

CP 4 2265  
Aus dem Institut für Tierphysiologie und dem Institut für  
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Vorstände: Prof. DDr. DDr. h. c. Johannes Brüggemann  
Prof. Dr. Dr. Jürgen Tiews

---

**Versuche zur Eignung von Carotin und  
Xanthophyll als Indikatoren zur Bestimmung  
der Grünfutterverdaulichkeit bei Wiederkäuern**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

**Wolfgang Klee**  
aus Friedrichshafen

**München 1972**



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. Dr. J. Tiews

Korreferent: Priv. Doz. Dr. W. Kreuzer

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

1. Die ...  
2. Die ...  
3. Die ...  
4. Die ...  
5. Die ...

**Meinen Eltern gewidmet**



## Inhaltsübersicht

	Seite
I. Vorwort	1
II. Theoretische Grundlagen der Verwendung von Verdaulichkeitsindikatoren	2
III. Literatur	14
a) Zugesezte Indikatoren	14
b) Pflanzeninhaltsindikatoren	20
IV. Eigene Untersuchungen	29
- Diskussion	67
- Zusammenfassung	80
V. Quellennachweis	84



## Vorwort

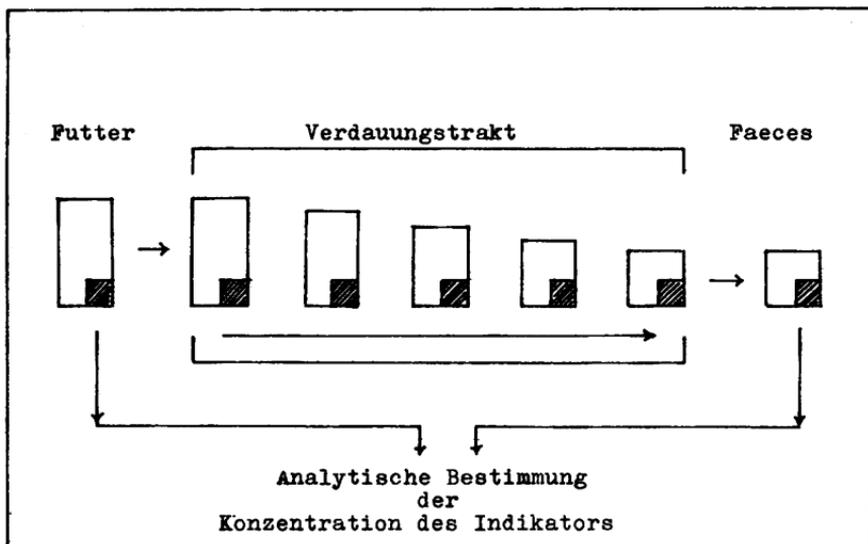
Indirekte Verfahren der Verdaulichkeitsbestimmung haben gegenüber herkömmlichen Techniken den Vorteil der Arbeits- und Zeitersparnis und teilweise der größeren Genauigkeit. Unter indirekten Verfahren werden im folgenden vor allem Indikatormethoden verstanden; auf Methoden der in-vitro-Verdauung, der künstlichen Mastikation (TROELSEN u. BIGSBY, 1964) und der Nylonbeutel-Technik (RAPP, 1972) wird nicht weiter eingegangen.

Zweck des folgenden Literaturteils ist es, eine kritische Übersicht über die gängigen Indikatormethoden zu geben. Der experimentelle Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, einige Pflanzenpigmente der Carotinoidreihe auf ihre Eignung als Indikatoren zu überprüfen.

## Theoretische Grundlagen der Verwendung von Verdaulichkeitsindikatoren

Die der Anwendung von Indikatoren zur Bestimmung der Verdaulichkeit zugrundeliegenden Vorstellungen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Abb. 1: Schematisierte Darstellung der Funktion eines Indikators



Die Konzentration des Indikators wird im Futter und in den Faeces bestimmt. Gleichung (1) beschreibt die Zusammenhänge zwischen der prozentualen Verdaulichkeit (V) der Futtertrockensubstanz, der Konzentration des Indikators im Futter (H) und seiner Konzentration in den Faeces (I)

$$V = 100 - \frac{100 \times H}{I} \quad \text{oder} \quad V = \frac{100(I - H)}{I} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Dabei ist zunächst gleichgültig, ob es sich um einen sogenannten internen (d.h. natürlichen Bestandteil des Futters) oder um einen externen, also dem Futter (homogen) beigemischten Indikator handelt.

Über Indikatormethoden wird nicht die wahre Verdaulichkeit, sondern die Scheinbare Verdaulichkeit berechnet, da die Konzentration des Indikators immer auf die Kot-Trockensubstanz bezogen wird, die den Fehler der "Scheinbaren" Verdaulichkeit schon in sich birgt.

Neben der Möglichkeit des Einsatzes von Indikatoren zur indirekten Bestimmung der Scheinbaren Verdaulichkeit können durch eine sinnvolle Kombination von zwei voneinander unabhängigen Indikatoren Futterverdaulichkeit und freiwilliger Futterverzehr berechnet werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für Indikatoren ist die Messung der Passagegeschwindigkeit von Futter im Verdauungstrakt. Dabei werden externe Indikatoren verwendet, von denen bekannt ist, daß sie mit der einen oder anderen Ingestafraktion (je nach Partikelgröße) oder -phase (wässrig bzw. fest) assoziiert sind.

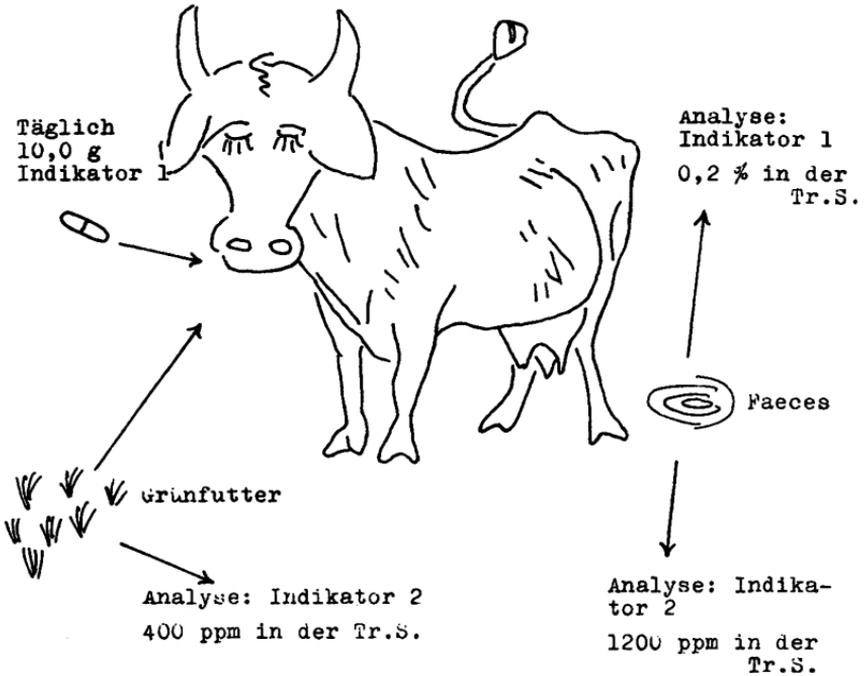
Schließlich kann mit Hilfe von Indikatoren untersucht werden, an welchen Stellen des Verdauungskanals bestimmte Inhaltsstoffe resorbiert (oder sezerniert) werden, indem man das Verhältnis zwischen Inhaltsstoff und Indikator entlang des Magen-Darm-Trakts (bei getöteten Tieren oder Tieren mit permanenten Fisteln) mißt.

Besonders interessant ist der Aspekt der gleichzeitigen Berechnung von Futteraufnahme und -verdaulichkeit bei Wiederkäuern auf der Weide. Denn diese beiden wichtigen Parameter zur Beurteilung der Nährstoffversorgung der Tiere und der Produktivität von Grünland sind einer exakten Bestimmung nur sehr schwer zugänglich.

In Abbildung 2 ist das Schema einer solchen "Doppelindikatormethode" (TIEWS) dargestellt.

Die unterschiedlichen Konzentrationen eines internen Indikators (Indikator 2) in Futter und Faeces werden zur Berechnung der Scheinbaren Verdaulichkeit nach Gleichung (1) verwendet.

Abb. 2: Schema einer Doppelindikatormethode zur Bestimmung der Trockensubstanzaufnahme und Nährstoffverdaulichkeit auf der Weide (nach FLEWS, modifiziert)



Ergebnis

Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S. (nach Gleichung 1):

$$V = 100 - \frac{100 \times 400}{1200} = 66,7 \%$$

Tägliche Kot-Tr.S.-ausscheidung in g (nach Gleichung 2):

$$P = \frac{100 \times 10,0}{0,2} = 5.000$$

Tägliche Futter-Tr.S.-Aufnahme in g (nach Gleichung 3):

$$G = \frac{100 \times 5.000}{100 - 66,7} = 15.000$$

Zur Bestimmung der Trockensubstanzaufnahme ist zuerst die Berechnung der täglich ausgeschiedenen Kot-Trockensubstanzmenge (P) notwendig. P errechnet sich aus der prozentualen Konzentration (K) des externen Indikators (Indikator 1) in der Tr.S. einer Durchschnitts-Faecesprobe und der täglich verabreichten konstanten Menge (L) dieses Indikators nach der folgenden Gleichung (2):

$$P = \frac{100 \times L}{K} \quad \text{Gleichung (2)}$$

Die auf diese Weise berechnete tägliche Trockensubstanz-Ausscheidung stellt den scheinbar unverdaulichen Anteil des aufgenommenen Futters dar.

Die tägliche Futter-Trockensubstanz-Aufnahme (G) errechnet sich folglich als

$$G = \frac{100 \times P}{100 - V} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Die dargestellten Verhältnisse gelten nur dann uneingeschränkt, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. Die untersuchte Futterprobe muß repräsentativ für das tatsächlich aufgenommene Futter sein.

Die Auswirkungen einer Futterselektion, die eine der Hauptfehlerquellen bei Indikatoruntersuchungen auf der Weide darstellen wird, auf das Ergebnis der Verdaulichkeitsbestimmung sind in den Abbildungen 3a bis 3c dargestellt.

Abb. 3a - c: Auswirkung von Futterselektion auf die berechnete Scheinbare Verdaulichkeit (Erläuterungen s.S. 7)

Abb. 3a

2	3	4	1
1	2	3	4
4	1	2	3
3	4	1	2

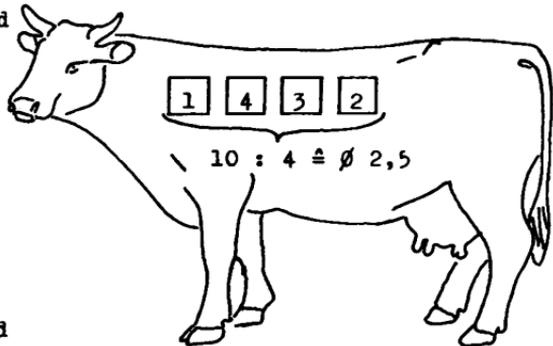
Grünfutterbestand

Ergebnis der Analyse einer repräsentativen Durchschnittsprobe: 2,5

Abb. 3b

2	3	4
1	2	3
4	1	2
3	4	1

Grünfutterbestand

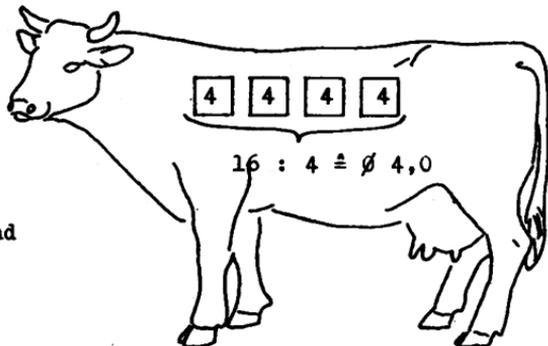


$$V = 100 - \frac{100 \times 2,5}{10} = 75$$

Abb. 3c

2	3		1
1	2	3	
	1	2	3
3		1	2

Grünfutterbestand



$$V = 100 - \frac{100 \times 2,5}{16} = 84,4$$

Erläuterungen zu den Abbildungen 3a bis 3c:

Die Felder sollen jeweils die gleiche Gewichtseinheit Trockensubstanz darstellen, die Zahlen in den Feldern die darin enthaltene absolute Menge an internem Indikator 2 (die Werte sind willkürlich angenommen, daher ohne Dimension).

Bei einer angenommenen Trockensubstanz-Verdaulichkeit von 75 % verteilt sich die gesamte mit 4 Gewichtseinheiten Grünfutter-Trockensubstanz aufgenommene Indikatormenge auf eine Gewichtseinheit Faeces-Trockensubstanz.

Durch die Präferenz des Tieres in Abb. 3c für indikatorreiches Futter, die dem Probenzieher unbekannt bleibt (Abb. 3a), errechnet sich trotz angenommener gleicher Verdaulichkeit des gesamten Grasbestandes von 75 % im Falle des Tieres in Abb. 3c über Gleichung (1) eine Trockensubstanz-Verdaulichkeit von 84,4 %

Bei gleichmäßigem Abbiß (Abb. 3b) errechnet sich über Gleichung (1) der richtige Wert von 75 %.

Daß Weidetiere Futter selektieren, ist seit langem bekannt und wurde vielfach nachgewiesen (HARDISON et al. 1954, JEFFERIES u. RICE 1969, LANGLANDS 1965, LANGLANDS 1967, LESPERANCE et al. 1960, MEYER et al. 1957 und WEIR u. TORELL 1959).

Ein idealer Zustand wäre gegeben, wenn der Indikator im Futter gleichmäßig verteilt ist, wenn also eine Stichprobe als repräsentativ angesehen werden kann. Er wird bei einem sehr homogen zusammengesetzten Bewuchs am ehesten erreicht. Schließlich besteht die Möglichkeit, eine repräsentative Futterprobe mit Hilfe einer künstlich angelegten Ösophagusfistel zu gewinnen (z.B. LANGLANDS 1969).

2. Die untersuchte Faecesprobe muß der untersuchten Futterprobe entsprechen.

Dieser Faktor gewinnt als Fehlerquelle an Bedeutung, wenn sich die Zusammensetzung (bzw. der Indikatorgehalt) eines Grünfutters in relativ kurzer Zeit erheblich ändert.

In einem solchen Fall muß daran gelegen sein, die Versuchsperiode so kurz wie möglich zu halten. Dabei taucht die Schwie-

rigkeit auf, zwischen zufälligen (= ungerichteten) und gerichteten Schwankungen zu unterscheiden.

Bei konventionellen Verdauungsversuchen (an Milchkuhen) wird eine Vorperiode von bis zu 2 Monaten und eine mindestens 2-monatige Hauptversuchsperiode vorgeschlagen (GES. f. ERNÄHRUNGSPHYSIOL. 1956), um ungerichtete Tagesschwankungen auszugleichen; bei einer derartigen Versuchsanstellung kann das Ergebnis der langen Versuchsperiode zur Beurteilung der Brauchbarkeit der Ergebnisse kürzerer Versuchsperioden herangezogen werden (z.B. CLANTON 1961).

Bei Versuchen mit Tieren auf der Weide kann aber eine längere Periode nur beschränkt als Maßstab für kürzere dienen, da gerade sie die Fehler beinhalten kann, die man mit kürzeren Perioden zu vermeiden trachtet.

Es muß jedoch nochmals betont werden, daß diese Überlegungen nur dann zum Tragen kommen, wenn drastische gerichtete Schwankungen in der Grünfütterzusammensetzung zu erwarten sind.

3. Die Indikatoren müssen nach der Passage durch den Verdauungstrakt vollständig wiederaufgefunden werden.

Sie dürfen folglich

- a) nicht resorbierbar sein.
- b) Im Verdauungstrakt dürfen keine chemischen Umwandlungen stattfinden, welche die analytische Erfassung verändern.
- c) Es darf weder eine Indikatoreigensynthese seitens des Versuchstieres mit anschließender Sekretion in das Darmlumen noch eine intrainestinale (mikrobielle) Neusynthese erfolgen.
- d) Der Indikator darf sich an keiner Stelle des Verdauungstraktes "anschoppen", d.h., er soll eine möglichst gleichmäßige Passagegeschwindigkeit zeigen (bzw. seine Passagegeschwindigkeit soll der der Ingesta entsprechen).

4. Der externe Indikator darf weder im Futter noch in möglichen Futterverunreinigungen (Staub, Erde) vorkommen.

Im folgenden werden die Zusammenhänge zwischen den Wiederauffindungsraten der Indikatoren und dem Versuchsergebnis aufgezeigt.

Indikator 1 möge zur Bestimmung der täglichen Kottrockensubstanz-Ausscheidung, Indikator 2 zur Bestimmung der Scheinbaren Verdaulichkeit der Futtertrockensubstanz dienen (vgl. Abb. 2).

Es werden folgende Symbole verwendet:

- A Wiederauffindungsrate von Indikator 2 (in %)
- B Wiederauffindungsrate von Indikator 1 (in %)
- C Wahre Futtertrockensubstanzmenge
- D Wahre Kottrockensubstanzmenge
- E Tatsächliche Scheinbare Verdaulichkeit der Futter-Tr.S.
- V Berechnete Scheinbare verdaulichkeit der Futter-Tr.S.
- G Berechnete Futtertrockensubstanzmenge
- H Konzentration von Indikator 2 in der Futter-Tr.S.
- I Konzentration von Indikator 2 in der Kot-Tr.S.
- K Konzentration von Indikator 1 in der Kot-Tr.S.
- L Absolute, täglich verabreichte Menge von Indikator 1
- P Berechnete tägliche Kottrockensubstanzmenge
- Q Genauigkeit der Indikator-2-Methode
- R Genauigkeit der Indikator-1-Methode
- S Genauigkeit der "Doppelindikatormethode"
- T Korrigierte berechnete Scheinbare Verdaulichkeit der Futter-Tr.S.
- U Korrigierte berechnete Futtertrockensubstanzmenge

Die allgemein angegebene und bekannte Gleichung

$$V = 100 - \frac{100 \times H}{I} \quad \text{Gleichung (1)}$$

setzt eine 100 %ige Wiederauffindungsrate des Indikator 2 voraus. Berücksichtigt man die Möglichkeit einer von 100 % abweichenden Wiederauffindungsrate für diesen Indikator, so ergeben sich für V, A und E folgende Zusammenhänge:

$$V = \frac{100 (A + E - 100)}{A} \quad \text{Gleichung (4)}$$

Unter der Bedingung, daß A nie größer als 100 werden kann, nimmt die Genauigkeit (Q) der Indikator-2-Methode, ausgedrückt als

$$Q = \frac{100 \times V}{E} \quad \text{Gleichung (5)}$$

den Wert

$$Q = \frac{10.000 (A + E - 100)}{A} \quad \text{Gleichung (5a)}$$

an. Das bedeutet, daß die Genauigkeit der über einen Indikator errechneten Scheinbaren Verdaulichkeit nicht nur von der Wiederauffindungsrate des Indikators abhängt, sondern auch eine Funktion der tatsächlichen Scheinbaren Verdaulichkeit der Futter-Trockensubstanz ist, denn für große E strebt Q dem Grenzwert 100 entgegen, unabhängig davon, wie groß A ist.

Zur Veranschaulichung dient die Tabelle 1.

Tab. 1: Genauigkeitwerte (Q) für V in Abhängigkeit von A und E

A %	E % 40	45	50	55	60	65	70	75	80
100	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
98	96,9	97,5	98,0	98,3	98,6	98,9	99,1	99,3	99,5
96	93,8	94,9	95,8	96,6	97,2	97,8	98,2	98,6	99,0
94	90,4	92,2	93,6	94,8	95,7	96,6	97,3	97,9	98,4
92	87,0	89,4	91,3	92,2	94,2	95,3	96,3	97,1	97,8
90	83,3	86,4	88,9	90,9	92,6	94,0	95,2	96,3	97,2
88	79,5	83,4	86,4	88,8	90,9	92,6	94,1	95,5	96,6
86	75,6	80,1	83,7	86,7	89,1	91,2	93,0	94,6	95,9

Indikator 1, der in konstanter Menge täglich eingegeben wird, dient zur Berechnung der täglich anfallenden Kot-Trockensubstanzmenge. Dabei gilt die Gleichung

$$P = \frac{100 \times L}{K} \quad \text{Gleichung (2),}$$

die sich in

$$P = \frac{100 \times D}{B} \quad \text{Gleichung (2a)}$$

umformen läßt.

Wenn man wiederum annimmt, daß die Wiederauffindungsrate des Indikator 1 einen von 100 % nach unten abweichenden Wert annehmen kann, läßt sich die Genauigkeit (R) der Indikator-1-Methode

$$R = \frac{100 \times D}{P} \quad \text{Gleichung (6)}$$

wie folgt ausdrücken:

$$R = 100 - \frac{100 (P - D)}{D} \quad \text{Gleichung (6a),}$$

was gleichbedeutend ist mit

$$R = \frac{200 \times B - 10.000}{B} \quad \text{Gleichung (6b).}$$

Für  $B = 100$  ist auch  $R = 100$ . In diesem Fall hängt die Genauigkeit nur von der Wiederauffindungsrate ab.

Durch eine Kombination der Indikator-1- mit der Indikator-2-Methode (= Doppelindikatormethode) läßt sich die aufgenommene Futtertrockensubstanzmenge berechnen:

$$G = \frac{100 \times P}{100 - V} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Durch entsprechendes Einsetzen erhält man

$$G = \frac{A \times C}{B} \quad \text{Gleichung (3a)}$$

Das heißt, daß die berechnete Futtertrockensubstanzmenge  $G$  mit der tatsächlich aufgenommenen Menge an Futter-Tr.S.  $C$  übereinstimmt, wenn die beiden Indikatoren die gleiche Wiederauffindungsrate haben, wobei deren Höhe ohne Einfluß ist. Mit anderen Worten: Bei gleichen (unvollständigen) Wiederauffindungsraten von Indikator 1 und 2 entspricht die über Indikator 1 errechnete zu hohe tägliche Faecesrockenmasse der über Indikator 2 errechneten zu niedrigen Scheinbaren Verdaulichkeit der Futter-Tr.S. Als Ausdruck der Genauigkeit der Kombination der beiden Methoden läßt sich der Einfachheit halber auch die Genauigkeit der berechneten täglichen Futter-Tr.S.-Menge heranziehen.

$$S = 100 - \frac{(G - C) \times 100}{C} \quad \text{Gleichung (7)}$$

Nach Umformen erhält man

$$S = \frac{200 \times B - 100 \times A}{B} \quad \text{Gleichung (7a)}$$

Im Gegensatz zur Genauigkeit der mit Hilfe von Indikator 2 errechneten Scheinbaren Verdaulichkeit der Futter-Tr.S. hängt  $S$  ausschließlich von den Wiederauffindungsraten der beiden Indikatoren ab.

Sind die Wiederauffindungsraten der beiden Indikatoren (aus einem Vorversuch) bekannt, so lassen sich die errechneten Werte gegebenenfalls korrigieren

$$T = E = \frac{A \times V - 100 \times A + 10.000}{100} \quad \text{Gleichung (8)}$$

und

$$U = C = \frac{G \times B}{A} \quad \text{Gleichung (9)}$$

Mit Hilfe der Indikator-2-Methode läßt sich nicht nur die scheinbare Verdaulichkeit der Gesamt-Futter-Tr.S., sondern auch die scheinbare Verdaulichkeit einzelner Futterbestandteile berechnen. So beträgt die prozentuale Verdaulichkeit des Futterbestandteils Y

$$100 - \frac{100 \times \text{Konz. Y i. Kot-Tr.S.} \times \text{Konz. Ind. 2 i. Futter-Tr.S.}}{\text{Konz. Y i. Futter-Tr.S.} \times \text{Konz. Ind. 2 i. Kot-Tr.S.}}$$

Gleichung (10)

Inwieweit die gebräuchlichen Indikatoren den oben gestellten Anforderungen genügen, soll nun anhand von Literaturberichten untersucht werden.

#### Zugesetzte Indikatoren

Über das von EDIN (1918) erstmals als Indikator verwendete Chrom(-III-)oxid ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) wird in zahlreichen Arbeiten berichtet. Dabei werden die verschiedensten Aspekte der Anwendung dieses Indikators beleuchtet.

Viele Untersucher benutzen die Analysenmethode von CHRISTIAN u. COUP (1954). Andere Verfahren beschreiben u.a. KIMURA u. MILLER (1957), PIATKOWSKI et al. (1962 a). PETRY u. RAPP (1971) verbesserten die Genauigkeit und Empfindlichkeit der  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Bestimmungsmethodik beträchtlich.

