

Zur effektiven intraluminalen Konzentration von Riboflavin und Pyridoxin in verschiedenen Darmabschnitten der Ratte

H. Daniel, G. Höfler und G. Rehner

Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

Zielsetzung der Untersuchung war es, in einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes von Ratten jene Konzentration an Riboflavin und Pyridoxin zu ermitteln, die sich intraluminal innerhalb bestimmter Zeiträume nach Verabreichung der Vitamine einstellt. Die Testsubstanzen wurden als ^{14}C -Riboflavin und ^3H -Pyridoxin in halbflüssiger Nahrung intragastral gesondet. Nach 30 Minuten, 1, 2, 6, 12 und 24 Stunden wurde bei je 6 Tieren die Konzentration der Vitamine im Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum radiochemisch bestimmt. Im Duodenum war die maximale Konzentration des Riboflavins (10,4 nmol/l) nach 2 Stunden, diejenige des Pyridoxins (5,5 nmol/l) nach 1,5 Stunden erreicht. Im Jejunum stellte sich die Höchstkonzentration – mit 4,1 nmol/l Riboflavin und 3,0 nmol/l Pyridoxin – für beide Vitamine 1,5 Stunden nach dem Sonden ein. Wie am Beispiel des Riboflavins diskutiert wird, ist die Kenntnis der physiologisch relevanten Konzentration von Mikronährstoffen am Resorptionsort essentiell, wenn Transportmechanismen geklärt werden sollen.

Summary

The study was designed to determine the intraluminal concentration of riboflavin and pyridoxine in different gastrointestinal segments of rats as a function of time after intragastric application of the vitamins. A semi-liquid diet with ^{14}C -riboflavin and ^3H -pyridoxine was delivered by tube. After a period of 30 minutes, 1, 2, 6, 12 or 24 hours, respectively, concentrations of the vitamins were determined by radiochemical methods in stomach, duodenum, jejunum and ileum. In the duodenum highest concentration of riboflavin (10.4 nmol/l) was reached 2 hours, that of pyridoxine (5.5 nmol/l) 1.5 hours after intubation. In jejunum maximum concentration of both vitamins – 4.1 nmol/l riboflavin and 3.0 nmol/l pyridoxine – was found 1.5 hours after tube feeding. As discussed for riboflavin, precise information about the physiologically relevant intraluminal concentration of micro-nutrients in the absorbing intestinal segments is essential, especially if transport mechanisms have to be elucidated.

Schlüsselwörter: Riboflavin, Pyridoxin, Konzentration im Magen-Darm-Trakt

Einleitung

Es dürfte das gemeinsame Charakteristikum der intestinalen Resorption der meisten – möglicherweise aller – wasserlöslichen Vitamine sein, daß die Kinetik ihrer Aufnahme in die resorbierende Epithelzelle je nach betrachteter Substratkonzentration unterschiedlich ist. In einem niedrigen Konzentrationsbereich überwiegt ein wahrscheinlich trägervermittelter Transportprozeß mit Sättigungskinetik, der mit zunehmender Substratkonzentration immer deutlicher durch eine einfache Diffusion überlagert wird. Eine solche duale Mischkinetik ist in letzter Zeit eindeutig für das Thiamin (4), das Riboflavin (1, 2) und mit Einschränkungen für das Vitamin B₁₂ (6) nachgewiesen worden. Diese Beobachtungen werfen die Frage nach dem „physiologischen“ Transportmechanismus auf. Sie läßt sich konsequenterweise nur beantworten, wenn die am Ort der Resorption, d. h. im Darmlumen, nach alimentärer Zufuhr sich einstellende Vitaminkonzentration bekannt ist.

Die Ermittlung der effektiven intraluminalen Konzentration oral aufgenommener Vitamine scheint bis heute wenig Interesse gefunden zu haben. Lediglich eine Autorengruppe (11) versuchte, die ungefähre Konzentration mehrerer Vitamine im Dünndarm zu berechnen, um Anhaltspunkte für die bei In-vitro-Experimenten einzusetzenden Dosierungen zu haben. Eine direkte Bestimmung von intraluminalen Vitaminkonzentrationen ist bislang offensichtlich nicht versucht worden. Zielsetzung der Untersuchung war es daher, am Beispiel zweier wasserlöslicher Vitamine, des Riboflavins und des Pyridoxins, den physiologisch relevanten Konzentrationsbereich zu ermitteln, der sich innerhalb bestimmter Zeiträume nach Verabreichung der Vitamine in einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes ergibt.

