

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie DFA

Abschlussbericht zum Forschungsauftrag 04HS037:
**„Folsäurequantifizierung in Nahrungsmittelrohstoffen und
Lebensmitteln mit konstanten Rezepturen“**

(Berichtszeitraum: 01.06.2005 - 31.05.2006)

verlängerte Abgabefrist 31.07.2006

Inhalt:

	S.	
1	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	1
1.1	Planung und Ablauf	4
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand der Technik	6
2	Material und Methoden	8
3	Ergebnisse	12
3.1	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	12
3.1.1	Methodenoptimierung der SIVA für Getreide und Hülsenfrüchte	12
3.1.2	Ergebnisse der Folatquantifizierung	14
3.1.2.1	Lebensmittelgruppe Hülsenfrüchte	14
3.1.2.2	Lebensmittelgruppe Getreide	15
3.1.2.3	Lebensmittelgruppe Früchten und Gemüse	17
3.1.2.4	Lebensmittelgruppe Milch	20
3.1.2.5	Lebensmittelgruppe Fleisch, Fisch	21
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	22
4	Zusammenfassung	24
5	Gegenüberstellung geplante - tatsächlich erreichte Ziele	25
6	Literaturverzeichnis	26
7	Anlagen	30

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Einführung: Eine ausreichende Versorgung von Folsäure in der humanen Ernährung ist, neben seiner Vitaminwirksamkeit, in der Prävention von speziellen Geburtsfehlern, den Neuralrohrerkrankungen, essentiell. Daneben wird ein erhöhtes Risiko für bestimmte Krebs- und kardiovaskuläre Erkrankungen durch eine suboptimale Folsäureversorgung diskutiert. Die für Folat ermittelten Verzehrsempfehlungen von 400 µg/d ((1) DGE 2000) werden nach der Auswertung nationaler Verzehrstudien nur zu ca. 50 % erreicht (2).

Die Folsäuredaten der Nährwerttabellen basieren größtenteils auf mikrobiologischen Assays sowie auf neueren flüssigchromatographischen Methoden, welche, wie unter 3. beschrieben, noch deutliche Probleme in der Selektivität der Bestimmung der einzelnen Derivate sowie durch Verluste der empfindlichen Folate bei der Probenaufarbeitung zeigen.

Eine neu entwickelte, sehr empfindliche Methode (Stabilisotopenverdünnungsanalyse; SIVA) beruht auf dem Einsatz von Stabilisotopomeren der Vitamere Folsäure, Tetrahydrofolat, 5-Formyltetrahydrofolat, 5-Methyltetrahydrofolat, und 10-Formylfolat als interne Standards bei HPLC-Trennung und Detektion durch ESI-Tandem-Massenspektrometrie (3,4,5), wodurch eine sehr selektive und empfindliche Analyse der Folatvitamere erzielt wird. Die Verluste der Analyten werden dabei, im Gegensatz zu den herkömmlichen Methoden, durch die Verwendung der internen Standards ideal kompensiert. Es ist naheliegend, dass diese spezifischere Untersuchung des Folatgehalts im Vergleich zu Studien, basierend z. B. auf mikrobiologischen Assays, wie sie zum größten Teil noch für die Daten der verschiedenen nationalen Nährwerttabellen zugrunde liegen, z.T. sehr abweichende Ergebnisse erzielt (vgl. Tab.1.1). Die Analyse erster ausgewählter Lebensmittel hat gezeigt, dass die Folatgehalte z.T. signifikant niedriger als die durch mikrobiologische Methoden bzw. HPLC mit Fluoreszenzdetektion ermittelten Literaturdaten liegen.

Berechnet man exemplarisch die tägliche Aufnahme von Folaten durch die Nahrung, basierend auf quantitativen Daten ermittelt durch SIVA und vergleicht mit den herkömmlichen ermittelten Werten Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) (6), so findet man eine um mehr als 20 % geringere Folataufnahme (7), Tabelle 1.2.

Tabelle 1.1: Gesamtfolatkonzentrationen in Gemüse gemessen mittels verschiedener Analysemethoden [$\mu\text{g}/100\text{ g}$ Frischgewicht] aus unterschiedlichen Literaturquellen

	SIVA ^{a)}	HPLC-FD ^{b)}	Mikrobiologischer Assay
Karotte	12,6 - 15,7	16	14 - 28
Spinat	96,1 - 159	100	150 - 338
Brokkoli	27,2 – 41,9	114	71; 90 - 102

a) Stabilisotopenverdünnungsanalyse b) Hochdruckflüssigchromatographie mit Fluoreszenz-Detektion

Tabelle 1.2: Mittlere tägliche Folataufnahme durch ausgewählte Lebensmittel, berechnet auf Basis der mittels SIVA analysierten Folatkonzentrationen im Vergleich zu jenen berechnet auf Grundlage der BLS-Datenbank (BGVV,1999) Lit. (6): Die Verzehrdaten stammen aus der bayerischen Verzehrerhebung 1995.

Lebensmittel	Mittlerer tägl. Verzehr [g]	Gesamtfolat FC _{BLS} [$\mu\text{g}/100\text{g}$] Lit.-Werte	Gesamtfolat FC _{SIVA} [$\mu\text{g}/100\text{g}$] SIVA	Tägl. Aufnahme DI _{BLS} [μg] Lit.-Werte	Tägl. Aufnahme DI _{SIVA} [μg] SIVA	Δ [μg]
Spinat, frisch gekocht	0.5	78	92.4	0.36	0.43	+ 0.07
Spinat, gefroren gekocht	2.8	35	33	0.97	0.92	-0.05
Broccoli, frisch gekocht	1.5	48	18	0.73	0.27	-0.46
Karotten, frisch	2.9	12	14.2	0.35	0.42	+0.07
Karotten, frisch gekocht	6.5	6	7.1	0.39	0.46	+0.07
Orangen, frisch	5.7	24	15.1	1.4	0.9	-0.5
Orangensaft aus Konzentrat	36.7	15	16.4	5.5	6.0	+0.5
Weißbrot	72.7	17	19.8	12.4	14.4	+2.0
Vollkornbrot	44.2	36	10.5	15.9	4.6	-11.3
Reis, weiß, gekocht	5.7	4	4.6	0.2	0.3	+0.1
Rindfleisch, gekocht	10.4	3	1.2	0.31	0.12	-0.19
Kalbsleber, gekocht	0.06	247	550	0.14	0.32	+0.18
Summe				38,65	29,14	-9.51

Fazit: In der aktuellen Diskussion um die Supplementierung von Lebensmitteln (8) mit Folsäure und zur Lieferung eines präziseren Instrumentes zur Berechnung der Folsäureaufnahme in den nationalen Verzehrerhebungen durch die Nährwerttabellen Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) und Souci-Fachmann-Kraut (SFK), sind die Messung, bzw. Überprüfung der existierenden Daten, insbesondere der Grundnahrungsmittel, über SIVA notwendig.

Ziel dieses Untersuchungsprojektes war daher die Quantifizierung der wichtigsten o.g. Folsäurederivate in ausgewählten Lebensmittelrohstoffen und Lebensmitteln mit konstanten Rezepturen (wie z.B. Brot und Käse), welche durch die durchschnittlich verzehrten Mengen bzw. auch durch entsprechend hohe Folatgehalte in signifikantem Maße zur Folsäureversorgung der Bevölkerung beitragen.

Damit sollte eine neue Datenbasis für die Datenbanken BLS bzw. SFK als Berechnungsgrundlage für eine zukünftig präzisere Auswertung der nationalen Verzehrerhebungen geschaffen werden, um so eine zuverlässigere Datenlage bezüglich der Folsäureversorgung der Bevölkerung zu erhalten.

Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele

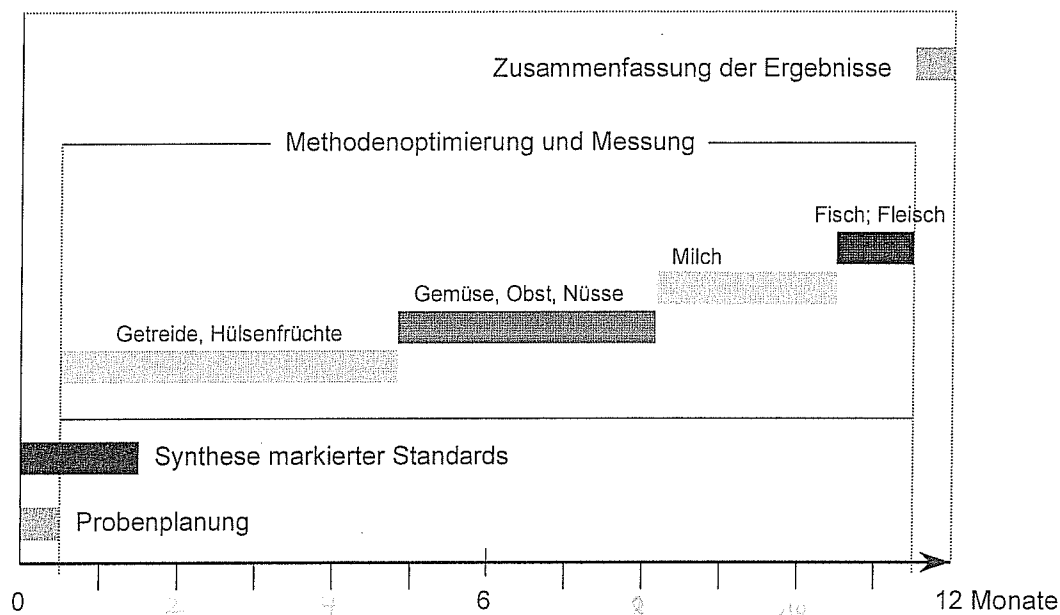
Basierend auf der bereits erfolgreich abgeschlossenen Methodenentwicklung im Rahmen einer Dissertation (5) und nachfolgende exemplarische Messungen einzelner Lebensmittel der verschiedenen Lebensmittelgruppen (9) ist das technische Arbeitsziel dieses Projektes die Methodenoptimierung für einzelne Lebensmittelmatrices, in der Probenaufarbeitung besonders im Bereich geringer Folsäurekonzentrationen und komplexer Lebensmittelmatrices entsprechende Modifizierungen der Analysenmethode notwendig sind, um zuverlässige und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten.