Über die Wiederauffindungsrate werden recht unterschiedliche Angaben gemacht; sie reichen von 71,5 % (KIESLING et al. 1969) bis zu 116 % (TROELSEN 1965 a).

Bei quantitativer Kotsammlung ("total fecal collection") ist eine Wiederauffindungsrate von über 100 % außer durch Analysefehler nur so zu erklären, daß sich der Indikator vor Beginn der Kotsammelperiode im Magen-Darm-Trakt "anschnappt" und während der Versuchsperiode vermehrt ausgeschieden wird.

Eine unvollständige Wiederauffindungsrate kann viele Gründe haben. Es wird darüber berichtet, daß Tiere eingegebene  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Kapseln regurgitieren (TROELSEN 1965 a). Bleibt ein solcher Vorgang unbemerkt, ist eine scheinbar verschlechterte Wiederauffindungsrate die Folge.

Eine weitere Möglichkeit sind Anschoppungen im Magen-Darm-Trakt. Dabei wäre zu unterscheiden, ob sich nur erst ein gewisser gleichmäßiger "Sättigungsgrad" einstellen muß, der bei den entsprechenden Versuchen mit niedriger Wiederauffindungsrate nicht abgewartet wurde oder ob sich an bestimmten Stellen über längere Zeit größere Mengen des Indikators ansammeln. Über die nötige Zeitspanne bis zum Auftreten einer gleichbleibenden täglichen  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Ausscheidung werden in der Literatur Angaben zwischen 36 Stunden (PIATKOWSKI et al. 1962 a) und 7 Tagen (HARDISON et al. 1959) gemacht.

In der von mir überblickten Literatur ist nur ein Hinweis über größere Anschoppungen zu finden, die in den Labmagenfalten eines Lammes zurückgehalten wurden (BARNICOAT 1945). Ansonsten begnügen sich die Autoren mit der Feststellung, das der Indikator "an irgendeiner Stelle des Verdauungstraktes zurückgehalten wurde" (CRAMPTON u. LLOYD 1951), da die Versuchstiere in der Regel nach Versuchsende nicht geschlachtet wurden.

Als dritte Möglichkeit für eine unvollständige Wiederauffindungsrates von  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  kommt eine Resorption in Betracht. Sie ist nur durch Verunreinigung des verabreichten Chromoxids mit löslichen Chromverbindungen vorstellbar. DEINUM et al. (1962) fanden nach  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Gaben an Kühe Spuren von Chrom in der Leber, in den Lymphknoten und in den Nieren.

Der überwiegende Teil der Untersucher verwirft jedoch den Gedanken an eine Resorption ins Gewicht fallender Chrommengen.

Theoretisch können auch noch Verluste nach der Kotsammlung eintreten (Trocknen, Mahlen, Analyse); auf diese soll aber nicht näher eingegangen werden.

Eigentlicher Sinn der Doppelindikatormethode ist es, auf eine quantitative Faecessammlung verzichten zu können.

Um auch durch einzelne Stichproben verlässliche Ergebnisse zu bekommen, muß der Indikator gleichmäßig in den Faeces eines Tages verteilt sein. Gerade bei Chromoxid aber gibt es eine umfangreiche Literatur über Schwankungen in der Ausscheidung innerhalb eines Tages ("diurnal variation"). Chromoxid, das als homogene Einmischung im Futter verabreicht wurde (BRADLEY et al. 1958), führte zu einer gleichmäßigeren Verteilung in den Faeces als wenn es täglich in Form einer Gelatine kapsel gegeben wurde. Dagegen stellten SMITH u. REID (1955) keinen Unterschied in der Genauigkeit der berechneten Kotsausscheidung zwischen der Verabreichung von  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  in Kapseln und als Einmischung in ein Kraftfutter fest.

Schwankungen in der  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Konzentration in den Faeces deuten auf eine unvollständige Durchmischung von Indikator und Ingesta im Pansen hin. So jedenfalls ist der Befund von CORBETT et al. (1958) zu interpretieren, die bei einem Schaf innerhalb von vier Stunden nach der peroralen Verabreichung einer  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Kapsel den Großteil der Dosis über eine Duodenalfistel wiederfanden. Die Autoren vermuten, daß sich die Kapsel wahrscheinlich kurz nach der Verabreichung im vorderen Teil des Pansens oder in der Haube, also in nächster Nähe der Hauben-Psalter-Öffnung, auflöste, und das  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , ohne vorherige gründliche Durchmischung mit dem Panseninhalt, weitertransportiert wurde.

Die letztgenannten Autoren stellen in einer Abbildung die Konzentration-Zeit-Kurve für Chromoxid im Duodenalinhalt nach Applikation einer einzigen Dosis (in einer Gelatine-kapsel in Pulverform) dar (CORBETT et al. 1958, Abb. 1, Kurve A). Diese Kurve ähnelt stark einer Ausscheidungskurve in den Faeces, die LAMBOURNE (1957) darstellt (Abb. 1, Kurve a der Veröffentlichung), wenn man die Zeitverschiebung im Verlauf der weiteren Darmpassage berücksichtigt. Auch die Kurve von LAMBOURNE verkörpert die Ausscheidung eines Indikators nach einer einzigen Dosis.

Auf dieser Kurve (und anderen) baut LAMBOURNE sehr interessante theoretische Ausscheidungskurven bei zweimaliger täglicher Indikatorverabreichung in verschiedenen Zeitintervallen auf. Er geht davon aus, daß unter Weidebedingungen die einzelnen Tiere nicht öfter als zweimal pro Tag belästigt werden sollten und kommt zu dem Schluß, daß Zeitintervalle von 8 und 16 bzw. 9 und 15 Stunden zwischen den zwei täglichen "Verrichtungen" (jeweils Kotprobenentnahme und Indikatorverabreichung) erfolgversprechend seien.

Solche Überlegungen zielen darauf ab, bei bestehenden Schwankungen in der Kotkonzentration von  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  bestimmte Zeitpunkte zu finden, zu denen die Konzentrationen dem Tagesdurchschnitt entsprechen oder Abweichungen sich aufheben. Sie setzen voraus, daß die Tagesschwankungen einem genauen Rhythmus unterworfen sind. Hier läßt sich einwenden, daß unter solchen Bedingungen auch eine einmalige Indikator-

verabreichung und Kotprobennahme genügen würde, da die "relative recovery" zur Zeit der Kotprobennahme (d.h., das Verhältnis zwischen  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Konzentration in der Kotprobe und dem Tagesdurchschnitt) konstant und somit rechnerisch korrigierbar wäre.

Über Schwankungen zwischen einzelnen Tagen ("daily variation") berichten jedoch u.a. CLANTON (1962) und KAMEOKA et al. (1956). Eher für Regelmäßigkeit im Verlauf der Ausscheidungskurven einzelner Tage sprechen die Ergebnisse von WILKINSON u. PRESCOTT (1970).

Um eine bessere Verteilung des Indikators im Fäsesinhalt zu erzielen, beschritten eine Reihe von Untersuchern neue Wege. So untersuchten FIGDEN u. BRISSON (1957), CORBETT et al. (1958) und andere die Möglichkeit, an Papier adsorbiertes  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  zu verwenden. CORBETT et al. (1958) behandelten das Chromoxid-Papier außerdem noch mit Aluminiumsulfat und kommen zu dem Ergebnis, daß  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  durch die enge Verbindung mit den Cellulosefasern des Papiers die Qualitäten eines internen Indikators annimmt.

Weniger gute Erfahrungen mit dieser Art der Applikation sammelten MIESLING et al. (1969). Bei ihnen war die Wiederauffindungsrate (z.T. nur 71,5 %) unbefriedigend; außerdem waren gesicherte Unterschiede zwischen den Versuchstieren ( $p < 0,05$ ) und Versuchen festzustellen.

Aufgrund der überblickten Literatur ist es nicht möglich, mit der wünschenswerten Sicherheit zu entscheiden, ob  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  geeignet ist, bei Wiederkäuern derart als Indikator Verwendung zu finden, daß einzelne Kotproben verlässliche Hinweise auf den Gesamtkot eines Tages geben würden.

So wird auch in jüngsten Arbeiten (HATTAN u. OWEN 1970) die quantitative Kotsammlung trotz verabreichter Indikatoren wieder ernsthaft in Erwägung gezogen. Dabei wird zwar gegenüber dem konventionellen Verdauungsversuch keine Arbeit gespart, dagegen das leidige Problem der Tagesschwankungen (wenn auch nicht einer eventuell unvollständigen Wiederauffindungsrate) umgangen. Außerdem bietet die Methode den Vor-

teil, bei einer kurzen Versuchsperiode sogenannte "end-period errors" zu vermeiden. Denn Unregelmäßigkeiten in der Kot-Tr.S.-Ausscheidung (z.B. eine durch kurzzeitige Kotverhaltung bedingte verringerte Kotausscheidung am letzten Tag) führen bei der konventionellen Methode (insbesondere bei kurzen Versuchsperioden) zu beträchtlichen Fehlern. Diese werden mit Hilfe des Indikators vermieden, dessen Konzentration unabhängig von Unregelmäßigkeiten bei der Kot-Tr.S.-Ausscheidung ist.

In neuerer Zeit werden auch bei Verdaulichkeitsuntersuchungen radioaktive Isotope als externe Indikatoren eingesetzt. Ihr Vorteil liegt in der einfachen und schnellen Bestimmung, ihr Nachteil in den meist gesetzlich vorgeschriebenen Vorsichtsmaßnahmen bei der Abfallbeseitigung (KANE et al. 1959).  $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$  hat, was seine Brauchbarkeit als Indikator angeht, die gleichen Eigenschaften wie normales  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (KANE et al. 1959). Allerdings berichten UTLEY et al. (1970) über eine geringere Wiederauffindungsrate (87,2 %) von  $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$  gegenüber  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (98 %).

MAUTZ (1971) findet ca. 98 % einer einzigen Dosis von  $^{51}\text{CrCl}_3$  (Mittel aus mehreren Versuchen) in den Faeces wieder. Durch Besprühen des Futters mit einer verdünnten Lösung erreicht er konstante Aktivitäten in den Faeces innerhalb eines Tages (beim Weißwedelhirsch).

$^{144}\text{Ce}$  besitzt nach FRANÇOIS et al. (1968) und HUSTON u. ELLIS (1968) sehr gute Eigenschaften als Indikator, weil es weitgehend an Futterbestandteile adsorbiert wird und sich deshalb mit der gleichen Passagegeschwindigkeit wie die Ingesta durch den Darmtrakt bewegt.

Ein weniger gebräuchlicher externer Indikator ist Eisen. Die in der überblickten Literatur vorliegenden Berichte über Wiederauffindungsraten von Eisen sind wenig günstig. So fanden DRUCE u. WILCOX (1949) nur 76 % des verfütterten Indikators wieder, andere Untersucher zwischen 82 % und 89 % (KNOTT et al. 1936 und MOORE u. WINTER 1934).

In neuerer Zeit berichten zwar SAPARGALIEV u. DZARKBASOV (1969) über eine Wiederauffindungsrate von 96,31 %, aber KLAPP (1963) gibt mit Recht zu bedenken, daß Eisen auch im Boden enthalten ist, und Verunreinigungen des Futters mit Erde zu Fehlern führen.

Polyäthylenglykol (PEG) wird auch verschiedentlich als externer Indikator beschrieben. Er hält sich hauptsächlich in der wässrigen Phase der Ingesta auf (CORBETT et al. 1959), verläßt den Pansen-Hauben-Raum deshalb schneller als das entsprechende Rauhfutter und ist für Verdaulichkeitsuntersuchungen folglich nur beschränkt geeignet.

## Pflanzeninhaltsindikatoren

Silikate wurden erstmals von WILDT (1874) als Indikatoren der Futterverdaulichkeit benützt.

Verdauungsversuche von JONES u. HANDRECK (1965) und SAPARGALIEV u. DZARKBASOV (1969) an Schafen, bei denen Silikate zu 99 % bzw. 94 % wiederaufgefunden wurden, sprechen für die Eignung dieser Verbindungen als Indikatoren.

Da aber Si-Verbindungen im Erdboden sehr verbreitet sind, sind besondere Vorsichtsmaßnahmen hinsichtlich einer schmutzfreien Gewinnung von Futterproben zur Silikat-Bestimmung notwendig. Angesichts der Befunde von VAN DYNE u. LOPGREEN (1964) daß sich im Verlauf einer Weideperiode mehrere kg Sand im Pansen ansammeln können, müssen "vollständige" Wiederauffindungsraten als glückliche Zufälle erscheinen.

In diesem Sinne dürfte auch das Urteil von STREETER (1969) zu werten sein, der in einer Literaturübersicht den Wert von Silikaten als Indikatoren als "obskur" bezeichnet.

Über die Verwendbarkeit von Lignin als interner Verdaulichkeitsindikator gehen die Meinungen stark auseinander.

Nach FORBES u. GARRIGUS (1950 a) wurde die engste Korrelation zwischen chemischer Zusammensetzung und Verdaulichkeit der organischen Substanz mit Lignin erhalten. Über Wiederauffindungsraten um 100 % berichten u.a. KANE et al. (1950), KELLAWAY (1969), FORBES u. GARRIGUS (1948) und FORBES u. GARRIGUS (1950 b).

VAN SOEST (1964) weist auf schwerwiegende Probleme bei der Analyse hin. So sollen Temperaturen über 50 °C, wie sie bei den meisten der beschriebenen Analysemethoden zur Trocknung angewandt werden, zu Lignin-Analyseergebnissen führen, die bis zu dreimal höher als der ursprüngliche Gehalt liegen. Unbefriedigend niedrige Wiederauffindungsraten fanden u.a. ELAM u. DAVIS (1961), ELY et al. (1953) und LAUBE (1960). RIDLEY et al. (1963) stellten sogar eine Scheinbare Verdaulichkeit des Lignins von 47,5 % fest. Vermutlich liegt der wesentliche Nachteil von Lignin als Verdaulichkeitsindikator darin, daß es für Wiederkäuer je nach Art des vorhandenen

Lignins, die in Abhängigkeit der Pflanzenart verschieden ist (GIESECKE 1972), mehr oder weniger verdaulich ist. Solange ferner die entsprechend komplizierten Verhältnisse bei der Analyse ungeklärt sind, ist einer Anwendung von Lignin als Verdaulichkeitsindikator kritisch zu begegnen.

In engem Zusammenhang mit der Lignin-Methode steht die Verwendung von Methoxyl-Gruppen des Lignins als Indikator. Sie hat gegenüber der Lignin-Methode zwar den Vorteil, daß eine chemisch definierte Gruppe erfaßt wird (RICHARDS u. REID 1952), dagegen den entscheidenden Nachteil, daß aus kleinen Analysenfehlern (die bei der üblichen Analysenmethode leicht eintreten können) erhebliche Fehler in der Verdaulichkeitsberechnung resultieren, weil der Methoxyl-Gehalt verschiedener Grünfütterarten in viel engeren Grenzen schwankt als deren Scheinbare Verdaulichkeit (ANTHONY u. REID 1958).

REID et al. (1950) stellten aus Grünfütter und der hiermit gewichtsmäßig korrespondierenden Faecesmenge Acetonextrakte (85 % Aceton + 15 % Wasser) her. Sie gingen von der Überlegung aus, daß bei gleicher Verdünnung der Extrakte solche Pigmente, die quantitativ und qualitativ unverändert die Magen-Darm-Passage überstehen, in beiden Extraktarten die gleiche Konzentration haben sollten.

Übertragen auf das spektrographische Verhalten der Pigmentextrakte aus Grünfütter bzw. Faeces sollten Pigmente in gleicher Konzentration Punkte mit gleicher Extinktion, sogenannte isosbestische Punkte, bilden. In diesen Punkten sollten sich die in der Regel voneinander abweichenden Absorptionskurven der konzentrationsgleichen Faeces- bzw. Grünfütteracetone extrakte schneiden.

In mehreren Versuchsreihen mit verschiedenen Grünfütterarten und Versuchstieren fanden die genannten Autoren einen solchen isosbestischen Punkt bei 406 nm.

Die so extrahierten Pigmente nannten sie Chromogen(e). In 36 Versuchen wurden durchschnittlich 100,5 % dieser Chromogene im Kot wiederaufgefunden.

Aus der Tatsache, daß sich in Versuchen mit den verschiedensten Grünfuttermitteln konstant ein isosbestischer Punkt bei 406 nm ergab, schlossen die Autoren, daß ein einzelnes Chromogen für die Lichtabsorption in diesem Bereich verantwortlich sei.

Um quantitative Vergleiche zu ermöglichen, bzw. zu vereinfachen, wurden Natriumchromatlösungen als Standard herangezogen. Dieses Verfahren erscheint unnötig umständlich, da solche Vergleiche auch durch direkten Bezug der Extinktion auf die Gewichtseinheit der untersuchten Materialien (unter Berücksichtigung der Verdünnung der Extrakte) möglich sind (BRISSON u. HATINA 1957). STREETER (1969) ist sogar der Meinung, daß der Bezug auf Chromatlösung (mit der darauf basierenden Quantifizierung in "units") ungenaue Ergebnisse bringt.

Es wurde bald festgestellt (SMART et al. 1953), daß es sich bei "Chromogen" um eine ganze Reihe von Pigmenten handelt, wobei Carotinoide bis  $1/3$  der Gesamtextinktion bei 406 nm ausmachen. Im einzelnen wurden folgende Pigmente isoliert (die Zahlen in Klammern geben jeweils den prozentualen Anteil der einzelnen Pigmente an der Gesamtextinktion in Extrakten aus Heu bzw. Schaf-Faeces an): Carotin (1,8 bzw. 2,7), Lutein (11,7 bzw. 15,3), Violaxanthin (7,1 bzw. 2,9), Chlorophyll a (41,6 bzw. 11,9), Phaeophytin a (14,7 bzw. 44,5), Phaeophytin b (16,8 bzw. 18,4) und nicht identifizierte Pigmente (6,1 bzw. 4,0).

DAVIDSON (1954), der ebenso die einzelnen Fraktionen des Pigmentgemisches "Chromogen" untersuchte, kommt zu dem Ergebnis, daß bei allen von ihm untersuchten Fraktionen (Chlorophylle, Phaeophytine, Carotin und Xanthophyll) während der Magen-Darm-Passage Verluste auftreten, wobei die Verluste bei gleicher Diät zwischen einzelnen Versuchstieren (Schafen) schwanken. Im ganzen gesehen sollen diese Verluste aber durch entstehende Ab- oder Umbauprodukte und durch neu hinzukommende Pigmente (Sekretion, mikrobielle Neusynthese) ausgeglichen werden, so daß sich die Extinktion der 85 %igen Acetonextrakte aus Futter und Faeces nur unerheblich unterscheiden. DAVIDSON (1954) empfiehlt, vor der praktischen Durchführung von Verdauungsversuchen in jedem Fall die geeignetste

Wellenlänge zu ermitteln.

STEGGER et al. (1962) befassen sich mit dem Phänomen, daß das Maximum der Extinktionskurve eines acetonischen Grasextraktes bei 430 nm, des Kotextraktes aber bei 413 nm liegt. Sie stellen fest, daß diese Unterschiede auf Veränderungen des Chromogens im Pansen zurückzuführen sind und daß distal vom Pansen keine weiteren Verschiebungen der Extinktionskurve mehr auftreten.

Da durch eine Dampfbehandlung des frischen Grünfutters das Extinktionsmaximum des Extraktes ebenfalls nach 413 nm rückt, schlagen die Autoren vor, routinemäßig diese Dampfbehandlung vor der Chromogenanalyse von Grünfütter einzuschalten. Bei derart vorbehandeltem Grünfütter fanden sie 92 % der verfütterten Chromogene in den Faeces der Versuchstiere wieder, während bei unbehandeltem Gras die Wiederauffindungsrate (Messung bei 413 nm) 115 % betrug.

Die Autoren (STEGGER et al. 1962) stellten weiterhin einen wechselnden Chromogengehalt einzelner Faecesproben im Verlauf eines Tages fest, der sich durch Sammlung mehrerer Proben im Abstand von jeweils 6 Stunden ausgleichen ließ. Demgegenüber fanden WOOLFOLK et al. (1950) bei einzelnen Kotproben zu verschiedenen Tageszeiten Chromogen-Konzentrationen, die mit dem durchschnittlichen Gehalt des Kotes während einer ganzen Versuchsperiode vergleichbar waren.

Weitere Widersprüchlichkeiten und Schwierigkeiten ergeben sich aus den Befunden anderer Untersucher.

So berichtet TROELSEN (1961), daß die Extinktion extrahierter Chromogene bei Lichtzutritt zunimmt (um 33 % in 15 Tagen). Dagegen stellen STEGGER et al. (1962) eine deutliche Abnahme der Extinktion der Chromogenextrakte bei Lichtzutritt fest.

SQUIBB et al. (1958) warnen davor, die Chromogenmethode unkritisch auf unbekannte Grünfüttersorten zu übertragen.

Die Chromogen-Methode ("chromogen ratio method") ist offensichtlich mit einigen Mängeln behaftet, die hauptsächlich auf der Heterogenität des Pigmentextraktes beruhen dürften.

KANE u. JACOBSON (1954) machen daher den Vorschlag, die Extrakte aus Grünfütter mit gesättigter Oxalsäure zu behandeln. Dadurch sollen (ähnlich wie bei der Dampfbehandlung von STEGER et al. 1962) die Veränderungen, denen Chlorophyll im Magen-Darm-Trakt unterworfen ist (Umwandlung zu Phaeophytin mit entsprechender Wanderung des Extinktionsmaximums von 435 nm nach 415 nm), in vitro vorverlegt werden, um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen.

Einen anderen Weg gehen SMART et al. (1954). Sie behandeln Futter- und Faecesextrakte mit einer sauren Kupferchloridlösung zur Zerstörung der Carotinoide und Stabilisierung der porphyrinhaltigen Pigmente.

SHEARER (1963) versucht, die Schwierigkeiten der spektrographischen Analyse zu umgehen, indem er die sogenannten Rohpigmente extrahiert, trocknet und wiegt.

Über den praktischen Wert der drei letztgenannten Verfahren liegen kaum Erfahrungen vor. HARDISON et al. (1957) sind nicht zufrieden mit der Methode von SMART et al. (1954).

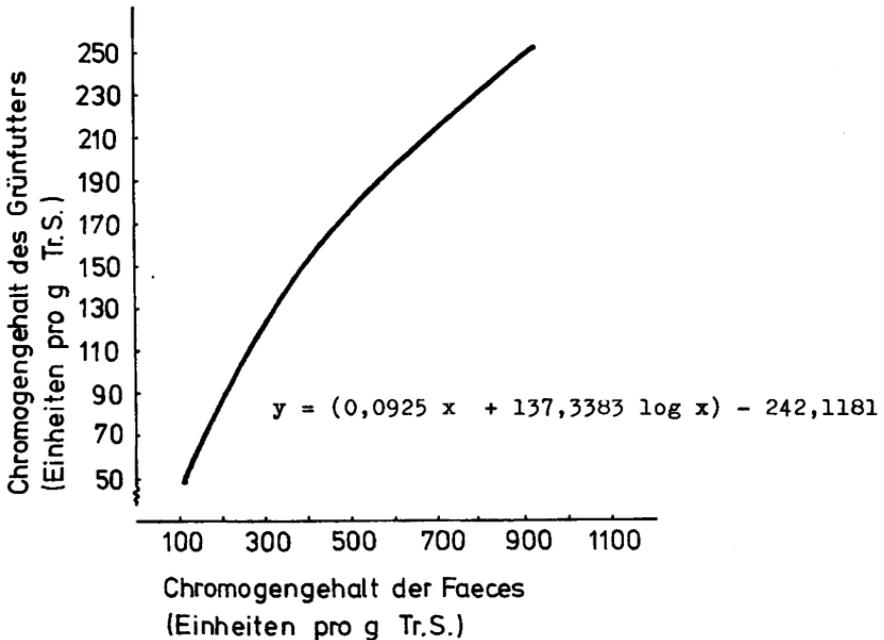
REID et al. weisen bereits im Jahre 1950 darauf hin, daß die Faeces von Rindern auf der Weide höhere Chromogenkonzentrationen zeigten als die Faeces der mit demselben (gemähten) Weidebewuchs gefütterten Stalltiere. Die Unterschiede dürften auf einer Futterselektion und Pigmentverlusten zwischen Schnitt und Fütterung beruhen.

