

**Pilotstudie über die in vitro Löslichkeit von Phosphor aus
Mineralquellen, Futterkomponenten und Mischfutter für
Schweine, Geflügel, Hunde und Katzen**

von Anna Lineva

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**Pilotstudie über die in vitro Löslichkeit von Phosphor aus
Mineralquellen, Futterkomponenten und Mischfutter für
Schweine, Geflügel, Hunde und Katzen**

**Von Anna Lineva
Aus Moskau**

München 2020

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle**

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 08.02.2020

Meiner Familie

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Lineva, A., Kienzle, E., Dobenecker, B. (2017). Investigations on dietary phosphorus solubility in water and acid medium from foods and mineral sources used for dog and cat nutrition. Vortrag auf dem 21. Kongress der ESVCN, 20-23.09.2017, Cirencester, UK.

Lineva, A., Kienzle E., Dobenecker, B., Kirchner, R., Kamphues, J. (2018). Investigations on solubility of dietary phosphorus in water and acid medium from foods and mineral sources in companion and food producing animal nutrition. Poster auf der 72. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 13-15.03.2018, Göttingen.

Inhaltsverzeichnis

1. Übersichten	2
1.1. Abkürzungsverzeichnis	2
1.2. Abbildungsverzeichnis	4
1.3. Tabellenverzeichnis	5
2. Einleitung	6
3. Literaturübersicht	8
3.1. Methoden der Gesamt-P-Bestimmung	8
3.2. Löslichkeit von Futterphosphaten	9
3.3. Methoden für die Bestimmung der P-Löslichkeit in Düngemitteln ...	10
3.4. P-Löslichkeit in Futtermitteln und Futterphosphaten	13
3.5. P-Binder und P-Löslichkeit in der Nephrologie	14
4. Publikation	15
5. Diskussion	41
5.1. Kritik der Methode	41
5.2. Diskussion der Ergebnisse	42
5.2.1. P-Löslichkeit in Einzelfuttermitteln	42
5.2.2. Mischfuttermittel	44
5.2.3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit in vivo Studien	46
5.3. Schlussfolgerung	48
6. Zusammenfassung	49
7. Summary	51
8. Literaturverzeichnis	53
9. Danksagung	60

Übersichten

1. Übersichten

1.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
cm	Zentimeter
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Kalziumdihydrogenphosphat Monohydrat
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalziumhydrogenphosphat, Dihydrat
$\text{Ca}_4\text{Na}(\text{PO}_4)_3$	Defluoriniertes Kalziumphosphat
DM	dry matter / Trockensubstanz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäisches Gesetz
et al.	et alii / und andere
fig.	figure
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g</i> -force / Zentrifugalkraft
h	hours
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
i.d.R.	in der Regel
i.e.	id est / das heißt

Übersichten

IRIS	International Renal Interest Society
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Tetrakaliumpyrophosphat
NaH_2PO_4	Natirumdihydrogenphosphat
$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	Pentanatriumphosphat
Nr.	Nummer
l	Liter
mg	Milligramm
MgO	Magnesiumoxid
Min/min	Minuten / minutes
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
n	number of samples
NRC	National Research Council
P	Phosphor
pH	potentia hydrogenii / Wasserstoffionen-Aktivität
s.	siehe
TS	Trockensubstanz
U/min	Umdrehungen pro Minute
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

Übersichten

1.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I: Vergleich von Gesamt-P Gehalt mit P-Löslichkeit in Wasser nach 1 Minute in Proben von Rohfleisch, gekochtem, getrocknetem Fleisch und Fischmehl.

Abbildungen in der Publikation:

Figure 1: Relationship between water soluble P content after 1 minute in fresh test mixtures (Table S1) as measured (x in g soluble P/kg wet weight) and calculated from ingredients (y in g soluble P/kg wet weight: $y=0.90x+0.09$; $r^2=0.95$).

Figure 2: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in compound feed for food producing animals with low, moderate and high phosphorus content.

Figure 3: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in complete dry dog food in products with moderate or high calcium content.

Figure 4: Relationship between phosphorus content not possibly originating from bones (=Total phosphorus minus total calcium divided by 2, calcium determined according to VDLUFA 2012; x in g/kg DM) and soluble phosphorus (y in g/kg DM: $y=0.65x+1.03$; $r^2=0.49$).

Figure 5: Relationship between electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride; sodium and potassium, chloride determined according to VDLUFA 2012; x in mmol/kg DM) and water soluble phosphorus (after 1 minute; y in mmol/kg DM): $y=0.38x+1.41$; $r^2=0.58$.

Übersichten

1.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Übersicht über Verwendung und Prinzip verschiedener P-Bestimmungsmethoden.

Tabelle II: Die Löslichkeit von Futterphosphaten.

Tabelle III: Übersicht der Methoden für die Bestimmung des löslichen Phosphors in Düngemitteln (VDLUFA II, 2014).

Tabelle IV: Überblick über die Löslichkeit von anorganischen Futterphosphaten in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode.

Tabellen in der Publikation:

Table 1: Solubility of mineral phosphorus sources (Soluble phosphorus in % of total phosphorus).

Table 2: Solubility of phosphorus in single feed (Soluble phosphorus in % of total phosphorus).

Table 3: P solubility in compound feed (Soluble phosphorus in % of total phosphorus).

Table S1: Solubility of phosphorus in test mixtures (Soluble phosphorus in % of total phosphorus).

Einleitung

2. Einleitung

Phosphor (P) ist die Strukturkomponente der Knochengewebe, ist in Nukleinsäuren sowie in Phospholipiden und Proteinen enthalten. P spielt auch eine wesentliche Rolle im Energiestoffwechsel und im Säure-Basen-Gleichgewicht.

In der Tierernährung sind bei Nutz- und Heimtieren zwei unterschiedliche Situationen in der P-Versorgung bekannt. Die Heimtiere Hund und Katze befinden sich im größten Teil ihres Lebens im Erhaltungsstoffwechsel, während Nutztiere enorme Leistungen in Wachstum oder Reproduktion bringen müssen. Gleichzeitig spielt in der Nutztierhaltung der Umweltschutz im Umgang mit den Ausscheidungen eine große Rolle.

Die pflanzlichen Rationen für hochleistende monogastrische Nutztiere (Schwein, Geflügel) enthalten daher häufig so wenig P wie möglich, um Kosten zu sparen und die Umweltbelastung möglichst gering zu halten (Létourneau-Montminy et al. 2011). Außerdem ist P in vielen pflanzlichen Futtermitteln an Phytat gebunden und daher für die monogastrischen Tiere wenig verfügbar (Hoff-Jørgensen 1945; Nelson 1967; Humer et al. 2015), sodass eine unzureichende Versorgung mit verfügbarem P ein Problem sein kann.

Anders im Bereich der Ernährung von Hund und Katze, hier wird P oft erheblich übertersorgt. Bei Alleinfutter kommen P-Versorgungen im Bereich des 6-fachen des Bedarfs regelmäßig vor (Anonymous 2008; Larsen et al. 2012; Anonymous 2014). In diesen Futtermitteln sind die P-Quellen nicht nur Futterkomponenten wie Fleisch, Knochen und deren Nebenerzeugnisse oder Getreide, sondern auch anorganische Phosphate. Diese dienen nicht primär ernährungsphysiologischen Zwecken – sondern sie werden zu technologischen Zwecken eingesetzt, beispielsweise als Dickungsmittel, Puffer oder Wasserbinder.

Einleitung

Bei Tieren mit einer Nierenerkrankung ist P ein wesentlicher Faktor der diätetischen Therapie: er soll reduziert sein, um eine Hyperphosphatämie und das Fortschreiten der Erkrankung zu vermindern (IRIS 2017). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass P einer der prädisponierenden Faktoren für Nierenerkrankungen sein kann (Pastoor et al. 1995; Calvo & Uribarri 2013; Böswald et al. 2018; Coltherd et al. 2018; Dobenecker et al. 2018b; Alexander et al. 2019). Bei Hunden und Katzen, die mit einer experimentellen Diät mit P-Übersorgung gefüttert wurden, wurde Hyperphosphatämie und Hyperphosphaturie beobachtet (Siedler & Dobenecker 2015; Dobenecker et al. 2018a; Herbst & Dobenecker 2018). Nierenkrankheiten beim Hund (Robertson 1986) und vor allem bei der Katze (Lulich et al. 1992) haben eine auffallend hohe Prävalenz, deshalb ist die P-Verfügbarkeit in den Futtermitteln für Kleintiere von besonderer Bedeutung.

Die P-Löslichkeit ist eine der Voraussetzungen für schnelle Absorption des P im Magen-Darm-Trakt und auch ein labortechnisch messbarer Parameter, der ohne Tierversuche eine Einschätzung der Eigenschaften der P-Quellen vermitteln kann. Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Bestimmung der P-Löslichkeit in verschiedenen Futtermitteln zu evaluieren und die Löslichkeit der verschiedenen P-Quellen und Futterarten zu vergleichen.

Literaturübersicht

3. Literaturübersicht

3.1. Methoden der Gesamt-P-Bestimmung

Die Methoden der Gesamt-P-Bestimmung wurden zunächst in der Stahlindustrie und danach in Bodenwissenschaft, Pflanzen- und Tierernährung entwickelt. Tabelle I gibt eine Übersicht über die etablierten Methoden.

Tabelle I: Übersicht über Verwendung und Prinzip verschiedener P-Bestimmungsmethoden.

Material	Methode	Prinzip	Referenz
Stahl	Kolorimetrie	Komplex mit Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat (orangengelb)	Misson 1908
Wasser, Erde, Dünger, Eisen	Nephelometrie	Präzipitation mit Strychninmolybdat	Pouget & Chouchak 1911
Anorganische P-Lösungen	Nephelometrie	Präzipitation mit Strychninmolybdat	Kober & Egerer 1915
Düngemittel, Futtermittel	Gravimetrie	Phosphate werden mit Salpeter-/Schwefelsäure in Lösung gebracht und als Ammoniumphosphomolybdat gefällt. Aus dem Gewicht lässt sich die Gesamt-P-Menge berechnen	Lorenz, von 1926; VDLUFA III 2012
Düngemittel, Futtermittel	Gravimetrie	Veraschung mit Kalziumkarbonat, Lösung mit Salpetersäure, gefällte Phosphate werden gewogen	Lepper 1931; VDLUFA III 2012
Stahl	Kolorimetrie	Komplex mit Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat (orangengelb)	Kitson & Mellon 1944
Verschiedene Substrate, Futtermittel	Kolorimetrie	Komplex mit Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat (orangengelb)	Gericke & Kurmies 1952
Futtermittel	Gravimetrie	Besonders für P-reiche Futtermittel. Aufschluss, Ausfällen in Säurelösung mit Chinolinmolybdat-Reagenz, Waschen, Trocknen und Wiegen von Chinolinphosphormolybdat	VDLUFA III 2012

Literaturübersicht

Die photometrische Methode mit Vanadat-Molybdat wurde von Gericke & Kurmies (1952) beschrieben und mit der klassischen gravimetrischen Methode verglichen, wobei eine genaue Übereinstimmung erreicht wurde. Im Vergleich zu den anderen Methoden ist sie schnell, einfach, genau und für verschiedene Orthophosphat-Lösungen geeignet.

Die Phosphate müssen vor der Analyse mittels Nass- oder Trockenveraschung in Orthophosphat überführt werden. Der P-Gehalt der veraschten Proben wird mit Vanadat-Molybdat photometrisch bestimmt. Die Werte werden gegen einen Standard gemessen, und der P in der Probe mit Berücksichtigung von Einwaage und Verdünnung in der Lösung kalkuliert.

Die Methode von Gericke & Kurmies (1952) ist derzeit die empfohlene Methode für P-Bestimmung in Futtermitteln.

3.2. Löslichkeit von Futterphosphaten

In Futtermitteln werden verschiedene Phosphatverbindungen als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt. Tabelle II zeigt die Löslichkeit von als Futter-P verwendeten Phosphaten in chemisch reiner Form.

Tabelle II: Die Löslichkeit von Futterphosphaten.