Material und Methoden

Tierversuch. Versuchstiere waren 36 männliche Wistar-Ratten (Winkelmann, Borcheln) mit einem Körpergewicht von 250–300 g. In einer zweiwöchigen Vorperiode bekamen sie ad libitum ein halbsynthetisches Futter folgender Zusammensetzung (in Gewichtsprozenten):

Saccharose	40,0	Methionin/Cholin-	
Stärke	28,7	chlorid-Mischung	1,2
Casein	20,0	Mineralstoffmischung	4,0
Maisöl	7,0	Vitaminmischung	0,1

Die Relation der Hauptnährstoffe sowie die Menge der Vitamine und Mineralstoffe in der Kost waren dem Bedarf der Ratte optimal angepaßt. Das Trinkwasser stand ebenfalls ad libitum zur Verfügung.

Die Vorperiode diente dazu, die Verdauungsorgane der Tiere an das halbsynthetische Futter, das anschließend in halbflüssiger Form auch zur Verabreichung der Testsubstanzen verwendet wurde, zu adaptieren. Weiterhin wurden die Ratten in diesem Zeitraum an das Einführen von Magensonden gewöhnt.

Die Testsubstanzen Riboflavin und Pyridoxin wurden den Versuchstieren als radioaktiv markierte Verbindungen mit dem Futter durch Magensonde verabreicht. Hierzu wurde ein halbsynthetisches Futter hergestellt, dessen Zusammensetzung wie oben angegeben war, mit der Ausnahme, daß es kein Riboflavin und Pyridoxin enthielt. Aus dieser Futtermischung wurde eine wässrige Suspension bereitet, deren Konsistenz (bei 2,5 g Futter pro ml Suspension) zur Verabreichung mittels Sonde noch gut geeignet war.

Vor Beginn des Sondens wurde den Tieren 12 Stunden lang das Futter entzogen, um einem eventuell unterschiedlichen Füllungszustand der Mägen vorzubeugen. Das pulverförmige Futter wurde 2 Stunden nach dem Sonden wieder zur Verfügung gestellt.

Jedes Tier erhielt durch die Sonde 2 ml der Sondenlösung – entsprechend 5 g Futter – intragastral verabreicht. In dieser Suspension war die dem Tagesbedarf des betreffenden Tieres entsprechende Menge an ^{14}C -Riboflavin und ^3H -Pyridoxin gelöst. Als Erhaltungsbedarf der Ratte wurden 100 μg Riboflavin (≈ 266 nmol) und 50 μg Pyridoxin (≈ 243 nmol) pro kg Körpergewicht und Tag angenommen (9). Die spezifische Aktivität der markierten Vitamine betrug 30,1 mCi/mmol ^{14}C -Riboflavin und 1,71 Ci/mmol ^3H -Pyridoxin (Amersham-Buchler, Braunschweig).

Die simultane Verabreichung beider Vitamine war vertretbar, da die Resorption von Riboflavin und Pyridoxin voneinander unabhängige Prozesse sind (8). Bei der Bestimmung des ^{14}C -markierten Riboflavins und des ^3H -markierten Pyridoxins waren ebenfalls keine Interferenzen zu erwarten.

Je 6 Tiere wurden zu folgenden Zeiten nach dem Sonden durch Dekapitieren getötet: 30 Minuten, 1 Stunde, 2, 6, 12 und 24 Stunden. Sofort nach dem Töten wurden Magen, Duodenum, Jejunum, proximales und distales Ileum herauspräpariert und der Inhalt des jeweiligen Abschnittes durch sorgfältiges Spülen mit einer definierten Wassermenge entnommen.