Aus wissenschaftlicher Sicht ist die Ermittlung von repräsentativen quantitativen Daten der einzelnen Folsäurederivate in Lebensmittelrohstoffen durch die Untersuchung einer Mindestzahl an Proben unter Berücksichtigung der internen und externen beeinflussenden Faktoren (z.B. der pflanzlichen Varietäten, jahreszeitlichen Einfluss etc.) das Ziel des vorliegenden Untersuchungsprojektes.

1.1 Planung und Ablauf

Abbildung 1.1 zeigt die zeitliche Verteilung der einzelnen Arbeitsschritte des Projekts: Probenplanung, Synthese markierter Verbindungen, quantitative Folatbestimmungen in Lebensmitteln der einzelnen Gruppen sowie die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Abb. 1.1: Zeitlicher Ablauf des Projekts



Die Auswahl der Lebensmittel sollte sich einerseits nach der durchschnittlichen, möglichst hohen Verzehrsmenge sowie der (zu erwartenden) Konzentration richten, so dass, da nicht alle Lebensmittelrohstoffe in diesem Projekt analytisch abgedeckt werden konnten, ein möglichst großer Teil der signifikant zur Folatversorgung der Bevölkerung beitragenden Lebensmittelrohstoffe untersucht werden konnten. Als Entscheidungshilfe dienten einerseits verfügbare Daten aus möglichst aktuellen nationalen Verzehrsstudien (z.B. die Bayerische Verzehrsstudie 1995) sowie andererseits zugängliches statistisches Datenmaterial zum Lebensmittelverbrauch in Deutschland.

Die genaue Auswahl der Lebensmittel sollte mit der Erstellung des Probenplans zu Beginn des Projektes erfolgen. Schwerpunkte liegen im Bereich Getreide mit einer größeren Auswahl verschiedenster Brote, als Lebensmittel mit konstanten Rezepturen sowie auch im Bereich der Milchprodukte, wie z. B. Joghurt und Käse. Folgende Schwerpunkte waren geplant:

Getreide u. Hülsenfrüchte: Rohstoff Getreidekorn, eine begrenzte Anzahl an Getreidemehlen, eine größere Anzahl von Brotsorten bzw. Gebäck; trockene Samen der gängigen Hülsenfrüchte sowie frische Hülsenfrüchte

Gemüse, Obst und Nüsse: gängige Gemüsesorten wie z.B. Tomaten, Kartoffeln, Karotten, Kohllarten, Obstsorten z.B. Äpfel, Bananen, Weinbeeren und Nüsse

Milch: verzehrfertige Frisch- und H-Milchsorten, die gängigsten Milchprodukte wie u.a. Joghurt, Speisequark, verschiedene Käsesorten, Ei roh, gekocht

Fleisch und Fisch: da die tierischen Lebensmittelrohstoffe der Gruppen Fleisch und Fisch bis auf die Innereien relativ niedrige Folatkonzentrationen aufweisen und daher keinen nennenswerten Beitrag zur Gesamtfolsäureversorgung haben, war für diese nur ein Analysenzeitraum von einem Monat vorgesehen, in dem die meist verzehrten Lebensmittel dieser Gruppe untersucht werden sollten.

Insgesamt war für einen Zeitraum von einem Jahr, abzüglich der einkalkulierten Zeit für die Probenplanung, Synthesen der markierten Standards der Zusammenstellung der Ergebnisse am Ende der Projektlaufzeit sowie der Methodenanpassung für alle 5 Lebensmittelgruppen von ca. 2-3 Wochen pro Gruppe, eine verbleibende reine Analysenzeit von ca. 40 Wochen vorgesehen. Bei einer durchschnittlichen Untersuchung von 10 Proben pro Woche (in Doppelbestimmung) war mit ca. 400 Proben im Rahmen des Projektes zu rechnen.

Folgende Einflüsse sollten bei der Erstellung des Probenahmeplans berücksichtigt werden: Einerseits der Sorteneinfluss sowie andererseits die saisonalen Schwankungen, welche sich aus dem jahreszeitlichen Klimaeinfluss, Erntezeitpunkt und auch Herkunft der jeweiligen Lebensmittel (u.a. Import) ergeben. Die saisonalen Schwankungen sollten dabei durch eine zeitlich periodische Probenahme zu allen vier Jahreszeiten und eine direkte Probenahme am Markt, so wie er für den Verbraucher zur Verfügung steht (z.B. Milch- u. Produkte aus dem Supermarkt, Gemüse und Obstproben aus dem Großmarkt unter Dokumentation von Sorte und Herkunft), berücksichtigt werden. Der Sorteneinfluss sollte durch die Untersuchung von ca. 3 Varietäten erfolgen unter weiterer Berücksichtigung des Verzehrsanteils und der saisonalen Schwankungen des Angebots. Bei einer Analyse von 3 Varietäten zu allen vier Jahreszeiten würde sich daraus eine Probenzahl von 12 Proben pro Gemüse bzw. Obstsorte ergeben. Bei den Lebensmitteln mit konstanten Rezepturen, speziell Brotsorten und Milchprodukten kann der Einfluss durch die Zutaten (z.B. Brot Hefeeinfluss) größer sein, als der saisonale Einfluss oder der

durch die Varietät verursachten Schwankungen. Hierbei sollte der Schwerpunkt auf die Probenvielfalt gelegt werden, gegebenenfalls durch die Analyse von Produkten verschiedener Hersteller. Die Tabelle 5.1^{5.44} stellt die geplanten und tatsächlich durchgeführten Analysen im Rahmen dieses Projektes gegenüber.

Für die Methodenanpassung an die jeweiligen Matrices der verschiedenen Lebensmittelgruppen ist jeweils ein Zeitraum von 2-3 Wochen vorgesehen. Hier stellte insbesondere die komplexe Matrix aus Stärke und Ballaststoffen bei Vollkorngetreide und Hülsenfrüchten eine Herausforderung an die Analytik dar.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Entwicklung der Fولاتanalytik:

Bisher angewandte analytische Methoden für die quantitative Bestimmung von Folsäure bzw. deren Derivaten, verwendet als Datenbasis für Nährwerttabellen, beruhen hauptsächlich auf *mikrobiologischen Assays*. Bei dieser durch Matrixbestandteile beeinflussten und schwer zu standardisierenden Methode wird das Wachstum eines folatbedürftigen Mikroorganismus turbidimetrisch gemessen, wobei lediglich die Summe der vorhandenen Folate in der Probe erfasst wird. Meist eingesetzt ist dabei der Mikroorganismus *Lactobacillus casei*, welcher annähernd gleichmäßig auf Mono- bis Triglutamate anspricht, jedoch bei höherer Kettenlänge ein signifikant niedrigeres Wachstum aufweist. Ein äquimolarer Response auf verschiedene Folate ist nur bei einem ausreichenden Abbau der in den Lebensmittelproben vorliegenden Folate gegeben. Trotz fortlaufender Verbesserungen in der Standardisierung der Methode zeigte sich immer wieder eine mangelnde Vergleichbarkeit im Rahmen von Vergleichsstudien (10).

Mit der Entdeckung der spezifisch folatbindenden Proteine (FBP) wurden *kompetitive Bindungsassays* entwickelt, welche in der klinischen Diagnostik breiten Einsatz fanden. Zunächst verwendete man radioisotopenmarkierte Standards, später wurden Enzymproteinbindungsassays entwickelt, wobei durch die Messung der enzymatischen Aktivität auf den Einsatz der radioisotopenmarkierten Standards verzichtet werden konnte. Studien zum Einsatz dieser Methoden in der Lebensmittelanalytik zeigten jedoch, dass aufgrund des unterschiedlichen Responses der natürlichen Folate keine zuverlässigen Analyseergebnisse erzielt werden konnten (10).

Die Entwicklung *flüssigchromatographischer Methoden* eröffnete die Möglichkeit der selektiven Quantifizierung einzelner Mono- bzw. Polyglutamate. Voraussetzung bei der Probenaufarbeitung dabei ist der vollständige Abbau der vorliegenden Polyglutamate im Probenextrakt mittels des Enzyms Dekonjugase, um einheitliche und auswertbare Chromatogramme zu erhalten. Diese Behandlung der Proben erfordert einen anschließenden Aufreinigungsschritt mittels Festphasenchromatographie, bzw. Affinitätschromatographie mit selektiv folatbindenden Proteinen. Die sich anschließende Flüssigchromatographie erfolgt via Ionenaustauscher- oder RP-Chromatographie in Verbindung mit einer UV-, Diodenarray- bzw. der am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzdetektion. Diese macht sich die Eigenfluoreszenz der Folate im sauren Medium zu Nutze. Meist wird auch eine Nachsäulenderivatisierung unter Entstehung von Pterinen mit Hypochlorit eingesetzt, da Folsäure keine native Fluoreszenz zeigt. Schwierigkeiten bereiten jedoch Verluste des Analyten bei der Probenaufarbeitung und eine nicht ausreichende Selektivität der Methode, eine sorgfältige Peakidentifizierung und -verifizierung wird hierbei als unbedingt notwendig erachtet (11,12). Die Verwendung von internen Standards in der HPLC-Analytik gestaltete sich aufgrund des unterschiedlichen Responses und Aufarbeitungsverluste der in Frage kommenden Derivate als schwierig. Erst mit der Einführung der chromatographischen Trennverfahren in Kopplung mit der massenspektrometrischen Detektion wurde die Durchführung von *Stabilisotopenverdünnungsanalysen* ermöglicht, bei welchen der jeweilige Analyt mit einem analogen, stabil-isotopenmarkierten internen Standard quantifiziert wird. Die Isotopenmarkierung besteht in der Regel aus ^{13}C oder ^2H -Atomen. Diese Technik nutzt das, bis auf einen geringen Isotopeneffekt chemisch und physikalisch nahezu identische Verhalten der jeweiligen Isotopomere (13), wobei die Verluste während der Probenaufarbeitung vollständig kompensiert werden. Aufgrund der fehlenden Flüchtigkeit der Folate ist bei der Anwendung der *Gaschromatographie-Massenspektrometrie* eine Derivatisierung des Analyten notwendig, mit der Folge, dass durch diesen Schritt eine selektive Bestimmung der einzelnen Folatvitamere nicht möglich ist (14,15).