Phosphat	Löslichkeit in Wasser, g/100 g H ₂ O	Löslichkeit in Säure, qualitativ
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ *H ₂ O	1,8 bei 30°C (Lide 1991)	Löslich in verdünnter Säure (Lide 2005)
CaHPO ₄ *2H ₂ O	0,02 bei 25°C (Lide 2005)	Löslich in verdünnter Säure (Lide 2005)
NaH ₂ PO ₄	94,9 bei 25°C (Lide 2005)	47,3-47,7% in HCl 0,4% (Jamroz 2010)
KH ₂ PO ₄	25 bei 25°C (Lide 2005)	11,81 g/100 g bei 38,5 °C (Kogan, 1961)
K ₄ P ₂ O ₇	187 bei 25°C (ILO-ICSC 1997)	Daten nicht verfügbar*
Na ₅ P ₃ O ₁₀	20 bei 25°C (Lide 2005)	Daten nicht verfügbar*

* Nach bestem Wissen der Autorin

Literaturübersicht

3.3. Methoden für die Bestimmung der P-Löslichkeit in Düngemitteln

Viele Methoden für die Bestimmung des löslichen P wurden in Bodenwissenschaft und für Düngemittel entwickelt, da die Löslichkeit eine der Voraussetzungen der Verfügbarkeit von P für die Pflanzen darstellt. Tabelle III zeigt gebräuchliche Methoden.

Tabelle III: Übersicht der Methoden für die Bestimmung des löslichen Phosphors in Düngemitteln (VDLUFA II 2014).

Medium	Dauer	Vorbereitung der Lösung	Trennung der Lösung
Bestimmung des Ameisensäurelöslichen Phosphats			
Ameisensäure, 2%	2 Stunden	2,5 g Probe mit etwas Ameisensäure übergießen und umschwenken, dann mit Ameisensäure bis zur Marke auffüllen, in der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur mit 30-40 U/Min schütteln.	Durch einen Faltenfilter filtrieren, den ersten durchlaufenden Filtratanteil verwerfen.
Bestimmung des Zitronensäurelöslichen Phosphats			
Zitronensäure, 2%	30 Min	5 g Probe unter ständigem Umschwenken mit 20°C warmer Zitronensäurelösung versetzen und bis Marke auf 500 ml auffüllen. Den Kolben verschließen und in der Schüttelmaschine bei 30-40 U/Min und bei 20°C genau 30 Min schütteln.	Durch einen Faltenfilter filtrieren.
Bestimmung des Wasser- und Neutralammoniumcitratlöslichen Phosphats			
Wasser; Salpetersäure, 33%	Ohne Inkubation	1 g Probe mit 25 ml Wasser vermischen.	Den Überstand auf einen Faltenfilter dekantieren, 3 mal wiederholen, den gesamten Rückstand auf den Filter bringen, mit Wasser auswaschen bis Filtratvolumen 200 ml beträgt, mit einigen Tropfen Salpetersäure versetzen und mit Wasser bis 5 l auffüllen.
Ammonium-zitratlösung,	4 Stunden	Den Filter mit verbleibendem Rückstand in	Abkühlen, mit Wasser auf 5 l auffüllen und durch Faltenfilter

Literaturübersicht

neutral		einen weiteren Meßkolben überführen. 100 ml Ammoniumzitratlösung zugeben, den Kolben verschließen, kräftig schütteln bis der Filter weitgehend zerstört ist. In der Schüttelmaschine 3 Stunden bei Raumtemperatur und 30-40 U/min schütteln. Im Wasserbad bei 40°C 1 Stunde erwärmen, dabei alle 10 Min umschwenken.	filtrieren.
		Den beiden Extrakten jeweils gleiche aliquote Anteile entnehmen, vereinigen und messen.	
Bestimmung des alkalisch-ammoniumzitratlöslichen Phosphats nach Petermann			
Alkalische Ammoniumzitratlösung; Oxinlösung	2 Stunden	2,5 g Probe mit etwas Petermann-Lösung mischen, umschwenken, dann auf 250 ml auffüllen. 2,5 g Probe mit 15 ml bzw. 25 ml Oxinlösung mischen, auf 250 ml mit Petermann-Lösung auffüllen. Beide Extrakte in der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur mit 30-40 U/min schütteln.	Beide Extrakte sofort durch Papierrund- oder Faltenfilter in die trockenen Gefäße filtrieren, den ersten durchgelaufenen Filtratanteil verwerfen. 15 ml Oxinlösung bei MgO Gehalt bis 5%, 25 ml Oxinlösung bei MgO Gehalt über 5%.
Bestimmung des Zitronensäurelöslichen und alkalisch-ammoniumzitratlöslichen Phosphats			
Zitronensäure, 2%	30 Min	2,5 g Probe mit 250 ml Zitronensäurelösung, in der Schüttelmaschine 30 Min bei Raumtemperatur schütteln.	Durch ein Membranfilter mittels Vakuum filtrieren, die ersten 10 ml des Filtrates verwerfen. Den Filter mit heißem Wasser auswaschen, das Waschwasser verwerfen.
Alkalische Ammoniumzitratlösung (Petermann-Lösung)	2 Stunden	Den ausgewaschenen Filter mit dem Rückstand in den Messkolben zurückgeben, 100 ml Petermann-Lösung zugeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden in der Schüttelmaschine schütteln. Mit Wasser auf	Durch doppelten Papierfilter filtrieren, den ersten durchlaufenden Filtratanteil verwerfen.

Literaturübersicht

		250 ml auffüllen.	
		Aus den beiden Extrakten gleich große aliquote Anteile entnehmen und vereinigen, Phosphat bestimmen.	
Bestimmung des Zitronensäurelöslichen Phosphats mit verlängerter Extraktionszeit			
Zitronensäure, 2%	180 Min	5 g Probe mit 20°C warmer Zitronensäure versetzen und auf 500 ml auffüllen. Den Kolben verschließen und in der Schüttelmaschine bei 30-40 U/min und 20°C genau 180 Min schütteln.	Durch Faltenfilter filtrieren.
Bestimmung des wasserlöslichen Phosphats			
Wasser; Salpetersäure 65%	30 Min	10 g Probe mit 200 ml Wasser gründlich mischen. Weitere 250 ml Wasser zugeben und den Kolben verschließen. In der Schüttelmaschine 30 Min schütteln. Mit Wasser auf 500 ml auffüllen und gut durchmischen.	Durch ein Faltenfilter filtrieren. Anwesende geringe Mengen von Pyro- oder Polyphosphaten müssen hydrolysiert werden. Den aliquoten Teil des Filtrats mit Salpetersäure, deren Volumen 10% des aliquoten Filtratanteils beträgt, vermischen und 10 Min kochen.

Literaturübersicht

3.4. P-Löslichkeit in Futtermitteln und Futterphosphaten

Die Löslichkeit von P aus anorganischen P-Quellen in Futtermitteln spiegelt im Wesentlichen die Löslichkeit der reinen Substanzen wider (Tabelle IV).

Tabelle IV: Überblick über die Löslichkeit von anorganischen Futterphosphaten in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode.

Medium	P-Quelle	Löslichkeit, %	Referenz
HCl 0,4%	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	100,0	Gillis et al. 1948
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100,0	
	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100,0	
Zitronensäure 2%	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	99,0	Huyghebaert et al. 1980
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	92,0-98,0	
	CaHPO_4	97,0-98,0	
	NaH_2PO_4	100,0	
Wasser	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	70,2	Grimbergen et al. 1985
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,9	
	CaHPO_4	1,0	
EDTA 20%	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	98,4	
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95,0	
	CaHPO_4	92,7	
Petermann-Lösung	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	99,2	De Groote & Huyghebaert 1997
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	94,7	
Zitronensäure 2%	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	99,1	
	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,4	

Literaturübersicht

3.5. P-Binder und P-Löslichkeit in der Nephrologie

Die Verwendung von P-bindenden Mitteln verringert die P-Löslichkeit und -Absorption bei Patienten mit chronischen Nierenkrankheiten. Diese Mittel werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zur Therapie eingesetzt (Block et al. 2012; IRIS 2017).

Sheikh et al. (1989) haben verschiedene P-Binder in vitro und in vivo untersucht: dabei standen Ca-haltige Verbindungen (Ca-Chlorid, Ca-Acetat, Ca-Laktat, Ca-Gluconat, Ca-Citrat, Ca-Carbonat) sowie Aluminium-haltige Stoffe (Aluminiumchlorid, Aluminiumhydroxid als Pulver und Gel, Aluminiumcarbonat, Aluminiumkomplex Carafate), Magnesiumhydroxid und Sukralfat zur Verfügung. Die P-Binder wurden mit Natriumhydrogenphosphat in vitro bei verschiedenen pH-Werten (4, 5, 6, 7) und für unterschiedliche Zeitspannen (direkt nach Zugabe, nach 1 und 24 Stunden, nach 4 Tagen sowie nach 1, 2 und 3 Wochen) inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und filtriert. Die Senkung der P-Konzentration im Filtrat stellte gebundenen P dar. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass es quantitative Unterschiede zwischen P-Bindern in Höhe und Rate (Geschwindigkeit) der Bindekapazität gibt, die der theoretischen Berechnung entsprechen.

Dieselbe Studie konnte außerdem in vivo nachweisen, dass es bei der Verwendung der P-Binder mit der Testmahlzeit (Fleisch, Kartoffeln und Käse) beim Menschen zu korrespondierenden Unterschieden in der P-Nettoabsorption kommt. Die von den Autoren verwendete Methode wich aber von den üblichen Bedingungen eines Verdaulichkeitsversuchs in der Tierernährung (Kamphues et al. 2017) stark ab (Darmspülung vor und nach der Testmahlzeit). Die Ergebnisse lassen sich also nicht mit den Daten zur scheinbaren Verdaulichkeit aus Tierexperimenten vergleichen.

4. Publikation

Received: 05 February 2018; accepted: 07 August 2018

Article first published online: 23 October 2018

DOI: 10.1111/jpn.12986

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition © 2018 Blackwell Verlag GmbH

A pilot study on in vitro solubility of phosphorus from mineral sources, feed ingredients and compound feed for pigs, poultry, dogs and cats

Lineva¹, A., R. Kirchner², E. Kienzle¹, J. Kamphues², B. Dobenecker¹

¹Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Department of Veterinary Science, Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany

²Institute for Animal Nutrition of the University of Veterinary Medicine Hanover, Germany

Running head: Phosphorus solubility in animal feed

Keywords: Phosphorus, solubility, mineral sources, feed materials, compound feeds

Correspondence:

Prof. Dr. E. Kienzle, Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik, Veterinärwissenschaftliches Departement, LMU München, Schönleutnerstr. 8, D 85764 Oberschleißheim, Tel.: +49 (0) 89 / 2180 – 78700; Fax: +49 (0) 89 2180 – 78702; Email: kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Publikation

Abstract

Excess phosphorus (P) as seen in cat foods can have a negative effect on health (Pastoor et al. 1995; Dobenecker et al. 2017). P surpluses may affect the environment, and economics in food producing animals, whereas marginal supply may impair performance and health. P can only be absorbed if it is soluble. Solubility of feed P in water and weak acid solution – as a precondition for absorption – was investigated in feed for dogs, cats, pigs and poultry. Different P containing mineral compounds ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_4\text{Na}(\text{PO}_4)_3$, KH_2PO_4 , $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NaH_2PO_4 , $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (29 samples), as well as 8 different ingredients such as wheat or meat, 64 compound feeds for pig and poultry, 8 complete dry and 13 complete moist dog foods, 25 complete moist cat foods and 29 experimental diets were analysed for P solubility. Finely ground feeds were soaked in water or hydrochloric acid (0.4%) for 1 and 90 min. The samples were centrifuged and the supernatant was analysed for P (photometric vanadate molybdate method after wet ashing). The solubility of P from inorganic sources reflected the solubility of the main compound of the feed grade material. „Organic“ ingredients, such as fish meal or meat, showed a lower P solubility than inorganic sources. Most ingredients from animal origin (exception fish meal) had a higher P solubility than those from plant origin. When inorganic and „organic“ P sources were mixed, the P solubility of the mixture reflected the P solubility and percentages of its compounds. In chicken, turkey and pig compound feed the percentage of acid soluble P increased with increasing P content. Pet moist food showed high percentages of water soluble P. The results show that the method is suitable to obtain data on water and acid solubility of P in feed and ingredients.

