	9	12	15	18	36	360	3 600
Vit-amin B ₆ Gesamt	4,98 ^e ± 1,32	6,02 ^d ± 0,59	6,65 ^{cd} ± 0,79	6,76 ^{cd} ± 0,65	7,03 ^{cd} ± 0,79	7,04 ^{bc} ± 0,98	7,10 ^{bc} ± 0,84	7,31 ^{bc} ± 0,63	8,06 ^b ± 1,19	10,92 ^a ± 1,77
PL	1,62 ^c ± 0,73	2,11 ^c ± 0,37	2,49 ^{bc} ± 0,37	2,52 ^{bc} ± 0,32	2,72 ^{bc} ± 0,49	2,61 ^{bc} ± 0,59	2,82 ^{bc} ± 0,56	2,83 ^{bc} ± 0,50	3,36 ^b ± 0,82	4,18 ^a ± 0,72
PM	3,36 ^b ± 0,82	3,91 ^{ab} ± 0,40	4,16 ^{ab} ± 0,65	4,24 ^{ab} ± 0,54	4,31 ^{ab} ± 0,53	4,43 ^{ab} ± 0,58	4,28 ^{ab} ± 0,65	4,48 ^a ± 0,58	4,71 ^a ± 0,48	4,52 ^a ± 0,92
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,22 ^a ± 1,27

* = Varianzanalyse mit logarithmisch transformierten Werten

n.n. = unter der Nachweisgrenze

Leber wider (Tab. 1). Auf die defizitäre Versorgungsstufe 0 mg Vitamin B₆/kg Diät reagierte die Leber mit einer signifikant erniedrigten Vitamin-B₆-Konzentration. Die Konzentration in der Zulagestufe mit 3 mg Vitamin B₆/kg Diät war gegenüber den Versorgungsstufen ab 15 mg Vitamin B₆/kg Diät ebenfalls signifikant erniedrigt. Ab einer Zufuhr von 6 mg Vitamin B₆ bis zur Zulagestufe mit 36 mg Vitamin B₆/kg Diät zeigte die Vitamin-B₆-Konzentration der Leber keine signifikanten Unterschiede. Durch die Versorgungsstufe 360 mg Vitamin B₆/kg Diät erhöhte sich die Vitamin-B₆-Konzentration ebenfalls nur leicht, die Versorgungsstufe mit 3 600 mg Vitamin B₆ verursachte eine signifikante Erhöhung der Konzentration gegenüber allen anderen Zulagestufen.

Mit Ausnahme der Zulagestufe 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät war die Gesamtvitamin-B₆-Konzentration aus den Vitameren Pyridoxal und Pyridoxamin zusammengesetzt. Dabei ergab sich für Pyridoxal mit steigender Vitamin-B₆-Zufuhr eine erhöhte Konzentration in der Leber, wobei signifikante Unterschiede nur zwischen den defizitären und den hochdosierten Zulagestufen auftraten. Ähnliches wurde für die Pyridoxaminkonzentration beobachtet, der niedrigste Gruppenmittelwert ergab sich in der Zulagestufe mit 0 mg Vitamin B₆. Die Konzentration von Pyridoxin blieb bis zur Versorgungsstufe 360 mg Vitamin B₆/kg Diät unter der Nachweisgrenze von 0,01 µg/g FM, bei einer Zulage von 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät ergab sich ein sprunghafter Anstieg auf $2,22 \pm 1,27$ µg/g FM.

Die in Tabelle 2 dargestellte prozentuale Zusammensetzung der Gesamtvitamin-B₆-Konzentration in der Leber ergab für Pyridoxal in allen Zulagestufen konstante Anteile, die im Durchschnitt bei 38 % lagen. Für Pyridoxamin zeigten sich in den Versorgungsstufen 0 mg bis 360 mg Vitamin B₆/kg Diät ebenfalls konstante Anteile von durchschnittlich 63 %, bei einer Zulage von 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät erniedrigte sich der Anteil jedoch signifikant auf $41,6 \pm 6,4$ %. Das lediglich in der Zulagestufe 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät nachweisbare

Pyridoxin machte hier einen Anteil von 19,8 % am Gesamtvitamin aus.