Aktueller Stand der Folatanalytik:

Die erste relativ ausgereifte *flüssigchromatographische Methode* zur Quantifizierung von Folsäure in angereicherten Lebensmitteln mit Hilfe von [$^{13}\text{C}_5$]-markierter Folsäure als internem Standard wurde von der Arbeitsgruppe um Palowsky 2001 (16)

vorgestellt. Dabei wurden Analyt und Standard aus der Probe extrahiert, mit Hilfe von Festphasenextraktion aufgereinigt, über HPLC aufgetrennt und mittels ESI-MS detektiert. Weiterhin publizierten letztgenannte Autoren eine Methode zur Bestimmung von 5-Methyltetrahydrofolat in Blutserum unter Verwendung von [$^{13}\text{C}_5$]-5-Methyltetrahydrofolat, wobei die Ionisierung hierbei im ESI⁺ Modus stattfand (17). Mit diesen Methoden wurden beide Verbindungen in verschiedenen Zitrusfrüchten quantifiziert (18). Eine weitere Studie umfasste die Quantifizierung von Folsäure mittels [$^{13}\text{C}_5$] - Folsäure in angereichertem Brot (19).

Die Arbeitsgruppe um Finglas et al. führte intensive kinetische Studien zum humanen Metabolismus, Bioverfügbarkeit und der Absorption verschiedener Folsäurederivate durch (20). Es erfolgten Stabilisotopenverdünnungsanalysen in Blutplasma und Urin mittels ^{13}C -markierter Folsäure sowie 5-Methyltetrahydrofolsäure. Nach der Extraktion der Proben schlossen sich Affinitätschromatographie an folatbindenden Proteinen sowie LC-MS/MS-Messungen an. Eine weitere Arbeitsgruppe um Pfeiffer et al. entwickelte ebenfalls eine validierte Methode zur Bestimmung von Folsäure, 5-Methyltetrahydrofolsäure sowie 5-Formyltetrahydrofolsäure mit Hilfe der entsprechenden ^{13}C -markierten Verbindungen für kinetische Untersuchungen in Urin und Plasma (21). Die Stabilisotopenverdünnungsanalysen wurden nach Extraktion und Festphasenextraktion ebenfalls mittels LC-MS/MS gemessen.

Die Bestimmung der Vitamere Folsäure, Tetrahydrofolat, 5-Formyltetrahydrofolat, 5-Methyltetrahydrofolat, und 10-Formylfolat in verschiedenen Lebensmittelmatrices mit Hilfe von Stabilisotopen als internen Standards, HPLC-Trennung und einer Detektion durch ESI-Tandem-Massenspektrometrie erfolgte durch Freisleben 2002 (5), wobei es erstmalig gelang, alle 5 Vitamere selektiv in komplexen Lebensmittelmatrices zuverlässig zu quantifizieren.

2 Material und Methoden

Material:

Die Proben (jeweils 1 kg) wurden in Lebensmittelgeschäften und Obst- und Gemüsemärkten in München gekauft, Sorte und Herkunft der Proben dokumentiert und umgehend für die Folatanalyse aufgearbeitet.

Methodenbeschreibung (3-5):

a) Probenaufarbeitung Lebensmittelgruppen Gemüse und Früchte, Milch und Milchprodukte, Eier, Fleisch und Fisch:

Um die Homogenität des Probenmaterials auch bei einer zu erwartenden inhomogenen Verteilung des Folats, wie z. B. bei Brokkoli, zu gewährleisten, werden relativ große Probenmengen zunächst grob zerkleinert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Mullnetze vermahlen. Direkt nach der Einwaage von je ca. 1-3 g Probenmaterial in Sovirellgläser, werden die Proben mit je 10-15 mL Wilson-Horne-Puffer (pH 7,85; 2% Ascorbinsäure; 0,2 M Mercaptoethanol) überschichtet, die markierten internen Standards (ca. das 2 bis 3fache der zu erwartenden Menge an Folat) zugesetzt und die resultierende Probenlösung mit Argon beschichtet. Anschließend erfolgt ein 10 minütiger Erhitzungsschritt im siedenden Wasserbad und eine anschließende sofortige Abkühlung im Eisbad von ca. 2 min. Mit einer Temperatur von ca. 30-35 °C werden proteinreiche Proben mit je 3 mg/g Probe Protease versetzt, mit Argon beschichtet und 5-6 h bei 37 °C inkubiert, anschließend 10 min zwecks Inaktivierung der Protease im siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen mit 100 µL Rattenserum zur Dekonjugation der Folate versetzt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Erhitzungsschritt werden die Proben zentrifugiert, die Überstände membranfiltriert und anschließend via Festphasenextraktion (SPE) oder Affinitätschromatographie (AC) für die sich anschließende Chromatographie aufgereinigt.

Stärkehaltige Proben werden vor dem Proteinabbau zusätzlich einer Inkubation mit Amylase unterworfen (2h bei 37 °C) (vgl. auch Abb. 2.1a). Die Festphasenextraktion (SPE) erfolgt unter Verwendung von Bakerbond SAX-Kartuschen (quaternäres Amin N⁺, J.T. Baker). Die für die Affinitätschromatographie benötigten Säulen sind nicht kommerziell erhältlich und werden daher unter Verwendung u.a. von Aktivester-Agarose Affigel-10 und folatbindendem Protein (FBP) selbst hergestellt.

b) Probenaufarbeitung Lebensmittelgruppen Getreide und Hülsenfrüchte (vgl. 3.1.1 (22): (vgl. auch Abb. 2.1 b)

Wie unter a) beschrieben werden die Proben bis zum Inkubationsschritt mit α -Amylase und Protease behandelt und anschließend 10 min auf 100 °C erhitzt. Der pH-Wert der Proben wird auf pH 7 eingestellt, membranfiltriert und über SPE

aufgereinigt sowie erneut auf pH 7 eingestellt. Es wird 100 µL Rattenserum und 2 mL Hühnerpankreas-Lösung zugesetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Um die konjugase Aktivität zu testen wird der Probe vor Dekonjugation 1µg Pteroyltryglutamat zugesetzt. Die Proben werden zentrifugiert und membranfiltriert für die HPLC-MS/MS-Messung eingesetzt.

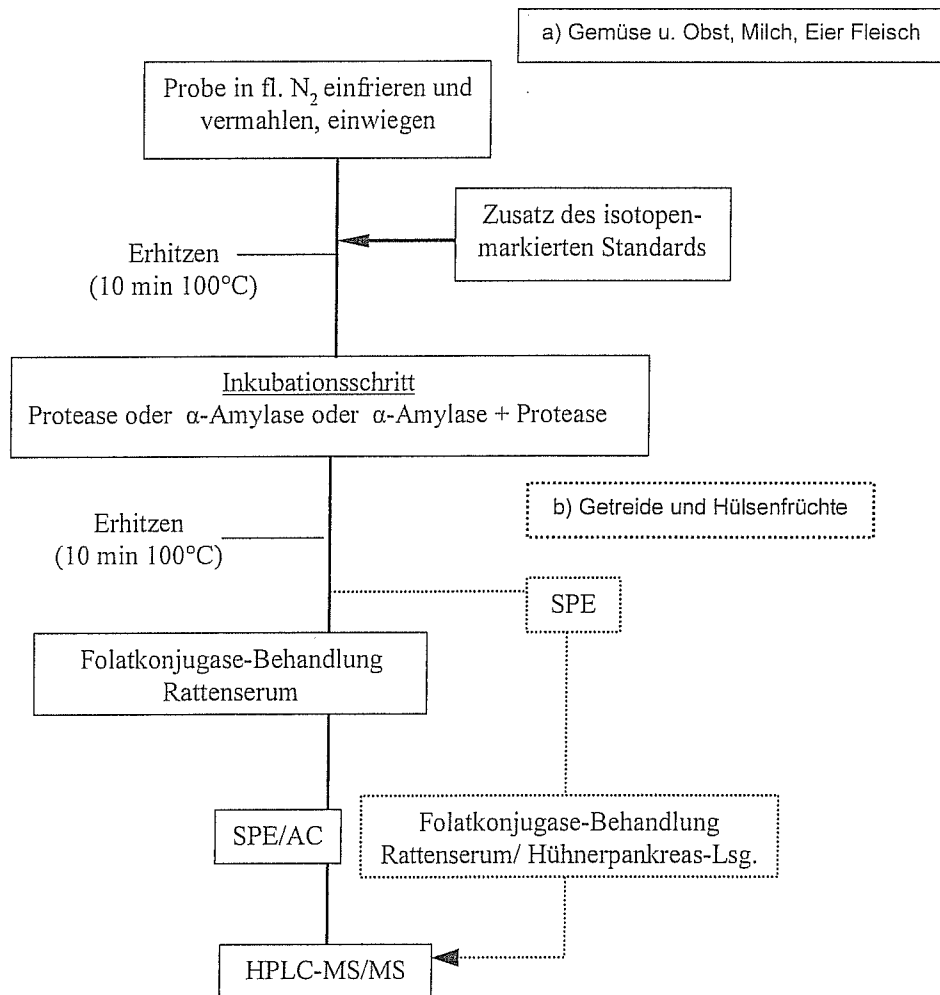


Abb.2.1 Schema zur Probenaufarbeitung Lebensmittelgruppen a) Gemüse und Früchte; Milch und Milchprodukte; Eier Fisch und Fleisch b) Getreide und Hülsenfrüchte

Chromatographische Trennung und Detektion: Die chromatographische Trennung erfolgt an einer Thermo Separations HPLC-Anlage (RP-18 Trennsäule; Fließmittel Ameisensäure 0,1% -Acetonitril, Gradienten Elution). Die Detektion erfolgt an einem TSQ Quantum Classic Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit

wechselbarer API-Quelle Die MS-MS-Messungen werden im ESI⁺ Modus durchgeführt (Abb. 2.2).