Aufarbeitung und Analyse der Proben. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes wurden die Proben bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert. Es wurde das Trockengewicht bestimmt und nach gründlicher Durchmischung ein adäquater Teil der Probe in Lexan-Kapsel eingewogen. Diese wurden in O_2 -Atmosphäre verbrannt (Oxymat, Intertechnik JA 101). Das aus dem ^{14}C -Riboflavin entstandene $^{14}\text{CO}_2$ wurde in einem Szintillatorgemisch folgender Zusammensetzung absorbiert: Dioxan 700 ml, Toluol 300 ml, Naphtalin 20 g, Butyl-PBD 7 g. Zur Absorption des aus ^3H -Pyridoxin entstandenen $^3\text{H}_2\text{O}$ diente ein Szintillator-Cocktail aus 2-Phenyläthylamin 330 ml, Methanol 220 ml, Toluol 400 ml, aqua dest. 50 ml, Butyl-PBD 7 g.

Die Impulsraten wurden im Liquid-Szintillation-Analyser (Philips) gemessen, die Ergebnisse einer Quenchkorrektur unterzogen und auf 100 % Zählausbeute berechnet. Aus den Impulszahlen wurde die Menge bzw. bei Bezug auf das Verteilungsvolumen die Konzentration der beiden Vitamine in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes errechnet.

Ergebnisse

Die Konzentration des Riboflavins bzw. des Pyridoxins im Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum als Funktion der Zeitspanne nach intragastraler Verabreichung ist in Abbildung 1 bzw. Abbildung 2 dargestellt.

Die Konzentrationsverlaufskurven für den Magen wurden unter Zugrundelegung der Exponentialfunktion (1) approximiert,

$$y = y_0 \cdot e^{-k_2 t} \quad (1)$$

wobei y die Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t , y_0 die fiktive Anfangskonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ und k_2 die Eliminationskonstante bedeutet. Gleichung (1) entspricht einer Eliminationsgleichung (3), deren Anwendung in diesem Falle statthaft ist, da die Invasion – durch Verabreichung der Vitamine per Schlundsonde – sehr rasch ist im Vergleich zur Elimination.

Die Konzentrationen in den einzelnen Darmabschnitten ergaben sich aus der Invasion der Testsubstanzen aus dem jeweils vorausgeschalteten Kompartiment und aus den gleichzeitigen Schritten der Elimination. Der

Konzentrationsverlauf wurde in diesem Falle mit der Bateman-Funktion (2) approximiert (3):

$$y = a \frac{k_{12}}{k_{12} - k_{20}} (e^{-k_{20}t} - e^{-k_{12}t}) \quad (2)$$

wobei a mit der fiktiven Anfangskonzentration y_0 identisch ist, k_{20} die Eliminationskonstante und k_{12} die Invasionskonstante ist.

Wie aus den graphischen Darstellungen hervorgeht, verließen die beiden Testsubstanzen den Magen sehr schnell, bereits nach 2 Stunden waren nur noch einige nmol pro ml Mageninhalt nachzuweisen. Entsprechend dem steilen Konzentrationsabfall im Magen stellte sich im Duodenum das Maximum der Konzentration zwischen der ersten und der zweiten Stunde nach Verabreichung der Vitamine ein.

Bei Vergleich der Konzentrationen im Duodenum fällt auf, daß die maximale Konzentration des Pyridoxins mit etwa 5,5 nmol/ml wesentlich niedriger war als diejenige des Riboflavins mit über 10 nmol/ml, obwohl von beiden Testsubstanzen etwa gleich hohe Dosen verabreicht worden sind (266 nmol Riboflavin bzw. 263 nmol Pyridoxin pro kg Körperge-