Die Vitamin-B₆-Konzentration des Restkörpers repräsentiert die extrahepatische Menge an Vitamin B₆ im Tierkörper ohne Magen-Darm-Trakt. Im Durchschnitt aller Tiere betrug das Gewicht des Restkörpers $212,4 \pm 18,7$ g, der Trockensubstanzgehalt lag bei $30,76 \pm 1,21$ %. Beim Vergleich der Gruppenmittelwerte zeigten sich in diesen beiden Kriterien keine signifikanten Differenzen.

In Tabelle 3 ist die Vitamin-B₆-Konzentration im Restkörper dargestellt. Im Vergleich zur Leber wies der Restkörper im Mittel um 57 % erniedrigte Werte auf, bezogen auf 1 g FM. In den Vitamin-B₆-Zulagestufen 3 mg bis 360 mg Vitamin B₆/kg Diät zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der defizitären Versorgungsstufe 0 mg Vitamin B₆ ergab sich der niedrigste Wert, was gegenüber den Konzentrationen der Zulagestufen ab 36 mg Vitamin B₆ signifikant abgesichert war. Insgesamt zeigte sich der Restkörper als der geringer durch die Vitamin-B₆-Zulagen beeinflusste Parameter. Wie bereits in der Leber beobachtet, setzte sich die Gesamtvitamin-B₆-Konzentration auch im Restkörper, mit Ausnahme der Zulagestufe 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät, aus den Vitameren Pyridoxal und Pyridoxamin zusammen. Für Pyridoxal ergab sich eine signifikant erniedrigte Konzentration in der Zulage mit 0 mg Vitamin B₆ und eine erhöhte Konzentration in der Versorgungsstufe mit 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät. In den dazwischenliegenden Zulagestufen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Konzentration an Pyridoxamin war zwischen den Zulagestufen 3 mg bis 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät sehr konstant und lag im Durchschnitt bei 0,99 µg/g FM. In der defizitären Zulagestufe war die Pyridoxaminkonzentration signifikant erniedrigt. Pyridoxin wurde nur in der Zulagestufe mit 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät nachgewiesen und erreichte eine Konzentration von $4,44 \pm 1,83$ µg/g FM. Die Vitamin-B₆-Konzentration des Ge-

Tab. 2 Prozentuale Zusammensetzung der Vitamin-B₆-Konzentration (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin) in der Leber am 14. Tag der Laktation in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, %*

	Vitamin-B ₆ -Zulage in der Laktation, mg/kg									
	0	3	6	9	12	15	18	36	360	3 600
PL	31,5 ^a ± 9,1	35,0 ^a ± 4,5	37,6 ^a ± 4,8	37,4 ^a ± 4,2	38,6 ^a ± 4,6	36,9 ^a ± 5,1	39,6 ^a ± 5,6	38,7 ^a ± 5,6	41,1 ^a ± 5,1	38,6 ^a ± 6,7
PM	68,5 ^a ± 9,0	65,0 ^a ± 4,5	62,4 ^a ± 4,8	62,6 ^a ± 4,2	61,4 ^a ± 4,6	63,1 ^a ± 5,1	60,4 ^a ± 6,0	61,3 ^a ± 5,6	58,9 ^a ± 5,1	41,6 ^b ± 6,4
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	19,8 ^a ± 9,3

* = Varianzanalyse mit logarithmisch transformierten Werten

n.n. = unter der Nachweisgrenze

Tab. 3 Vitamin-B₆-Konzentration (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin) im Rest- und Gesamtkörper am 14. Tag der Laktation in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, µg/g FM*