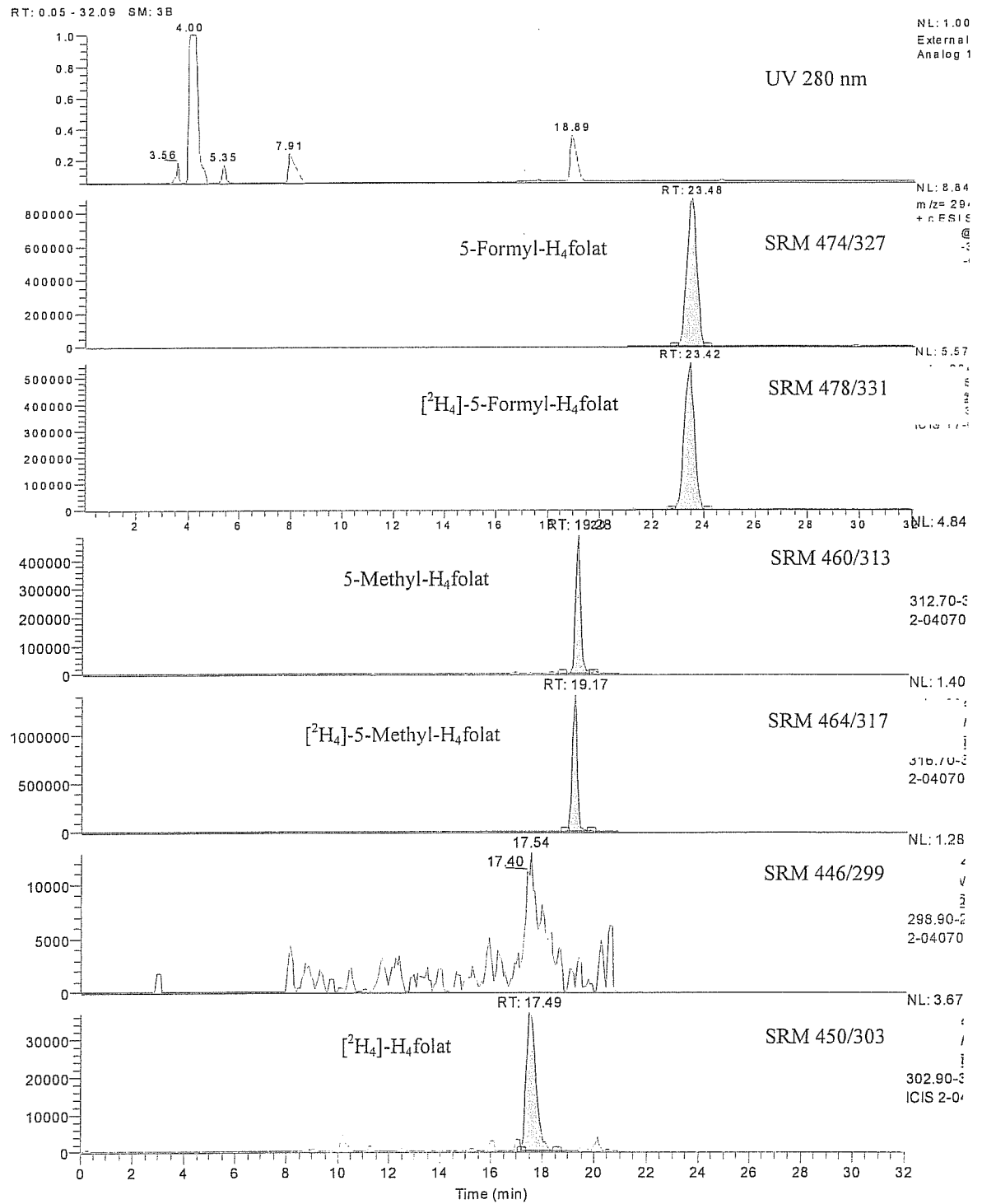


Abb.2.2: LC/MS/MS eines Spinatextraktes im Selected Reaction Monitoring (SRM)-Modus

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Methodenoptimierung der SIVA für Getreide und Hülsenfrüchte

Da zur Folatbestimmung als interne Standards nur die Monoglutamatformen vorliegen, müssen die in Lebensmitteln häufig als Polyglutamate enthaltenen Folatvitamere in die Monoglutamate überführt werden. Dies wurde bisher nach dem im Hause üblichen Verfahren (4) durch den Einsatz einer in Rattenserum enthaltenen Konjugase erreicht. Nachdem eine neue Charge dieses Materials für die Vielzahl der zu erwartenden Bestimmungen besorgt wurde, stellte sich heraus, dass diese weit weniger aktiv war und ein Umsatz von nur 40 % zu erreichen war. Daher wurde eine zusätzliche Folatkonjugase aus Hühnerpankreas der Firma Difco, USA, zum Abbau der Polyglutamate eingesetzt. Da letzteres Enzym Polyglutamate nur zu Diglutamaten abbaut, wirkt es nur in Kombination mit Rattenserum, das den weiteren Abbau der Folate zu Monoglutamaten bewirkt. Mit Zugabe von Rattenserum und Hühnerpankreas-Lösung konnte schließlich in reine Pteroyltriglutamatlösungen eine Konjugaseaktivität zwischen 80 und 96% erzielt werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Umsatzraten von Pteroyltriglutamat zu Folsäure bei verschiedenen Enzymzusätzen

Konjugasebehandlung	Umsatz (%)
nur Rattenserum	42
Rattenserum+1 mL Hühnerpankreas-Lsg.	51
Rattenserum +2 mL Hühnerpankreas-Lsg.	96

Da die Konjugaseaktivität in Lebensmittelextrakten im Vergleich zur denjenigen in reinen Pteroylpolyglutamatlösungen deutlich geringer war und nur zwischen 20 und 45 % lag, waren weitere Modifizierungen der Aufarbeitung nötig. Die Tatsache, dass in reiner Triglutamatlösung und Lebensmittelextrakten unterschiedliche Konjugaseaktivitäten auftreten, legt den Verdacht nahe, dass Konjugaseinhibitoren den vollständigen Polyglutamatumsatz verhindern. Die Existenz dieser Inhibitoren, v.a. in pflanzlichen Lebensmitteln, wurde auch schon von verschiedenen anderen Autoren vermutet.

Da Folate sehr gut durch Anionentauscher gereinigt werden können, wurde mit Hilfe von Ionentausch-Festphasenkartuschen (SPE) versucht, die Inhibitoren aus den

Proben zu eliminieren. Dazu wurde die SPE-Extraktion vor Zugabe der Konjugasen durchgeführt, was schließlich zur gewünschten Umsatzsteigerung (Tab. 3.2) führte. Dabei musste auch darauf geachtet werden, dass die Extrakte auf das pH - Optimum der Konjugasen bei pH 7 eingestellt wurde. Auch in einer Lebensmittelprobe (rote Linse) wurde ein optimaler Polyglutamatumsatz von 102 % erreicht.

Tab. 3.2: Umsatzraten von Pteroyltriglutamat in Linsenextrakt zu Folsäure bei verschiedenen Enzymzusätzen

Konjugasebehandlung	Umsatz (%)
nur Rattenserum	7
Rattenserum + 1 mL Hühnerpankreas-Lsg.	45
Rattenserum + 2 mL Hühnerpankreas-Lsg.	57
nach Entfernung von Konjugaseinhibitoren, ohne pH-Kontrolle	
Rattenserum + 2 mL Hühnerpankreas-Lsg.	102
nach Entfernung von Konjugaseinhibitoren, nach pH-Kontrolle	

Die Notwendigkeit der Umsatzsteigerung wird beim Vergleich der resultierenden Gesamtfolatgehalte von unterschiedlichen Lebensmittelproben deutlich.

Aus Tabelle 3.3 wird am Beispiel verschiedener Hülsenfrüchte ersichtlich, dass mit der neuen Methode, in Verbindung mit einer optimalen Konjugaseaktivität, ein weit höherer Gesamtfolatgehalt ermittelt wird als mit der sehr niedrigen Konjugaseaktivität der ursprünglichen Methode.

Tab.3.3: Vergleich verschiedener Enzymzusätze anhand ausgewählter Hülsenfrüchte

Hülsenfrucht	Enzymzusatz			
	nur Rattenserum		Rattenserum + 2mL Hühnerpankreas-Lsg. nach Entfernung von Konjugaseinhibitoren und pH-Kontrolle	
	Gesamtfolat µg/100g	Konjugase- aktivität	Gesamtfolat µg/100g	Konjugase- aktivität
rote Linse	70	8 %	178	102 %
tiefgekühlte Erbse	50	4 %	146	74 %
tiefgekühlte Bohne	13	7 %	98	92 %

3.1.2 Ergebnisse der Folatquantifizierung

3.1.2.1 Lebensmittelgruppe Hülsenfrüchte

Wie aus der Tabelle 3.4 der Anlage 7.1 ersichtlich, liegen die mittels SIVA ermittelten Gehalte an Gesamtfolat in getrockneten Leguminosensamen zwischen 10 und mehr als 300 µg/ 100g essbarem Anteil. Die höchste Konzentration von 318 µg/100g wurde für Sojabohnen gemessen, gefolgt von Mungbohne und Kichererbse mit knapp 280 µg/ 100g. Die Konzentrationen in der roten Linse (geschält) und der Kidneybohne liegen um 100 µg niedriger. In einem Konzentrationsbereich von 100-150 µg/100g Gesamtfolat liegen weiße-, schwarze Bohnen, Schwarzaugenbohnen sowie grünen Linsen. 50 bis 100µg/100g Gesamtfolat wurden für die Erdnuss und die Riesenbohne verzeichnet. Erbsen zeigten den niedrigsten Gesamtfolatgehalt von 10-20 µg/100g. Der Kochverlust bei den gekochten getrockneten Samen liegt, unter Berücksichtigung der Wasseraufnahme, bei grünen Linsen und weißen Bohnen bei ca. 30 %, bei grünen Erbsen zeigte sich ein Verlust um ca. die Hälfte.

