



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und  
Umwelt

Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie

## **Folatanalytik und Simulation der Verdauung von Folaten**

**Christiane Ringling**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

*Doktors der Naturwissenschaften*

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Thomas F. Hofmann  
Prüfer der Dissertation:  
1. Univ.-Prof. Dr. Michael Rychlik  
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster

Die Dissertation wurde am 26.10.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.03.2016 angenommen.



In Memoriam

**Claus-Erich Ziemke**

(30.01.1936 - 30.08.2010)



## Danksagung

Gleich zu Beginn möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank geht an:

- Prof. Dr. Michael Rychlik für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung und die Gesprächsbereitschaft
- Prof. Schuster für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten
- Dr. Stefan Asam ebenfalls für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas, z.B. durch Gespräche und Diskussionen zu Folaten und vielen anderen Themen, durch praktische Tips und für die Unterstützung bei der Wartung, ... der Geräte
- meine Kollegen, vor allem Martina Lichtenegger und Nina Firl für die offenen Ohren, die vielen Diskussionen und netten Gespräche, aber auch für die Unterstützung im Labor
- meine Forschungspraktikantinnen Maria Grübner und Kateryna Kovalova für die Vorarbeiten zum mikrobiologischen Assay bzw. den Beitrag zur Untersuchung der Dekonjugation während der analytischen Aufarbeitung
- die Mitarbeiter der Bionalytik, vor allem Christopher Zeck und Dr. Sabine Mönch, und die Mitarbeiter der Vorschungsanstalt Thalhausen, des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und des Lehrstuhls für Molekulare Sensorik, u.a. für die Untersuchung am TOF-MS
- das Institut Kirchhoff Berlin für die Messungen des Gesamtfolatgehaltes mittels Mikrobiologischem Assay bzw. an Dr. Erhard Kirchhoff sowohl für die Möglichkeit diese Messungen durchführen zu lassen als auch für die Gesprächsbereitschaft
- meine Familie, meinen Lebenspartner und meine Tochter für die jahrelange Unterstützung, Ausdauer und das Vertrauen in mich und meine Arbeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Allgemeines . . . . .	5
2.1.1	Struktur der Folate . . . . .	5
2.1.2	Stabilität der Folate . . . . .	6
2.1.3	Vorkommen der Folate . . . . .	8
2.2	Physiologie der Folate . . . . .	9
2.2.1	Dekonjugation und Absorption . . . . .	9
2.2.2	Metabolismus und Funktion der Folate . . . . .	10
2.2.3	Mangelercheinungen und Empfehlungen . . . . .	12
2.3	Analytik von Folaten . . . . .	12
2.3.1	Aufarbeitung . . . . .	12
2.3.2	Quantifizierung . . . . .	14
2.4	Bioverfügbarkeit . . . . .	16
2.4.1	<i>in vivo</i> -Studien . . . . .	16
2.4.2	<i>in vitro</i> -Simulationen . . . . .	17
<b>II</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Methodenoptimierung und -vergleich</b>	<b>21</b>
3.1	Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Methode . . . . .	21
3.1.1	5,10-Methenyltetrahydrofolat und 10-Formyldihydrofolat in Lebensmitteln . . . . .	21
3.1.2	Substanz mit folatähnlicher Struktur . . . . .	38
3.1.3	Optimierung der Dekonjugation . . . . .	47
3.2	Methodenvergleich . . . . .	65
3.2.1	Mikrobiologisches Assay . . . . .	65
3.2.2	Mikrobiologisches Assay vs. LC-MS/MS . . . . .	66
3.2.3	Diskussion . . . . .	68
3.3	Abschließende Diskussion . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Simulation der Verdauung von Folaten</b>	<b>73</b>
4.1	Verdauung einzelner Folate . . . . .	74
4.1.1	Folsäure . . . . .	74
4.1.2	10-Formylfolsäure . . . . .	75
4.1.3	Tetrahydrofolat . . . . .	75

4.1.4	5-Formyltetrahydrofolat . . . . .	75
4.1.5	5-Methyltetrahydrofolat . . . . .	77
4.1.6	Diskussion . . . . .	78
4.2	Verdauung von Lebensmitteln . . . . .	83
4.2.1	Optimierung des <i>in vitro</i> -Verdau . . . . .	84
4.2.2	Effektivität der Verdauungssimulation . . . . .	88
4.2.3	Biozugänglichkeit von Folaten in Lebensmitteln . . . . .	93
4.3	Korrelation der Verdauungssimulation mit einer Humanstudie . . . . .	102
4.4	Abschließende Diskussion . . . . .	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>115</b>
<b>III Experimenteller Teil</b>		<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien, Lebensmittel</b>	<b>121</b>
7.1	Chemikalien . . . . .	121
7.2	Standards . . . . .	122
7.3	Lebensmittel . . . . .	122
7.4	Lösungen, Puffer und Standardlösungen . . . . .	123
7.4.1	Lösungen und Puffer . . . . .	123
7.4.2	Standardlösungen . . . . .	126
<b>8</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>129</b>
8.1	Geräte . . . . .	129
8.2	Geräteparameter . . . . .	130
8.2.1	HPLC-UV . . . . .	130
8.2.2	Präparative HPLC . . . . .	130
8.2.3	LC-MS/MS . . . . .	130
8.2.4	Verdauungsapparatur . . . . .	134
8.3	Verbrauchsmaterialien . . . . .	134
<b>9</b>	<b>Durchführung</b>	<b>135</b>
9.1	Synthese . . . . .	135
9.1.1	10-Formyldihydrofolat . . . . .	135
9.1.2	Pyrazino-s-Triazin (MeFox) . . . . .	135
9.2	Analytik . . . . .	135
9.2.1	HPLC-UV - Überprüfung der Konzentration der Standardlösungen	135
9.2.2	Quantifizierung mittels LC-MS/MS . . . . .	137
9.2.3	postcolumn infusion-Technik . . . . .	141
9.2.4	Affinitätschromatographie . . . . .	142
9.2.5	Mikrobiologisches Assay (MA) . . . . .	142
9.3	Humanstudie (Vorstudie) . . . . .	143
9.4	<i>in vitro</i> -Verdau . . . . .	143
9.4.1	Darmpräparation . . . . .	143
9.4.2	Aufreinigung der Darmmukosa (Differentialzentrifugation) . . . . .	144