Außerdem ist Chromogen aus Grünfütter schwieriger zu extrahieren als aus Faeces (REID et al. 1952). Aus diesen Gründen versuchen die Autoren, die Grünfütteranalyse zu umgehen. Sie bestimmten in konventionellen Verdauungsversuchen mit verschiedenen Grünfütterarten die Tr.S.-Aufnahme (w) und Tr.S.-Ausscheidung (x) von Wiederkäuern, außerdem die Chromogenkonzentration in der Kot-Tr.S. (y). Hieraus ließ sich - eine 100 %ige Wiederauffindungsrate des Chromogens vorausgesetzt - die Chromogenkonzentration in verschiedensten Grünfütterarten (z) rückrechnen ( $z = yx/w$ ).

Aus einer Vielzahl von durchgeführten Untersuchungen ergab sich die in Abbildung 4 graphisch dargestellte Beziehung zwischen Chromogengehalt in Faeces und Chromogengehalt der

verzehreten Grünfütteretrockensubstanz.

Abb. 4: Beziehung zwischen Chromogengehalt der Faeces und berechnetem Chromogengehalt des verzehreten Grünfutters (nach REID et al. 1952)



Ist demnach der Chromogengehalt in den Faeces (aufgrund von Analysen) bekannt, läßt sich der Chromogengehalt des Grünfutters aus Abbildung 4 ablesen (bzw. aus der angegebenen Gleichung errechnen) und in Gleichung (1) zur Berechnung der Futter-Tr.S.-Verdaulichkeit einsetzen. Demnach steht der Chromogengehalt eines Grünfutters in einem bestimmten Verhältnis zu seiner Scheinbaren Verdaulichkeit (REID et al. 1952). Daher müßte auch der umgekehrte Weg gangbar sein (die ordnungsgemäß quantitative Chromogenbestimmung im Grünfutter vorausgesetzt), aus der Chromogenanalyse einer repräsentativen Grünfutterprobe und der aus Abbildung 4 abgelesenen dazugehörigen Chromogenkonzentration in den Faeces die Verdaulichkeit der Futter-Tr.S. gemäß Gleichung (1) ( $V = 100 - \frac{100 \cdot x \cdot H}{I}$ ) zu berech-

nen; eine Chromogenkonzentration in der Futter-Tr.S. von 150 Einheiten/g korrespondiert mit einem Faeceschromogengehalt von (ca.) 400 Einheiten/g, woraus sich entsprechend Gleichung (1) die Tr.S.-Verdaulichkeit eines solchen Grünfutters zu  $100 - \frac{100 \times 150}{400} = 62,5 \%$  berechnet.

Diese Methode ("fecal chromogen method") kann jedoch nicht ohne Einschränkung verwendet werden, da Chromogengehalt und Scheinbare Verdaulichkeit eines Grünfutters doch in einem gewissen Maße voneinander unabhängig zu sein scheinen.

PIATKOWSKI et al. (1962 b) fanden nämlich, daß im Laufe einer Vegetationsperiode Chromogengehalt und experimentell ermittelte Scheinbare Verdaulichkeit in drei von acht Fällen gegenläufige Tendenz zeigten.

GREENHALGH u. CORBETT (1960) stellen fest, daß spätere Aufwüchse von Grünfutter bei gleicher Verdaulichkeit beträchtlich mehr Chromogen enthielten als der erste Aufwuchs. Sie sahen sich gezwungen, zwei verschiedene Regressionsgleichungen für erste und nachfolgende Aufwüchse anzugeben.

Berichte über praktische Anwendungen dieser Methode sind widersprüchlich.

MARTEN u. JORDAN (1967) berichten, daß das Verfahren bei alfalfa geringere Verdaulichkeiten ergab als bei Gräsern (bei vergleichbarer konventionell ermittelter Scheinbarer Verdaulichkeit).

BRANNON et al. (1954) sind sehr zufrieden mit den Ergebnissen, die sie mit der Kombination von Chromoxid und "fecal chromogen" erzielten.

KANE et al. (1953) fanden in einem konventionellen Verdauungsversuch 129 % der verfütterten Chromogene in den Faeces wieder. Sie meinen, diese "recovery errors" durch die Anwendung der "fecal chromogen method" von REID et al. (1952) umgehen zu können. Diese Ansicht ist insofern irrig, als die genannte Methode auf der Annahme basiert, daß die Wiederauffindungsrate der Chromogene 100 % beträgt. Werden in einem konventionellen Verdauungsversuch (bei dem selektives Fressen nicht ins Gewicht fällt) 129 % der verfütterten Chromogene im Kot wiederaufgefunden, handelt es sich nicht um "recovery errors", sondern entweder um Analysefehler (z.B. unvollständige Ex-

traktion des Grünfutters) oder um eine durch Verschiebung der absorptionskurve des Faeces-Extraktes bedingte erhöhte Extinktion bei der gemessenen Wellenlänge (z.B. GREENHALGH u. CORBETT 1960).

Den Stickstoff-(N-)Gehalt in den Faeces versuchten u.a. GALLUP u. BRIGGS (1948) und LANCASTER (1949) als Indikator für Verdaulichkeitsbestimmungen zu verwenden. Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß bei Fütterung von Heu mit unterschiedlichem Proteingehalt (ca. 3 bis 6 %) an Ochsen die N-Ausscheidung in den Faeces relativ konstant bei 0,55 g N pro 100 g Futter-Tr.S.-Aufnahme lag (GALLUP u. BRIGGS 1948). Auch bei Grünfütterung wurde ein relativ konstanter Wert von 0,83 g Faeces-N pro 100 g organischer Futter-Tr.-Substanz festgestellt (LANCASTER 1949).

Später stellten u.a. GREENHALGH et al. (1966) Regressionsgleichungen auf, die die Scheinbare Verdaulichkeit der organischen Futtersubstanz mit der N-Konzentration der organischen Faecessubstanz verknüpfen.

Verschiedene Untersucher berichten über die Anwendung der einen oder anderen "fecal nitrogen technique".

FORBES (1949) und HOMB u. BREIREM (1952) stellen Schwankungen in der absoluten Menge an (in den Faeces) ausgeschiedenem Stickstoff fest, nachdem bei konstanter Tr.S.-Zufuhr der Proteingehalt des Futters geändert worden war.

WOOLFOLK et al. (1950) konnten aufgrund hoher Schwankungen der N-ausscheidung keine Korrelation zwischen N-Ausscheidung (in Faeces) und Höhe der N-Zufuhr feststellen.

Verschiedene Regressionsgleichungen für erste und spätere aufwüchse von Grünfutter mußten von GREENHALGH u. CORBETT (1960) aufgestellt werden.

GREENHALGH et al. (1960) stellen signifikante Einflüsse der Jahreszeit und der Düngung auf die ermittelten Regressionen fest. LAMBOURNE u. REARDON (1962) führen diese Unterschiede auf das sich ändernde Verhältnis von Blättern zu Stengeln zurück. Ihre Versuchsergebnisse scheinen anzudeuten, daß Blätter und Stengel verschiedene Verdaulichkeiten und dementsprechend differierende "fecal index regressions" haben.

MASON (1969) untersucht die Herkunft des faekalen Stickstoffs. Je nach Zusammensetzung der Ration stammen zwischen 71,7 und 96,8 % des im Kot gefundenen Stickstoffs nicht aus der Nahrung (non-dietary faecal nitrogen, NDFN). Den größten Anteil an diesem NDFN stellt der Stickstoff aus Bakterien und "endogenem Zerfall". Die absolute Menge NDFN pro Gewichtseinheit aufgenommener Tr.S. oder verdaulicher Tr.S. ändert sich mit der Zusammensetzung der Ration.

Zu den bisher aufgezählten Schwierigkeiten dieser Methode kommt hinzu, daß auch hier das selektive Grasens der Weidetiere eine Fehlerquelle darstellt. Denn die benutzten Regressionsgleichungen werden aufgrund von konventionellen Verdauungsversuchen aufgestellt, deren Ergebnisse nur begrenzt auf die Verhältnisse bei Weidegang übertragbar sind (PEARCE et al. 1962).

Eine ausführliche Darstellung und Kritik der Methode gibt STREETER (1969).

## Eigene Untersuchungen

In Versuchen an kleinen und großen Wiederkäuern haben wir die Eignung von Carotin und Xanthophyll als Verdaulichkeitsindikatoren geprüft.

Obgleich es sich um eine ganze Gruppe sauerstoffhaltiger Carotinoide handelt, die bei der von uns verwendeten Analysenmethode erfaßt werden, in der zwar bei Weidegräsern das 1,4 - Dihydroxy - $\alpha$ - Carotin (= Lutein = "Blattxanthophyll") überwiegt, verwenden wir nachstehend "Xanthophyll" stets in der Einzahl. Auch der benützte Ausdruck "Carotin" ist ein Sammelbegriff, der die Gesamtheit der sauerstofffreien kohlenwasserstoff-Carotinoide beschreibt, bei denen allerdings das  $\beta$ -Carotin in Weidepflanzen mengenmäßig dominiert.

Xanthophylle schienen uns als Verdaulichkeitsindikator beim Wiederkäuer besonders geeignet zu sein. Es handelt sich um eine im Grünfutter weit verbreitete Pigmentgruppe, die sich auch in der Routineanalytik leicht erfassen läßt. Zudem resorbiert das Rind nur einen winzigen Anteil des mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommenen Xanthophylls. Die gelbliche Farbe des Blutserums und des Körperfetts von Rindern ist ausschließlich durch Carotine (hauptsächlich  $\beta$ -Carotin) bedingt.

Schafe, deren Blutserum und Fett farblos sind, scheinen nicht einmal Spuren von Xanthophyll oder Carotin speichern zu können.

Wir untersuchten folglich die Wiederauffindungsrate des Xanthophylls zuerst am kleinen Wiederkäuer. Zugleich wurde die Wiederauffindungsrate des Carotins miterfaßt, dessen Bestimmung im selben Analysengang anfällt. Die Verwertung des Carotins interessierte uns besonders im Hinblick auf seine Provitamin-A-Wirksamkeit.

Zur quantitativen Analyse der Pigmente wurde in den ersten beiden Versuchen folgendes Verfahren (ANALYSENKOMMISSION DER EWG, 1968) angewandt:

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient zur Bestimmung von Carotin und/oder Xanthophyll in Futtermitteln (und Faeces). Bei der Carotin-Bestimmung werden neben  $\beta$ -Carotin auch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Carotin, bei der Xanthophyll-Bestimmung werden alle sauerstoffhaltigen Carotinoide summarisch erfaßt.

### 2. Prinzip

Trockenfutter werden mit Hexan-Aceton-Gemisch, frische Futterpflanzen (und Faeces) mit Aceton bei Zimmertemperatur erschöpfend extrahiert und der Extrakt mit methanolischer Kaliumhydroxidlösung zur Zerstörung der Chlorophylle kalt verseift. Der zur Trockne eingedampfte Extrakt wird in Petroläther aufgenommen und an Aluminiumoxid zur Auftrennung der Carotin- und Xanthophyll-Fraktion chromatographiert. Das Eluat wird spektrophotographisch gemessen.

### 3. Reagentien

3.1 Äthanol, 96 v.H. (V/V)

3.2 Stickstoffgas gereinigt

3.3 Petroläther, Siedeintervall 30 bis 50 °C

3.4 Aluminiumoxid zur Chromatographie, standardisiert nach BROCKMANN wird 8 Stunden bei 750 °C erhitzt, im Exsikkator abgekühlt und in braunen Flaschen aufbewahrt. Vor der weiteren Verwendung zur Chromatographie werden 9l g mit 9 ml Wasser versetzt, kräftig geschüttelt und mindestens 12 Stunden in verschlossenen braunen Schliffflaschen aufbewahrt.

3.5 Natriumsulfat, p.a., wasserfrei

3.6 n-Hexan

3.7 Aceton

3.8 n-Hexan(3.6)-Aceton(3.7)-Mischung: 70/30 (V/V)

3.9 Methanolische KOH-Lösung 40 v.H. (G/V), aus Methanol p.a.

3.10 Natriumsulfatlösung, gesättigt, aus Natriumsulfat (3.5)

#### 4. Geräte

- 4.1 Glasgeräte: Erlenmeyerkolben, Scheidetrichter, Meßpipetten, Meßkolben, Meßzylinder mit Schliffstopfen
- 4.2 Wasserbad
- 4.3 Vakuum-Destillierapparat
- 4.4 Chromatographiesäulen aus Glas: Höhe 300 mm, innerer Durchmesser 10 bis 15 mm
- 4.5 Spektralphotometer oder Filterphotometer (450 nm)
- 4.6 Homogenisator
- 4.7 Filtriernutsche, Porosität G 3

#### 5. Verfahren

##### 5.1 Vorbereitung der Probe

Sorgfältig gezogene Durchschnittsproben von mindestens 500 g Gewicht werden nochmals gründlich gemischt und gegebenenfalls fein zerkleinert (0,5 mm-Sieb) unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen, um eine Zersetzung der Carotinoide während der Zerkleinerung zu vermeiden. Frische Futterpflanzen werden auf 5 mm mit dem Wiegemesser zerkleinert. Die Größe der Einwaage richtet sich nach dem erwarteten Carotingehalt.

Trockengrünfutter	1,5 bis 3 g
Frische Futterpflanzen	10 g
Faeces	5 g

##### 5.2 Vorbereitung des Extraktes

Trockengrünfutter: 1,5 bis 3 g des fein zerkleinerten Probenmaterials werden in einem mit Schliffstopfen verschließbaren Meßzylinder mit 30 ml der Hexan-Aceton-Mischung (3.8) versetzt und unter Stickstoff (3.2) über Nacht zur Extraktion stehengelassen. Eine Stunde vor der Chromatographie erfolgt ein Zusatz von 2 ml der methanolischen Kaliumhydroxidlösung (3.9). Die Probe wird kräftig geschüttelt und eine halbe Stunde im Dunkeln belassen. Es folgt ein Zusatz von 2 ml Wasser. Man schüttelt erneut und läßt absetzen. Dann werden 70 ml Hexan (3.6) zugesetzt und damit das Volumen der Hexan-Aceton-Mischung auf 100 ml eingestellt.

Ein aliquoter Teil wird im Vakuum bei 50 °C Wassertemperatur zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 5 ml Petroläther (3.3) aufgenommen.

Frisches Pflanzenmaterial (bzw. Faeces): 10 g fein zerschnittenes Pflanzenmaterial (bzw. 5 g homogenisierte Faeces) werden in einem Homogenisator dreimal mit je 50 ml Aceton (3.7) zerkleinert und extrahiert. Die Extrakte werden über eine Nutsche G 3 abgesaugt, vereinigt und in einem 200 ml-Meßkolben bis zur Marke mit Aceton (3.7) aufgefüllt. 20 ml der Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 0,5 ml methanolischer Kaliumhydroxidlösung (3.9) versetzt und kräftig geschüttelt. Man läßt eine halbe Stunde ruhen, fügt 30 bis 40 ml Petroläther (3.3) hinzu und schüttelt kräftig um. Zur Entfernung des Acetons und der methanolischen KOH-Lösung wird die Lösung dreimal mit 10 ml Wasser im Scheidetrichter gewaschen. Anschließend entfernt man Wasserspuren durch zweimalige Wäsche unter der gesättigten Natriumsulfatlösung (3.10). Man engt den Petrolätherextrakt bei 40 °C Wasserbadtemperatur im Vakuum auf 5 ml ein.

### 5.3 Chromatographie

Ein aliquoter Teil des Extraktes wird auf die gut mit Petroläther (3.3) befeuchtete Aluminiumoxid(3.4)-Säule (Höhe 150 mm) pipettiert, deren oberer Abschluß von 20 mm Natriumsulfat (3.5) gebildet wird. Unter schwachem Vakuum oder Überdruck wird die Tropfgeschwindigkeit der Säule auf 2 bis 3 Tropfen/sek. einreguliert. Die Carotinfraction wird im Durchlaufchromatogramm erhalten. Dazu wäscht man die Säule so lange mit kleinen Petroläthermengen (3.3), bis die abtropfende Flüssigkeit farblos erscheint.

Das Eluat wird in einer Vorlage aufgefangen und mit Petroläther (3.3) auf ein geeignetes Endvolumen aufgefüllt. Nach Wechseln der Vorlage wird die Xanthophyllfraction mit kleinen Mengen Äthanol (3.1) aus der Säule eluiert und mit Äthanol (3.1) auf ein geeignetes Endvolumen aufgefüllt.

### 5.4 Messung der Extinktion

Sie erfolgt in einem Spektralphotometer oder in einem geeigneten Filterphotometer.

Die Extinktion der Carotinfraction wird gegen Petroläther (3.3) bei 450 nm gemessen:

$$\beta\text{-Carotin} \quad E_{1\text{ cm}}^{1\%}(450\text{ nm}) = 2600$$

Die Extinktion der Xanthophyllfraktion wird gegen Methanol (3.1) ebenfalls bei 450 nm gemessen:

$$\text{Xanthophyll} \quad E_{1\text{ cm}}^{1\%}(450\text{ nm}) = 2500$$

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Die Größe der Einwaage und die Verdünnungsverhältnisse im Analysengang werden sinngemäß berücksichtigt. Gehaltsangaben für  $\beta$ -Carotin und/oder Xanthophyll erfolgen in mg/kg Trockenmasse (ppm). Es ist deshalb die parallel durchzuführende Untersuchung und Angabe des Wassergehaltes notwendig.

Der mittlere Fehler (s) der Ergebnisse liegt für Carotin- und Xanthophyllwerte in der Größenordnung von  $\pm 5$  v.H. Bei Pigmentkonzentrationen unter 4 ppm Carotin muß auch mit größeren Abweichungen gerechnet werden.

#### 7. Bemerkungen

Wegen der Licht- und Oxidationsempfindlichkeit des Carotins ist die Analyse möglichst schnell vorzunehmen. Die Aufbewahrung der Proben sollte im Kühlschrank erfolgen. Frisches Pflanzmaterial kann nur tiefgefroren gelagert werden.

Versuch I (Dez. 1968)

Ein ausgewachsener Hammel (63 kg Körpergewicht), der in einem Stoffwechsellkäfig aufgestellt war, wurde in einem konventionellen Verdauungsversuch ausschließlich mit Grasgrünmehlpellets gefüttert. Dieses Futter wurde gewählt, um Analysenschwierigkeiten aufgrund von inhomogenen Pigmentkonzentrationen zu vermeiden, wie sie etwa bei Heufütterung erwartet werden können.

Der Kot wurde quantitativ in Plastik-Beuteln aufgefangen, zweimal täglich gesammelt, gewogen und homogenisiert. Aus jedem homogenisierten Halbtageskot wurde eine aliquote Probe entnommen und sofort der Pigmentanalyse zugeführt. Der Rest wurde tiefgekühlt (- 20 °C) aufbewahrt.

An eine 6-tägige Vorperiode schloß sich eine 8-tägige Hauptversuchsperiode an.

Die Tagesration von 1331 g Tr.S. ( $\hat{=}$  1500 g Grasgrünmehl-Frischsubstanz) blieb über Vor- und Hauptperiode konstant und wurde immer quantitativ aufgenommen. Sie wurde täglich zur Hälfte um 8.00 und 17.00 Uhr gefüttert.

Die Rohnährstoffanalyse der Grasgrünmehlpellets ergab folgende Werte:

Rohprotein	12,67 %
Rohfett	3,94 %
Rohasche	9,85 %
Rohfaser	23,39 %
Wasser	11,27 %
N-freie Extraktstoffe	38,88 %

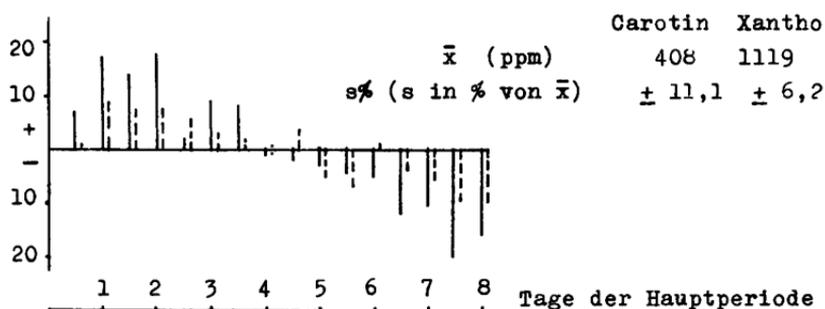
Das Grasgrünmehl hatte eine Konzentration von 151,4 ppm Carotin (im folgenden bezieht sich die Konzentrationsangabe "ppm" immer auf Tr.S.) und 423 ppm Xanthophyll.

Jede Tagesration enthielt durchschnittlich 202 mg Carotin und 564 mg Xanthophyll.

In den Faeces wurde ein mittlerer Carotingehalt von 407,6 ppm und Xanthophyllgehalt von 1118,5 ppm analysiert. Dabei

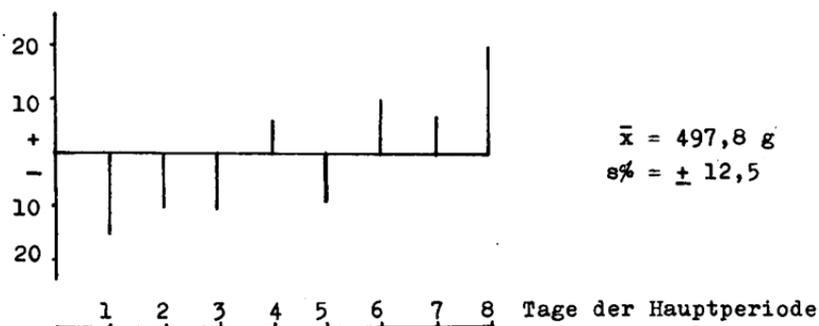
traten zwischen den einzelnen "Halbtageswerten" folgende Schwankungen auf (Abbildung 5).

Abb. 5: Schwankungen der Carotin(—)- und Xanthophyll(---)-Konzentration in den Faeces (in % der Mittelwerte)



Die Carotin- und Xanthophyllkonzentrationen in der Kottrockensubstanz fielen vom ersten Versuchstag an kontinuierlich ab, während die tägliche kot-Tr.S.-ausscheidung innerhalb der Hauptversuchsperiode deutlich anstieg (Abbildung 6).

Abb. 6: Schwankungen in der täglichen Kot-Tr.S.-ausscheidung (in % des Mittelwertes) während der Hauptversuchsperiode



Die gegenläufige Veränderung beider Meßgrößen (Pigmentkonzentration und Kot-Tr.S.-Ausscheidung) scheint auf eine sich während der Hauptperiode einstellende Depression der Futter-Tr.S.-Verdaulichkeit hinzudeuten. Eine sich bereits im ersten Drittel der Vorperiode klinisch abzeichnende Pansenacidose mag hierfür verantwortlich sein. Die tägliche Futtermenge wurde zwar noch aufgenommen, aber der Appetit des Versuchstieres war deutlich herabgesetzt.

Wir vermuten, daß die Pellets beim Kauen bald in Grünmehl zerfielen und die fein zermahlene Grasteile keinen genügenden Wiederkauanreiz boten, so daß es infolge herabgesetzten Speichelflusses zu einem Mangel an pufferndem Natriumbikarbonat kam.

Die Acidose konnte durch anfänglich intraruminale (via Pansenfistel), später orale Gaben von täglich 25 g  $\text{NaHCO}_3$  abgefangen werden, worauf sich die Freßlust wieder verbesserte. Die Pansenstätigkeit ließ jedoch nach, und Wiederkauen wurde immer seltener beobachtet.

Die täglich ausgeschiedenen Pigmentmengen wurden zur Berechnung der Wiederauffindungsraten den täglichen Einnahmen an diesen Pigmenten gegenübergestellt. Dabei ergab sich für Carotin eine durchschnittliche (bei täglich konstanter Pigmentzufuhr, wie in diesem Versuch, ist der Mittelwert aus den Wiederauffindungsraten der einzelnen Versuchstage identisch mit der Wiederauffindungsrate für den ganzen Versuch) Wiederauffindungsrate von 99,5 % und für Xanthophyll von 98,1 %.

$$\left( \frac{100 \times \text{Absolute Menge Carotin bzw. Xanthophyll im Kot}}{\text{Absolute Menge Carotin bzw. Xanthophyll im Futter}} \right)$$

Die über quantitative Kotsammlung ermittelte Scheinbare Verdaulichkeit der Futter-Tr.S. für die einzelnen Tage sank im Verlauf der Hauptperiode unregelmäßig von 68,3 bis auf 55,3 %. Die mittlere Scheinbare Verdaulichkeit während der Hauptperiode betrug 62,6 %.

Bei Verwendung von Carotin bzw. Xanthophyll als Verdaulichkeitsindikatoren errechnete sich eine mittlere Scheinbare Verdaulichkeit von 62,4 bzw. 62,0 %.