Die Folatgehalte von frischen Erbsen und frischen grünen Bohnen, jeweils ganze Schoten mit Samen analysiert, liegen zwischen 40 und 90 µg/100g, wobei ein entsprechend großer natürlicher Schwankungsbereich bei den gemessenen Bohnenproben zu verzeichnen ist.

Die analysierten Dosenprodukte zeigen infolge des höheren Wassergehaltes im Vergleich zu den trockenen Samen sowie dem Verarbeitungsschritt insgesamt geringere Folatgehalte von 4 (grüne Bohnen) bis 70 µg/100g (Schwarzaugenbohnen). Die frischen gekochten grünen Bohnen (37 µg/100g) zeigen durch den Kochvorgang annähernd keine Folatverluste (Ausgangskonzentration aus demselben Probenmaterial 37µg/100g). Die Werte von frischen Erbsen, getrockneten Samen und dem entsprechenden Dosenprodukt lassen sich nicht vergleichen, da sie nicht aus demselben Ausgangsmaterial hergestellt sind und daher mit relativ großen natürlich auftretenden Schwankungen des Ausgangsmaterials zu rechnen ist.

Für die im Handel erhältlichen Tiefkühlprodukte, meist blanchiert und tiefgefroren, konnten relativ hohe Folatgehalte von 70-100 µg/100 g gemessen werden.

Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten, gemessen mittels HPLC bzw. mikrobiologischen Assays:

Betrachtet man die in der Literatur bisher verfügbaren, vornehmlich mittels mikrobiologischer Assays bestimmten Werte, so zeigen sich insbesondere bei den getrockneten Leguminosensamen signifikante Unterschiede zu den hier durch SIVA

analysierten Daten. Die mikrobiologisch bestimmten Werte (Tab. 3.4 Anlage 7.1, Lit. 24 u. 25) liegen um den Faktor 2 bis 3 (Kichererbse, Linse grün, weiße- und schwarze Bohnen, Kidney- und Mungbohnen), im Falle der Schwarzaugenbohne um den Faktor 4 sowie bei der Erbse um das 14 bis 27fache höher verglichen mit den durch SIVA ermittelten Gehalten. Ausnahme sind die für die Sojabohne vorhandenen Daten (Lit. 24, 25 und 26), die im Größenordnungsbereich der SIVA - Werte liegen. Die mittels herkömmlicher HPLC-Methoden bestimmten Daten (Lit. 23) für frische Erbsen und grüne Bohnen sowie getrocknete Samen von Erbse, grüner Linse und weißer Bohne liegen im Bereich der mittels SIVA gemessenen Daten mit Ausnahme des hohen Wertes für getrocknete Erbsensamen.

Die durch SIVA bestimmten Gesamtfolatgehalte der frischen Leguminosen liegen in einem den natürlichen Einflüssen (Klima, Varietät usw.) entsprechenden großen Schwankungsbereich, wobei die HPLC-Daten (Lit. 23) an der Obergrenze des jeweiligen Schwankungsbereichs liegen. Hier ist zu berücksichtigen, dass aus den Publikationen nicht immer klar zu entnehmen ist, ob nur der grüne Same oder die ganze Schote zur Analyse eingesetzt wurde.

Die in Literatur 24 und 29 zu findenden Folatdaten zu den jeweiligen Dosenprodukten liegen im Größenordnungsbereich der mittels SIVA bestimmten Werte. Im Falle der Tiefkühlprodukte ist zu berücksichtigen, dass die Proben der entsprechenden Literaturwerte zunächst gefroren und anschließend gekocht wurden, während es sich bei unseren Proben um die unverarbeitete Tiefkühlware handelt. Dies würde die signifikant niedrigeren Literaturdaten erklären.

Aus dem Vergleich der im Rahmen dieses Projektes mittels SIVA analysierten Werten mit Literaturdaten zeigt sich einerseits, dass insbesondere die mikrobiologischen Assays im Falle der getrockneten Samen ein Matrixproblem aufzeigen und signifikant erhöhte Konzentrationen ergeben. Die durch herkömmliche HPLC-Methoden ermittelten Werte bewegen sich eher an der Obergrenze der durch SIVA gemessenen Daten. Auch hier sind z.T. methodenbedingte Messungenauigkeiten zu vermuten.

3.1.2.2 Lebensmittelgruppe Getreide

Bei der Untersuchung der Folatgehalte der Lebensmittelgruppe Getreide und Getreideprodukte wurde der Schwerpunkt auf die meist verzehrten Produkte gelegt:

Reis, Brot, Bier und Backwaren bzw. auch Produkte mit hohen Folatgehalten wie z. B. Weizenkeime und Kleie (Tab 3.5 Anlage 7.1).

Folatgehalte und Vergleich mit Literaturdaten:

Getreidekörner: Die in Getreidekörnern analysierten Gesamtfolatgehalte liegen zwischen 16 µg/ 100g (geschälter Reis) bis zu 69 µg/ 100g bei Gerste bzw. 72 µg/ 100g Grünkern. Es findet sich insgesamt in der Größenordnung eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten, insbesondere mit den mikrobiologisch ermittelten Werten, für die meisten Getreidekörner existieren noch keine über HPLC/FD gemessenen Daten. Im Falle des Roggens sind die Literaturwerte deutlich höher, insbesondere der HPLC-Wert (Lit. 23). Auch beim Weizen liegt der HPLC Wert höher als der mittels SIVA analysierte Folatgehalt.

Getreidemehle: Untersucht wurden die zur Herstellung von Brot gängig verwendeten Mehlsorten von Roggen und Weizen. Gefunden wurden Konzentrationen von durchschnittlich 19 bis 37 µg/ 100g. Der Folatgehalt zeigt im Mehl eine Zunahme mit steigendem Ausmahlungsgrad, liegt aber niedriger als der Folatgehalt im unverarbeiteten Korn, erklärbar durch das Fehlen des Getreidekeims, der nicht mitverarbeitet wird und einen sehr hohen Gehalt aufweist (Weizenkeime: 538 µg/ 100g). Zu den Getreidemehlen findet man in der Literatur so gut wie keine Daten.

Getreideprodukte außer Brot:

Zu diesen Produkten zählen wenig verarbeitete Waren wie z.B. Weizenkeime, -kleie und -grieß sowie Haferflocken aber auch extrudierte Ware wie z.B. Nudeln und fermentierte Produkte wie Weizenkeimlinge und Bier. In dieser Gruppe weisen Weizenkeime und auch -kleie und keimlinge mit 538 bzw. 173/172 µg/ 100g den höchsten Gehalt auf, auch Dinkelflocken zeigen einen sehr hohen Gehalt mit 150 µg/ 100g Gesamtfolat. Nudeln, Cornflakes und Bier liegen deutlich niedriger in ihren Folatgehalten. Gekochte Teigwaren zeigten unter Berücksichtigung der Wasseraufnahme beim Kochvorgang keine signifikanten Verluste. Im Vergleich mit den Literaturdaten findet sich z. T. eine recht gute Übereinstimmung, im Falle des Bieres liegen die Werte dieser Untersuchungen bei allen drei Sorten deutlich über den Literaturwerten. Zurückzuführen könnte dies auf die international abweichenden Rezepturen bei der Bierherstellung sein. Auch die Literaturdaten für die Weizenprodukte weichen z.T. erheblich von den gefundenen Daten ab, zeigen jedoch auch zwischen den angewendeten Methoden und den einzelnen

Publikationen große Abweichungen, evtl. zurückzuführen auf Matrixeinflüsse bei der Aufarbeitung.

Brot und Kleingebäck:

In dieser Lebensmitteluntergruppe wurde aufgrund vorliegender Verzehrdaten der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Roggenweizen- und Weizenroggenmischbrote sowie Toastbrot gelegt. Die höchsten Folatgehalte konnten für Knäckebrot mit 89 µg /100g sowie Weizenvollkornbrot mit 58, Weizenvollkorntoast mit 54 und Weizentoastbrot mit 52 µg/ 100g analysiert werden. Es folgen mit etwas geringeren Gehalten Brötchen (Semmeln) mit 33 µg/ 100g sowie beide Arten von Mischbroten mit ca. 30 µg/ 100g sowie Pumpernickel mit 24 µg/ 100g. Für reines Roggenbrot und Roggenvollkornbrot wurden niedrigere Folatgehalte festgestellt. Die Ursache der in den reinen Roggenprodukten niedriger liegenden Werten könnte mit dem fehlenden Hefezusatz bei der Herstellung in Verbindung gebracht werden, die bei Weizenbrot einen signifikanten Eintrag von Folaten in das Endprodukt bewirkt.

Bei einem Vergleich mit Literaturdaten muss berücksichtigt werden, dass für die Brotherstellung im Ausland andere Rezepturen verwendet werden. Dies kann den Folatgehalt im Endprodukt signifikant beeinflussen. Die mittels SIVA gemessenen Werte zu verschiedenen Weizen- und Roggenbrotsorten sowie Brötchen korrelieren gut mit den in der Literatur zu findenden, durch HPLC ermittelten Daten von deutschen Produkten (Lit. 23). Im Falle der ausländischen Daten treten größere Abweichungen auf.