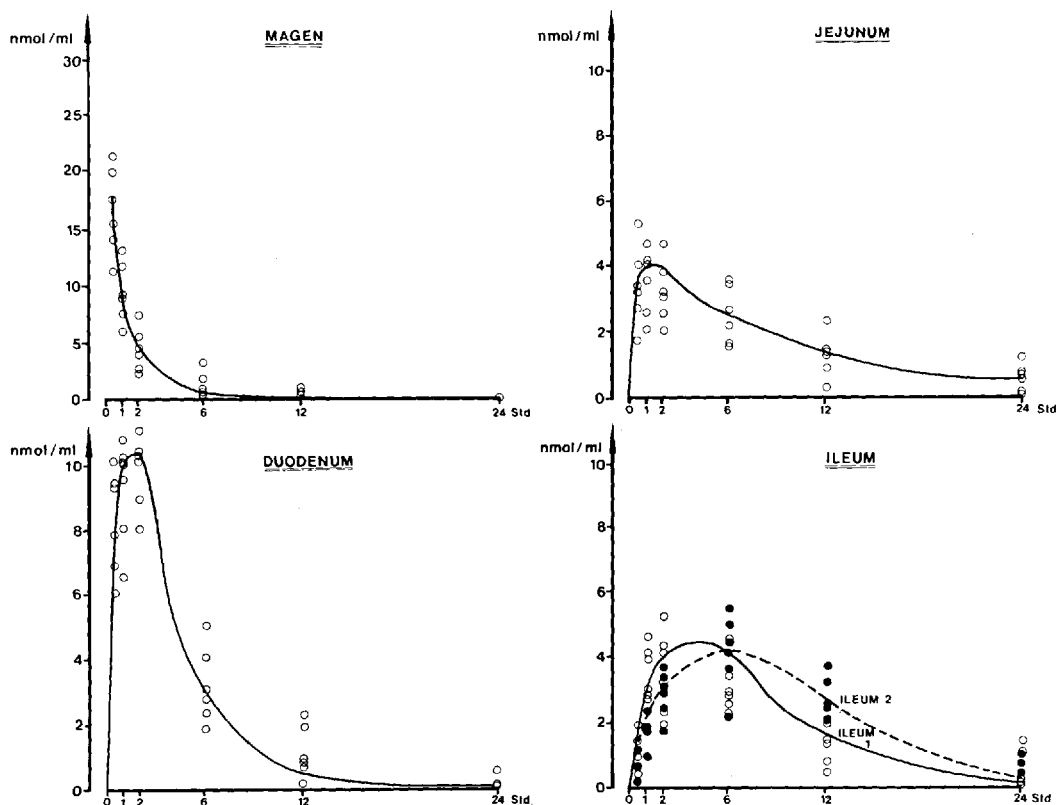


Abb. 1. Riboflavinkonzentration in verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes als Funktion der Zeit nach intra-gastraler Verabreichung.