## Versuch II (Jan./Feb. 1969)

Nach den überraschend guten Wiederauffindungsraten von Carotin und Xanthophyll beim Hammel wurde mit derselben Charge Grasgrünmehlpellets ein analoger Verdauungsversuch am Rind (Jungbulle, 185 kg) durchgeführt.

Um dem Modell des Doppelindikatorversuchs näher zu kommen, wurde Chromoxid in einer Konzentration von 0,318 % homogen in das Grasgrünmehl eingemischt. Wir bevorzugten die Einmischung des Chromoxids gegenüber der üblichen einmaligen oder zweimaligen peroralen  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Gabe (in Form einer Gelatinekapselform), weil auf diese Weise die homogene Verteilung des Chromoxids in den Ingesta eher gewährleistet schien.

Ein Anteil von 2 % Natriumbikarbonat in den Pellets wurde vorbeugend zur Verhinderung der in Versuch I beschriebenen Pansenacidose eingemischt. Die für den Versuch benötigte Menge Pellets mußte zur Einmischung des Chromoxids und des Natriumbikarbonats zerkleinert und nach gründlicher Durchmischung erneut pelletiert werden. Die beim Pelletiervorgang auftretende Hitze (ca. 65 °C) ist vermutlich auch (neben der Lagerungszeit zwischen Versuch I und Versuch II) mit verantwortlich für den geringeren Pigmentgehalt der Pellets in diesem Versuch von durchschnittlich 93 ppm Carotin und 336 ppm Xanthophyll.

Der Kot wurde wie in Versuch I beschrieben gesammelt und weiter behandelt.

Der Versuch erstreckte sich über eine je 10 Tage währende Vor- und Hauptperiode.

Die tägliche Futter-Tr.S.-Menge betrug 2730 g und wurde in zwei Hälften um 7.00 und 17.00 Uhr gefüttert und immer quantitativ aufgenommen.

Die tägliche Zufuhr an Indikatoren betrug

Chromoxid	8,68 g
Xanthophyll	918 mg
Carotin	254 mg

Zur quantitativen Bestimmung von Chromoxid wurde in diesem Versuch die Methode von KIMURA u. MILLER (1957) benutzt (Prinzip: Nasse Veraschung der organischen Substanz mit konz. Salpetersäure, Oxidation von  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  mit Perchlorsäure; Messung der Extinktion bei 440 nm gegen Wasser; Vergleich mit einer Eichkurve aus Kaliumdichromat).

Der Carotin-, Xanthophyll- und Chromoxidgehalt der einzelnen "Halbtages-Faeces"-Proben wich nur geringfügig von der errechneten durchschnittlichen Konzentration ab (Abbildungen 7 und 8).

Abb. 7: Schwankungen der Carotin(—)- und Xanthophyll(---)-Konzentration in den Faeces (in % der Mittelwerte)

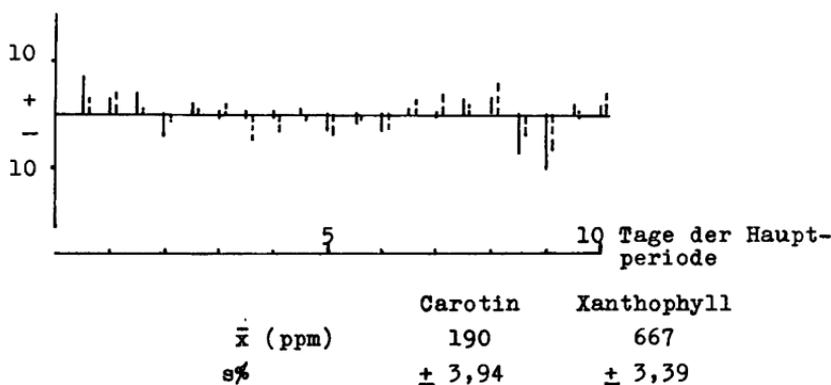
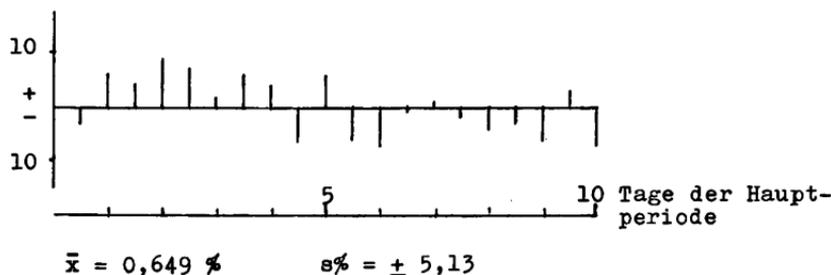


Abb. 8: Schwankungen der Chromoxidkonzentration in den Faeces (in % des Mittelwertes)



Die durchschnittlichen Indikatorkonzentrationen in der Kot-Tr.S. betragen 190 ppm Carotin, 667 ppm Xanthophyll und 0,649 % Chromoxid.

Carotin wurde im Mittel zu 95,9 %, Xanthophyll zu 93,9 % und Chromoxid zu 95,6 % wiederaufgefunden (Berechnung wie in Versuch I beschrieben).

Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der über die Indikatoren Carotin und Xanthophyll (nach Gleichung 1) errechneten scheinbaren Verdaulichkeit der Futter-Tr.S. an den einzelnen Versuchstagen mit der konventionell bestimmten scheinbaren Verdaulichkeit  $(100 - \frac{100 \times \text{Kot-Tr.S.}}{\text{Futter-Tr.S.}})$ .

Durch die homogene Einmischung konnte in diesem Versuch auch  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  zur Errechnung der scheinbaren Verdaulichkeit herangezogen werden. Tabelle 3 vergleicht die über  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  errechneten Werte mit den konventionell bestimmten.

Es ist erwähnenswert, daß die über die Indikatoren errechneten Werte geringeren Tagesschwankungen unterworfen sind als die über quantitative Kotsammlung ermittelten. Der Grund ist darin zu suchen, daß die konventionelle Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit in großem Maße von zufälligen Unregelmäßigkeiten in der Kotsammlung beeinflusst wird, wenn sich die Kotsammlung über eine relativ kurze Periode erstreckt (vgl. S. 18 oben). Das ist mit ein Grund dafür, weshalb Verdauungsversuche über mindestens 10 Tage angesetzt werden.

Bei Anwendung der Doppelindikatormethode jedoch dient die Chromoxidkonzentration in der Kot-Tr.S. dazu, die tägliche Ausscheidung an Faeces-Trockenmasse zu berechnen (Gleichung 2). Tabelle 4 zeigt einen Vergleich der über  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  errechneten täglichen Kot-Tr.S.-Menge mit der tatsächlich gewogenen Menge.

Der letzte Schritt der Doppelindikatormethode ist die indirekte Berechnung der täglichen Futter-Tr.S.-Aufnahme.

Tabelle 5 zeigt einen Vergleich der über die Kombinationen Carotin +  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  und Xanthophyll +  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  berechneten täglichen Futter-Tr.S.-Mengen (tatsächliche Menge 2730 g). Außerdem wird die prozentuale Abweichung der errechneten Werte vom tatsächlichen aufgeführt.

Tab. 2: Vergleich der über die Indikatoren Carotin und Xanthophyll errechneten Sch. Verdaul. von Grasgrünmehlpellets mit der konventionell (über quantitative Kot-sammlung) bestimmten Sch. Verdaul.

Versuchstag (29.1. - 7.2.)	Sch. Verdaul. via Carotin (in %)	Sch. Verdaul. via Xantho. (in %)	Konvention. Sch. Verdaul. (in %)
1	53,8	51,3	53,5
2	51,2	49,6	52,8
3	51,7	50,5	55,7
4	51,1	47,5	53,9
5	50,8	48,4	52,5
6	49,7	48,5	48,5
7	51,3	51,2	51,0
8	52,7	51,3	60,8
9	46,5	47,0	54,6
10	<u>52,1</u>	<u>50,6</u>	<u>48,0</u>
	$\bar{x}$ 51,1	49,6	53,1
	s% $\pm$ 3,83	$\pm$ 3,29	$\pm$ 6,92

Tab. 3: Vergleich der über Chromoxid errechneten Scheinbaren Verdaulichkeit mit der konventionell bestimmten Sch. Verdaul.

Versuchstag (29.1. - 7.2.)	Sch. Verdaul. via Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (in %)	Konvention. Sch. Verdaul. (in %)
1	51,6	53,5
2	53,8	52,8
3	53,0	55,7
4	53,4	53,9
5	50,8	52,5
6	47,6	48,5
7	50,8	51,0
8	49,5	60,8
9	48,7	54,6
10	<u>49,9</u>	<u>48,0</u>
	$\bar{x}$ 50,9	53,1
	s% $\pm$ 3,80	$\pm$ 6,92

Tab. 4: Vergleich der über  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  errechneten täglichen Kot-Tr.S.-Menge mit der gewogenen täglichen Kot-Tr.S.-Menge

Versuchstag (29.1. - 7.2.)	Kot-Tr.S. via $\text{Cr}_2\text{O}_3$ (in g)	Kot-Tr.S. gewogen (in g)	Differenz (in %)
1	1320,5	1269,1	+ 4,1
2	1262,1	1287,2	- 2,0
3	1281,9	1209,0	+ 6,0
4	1273,0	1257,9	+ 1,2
5	1343,4	1298,2	+ 3,5
6	1429,9	1406,0	+ 1,7
7	1343,5	1339,2	+ 0,3
8	1381,3	1069,0	+ 29,2
9	1400,7	1240,7	+ 12,9
10	<u>1369,2</u>	<u>1419,6</u>	<u>- 3,6</u>
$\bar{x}$	1340,6	1279,6	+ 5,3
s%	± 4,4	± 7,9	

Tab. 5: Vergleich der über Carotin + Chromoxid (C +  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) bzw. Xanthophyll + Chromoxid (X +  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) errechneten täglichen Futter-Tr.S.-Mengen und deren prozentuale Abweichung (%Aw.) vom tatsächlichen Wert (2730 g)

Versuchstag (29.1. - 7.2.)	Futter-Tr.S. via C + $\text{Cr}_2\text{O}_3$ (in g)	%Aw.	Futter-Tr.S. via X + $\text{Cr}_2\text{O}_3$ (in g)	%Aw.
1	2860	+ 4,8	2711	- 0,7
2	2585	- 5,4	2504	- 8,3
3	2652	- 2,9	2590	- 5,2
4	2604	- 4,5	2425	- 11,1
5	2730	± 0,0	2603	- 4,6
6	2843	+ 4,1	2774	+ 1,6
7	2756	+ 0,9	2750	+ 0,7
8	2920	+ 6,9	2835	+ 3,8
9	2620	- 4,0	2644	- 3,2
10	<u>2859</u>	<u>+ 4,7</u>	<u>2770</u>	<u>+ 1,5</u>
$\bar{x}$	2743	+ 0,5	2661	- 2,5
s%	± 4,5		± 4,9	

Beide Kombinationen erweisen sich als in hohem Maße geeignet, wobei die Kombination Carotin + Chromoxid den Vorteil der gleichen Wiederauffindungsrate hat und somit (wie auf S. 12 dargestellt wurde) zur richtigen Berechnung der Futter-Tr.S.-Aufnahme führt.

### Versuch III (Sept. 1969)

Beginnend mit diesem Versuch wurden Carotin und Xanthophyll nach dem folgenden Analysenverfahren (ANALYSENKOMMISSION DER EWG, 1968) quantitativ bestimmt:

1. Zweck und Anwendungsbereich  
(Wie auf S. 30 beschrieben.)

#### 2. Prinzip

Das Probenmaterial wird mit äthanolischer Kaliumhydroxidlösung hydrolysiert und mit Diäthyläther extrahiert. Der Extrakt wird mit Wasser gewaschen, zur Trockne eingeengt, in Petroläther aufgenommen und an Aluminiumoxid zur Auftrennung der Carotin- und Xanthophyllfraktion chromatographiert. Das Eluat wird spektrophotographisch gemessen.

#### 3. Reagentien

3.1 bis 3.5 wie auf S. 30 beschrieben

3.6 Äthanolische Kaliumhydroxidlösung 10 v.H. (G/V) aus Äthanol 96 v.H. (3.1)

3.7 Diäthyläther, puriss., wird zur Entfernung der Peroxide über einen alkalischen Eisen-II-Sulfatlösung (500 ml Eisen-II-Sulfatlösung 10 v.H. (G/V) + 500 ml Kaliumhydroxidlösung 5 v.H. (G/V) für 10 kg Diäthyläther) unter wiederholtem Umschütteln gelagert. Vor Gebrauch wird der Diäthyläther mit Wasser ausgeschüttelt und über KOH (in rotulis) oder metallischem Natrium destilliert. Aufbewahren über Natriumsulfat (3.5).

3.8 Seesand, mit Salzsäure gereinigt, oder Quarz in Pulverform

3.9 Kaliumhydroxidlösung 0,5 v.H. (G/V)

3.10 Äthanolische Phenolphthaleinlösung 0,5 v.H. (G/V) aus Äthanol 96 v.H. (3.1)

3.11 Äthanol, absolutus

3.12 Benzol, p.a., kristallisierbar

3.13 Benzol(3.12)-Äthanol(3.11)-Mischung: 1:1 in Vol.

#### 4. Geräte

- 4.1 Glasgeräte: Erlenmeyer-Kolben, Scheidetrichter, Meßpipetten, Meßkolben, Meßzylinder mit Schliffstopfen
- 4.2 Mörser
- 4.3 Wasserbad
- 4.4 Vakuum-Destillierapparat
- 4.5 Chromatographiesäulen aus Glas: Höhe 300 mm, innerer Durchmesser 10 bis 15 mm
- 4.6 Spektralphotometer oder Filterphotometer

#### 5. Verfahren

- 5.1 Vorbereitung der Probe (wie auf S. 31 beschrieben)
- 5.2 Vorbereitung des Extraktes

Die Probe wird mit 30 bis 80 ml (abhängig von der Einwaage) äthanolischer Kaliumhydroxidlösung (3.6) 30 Minuten lang bei 70 bis 80 °C Wasserbadtemperatur am Rückflusskühler unter Stickstoffatmosphäre (3.2) hydrolysiert und anschließend unter der Wasserleitung abgekühlt. 100 ml Diäthyläther (3.7) werden in die Seifenlösung gegeben. Die Probe wird kräftig geschüttelt und die Ätherseifenlösung vom festen Probenrückstand in einen Scheidetrichter dekantiert. Zur quantitativen Erfassung der Xanthophylle wird der Probenrückstand in einem Mörser unter Verreiben mit Seesand (3.8) mehrfach mit kleinen Diäthyläthermengen (3.7) erschöpfend extrahiert, und die Ätherextrakte werden mit der Ätherseifenlösung im Scheidetrichter vereinigt. Danach wird die Ätherseifenlösung im Scheidetrichter mit 100 ml Wasser gewaschen und die sich abscheidende äthanolisch-wässrige Phase abgetrennt. Die äthanolisch-wässrige Phase wird ihrerseits noch einmal mit 100 ml Diäthyläther (3.7) extrahiert, und die Ätherextrakte werden erneut vereinigt. Der Ätherextrakt wird nacheinander mit 100 ml Kaliumhydroxidlösung (3.9) und dann mehrmals mit je 50 ml Wasser bis zur Alkalifreiheit (Phenolphthalein(3.10)-Probe) gewaschen. Anschließend wird der Ätherextrakt oder ein aliquoter Teil davon im Wasserbad bei 40 °C im Vakuum zur Trockne eingengt. Wasserspuren werden mit 10 ml der Benzol-Äthanol-Mischung (3.13) im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird schnell in wenig Petroläther (3.3) aufgenommen und auf ein geeignetes Endvolumen gebracht.

- 5.3 Chromatographie,
- 5.4 Messung der Extinktion,
6. Berechnung der Ergebnisse und
7. Bemerkungen wie auf S. 32 f beschrieben

Zur quantitativen Bestimmung von Chromoxid wurde in diesem Versuch die von FETKY u. RAPP (1971) ausgearbeitete Methode benutzt.

#### 1. Prinzip

Mit Hilfe eines Oxidationsgemisches aus Schwefelsäure und Perchlorsäure wird die organische Substanz verascht und Chromoxid oxidiert. Das entstandene Chromat wird als Monochromat in alkalischer Lösung bei 370 nm photometrisch bestimmt.

#### 2. Reagentien

- 2.1 Chrom-III-oxid  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , wasserfrei, 99 v.H.
- 2.2 Perchlorsäure p.a., etwa 70 v.H.
- 2.3 Schwefelsäure p.a., 95 bis 97 v.H.
- 2.4 Natronlauge p.a., mindestens 32 v.H.
- 2.5 Natriummolybdat  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  p.a.
- 2.6 Natronlauge 0,1 N

#### 3. Herstellung des Oxidationsgemisches nach BOLIN et al. (1952)

Zu einer Lösung von 10 g Na-Molybdat (2.5) in 150 ml Aqua dest. werden vorsichtig 150 ml konzentrierte Schwefelsäure (2.3) gegeben. Nach Erkalten werden 200 ml Perchlorsäure (2.2) hinzugefügt und umgeschüttelt.

#### 4. Aufschluß der Analysenprobe

Etwa 0,5 g des fein gemahlene Untersuchungsmaterials werden zusammen mit 5 ml Oxidationsgemisch in einem 100 ml-Kjeldahl-Kolben unter dem Perchlorsäureabzug auf einem Mikrobrenner erhitzt. Die entweichenden Perchlorsäuredämpfe werden über ein Abzugsrohr durch eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach etwa 5 Minuten Siedehitze erfolgt die Oxidation zu Chromat, die an dem Farbumschlag von grün nach orangerot zu erkennen ist. Die klare Lösung wird nach Erkalten mit 2 ml Perchlorsäure (2.2) versetzt und nochmals 5 Minuten erhitzt. Die abgekühlte, stark saure Lösung wird mit wenig Aqua dest ver-

dünnt und schließlich mit 25 ml 32 %iger Natronlauge (2.4) unter Kühlung alkalisiert. Der sich abscheidende Niederschlag von Silikaten (Adsorption von Chromat!) wird 10 Minuten lang bei 3500 U/min. abzentrifugiert und zweimal mit etwa 5 ml 32 %iger Natronlauge (2.4) ausgewaschen. Die klaren, grünlich-gelben Überstände werden gesammelt und vereint in einem 100 ml-Meßkolben bis zur Marke mit 0,1 N Natronlauge (2.6) aufgefüllt.

#### 5. Photometrische Bestimmung

Zur photometrischen Messung wird die so erhaltene Monochromatlösung mit 0,1 N Natronlauge (2.6) auf eine chromäquivalente Konzentration von 2 bis 10 mg  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ /Liter verdünnt. Die Extinktionsermittlung erfolgt in einer Glasküvette ( $d = 10$  mm) gegen Aqua dest. bei 370 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers. Der Farbkomplex in der Lösung ist bei Zimmertemperatur mindestens drei Tage optisch stabil.

#### 6. Berechnung der Konzentration

Es gilt folgende Gleichung:

$$\text{mcg Cr}_2\text{O}_3/\text{ml Meßlösung} = 15,587 \times \text{Extinktion}$$

$$\text{(d.h., } E_1^1 \% \text{ cm (370 nm) = 641,56, bezogen auf Cr}_2\text{O}_3\text{!)},$$

wobei naturgemäß die Verdünnung der Analysenprobe zur Meßlösung noch berücksichtigt werden muß.

Der mittlere Analysenfehler liegt bei  $\pm 1,58$  %.

#### 7. Bemerkungen

Da in den oben genannten Faktor von 15,587 alle subjektiven Fehler eingehen, muß er von jedem Untersucher neu bestimmt werden (PETRY, 1972). Er betrug bei unseren Untersuchungen 15,457 .

Mit Versuch III war ein weiterer Schritt in Annäherung auf die Verhältnisse bei Weidegang beabsichtigt. Dazu wurde täglich um 6.00 Uhr geschnittenes Weidegras an einen Jungbullen ("Rind 1", 190 kg) und an ein Jungrind ("Rind 2", 260 kg) in täglich annähernd konstanter Menge verfüttert. Beide Versuchstiere erhielten zusätzlich (jeweils zur Hälfte um 7.00 und 17.00 Uhr) täglich insgesamt 11,88 g Chromoxid (12,00 g  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  99 v.H.), das in Gelatine kapseln über einen PVC-Schlauch in den Pansen gespült wurde.

Die Versuchszeit gliederte sich in eine 12-tägige Vorperiode und anschließende 10-tägige Hauptperiode.

Die Faeces wurden bei dem männlichen Tier mit Hilfe einer selbstkonstruierten Kotschürze in einer Wanne quantitativ gesammelt, täglich gewogen und homogenisiert; ein aliquoter Teil wurde zur Pigment-, Chromoxid- und Tr.S.-Bestimmung entnommen. Eine genügend große Probe wurde tiefgekühlt aufbewahrt. Der Kot des weiblichen Versuchstieres wurde nicht quantitativ gesammelt, sondern es wurde lediglich eine täglich frisch aus dem Rektum entnommene Faecesprobe untersucht.

Die Verwendung von frischem Weidegras führte zu der Schwierigkeit, die täglich gefütterte Menge an Trockensubstanz konstant zu halten. Wir gingen dabei so vor, daß den Versuchstieren am Morgen eine bestimmte Menge an Grünfutter-Frischsubstanz zugeessen wurde, deren Tr.S.-Gehalt aufgrund einer sofort anschließend vorgenommenen Tr.S.-Bestimmung errechnet wurde. Die an der täglichen Soll-Tr.S.-Aufnahme fehlende Menge wurde bei der Abendfütterung entsprechend zugeteilt.

In der Zeit zwischen Morgen- und Abendfütterung lagerte das Weidegras in einem dunklen Raum. Lagerungsverluste an Carotinoiden wurden in den ersten Versuchstagen überprüft; sie fielen nicht ins Gewicht, wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist. Demgegenüber traten bei frisch geschnittenem Grünfutter, das fein zerkleinert wurde, bei Lagerung bei Zimmertemperatur und unter Sauerstoffzutritt Carotinoidverluste in beträchtlichem Ausmaß auf. Sie lagen z.B. im Fall des  $\beta$ -Carotins in homogenisiertem Weisklee bei 60 % des Ausgangswertes innerhalb von 4 Stunden (LAST, Diss. in Vorbereitung). Bei gemähtem Gras jedoch sind die Verluste geringer, weil Luftsauerstoff, der für

die fermentativ katalysierte Oxidation der Carotinoide notwendig ist, nicht in dem Ausmaß Zutritt zu den Chloroplasten hat wie bei fein zerkleinertem Pflanzenmaterial.

Tab. 6: Carotin- und Xanthophyllgehalt (in ppm) in frisch geschnittenem Weidegras bei 10-stündiger Lagerung (7.00 und 17.00 Uhr)

Datum	7.00		17.00	
	Ø Carotin	Ø Xantho	Ø Carotin	Ø Xantho
4.9.	181,5	562,5	180,5	545
5.9.	208,5	604	227	638
6.9.	217,5	596,5	205	579,5
7.9.	245	743	250,5	753,5

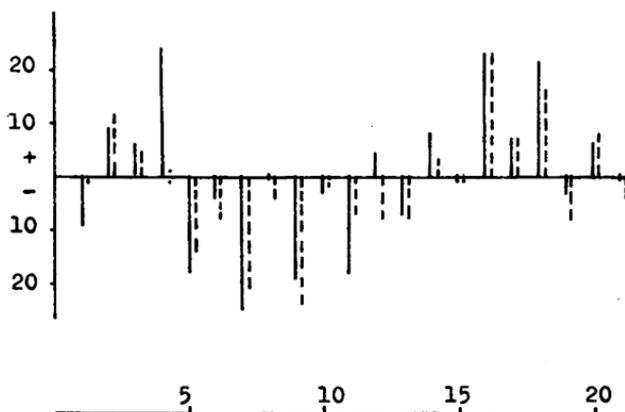
Außerdem stellten HOFFMANN u. NEHRING (1967) fest, daß zumindest die Carotin-Verluste (bei der Gärfutterzubereitung) mit fortschreitender Vegetationsperiode abnehmen. Dieser Effekt war schon im Juni deutlich bemerkbar, so daß anzunehmen ist, daß dieser Faktor hier (September!) auch eine Rolle gespielt hat.

Die tägliche Futter-Tr.S.-Menge betrug 5,50 kg. Die Rohnährstoffanalyse des Weidegrases hatte folgendes Ergebnis:

	In der Frischsubstanz	In der Tr.S.
Rohprotein	2,78 %	11,76 %
Rohfett	0,78 %	3,30 %
Rohfaser	6,77 %	28,63 %
Asche	2,35 %	9,94 %
Wasser	76,36 %	-
N-freie Extr.st.	10,96 %	46,37 %

Der Durchschnitt aus 65 Carotin- bzw. Xanthophyllbestimmungen im frischen Weidegras betrug 199,5 ppm bzw. 559 ppm. Die entsprechenden Tagesschwankungen sind in Abbildung 9 dargestellt.