Introduction

In plant nutrition it is generally accepted that phosphates can only be absorbed if they are dissolved in the soil solution (Hinsinger 2001). In animals phosphorus (P) can only be absorbed from the gastrointestinal tract if it is soluble (Breves & Schröder 1991). In humans,

Publikation

eating a western diet the intake of P can be too high. This is a problem for patients with chronic kidney disease (Uribarri 2007). In order to reduce P absorption in human patients with chronic kidney diseases phosphate binders are used (Sheikh et al. 1989). These substances form insoluble complexes with phosphates which then lead to reduced absorption. The potential of such phosphate binders has been successfully assessed in vitro by measuring the reduction of P solubility in aqueous solution (Sheikh et al. 1989). This study evaluates the method to consider the solubility of P as a variable of interest for P metabolism. Interestingly, pet nutrition and the feeding of food producing animals face two entirely different scenarios with regard to P supply – but in both cases an estimation of the solubility of the ingested P may be helpful. Pets are mostly fed for maintenance, whereas farm animals are either reproducing or growing and they are fed for high performance. In pet food there is abundant P, which may come from bones, meat or cereal by-products and supplementation. The latter is done for various purposes such as modulating Ca/P ratio, as a buffer, for water-holding capacity, to modulate texture, for preservation, or as a palatability enhancer. This may lead to a P intake of about 6 times of the recommended allowance (Anonymous 2008, 2014; Larsen et al. 2012). Pastoor et al. (1995) and Dobenecker et al. (2017) considered this to be a risk for renal health in cats. Given the high rate of chronic renal disease in cats and dogs (Lulich et al. 1992; Babyak et al. 2017), and given the fact that P is an important constituent of uroliths (Lekcharoensuk et al. 2001) a high intake of available P may be an important risk factor. Dobenecker et al. (2017) compared excessive intake of moderately water soluble calcium monophosphate with similar amounts of highly water soluble potassium monophosphate in cats. The highly water soluble P was excreted renally in much larger percentages than the less water soluble P. Dobenecker and Siedler (2016) demonstrated similar effects of soluble and insoluble P sources on postprandial serum P in dogs. Schmidt et al. (2011) compared postprandial plasma P levels in pigs after the intake of a meal with either sodium

Publikation

monophosphate (water soluble) or dicalcium phosphate (water insoluble) or wheat bran in pigs. They reported higher values after the intake of the water soluble P.

By contrast to pet food, P content in feeds for monogastric farm animals (pigs, poultry) tends to be restricted due to expensive P sources and in order to prevent the environmental impact (Rodehutschord 2001). Thus, the P supplementation for farm animals aims to meet their requirements and to avoid any surplus. Therefore, efforts are made to increase availability such as the addition of phytase. In various productive animal species it has been shown that the apparent digestibility of more water soluble P sources such as monocalcium phosphate tends to be higher than that of less water soluble P salts such as dicalcium phosphate (Eya & Lovell 1997; Jongbloed et al. 1991; Gillis et al. 1948). P which is bound to phytate is not soluble in water and therefore less available for monogastric animals (i.e. pigs and poultry; Rodehutschord 2001; Kiarie et al. 2010).

In the present study the solubility of P in certain P sources, ingredients and compound feed for poultry, pigs and pets, in water and in diluted acid was measured. The water in this study reflects the P solubility in the food, the hydrochloric acid with concentration 0.4% was used for imitation of processes in the animal's stomach (dogs: Gray and Bucher 1941; cats: Bowie et al. 1953; piglets: Kamphues 1990). The duration of 1 minute was chosen to distinguish the rapidly soluble phosphates, and the duration of 90 minutes for slow soluble phosphates, and this duration is also comparable with the processes in the stomach.

The rationale was that a low solubility in water and in acid even after 90 minutes would help identify P sources with a low availability, especially in situations with a P supply just meeting requirements. By contrast a high and immediate solubility in water might be useful to identify P sources which are likely to be rapidly absorbed, especially in animals fed excessive amounts of P.

Publikation

The aim of the study was to generate data on P solubility of feed ingredients and to test whether the P solubility of ingredients in mixed feed is additive. In further studies in vitro solubility of P may be linked to in vivo measurements of P metabolism, such as postprandial serum P, renal P excretion, and even hormones like parathyroid hormone and fibroblast growth factor 23.

Materials and Methods

Different mineral P sources, ingredients, compound feeds and experimental mixtures were analysed regarding the solubility of P both in water and in 0.4% HCl after 1 and 90 minutes. Mineral P sources are listed in table 1. The samples were partly feed grade, and they were from the feed production units of the Institute for Animal Nutrition in Hanover and the Chair for Animal Nutrition in Munich as well as samples provided by producers. Ingredients were bought on the market, and in addition, there were some samples from the GrainUp project (University of Bonn), as well as corn from the University of Vienna, dried and ensiled (table 2). Fresh and heated meat was analysed without (table 2) and with the addition of mineral P sources (table S1).

Compound feed for poultry and pigs were partly test mixtures produced in the Institute for Animal Nutrition in Hanover, and partly provided by farms as well as samples from the nutrition consultation service in Hanover (table 3). The experimental diets for dogs consisted of tripe and rice with added P sources (Siedler 2018), and the experimental cat diets consisted of meat and rice (Hertel-Böhnke 2018), see table S1. The dry and moist dog food came from digestibility trials at the chair of Animal Nutrition in Munich (Kienzle et al. 2017; Dobenecker unpublished). The moist cat food was bought randomly (table 3).

Preparation of samples: Mineral P sources were used without any preparation and directly weighed into the assays. Air dry feed materials and compound feed such as cereals, dry dog food, compound feed for pigs and poultry were ground (particle size <0.5 mm). Experimental

Publikation

pet diets and moist pet food were lyophilized and ground (<0.5 mm). In either case 3 g of the ground material was weighed into the assay tubes. Fresh meat was minced in a kitchen machine (< 4.5 mm), and 5 g wet weight were used for each assay. To determine the effect of heat drying on meat P solubility a piece of the meat was oven dried (103°C, 5 h). Then it was ground (< 0.5 mm) and 3 g were used in the assay. For the effect of cooking 5 g of fresh minced meat were weighed into the assay tubes and were put into a microwave oven at 90W for 5 minutes. After that the assay procedure was carried out. Grain and soy samples were analysed without prior processing, and after oven drying. The samples were incubated in a drying oven at 103-106°C for 30-35 minutes. Meat with mineral additions: samples of raw meat were weighed separately for combinations with mineral sources. Mineral sources were added to the total amount of P of 1800 mg/kg dry matter (DM) for NaH₂PO₄ and of 1130 mg/kg DM for Na₅P₃O₁₀. For heating, samples with P additions were heated in a microwave oven at 90W for 5 minutes.

19.5 ml bidistilled water or 0.4% HCl was added to every sample of either 3 g of dried samples or 5 g of raw meat. Every sample was then stirred, for either 1 min or 90 min. After stirring, the samples were centrifuged at 1811 g for 3 minutes, and the solution was placed into new tubes.

For total P content determination, 0.5 g of each sample was weighed and after the addition of 1 ml hydrogen peroxide and 5 ml concentrated nitric acid, was exposed to microwave digestion (VDLUFA 2012), a process which transforms all feed P into ortho-phosphate. Then the solution was diluted after cooling up to 10 ml with bidistilled water. P was analysed photometrically by the method of Gericke & Kurmies (1952), a method which measures ortho-phosphate.

Every sample was measured in duplicates. Analysis of soluble P was repeated 4 times for estimate of repeatability. Mean within assay coefficient of variation of 232 samples of mineral

Publikation

compounds, ingredients and compound feed, in water and acid, after 1 and 90 minutes, was 3.9%.

$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ and $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ samples were analysed additionally also without microwave digestion.

For the moist cat foods, additional data obtained by standard methods from a certified laboratory were available on sodium, potassium and chloride content.

Results

The solubility of the feed grade mineral P sources reflected more or less the solubility of the purified chemical P salts of the main compound of the feed grade material (table 1).

Polyphosphates (tetra-potassium pyrophosphate and sodium triphosphate) were highly soluble in water and acid (> 90%; table 1). For the polyphosphates wet digestion in the microwave was essential for analysis. If solutions of polyphosphates were analysed without wet digestion negligible amounts could be found by the method of Gericke & Kurmies (1952).

Cereals and plant protein sources had a considerably lower solubility of P in water than most animal protein sources (table 2). Fish meal was an exception with a very low P solubility. For acid solubility the differences were less marked, in some feeds acid solubility was lower than water solubility, in others it was higher. In grains and meat, heating reduced P solubility in water (table 2). By contrast, in soy bean meal, rape seed meal and corn P solubility in water was unaffected by heating. The effect of cooking on P solubility in water after one minute and in acid was only tested in meat. There was a clear-cut decrease (table 2).

When inorganic and „organic“ P sources were freshly mixed, the P solubility of the mixture reflected the P solubility and percentages of its compounds (fig. 1). The results suggest additivity of P solubility in different ingredients rather than interaction (table S1). The heating process slightly reduced P solubility in most of the meat samples with additional inorganic P sources (table S1).

Publikation

When the percentage of P soluble in water or acid was compared in compound feed for different stages of pig production (piglets, fattening, pregnant and lactating sows) there were no systematic differences (data not shown). The same was true for the comparison of turkey and chicken diets as well as when poultry and pigs diets were compared. Table 3 shows the mean for all three species. In table 3 complete feed for pigs, chickens, and turkeys and prepared moist dog and cat, and dry dog food are compared. The water solubility of P was the lowest in dry dog food compared to all other feed types tested. All feeds showed a high P solubility in acid without any differences after one minute. Dry dog and moist cat food had the highest P solubility in acid after 90 minutes.

Solubility in water after 1 minute was slightly lower than after 90 minutes for most compound feed and ingredients but not for high P feed such as $\text{Ca}_4\text{Na}(\text{PO}_4)_3$ (details see table 1 and 2).

Solubility in acid after 90 minutes was similar or higher than solubility in acid after one minute. Especially in mineral P sources solubility in acid increased within 90 minutes (details see table 1).

Discussion

The measurement of P solubility in water or acid showed large differences between various P sources. Well known effects such as insolubility of phytate bound P in cereals (Rodehutschord 2001; Kiarie et al. 2010) or high water solubility of sodium monophosphate could be reproduced with the method. The solubility of different P sources, especially inorganic or „organic“ sources in experimental mixtures, was close to the solubility which would be expected when the soluble P from the ingredients was added up (table S1). Figure 1 shows the relationship between water soluble P as calculated from the ingredients and measured water soluble P after one minute. For all measurements there was no systematic interaction between ingredients. This makes the method applicable for compound feed.

Publikation

Heating changed the solubility of raw P sources, such as meat and cereals, presumably because enzymes such as phytase or muscle phosphatases, which can release P from tissues, are inactivated. Protein coagulation could also strengthen the binding of phosphate in proteins. Thus measuring P solubility in feed, in water or acid, will also give information on the effects of treatment on P availability and not only on effects of the composition. Differences between plant materials in solubility in water and acid are likely to reflect more the pH-optima of their phytases which may differ (Peers 1953; Bohn et al. 2008; Greiner et al. 1998) than actual differences in availability of P.

A special point is the measurement of polyphosphates which will not show up in the photometric method (Gericke and Kurmies 1952), unless they are transformed into ortho-phosphates by wet digestion. This way it is even possible to differentiate between soluble ortho- and polyphosphates.

Given the fact that the solubility of inorganic P sources, especially in acid, is considerably higher than that of „organic“ plant material sources; and the P content of many ingredients of plant origin (especially cereals and soy bean meal, table 2) used for feed animal diets is relatively low, we hypothesized that the solubility of P in acid would increase with increasing total P content in the feed, assuming that higher P contents would mostly be of inorganic origin. We set a limit of 5.5 g P/kg DM for the group with the lowest content, assuming that most of these would be of plant origin. The second group with moderate P content ranged from this limit to 6.5 g P/kg DM, and the third was above 6.5 g P/kg DM. As shown in figure 2, the acid solubility in the three groups increased significantly with increasing P content.

In dog food we hypothesized that part of the P would come from bones (for instance from meat and bone meal, chicken meal etc.), and that this P would be rather insoluble. As a rough indicator for bone content we used calcium content - even though calcium could also be added

Publikation

as a mineral salt. We grouped the dog food accordingly (≤ 15 g Ca/kg DM, > 15 g Ca/kg DM). The P solubility in acid differed significantly between these groups (fig. 3).

In moist pet food P content was very high (table 3). In a group of 25 moist cat foods data on calcium, sodium, potassium and chloride were available. We hypothesized that a large part of the P would originate from bone material as in the dry dog food. We presumed that the bone material would have a Ca/P ratio of approximately 2/1. Given that, we calculated the maximal P content that could possibly come from bone sources by dividing the calcium content by 2. The rest of the P is unlikely to originate from bones. We calculated therefore the content of P that does not come from bones by subtracting the former figure (calcium content divided by 2) from the total P content. The content of water soluble P and the P content not from bones correlated highly significant (fig. 4).

This suggests that the added P is from inorganic highly soluble sources such as sodium or potassium dihydrogen phosphate. We summed up the content of sodium and potassium and subtracted chloride. The result also correlated highly with the soluble P content (fig. 5) which strongly indicates the addition of the above mentioned phosphates.