Vitamin-B ₆ -Zulage in der Laktation, mg/kg										
	0	3	6	9	12	15	18	36	360	3 600
Restkörper										
Vit-amin B ₆ Gesamt	2,10 ^c ± 0,36	2,48 ^{bc} ± 0,16	2,65 ^{bc} ± 0,14	2,64 ^{bc} ± 0,20	2,63 ^{bc} ± 0,10	2,61 ^{bc} ± 0,12	2,68 ^{bc} ± 0,21	2,76 ^b ± 0,23	2,76 ^b ± 0,28	7,52 ^a ± 1,87
PL	1,39 ^c ± 0,26	1,55 ^{bc} ± 0,11	1,61 ^{bc} ± 0,10	1,68 ^{bc} ± 0,13	1,65 ^{bc} ± 0,11	1,59 ^{bc} ± 0,16	1,72 ^b ± 0,17	1,73 ^b ± 0,18	1,74 ^b ± 0,25	2,09 ^a ± 0,24
PM	0,71 ^b ± 0,12	0,93 ^a ± 0,09	1,04 ^a ± 0,09	0,96 ^a ± 0,09	0,98 ^a ± 0,13	1,02 ^a ± 0,14	0,96 ^a ± 0,08	1,03 ^a ± 0,10	1,02 ^a ± 0,08	0,99 ^a ± 0,09
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,44 ^a ± 1,83
Gesamtkörper										
Vit-amin B ₆ Gesamt	2,18 ^c ± 0,32	2,50 ^{bc} ± 0,15	2,79 ^{bc} ± 0,11	2,80 ^b ± 0,19	2,84 ^b ± 0,07	2,78 ^b ± 0,11	2,86 ^b ± 0,26	2,99 ^b ± 0,21	3,03 ^b ± 0,29	7,67 ^a ± 1,67
PL	1,35 ^c ± 0,27	1,53 ^{bc} ± 0,11	1,61 ^{bc} ± 0,07	1,68 ^b ± 0,11	1,67 ^b ± 0,12	1,61 ^b ± 0,14	1,74 ^b ± 0,18	1,76 ^b ± 0,16	1,81 ^b ± 0,24	2,21 ^a ± 0,24
PM	0,83 ^b ± 0,10	1,06 ^a ± 0,07	1,18 ^a ± 0,08	1,12 ^a ± 0,10	1,17 ^a ± 0,11	1,17 ^a ± 0,16	1,13 ^a ± 0,12	1,23 ^a ± 0,08	1,21 ^a ± 0,09	1,25 ^a ± 0,14
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,21 ± 1,65

* = Varianzanalyse mit logarithmisch transformierten Werten

n.n. = unter der Nachweisgrenze

samtkörpers setzt sich aus den Gehalten der Leber und des Restkörpers zusammen. Wie Tabelle 3 zeigt, ergaben sich ähnliche Verhältnisse wie im Restkörper, da hier etwa 95 % des Gesamtvitamin-B₆-Bestandes des Körpers lokalisiert sind.

Tabelle 4 zeigt die prozentuale Zusammensetzung der Gesamtvitamin-B₆-Konzentration im Restkörper. In den Zulagestufen 0 mg bis 360 mg Vitamin B₆/kg Diät ergaben sich für Pyridoxal und für Pyridoxamin konstante Anteile, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Durchschnitt wurde die Gesamtvitamin-B₆-Konzentration hier zu 63 % aus Pyridoxal und zu 37 % aus Pyridoxamin gebildet. Signifikant verschoben waren die Anteile in der Zulagestufe mit 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät. Die prozentuale Verteilung im Gesamtkörper zeigt eine ähnliche Zusammensetzung wie im Restkörper, die differierenden Vitameranteile der Leber ergaben nur geringe Veränderungen im Gesamtkörper.

Diskussion

Leber

Die Ergebnisse zeigen einen Einfluß der nutritiven Vitamin-B₆-Aufnahme auf die Vitaminkonzentration in der Leber. Dabei stimmen die analysierten Werte gut mit denen von Hammoudia und Leclerc (7) überein, die ebenfalls am 14. Tag der Laktation bei Ratten ermittelt wurden. Ab einer Vitamin-B₆-Zulage von 6 mg bis 36 mg/kg Diät konnte der Vitamin-B₆-Status der Leber nicht signifikant verbessert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Kirksey und Susten (8) die, mit den Zulagestufen 1,2; 2,4; 4,8; 9,6 und 19,2 mg Vitamin B₆/kg Diät während der Gravidität und der Laktation, nur für die ersten zwei Zulagestufen signifikant erniedrigte Vitamin-B₆-Leberwerte gefunden haben. Bei einer Untersuchung an graviden und nichtgraviden Ratten konnten Reithmayer et al.