Abb. 9: Tagesschwankungen (in % der Mittelwerte) der Carotin(—)- und Xanthophyll(---)-Konzentration in frischem Weidegras über einen Zeitraum von 21 Tagen



	Carotin	Xanthophyll
$\bar{x}$	199,5 ppm (Tr.S.)	559 ppm (Tr.S.)
s%	$\pm 13,5$	$\pm 11,3$

Auffallend ist die hohe prozentuale Abweichung der einzelnen Tageswerte vom 3-Wochen-Mittelwert.

Das Maximum der Xanthophyllabsorptionskurve (in Athanol) lag im Mittel bei 442,4 nm. Die bei 450 nm gemessene Extinktion der Xanthophyllextrakte, die der quantitativen Berechnung von Xanthophyll zugrundegelegt wurde (vgl. S. 45 bzw. 33), machte durchschnittlich 90,0 % der Maximalextinktion aus.

Die Pigmentanalysen der Faeces erbrachten gegenüber den hohen Schwankungen der Pigmentkonzentrationen im Grünfütter eine deutliche Nivellierung der Konzentration (Abbildungen 10 und 11)

Abb. 10: Schwankungen der Carotin-Konzentration (in % der Mittelwerte) in den Faeces

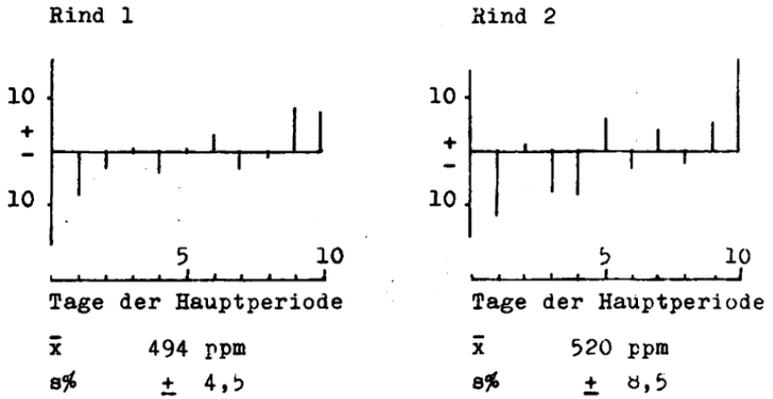
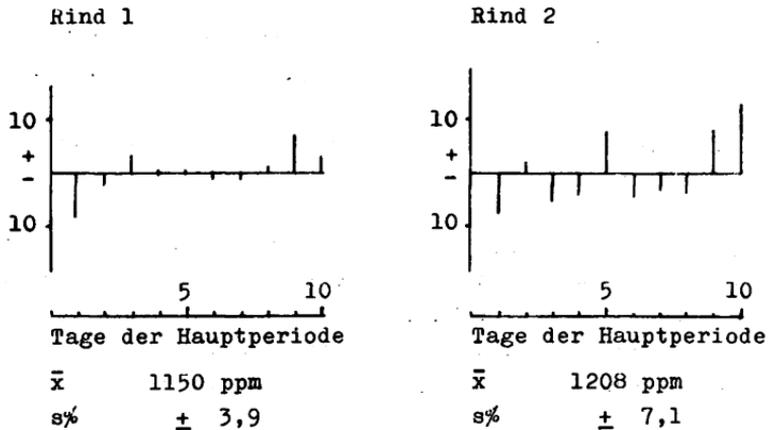
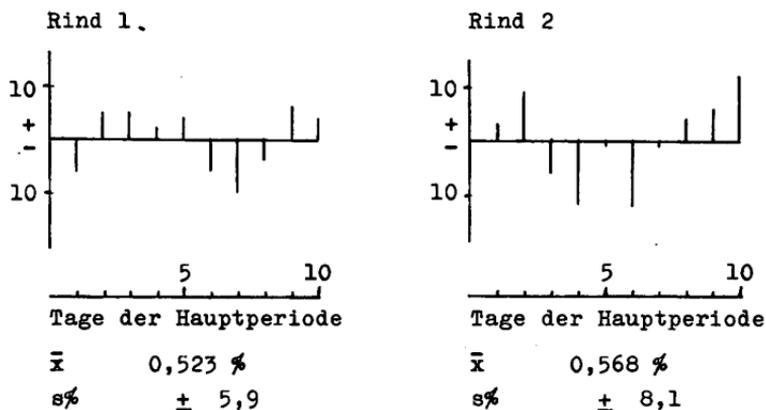


Abb. 11: Schwankungen der Xanthophyll-Konzentration (in % der Mittelwerte) in den Faeces



Die entsprechenden Befunde bei der Chromoxidanalyse der Faeces sind in Abbildung 12 dargestellt.

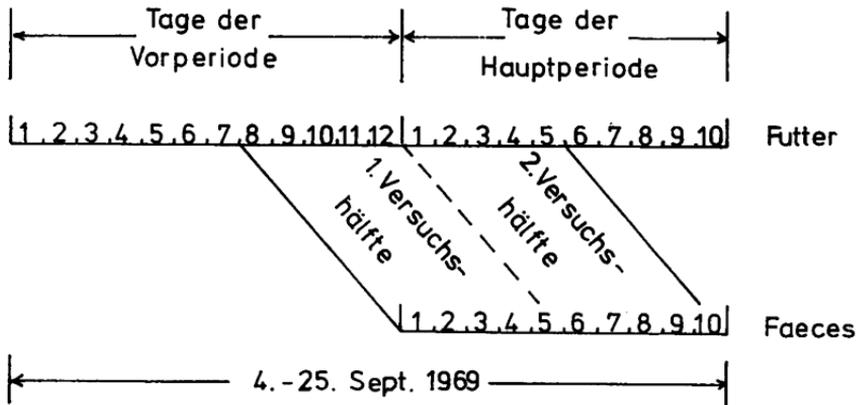
Abb. 12: Schwankungen der Chromoxid-Konzentration (in % der Mittelwerte) in den Faeces



Bei Rind 2 lagen die Konzentrationen von Chromoxid, Carotin und Xanthophyll in den Faeces höher als bei Rind 1; das Xanthophyll : Carotin-Verhältnis war dagegen das gleiche wie bei Rind 1. Wir müssen daraus schließen, daß die Scheinbare Verdaulichkeit des Weidegrases bei Rind 2 etwas höher lag als bei Rind 1.

Bei der Berechnung der Wiederauffindungsraten der Indikatoren gingen wir so vor, daß die Aufnahme (g Faeces-Tr.S., mg Carotin, mg Xanthophyll, g Chromoxid) in der Zeit vom 8. bis 12. Vorversuchstag den entsprechenden Ausscheidungen in der Zeit vom 1. bis 5. Hauptversuchstag gegenübergestellt wurde (1. Versuchshälfte). In gleicher Weise wurden die vom 1. bis 5. Hauptversuchstag aufgenommenen Mengen mit den vom 6. bis 10. Hauptversuchstag ausgeschiedenen verglichen (2. Versuchshälfte). Zur Verdeutlichung dient Abbildung 13.

Abb. 13: Schema zur Berechnung der Wiederauffindungsraten der Indikatoren in Versuch III



Schließlich legten wir der Berechnung der Ergebnisse die Aufnahmen vom 8. Vorversuchstag bis 5. Hauptversuchstag und Ausscheidungen vom 1. bis 10. Hauptversuchstag zugrunde (vgl. Abbildung 13). Dieses Verfahren wurde gewählt, weil es im Hinblick auf die praktische Verwendung einer Indikatormethode interessant ist festzustellen, ob kürzere Hauptversuchsperioden vergleichbare Ergebnisse liefern, wenn auch die Ergebnisse eines solchen Vergleiches mit einer gewissen Skepsis beurteilt werden müssen (vgl. S. 8). Nach den ersten Wochen des Weidegangs sind die Tiere adaptiert, und es kann auf eine Vorperiode verzichtet werden.

Die Ergebnisse des Versuches III sind in den Tabellen 7 bis 10 dargestellt.

Tab. 7: Wiederauffindungsraten der Indikatoren bei Rind 1 (in %)

	1. Versuchshälfte	2. Versuchshälfte	1. + 2. Versuchshälfte
Carotin	90,5	89,2	89,8
Xanthophyll	76,6	73,5	75,0
Chromoxid	87,2	87,6	87,4

Tab. 8: Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S. (in %) bei Rind 1 (R 1) und Rind 2 (R 2)

Berechnet über	1. Versuchshälfte		2. Versuchshälfte		1. + 2. Versuchshälfte	
	R 1	R 2	R 1	R 2	R 1	R 2
Kot-Tr.S.	65,4	-	62,9	-	64,1	-
Carotin	61,8	63,3	58,5	60,9	60,1	62,1
Xanthophyll	54,8	57,1	49,7	52,0	52,2	54,5

Tab. 9: Durchschnittliche tägliche Faecestrockenmasse (in g) bei Rind 1 (R 1) und Rind 2 (R 2)

Bestimmt über	1. Versuchshälfte		2. Versuchshälfte		1. + 2. Versuchshälfte	
	R 1	R 2	R 1	R 2	R 1	R 2
Wägung	1903	-	2041	-	1972	-
Chromoxid	2225	2125	2386	2057	2302	2091

Tab. 10: Berechnete durchschnittliche tägliche Futter-Tr.S.-Menge (in g) bei Rind 1 (R 1) und Rind 2 (R 2) (Gefüttert wurde 5.500 g pro Tag)

Errechnet über	1. Versuchshälfte		2. Versuchshälfte		1. + 2. Versuchshälfte	
	R 1	R 2	R 1	R 2	R 1	R 2
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +						
Carotin	5820	5790	5750	5260	5770	5519
Xanthophyll	4920	4950	4740	4280	4820	4596

Die relativ gute Genauigkeit der über Carotin + Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> errechneten Futter-Tr.S.-Menge erklärt sich aus der oben (s. S. 12) beschriebenen Tatsache, daß die Berechnung der Futter-Tr.S.-Menge richtig ist, wenn beide verwendeten Indikatoren dieselbe (oder annähernd dieselbe) Wiederauffindungsrate haben, wobei deren Höhe belanglos ist.

## Änderungen im Absorptionsverhalten von Xanthophyll nach der Darmpassage

Auffallend in diesem Versuch war eine deutliche Verschiebung der Absorptionskurve der Xanthophyllfraktion aus Faeces in den langwelligeren Meßbereich. Das Maximum der Absorptionskurve des Faeces-Xanthophyllextraktes (in Äthanol) lag bei 446,5 nm. Die Extinktion bei 450 nm betrug im Mittel 97,2 % der maximalen Extinktion (vgl. S. 49).

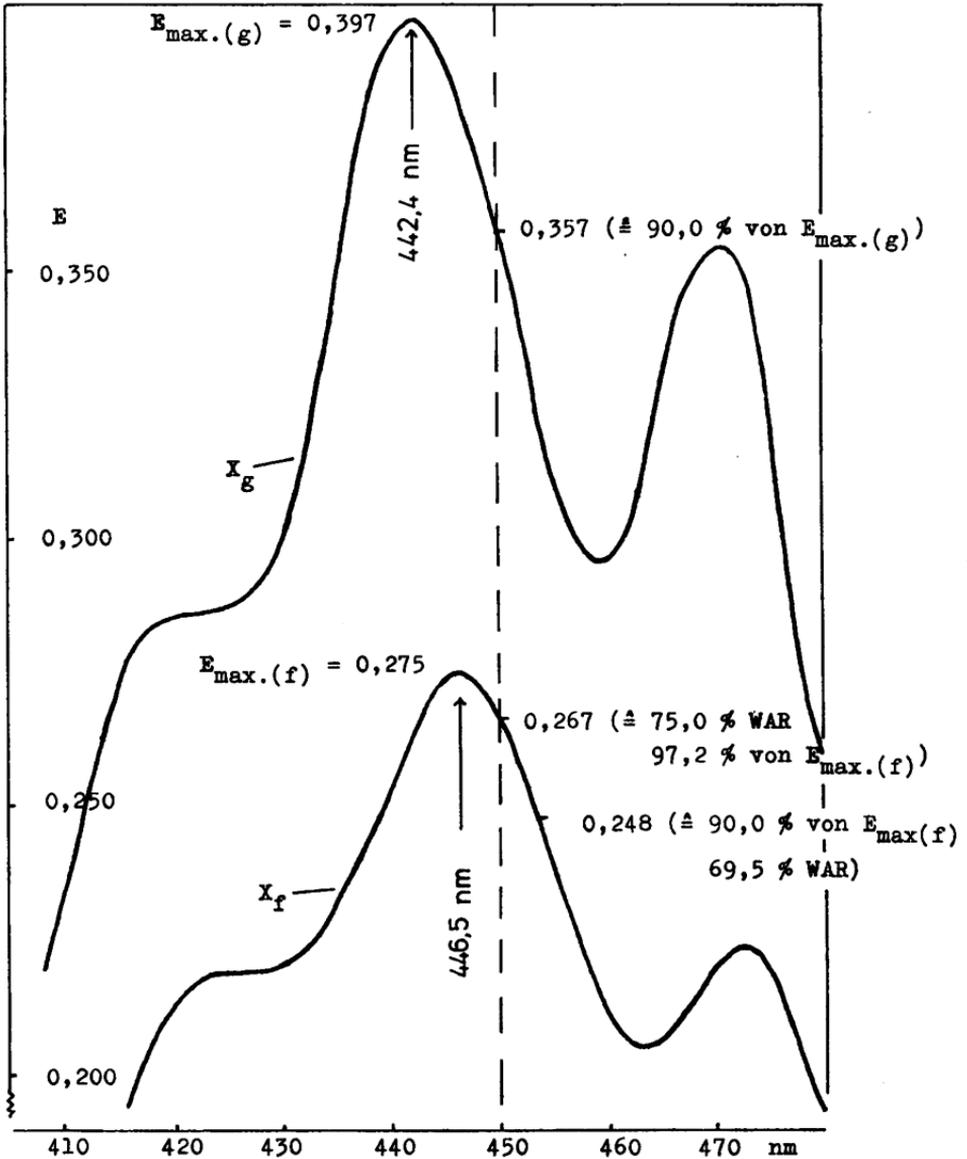
Es wurde folglich bei der Messung von Xanthophyll aus Faeces ein größerer Prozentsatz der tatsächlich vorhandenen Pigmente erfaßt als bei der Messung des Grasextraktes, da in beiden Fällen (gemäß Analysenvorschrift) die bei 450 nm gemessene Extinktion der quantitativen Berechnung zugrundegelegt wurde. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums hat also eine scheinbare Verbesserung der Wiederauffindungsrate zur Folge.

Die Absorptionskurven des Xanthophyllextraktes (in Äthanol) aus Weidegras bzw. Rinderfaeces sind in Abbildung 14 dargestellt. Das Verhältnis der Extinktion des Faeces-Xanthophylls bei 450 nm zur Extinktion des Weidegras-Xanthophylls bei 450 nm entspricht in dieser Darstellung der in Versuch III ermittelten durchschnittlichen Wiederauffindungsrate des Xanthophylls (bei Rind 1).

Aus der Abbildung wird die während der Magen-Darm-Passage auftretende Verschiebung des Xanthophyll-Extinktionsmaximums um ca. 4 nm zum langwelligen Licht hin deutlich.

Wäre die Xanthophyll-Absorptionskurve aus Faeces an der (relativ zu ihrem Maximum) gleichen Stelle gemessen worden wie die Xanthophyll-Absorptionskurve aus Weidegras, hätte sich eine durchschnittliche Wiederauffindungsrate von 69,5 % für Xanthophyll errechnet, wie aus der Zeichnung hervorgeht.

Abb. 14: Absorptionskurven von Xanthophyll aus Grünfutter ( $X_g$ ) und Rinderfaeces ( $X_f$ ) im Verhältnis der experimentell ermittelten Wiederauffindungsrate (WAR)



Versuche IV, V und VI (Jan. 1970)

In einer letzten Serie von Verdauungsversuchen sollte die Eignung von Carotin und Xanthophyll als Indikatoren noch einmal an einem großen Tiermaterial überprüft werden.

Bei diesen Versuchen, für die uns die Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub, in bedankenswerter Weise Grünfütter- und Faecesproben zur Verfügung stellte, wurden 9 Hammel verwendet.

Es sollte ferner geklärt werden, ob die auf die Vorbereitungsperiode von 10 Tagen folgende 10-tägige Hauptversuchsperiode sich ohne schwerwiegende Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse auf 5 Tage reduzieren läßt.

Verfüttert wurde Weidegras, das im August 1969 gemäht und a) sofort nach dem Mähen, b) nach leichtem Anwelken, c) in stark angewelktem Zustand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert worden war. Das Gras wurde einen Tag vor dem Verfüttern bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Die 9 ausgewachsenen Hammel wurden zu je 3 Tieren auf die folgenden 3 Versuchsgruppen verteilt:

	Hammel Nr.	Ration
Gruppe I	95, 73, 80	2,0 kg stark angewelktes Weidegras
Gruppe II	87, 83, 78	3,0 kg leicht angewelktes Weidegras
Gruppe III	88, 82, 77	3,0 kg frisches Weidegras + 300 g Heu

Gruppe III erhielt wegen des hohen Feuchtigkeitsgehaltes des frischen Weidegrases zusätzlich 300 g Heu pro Tag. Alle Versuchstiere waren einzeln in Stoffwechselkäfigen untergebracht. Der Kot wurde täglich gesammelt, gewogen und bis zum Versuchsende tiefgekühlt ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gelagert.

Die Rohnährstoffanalyse der einzelnen Rationen hatte folgende Ergebnisse:

	Weidegras frisch	Weidegras leicht angew.	Weidegras stark angew.	Wiesen- heu
Tr.S. (%)	16,8	31,7	55,6	89,4
	% in der Trockensubstanz			
Org. Substanz	80,0	83,4	86,0	93,5
Rohprotein	17,5	17,5	17,0	10,1
Rohfett	4,5	4,8	3,2	2,2
Rohfaser	20,9	22,8	23,0	33,2
Asche	20,0	16,6	14,0	6,5
NfE	37,1	38,3	42,8	48,0

Die Versuche gliederten sich in eine 10-tägige Vorperiode (Tag 1 bis 10) und eine anschließende 10-tägige Hauptversuchsperiode (Tag 11 bis 20).

Bei der Auswertung der Versuche wurden der Aufnahme an Tr.S., Carotin und Xanthophyll vom 6. bis 10. Tag (2. Versuchsviertel) die an den Tagen 11 bis 15 (3. Versuchsviertel) wiedergefundenen (und in einem Pool vereinigten) Mengen dieser Komponenten gegenübergestellt. In gleicher Weise wurden die Tage 11 bis 15 (3. Versuchsviertel; Aufnahme) mit den Tagen 16 bis 20 (4. Versuchsviertel; Wiederauffindung) verglichen. Ferner wurde die Aufnahme an den Tagen 6 bis 15 den (rechnerisch zusammengefaßten) wiedergefundenen Mengen im Abschnitt vom 11. bis 20. Tag gegenübergestellt.

Gruppe I (Stark angewelktes Weidegras; Versuch IV)

Der Tr.S.-, Carotin- und Xanthophyllgehalt des Grünfutters war während der gesamten Versuchszeit annähernd konstant. Die Carotinkonzentration betrug im 2. Versuchsviertel (2. VV) durchschnittlich 133 ppm, im 3. VV 124 ppm. Beim Xanthophyll lag die mittlere Konzentration bei 701 ppm (2. VV) bzw. bei 676 ppm (3. VV).

Das Extinktionsmaximum des Xanthophylls (in Äthanol) aus stark angewelktem Weidegras lag bei 444 nm; die bei 450 nm durchgeführte Messung erfaßte im Mittel 93,3 % der maximalen Extinktion.

Der Verzehr der Versuchsgruppe I in den einzelnen Abschnitten betrug:

	2. VV	3. VV	2. + 3. VV
g Tr.S.	5491,2	5672,4	11163,6
mg Carotin	730	705	1435
mg Xanthophyll	3848	3835	7683

Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 11 bis 13 dargestellt.

Tab. 11: Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S. (in %), berechnet über Kot-Tr.S.-Ausscheidung

Hammel Nr.	3. VV	4. VV	3. + 4. VV
95	74,8	79,1	77,0
80	74,8	77,0	75,9
73	76,0	77,2	76,7
$\bar{x}$	<u>75,2</u>	<u>77,8</u>	<u>76,5</u>

Tab. 12: Wiederauffindungsraten (WAR) von Carotin und über Caroti; errechnete Scheinbare Verdaulichkeit (% Verd.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. V		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
95	73,3	65,7	64,7	67,7	69,1	66,7
80	69,3	63,6	63,9	63,9	66,6	63,8
73	68,4	64,9	69,2	67,0	68,7	66,0
$\bar{x}$	70,3	64,7	65,9	66,2	68,1	65,5

Tab. 13: Wiederauffindungsraten (WAR) von Xanthophyll und über Xanthophyll errechnete Scheinbare Verdaulichkeit (% Ver.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. V		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
95	61,1	58,8	55,1	62,0	58,1	60,4
80	63,6	60,4	57,8	60,1	60,7	60,3
73	61,0	60,7	58,7	61,3	59,8	61,0
$\bar{x}$	61,9	60,0	57,2	61,1	59,5	60,6

Das auffallende Ergebnis dieses Versuches sind die schlechten Wiederauffindungsraten von Carotin und Xanthophyll, die wesentlich unter den bisher gefundenen Wiederauffindungsraten liegen. Sie sind bei allen Versuchstieren in annähernd der gleichen Größenordnung; individuelle Unterschiede fallen nicht ins Gewicht. Entsprechend den schlechten Wiederauffindungsraten errechnen sich mit Hilfe der Indikatoren viel zu geringe Werte für die Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S.

Das Extinktionsmaximum des Faeces-Xanthophyllextraktes (in Äthanol) lag bei 446 nm; die Messung bei 450 nm erfaßte im Durchschnitt 95,8 % der maximalen Extinktion.



Das Extinktionsmaximum des Xanthophyllextraktes aus dem leicht angewelkten Weidegras (in Äthanol) lag bei 443,6 nm; die Messung bei 450 nm erfaßte 93,2 % der Maximaextinktion.

Der Verzehr der Versuchsgruppe II in den einzelnen Abschnitten betrug:

	2. VV	3. VV	2. + 3. VV
g Tr.S.	4786,5	4727,4	9513,9
mg Carotin	852	794	1646
mg Xanthophyll	3943	3941	7884

Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 14 bis 16 dargestellt.

Tab. 14: Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S. (in %), berechnet über Kot-Tr.S.-Ausscheidung

Hammel Nr.	3. VV	4. VV	3. + 4. VV
87	66,6	64,5	65,5
83	67,9	68,4	68,1
78	68,0	68,7	68,3
	<u>        </u>	<u>        </u>	<u>        </u>
$\bar{x}$	67,5	67,2	67,3

Tab. 15: Wiederauffindungsraten (WAR) von Carotin und über Carotin errechnete Scheinbare Verdaulichkeit (% Verd.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. VV		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
87	91,7	63,5	95,3	62,8	93,4	63,1
83	84,7	62,0	87,1	63,8	85,9	62,9
78	91,4	64,9	87,1	64,0	89,3	64,5
	<u>        </u>					
$\bar{x}$	89,3	63,5	89,8	63,5	89,5	63,5

Tab. 16: Wiederauffindungsraten (WAR) von Xanthophyll und über Xanthophyll errechnete Scheinbare Verdaulichkeit (% Verd.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. VV		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
87	81,6	59,0	83,3	57,3	82,4	58,2
83	78,4	58,9	75,0	57,9	76,7	58,5
78	<u>82,3</u>	<u>61,0</u>	<u>79,6</u>	<u>60,6</u>	<u>80,9</u>	<u>60,9</u>
$\bar{x}$	80,8	59,6	79,3	58,6	80,0	59,2

Die Wiederauffindungsraten der Indikatoren sind in diesem Versuch deutlich besser als in Versuch IV (stark angewelktes Weidegras), wengleich bestenfalls das Carotin mit einer Wiederauffindungsrate von annähernd 90 % als Indikator geeignet erscheint.

Das Extinktionsmaximum des Xanthophyllextraktes aus *Faeces* (in Athanol) lag im Durchschnitt bei 446 nm; die Extinktion des Extraktes bei 450 nm betrug im Mittel 95,9 % der maximalen Extinktion.