3.1.2.3 Lebensmittelgruppe Früchte und Gemüse

Unter Berücksichtigung der Daten aus den aktuellen nationalen Verzehrstudien (Bayerische Verzehrerhebung 1995 und 2002) und anderen statistischen Daten zum Lebensmittelverbrauch in Deutschland (Eurostat (30)) sowie den aus der Literatur bekannten Folatkonzentrationen in Lebensmittelrohstoffen wurden Gemüse und Früchte ausgewählt, die aufgrund ihrer Verzehrsmengen und Folatgehalte einen signifikanten Beitrag zur Folatversorgung leisten. Dementsprechend und in Abhängigkeit der ersten erhaltenen Analyseergebnisse wurden, um jahreszeitliche Einflüsse, Sorten- und evtl. weitere Einflüsse festzustellen, von ausgewählten Obst- und Gemüsesorten jeweils bis zu 10 Proben untersucht (z.B. Kartoffel, Tomaten, Äpfel, Kopfsalat). Die Proben wurden in Lebensmittelgeschäften und Obst- und

Gemüsemärkten in München gekauft und umgehend für die Folatanalyse aufgearbeitet.

Wie in Tabelle 3.6 Anlage 7.1 zusammengestellt, reichen die durchschnittlichen Folatgehalte der untersuchten Früchte und Gemüsesorten von 5 µg/ 100g beim Apfel bis zu mehr als 140 µg/ 100g im Spinat. Ebenfalls hohe Gesamtfolatkonzentrationen von 119 und 94 µg/ 100g wurden für Hasel- bzw. Walnüsse festgestellt. Der höchste Wert wurde bei den verarbeiteten Produkten in Tomatenmark mit ca. 150 µg/ 100g analysiert. Im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 100 µg/100g wurden Gesamtfolatgehalte von Blumenkohl, grünen Chillis, rote Paprika, Lauch und Avocado gemessen. Es folgen mit Werten zwischen 25 und 50 µg/ 100g Tomaten, Brokkoli, Wirsing, Weißkohl, Rote Beete, gelbe Paprika, Kopfsalat, Erdbeeren, Kirschen, Cashew Nüsse, Mandeln und Dosentomaten bei den verarbeiteten Produkten. Für Kartoffeln, Karotten, grüne Paprika, Zucchini, Orangen, Bananen und Äpfel sowie Apfel-, Tomaten- und Orangensaft wurden Gehalte im Bereich von 5 bis 25 µg/ 100g gemessen.

Einflüsse durch Jahreszeit, Sorte und Lagerung: Bei der Untersuchung 10 verschiedener Kartoffelproben konnten unterschiedliche Konzentrationsbereiche für Lagerware (Frühherbst 2005) und für das über den weiteren Versuchszeitraum analysierte Probenmaterial mit 5 – 10 µg/ 100g bzw. 12 - 31 µg/ 100g Gesamtfolatgehalt gefunden werden. Weiterführende systematische Untersuchung Kartoffeln gleicher Sorte unter definierten Lagerbedingungen könnten diese ersten Ergebnisse näher beleuchten. Für Tomaten konnte einerseits ein saisonaler Einfluss festgestellt werden: die Folatgehalte der Sommerware lagen zwischen 20 und 73 µg/ 100g, für Winterware zwischen 8 und 14 µg/ 100g. Weiterhin konnten für die Sorten Flaschen- oder Eiertomate, Strauchtomate und Cocktailtomate unterschiedliche Gehalte gemessen werden, wobei die Strauchtomate den niedrigsten Wert von 20 µg/ 100g und die Cocktailtomate den höchsten Gehalt von 73 µg/ 100g aufwies. Bei der Untersuchung 6 verschiedener Apfelsorten ergaben sich ebenfalls abweichende Werte zwischen den Sorten, die höchsten Gehalte wurden für Jona Gold und Boskop mit 7 bzw. 10 µg/ 100g analysiert. Weiterführende systematische Untersuchungen zu diesen saisonalen und sortenbedingten Einflüssen wären sinnvoll. Ein Reifeinfluss könnte die Ursache der verschieden hohen Werte von grünen, gelben und roten Paprika sein, die während dieser Untersuchungen gemessen wurden, entsprechend unterschiedliche Werte sind auch in der amerikanischen Nährwerttabelle

dokumentiert (Lit. 24). Um diesen Einfluss jedoch statistisch abzusichern bedarf es weitergehender Messungen verschiedener Paprikaprobe.

Die Analyse von Wal- und Haselnüssen ausgehend von Untersuchungsmaterial ohne und mit Schale ergab für das Probenmaterial ohne Schale deutlich niedrigere Werte als für das mit Schale gelagerte Probenmaterial. Vermutlich handelt es sich um einen Einfluss durch die Lageratmosphäre und auch die Dauer der Lagerung. Für die analysierten Kohlgemüsesorten Brokkoli, Weißkohl und Wirsing sowie für Karotten, Kopfsalat Spinat, Bananen und Orangen konnten solche Einflüsse im Rahmen dieser Messungen nicht festgestellt werden. Hier sind die ermittelten natürlichen Schwankungsbereiche etwas kleiner.

Vergleich mit Literaturdaten: In Tabelle 3.6 Anlage 7.1 sind die durch SIVA in diesem Projekt ermittelten Daten mittels Mikrobiologischer Assays und HPLC/FD analysierten Literatur-Werten gegenübergestellt. Gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten unter Berücksichtigung der gefundenen Schwankungsbereiche zeigt sich für folgende Lebensmittel: Kartoffeln, Spinat, Weiß- und Blumenkohl, Avocado, Bananen, Mandarinen, getrocknete Feigen und Nüsse (ausgenommen Erdnuss, vgl. 3.1.2.1 unter Hülsenfrüchten). Erhöhte Literaturdaten gegenüber den gemessenen SIVA-Werten bestimmt mittels HPLC/FD (insbesondere Lit. 23) sind für Karotten, Lauch, Kopfsalat, Äpfel und Orangen zu vermerken. Hier sind methodisch bedingte Messungenauigkeiten der HPLC/FD als Ursache zu vermuten, wie bereits unter 1.2 und 3.1.2.1 beschrieben. Insgesamt deutlich niedrigere Werte als in der Literatur beschrieben wurden für die Kohlgemüse Brokkoli und Wirsing, Zucchini und Rote Beete gemessen. Zu den letzteren beiden liegen allerdings nicht genug Werte vor, um diese Differenz abzusichern. Eine Erklärung für den höheren Wert im Falle der MA Methode könnten die sehr unterschiedlichen Intensitäten der Reaktion der Mikroorganismen, d.h. "Responses", auf die über 50 verschiedenen Folatderivate sein, die in Lebensmitteln vorkommen können. Das Messsystem wird extern lediglich mit Folsäure als externem Standard geeicht. Besonders große Responses für wenige Vitamere könnten diesen Unterschied hervorrufen. Eine andere Möglichkeit wären in diesen Lebensmitteln vorkommende Verbindungen unbekannter Struktur, die bei der Probenaufarbeitung nicht abgetrennt werden und bei den Mikroorganismen ein verstärktes Wachstum hervorrufen. Ein direkter Methodenvergleich anhand identischer Proben zwischen der SIVA und den mikrobiologischen Assays hat diese Diskrepanzen bestätigt. Um diese Frage hinreichend zu klären, sind umfangreiche

detaillierte Studien notwendig. Andererseits wurden für grüne Chillies, Weinbeeren und Apfelsaft deutlich höhere Werte als in der Literatur gefunden. Die Literatur-Daten zu Kirschen liegen im Falle der MA deutlich niedriger, im Falle der HPLC/FD viel höher als die von uns mit Hilfe der SIVA gemessenen Daten.

3.1.2.4 Lebensmittelgruppe Milch

Aus der Lebensmittelgruppe der Milch und Milchprodukte wurden die gängigsten Konsummilchsorten sowie Milchprodukte und auch Trockenmilchprodukte, als wichtige Bestandteile von verarbeiteten Lebensmitteln, untersucht (Tab 3.7 Anlage 7.1):

Konsummilch: Die Gesamtfolatkonzentration in den gängigen Konsummilchen wurde mit Werten zwischen 5 und 9 µg/ 100g analysiert. Frauenmilchproben einer Probandin mit und ohne Folsäuresupplementierung zeigten Werte von 14 bzw. 7 µg/ 100g. Die mittels SIVA gemessenen Daten korrelieren gut mit den Literaturwerten, sofern vorhanden. Die wenigen über HPLC/FD Methode ermittelten Daten liegen etwas niedriger. Der Folatgehalt der Ziegenmilch gemessen mit mikrobiologischer Methode liegt deutlich unter dem im Rahmen dieser Untersuchungen ermittelten Wertes.

Milchprodukte: Das untersuchte Spektrum an Milchprodukten weist Folatgehalte von 7 (Sahne und Kondensmilch) bis über 140 µg/100g (Camembertkäse) auf, in Abhängigkeit des Verarbeitungsprozesses, insbesondere fermentativer Vorgänge bei der Herstellung der Produkte. Im niedrigsten Konzentrationsbereich bis ca. 10 µg/100g findet man neben den beiden erst genannten Produkten Vollmilchjoghurt, Kefir und Buttermilch, gefolgt von Sauermolke, Joghurt und Speisequark verschiedener Fettstufen, Feta-, Emmentaler- und Edamer Käse im Konzentrationsbereich von 10 – 25 µg/ 100g. Werte zwischen > 25 und 50 µg/ 100g wurden für Frischkäsesorten analysiert. Herausragend hohe Werte zeigt Camembertkäse, insbesondere die fettreduzierten Sorten mit bis zu 143 µg/ 100g. Hier scheint die fettärmere Matrix ein Vorteil gegenüber den anderen Sorten für die fermentative Tätigkeit der Mikroorganismen zu sein. Die Literaturdaten liegen in den meisten Fällen etwas niedriger als die über SIVA gemessenen Werte, jedoch im gleichen Größenordnungsbereich.