Tab. 4 Prozentuale Zusammensetzung der Vitamin-B₆-Konzentration (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin) im Rest- und Gesamtkörper am 14. Tag der Laktation in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, %*

Vitamin-B ₆ -Zulage in der Laktation, mg/kg										
	0	3	6	9	12	15	18	36	360	3 600
Restkörper										
PL	65,9 ^a ± 2,5	62,5 ^a ± 2,3	60,9 ^a ± 2,1	63,6 ^a ± 1,4	62,7 ^a ± 4,3	61,0 ^a ± 5,2	64,1 ^a ± 3,5	62,5 ^a ± 2,6	63,1 ^a ± 3,2	29,5 ^b ± 8,6
PM	34,1 ^a ± 2,5	37,5 ^a ± 2,3	39,1 ^a ± 2,1	36,4 ^a ± 1,4	37,3 ^a ± 4,3	39,0 ^a ± 5,2	35,9 ^a ± 3,5	37,5 ^a ± 2,6	36,9 ^a ± 3,2	14,2 ^b ± 5,1
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	56,3 ^a ± 13,6
Gesamtkörper										
PL	61,6 ^a ± 2,9	59,1 ^a ± 1,9	57,7 ^a ± 1,8	60,0 ^a ± 1,9	58,7 ^a ± 3,8	57,8 ^a ± 5,0	60,6 ^a ± 3,6	58,9 ^a ± 2,1	59,7 ^a ± 2,9	28,8 ^b ± 8,2
PM	38,4 ^a ± 3,0	40,9 ^a ± 1,9	42,3 ^a ± 1,8	40,0 ^a ± 1,9	41,3 ^a ± 3,7	42,2 ^a ± 5,0	39,4 ^a ± 3,6	41,1 ^a ± 2,1	40,2 ^a ± 2,8	16,3 ^b ± 5,1
PN	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	54,9 ^a ± 13,3

* = Varianzanalyse mit logarithmisch transformierten Werten

n.n. = unter der Nachweisgrenze

(13) ab einer Zulage von 6 mg Vitamin B₆/kg Diät auch durch Zulagen von 12 mg, 24 mg und 48 mg Vitamin B₆/kg Diät keine signifikante Erhöhung des Vitamin-B₆-Status der Leber erreichen. Roth-Maier und Kirchgeßner (14) fanden bei steigendem alimentären Angebot von Vitamin B₆ höhere Konzentrationen an diesem Vitamin in der Leber wachsender Ratten, wobei höhere Gaben von 6 mg bis 24 mg Vitamin B₆/kg Diät keine wesentlichen Veränderungen hervorriefen. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung hervorgeht, verursachen erst höhere Zulagestufen von 360 mg und 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät eine signifikante Erhöhung der Vitamin-B₆-Konzentration in der Leber (Abb. 1).

Die Veränderung der Vitamin-B₆-Konzentration, besonders bei der Zulagestufe von 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät, spiegelt sich auch in veränderten Anteilen der Vitamere wider. Unter physiologischen Bedingungen besteht die Vitamin-B₆-Konzentration der Leber zum Großteil aus den phosphorylierten Formen von Pyridoxal und Pyridoxamin (19). Furth-Walker et al. (6) zeigten eine Korrelation von 0,86 zwischen der alimentären Vitamin-B₆-Aufnahme und der Pyridoxal- und Pyridoxaminkonzentration der Leber. In den vorliegenden Untersuchungen konnten diese Ergebnisse für die Vitamin-B₆-Zulagestufen bis 360 mg bestätigt werden (Korrelations-

koefizient = 0,716), bei einer Versorgung mit 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät erscheinen im Durchschnitt noch zusätzlich 2,22 µg Pyridoxin pro g Leberfrischmasse. Eine wesentliche Aufgabe der Leber im Vitamin-B₆-Stoffwechsel besteht darin, alimentär aufgenommenes Pyridoxin über die Zwischenstufe Pyridoxal-5'-Phosphat in Pyridoxal umzuwandeln. Durch die in allen peripheren Zellen vorhandene Pyridoxalkinase kann dann im Blut zirkulierendes Pyridoxal über „metabolic trapping“ in die Zelle aufgenommen und somit verfügbar gemacht werden. Die enzymatische Konvertierung von Pyridoxin zu Pyridoxal erfordert jedoch das Vorhandensein von Pyridoxinphosphatase, die primär in der Leber vorhanden ist. Der Nachweis von Pyridoxin in der Leber bei hochdosierten Vitamin-B₆-Zulagen von 3 600 mg/kg Diät deutet auf eine nicht vollständig stattgefundene Konvertierung des alimentär aufgenommenen Pyridoxins durch die FMN-abhängige Pyridoxinphosphatase hin.