These calculations demonstrate that measuring the soluble P content in food can give valuable information on the P source. In case of excessive P intake the measurement of water soluble P (1 min) can help identify P sources likely to be absorbed rapidly, which might increase serum P levels and renal P excretion (Dobenecker et al. 2018), and thus present a risk for kidney disease as P can be directly nephrotoxic (Haut et al. 1980; Kuro-o 2013). In case of low to moderate P intake the measurement of acid soluble P within 90 minutes may help identify P sources with very low availability. By contrast, a prediction of apparent P digestibility is

Publikation

impossible. Presumably, regulation of P metabolism interferes with apparent digestibility, especially in case of rapid P absorption.

References

Anonymous. Katzenfutter test 09/2008, 58-64. Publisher Stiftung Warentest, Berlin.

Anonymous. Katzenfutter test 03/2014, 80-85. Publisher Stiftung Warentest, Berlin.

Babyak, J. M., Weiner, D. E., Noubary, F., & Sharp, C. R. (2017). Prevalence of Elevated Serum Creatinine Concentration in Dogs Presenting to a Veterinary Academic Medical Center (2010–2014). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(6), 1757-1764.

DOI: 10.1111/jvim.14823

Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(3), 165–191.

<http://doi.org/10.1631/jzus.B0710640>

Bowie, Jane Y., G. Darlow, & M. Murray (1953). The effect of sodium fluoride on gastric acid secretion. *The Journal of Physiology*, 122 (1): 203-208.

Breves, G., & Schröder, B. (1991). Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutrition Research Reviews*, 4(1), 125-140.

<https://doi.org/10.1079/NRR19910011>

Dobenecker, B. & Siedler, S. (2016): The source of phosphorus influences serum PTH, apparent digestibility and blood levels of calcium and phosphorus in dogs fed high

Publikation

phosphorus diets with balanced Ca/P ratio. Waltham International Nutrition Sciences Symposium, Proc. p. 21.

Dobenecker, B., Hertel-Böhnke, P., Webel, A., & Kienzle E. (2018). Renal phosphorus excretion in adult healthy cats after the intake of high phosphorus diets with either calcium monophosphate or sodium monophosphate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, submitted for publication.*

Dobenecker, B., Webel, A., Reese, S., & Kienzle, E. (2017). Effect of a high phosphorus diet on indicators of renal health in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery, 20*, 339-343.
<https://doi.org/10.1177/1098612X17710589>

Eya, J. C., & Lovell, R. T. (1997). Net absorption of dietary phosphorus from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorus by channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of the World Aquaculture Society, 28*(4), 386-391.

Gericke, S., & Kurmies, B. (1952). Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit ammonium-vanadat-molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 59*, 235-247.

Gillis, M. B., Norris, L. C., & Heuser, G. F. (1948). The utilization by the chick of phosphorus from different sources. *Journal of Nutrition, 35*, 195-207.

Gray J. S., & Bucher G. R. (1941). The composition of gastric juice as a function of the rate of secretion. *American Journal of Physiology-Legacy Content, 133*:3, 542-550.

Publikation

Greiner, R., Konietzny, U., & Jany, K.-D (1998). Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry* 22.2, 143-161.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1998.tb00236.x>

Haut, L. L., Alfrey, A. C., Guggenheim, S., Buddington, B., & Schrier, N. (1980). Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney International*, 17(6), 722-731.

Hertel-Böhnke, P. (2018). *Einfluss der Phosphorquelle und des Calcium-Phosphor-Verhältnisses bei Phosphorübersorgung auf Parameter der Nierengesundheit bei der Katze (Doctoral dissertation)*. LMU, München.

Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237(2), 173-195.

<https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>

Jongbloed, A. W., Everts, H., & Kemme, P. A. (1991). Phosphorus availability and requirements in pigs. *Recent Advances in Animal Nutrition, 1991*, 65-80.

Kamphues, J. (1990). Acidification of the stomach contents of weaned piglets. Influence of amounts of feed and composition of diet. *Tierärztliche Praxis* 18.4 (1990): 359-363.

Kiarie, E., Nyachoti, C. M., Vitti, D., & Kebreab, E. (2010). Bioavailability of calcium and phosphorus in feedstuffs for farm animals. *Phosphorus and Calcium Utilization and Requirements in Farm Animals*, 76-83.

Publikation

Kienzle, E., Brenten, T., & Dobenecker, B. (2017). Impact of faecal DM excretion on faecal calcium losses in dogs eating complete moist and dry pet foods—food digestibility is a major determinant of calcium requirements. *Journal of Nutritional Science*, 6, e13.

<https://doi.org/10.1017/jns.2017.11>

Kuro-o, M. (2013). A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*, 3(5), 420-426.

<https://doi.org/10.1038/kisup.2013.88>

Larsen, J. A., Parks, E. M., Heinze, C. R., & Fascetti, A. J. (2012). Evaluation of recipes for home-prepared diets for dogs and cats with chronic kidney disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(5), 532-538.

<https://doi.org/10.2460/javma.240.5.532>

Lekcharoensuk, C., Osborne, C. A., Lulich, J. P., Pusoonthornthum, R., Kirk, C. A., Ulrich, L. K., & Swanson, L. L. (2001). Association between dietary factors and calcium oxalate and magnesium ammonium phosphate urolithiasis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(9), 1228-1237.

<https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.1228>

Lulich, J. P., Osborne, C. A., O'Brien, T. D., & Polzin, D. J. (1992). Feline renal failure: questions, answers, questions. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*.

Publikation

Pastoor, F. J. H., Klooster, A., Mathot, J. N. J. J., & Beynen, A. C. (1995). Increasing phosphorus intake reduces urinary concentrations of magnesium and calcium in adult ovariectomized cats fed purified diets. *The Journal of Nutrition*, 125(5), 1334.

Peers, F.G. (1953). The Phytase of Wheat. *The Biochemical Journal*, 53 (1), 102-110.

Rodehutschord, M. (2001). Der gegenwärtige Stand der Phosphorbewertung für Nutztiere. *Lohmann Informationen*, 26-34.

Schmidt, B., Linke, K., Ebert, A., Bachmann, L., Coenen, M. (2011). Effect of different dietary phosphorus sources concentration in growing pigs three hours postprandial. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 20, 68.

Sheikh, M. S., Maguire, J. A., Emmett, M., Santa Ana, C. A., Nicar, M. J., Schiller, L. R., & Fordtran, J. S. (1989). Reduction of dietary phosphorus absorption by phosphorus binders. A theoretical, in vitro, and in vivo study. *Journal of Clinical Investigation*, 83(1), 66.

DOI: 10.1172/JCI113886

Siedler, S. (2018). *Der Einfluss verschiedener Phosphorquellen bei alimentärer Phosphoriübersorgung auf die Phosphorverdaulichkeit und auf ausgewählte Blutparameter beim Hund* (Doctoral dissertation). LMU, München

Uribarri, J. (2007). Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake. *Seminars in Dialysis*, 20(4), 295-301.

DOI: 10.1111/j.1525-139X.2007.00309.x

Publikation

VDLUFA (2012). *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.* VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany

Headings of Figures

Fig. 1: Relationship between water soluble P content after 1 minute in fresh test mixtures (Table S1) as measured (x in g soluble P/kg wet weight) and calculated from ingredients (y in g soluble P/kg wet weight: $y=0.90x+0.09$; $r^2=0.95$).

Fig. 2: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in compound feed for food producing animals with low, moderate and high phosphorus content.

Fig. 3: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in complete dry dog food in products with moderate or high calcium content.

Fig. 4: Relationship between phosphorus content not possibly originating from bones (=Total phosphorus minus total calcium divided by 2, calcium determined according to VDLUFA 2012; x in g/kg DM) and soluble phosphorus (y in g/kg DM: $y=0.65x+1.03$; $r^2=0.49$).

Fig. 5: Relationship between electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride; sodium and potassium, chloride determined according to VDLUFA 2012; x in mmol/kg DM) and water soluble phosphorus (after 1 minute; y in mmol/kg DM): $y=0.38x+1.41$; $r^2=0.58$.

Publikation

Table 1: Solubility of mineral phosphorus sources (Soluble phosphorus in % of total phosphorus)

Source	P measured, g/kg DM (n)	1 min water	90 min water	1 min acid	90 min acid
Feed grade samples, several batches analysed					
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	216-231 (9)	79±9	81±10	93±8	96±10
CaHPO ₄ • 2H ₂ O	176-189 (5)	5±3	9±5	101±3	101±3
Mixed: Ca(H ₂ PO ₄) ₂ CaHPO ₄ • 2H ₂ O	215-219 (3)	57±18	56±16	93±7	99±1
Ca ₄ Na(PO ₄) ₃ unrefined	157-185 (8)	1±0	2±0	41±18	105±4
Analytical grade or human food grade, one batch analysed					
KH ₂ PO ₄	232	92	90	88	89
K ₄ P ₂ O ₇	183	95	94	89	95
NaH ₂ PO ₄	254	96	96	93	92
Na ₅ P ₃ O ₁₀	238	96	95	93	96

Publikation

Table 2: Solubility of phosphorus in single feed (Soluble phosphorus in % of total phosphorus)

Ingredients	P measured, g/kg DM	1 min water	90 min water	1 min acid	90 min acid
Several different batches/samples analysed					
Wheat	3.73±0.41 (9)	15±5 ^{aA}	42±8 ^{bA}	40±8 ^{bA}	50±3 ^{cAC}
Wheat heated	3.73±0.41 (9)	-	18±6 [*]	-	-
Barley	3.66±0.46 (8)	32±11 ^{aB}	65±8 ^{bB}	41±8 ^{cA}	47±3 ^{cA}
Barley heated	3.66±0.46 (8)	-	38±18 [*]	-	-
Soy bean meal	6.80±0.21 (5)	42±23 ^{abBC}	57±5 ^{bB}	16±3 ^{cB}	21±3 ^{acB}
Soy bean meal heated	6.80±0.21 (5)	-	57±7	-	-
Rape seed meal	12.34±0.79 (4)	9±1 ^{aA}	13±1 ^{aC}	45±2 ^{bA}	59±18 ^{bAC}
Rape seed meal heated	12.34±0.79 (4)	-	13±2	-	-
Maize	3.11±0.28 (6)	60±13 ^{aC}	81±11 ^{bD}	51±11 ^{aA}	59±6 ^{aC}
Maize heated	3.11±0.28 (6)	-	82±12	-	-
Chicken meal	11.01±0.08 (2)	55±7 ^{BC}	58±14 ^{AB}	43±7 ^A	61±0 ^{AC}
One batch/sample analysed					
Fish meal	27.19	8	9	22	23
Raw pork meat	9.13	72	74	57	58
Cooked pork meat	9.28	46	47	38	44
Raw beef meat	7.45	69	73	58	68
Cooked beef meat	10.17	38	41	33	32
Raw chicken meat	10.53	67	71	63	79
Cooked chicken meat	10.08	57	66	50	58

- Means in one row not sharing a superscript letter are significantly different (repeated measures one way ANOVA Holm-Sidak, SigmaPlot 12.5)
- Means in one column not sharing a superscript capital are significantly different (one way ANOVA (heated samples not included in statistical analysis))
- * = significant difference between raw and heated (paired t-test, SigmaPlot 12.5)

Publikation

Table 3: P solubility in compound feed (Soluble phosphorus in % of total phosphorus)

Type	n	P g/kg DM	1 min Water	90 min water	1 min acid	90 min acid
Farm animal feed	64	7.23±1.80	31±11 ^{ab}	48±13 ^a	51±7 ^a	63±8 ^a
Moist dog food	13	15.27 ± 2.97	38±13 ^a	44±12 ^a	47±6 ^a	62±11 ^a
Dry dog food	8	11.07 ± 2.93	14±7 ^b	20±8 ^b	46±10 ^a	77±8 ^b
Moist cat food	25	15.52 ± 3.99	33±13 ^a	35±13 ^a	49±11 ^a	72±11 ^b

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, post hoc test, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$, calculated in Sigma Plot 12.5)

Publikation

Table S1: Solubility of phosphorus in test mixtures (Soluble phosphorus in % of total phosphorus)