Trockenmilchprodukte: Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Trockenmilchprodukte zeigten Gesamtfolatkonzentrationen zwischen 21 und 56 µg/

100g, wobei die fettärmeren Produkte Trockenbuttermilch, -magermilch und -molke Werte von ca. 50 µg/100g aufwiesen und Trockenvollmilchpulver lediglich 20 µg/100g. Evtl. könnten auch die Bedingungen der Trocknung Einfluss auf die Folatkonzentrationen im Endprodukt haben. Aus diesem Grund sind auch die verfügbaren Literaturdaten in diesem Fall nicht direkt vergleichbar, da keine weiteren Informationen zu dem jeweiligen Herstellungsprozess vorliegen.

3.1.2.5 Lebensmittelgruppe Eier, Fleisch und Fisch

Um auch einen kurzen Einblick in diese Lebensmittelgruppe zu bekommen, wurden einzelne ausgewählte Lebensmittel mit relativ hohem Folatgehalt, wie z. B. Hühnerei, verschiedene Lebersorten und auch Hefe untersucht, sowie einige Fleischsorten und zwei gängige Speisefische (Tab 3.8 Anlage 7.1).

Ei: Untersuchtes Hühnerei (Vollei, roh) zeigte eine durchschnittliche Konzentration von 74 µg/ 100g, sehr gut übereinstimmend mit dem Literaturwert von (Lit. 23) bestimmt mittels HPLC/FD, der mikrobiologische Wert liegt etwas niedriger. Die Analyse von rohem Eiklar und Eigelb ergab, wie auch durch Literaturdaten beschrieben, dass annähernd das gesamte Folat im Eigelb lokalisiert ist. Für rohes Eiweiß wurde nur 1 µg/ 100g Gesamtfolatgehalt gemessen, während Eigelb knapp über 200 µg/ 100g Folat aufwies. Die Literaturwerte sind für das Eiweiß etwas höher, für das Eigelb etwas niedriger als die durch SIVA ermittelten Werte. Eiweiß eines gekochten Eis enthält im Durchschnitt 137 µg/ 100g, d.h. während des Kochvorgangs findet eine Verteilung der Folate im Ei statt.

Fisch: Für rohen Köhler (Seelachs) wurden mittels SIVA 8 µg/ 100g gemessen und für rohen Kabeljau (Dorsch) 29 µg/ 100g. Die Werte liegen im Vergleich zu den über mikrobiologische Methode oder HPLC/FD analysierten Literaturdaten deutlich höher. Insbesondere beim Kabeljau könnte der Beitrag zur Folatversorgung unterschätzt worden sein. Eine weitere Untersuchung dieser und anderer Fischarten wäre interessant, um diese Frage im Detail zu klären.

Fleisch: Für vier verschiedene Tierlebersorten wurden Folatkonzentrationen zwischen 320 und 1600 µg/ 100g ermittelt. In der Literatur findet man sehr unterschiedliche Werte für jeweils eine Leberart. Die Analyse zwei verschiedener Kalbsleberproben mit knapp 300 und 770 µg/ 100g zeigt, dass die Gehalte sehr unterschiedlich sein können, evtl. zurückzuführen auf den Ernährungsstatus des jeweiligen Tieres. Leberwurst wurde mit einem Gesamtfolatgehalt von 52 µg/ 100g

analysiert. Vergleichbare Literaturdaten von nationalen Produkten liegen nicht vor. Rohes Schweine-, Rind-, Kalb- und Putenfleisch wies Folatgehalte zwischen 1 und 3 µg/ 100g auf, gegenüber Hühnerfleisch mit 6 µg/ 100g. In diesem Fall korrelieren die über HPLC/FD gemessenen Literaturdaten sehr eng mit den SIVA - Daten, während die mikrobiologisch analysierten Werte deutlich höher liegen.

Für *Bäckerhefe* wurden knapp 300 µg/ 100g Folat analysiert, wobei die Literaturdaten z.T. mehr als doppelt so hoch liegen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Hauptziel dieses Projektes war die Überprüfung der Datenlage zum Folat, bzw. die Schaffung einer zuverlässigen Datengrundlage für die nationalen Nährwerttabellen Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) und Souci-Fachmann-Kraut (SFK), um ein präziseres Instrument für die Auswertung nationaler Verzehrerhebungen zur Verfügung stellen zu können. Wie aus den vorangegangenen Abschnitten der Ergebnisbeschreibung ersichtlich, findet man bei der Untersuchung des Gesamtfolatgehaltes von Lebensmittelrohstoffen größtenteils eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten analysiert mittels der herkömmlichen mikrobiologischen Methode oder auch mit neueren HPLC/FD-Werten. Jedoch sind gebietsweise Abweichungen von den bisher bekannten Daten zu finden: im Bereich der getrockneten Hülsenfrüchte sowie den Kohlgemüsen Brokkoli und Wirsing wurden signifikant niedrigere Gehalte gemessen, für Weinbeeren und Apfelsaft wurden deutlich höhere Konzentrationen festgestellt.

In der Lebensmittelgruppe Getreide zeigen verschiedene Brotsorten deutliche Abweichungen von den Literaturwerten. In der folgenden Tabelle sind exemplarisch Gesamtfolatkonzentrationen von Weizen, Weizenbrotsorten, bzw. Roggen u. Roggenbrotsorten, Reis und Kartoffeln als häufig verzehrte Stärkelieferanten aus dem BLS II.3 den Daten dieser Studie gegenübergestellt.

Die BLS-Daten für Weizenbrote sind z.T. deutlich niedriger, diejenigen für Roggenbrote erheblich höher als die in dieser Studie analysierten Daten und Kartoffeln zeigen bei der Messung mittels SIVA durchschnittlich nur die Hälfte der Folatkonzentration. Auch beim Reis gibt es teilweise Abweichungen von den Literaturdaten. Demnach ist also anzuraten, die BLS-Daten gründlich zu überprüfen und gebietsweise zu überarbeiten, um eine zuverlässigere Datengrundlage für die Auswertung der nationalen Verzehrerhebungen zur Verfügung stellen zu können.

Da durch die Untersuchung verschiedener Obst- und Gemüsesorten, insbesondere Tomaten und Kartoffeln ein signifikanter jahreszeitlicher Einfluss, aber auch Lagerungseinfluss auf den Gesamtfolatgehalt festzustellen war, kann, wie es auch allgemein bzgl. des Vitamingehalts von Obst und Gemüse getan wird, empfohlen werden, diese pflanzlichen Lebensmittel nach Saison zu verzehren, lange Lagerzeiten zu vermeiden und optimale Lagerbedingungen zu wählen.

Tab.3.9: Vergleich der Gesamtfolat Daten des Bundeslebensmittelschlüssels Version BLS II.3 mit Ergebnissen ermittelt über SIVA [$\mu\text{g}/100\text{g}$]

Lebensmittel	BLS II.3 Daten	SIVA
Weizen, ganzes Korn	49	60
Weizenvollkornbrot	34	58
Graubrot, Weizenmischbrot	38	27
Weißbrot	17	14
Brötchen, Semmel	9	33
Weizentoastbrot	25	52
Roggen, ganzes Korn	56	36
Roggenvollkornbrot	36	11
Roggenbrot	44	15
Roggenmischbrot	23	31
Vollkornreis	16	22
Reis, geschält	29	16
Reis parboiled	11	16
Kartoffeln, roh	30	15

Um weitere Einflüsse festzustellen, wären umfangreichere Studien zu dieser Thematik an einigen ausgewählten pflanzlichen Lebensmitteln, wie schon unter 3.1.2 erwähnt, sinnvoll.

Weiterhin können einige Lebensmittel mit relativ hohen Gesamtfolatgehalten für eine Steigerung der Folatzufuhr empfohlen werden, darunter fallen insbesondere Hülsenfrüchte, Weizenkeime und -kleie oder auch gekeimter Weizen, bestimmte Camembertsorten und auch einige Blattgemüsesorten. Auch Weizenbrot, insbesondere Vollkornbrot und Weizentoastbrot weisen relativ hohe Gehalte an Folat auf.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der für dieses Projekt zur quantitativen Folsäuremessung vorgesehenen Lebensmittelgruppen musste die SIVA insbesondere für die komplexe Lebensmittelmatrix der Hülsenfrüchte und Getreide optimiert werden.

Die Methodenoptimierung der SIVA für diese Lebensmittelgruppe führte zu einer effektiven Entfernung der in Leguminosen natürlicherweise vorkommenden Konjugaseinhibitoren, so dass durch kombinierte Anwendung von Rattenserum/ Hühnerpankreas sowie der Extraktreinigung durch Ionenaustauschkartuschen eine annähernd vollständige Konjugaseaktivität erzielt werden konnte. Durch die Verwendung der stabilisotopenmarkierten internen Standards wurden die Verluste der Analyten korrekt ausgeglichen und damit hervorragende Methodvalidierungsdaten erreicht.

Die Ergebnisse der Analyse der verschiedenen Lebensmittelrohstoffe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Analyse des Folatgehaltes von *Hülsenfrüchten* ergab einerseits im Vergleich zu den Literaturwerten z.T. signifikant niedrigere Gehalte in trockenen Leguminosensamen, andererseits zeigte sich im Bereich der verarbeiteten Produkte eine gute Übereinstimmung mit den wenigen bereits existierenden Literaturwerten. Tiefkühlprodukte zeichneten sich durch relativ hohe Gesamtfolatgehalte aus.

Die Analyse von *Getreideprodukten* ergab eine relativ gute Übereinstimmung mit den vorhandenen Literaturdaten. Im Bereich der Weizenprodukte mit hohen Folatkonzentrationen: Weizenkeimen, Kleie und Keimlingen finden sich größere Abweichungen von den Literaturdaten. Die höchsten Gesamtfolatgehalte der Gruppe Brot und Kleingebäck wurden für Knäckebrot, Weizenvollkornbrot und Weizentoastbrot analysiert. Roggenbrot weist vermutlich aufgrund des fehlenden Hefezusatzes niedrigere Konzentrationen auf.