Die hier vorliegende Versuchsanstellung mit gestaffelten alimentären Vitamin-B₆-Zulagestufen während der Laktation und die daraus resultierenden Leberkonzentrationen sind auch dazu geeignet, Aussagen zum Vitamin-B₆-Bedarf zu machen. Die Eignung eines Parameters für eine Bedarfsabschätzung ergibt sich aus der Dosis-Wirkungsabhängigkeit und erfordert die Ausbildung eines

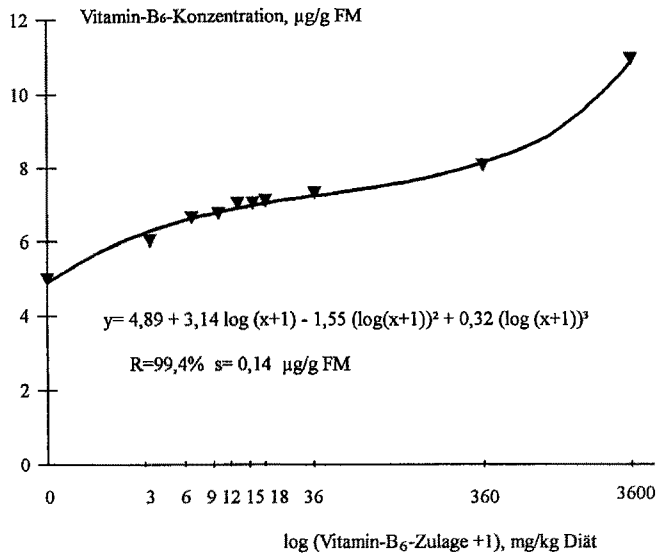


Abb. 1 Vitamin-B₆-Konzentration der Leber in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, µg/g FM.

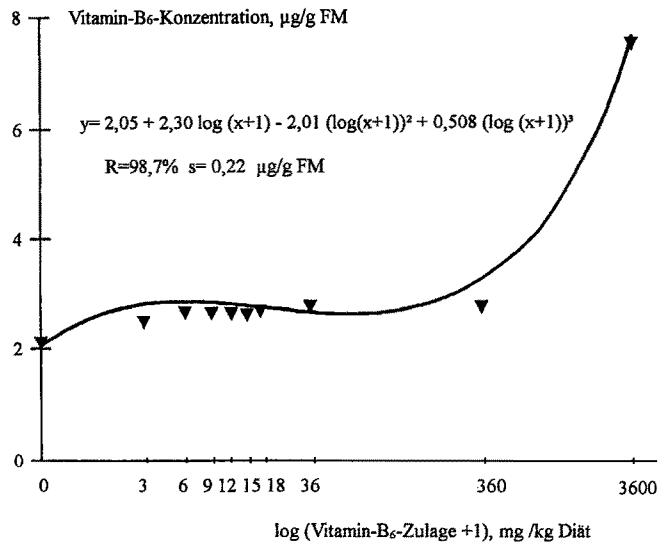


Abb. 2 Vitamin-B₆-Konzentration des Restkörpers in Abhängigkeit von der Vitamin-B₆-Zulage, µg/g FM.