Mix	P measured, g/kg DM	1 min water	90 min water	1 min acid	90 min acid
Several different batches/samples analysed					
Basis 1	4.44±0.11(4)	29	60	29	34
Basis 1 + Ca(H ₂ PO ₄) ₂	6.61±0.17 (4)	43	60	53	59
Basis 1 + CaHPO ₄ • 2H ₂ O	6.75±0.21 (4)	20	39	55	57
Basis 1 + Ca(H ₂ PO ₄) ₂ CaHPO ₄ • 2H ₂ O	6.68±0.22 (4)	31	51	56	60
Basis 1 + Ca ₄ Na(PO ₄) ₃	6.63±0.28 (4)	19	34	39	55
Basis 2	4.56±0.13 (4)	23	43	40	57
Basis 2 + Ca(H ₂ PO ₄) ₂	6.57±0.27 (4)	43	58	63	74
Basis 2 + CaHPO ₄ • 2H ₂ O	6.56±0.16 (4)	18	26	54	71
Basis 2 + Ca(H ₂ PO ₄) ₂ CaHPO ₄ • 2H ₂ O	6.62±0.08 (4)	30	46	55	60
Basis 2 + Ca ₄ Na(PO ₄) ₃	6.67±0.17 (4)	18	32	39	54
One batch/sample analysed					
Tripe-rice*	4.48	40	50	29	38
Tripe-rice + CaHPO ₄ • 2H ₂ O*	19.90	7	12	37	44
Tripe-rice + Ca(H ₂ PO ₄) ₂ *	21.58	44	46	65	71
Tripe-rice + NaH ₂ PO ₄ *	21.48	74	81	47	66
Tripe-rice + KH ₂ PO ₄ *	22.38	95	80	94	90
Tripe-rice + K ₄ P ₂ O ₇ *	10.55	100	99	76	71
Tripe-rice + Na ₅ P ₃ O ₁₀ *	12.16	76	100	60	72
Beef raw + NaH ₂ PO ₄	20.47	87	96	73	80
Beef raw + Na ₅ P ₃ O ₁₀	13.33	83	98	82	87
Beef cooked + NaH ₂ PO ₄	20.45	90	90	73	55
Beef cooked + Na ₅ P ₃ O ₁₀	13.39	81	87	54	87
Pork raw + NaH ₂ PO ₄	15.75	88	93	78	79
Pork raw + Na ₅ P ₃ O ₁₀	11.74	76	80	62	73
Pork cooked + NaH ₂ PO ₄	15.64	83	87	70	74
Pork cooked + Na ₅ P ₃ O ₁₀	11.74	73	78	53	51
Chicken raw + NaH ₂ PO ₄	18.26	83	92	59	77
Chicken raw + Na ₅ P ₃ O ₁₀	11.26	76	88	64	79
Chicken cooked + NaH ₂ PO ₄	17.26	78	89	67	71
Chicken cooked + Na ₅ P ₃ O ₁₀	11.23	82	83	69	66

Basis 1 wheat 40%, barley 30%, soy bean meal 21%, rape seed meal 5%, bolus alba and the respective phosphorus source; Basis 2 = Basis 1 plus CaCO₃ in amounts to provide a total of 14g Ca/kg air dry feed including the calcium from some of phosphorus sources

* material analysed after drying

Publikation

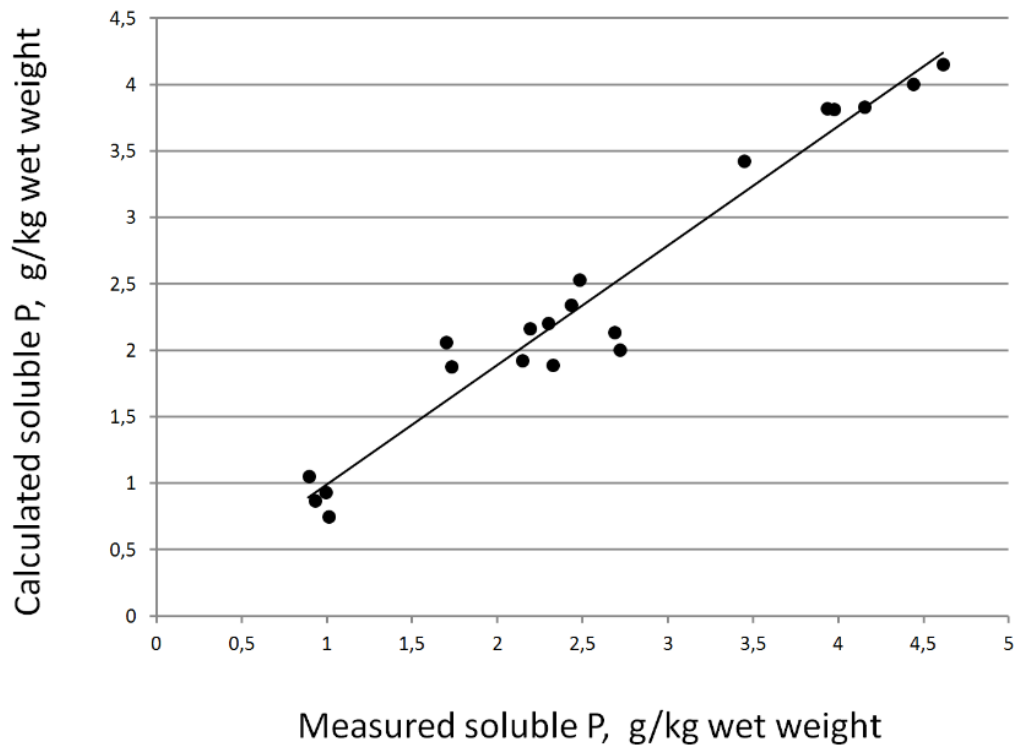


Fig. 1: Relationship between water soluble P content after 1 minute in fresh test mixtures (table S1) as measured (x in g soluble P/kg wet weight) and calculated from ingredients (y in g soluble P/kg wet weight: $y=0.90x+0.09$; $r^2=0.95$)

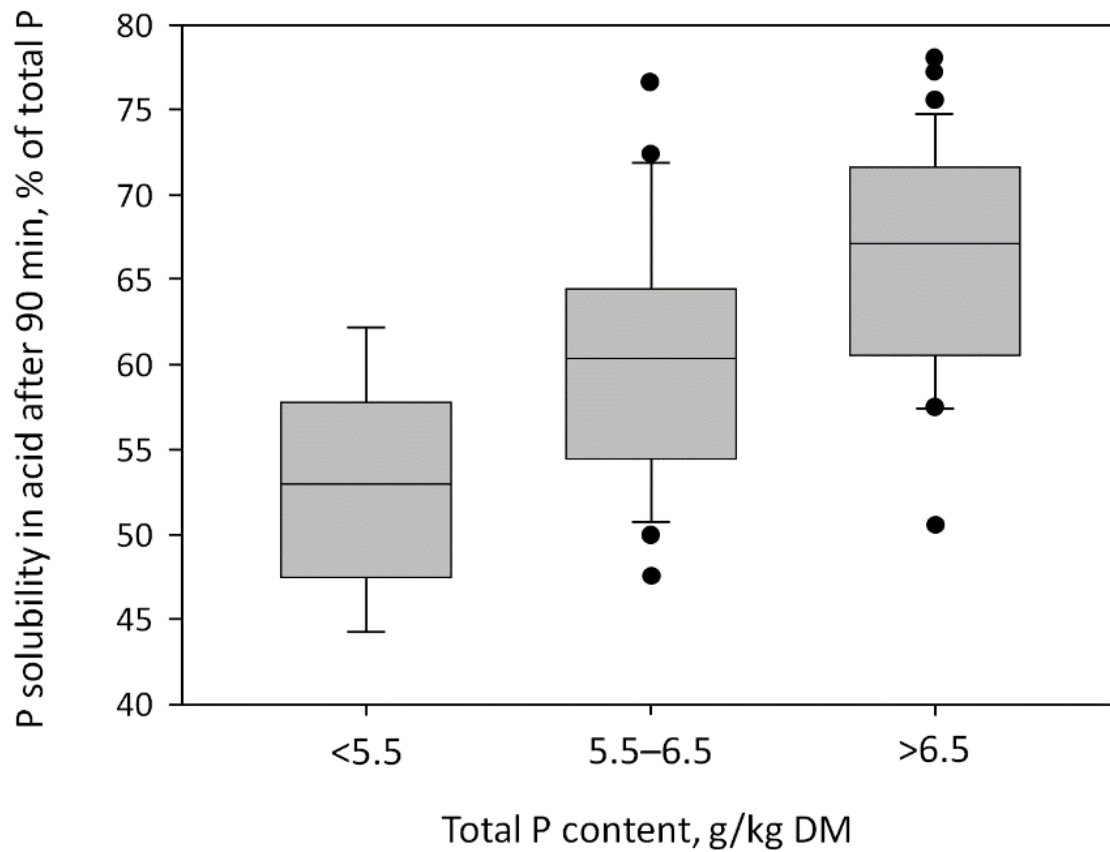


Fig. 2: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in compound feed for food producing animals with low, moderate and high phosphorus content

Publikation

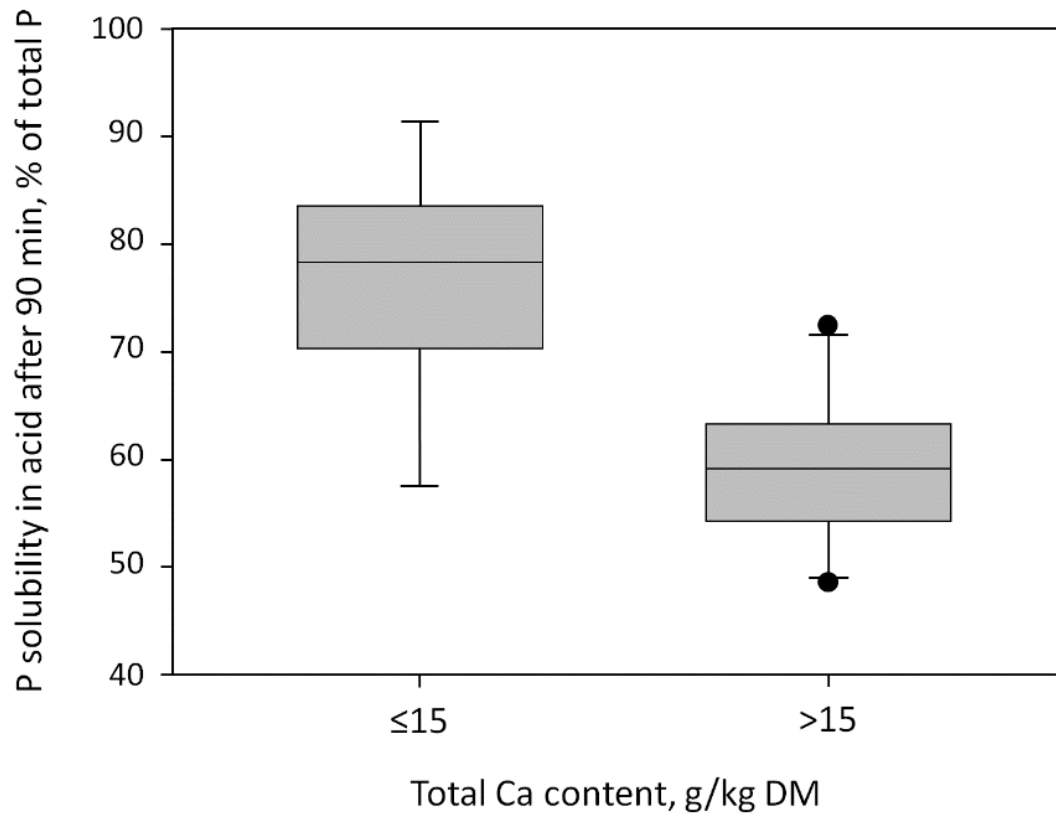


Fig. 3: Data distribution (Boxplots showing median, box = 25/75% quartiles, whiskers = 5/95% quartiles and outliers dots) of phosphorus solubility after 90 minutes in weak hydrochloric acid in complete dry dog food in products with moderate or high calcium content