Gruppe III (Frisches Weidegras und Heu; Versuch VI)

Das frische Weidegras hatte einen durchschnittlichen Tr.S.-Gehalt von 16,8 %.

Höhe und Schwankungen der Carotin- und Xanthophyllkonzentrationen sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

Abb. 17: Schwankungen der Carotin-Konzentration (in % der Mittelwerte) in frischem Weidegras

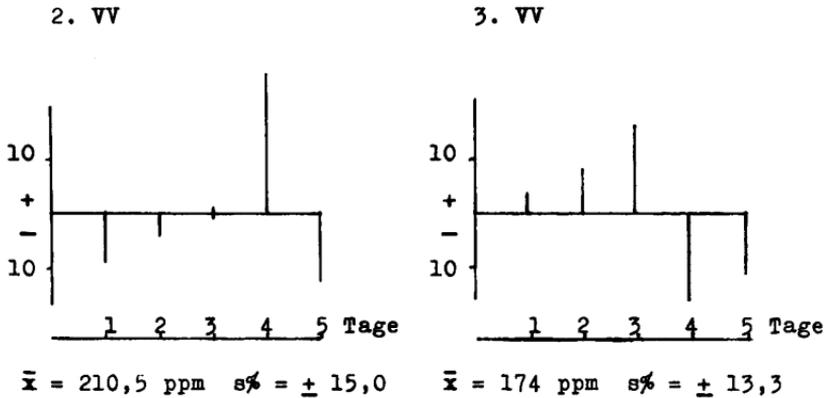
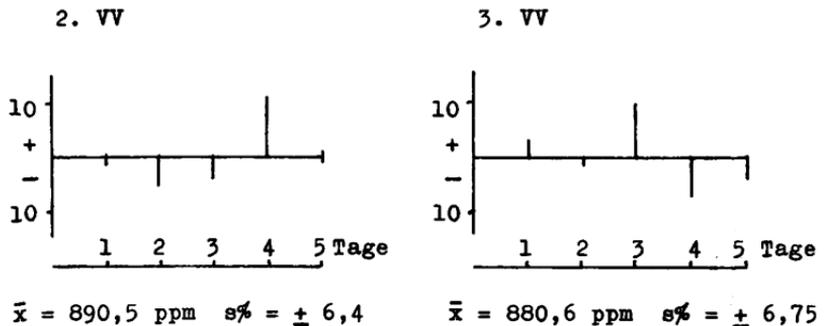


Abb. 18: Schwankungen der Xanthophyll-Konzentration (in % der Mittelwerte) in frischem Weidegras



Das Xanthophyllextinktionsmaximum des frischen Weidegrases (in Äthanol) lag bei 443,3 nm; die Messung bei 450 nm erfaßte 92,7 % der maximalen Extinktion.

Das Wiesenheu hatte einen durchschnittlichen Tr.S.-Gehalt von 89,4 %, einen Carotingehalt von 22,8 mg pro kg Tr.S. und einen Xanthophyllgehalt von 204 mg/kg Tr.S.

Der Verzehr der Versuchsgruppe III in den einzelnen Abschnitten betrug:

	2. VV	3. VV	2. + 3. VV
g Tr.S.	3848,1	3883,8	7731,9
mg Carotin	557	473	1030
mg Xanthophyll	2505	2515	5020

Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 17 bis 19 dargestellt.

Tab. 17: Scheinbare Verdaulichkeit der Tr.S. von frischem Weidegras + Heu (in %), berechnet über Kot-Tr.S.-Ausscheidung

Hammel Nr.	3. VV	4. VV	3. + 4. VV
88	65,7	69,3	67,5
82	67,7	56,4	62,0
77	65,4	65,8	65,6
	<u>        </u>	<u>        </u>	<u>        </u>
$\bar{x}$	66,3	63,8	65,0

Tab. 18: Wiederauffindungsrate (WAR) von Carotin und über Carotin errechnete (die theoretische durchschnittliche Carotin-Konzentration der Gesamtration wurde aus den oben angegebenen Absolutmengen an Carotin und Tr.S. berechnet) Scheinbare Verdaulichkeit (% Verd.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. VV		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
88	93,9	63,5	83,7	63,3	89,1	63,5
82	82,9 (!)	61,1	118,5 (!)	63,2	99,2	61,7
77	91,2	62,1	97,0	64,7	93,8	63,3
	<u>        </u>					
$\bar{x}$	89,3	62,2	99,7	63,7	94,0	62,8

Tab. 19: Wiederauffindungsraten (WAR) von Xanthophyll und über Xanthophyll errechnete (vgl. Tab. 18) Scheinbare Verdaulichkeit (% Verd.) der Trockensubstanz

Hammel Nr.	3. VV		4. VV		3. + 4. VV	
	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.	WAR	% Verd.
88	85,8	60,0	72,3	57,6	79,0	58,9
82	76,6(!)	57,8	106,4(!)	59,0	91,5	58,5
77	<u>85,6</u>	<u>59,6</u>	<u>84,2</u>	<u>59,4</u>	<u>84,9</u>	<u>59,5</u>
$\bar{x}$	82,7	59,1	87,6	58,7	85,1	59,0

Die Daten über Lage der Extinktionsmaxima der Xanthophyllfraktion und Anteil der Extinktion bei 450 nm an der Maximalextinktion aus den Versuchen III bis VI sind in Tabelle 20 zusammengefaßt.

Tab. 20: Lage der Extinktionsmaxima ( $E_{max.}$ ) und prozentualer Anteil von  $E_{450\text{ nm}}$  an  $E_{max.}$  in den Versuchen III bis VI

Versuch Nr.	Grünfutter		Faeces	
	$E_{max.}(nm)$	$\frac{\% E_{450\text{ nm}}}{E_{max.}}$	$E_{max.}(nm)$	$\frac{\% E_{450\text{ nm}}}{E_{max.}}$
IV	444	93,3	446	95,8
V	443,6	93,2	446	95,9
(VI	443,3	92,7	446,3	96,6)
III	442,4	90,0	446,5	97,2

Obwohl Versuch VI in diesem Zusammenhang (wegen der Zufütterung von Heu) nur beschränkt verwendbar ist, scheint sich doch eine gewisse Tendenz abzuzeichnen: Je frischer ein Grünfutter ist, desto näher liegt das Extinktionsmaximum der Xanthophyllfraktion (in Äthanol) bei 439 nm (Violaxanthin), und umso geringer ist folglich der Anteil der Extinktion bei 450 nm an der Maximalextinktion.

Trocknung und Welken scheinen auf die Xanthophyllfraktion eines Grünfutters unterschiedliche Wirkung zu haben, denn in den Versuchen mit Grasgrünmehlpellets (I und II) war die Wiederauffindungsrate von "Xanthophyll" am höchsten, in Versuch IV (stark angewelktes Weidegras) dagegen am niedrigsten.

Das in den Versuchen III bis VI aufgeworfene Problem der Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus 5- und 10-tägigen Versuchsperioden läßt sich reduzieren auf die Frage, ob die Forderungen 1 und 2 (S. 5 ff) erfüllt sind. Dann nämlich kommen die Vorteile der Anwendung von Indikatoren zum Tragen: Empfindliche Reaktion auf echte Schwankungen der Verdaulichkeit und Unempfindlichkeit gegenüber zufälligen Schwankungen in der Kotsausscheidung. Die Bedeutung der Länge der Versuchsperiode als ausgleichendes Moment tritt dann in den Hintergrund.

In Versuch VI kommt der letztgenannte Vorteil der Indikatoranwendung zum Ausdruck. Hammel Nr. 82 zeigte im 3. VV eine Kotverhaltung, was zur Folge hatte, daß die konventionell (über quantitative Kotsammlung) berechnete Scheinbare Verdaulichkeit höher lag als bei den anderen beiden Tieren der gleichen Versuchsgruppe (Tab. 17). Im 4. VV schied Tier Nr. 82 vermehrt Kot aus, d.h., die konventionell bestimmte Scheinbare Verdaulichkeit fiel deutlich unter das Niveau der anderen Hammel. Bei indirekter Berechnung der Scheinbaren Verdaulichkeit (über die Indikatoren Carotin und Xanthophyll) liegen die Werte für Nr. 82 in der gleichen Größenordnung wie die der übrigen Tiere (Tabb. 18 und 19).

## Diskussion

Wenn in der Literatur Carotinoide im Zusammenhang mit Indikatormethoden erwähnt werden, dann i.d.R. in dem Sinn, daß sie von vornherein als untauglich erklärt werden.

DAVIDSON (1954) meint ferner, es sei mit keinem Vorteil verbunden, eine einzelne Pigmentfraktion als Indikator zu verwenden (vgl. S. 22), da in allen Fraktionen Verluste aufträten. Nach seinen eigenen Angaben sind diese Verluste bei Carotin aber erstaunlich niedrig (7 % als Durchschnitt von 4 Versuchstieren, verglichen mit durchschnittlich 52 % bei den gesamten fettlöslichen Tetrapyrrolen, also Chlorophyllen und Phaeophytinen!).

Ähnlich äußern sich IRVIN u. WISEMAN (1953), die Carotine und Xanthophylle wegen ihrer Instabilität und Verdaulichkeit als Indikatoren in Verdauungsversuchen für ungeeignet halten. Allenfalls die Summe aller Pigmente sei als Indikator zu verwenden (DAVIDSON 1954, IRVIN u. WISEMAN 1953 und IRVIN et al. 1953). Dagegen ist einzuwenden, daß es nach den bisherigen Erfahrungen mit Pigmentmischungen (Chromogen und "Xanthophyll", s.u.) ratsamer erscheint, eine chemisch definierte Substanz als Indikator zu wählen, als ein in seiner Zusammensetzung unbekanntes Gemisch mit unberechenbaren Eigenschaften. Dabei kann auch eine nicht ganz vollständige Wiederauffindungsrate in Kauf genommen werden, wenn man ausschließen kann, daß sie durch ein zufälliges Zusammenwirken unbekannter Faktoren großen Schwankungen unterliegt. Es ist letztlich irrelevant zu wissen, ob eine Kuh 15,0 oder 15,5 kg Tr.S. aufgenommen hat, und die Tr.S. zu 67 % oder zu 65 % verdaut wurde, solange den (über Indikatoren) berechneten Werten Vertrauen entgegengebracht werden kann.

Carotin hat in einem Teil der beschriebenen Versuche Wiederauffindungsraten gezeigt, die durchaus mit praxisüblichen Indikatoren vergleichbar sind.

Seine Funktion als Provitamin-A und essentielle Vitaminquelle des Wiederkäuers ließ allerdings den Gedanken an eine mögliche Eignung als Indikator gar nicht erst aufkommen. Trotz-

dem werden von manchen Autoren unfreiwillig Argumente geliefert, die eine Indikatoreignung zumindest diskutabel erscheinen lassen. So wird nach PAGE et al. (1958) bei Rindern durch Erhöhung der Carotinzufuhr die Carotinausnutzung verschlechtert. GEBAUER (1962) rechnet in einer Studie zur Carotinversorgung der Nutztiere mit einer 10 %igen Ausnutzung von Carotin. BRUNE u. ZADDACH (1965) fanden bei Schafen eine Carotinverdaulichkeit zwischen 4 und 25 %.

Bei genügend hoher Carotinzufuhr kann der Bedarf aus einem relativ kleinen Teil des Angebots gedeckt werden, wie aus der folgenden Rechnung deutlich wird: Frisches Weidegras guter Qualität enthält wenigstens 300 ppm Carotin (in der Tr.S.). Eine Kuh mit 500 kg Körpergewicht nimmt also bei einem Tr.S.-Verzehr von 12 kg täglich 3,6 g Carotin auf. GUILBERT u. LOOSLI (1951) postulieren einen Carotinbedarf für Rinder und Schafe von 132 mcg/kg und Tag. Als Kriterien verwenden sie Wachstum und Fortpflanzungsleistung, unter Berücksichtigung eines gewissen Sicherheitsfaktors. Eine Kuh mit 500 kg Lebendgewicht benötigt demnach 66 mg Carotin pro Tag. Selbst wenn man unterstellt, daß nach Weideauftrieb erst alle Speicher für Carotin (Fett, Leber) aufgefüllt werden müssen, wird in relativ kurzer Zeit eine hohe Wiederauffindungsrate zu erwarten sein, die in dem gegebenen Beispiel 98,2 % betragen müßte.

Wenn GEBAUER (1965) eine Versorgung von 600 mg Carotin pro Hochleistungskuh pro Tag fordert, ist dieser Betrag nicht als tatsächlicher Bedarf zu werten; diese Zufuhr stellt vielmehr die geringe Ausnutzungsrate für Carotin schon in Rechnung.

Dagegen sind in der Literatur auch Hinweise für eine weitaus höhere Scheinbare Verdaulichkeit von Carotin vorhanden. CHANDA et al. (1951) fanden bei Ziegen eine durchschnittliche Verdaulichkeit von 63 % (Durchschnitt aus 4 Versuchstieren). WING (1969) errechnete aus Daten von 445 Verdauungsversuchen an 35 Tieren mit verschiedenen Grünfuttersorten eine Scheinbare Verdaulichkeit für Carotin von 77,7 %. Dieses Ergebnis stammt jedoch nicht aus konventionellen Verdauungsversuchen, sondern wurde mit Hilfe von 2 Indikatoren ("fecal chromogen" nach REID et al. 1952 und Chromoxid) bestimmt.

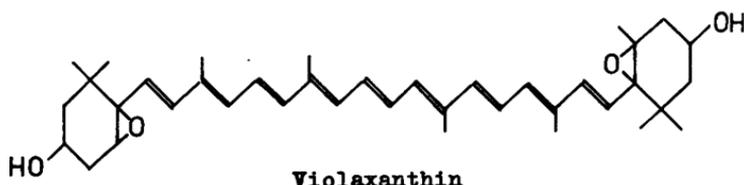
Über negative Carotinbilanzen wird immer wieder berichtet. Die überraschendsten Angaben stammen von WHITNAH et al. (1939), die zwischen 75 und 1470 % (!) des verfütterten Carotins in den Faeces wiederfanden. In jüngerer Zeit fanden TUCKER et al. (1967) 160 bis 300 % der an Hammel verfütterten Carotinmenge in den Faeces wieder. Die in den Faeces gefundenen Pigmente bestanden jedoch nicht aus reinem  $\beta$ -Carotin, wie durch Fütterung der isolierten Pigmente an Vitamin-A-Mangel-Küken gezeigt werden konnte, die auf eine fehlende Vitamin-A-Aktivität schließen ließ.

McGILLIVRAY (1951) ist der Ansicht, daß negative Carotinbilanzen durch mikrobielle Carotinsynthese zustandekommen. Es ist zwar bekannt, daß bestimmte Bakterien (wie Purpurbakterien) Carotinoide bilden können (JENSEN et al. 1961), aber diese Bakterien kommen im Verdauungstrakt nicht vor (GIESECKE 1972). Berücksichtigt man außerdem die physiologischen Funktionen der Carotinoide (Photosynthese und Farbgebung; KARLSON 1970), erscheint eine mikrobielle Synthese von Carotinoiden im lichtlosen und anaeroben Milieu des Verdauungstraktes wenig wahrscheinlich.

Eine andere mögliche Erklärung für negative Carotinbilanzen bieten ALMENDINGER u. HINDS (1969 a und b) an. Nach ihren Erfahrungen wird Carotin bei der Analyse aus Grünfütter teilweise unvollständig, aus Faeces aber vollständig extrahiert, wodurch eine negative Bilanz vorgetäuscht wird. Als Ursache vermuten die Autoren Carotin-Protein-Komplexe, aus denen Carotin nur unter größten Schwierigkeiten zu extrahieren ist. Über solche Komplexe in grünem Pflanzenmaterial berichten auch u. a. NISHIMURA u. TAKAMOTO (1957).

SAVEL'EV (1968) beschreibt ein Phänomen, das die Verwendbarkeit von Carotin als Indikator ausschließen würde. Er stellte bei Grünfütterpflanzen ausgeprägte periodische Tagesschwankungen des Carotiningehaltes fest. So zeigten Lupinen bei Sonnenaufgang, um 13.00, 21.00 und 1.00 Uhr folgende Carotinkonzentrationen (in der Tr.S.): 500 ppm, 150 ppm, 180 ppm und 60 ppm. Diese sehr überraschend hohen Tagesschwankungen sind u.W. von anderen Autoren zumindest in diesem Umfang bisher nicht bestätigt worden. Eigene Untersuchungen zu diesem Thema sind noch nicht abgeschlossen.

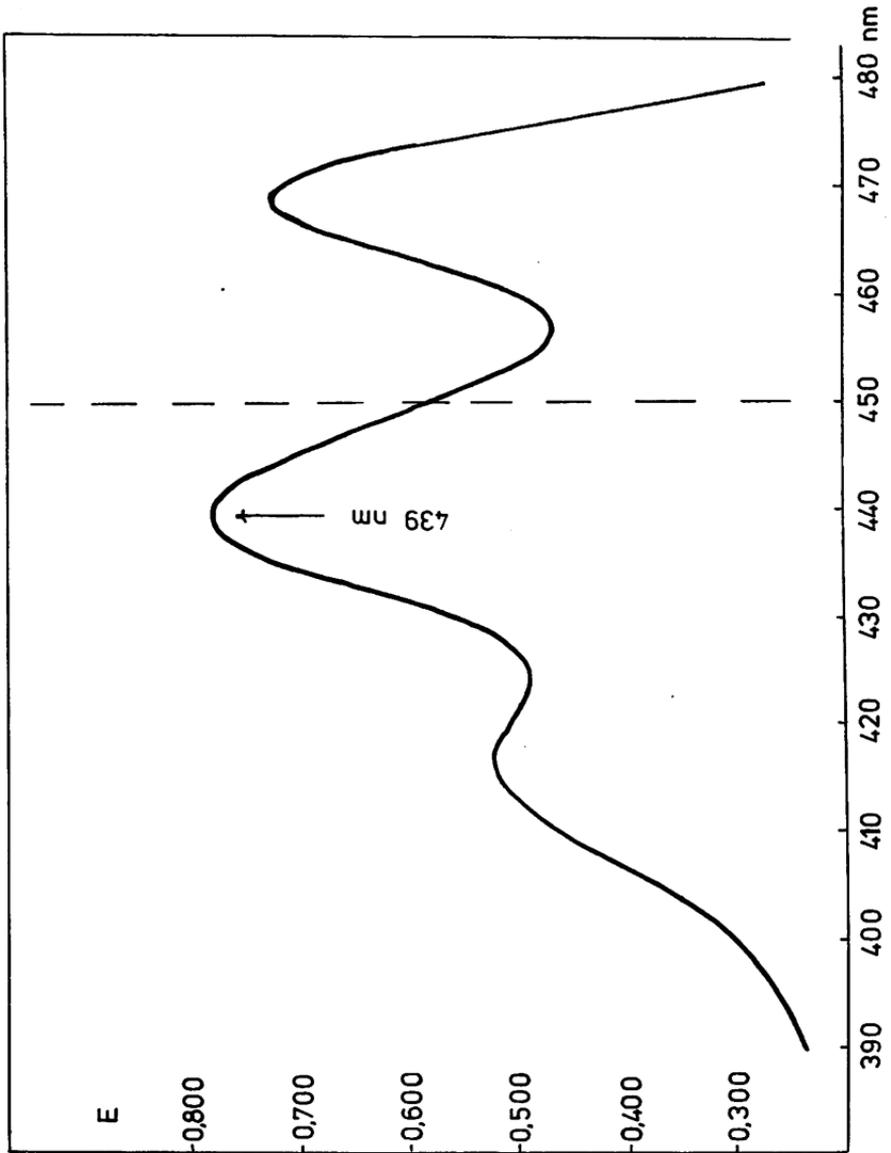
Das in den beschriebenen Versuchen bestimmte "Xanthophyll" zeigte zwar in den beiden ersten Versuchen (mit Grasgrünmehlpellets) Wiederauffindungsraten, die es zu einem brauchbaren Indikator machen würden. Die Ergebnisse der Grünfütterversuche (III bis VI) sind jedoch ungünstiger zu beurteilen. "Xanthophyll", obgleich chemisch wesentlich einheitlicher als "Chromogen", weist Parallelen zur Chromogen-Methode auf. Denn die einzelnen Carotinoide, die in ihrer Gesamtheit die Xanthophyllfraktion ausmachen, verhalten sich während der Magen-Darm-Passage ganz unterschiedlich. Die Xanthophyllfraktion bestand nach eigenen Untersuchungen hauptsächlich aus Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin, sowie mehreren Spurencarotinoiden. Violaxanthin hatte einen Anteil von 23 % an der bei 450 nm gemessenen Gesamtextinktion des Xanthophyllextraktes eines untersuchten Weidegrases. Denselben relativen Anteil des Violaxanthins von 23 % am Gesamt-xanthophyllgehalt mehrerer Gräser- und Leguminosenarten stellten LIVINGSTON et al. (1968) fest.



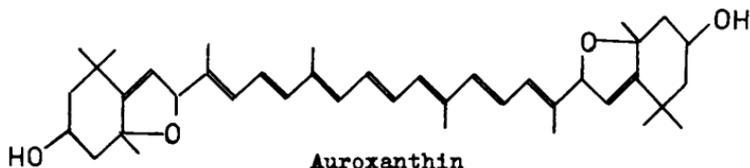
Die Absorptionskurve (in Äthanol) von dünnschichtchromatographisch isoliertem Violaxanthin aus Weidegras ist in Abbildung 19 dargestellt.

Violaxanthin, das Zeaxanthin-5,6,5',6'-Diepoxid, wird in Gegenwart von Säuren (flüchtige Fettsäuren des Pansens und HCl des Labmagens) in das sogenannte Auroxanthin (Zeaxanthin-5,8,5',8'-Diepoxid) umgelagert (KARRER u. RUTSCHMANN 1944 und KARRER u. JUCKER 1945).

Abb. 19: Absorptionskurve von Violaxanthin aus Weidegras  
in Äthanol



In vitro sind die Folgeprodukte von Violaxanthin nach der säurekatalytischen Umlagerung zu 70 % als Auroxanthin erfaßbar (HAGER u. STRANSKY 1972).

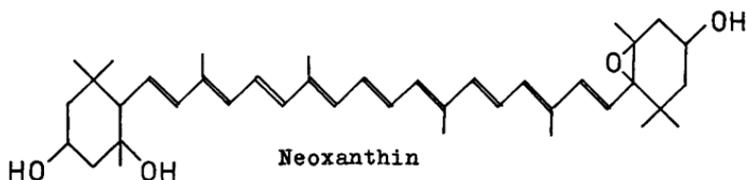


Die Umlagerung ist mit zwei gravierenden Änderungen des spektrophysischen Verhaltens verbunden (HAGER u. MEYER-BERTENRATH 1967): 1. Die Extinktionsmaxima werden um  $43 \pm 4$  nm in Richtung des kurzwelligen Lichtes verlagert, und 2. sinkt die spezifische Extinktion. Der Extinktionsabfall kommt durch die respektiven Extinktionskoeffizienten ( $E_1^1$  % in Äthanol) von Violaxanthin (2550; STRAIN 1938) und Auroxanthin (1850; KARRER u. RUTSCHMANN 1942) zum Ausdruck.

In vivo werden die Verhältnisse komplizierter, weil Violaxanthin während der Verdauungspassage nicht quantitativ zu Auroxanthin umgelagert wird, also noch unverändertes Violaxanthin in den Faeces wiederaufgefunden wird (HOPPE u. LAST, unveröffentlicht) und ferner neben Auroxanthin noch andere Folgeprodukte wie Luteoxanthin und Stereoisomere von Violaxanthin, Auroxanthin und Luteoxanthin (HAGER u. STRANSKY 1972) entstehen, so daß die quantitativen Verhältnisse nicht vorauszusagen sind.

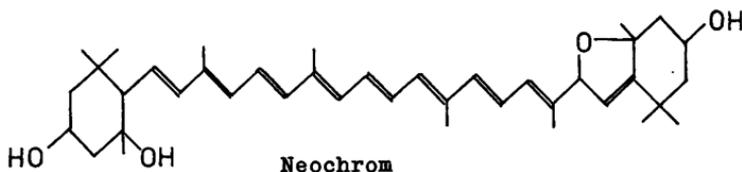
Eine weitere Komplikation stellt die lichtabhängige Umwandlung von Violaxanthin über Antheraxanthin in Zeaxanthin dar, die von YAMAMOTO et al. (1962) und HAGER (1966) beschrieben wird. Nach HAGER (1966) kann es in der Natur (allerdings nur) bei großer Lichtintensität zu einer Anhäufung von Zeaxanthin kommen. Das bedeutet, daß je nach Schnitt-(oder Weide-)zeitpunkt ein in seiner quantitativen Zusammensetzung unvorhersagbares Gemisch dieser drei Xanthophylle in der grünen Pflanze vorliegt.