nichtzuverbessernden Plateaus (14). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Bedarfsableitung anhand zweier, bereits in einer früheren Arbeit beschriebener (1), statistischer Modelle durchgeführt, dem linearen „broken-line“-Modell und dem nichtlinearen „Reading-Modell“. Im „broken-line“-Modell wird der Bedarf im Schnittpunkt der Steigungsgerade und der „no-response“-Gerade ermittelt. Im „Reading-Modell“ setzt sich die Gesamtfunktion aus einem quadratischen ansteigenden Teil und dem linearen Teil der „no-response“-Werte zusammen. Hierbei wird der resultierende Bedarf im Maximum der quadratischen Funktion abgeleitet. Bedingt durch den mathematischen Ansatz wird der Bedarf im linearen Modell unterschätzt, im quadratischen Modell überschätzt. Die Differenz zwischen den beiden Bedarfszahlen gibt einen Hinweis auf die generelle Eignung des Parameters für eine Bedarfsabschätzung. Die errechneten Regressionsgleichungen lauten wie folgt:

	„no-response“- Wert	„break-point“ (= Bedarf)
„broken-line“-Modell: $y = 5,04 + 0,27 x$	7,04 µg/g FM	7,18 mg/kg Diät
Reading-Modell: $y = 5,04 + 0,33 x - 0,01 x^2$	7,10 µg/g FM	12,31 mg/kg Diät

Der statistisch errechnete Vitamin-B₆-Bedarf liegt demnach unter Verwendung des „broken-line“-Modells bei 7,18 mg/kg Diät, nach Berechnung durch das Reading-Modell bei 12,31 mg/kg Diät. Die vergleichsweise hohe Bedarfszahl nach dem Reading-Modell erklärt sich aus der zwar nicht signifikanten, aber tendenziell erkennbaren Konzentrationserhöhung oberhalb einer Zulage von 6 mg Vitamin B₆/kg Diät. Bei der quadratischen Kurven-

führung wird ein höheres Plateau verursacht. Aus diesem Ergebnis wird deutlich, daß die Vitamin-B₆-Konzentration der Leber im Bereich physiologischer Zulagen keiner eindeutigen Sättigung unterliegt, sondern mit zunehmender Versorgung tendentiell ansteigt, weswegen die errechneten Bedarfszahlen der beiden verwendeten Modelle relativ weit auseinander liegen.

Rest- und Gesamtkörper

Mit einem Anteil von 70 bis 80 % am Gesamtkörper-Bestand bildet die Skelettmuskulatur den Hauptspeicherort für Vitamin B₆. Davon erscheint der größte Anteil in Form von Pyridoxalphosphat als Coenzym gebunden an einen Lysinrest der Glycogen-Phosphorylase (2, 3, 5, 10). Die Vitamin-B₆-Konzentration im Restkörper repräsentiert unter anderem auch den Anteil der Skelettmuskulatur. Ein direkter Vergleich mit anderen Literaturstellen ist nur eingeschränkt möglich, da die Zusammensetzung und Definition des Restkörpers in den verschiedenen Arbeiten variieren.

In der vorliegenden Arbeit ist der Restkörper als ausbluteter Gesamtkörper ohne Leber und Verdauungstrakt definiert. Die im homogenisierten Restkörper ermittelten Vitamin-B₆-Konzentrationen stimmen gut mit den Ergebnissen von Hammoudia und Leclerc (7), bei laktierenden Ratten am 14. Tag der Laktation gemessen, überein. Die Versuchstiere erhielten mit Beginn der Laktation Vitamin-B₆-Zulagen in der Dosierung 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 und 16 mg/kg Diät. Der Restkörper bestand in dieser Untersuchung aus den gleichen Kompartimenten wie in der hier vorgestellten Untersuchung.