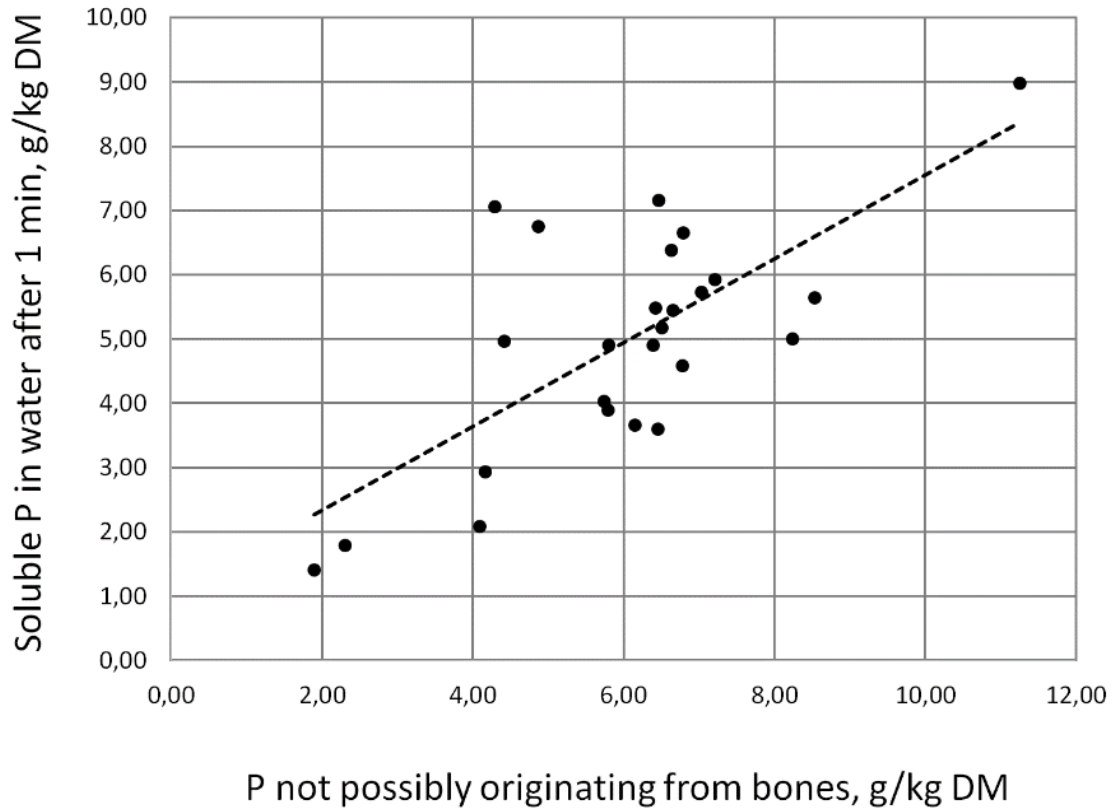


Fig. 4: Relationship between phosphorus content not possibly originating from bones (=Total phosphorus minus total calcium divided by 2, calcium determined according to VDLUFA 2012; x in g/kg DM) and soluble phosphorus (y in g/kg DM): $y=0.65x+1.03$; $r^2=0.49$

Publikation

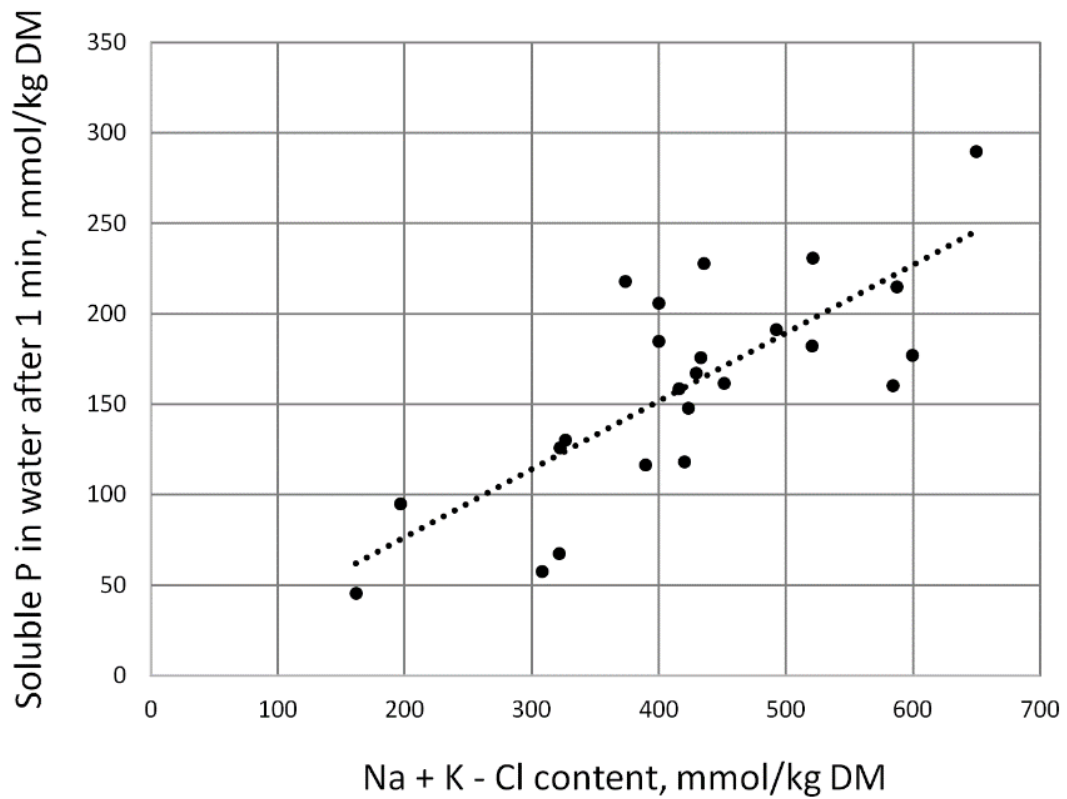


Fig. 5: Relationship between electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride; sodium and potassium, chloride determined according to VDLUFA 2012; x in mmol/kg DM) and water soluble phosphorus (after 1 minute; y in mmol/kg DM): $y = 0.38x + 1.41$; $r^2 = 0.58$

5. Diskussion

5.1. Kritik der Methode

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode zur Löslichkeitsbestimmung von Phosphaten wurde das zu prüfende Futtermittel entweder mit destilliertem Wasser oder mit 0,4% Salzsäure versetzt. Da die Futtermittel unterschiedliche pH-Werte und Pufferkapazitäten aufweisen, war damit zu rechnen, dass der pH-Wert im Analysengut variiert. Einzelne Testmessungen in Vorversuchen haben dies auch gezeigt. In vivo ist allerdings mit ähnlichen Effekten durch den pH-Wert der Futtermittel zu rechnen, sodass entschieden wurde, den pH-Wert in der Messlösung nicht festzulegen. Dies wäre nur möglich gewesen, wenn Puffer zugesetzt und/oder die Salzsäurekonzentration geändert worden wäre. Davon abgesehen, dass dann mehrere Voransätze für die Messung nach einer Minute nötig gewesen wären, hätten Puffer und Salzsäure potentiell weitere Effekte auf die Löslichkeit, sodass die Genauigkeit sich nicht verbessert hätte, die Parallele zum in vivo-Geschehen sich jedoch verschlechtert hätte.

Die eingewogene Futtermenge war konstant, sodass sich bei unterschiedlichem P-Gehalt verschiedene P-Konzentrationen im Reagenzglas ergaben. Sofern diese Konzentrationen sich im marginalen Bereich der Maximallöslichkeit befinden, könnten verschiedene P-Konzentrationen derselben P-Quelle verschiedene Löslichkeitsergebnisse bewirken. Allerdings sind die in Futtermitteln möglichen P-Konzentrationen in Relation zur Einwaage und der zugegebenen Wasser- oder Säuremenge erheblich niedriger (i.d.R. um mindestens eine Zehnerpotenz) als die Löslichkeiten der Futterphosphate (Tabelle 2). Dass die genannten Faktoren sich nicht in erheblicher Weise auf das Ergebnis der Löslichkeitsmessung auswirken, zeigt auch die Additivität der Resultate, wenn verschiedene P-Quellen in einem Mischfuttermittel verwendet werden (Fig. 1 in der Publikation). Die aus der P-Löslichkeit der

Diskussion

P-haltigen Einzelkomponenten berechnete Löslichkeit korrelierte mit der gemessenen P-Löslichkeit der Mischungen ($R^2 = 0,95$).

Dies zeigt, dass die Methode als Screening für die Identifikation von sehr schwer und sehr leicht löslichen P brauchbar ist.

Ein weiterer Parameter, der nicht vollständig standardisierbar war, war die Partikelgröße bei frischem und gekochtem Fleisch, die aus technischen Gründen größer war als bei anderen Futtermitteln. Trotzdem ließen sich hier die erwarteten Ergebnisse (i.e. höhere Löslichkeit als bei P aus Knochen oder Getreide, geringere Löslichkeit von P aus Fleisch nach dem Kochen) deutlich zeigen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. P-Löslichkeit in Einzelfuttermitteln

Die Löslichkeit von P in mineralischen Einzelfuttermitteln entsprach in etwa den Angaben für die Reinsubstanzen. Hier verdienen die Polyphosphate besondere Erwähnung. In Vorversuchen wurden die mineralischen Einzelfuttermittel nach dem Aufschwemmen in Wasser oder Säure und dem Zentrifugieren zunächst nicht nassverascht, sondern direkt gemessen, da praktisch keine organischen Bestandteile vorhanden waren. Die Polyphosphate zeigten hierbei ein bemerkenswertes Verhalten: Die Substanzen lösten sich zwar, waren jedoch in der Lösung dann nicht nachweisbar, da die Methode nach Gericke & Kurmies (1952) die Polyphosphate nicht bestimmt, sondern nur Orthophosphate. Erst nach dem Veraschen konnten die Polyphosphate wieder nachgewiesen werden. Dies lässt sich dazu nutzen, Orthophosphate, die von der genannten photometrischen P-Bestimmung erfasst werden, von anderen Phosphaten, die nicht erfasst werden, zu differenzieren, indem die P-Konzentration einmal aus der unbearbeiteten Probe und einmal nach einer Veraschung gemessen wird.

Diskussion

Die als Futtermittel verwendeten Getreide enthalten relativ niedrige Mengen von Gesamt-P, die P-Löslichkeit war aber sehr unterschiedlich. Es ist bekannt, dass in pflanzlichen P-Quellen ein bestimmter Anteil der Phosphate als Phytat vorliegt, und dieser Anteil in diversen Pflanzen unterschiedlich hoch sein kann (Humer et al. 2015). Phosphate bilden mit Phytat unlösliche Verbindungen, was durch die Ergebnisse der Löslichkeitsmessung bestätigt werden konnte.

P in Fleisch liegt überwiegend in organischer Form vor, meistens in strukturellen Proteinen. P kann auch in Enzymen, Phospholipiden, Nukleinsäuren und anderen Verbindungen enthalten sein. Generell sind solche Verbindungen weniger löslich in Wasser und Säure als anorganische, was bei der Löslichkeitsmessung bestätigt wurde. Die P-Löslichkeit aus rohem und gekochtem Fleisch war unterschiedlich, wobei die gekochten Fleischproben eine etwas niedrigere Löslichkeit hatten. Das könnte mit der Denaturierung der Proteine erklärt werden, deren Struktur sich durch die thermische Behandlung ändert. Die P-Löslichkeit der Phosphate im Fleisch ist höchstwahrscheinlich auch von diesen Strukturänderungen betroffen, was die Unterschiede in der P-Löslichkeit zwischen rohem und gekochtem Fleisch erklären könnte. Ein weiterer Grund für den Unterschied in der P-Löslichkeit von rohem und gekochtem Fleisch könnte sein, dass die im Fleisch enthaltenen Enzyme (Phosphatasen) beim Kochen inaktiviert werden und P nicht mehr freisetzen können.

Getrocknetes Fleisch und Fischmehl zeigten trotz der kleineren Partikelgröße der Proben noch niedrigere P-Löslichkeiten als gekochtes Fleisch. Das getrocknete Fleisch wurde im Labor hergestellt, wofür im Supermarkt gekaufte Hühnerbrust ohne Knochen in Stückchen von ca. 2x2x2 cm geschnitten wurde. Die Fleischstücke wurden im Trockenschrank bei 103°C für 5 Stunden getrocknet und danach in der Labormühle zermahlen (Partikelgröße 0,5 mm). Diese Proben enthielten also keine Knochenanteile. Das Fischmehl war kommerziell verfügbar. Dieses Produkt enthielt einen hohen Skelettanteil, da der Fisch bzw. Fischabfälle gewöhnlich

Diskussion

im Ganzen für das Fischmehl industriell verarbeitet werden. Außerdem werden Mehle aus der industriellen Herstellung länger und bei höheren Temperaturen und unter Druck erhitzt (Parlament, Verordnung (EG) Nr. 1069/2009), was die Proteinstruktur stärker beeinflusst als das Trocknen.

Abbildung I zeigt den Gesamt-P-Gehalt und den Anteil des wasserlöslichen P nach 1 Minute in Proben von Fleisch (roh, gekocht, getrocknet) und Fischmehl.