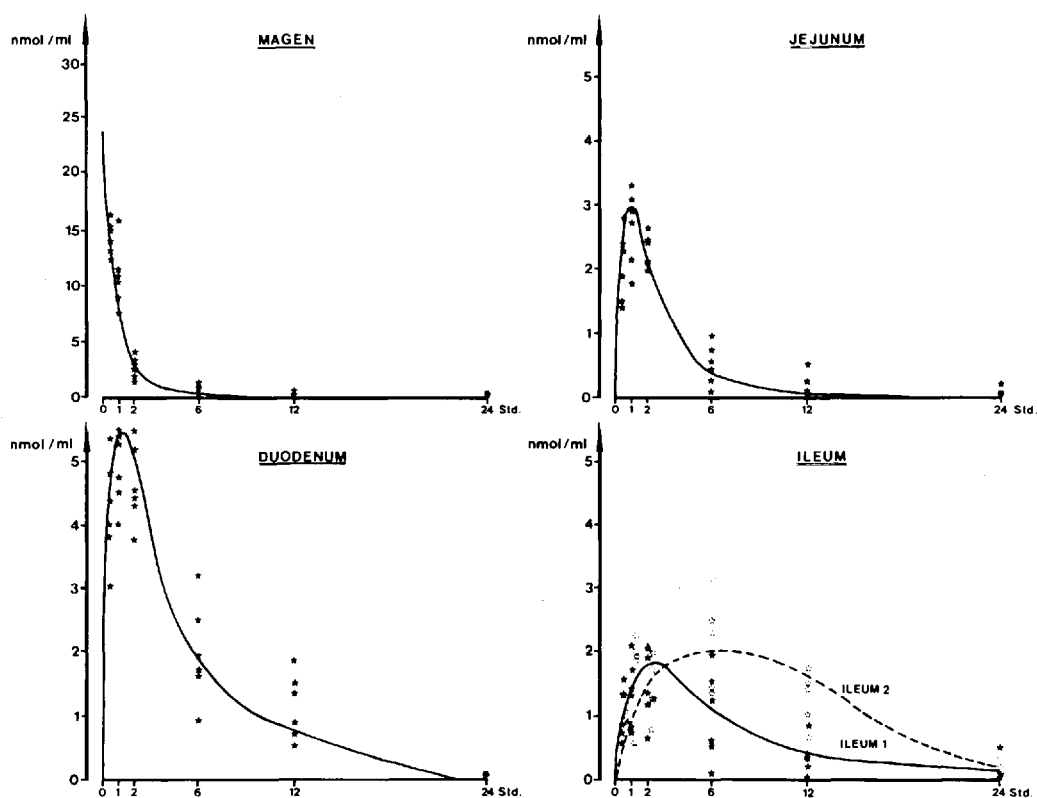


Abb. 2. Pyridoxinkonzentration in verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes als Funktion der Zeit nach intra-gastraler Verabreichung.

wicht). Dies spricht für eine sehr schnelle Netto-Resorption des Pyridoxins bereits im Duodenum.

Auch im Jejunum fiel die Konzentration des Pyridoxins wesentlich steiler ab als diejenige des Riboflavins. Bereits nach 6 Stunden war die Pyridoxinkonzentration in diesem Darmabschnitt etwa auf das Niveau gesunken, das das Riboflavin erst zwischen der 12. und 24. Stunde nach Verabreichung erreicht hatte.

Als Folge der anscheinend effektiveren Resorption des Pyridoxins war die maximale Konzentration dieses Vitamins auch im Ileum nur etwa halb so hoch wie die des Riboflavins. Diese maximale Konzentration stellte sich etwa 2 bis 3 Stunden nach der intra-gastralen Verabreichung der Testsubstanzen ein.

Im distalen Teil des Ileums war die Konzentration beider Vitamine ab etwa der vierten bis sechsten Stunde nach Verabreichung höher als im proximalen Teil dieses Darmabschnittes. Dieser zunächst überraschende Befund ist auf die Konzentrierung des Chymus als Folge der Wasserresorption im Ileum zurückzuführen (5), während die beiden Vitamine im Ileum kaum mehr resorbiert worden sind.

Für die beiden Darmabschnitte, die als hauptsächliche Resorptionsorte des Riboflavins und des Pyridoxins gelten, wurden folgende maximale intraluminale Konzentrationen¹⁾ errechnet:

	Riboflavin	Pyridoxin
Duodenum	10,4 ± 8,7	5,5 ± 4,3
Jejunum	4,1 ± 3,1	3,0 ± 2,6

Diese maximalen Konzentrationen ergaben sich im Duodenum für das Riboflavin etwa 2 Stunden, für das Pyridoxin etwa 1,5 Stunden nach intragastraler Verabreichung. Die Höchstkonzentration stellte sich im Jejunum für beide Vitamine ca. 1,5 Stunden nach dem Sonden ein.

Diskussion

Hauptzielsetzung der Untersuchung war es, die intraluminale Konzentration des Riboflavins und Pyridoxins in den für die Resorption dieser beiden Vitamine in Frage kommenden Abschnitten des Magen-Darm-Traktes zu ermitteln. Die Resultate sollten es insbesondere ermöglichen, bei In-vitro-Experimenten zum Resorptionsmechanismus dieser beiden Mikronährstoffe die physiologisch relevanten Konzentrationsbereiche zu wählen. Um dieser Anforderung zu genügen, sollten die Versuchsbedingungen den physiologischen Gegebenheiten weitgehend angenähert werden. Die beiden Testsubstanzen wurden daher nicht als wässrige Lösungen verabreicht, sondern mit einem adäquaten Futter vermischt, an das die Versuchstiere durch eine Vorperiode adaptiert waren.