Die Vitamin-B₆-Konzentration im Restkörper erweist sich als eine sehr konstante Größe, die letztlich nur durch eine hochdosierte Vitamin-B₆-Zulage von 3 600 mg/kg Diät signifikant verändert werden kann (Abb. 2). In einer vergleichenden Untersuchung zum Vitamin-B₆-Status gravider und nichtgravider Ratten verweisen Reithmayer et al. (13) auf eine zögernde Erhöhung der Vitamin-B₆-Konzentration des Restkörpers in einem Zulagebereich von 1 mg bis 40 mg Vitamin B₆/kg Diät. Dabei werden für gravide Tiere geringere Vitamin-B₆-Konzentrationen festgestellt als für nichtgravide, was auf eine hormonell bedingte, erhöhte Wasserretention zurückgeführt wird. In einer induzierten Mangelsituation mit Vitamin-B₆-freier Ernährung von wachsenden Ratten finden Roth-Maier und Kirchgeßner (15) eine geringe Änderung in der Vitamin-B₆-Konzentration des Gesamtkörpers. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Russel et al. (18) bei einer Studie mit Jungsaugen, wobei ein Vitamin-B₆-Mangel nur geringen Einfluß auf die Gehalte an Muskel-Pyridoxalphosphat und Phosphorylase hat. Black et al. (2, 3) untersuchten das Verhalten der Muskel-Phosphorylase als ein Reservoir für Vitamin B₆ im Organismus. Mit zunehmender Vitamin-B₆-Aufnahme ergaben sich zwar höhere Gehalte an Phosphorylase im Muskel junger Ratten, nach einer anschließenden Vitamin-B₆-Depletion blieb der Phosphorylasegehalt jedoch unbeeinflusst. Erst eine durch längeren Vitamin-B₆-Mangel hervorgerufene Anorexia bewirkt eine Reduzierung der Muskel-Phosphorylase. Die Muskel-Phosphorylase ist somit nach dem Vorschlag von Krebs und Fischer (9), bedingt durch den stöchiometrischen Gehalt an Pyridoxalphosphat, ein Reservoir für Vitamin B₆, die Abnahme der Muskel-Phosphorylase wird jedoch durch eine Anorexia und nicht durch einen Vitamin-B₆-Mangel per se verursacht. Im Gesamtkörper ergaben sich ähnliche Verhältnisse wie im Restkörper, der etwa 95 % des Vitamin-B₆-Bestandes enthält.

Die Zusammensetzung der Vitamin-B₆-Konzentration aus den Vitameren ergibt ein ähnliches Bild wie bereits in anderen Kompartimenten beobachtet. Die Zulage von 3 600 mg Vitamin B₆/kg Diät bewirkt auch im Rest- und

Gesamtkörper das Vorhandensein einer beträchtlichen Menge Pyridoxin. Dieser Sachverhalt läßt vermuten, daß alimentär aufgenommenes Pyridoxin zwar nicht vollständig zu Pyridoxalphosphat konvertiert wird, ein Transport in peripheres Gewebe aber dennoch stattfindet. Der hohe Anteil von 50 % Pyridoxin am Gesamtvitamin B₆ im Restkörper, im Vergleich zu einem Anteil von nur 20 % Pyridoxin in der Leber, deutet auf eine verstärkte Assimilierung des nichtkonvertierten Pyridoxins im extrahepatischen Raum hin. In sämtlichen anderen Zulagestufen beschränkt sich die Zusammensetzung des Gesamtvitamins B₆ auf konstante Anteile von Pyridoxal und Pyridoxamin im Verhältnis 3:2.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen machen deutlich, daß der Vitamin-B₆-Bestand des Organismus durch eine unterschiedliche alimentäre Versorgung schwerer zu beeinflussen ist, wobei die Mobilität der stoffwechselaktiven Leber noch höher zu bewerten ist als der mengenmäßig größere Bestand in den extrahepatischen Kompartimenten.

Bezüglich der Bedarfsermittlung anhand der statistischen Modelle ergeben sich für den Restkörper folgende Ergebnisse:

	„no-response“-Wert	„break-point“ (= Bedarf)
„broken-line“-Modell: $y = 2,10 + 0,12 x$	2,66 µg/g FM	4,43 mg/kg Diät
Reading-Modell: $y = 2,10 + 0,16 x - 0,01 x^2$	2,66 µg/g FM	7,01 mg/kg Diät

Berücksichtigt man die Differenz der Bedarfszahlen zwischen den beiden statistischen Modellen, so liegt diese für den Parameter Restkörper unter dem des Parameters Leber. Aufgrund dieser Ergebnisse sowie auch der früher durchgeführten Untersuchungen von Benedikt et al. (1) kann geschlossen werden, daß bei einer semisynthetischen Diät mit einem Rohproteinanteil von 20,8 % und einem Gehalt an umsetzbarer Energie von 17,4 ME/kg T eine Vitamin-B₆-Zulage von 5 bis 6 mg/kg Diät als bedarfsdeckend für laktierende Ratten angesehen werden kann.