Die höchsten Folatgehalte der Lebensmittelgruppe *Gemüse und Früchte* wurden für Spinat, Wal- und Haselnüsse gemessen, ebenso findet man sehr hohe Folatgehalte in Tomatenmark. Große Abweichungen von den Literaturwerten wurden für die Kohlsorten Brokkoli und Wirsing festgestellt. Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes besteht noch Forschungsbedarf. Weiterhin wurde für Tomaten ein jahreszeitlicher sowie auch ein Sorteneinfluss festgestellt, bei Kartoffeln ein Lagerungseinfluss, bei Äpfeln wiederum ein Sorteneinfluss, wobei hinsichtlich dieser Aspekte ebenfalls noch Forschungsbedarf besteht.

Für die Gruppe der *Milchprodukte* wurde insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den vorhandenen Literaturwerten festgestellt. Besonders hohe Konzentrationen wurde für fettarme Camembertsorten gemessen. Insgesamt liegen die fettärmeren im Vergleich zu den entsprechenden fetthaltigeren Produkten etwas höher in den Folatkonzentrationen.

Die Verteilung im *Ei* verändert sich beim Kochvorgang, wobei sich das zunächst fast vollständig im Eigelb lokalisierte Folat im Ei verteilt. Für Kabeljau wurde mit knapp 30 µg/ 100g erstaunlich hoher Folatgehalt analysiert. Die Literaturwerte von rohem *Fleisch* wurden bestätigt, die Analysenergebnisse verschiedener Lebersorten unterlagen größeren Schwankungen.

5 Gegenüberstellung geplante - tatsächlich erreichte Ziele

Die Probenplanung zum vorliegenden Projekt, die Anfertigung der Synthesen der benötigten Standards, die Methodenentwicklung der SIVA für die Lebensmittelgruppe Getreide und Hülsenfrüchte sowie die quantitativen Analysen der Lebensmittelproben aller vorgesehenen Lebensmittelgruppen sind entsprechend den Vorgaben des Arbeitsplans des Projektes erfolgreich durchgeführt worden. In Anhang 7.2 Tabelle 5.1 sind die geplanten Analysenzahlen den tatsächlich durchgeführten gegenübergestellt. Von den geplanten 400 Analysen wurden 313 durchgeführt. Im Falle der Untersuchung der Lebensmittelgruppe Gemüse und Früchte wurde in Abhängigkeit der erhaltenen Schwankungsbereiche der ersten Analysen sowie der auftretenden Einflüsse von Sorte zu Sorte die Probenzahl festgelegt, bzw. festgestellt, dass in einigen Fällen keine weiteren Analysen notwendig waren. Ebenso wurden punktuell in den anderen Lebensmittelgruppen interessante Ergebnisse weiterverfolgt und in einigen Fällen die Probenzahlen verringert, insbesondere im Falle sehr guter Übereinstimmung mit den in der Literatur vorliegenden Werten.

6 Literatur

- (1) Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage 2000, Umschau Braus GmbH Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M..
- (2) Koletzko, B.; Pietrzik, K. (2004) Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr Teil 1: Folsäure und Gesundheit. Ernährungs-Umschau 51:264-271
- (3) Freisleben A, Schieberle P, Rychlik M. (2002) Syntheses of labeled vitamers of folic acid to be used as internal standards in stable isotope dilution assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 4760-4768
- (4) Freisleben A, Schieberle P, Rychlik M (2003) Comparison of folate quantification in foods by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection to that by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry 315: 247-255
- (5) Freisleben A, Dissertation: Entwicklung und Erprobung von Stabilisotopenassays zur Einzelbestimmung von Folsäurevitameren durch HPLC-MS/MS TU-München 2002.
- (6) Bundeslebensmittelschlüssel (BLS II.3) Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BGVV (1999)
- (7) Rychlik M. (2004) Revised Folate Data in Foods Determined by Stable Isotope Dilution Assays. Journal of Food Composition and Analysis 17: 475-483.
- (8) Koletzko, B.; Pietrzik, K. (2004) Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr Teil 2: Zufuhrempfehlungen, Versorgungslage und Anreicherung von Lebensmitteln. Ernährungs-Umschau 51:313-324
- (9) Mayr A, Diplomarbeit: Analyse des Folatgehaltes ausgewählter Lebensmittel mit Stabilisotopenverdünnungsanalyse. TU-München 2004.
- (10) Finglas, P.M.; Faure, U; Southgate D.A.T. (1993) First BCR-inter-comparison on the determination of folate – potential use in food analysis. Food Chemistry 46:199-213
- (11) Vahteristo et al. (1996) Third EU MAT intercomparison study on food folate analysis using HPLC procedures. Food Chemistry 57: 109-111
- (12) Kariluoto, S.M.; Vahteristo, L.T.; Piironen V.I. (2001) Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in studying folate contents in rye. Journal of the Science of Food and Agriculture 81: 938-942
- (13) Gilbert, J. In: Applications of mass spectrometry in food science, Elsevier, London – New York (1987) Chapter 2: Applications of quantitative mass spectrometry in food science

- (14) Gregory J.F. III, Toth, J.P. (1988) Chemical synthesis of deuterated folate monoglutamate and in vivo assesment of urinary excretion of deuterated folates in man. *Analytical Biochemistry* 170: 94-104
- (15) Santosh-Kumar C.R. et al. (1995) Quantification of red blood cell folates by stable-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry utilizing a folate internal standard. *Analytical Biochemistry* 225: 1-9
- (16) Pawlosky, R.J.; Flanagan, V.P. (2001) A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1282-1286
- (17) Pawlosky, R.J.; Flanagan, V.P.; Pfeiffer, C.M. (2001) Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid in human serum by stable-isotope dilution high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 298: 299-305
- (18) Thomas, P.M.; Flanagan, V.P.; Pawlosky, R.J. (2003) Determination of 5-Methyltetrahydrofolic Acid and Folic Acid in Citrus Juices Using Stable Isotope Dilution-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1293-1296
- (19) Pawlosky, R.J.; Hertrampf, E.; Flanagan, V. P.; Thomas, P.M. (2003) Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 281-286
- (20) Kok, R. M.; Smith, D. E. C.; Dainty, J. R.; van den Akker, J. T.; Finglas, P. M.; Smulders, Y. M.; Jakobs, C.; de Meer, K. (2004) 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism. *Analytical Biochemistry* 326: 129-138
- (21) Pfeiffer, C.M.; Fazili, Z.; McCoy, L.; Zhang, M.; Gunter, E.W. (2004) Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. 50: 423-432
- (22) Rychlik, M., Englert, K., Kapfer S., Kirchhoff E. (2006) Folate Contents of Legumes Determined by Optimized Enzyme Treatment and Stable Isotope Dilution Assays, *Journal of Food Composition Analysis* 19, im Druck
- (23) Müller, H. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung u. Forschung* (1993) 196: 137-41 und 197: 573-7
- (24) U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2005). USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Retrieved July, 2006 from the Nutrient Data Laboratory Home Page on the World Wide Web: http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=12354500
- (25) Augustin, J.; Klein, B.; in: *Legumes: Chemistry, Technology and Human Nutrition* (Ed.:Matthews, R.) M. Dekker, Inc. New York, 1989; S187ff.

- (26) Han, J.Y.; Tyler, R.T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51: 5315-18
- (27) Yon, M.; Hyun, T.H. *Nutrition Research* (2003) 23:735-746
- (28) Melse-Boonstra, A. et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50:3473-8
- (29) Konings E.J.M. et al. *American Journal of Clinical Nutrition* (2001) 73: 765-76
- (30) Europäische Statistik Eurostat
(http://epp.eurostat.cec.eu.int/portal/page?_pageid=1090,1&_dad=portal&_schema=PORTAL)
- (31) Pfeiffer C.M., Rogers, L.M., Gregory, J.F. (1997) Determination of folate in Cereal-Grain Food products using Trienzyme Extraction and combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 407
- (32) Scherz H, Senser F: *Souci – Fachmann – Kraut/ Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwerttabellen*. 6. Aufl., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart (2000)
- (33) Danish Institute for Food and Veterinary Research, Ministry of Food, Fisheries and Agriculture (2006) Danish Food Composition Databank Revision 6.0 Retrieved July, 2006 from the World Wide Web: <http://www.foodcomp.dk/>
- (34) Vahteristo L.T., Lehtikainen K., Ollilainen V., Varo P., (1997) Application of an HPLC Assay for the Determination of Folate Derivatives in some Vegetables, Fruits and Berries consumed in Finland, *Food Chemistry* 59: 589
- (35) White D.R., (1990) Determination of 5-Methyltetrahydrofolate in Citrus Juice by Reversed Phase HPLC with Electrochemical Detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1990) 38: 1515
- (36) Stralsjo L. M.; Witthoft C. M.; Sjöholm I. M.; Jägerstad M. I. (2003) Folate content in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of Cultivar, Ripeness, Year of Harvest, Storage, and Commercial Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 128-33.
- (37) Holt D.L., Wehling R.L., Zeece M.G. (1988) Determination of native Foliates in Milk and other Dairy Products by HPLC, *Journal of Chromatography* 449 (1988) 271
- (38) Brown C.M., Smith A.M., Picciano M.F. (1986) Forms of Human Milk Foliacin and Variation Patterns *J. Ped. Gastroent. Nutr.* 5: 278
- (39) Karra M.V., Udipi S.A., Kirsey A., Roepke J. (1986) Changes in specific Nutrients in Breast Milk during extended Lactation *American Journal of Clinical Nutrition* 43: 495

(40) E. Renner, A. Renz-Schauen (1992) Nährwerttabellen für Milch und Milchprodukte, Verlag B. Renner, Gießen

(41) Sieber R., Collomb M., Lavanchy P., Steiger G. (1988) Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung schweizerischer konsumreifer Käsesorten, Schweiz. Milchw. Forschung 17: 9

(42) Hoppner K., Lampi B. (1989) Total Folate, Pantothenic acid and Biotin in some Fish Products, Canadian Institute for Food Science Technology Journal 22: 170