Abbildung I

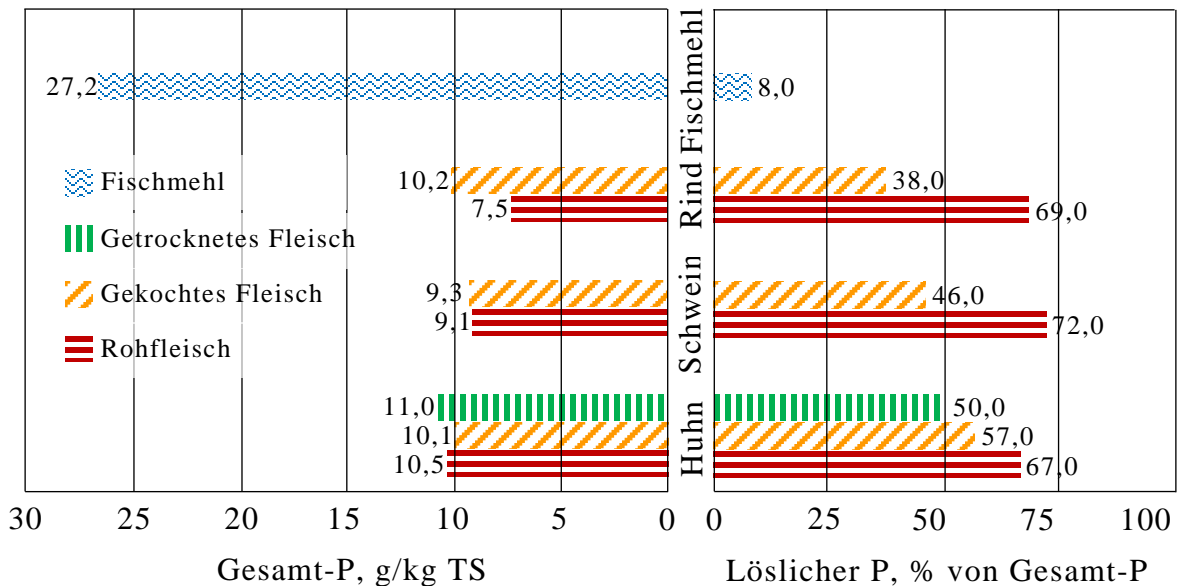


Abb. I: Vergleich von Gesamt-P Gehalt mit P-Löslichkeit in Wasser nach 1 Minute in Proben von Rohfleisch, gekochtem, getrocknetem Fleisch und Fischmehl.

5.2.2. Mischfuttermittel

Wie oben ausgeführt wurde bei Mischungen mit zwei Komponenten gezeigt, dass eine Additivität der P-Löslichkeit vorliegt. Die Frage war nun, ob dies auch bei Mischfuttern mit mehr als zwei Einzelkomponenten der Fall ist. Die Zusammensetzung der Mischfutter (P-Quellen) war nicht bekannt.

Diskussion

Allerdings lassen sich Plausibilitätskontrollen der Ergebnisse zu Mischfuttern aus bekannten Effekten herleiten. So enthalten z.B. pflanzliche Futtermittel wie Getreide etwa 4 maximal 5 g P/kg. Darüber hinausgehende P-Gehalte im Mischfutter ohne tierische Bestandteile wie Fischmehl dürften daher aus anorganischen Quellen stammen. Die Daten über die P-Löslichkeit in Säure nach 90 Minuten der Futtermittel für Nutztiere wurden entsprechend in 3 Gruppen nach P-Gehalt eingeteilt. Der P-Gehalt $< 5,5$ g/kg Trockensubstanz (TS) wurde als Grenze für den niedrigen P-Gehalt festgelegt – diese Gruppe repräsentiert vermutlich überwiegend pflanzliche P-Quellen ohne anorganische Phosphate (s. Tabelle 2). Ein P-Gehalt $> 6,5$ g/kg TS wurde als hoher Gehalt betrachtet, der nur mit zugesetzten Phosphaten erklärt werden kann. Der mittlere P-Gehalt wurde von 5,5 bis 6,5 g/kg TS definiert. Die Hypothese war, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode eine geringere P-Löslichkeit in Futtermitteln mit niedrigerem P-Gehalt nachweisen wird, da hier weniger zugesetzte Phosphate enthalten sein dürften. Fig. 2 in der Publikation zeigt, dass diese Hypothese zutreffend ist.

Trockenfutter für Hunde und Katzen enthält als Protein-, Ca- und P-Quellen gewöhnlich Fleisch- und Knochenmehl. Die Hypothese war, dass P aus diesen Komponenten weniger löslich ist, weil die oben beschriebenen Einzelfuttermittel aus der eigenen Untersuchung bzw. Testmischungen mit Knochenmehl als P-Quellen (Siedler & Dobenecker 2016) wenig löslich waren. Als Marker für den Knochengehalt wurde der Ca-Gehalt gewählt. Die Futtermittel wurden dementsprechend in 2 Gruppen (niedriger bzw. hoher Knochengehalt) geteilt, wobei die Grenze für einen sehr hohen Gehalt bei 15 g Ca/kg TS festgelegt wurde (der Ca-Bedarf von Hunden und Katzen im Wachstum beträgt 12 bzw. 8 g/kg TS; NRC 2006). Fig. 3 in der Publikation zeigt, dass die P-Löslichkeit in Säure in der Gruppe mit höherem Ca-Gehalt signifikant niedriger war als in der Gruppe mit niedrigerem Ca-Gehalt, was diese Plausibilitätskontrolle bestätigt.

Diskussion

Der P-Gehalt in Nassfutter für Katzen war deutlich höher als in Trockenfutter. Die Verwendung von anorganischen Phosphaten bei der Nassfutterherstellung ist aus technologischen Gründen sehr wahrscheinlich. Angenommen, dass das Ca : P Verhältnis in Knochen relativ konstant ist und ca. im Mittel bei 2 : 1 liegt (Fountos et al. 1999; Speller et al. 2005), konnte der P-Gehalt kalkuliert werden, der maximal aus Knochen stammen kann. Dafür wurde vom P-Gehalt der durch 2 dividierte Ca-Gehalt subtrahiert – der Rest entspricht dem Anteil an P, der nicht aus Knochen kommen kann. Der nicht aus Knochen stammende P korrelierte mit der P-Löslichkeit in Wasser nach 1 Minute (Fig. 4 in der Publikation), was die Vermutung nahelegt, dass es sich dabei um leichtlösliche Phosphate, wie Natrium- oder Kalium-Dihydrogenphosphate aus dem ersten Abschnitt der Arbeit, handeln könnte.

Die Daten über den Natrium-, Kalium- und Chlorid-Gehalt derselben Proben standen aus der Analytik eines zertifizierten Dienstleistungslabors zur Verfügung. Um die oben genannte Vermutung zu überprüfen, wurden die Gehalte der Kationen (Natrium, Kalium) summiert, während der Chloridgehalt subtrahiert wurde. Die Vermutung, dass der restliche Anteil der Elektrolyte dem P-Gehalt entspricht, wurde durch eine Korrelation ($R^2 = 0,58$) zwischen der P-Löslichkeit in Wasser nach 1 Minute und dem Elektrolyt-Restanteil bestätigt (Fig. 5 in der Publikation).

5.2.3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit in vivo Studien

Die Mehrkomponentenmischungen (Pansen, Reis, Mineralfutter) wurden in einem Versuch an Hunden eingesetzt (Siedler & Dobenecker 2015; Siedler & Dobenecker 2016). Dies wurde in einer anderen Arbeit mit den Daten über die Löslichkeit verglichen (Lineva et al. 2017). Es gab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Gehalt an leicht wasserlöslichen Phosphaten und dem postprandialen P-Serumspiegel bei den Hunden. Die scheinbare Verdaulichkeit korrelierte jedoch nicht mit der P-Löslichkeit, was mit der komplexen Regulation der P-Homöostase im Organismus erklärt werden kann. Vermutlich kann

Diskussion

wasserlösliches P schnell und in hoher Konzentration im Magen-Darm-Trakt absorbiert werden. Es ist anzunehmen, dass die daraus resultierende Hyperphosphatämie Regulationsmechanismen zur Gegensteuerung induziert, welche sich vermutlich auch auf die scheinbare Verdaulichkeit auswirken.

5.3. Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Löslichkeitsbestimmung von P kann zur Einschätzung der P-Löslichkeit aus verschiedenen P-Quellen in Futtermitteln dienen. Bei Nutztieren kann eine niedrige Säurelöslichkeit des P hinweisend auf eine sehr geringe P-Verfügbarkeit sein und somit ungünstige P-Quellen identifizieren. Im Bereich der Kleintierfütterung kann die Methode helfen, extrem gut lösliche P-Quellen bei extrem hohem P-Gehalt in Futter zu identifizieren, die zu Hyperphosphatämie und Hyperphosphaturie führen können und damit ein potentielles Gesundheitsrisiko darstellen (Siedler & Dobenecker 2015, Coltherd et al. 2018; Dobenecker et al. 2018a; Herbst & Dobenecker 2018, Alexander et al. 2019).

Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Phosphor (P) kann nur absorbiert werden, wenn er gelöst ist. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Bestimmung der P-Löslichkeit in verschiedenen Futtermitteln für Hunde, Katzen, Schweine und Geflügel untersucht. Die P-Löslichkeit in Wasser und Salzsäure (0,4%) wurde nach 1 Minute und 90 Minuten in 29 Futterphosphatproben, 8 Einzelfuttermitteln wie Fleisch oder Getreide, 64 Mischfuttermitteln, 8 Alleintrockenfuttern für Hunde, 13 Nassfuttern für Hunde, 25 Nassfuttern für Katzen und 29 experimentellen Mischungen analysiert. Die Proben wurden zermahlen, in Wasser oder Salzsäure gelöst und für 1 Minute bzw. 90 Minuten geschüttelt. Aus dem Überstand wurde nach der Nassveraschung P photometrisch analysiert. Die Löslichkeit wurde rechnerisch in % des Gesamt-P in der Trockensubstanz kalkuliert. Die organischen Einzelfuttermittel (Fleisch oder Getreide) hatten die niedrigsten Werte der P-Löslichkeit in beiden Medien. Die anorganischen Futterphosphate zeigten mit wenigen Ausnahmen eine sehr hohe P-Löslichkeit in Wasser und Säure. Die P-Löslichkeit von experimentellen Mischungen wurde sowohl gemessen, als auch aus den Werten der vorherigen Bestimmungen der P-Löslichkeit in Einzelkomponenten kalkuliert. Dabei wurde die Additivität der P-Löslichkeit der verwendeten Komponenten in diesen experimentellen Mischungen beobachtet. Erhitzen von Fleisch und Getreide führte zu einem Rückgang der P-Löslichkeit. Die untenstehende Tabelle V zeigt P-Gehalt und Löslichkeit von Alleinfuttermitteln für Schweine und Geflügel (hier bestanden keinerlei Unterschiede zwischen den Tierarten, den Alters- und Nutzungsgruppen, für die die FM bestimmt waren) sowie von Alleinfuttermitteln für Hunde und Katzen.

Zusammenfassung

Tabelle V: P-Löslichkeit in Alleinfuttermitteln (Löslicher P in % von Gesamt-P; Mittelwerte +/- Standardabweichung)

Futtermittel	n	P g/kg TS	1 Min Wasser	90 Min Wasser	1 Min Säure	90 Min Säure
Futtermittel für Nutztiere	64	7,23±1,80	31±11 ^{ab}	48±13 ^a	51±7 ^a	63±8 ^a
Nassfutter für Hunde	13	15,27±2,97	38±13 ^a	44±12 ^a	47±6 ^a	62±11 ^a
Trockenfutter für Hunde	8	11,07±2,93	14±7 ^b	20±8 ^b	46±10 ^a	77±8 ^b
Nassfutter für Katzen	25	15,52±3,99	33±13 ^a	35±13 ^a	49±11 ^a	72±11 ^b

Mittelwerte in einer Spalte, die nicht mit gleichen Indexen markiert sind, unterscheiden sich signifikant (one way ANOVA, post hoc test, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$, kalkuliert in Sigma Plot 12.5)

Die in dieser Arbeit verwendete Methode kann schlecht lösliche und sehr leicht lösliche P-Quellen unterscheiden. Die Absorption ersterer kann als unterdurchschnittlich eingestuft werden. Dieser Aspekt ist vor allem für landwirtschaftliche Nutztiere wichtig, wenn trotz ausreichender P-Versorgung der Verdacht einer unzureichenden Verfügbarkeit besteht. In hohen Mengen verabreichte leicht lösliche Phosphate führen bei Hunden oder Katzen häufig zu postprandialer Hyperphosphatämie und Phosphaturie und stellen daher ein Risiko für die Nierengesundheit dar. Die Bestimmung der leicht löslichen Phosphate ist unter diesem Aspekt von Bedeutung für die Heimtierernährung.