Literatur

- Benedikt J, Roth-Maier DA, Kirchgeßner M (1996) Zum Einfluß einer variierten Vitamin-B₆-Versorgung auf die Aktivität spezifischer Transaminasen laktierender Ratten. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 75: 73–82
- Black AL, Guirard BM, Snell EE (1977) Increased muscle phosphorylase in rats fed high levels of vitamin B₆. *J Nutr* 107:1962–1968
- Black AL, Guirard BM, Snell EE (1978) The behavior of muscle phosphorylase as a reservoir for vitamin B₆ in the rat. *J Nutr* 108:670–677
- Bognar A (1985) Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssig-Chromatographie (HPLC). *Z Lebensmitt Untersuch* 181: 200–205
- Coburn SP, Ziegler PJ, Costill DL, Mahuren JD, Fink WJ, Chaltenbrand WE, Pauly TA, Pearson DR, Conn PS, Guilarte TR (1991) Response of vitamin B₆ content of muscle to changes in vitamin B₆ intake in men. *Am J Clin Nutr* 53:1436–1442
- Furth-Walker D, Leibman D, Smolen A (1990) Relationship between blood, liver, and brain pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate concentration in mice. *J Nutr* 120:1338–1343
- Hammoudia F, Leclerc J (1981) Etat de nutrition vitaminique B₆ de la ratte allaitante et de sa portee en fonction de l'apport alimentaire de vitamine B₆. *Internat J Vit Nutr Res* 51:223–231
- Kirksey A, Susten SS (1978) Influence of different levels of dietary pyridoxine on milk composition in the rat. *J Nutr* 108:113–119
- Krebs EG, Fischer EH (1964) Phosphorylase and related enzymes of glycogen metabolism. *Vitam Horm* 22:399–410

10. Machlin LJ (ed) (1991) Handbook of vitamins. Second edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel
11. Pallauf J, Kirchgeßner M (1971) Experimenteller Zinkmangel bei wachsenden Ratten. 2. Mitteilung: Zum Stoffwechsel des Zinks im tierischen Organismus. Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde 28:128
12. Reithmayer F, Roth-Maier DA, Kirchgeßner M (1985) a: Untersuchungen zum Vitamin-B₆-Status und zur Vitamin-B₆-Ausscheidung von Ratten in der Gravidität bei unterschiedlicher Vitamin-B₆-Versorgung. Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde 53:70–78
13. Reithmayer F, Roth-Maier DA, Kirchgeßner M (1985) b: Vergleichende Untersuchungen zum Vitamin-B₆-Status gravider und nichtgravider Ratten bei unterschiedlicher Vitamin-B₆-Versorgung. Z Ernährungswiss 24:30–43
14. Roth-Maier DA, Kirchgeßner M (1981) Zur Homöostase und zum Bedarf von Vitamin B₆ bei wachsenden Ratten. Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde 46:247–254
15. Roth-Maier DA, Kirchgeßner M (1989) Verlauf von Vitamin-B₆-Gehalten wachsender Ratten bei Vitamin-B₆-freier Ernährung. Z Ernährungswiss 28:231–239
16. Roth-Maier DA (1994) Ausgewählte Aspekte der B-Vitamine in der Ernährungsphysiologie. Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Ernährung. ETH-Zürich Heft 33:49–64
17. Roth-Maier DA, Benedikt J, Kirchgeßner M (1996) Zum Einfluß der alimentären Vitamin-B₆-Versorgung während Gravidität und Laktation auf die Aktivität spezifischer Transaminasen laktierender Ratten. Z Ernährungswiss 35: (im Druck)
18. Russell LE, Bechtel PJ, Easter RA (1985) Effect of deficient and excess dietary vitamin B₆ on amino transaminase and glycogen phosphorylase activity and pyridoxal phosphate content in two muscles from postpubertal gilts. J Nutr 115:1124–1135
19. Van Den Berg H, Bogaards JJP, Sinkeldam EJ, Schreurs WHP (1982) Effect of different levels of vitamin B₆ in the diet of rats on the content of pyridoxamine-5'-phosphate and pyridoxal-5'-phosphate in the liver. Internat J Vit 52:407–416