Um eine vollständige Aufnahme der Testdosis zu gewährleisten, war es notwendig, die in das halbflüssige Futter eingerührten Vitamine mittels Sonde intragastral zu verabreichen. Um zu erreichen, daß diese Applikationsart keinen ungewohnten Streß bedeutet, der eventuell die Transitzeit des Chymus hätte beeinflussen können, wurden die Versuchstiere in der Vorperiode an das Sonden gewöhnt.

Die auf einmal verabreichte Vitamindosis entsprach dem Tagesbedarf des jeweiligen Tieres. In dieser Hinsicht mußte zugunsten der Analytik ein Kompromiß eingegangen werden. Obwohl die verwendeten markierten Vitamine eine sehr hohe spezifische Aktivität hatten, waren die nach Verteilung im Magen-Darm-Trakt zu bestimmenden Substanzmengen so gering, daß bei Aufteilung der Tagesdosis die Grenzen der radiochemischen Analytik unterschritten worden wären. Die von uns bestimmten Vitaminkonzentrationen sind daher als Maxima der physiologisch relevanten Konzentrationen aufzufassen.

Durch die Möglichkeit, ¹⁴C-markiertes Riboflavin und ³H-markiertes Pyridoxin simultan verabreichen zu können, konnte das Verhalten dieser beiden wasserlöslichen Vitamine unter idealen Bedingungen verglichen werden, da sie sich im selben Chymus befanden. Die verabreichte Dosis der beiden Substanzen war annähernd äquimolar. Dennoch war die Maximalkonzentration des Riboflavins im Duodenum etwa doppelt so hoch wie die des Pyridoxins. Auch im Jejunum war die maximale Vitamin-B₂-Konzentration um ca. 25 % höher als die Konzentration des Vitamin B₆. Außerdem fiel die Riboflavinkonzentration in diesem Abschnitt nur all-

¹⁾ in nmol/ml = 10⁻⁶ mol/l; Mittelwert ± Standardabweichung

mählich ab, sogar nach 24 Stunden war noch ^{14}C -Aktivität nachweisbar. Dieser Befund dürfte aus zwei Faktoren resultieren: aus der im Vergleich zu Pyridoxin niedrigeren Resorptionsrate des Riboflavins und der von mehreren Untersuchern (14, 10) nachgewiesenen Sekretion von Riboflavin mit der Galle. Nach eigenen Untersuchungen (unveröffentlicht) wird Riboflavin bereits 5 Minuten nach intraluminaler Verabreichung mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden getesteten Vitamine weist darauf hin, daß die effektive intraluminale Konzentration nicht allein von der verabreichten Dosis abhängt, sondern durch Faktoren wie Effektivität der Resorption in den proximalen Darmabschnitten sowie durch exkretorische und sekretorische Prozesse modifiziert werden kann. Es erscheint daher notwendig, diese Konzentration für jede Substanz einzeln zu bestimmen, da ein analoges Verhalten nicht a priori vorausgesetzt werden kann.

Lange Jahre hindurch führten In-vitro-Untersuchungen über den intestinalen Transport von Riboflavin zum Ergebnis, daß dieses Vitamin durch einfache Diffusion aufgenommen wird. Nachfolgend sollen die Konzentrationen, in denen das Riboflavin bei diesen Experimenten eingesetzt wurde, aufgelistet werden:

Verfasser	Spezies	Riboflavinkonz. (mol/l)
Spencer und Zamcheck (1961) (12)	Ratte, Hamster	$1 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-4}$
Mayersohn und Gibaldi (1970) (7)	Ratte	$5,3 \cdot 10^{-5}$
Turner und Hughes (1962) (13)	Ratte	$2 \cdot 10^{-5}$
Spencer und Bow (1964) (11)	Ratte, Hamster	$7 \cdot 10^{-6}$
Meinen (1976) (8)	Ratte	$2 \cdot 10^{-7}$ – $12,8 \cdot 10^{-6}$