Summary

7. Summary

Phosphorus (P) can only be absorbed if it is in solution. In the present work, a method for the evaluation of P solubility in different feed for dogs, cats, pigs and poultry was studied. The P solubility in water and hydrochloric acid (0.4%) was analysed after 1 and 90 minutes in 29 samples of feed phosphates, 8 single ingredients, 64 compound feeds for pig and poultry, 8 complete dry and 13 complete moist dog foods, 25 complete moist cat foods and 29 experimental diets. The samples were ground, then dissolved in water or hydrochloric acid and stirred for 1 and 90 minutes, respectively. The supernatant was analysed after wet digestion with the photometric method. The solubility was calculated in % of total P in DM. The organic single ingredients (meat or poultry) had the lowest rates of P solubility in both media. The inorganic feed phosphates showed very high P solubility with only a few exceptions. The P solubility of experimental diets was both measured and calculated from the data of previous measurements of P solubility in single ingredients. In the experimental mixtures, P solubility of the single compounds showed to be additive. The heating of meat and grain led to a decrease of P solubility. Table V below shows total P and solubility of compound feed for pigs and poultry (there were no differences between animal species, age or production groups, for which the feed were intended), and also of compound feed for dogs and cats.

Table V: P solubility in compound feed (Soluble phosphorus in % of total phosphorus)

Type	n	P g/kg DM	1 min Water	90 min water	1 min acid	90 min acid
Farm animal feed	64	7.23±1.80	31±11 ^{ab}	48±13 ^a	51±7 ^a	63±8 ^a
Moist dog food	13	15.27±2.97	38±13 ^a	44±12 ^a	47±6 ^a	62±11 ^a
Dry dog food	8	11.07±2.93	14±7 ^b	20±8 ^b	46±10 ^a	77±8 ^b
Moist cat food	25	15.52±3.99	33±13 ^a	35±13 ^a	49±11 ^a	72±11 ^b

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different (one way ANOVA, post hoc test, Holm-Sidak-test, $p < 0.05$, calculated in Sigma Plot 12.5)

Summary

The method used in the present work can be used to differentiate between P sources with very low and very high solubility. The absorption of the former is expected to be below average. This aspect is mainly important for farm animals in which, despite sufficient P-supply, an insufficient availability is suspected. In dogs and cats, an excess of high soluble phosphates has been shown to cause postprandial hyperphosphataemia and phosphaturia. This may present a risk for renal health. The evaluation of highly soluble phosphates is, in view of these aspects, of importance for animal nutrition.

8. Literaturverzeichnis

Alexander, J., Stockman, J., Atwal, J., Butterwick, R., Colyer, A., Elliott, D., Gilham, M., Morris, P., Staunton, R., Renfrew, H. & Elliott, J. (2019). Effects of the long-term feeding of diets enriched with inorganic phosphorus on the adult feline kidney and phosphorus metabolism. *British Journal of Nutrition*, 121(3), 249-269.

Anonymous. Katzenfutter test 09/2008, 58–64. Publisher Stiftung Warentest, Berlin.

Anonymous. Katzenfutter test 03/2014, 80–85. Publisher Stiftung Warentest, Berlin.

Block, G. A., Wheeler, D. C., Persky, M. S., Kestenbaum, B., Ketteler, M., Spiegel, D. M., Allison, M.A., Asplin, J., Smits, G., Hoofnagle, A.N., & Kooienga, L. (2012). Effects of phosphate binders in moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(8), 1407-1415.

Böswald, L. F., Kienzle, E., & Dobenecker, B. (2018). Observation about phosphorus and protein supply in cats and dogs prior to the diagnosis of chronic kidney disease. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102, 31-36.

Calvo, M. S., & Uribarri, J. (2013). Contributions to total phosphorus intake: all sources considered. *Seminars in Dialysis*, 26(1), 54-61. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Coltherd, J. C., Staunton, R., Colyer, A., Thomas, G., Gilham, M., Logan, D. W., Butterwick, R. & Watson, P. (2018). Not all forms of dietary phosphorus are equal: an evaluation of

Literaturverzeichnis

postprandial phosphorus concentrations in the plasma of the cat. *British Journal of Nutrition*, 1-42.

De Groote, G., & Huyghebaert, G. (1997). The bio-availability of phosphorus from feed phosphates for broilers as influenced by bio-assay method, dietary Ca-level and feed form. *Animal Feed Science and Technology*, 69(4), 329-340.

Dobenecker, B., Hertel-Böhnke, P., Webel, A., & Kienzle, E. (2018a). Renal phosphorus excretion in adult healthy cats after the intake of high phosphorus diets with either calcium monophosphate or sodium monophosphate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(6), 1759-1765.

Dobenecker, B., Webel, A., Reese, S., & Kienzle, E. (2018b). Effect of a high phosphorus diet on indicators of renal health in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(4), 339-343.

Fountos, G., Tzaphlidou, M., Kounadi, E., & Glaros, D. (1999). In vivo measurement of radius calcium/phosphorus ratio by X-ray absorptiometry. *Applied Radiation and Isotopes*, 51(3), 273-278.

Gericke, S., & Kurmies, B. (1952). Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-vanadat-molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 59, 235-247.

Gillis, M. B., Norris, L. C., & Heuser, G. F. (1948). The utilization by the chick of phosphorus from different sources. *The Journal of Nutrition*, 35(2), 195-207.

Literaturverzeichnis

Grimbergen, A. H. M., Cornelissen, J. P., & Stappers, H. P. (1985). The relative availability of phosphorus in inorganic feed phosphates for young turkeys and pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 13(1-2), 117-130.

Herbst, S., & Dobenecker, B. (2018). Effects of phosphorus addition from organic and inorganic sources on kinetics of selected blood parameters in dogs. *Proceedings of the 22th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition*, 68.

Hoff-Jørgensen, E. (1946). The influence of phytic acid on the absorption of calcium and phosphorus: 1. In dogs. *Biochemical Journal*, 40(2), 189-192.

Humer, E., Schwarz, C., & Schedle, K. (2015). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(4), 605–625.

Huyghebaert, G., De Groote, G., & Keppens, L. (1980). The relative biological availability of phosphorus in feed phosphates for broilers. *Annales de Zootechnie*, 29(3), 245-263.

ILO-ICSC: International Chemical Safety Cards (ICSC):
http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0983

IRIS (2017) Treatment Recommendations for CKD: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/recommendations.html>

Jamroz, D., Gajda-Janiak, A., Wzorek, Z., & Kowalski, Z. (2010). Physico-chemical evaluation of feed phosphates as a criterion of their classification. *Krmiva: Časopis o Hranidbi Životinja, Proizvodnji i Tehnologiji Krme*, 52(6), 299-315.

Literaturverzeichnis

Kamphues, J., Rodehutschord, M., Schenkel, H., Susenbeth, A., Staudacher, W., & Windisch, W. (2017). Stellungnahme zur Unerlässlichkeit von Tierversuchen und zur Eignung von Ersatzmethoden in der Tierernährungsforschung. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 71, 219-224.

Kitson, R. E., & Mellon, M. G. (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.

Kober, P. A., & Egerer, G. (1915). Nephelometric estimation of phosphorus. *Journal of the American Chemical Society*, 37(10), 2373-2381.

Kogan, V. B., Fridman, V. M., & Kafarov, V. V. (1961). Spravochnik po rastvorimosti (Handbook of Solubility), Moscow: Akad. Nauk SSSR, 1-1, 161.

Larsen, J. A., Parks, E. M., Heinze, C. R., & Fascetti, A. J. (2012). Evaluation of recipes for home-prepared diets for dogs and cats with chronic kidney disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(5), 532-538.

Lepper, W. (1931). Zur Phosphorsäurebestimmung in organischen Substanzen insbesondere in Futtermitteln. *Landwirtschaftliche Versuchsstation 111*, 157-161.

Létourneau-Montminy, M. P., Narcy, A., Lescoat, P., Magnin, M., Bernier, J. F., Sauvant, D., Jondreville, C & Pomar, C. (2011). Modeling the fate of dietary phosphorus in the digestive tract of growing pigs. *Journal of Animal Science*, 89(11), 3596-3611.

Literaturverzeichnis

Lide, D.R. (1991). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 72nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 4-49.

Lide, D. R. (2005). CRC Handbook of Chemistry and Physics: a Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data, 4-55; 4-79; 4-86; 4-88.

Lineva, A., Kienzle, E., & Dobenecker, B. (2017). Investigations on dietary phosphorus solubility in water and acid medium from foods and mineral sources used for dog and cat nutrition. *Proceedings of 21. ESVCN Congress, Cirencester, UK*, 107.

Lorenz, von (1926) in Abderhalden, E. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* (Vol. 4, No. 7). Urban & Schwarzenberg. XI, Teil 3, 3e.

Lulich, J. P., Osborne, C. A., O'brien, T. D., & Polzin, D. J. (1992). Feline renal failure: questions, answers, questions. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*.

Misson, G. (1908). Kolorimetrische Phosphorbestimmung im Stahl. *Chemiker-Zeitung*, 32, 633.

National Research Council (NRC). (2006). *Nutrient requirements of dogs and cats*. National Academies Press, 357-364.

Nelson, T. S. (1967). The utilization of phytate phosphorus by poultry – A review. *Poultry Science*, 46(4), 862-871.

Parlament, E. (2009). Rat (2009): Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates in der Fassung von 21. Oktober mit Hygienevorschriften für nicht

Literaturverzeichnis

für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte). *Amtsblatt der Europäischen Union L 300/1 vom 14.11.*

Pastoor, F. J. H., van'T Klooster, A. T., Mathot, J. N. J. J., & Beynen, A. C. (1995). Increasing phosphorus intake reduces urinary concentrations of magnesium and calcium in adult ovariectomized cats fed purified diets. *The Journal of Nutrition*, 125(5), 1334-1341.

Pouget, I., & Chouchak, D. (1911). Dosage colorimétrique de l'acide phosphorique. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 4, 104.

Robertson, J. L. (1986). Spontaneous renal disease in dogs. *Toxicologic Pathology*, 14(1), 101-108.

Sheikh, M. S., Maguire, J. A., Emmett, M., Santa Ana, C. A., Nicar, M. J., Schiller, L. R., & Fordtran, J. S. (1989). Reduction of dietary phosphorus absorption by phosphorus binders. A theoretical, in vitro, and in vivo study. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(1), 66-73.

Siedler, S., & Dobenecker, B. (2015). Effect of different P sources in high phosphorus diets with balanced Ca/P ratio on serum PTH, P and calcium levels as well as apparent digestibility of these minerals in dogs. *Proceedings of the 19th ESVCN Congress*, 128.

Siedler, S., & Dobenecker, B. (2016). The source of phosphorus influences serum PTH, apparent digestibility and blood levels of calcium and phosphorus in dogs fed high phosphorus diets with balanced Ca/P ratio. *Proceedings of Waltham International Nutritional Sciences Symposium, USA*, 21.

Literaturverzeichnis

Speller, R., Pani, S., Tzaphlidou, M., & Horrocks, J. (2005). MicroCT analysis of calcium/phosphorus ratio maps at different bone sites. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 548(1-2), 269-273.

VDLUFA II (2014). *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band II. Die Untersuchung von Düngemitteln*, 4.1.1.1. – 4.4. Darmstadt, Germany: VDLUFA-Verlag.

VDLUFA III (2012). *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln*, 10.6.1 – 10.6.5. Darmstadt, Germany: VDLUFA-Verlag.

Danksagung

9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für ihre freundliche Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ich bedanke mich für ihre begeisterte Unterstützung bei der Datenanalyse, für ihre Leitung beim wissenschaftlichen Schreiben und für unsere wissenschaftlichen Publikationen, die für mich die ersten geworden sind. Über diese Dissertation hinaus bedanke ich mich bei Ihnen für die Möglichkeit, auch in Rahmen Ihrer Betreuung meines ECVCN Residency Programms, so viel während dieser Jahre gelernt zu haben.

Herrn Prof. Dr. Josef Kamphues danke ich für die inspirierende Zusammenarbeit an der Publikation und für meine erste Weiterbildung in der Tierernährung, die mir den beruflichen Weg zeigte.

Frau Dr. Britta Dobenecker danke ich für die Überlassung dieses Themas sowie für die Unterstützung bei Komplikationen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. Linda Franziska Böswald bin ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit sehr herzlich dankbar, danke auch für Dein Vorbild während der Zusammenarbeit und Lernzeit.

Herrn Christian Overdiek bin ich für seine freundliche Unterstützung der Laborarbeit sehr dankbar und auch dafür, was ich im Labor während der ersten 2 Jahre dieser Arbeit praktisch gelernt und geübt habe. Allen Laborkollegen und Kolleginnen danke ich für Eure Hilfe und Euren Rat.

Allen Kollegen und Kolleginnen des Lehrstuhls danke ich dafür, dass ich immer im sehr freundlichen kollegialen Kreis arbeiten durfte und mit Euch keine Sprachen- oder Kulturunterschiede fühlte.

Ich möchte mich nicht zuletzt bei dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für das Stipendium für das erste Jahr meines Studiums bedanken.

Meinem Mann danke ich ganz herzlich für seine vielseitige Unterstützung dieser Arbeit und dafür, dass es trotz allen Schwierigkeiten letztendlich möglich war.