Neoxanthin, ein Monoepoxid, macht nach Angaben von LIVINGSTON et al. (1968) 17 % der Xanthophylle von Weidegräsern und Leguminosen aus. Eigene Untersuchungen ergaben einen Anteil von 14 % an der Extinktion des Xanthophyllextraktes bei 450 nm.



Die Absorptionskurve (in Äthanol) von dünn-schichtchromatographisch isoliertem Neoxanthin aus Weidegras ist in Abbildung 20 dargestellt.

Auch Neoxanthin zeigt das Phänomen der hypsochromen Verschiebung der Absorptionskurve nach Einwirkung von Säuren. Das Extinktionsmaximum dieses Monoepoxy-Carotinoids wandert dabei um 18 - 25 nm in den kurzwelligen Bereich (DAVIES 1965). Das Hauptfolgeprodukt ist Neochrom (HAGER u. STRANSKY 1972).



Lutein hat mit 60 % (LIVINGSTON et al. 1968) bzw. 63 % (eigene Untersuchungen) den größten Anteil an der Xanthophyllfraktion. Es besitzt keine Epoxid-Gruppe, erleidet also auch keine Umwandlung unter Säure-Einfluß.

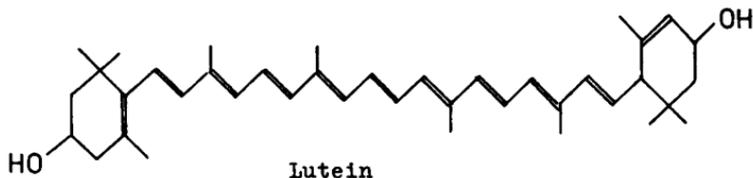
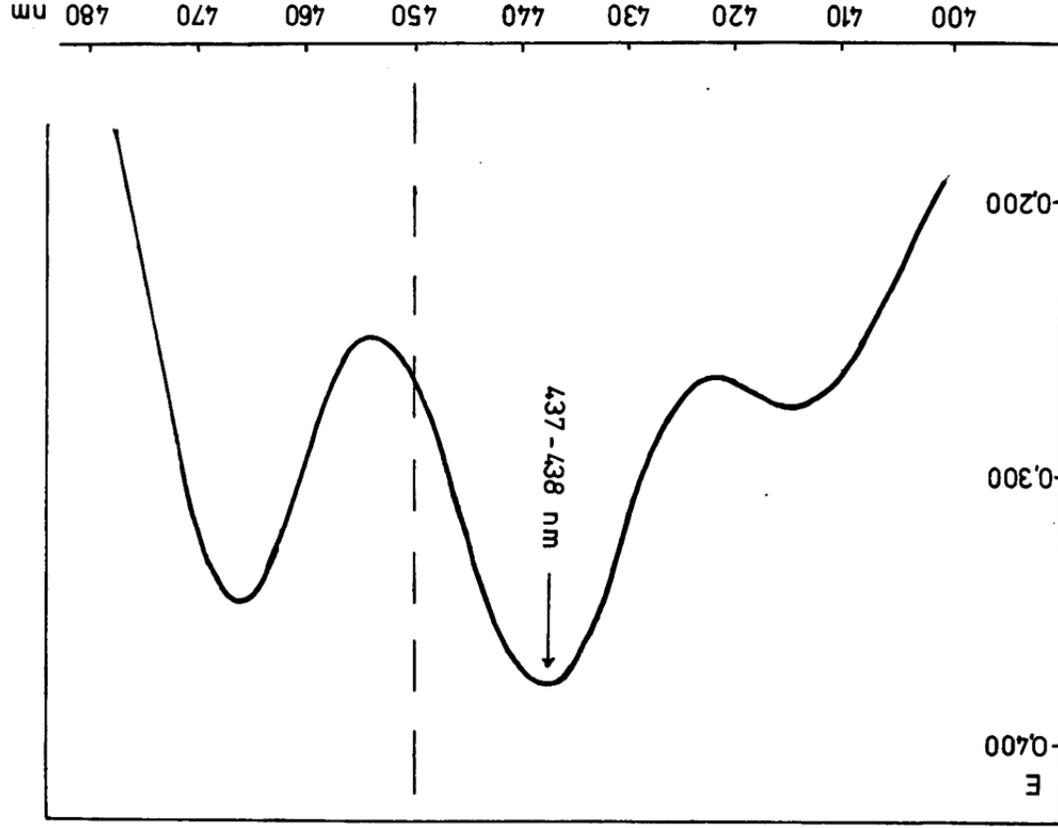
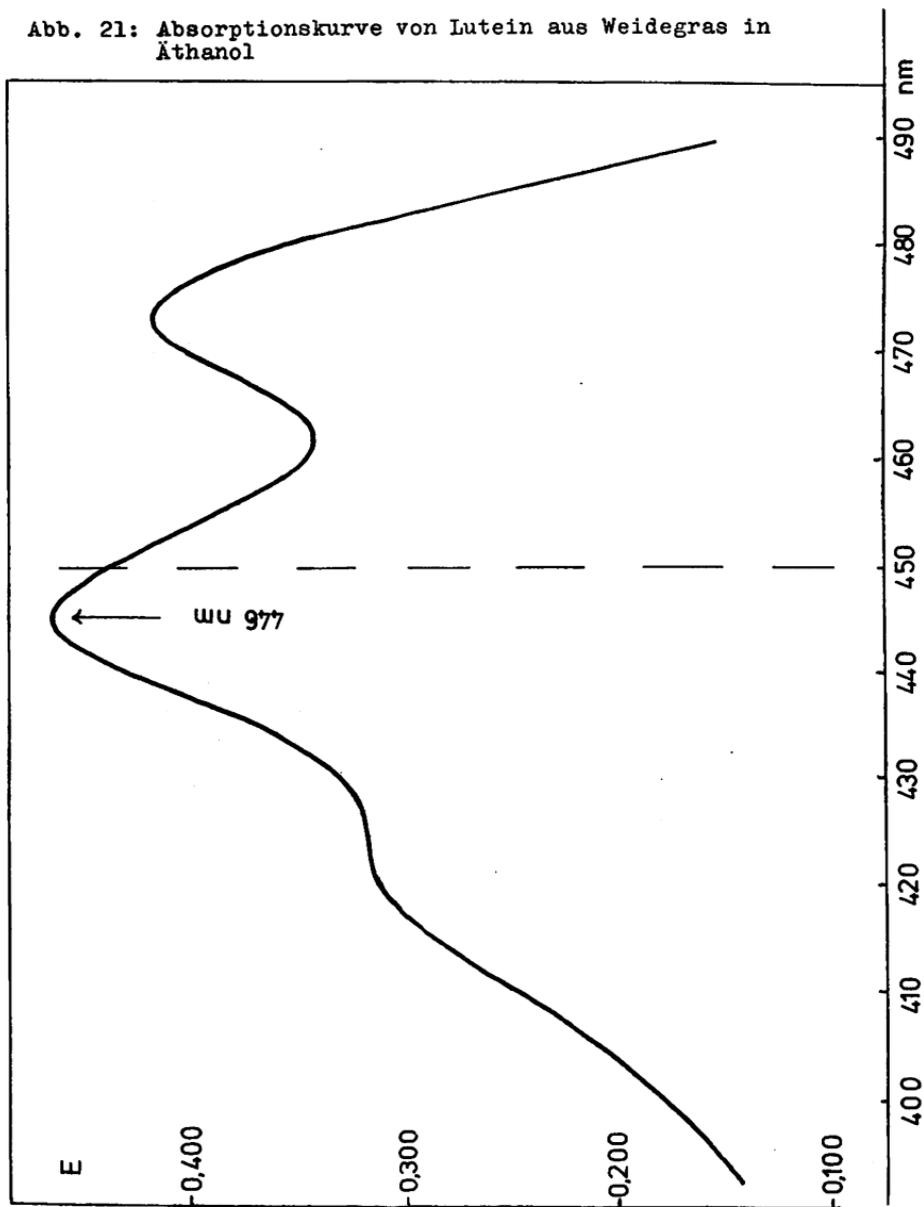


Abb. 20: Absorptionskurve von Neoxanthin aus Weidegras  
in Äthanol



Die Absorptionskurve (in Äthanol) von dünn-schichtchromato-graphisch isoliertem Lutein aus Weidegras ist in Abbildung 21 dargestellt.

Abb. 21: Absorptionskurve von Lutein aus Weidegras in Äthanol



YAMAMOTO et al. (1962) berichten, daß der Luteingehalt von Blättern trotz intensiver Bestrahlung mit Kunstlicht so gut wie konstant blieb.

Lutein dürfte folglich als "innerer" Indikator zur indirekten Bestimmung der Scheinbaren Verdaulichkeit von Grünfütter aus folgenden Gründen in Betracht kommen:

1. Es ist in grünen Pflanzen in beträchtlichen Mengen vorhanden.
2. Es ist gegenüber Säureeinwirkung stabil.
3. In der überblickten Literatur liegen keine Hinweise für periodische Tagesschwankungen vor.

Die Eignung von Lutein als Verdaulichkeitsindikator bei Wiederkäuern wird zur Zeit von LAST (Diss. in Vorbereitung) untersucht.

Abschließend soll an zwei konstruierten Darstellungen das Verhalten der drei Haupt-Xanthophylle verdeutlicht werden. Abbildung 22 zeigt die Absorptionskurven von Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin aus Weidegras in Äthanol. In der Abbildung entsprechen die Extinktionen der einzelnen dargestellten Carotinoide ihrem Anteil an der Gesamtextinktion bei 450 nm. Außerdem ist (als Summe der Einzelkurven) die Absorptionskurve von "Xanthophyll" eingezeichnet, deren Extinktionsmaximum bei 441 - 442 nm liegt (vgl. Versuch III). In Abbildung 23 sind die theoretischen Verhältnisse nach der Magen-Darm-Passage dargestellt. Es wird vorausgesetzt, daß Violaxanthin und Neoxanthin quantitativ umgelagert sind. Die einzelnen Kurven stammen von dünn-schichtchromatographisch isolierten Pigmenten, die mit HCl behandelt wurden. Es wird weiter angenommen, daß Lutein keinen Veränderungen quantitativer oder qualitativer Art unterworfen ist.

Die Summe der drei Kurven ist wiederum als "Xanthophyll" bezeichnet. Das Extinktionsmaximum dieser Kurve liegt bei 446 nm, weil der relative Anteil des Luteins (Extinktionsmaximum bei 446 nm) an der Gesamtextinktion im Intervall von 440 bis 450 nm stark zugenommen hat.

Abb. 22: (Erläuterungen s. Text S. 76 u. 79)

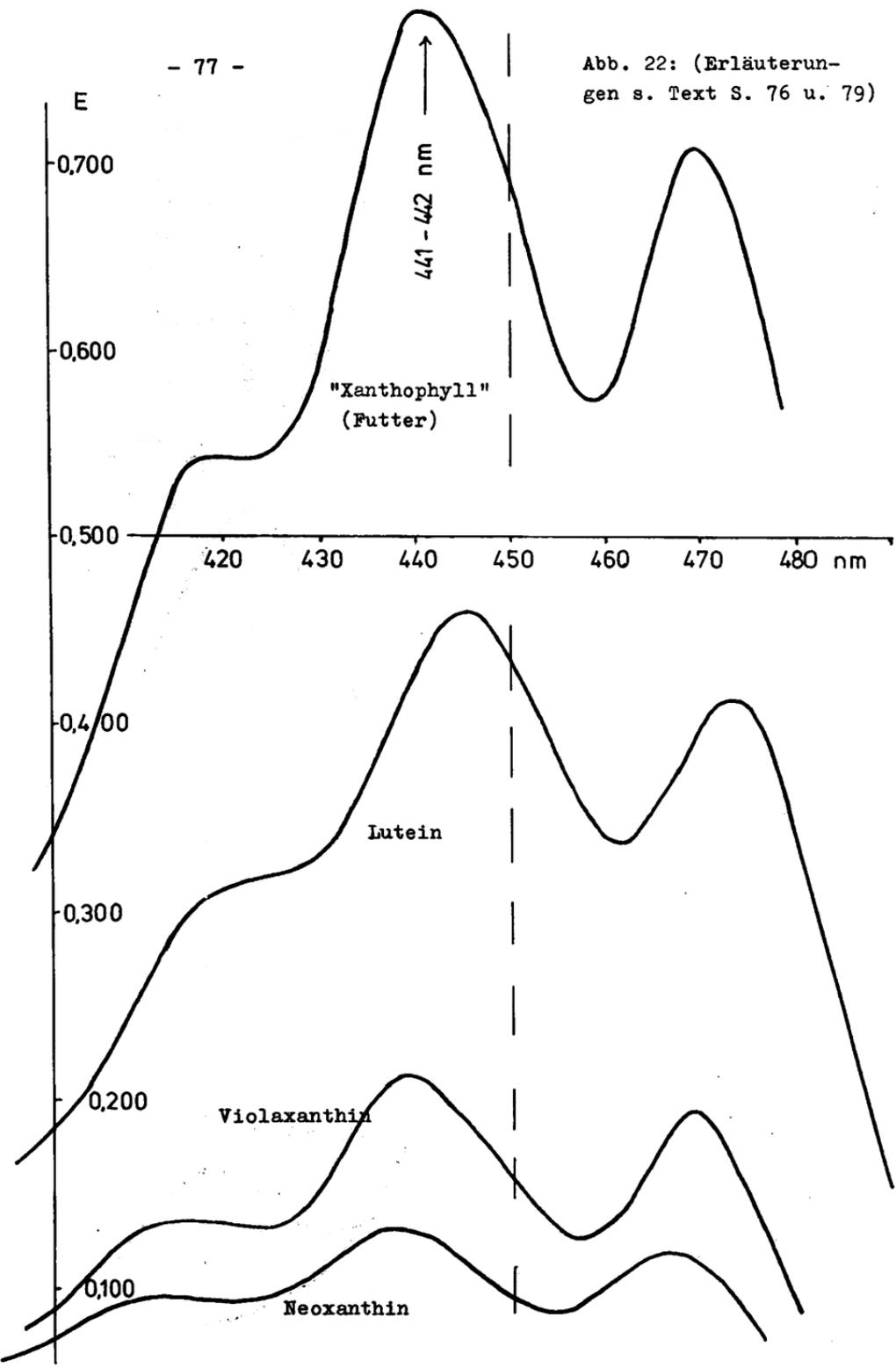
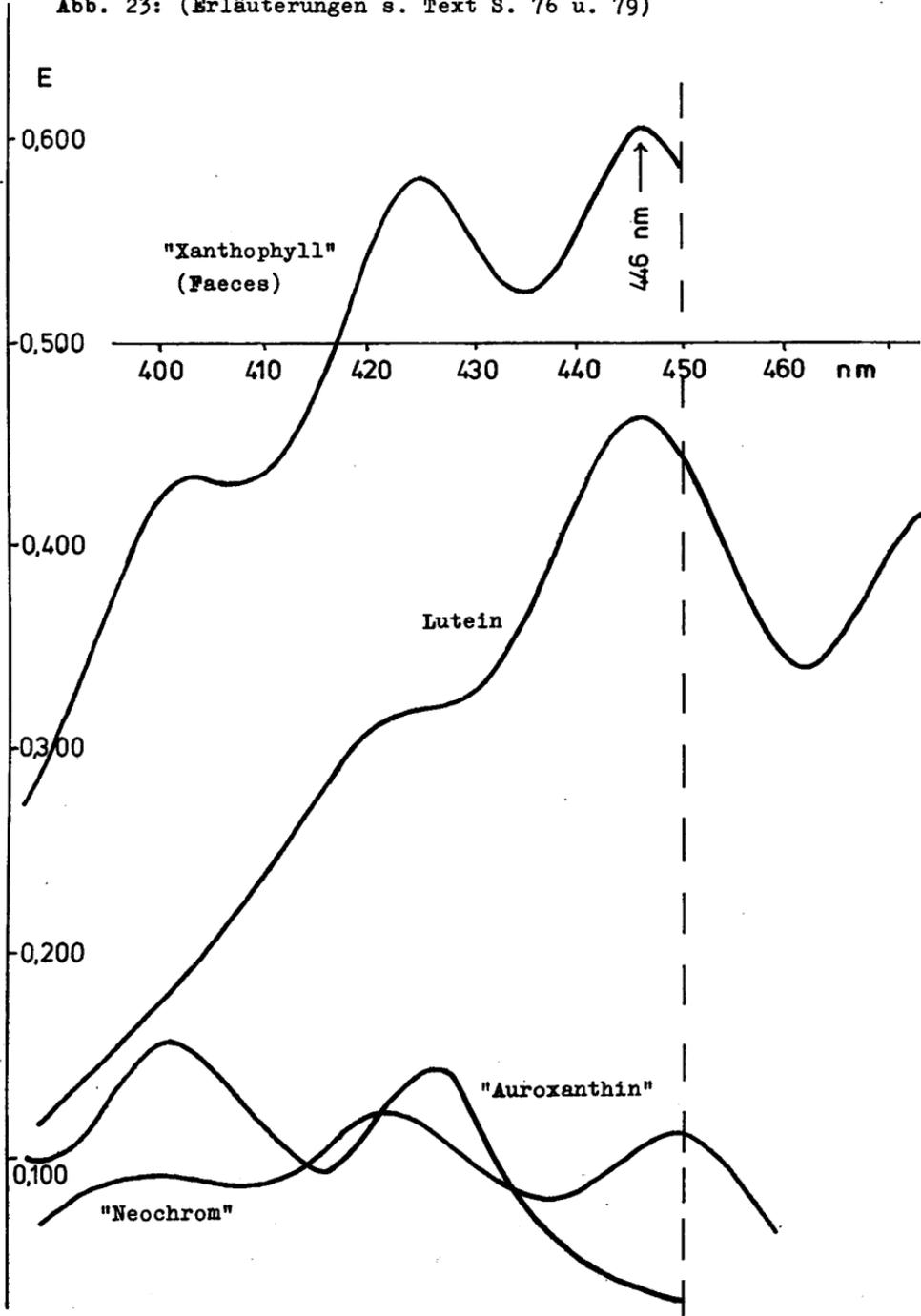


Abb. 23: (Erläuterungen s. Text S. 76 u. 79)



Interessant ist das Verhalten von Neoxanthin. Neochrom (als angenommenes einziges Folgeprodukt von Neoxanthin) hat nämlich bei 450 nm eine absolut höhere Extinktion als Neoxanthin, da die Absorptionskurve von Neochrom bei 450 nm ihr langwelliges Maximum, die des Neoxanthins jedoch ein Absorptions"tal" zeigt.

Folglich wird für Neoxanthin-Neochrom (bei einer Messung der "Xanthophylle" bei 450 nm) eine erhöhte Wiederauffindungsrate vorgetäuscht.

Dieser Erhöhung der Gesamttextinktion bei 450 nm durch Neochrom steht ein drastisch verringerter Anteil der Violaxanthin-Auroxanthin-Extinktion an der Gesamttextinktion gegenüber. Denn das Violaxanthin-Folgeprodukt Auroxanthin hat sein Extinktionsmaximum bei 400 nm; während Violaxanthin für 23 % der Gesamttextinktion des Xanthophyllextraktes aus Weidegras verantwortlich war, betrug der Anteil von Auroxanthin an der Xanthophyllextinktion bei 450 nm nur noch 5 %.

Es kann als sicher gelten, daß die wenig befriedigenden Wiederauffindungsraten für Xanthophyll auf die vorstehend geschilderten Veränderungen am Violaxanthin- und Neoxanthingehalt der Xanthophyllfraktion zurückgehen.

Warum die "Xanthophyll-Verluste" bei der Verfütterung von Trockengrünmehlpellets um so vieles niedriger waren (Versuch I und II) als bei der Verfütterung von frischem Gras (Versuch III), kann nicht entschieden werden. Am größten waren sie bei längerer Zeit gelagerten (wenn auch tiefgefrorenen) Anwelksilagen.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Verwendung von Indikatoren zur Verdaulichkeitsbestimmung bei Wiederkäuern.

Im literarischen Teil werden die gebräuchlichen Indikatoren ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $^{144}\text{Ce}$ , Eisen, Polyäthylenglykol, Silikate, Lignin, Methoxyl-Gruppen des Lignins, Chromogen und Stickstoff) kritisch behandelt und die theoretischen Grundlagen der Verwendung von Verdaulichkeitsindikatoren dargestellt.

In eigenen Untersuchungen wurden zwei durch säulenchromatographische Trennung an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gewonnene Carotinoidgruppen, Carotin (Kohlenwasserstoffverbindungen) und Xanthophyll (Summe der O-haltigen Carotinoide), auf ihre Eignung als Verdaulichkeitsindikatoren an großen und kleinen Wiederkäuern geprüft. Dazu wurden in Verdauungsversuchen mit quantitativer Kotsammlung die prozentualen Wiederauffindungsraten von Carotin und Xanthophyll ermittelt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (21) zusammengefaßt:

Tab. 21: Wiederauffindungsraten (% WAR) von Carotin und Xanthophyll in den durchgeführten Versuchen

Futter	Versuchstiere (n)	Vorperiode (Tage)	Hauptperiode (Tge)	% WAR	
				Car.	Xanth.
Grasgrün-					
mehlpel-	Hammel (1)	6	8	99,5	98,1
lets	Jungbulle (1)	10	10	95,6	93,9
Frisches Weidegras	"	12	10	89,8	75,0
Stark angewelktes Weidegras	Hammel (3)	10	10	68,1	59,5
Angewelktes Weidegras	Hammel (3)	10	10	89,5	80,0
Frisches Weidegras + Heu	Hammel (3)	10	10	94,0	85,1

Nach diesen Ergebnissen scheint Xanthophyll während der Verdauungspassage größere Verluste zu erleiden, die seine Verwendung als Indikator ausschließen.

Carotin wurde zwar bis auf Versuch IV zu einem erstaunlich hohen Prozentsatz wiedergefunden, dürfte aber angesichts beträchtlicher Konzentrationsschwankungen im Futter ebenfalls als Indikator ausscheiden.

Als Ursache für die Scheinbare Verdaulichkeit des Xanthophylls werden Veränderungen der Carotinoide Violaxanthin und Neoxanthin angesehen, die einen größeren Anteil der Xanthophyllfraktion bilden.

Aus den Untersuchungen wird gefolgert, daß von den in größeren Mengen in pflanzlichem Material enthaltenen Carotinoiden Lutein am ehesten als Indikator geeignet sein dürfte.

## Summary

This dissertation deals with the use of indicators for the determination of digestibility in ruminants.

In a study of literature, the commonly used indicators ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $^{144}\text{Ce}$ , iron, PEG, silica, lignin, lignin methoxyl groups, chromogen, and fecal nitrogen) are subjected to a critical review, and the theoretical basis for the use of digestibility indicators is drawn out.

Two groups of carotenoids, carotene (hydrocarbon compounds) and xanthophyll (the sum of oxygenated carotenoids) as separated by column chromatography (on an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  column) were tested on large and small ruminants for possible aptitude to serve as digestibility indicators. For that purpose, the rates of recovery of carotene and xanthophyll were examined in digestion trials with total fecal collection. The results are summarized in table 21.

Table 21: Rates of recovery of carotene and xanthophyll in the experiments carried out

Feed	Animals (n)	Preliminary period (days)	Collection period (days)	% recovery	
				Car.	Xanth.
Dehydrated grass meal pellets	wether (1)	6	8	99,5	98,1
	bull (1)	10	10	95,6	93,9
Fresh grass	bull (1)	12	10	89,8	75,0
Grass, heavily wilted	wethers (3)	10	10	68,1	59,5
Grass, wilted	wethers (3)	10	10	89,5	80,0
Fresh grass + hay	wethers (3)	10	10	94,0	85,1

These results seem to indicate that xanthophyll suffers substantial losses during passage through the alimentary canal. Such losses would rule out the use of xanthophyll as an indicator.

Although carotene was recovered to a surprisingly high percentage it fails to be a useful indicator due to considerable diurnal variation of its concentration in forages.

The apparent digestibility of xanthophyll is attributed to chemical changes undergone by the carotenoids violaxanthin and neoxanthin during intestinal passage. These two carotenoids account for a large part of "xanthophyll".