Wie die Zusammenstellung zeigt, waren die von den ersten drei Autoren eingesetzten Riboflavinkonzentrationen um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher als jene, die nach der vorliegenden Untersuchung im Lumen von Duodenum ($10,4 \cdot 10^{-6}$ mol/l) bzw. Jejunum ($4,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) als Maximalkonzentrationen bestimmt wurden. Spencer und Bow (11) arbeiteten in diesem maximalen Konzentrationsbereich. Wie bereits betont, hatten sich diese Konzentrationen unter unseren Versuchsbedingungen dann eingestellt, wenn die ganze Tagesdosis auf einmal verabreicht wurde. Es dürfte sich dabei also um die obere Grenze des „physiologischen“ Konzentrationsbereichs handeln. Meinen (8), die Substratkonzentrationen zwischen $2 \cdot 10^{-7}$ und $12,8 \cdot 10^{-6}$ einsetzte, konnte das erste Mal in vitro zeigen, daß bei niedriger Riboflavinkonzentration ein Bergauftransport stattfindet, während bei Konzentrationen ab etwa $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l der Transport dosisproportional ist, was auf eine einfache Diffusion schließen läßt. Durch systematische Untersuchungen über die Konzentrationsabhängigkeit des transmuralen Transportes von Riboflavin (getesteter Konzentrationsbereich $33 \cdot 10^{-9}$ bis $10 \cdot 10^{-6}$ mol/l) ist es Daniel (2) gelungen, die duale

Charakteristik des Riboflavintransportes nachzuweisen, wonach bei „physiologischer“ Riboflavinkonzentration ein carriervermittelter Prozeß mit Sättigungskinetik vorherrscht, der mit zunehmender Substratkonzentration immer stärker durch einfache Diffusion maskiert wird.

Literatur

1. Akiyama T, Selhub J, Rosenberg JH (1982) FMN phosphatase and FAD pyrophosphatase in rat intestinal brush borders: role in intestinal absorption of dietary riboflavin. *J Nutr* 112:263–268
2. Daniel H (1982) In-vitro-Kinetik des intestinalen Transportes von Pyridoxin und Riboflavin – Vergleich mit dem Transport von D-Glucose – Inaugural-Dissertation, Gießen
3. Gladtko E, von Hattingberg HM (1973) Pharmakokinetik – Eine Einführung – Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
4. Hoyumpa AM, Middleton HM III, Wilson FA, Schenker S (1975) Thiamine transport across the rat intestine. I. Normal characteristics. *Gastroenterology* 68:1218–1227
5. Mailman DS (1977) Fluid and electrolyte absorption. In: *Gastrointestinal physiology*; Johnson LR (ed.) Mosby CV, Saint Louis, p. 109
6. Matthews DM (1974) Absorption of water-soluble vitamins. In: *Intestinal absorption*; Smyth DH (ed.) Plenum, London-New York, p. 878
7. Mayersohn M, Gibaldi M (1970) Drug transport. II. The effect of various cations on the passive transfer of drugs across the everted rat intestine. *Biochim Biophys Acta* 196:296–304
8. Meinen M (1976) Untersuchungen zur intestinalen Resorption von Riboflavin und Pyridoxin in vitro und in vivo. Inaugural-Dissertation Gießen
9. Nat Acad Sci – Nat Res Council (USA) (1962) Nutrient requirements of laboratory animals. Publ 99 P
10. Nogami H, Hanano M, Awazu S, Iga T (1970) Pharmacokinetic aspects of biliary excretion. Dose dependency of riboflavin in rat. *Chem Pharm Bull* 18:228–234
11. Spencer RP, Bow TM (1964) In vitro transport of radiolabeled vitamins by the small intestine. *J Nuclear Med* 5:251–258
12. Spencer RP, Zamchek N (1961) Intestinal absorption of riboflavin by rat and hamster. *Gastroenterology* 40:794–797
13. Turner JB, Hughes ED (1962) The absorption of some B-group vitamins by surviving rat intestine preparations. *Quart J Exper Physiol* 47:107–123
14. Yagi K, Nagatsu T, Nagatsu-Ishibashi J, Ohashi A (1966) Migration of injected ¹⁴C-labelled riboflavin into rat tissues. *J Biochem* 59:313–315

Eingegangen 16. Juli 1984

Für die Verfasser:

Prof. Dr. Gertrud Rehner, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität, Wilhelmstr. 20, 6300 Gießen