It is concluded that of the carotenoids occurring in appreciable amounts in forage material only lutein may have the qualities essential for an indicator in digestion trials.

q u e l l e n n a c h w e i s

Almendinger, R., F.C. Hinds

Increases of extractable  $\beta$ -carotene in haylage  
during in vitro digestion

J. Dairy Sci. 52, 2044 (1969 a)

Almendinger, R., F.C. Hinds

Apparent carotenoid increases in the digestive  
tract of beef cattle

J. Nutr. 97, 13 (1969 b)

Analysenkommission der EWG

Bestimmung von Carotin und/oder Xanthophyll  
Vorschrift 17.383/2/VI 1968

Anthony, W.B., J.T. Reid

Methoxyl as an indicator of nutritive value  
of forage

J. Dairy Sci. 41, 1715 (1958)

Barnicoat, C.R.

Estimation of apparent digestibility coefficients  
by means of an inert reference substance

N. Z. J. Sci. Technol. 27, 202 (1945)

zit. n. Crampton, E.W., L.E. Lloyd

J. Nutr. 45, 319 (1951)

Barrick, E.R., F.N. Andrews, J.F. Ballard

Absorption of carotene and vitamin A from various  
levels of the gastro-intestinal tract of sheep

J. animal Sci. 7, 539 (1948)

Bolin, D.W., R.P. King, E.W. Klosterman

A simplified method for the determination of chromic oxide ( $Cr_2O_3$ ) when used as an index substance

Science 116, 654 (1952)

zit. n. Petry, H., W. Rapp

Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 27, 181 (1971)

Bradley, N.W., R.M. Forbes, W.W. Albert, G.E. Mitchell Jr., A.L. Neumann

Use of the chromic oxide method for determining digestible energy and protein in complete pelleted steer rations

J. Animal Sci. 17, 1199 (1958) (Abstr.)

Brannon, W.F., J.T. Reid, J.I. Miller

The influence of certain factors upon the digestibility and intake of pasture herbage by beef steers

J. Animal Sci. 13, 535 (1954)

Brisson, G.J., G. Matina

A method for the extraction of pigments (chromogens) from feces of cattle and sheep

Canad. J. Animal Sci. 37, 136 (1957)

zit. n. Steger, H., B. Piatkowski, F. Püschel

Arch. Tierernähr. 12, 121 (1962)

Brune, H., M.Z. Zaddach

Vergleichende Studie der Carotinverwertung aus Grassilage, Gras-Anwelksilage und Heu, untersucht am kleinen Wiederkäuer

Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 20, 224 (1965)

Chanda, R., H.M. Clapham, M.L. McNaught, E.C. Owen

The use of chromium sesquioxide to measure the digestibility of carotene by goats and cows

J. Agr. Sci. 41, 179 (1951)

Christian, K.P., M.R. Coup

Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep VI. The determination of chromic oxide in faeces  
N. Z. J. Sci. Technol. (A) 36, 328 (1954)

Clanton, D.C.

Comparison of 7- and 10-day collection periods in digestion and metabolism trials with beef heifers  
J. Animal Sci. 20, 640 (1961)

Clanton, D.C.

Variation in chromic oxide methods of determining digestibility of hand-fed beef cattle rations  
J. Animal Sci. 21, 214 (1962)

Corbett, J.L., J.F.D. Greenhalgh, A.P. McDonald

Paper as a carrier of chromium sesquioxide  
Nature 182, 1014 (1958)

Corbett, J.L., J.F.D. Greenhalgh, E. Florence

Distribution of chromium sesquioxide and poly-ethyleneglycol in the reticulo-rumen of cattle  
Brit. J. Nutr. 13, 337 (1959)

Crampton, E.W., L.E. Lloyd

Studies with sheep on the use of chromium oxide as an index of digestibility of ruminant rations  
J. Nutr. 45, 319 (1951)

Davidson, J.

The chromogen method for determining the digestibility of dried grass by sheep  
J. Sci. Fd. Agric. 5, 209 (1954)

Davies, B.H. in: Goodwin, T.W.

Chemistry and biochemistry of plant pigments  
Academic Press, London and New York (1965)

Deinum, B., H.O. Immink, W.B. Deijs

The excretion of chromium sesquioxide in faeces by cows after administration of  $Cr_2O_3$ -containing paper  
Jaar. Inst. biol. scheik. onderzoek. Landbouwgewassen  
wageningen Meded. no. 188 pp. 123 (1962)  
zit. n. Nutr. Abstr. Rev. 33, 848 (1963)

Druce, E., J.S. Wilcox

The application of modified procedures  
in digestibility studies  
Empire J. Exp. Agr. 17, 188 (1949)  
zit. n. Streeter, C.C.  
J. Animal Sci. 29, 757 (1969)

Edin, H.

Orienterande Forsök Over en pa Ledkroppsprincipen  
Grundad Metod att Bestämna an Foderblandnings  
Smältbarhet  
Meddelanden från Centralanstalten för Försöks-  
väsendet pa Jordbruksomradet Nr. 165 (1918)  
zit. n. Hardison, W.A., R.W. Engle, W.N. Linkous,  
H.C. Sweeney, G.C. Graf  
J. Nutr. 58, 11 (1956)

Elam, C.J., R.E. Davis

Lignin excretion by cattle fed a mixed ration  
J. Animal Sci. 20, 484 (1961)

Ely, R.E., E.A. Kane, W.C. Jacobson, L.A. Moore

Studies on the composition of lignin isolated from  
orchard grass hay cut at four stages of maturity  
and from corresponding feces  
J. Dairy Sci. 36, 346 (1953)

Gebauer, F.

Zur Frage der Karotinversorgung unserer Nutztiere  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69, 701 (1962)

Gebauer, H.

Carotin-Verwertung und Carotin-Bedarf beim  
Wiederkäuer  
Tierärztliche Umschau 20, 455 (1965)

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere  
Richtlinien zur Durchführung und Auswertung von  
praktischen Fütterungsversuchen an Haustieren  
Arch. Tierernähr. 6, 206 (1956)

Giesecke, D.

Persönliche Mitteilung (1972)

Greenhalgh, J.F.D., J.L. Corbett

The indirect estimation of the digestibility  
of pasture herbage. I. Nitrogen and chromogen  
as faecal index substances  
J. Agr. Sci. 55, 371 (1960)

Greenhalgh, J.F.D., J.L. Corbett, I. McDonald

The indirect estimation of the digestibility  
of pasture herbage. II. Regressions of digesti-  
bility on faecal nitrogen concentration: their  
determination in continuous digestibility trials  
and the effect of various factors on their accuracy  
J. Agr. Sci. 55, 377 (1960)

Greenhalgh, J.F.D., G.W. Reid, I. McDonald

The indirect estimation of the digestibility  
of pasture herbage. IV. Regressions of digesti-  
bility on faecal nitrogen concentration: effects  
of different fractions of the herbage upon within-  
and between period regressions  
J. Agr. Sci. 66, 277 (1966)

- Guilbert, H.K., J.K. Loosli  
Comparative nutrition of farm animals  
J. Animal Sci. 10, 22 (1951)
- Hager, A.  
Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen Xanthophyllumwandlungen an Chlorella und Spinacia  
Planta 74, 148 (1966)
- Hager, A., T. Meyer-Bertenrath  
Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen  
Planta 76, 149 (1967)
- Hager, A., H. Stransky  
Persönliche Mitteilung (1972)
- Hardison, W.A., J.T. Reid, C.M. Martin. P.G. Woolfolk  
Degree of herbage selection by grazing cattle  
J. Dairy Sci. 37, 89 (1954)
- Hardison, W.A., W.N. Linkous, C.Y. Ward  
Digestibility of the top and bottom portions of the Alfalfa plant, as estimated from randomly collected samples of feces  
J. Dairy Sci. 40, 768 (1957)
- Hardison, W.A., W.N. Linkous, R.W. Engle, G.C. Graf  
Observations on the use of chromic oxide for estimating the fecal output of dairy animals  
J. Dairy Sci. 42, 346 (1959)
- Hattan, G.L., F.G. Owen  
Efficiency of total collection and chromic oxide techniques in short-term digestion trials  
J. Dairy Sci. 53, 325 (1970)

Hoffmann, M., K. Nehring

Carotinuntersuchungen an Futterpflanzen

II. Versuche zum zeitlichen Verlauf des Carotin-  
abbaus bei der Gärfutterzuereitug

Arch. Tierernähr. 17, 27 (1967)

Homb, T., k. Breirem

The use of fecal nitrogen as a measure of dry  
matter intake and digestibility of organic  
matter in forage

J. Animal Sci. 11, 496 (1952)

Huston, J.E., W.C. Ellis

Evaluation of certain properties of radiocerium  
as an indigestible marker

J. Agr. Fd. Chem. 16, 225 (1968)

Irvin, H.M., H.G. Wiseman

The possible use of plant pigments as a marker in  
digestion trials

J. Dairy Sci. 36, 382 (1953) (Abstr.)

Irvin, H.M., H.G. Wiseman, J.C. Shaw, L.A. Moore

The role of plant pigments in digestion trial studies

J. Animal Sci. 12, 541 (1953)

Jefferies, N.W., R.W. Rice

Nutritive value of clipped and grazed range forage  
samples

J. Range Management 22, 192 (1969)

Jensen, S.L.G., C. Bazier, R.Y. Stanice

Biosynthesis of carotenoids in purple bacteria

Nature 192, 1168 (1961)

- Jones, L.H.P., K.A. Mandreck  
The relationship between the silica content of  
the diet and the excretion of silica by sheep  
J. Agr. Sci. 65, 129 (1965)
- Kameoka, K., S. Takahashi, H. Morimoto  
Variation in the excretion of chromic oxide  
by ruminants  
J. Dairy Sci. 39, 462 (1956)
- Kane, E.A., W.C. Jacobson, L.A. Moore  
A comparison of techniques used in digestibility  
studies with dairy cattle  
J. Nutr. 41, 583 (1950)
- Kane, E.A., W.C. Jacobson, R.E. Ely, L.A. Moore  
The estimation of the dry matter consumption of  
grazing animals by ratio techniques  
J. Dairy Sci. 36, 637 (1953)
- Kane, E.A., W.C. Jacobson  
An improved method of using plant pigments as  
an indicator of digestibility  
J. Dairy Sci. 37, 672 (1954) (Abstr.)
- Kane, E.A., W.C. Jacobson, P.M. Damewood Jr.  
Use of radioactive chromium oxide in  
digestibility determinations  
J. Dairy Sci. 42, 1359 (1959)
- Carlson, P.  
Kurzes Lehrbuch der Biochemie  
7. Auflage 1970 S. 222  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Karrer, P., J. Rutschmann  
Helv. Chim. Acta 25, 1624 (1942)  
zit. n. Goodwin, T.W. in  
Paech, K., M.V. Tracey  
Moderne Methoden der Pflanzenanalyse  
Bd. III, S. 272 (1955)  
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- Karrer, P., J. Rutschmann  
Helv. Chim. Acta 27, 1684 (1944)  
und
- Karrer, P., E. Jucker  
Helv. Chim. Acta 28, 300 (1945)  
zit. n. Karrer, P., E. Jucker  
Carotinoide S. 199 (1948)  
Birkhäuser Verlag, Basel
- Kellaway, R.C.  
The estimation of digestible energy intake  
from forages by ruminants  
Austral. J. exper. Agric. Animal Husbandry 9, 578 (1969)  
zit. n. L.Z. (III) 15, 1623 (1970)
- Kiesling, H.E., H.A. Barry, A.B. Nelson, C.H. Herbel  
Recovery of chromic oxide administered in  
paper to grazing steers  
J. Animal Sci. 29, 361 (1969)
- Kimura, F.G., V.L. Miller  
Improved determination of chromic oxide  
in cow feed and feces  
J. Agr. Ed. Chem. 5, 216 (1957)
- Klapp, E.  
Verfahren zur Ermittlung des Grünlandertrages  
Das wirtschaftseigene Futter 9, 249 (1963)

Knott, J.C., H.K. Murer, R.E. Hodgson

The determination of the apparent digestibility  
of green and cured grass by modified procedures

J. Agr. Res. 22, 555 (1936)

zit. n. Streeter, C.C.

J. Animal Sci. 29, 757 (1969)

Lambourne, L.J.

Measurement of feed intake of grazing sheep

II. The estimation of faeces output using markers

J. Agr. Sci. 48, 415 (1957)

Lambourne, L.J., T.F. Reardon

Use of "seasonal" regressions in measuring  
feed intake of grazing animals

Nature 196, 961 (1962)

Lancaster, R.J.

The measurement of feed intake by grazing cattle  
and sheep

I. A method of calculating the digestibility of  
pasture based on the nitrogen content of faeces  
derived from the pasture

N. Z. J. Sci. Technol. (A) 31, 31 (1949)

zit. n. Arnold, G.W., M.L. Dudzinski

J. Agr. Sci. 61, 33 (1963)

Langlands, J.P.

Diurnal variation in the diet selected by  
free-grazing sheep

Nature 207, 666 (1965)

Langlands, J.P.

Studies on the nutritive value of the diet  
selected by grazing sheep

II. Some sources of error when sampling  
oesophageally fistulated sheep at pasture

Anim. Prod. 2, 167 (1967)

Langlands, J.P.

Studies on the nutritive value of the diet  
selected by grazing sheep

V. further studies of the relationship between  
digestibility estimated in vitro from oesophageal  
fistula samples and from faecal and dietary composition  
Anim. Prod. 11, 379 (1969)

Last, W.

Vet. med. Diss. in Vorbereitung

Laube, W.

Untersuchungen über den Einfluß der pflanzlichen  
Gerüstsubstanzen auf die Verdaulichkeit von  
Grünfütterstoffen

Arch. Tierernähr. 10, 99 (1960)

Lesperance, A.L., V.R. Bohman, D.W. Marble

Development of techniques for evaluating grazed forage  
J. Dairy Sci. 43, 682 (1960)

Livingston, A.L., D. Smith, H.L. Carnahan, R.E. Knowles

Variation in the xanthophyll and carotene content  
of lucerne, clovers and grasses

J. Sci. Fd. Agr. 19, 632 (1968)

McGillivray, W.A.

The apparent intestinal synthesis of carotene  
by sheep

Brit. J. Nutr. 5, 223 (1951)

zit. n. Almendinger, R., F.C. Hinds

J. Nutr. 97, 13 (1969 b)

Marten, G.C., R.M. Jordan

Pasture quality for sheep as estimated by chromogen  
vs. nitrogen indicators

J. Animal Sci. 26, 1165 (1967)

Mason, V.C.

Some observations on the distribution and origin  
of nitrogen in sheep faeces  
J. Agr. Sci. 73, 99 (1969)

Mautz, W.W.

Comparison of the  $^{51}\text{CrCl}_3$  ratio and total collection  
techniques in digestibility studies with a wild  
ruminant, the white-tailed deer  
J. Animal Sci. 32, 999 (1971)

Meyer, J.H., G.P. Lofgreen, J.L. Hull

Selective grazing by sheep and cattle  
J. Animal Sci. 16, 766 (1957)

Moore, L.A., O.B. Winter

The rate of passage of inert material through  
the digestive tract of the bovine  
J. Dairy Sci. 17, 297 (1934)

Nishimura, M., K. Takamatsu

A carotene-protein complex isolated from green leaves  
Nature 180, 699 (1957)

Page, H.M., E.S. Erwin, T.R. Varnell, C.B. Roubicek

Effect of hepatic vitamin A and carotene concentration  
on the biological value of carotene in the bovine  
Am. J. Physiol. 194, 313 (1958)  
zit. n. Mitchell, G.E. Jr.  
J. Amer. vet. med. Ass. 151, 430 (1967)

Pearce, G.R., J.E. Vercoe, M. Freer

The establishment of faecal nitrogen-digestibility  
regressions for animals grazing on irrigated pastures  
J. Agr. Sci. 59, 397 (1962)

Petry, H., W. Rapp

Zur Problematik der Chromoxidbestimmung  
in Verdauungsversuchen

Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 27, 181 (1971)

Petry, H.

Persönliche Mitteilung (1972)

Piatkowski, B., H. Steger, F. Püschel

Bestimmung sowie Ausscheidung von Chromoxyd bei  
im Stall gefütterten und weidenden Kühen

Arch. Tierernähr. 12, 137 (1962 a)

Piatkowski, B., K. Kasdorf, H. Steger, F. Püschel

Verdaulichkeit und Aufnahme von Weidegras unter-  
sucht mit Hilfe der konventionellen und der Indi-  
kator-Methode an Milchkühen

Arch. Tierernähr. 12, 143 (1962 b)

Pigden, W.J., G.J. Brisson

Note on a chromium oxide pellet to provide uniform  
release of this indicator in the rumen of cattle  
Canad. J. Animal Sci. 37, 185 (1957)

zit. n. Corbett, J.L., J.F.D. Greenhalgh, A.P. McDonald  
Nature 182, 1014 (1968)

Rapp, W.

Yet. med. Diss. München (1972)

Reid, J.T., P.G. Woolfolk, C.R. Richards, R.W. Kaufmann,

J.K. Loosli, K.L. Turk, J.I. Miller, R.E. Blaser

A new indicator method for the determination of  
digestibility and consumption of forages by ruminants

J. Dairy Sci. 33, 60 (1950)

Reid, J.T., F.G. Woolfolk, W.A. Hardison, C.M. Martin,  
A.L. Brundage, R.W. Kaufmann

A procedure for measuring the digestibility of  
pasture forage under grazing conditions  
J. Nutr. 4b, 255 (1952)

Richards, C.R., J.T. Reid

The use of methoxyl group in forage and faecal  
materials as an index of the feeding value of forages  
J. Dairy Sci. 35, 595 (1952)

Ridley, J.R., A.L. Lesperance, E.H. Jensen, V.R. Bohman

Pasture evaluation with fistulated and intact cattle  
J. Animal Sci. 22, 852 (1965) (Abstr.)

Sapargaliev, G.S., A. Džarkbasov

Kosvennoe opredelenie perevarimosti kormov v  
opytah s karakul'skimi ovcami  
Dokl. Vses. Akad. Sel'skhoz. Nauk. 8, 33 (1969)  
zit. n. Nutr. Abstr. Rev. 40, 654 (1970) Ref.Nr. 3772

Savel'ev, D.N.

O dinamike soderžanija karotina v kormovyh rastenijah  
Zivotnovodstvo 12, 47 (1968)  
zit. n. Nutr. Abstr. Rev. 40, 42 (1970) Ref. Nr. 349

Shearer, D.A.

Benzene-ethanol extracts of forage and feces  
as indicators of digestibility  
J. Agr. Fd. Chem. 11, 33 (1963)

Smart, W.W.G. Jr., F.W. Sherwood, G. Matrone, G.H. Wise

Pigments involved in the chromogen(s) ratio method  
J. Agr. Fd. Chem. 1, 318 (1953)

- Smart, W.W.G. Jr., G. Matrone, V.W. Smart  
Use of copper derivatives of chlorophylls in ratio  
method for estimating digestibility of forage  
J. Agr. Fd. Chem. 2, 1331 (1954)
- Smith, A.M., J.T. Reid  
Use of chromic oxide as an indicator for fecal  
output for the purpose of determining the intake  
of pasture herbage by grazing animals  
J. Dairy Sci. 38, 515 (1955)
- Squibb, R.L., C. Rivera, R. Jarquin  
Comparison of the chromogen method with standard  
digestion trial for determination of the digestible  
nutrient content of kikuyu grass and ramie forages  
with sheep  
J. Animal Sci. 17, 318 (1958)
- Steger, H., B. Piatkowski, F. Püschel  
Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der Ver-  
daulichkeit des Weidegrases mit Hilfe der Chromogen-  
methode  
Arch. Tierernähr. 12, 121 (1962)
- Strain, H.H.  
Leaf xanthophylls  
Washington Carnegie Institute (1938)  
zit. n. Goodwin, T.W.  
Carotenoids  
in Paech, K., M.V. Tracey  
Moderne Methoden der Pflanzenanalyse  
Bd. III, S. 272 (1955)  
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- Streeter, C.C.  
A review of techniques used to estimate the in  
vivo digestibility of grazed forage  
J. Animal Sci. 29, 757 (1969)

Troelsen, J.E.

Plant chromogens as an indicator in estimating  
the digestibility of forage crops by sheep  
Canad. J. Plant Sci. 41, 732 (1961)

Troelsen, J.E., F.W. Bigsby

Artificial mastication - a new approach for  
predicting voluntary forage consumption by ruminants  
J. Animal Sci. 23, 1139 (1964)

Troelsen, J.E.

A note on the sustained release of chromic oxide  
in the rumen of sheep from a chromic oxide-dental  
plaster pellet  
Anim. Prod. 7, 127 (1965 a)

Troelsen, J.E.

Sustained release of chromic oxide in the rumen  
of sheep from a  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -paper pellet  
Anim. Prod. 7, 239 (1965 b)

Tucker, R.E., G.E. Mitchell Jr., C.O. Little

Yellow pigments excreted by vitamin A-depleted sheep  
J. Nutr. 93, 518 (1967)

Utley, P.R., J.A. Boling, N.W. Bradley, R.E. Tucker

Recovery of radioactive chromic oxide from  
the bovine gastrointestinal tract  
J. Nutr. 100, 1227 (1970)

Van Dyne, G.M., G.P. Lofgreen

Comparative digestion of dry annual range forage  
by cattle and sheep  
J. Animal Sci. 23, 823 (1964)

Van Soest, P.J.

Symposium on nutrition and forage and pastures:  
New chemical procedures for evaluating forages  
J. Animal Sci. 23, 838 (1964)

Weir, W.C., D.T. Torell

Selective grazing by sheep as shown by a comparison of the chemical composition of range and pasture forage obtained by hand clipping and that collected by oesophageal fistulated sheep  
J. Animal Sci. 18, 641 (1959)

Whitnah, C.H., W.J. Peterson, F.W. Atkeson, H.W. Cave

Carotene balance and carotene blood levels in heifers and lactating dairy cows, and their relation to production of off-colored milk  
J. Agr. Res. 58, 343 (1939)

Wildt, E.

Über die Resorption und Secretion der Nahrungsbestandtheile im Verdauungskanal des Schafes  
Jour. f. Landw. 22, 1 (1874)

zit. n. Soni, B.K., P.K. Murdock, A.S. Hudgson,  
T.H. Blosser, K.C. Mahanta  
J. Animal Sci. 13, 474 (1954)

Wilkinson, J.M., J.H.D. Prescott

The use of chromic oxide in the measurement of individual feed intake in cattle fed on silage and barley  
Anim. Prod. 12, 71 (1970)

Wing, J.M.

Effect of source and season on apparent digestibility of carotene in forage by cattle  
J. Dairy Sci. 52, 479 (1969)

Woolfolk, P.G., C.R. Richards, R.W. Kaufmann, C.M. Martin,  
J.T. Reid

A comparison of fecal nitrogen excretion rate, chromium oxide and "chromogen(s)" methods for evaluating forages and roughages  
J. Dairy Sci. 33, 385 (1950) (abstr.)

Yamamoto, H.Y., T.O.M. Nakayama, C.O. Chichester  
Studies on the light and dark interconversions  
of leaf xanthophylls  
Archs. Biochem. 97, 168 (1962)

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Tiews meinen ergebensten Dank sagen.

Herrn Dr. P. Hoppe danke ich besonders für seinen jederzeit gewährten Rat und die aufgewendete Mühe.

Den Herren Dr. G. Koch und G. Weigelt, Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub, bin ich zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial für die Versuche IV bis VI.

Herrn Prof. Dr. A. Hager, Münster (vormals München), danke ich für seine freundliche Hilfe bei unseren anfänglichen Schwierigkeiten bei der Dünnschichtchromatographie.

Den Herren Universitätsdozent Dr. D. Giesecke, Prof. Dr. W. Krauss, Dr. H. Petry und Dr. F. Scheidel danke ich für Auskünfte in einzelnen Sachfragen.

Frau O. Kreutzberg, Frau A. Wetzels, Frau I. Eichhorn und Fräulein G. Dziekan danke ich für die technische Unterstützung bei der Ausführung der Versuche.

Für die Gewährung eines Promotionsstipendiums bin ich der Zentralen Kommission für die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses zu großem Dank verpflichtet.

## Lebenslauf

Am 13. Juli 1946 wurde ich, Wolfgang Klee, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Karl Klee und seiner Frau Hedwig, geb. Assmus, in Friedrichshafen geboren.

Nach Besuch der Grundschule in Friedrichshafen trat ich 1956 in das dortige Graf-Zeppelin-Gymnasium ein. Am 2. März 1966 bestand ich die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Universität München das Studium der Tiermedizin. Im September 1971 beendete ich hier mein Studium mit der Tierärztlichen Prüfung.

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1968 bis 1972. Ein Teil der Ergebnisse wird gemeinsam mit P. Hoppe, J. Tiews, W. Last und G. Koch in Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. (im Druck, 1972) veröffentlicht.

München, am 9. Mai 1972

*Wolfgang Klee*