---

9.4.3	Durchführung der Verdauungssimulation . . . . .	144
9.4.4	Stärkenachweis . . . . .	145
9.4.5	Quantifizierung der freien Aminosäuren und des Gesamtgehaltes an Aminosäuren . . . . .	145
9.4.6	Quantifizierung der Fettsäuren - gesamt und frei . . . . .	146
9.5	Statistische Auswertungen . . . . .	146
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>149</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>167</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>169</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>171</b>
<b>A zusätzliche Abbildungen</b>		<b>173</b>
<b>B zusätzliche Tabellen</b>		<b>179</b>



Teil I

Einführung



# 1 Einleitung und Problemstellung

Folate gehören zu den wasserlöslichen Vitaminen und spielen eine wichtige Rolle im C<sub>1</sub>-Metabolismus [1–7]. Durch einen Mangel an Folaten kann es u.a. zu einer Anreicherung mit Homocystein kommen, einem Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [3,8]. Die empfohlene Zufuhr für einen Erwachsenen liegt in Deutschland bei 300 µg Folatequivalenten [9]. Eine Supplementierung oder Anreicherung mit Folaten, wie sie u.a. in den USA verpflichtend durchgeführt wird, kann z.B. das Risiko für Neuralrohrdefekte senken [10].

Die Variationen zwischen den einzelnen Vitameren der Folate sind an drei Stellen des Folatgrundgerüsts zu finden: Neben dem Oxidationszustand und optionalen C<sub>1</sub>-Einheiten an N<sup>5</sup> und N<sup>10</sup> variieren die Folate in der Länge der Glutaminsäurekette. Diese kann zwischen 1 - 7 Glutaminsäureeinheiten betragen. In Lebensmitteln liegt ein Großteil der Folate in Form dieser Polyglutamate vor [11,12]. Da die Absorption der Folate im Jejunum des Menschen nur in Form der Monoglutamate (1 Glutaminsäureeinheit) erfolgt, müssen die Polyglutamate zuerst durch ein membrangebundenes Enzym zu den jeweiligen Monoglutamaten dekonjugiert werden [12]. Diese sogenannte Dekonjugase kommt in der Bürstensaummembran vor und kann durch Bestandteile in Lebensmitteln inhibiert werden [13–15]. Ob diese Inhibition einen nennenswerten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat und die natürlich vorkommenden Monoglutamate jeweils besser verfügbar sind, als die entsprechenden Polyglutamate, wird hingegen kontrovers diskutiert [16,17]. Auch die Bioverfügbarkeit der einzelnen Monoglutamate wirft Fragen auf. In der Literatur wird teilweise von unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten der einzelnen Folate berichtet [18], wobei es sich nicht unbedingt um signifikante Unterschiede handelt.

In einer zuvor in der Arbeitsgruppe erfolgten Humanstudie [19] wurden sehr unterschiedliche Bioverfügbarkeiten für Folate in drei verschiedenen Lebensmitteln ermittelt, wobei der Gehalt und die Bioverfügbarkeit des Tetrahydrofolats, dem empfindlichsten der Vitamere [11], für die Abweichungen in den ermittelten Bioverfügbarkeiten verantwortlich gemacht wurde. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die eingehende Untersuchung der Ursachen für diese unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten. Hierfür wurde neben dem Einfluss der Stabilität der einzelnen Vitamere auch der Einfluss der Dekonjugation auf die Biozugänglichkeit der Folate untersucht. Unter der Biozugänglichkeit (*engl. bioaccessibility*) ist der Folatanteil zu verstehen, der nach bzw. durch die Verdauung der Matrix für die Absorption zur Verfügung steht [20–22]. Es wurde ein *in vitro*-Modell zur Simulation der Verdauung (Magen- und Darmstufe) auf Grundlage der Verdauungssimulation der DIN 19738 entwickelt, das zusätzlich die Dekonjugation der Folate mitberücksichtigt. Mit diesem Modell wurden verschiedene Folatstandards untersucht, um Hinweise auf die Stabilität der Folate während der Verdauung und unter den entsprechenden Bedingungen zu gewinnen. Weiterhin wurden verschiedene Lebensmittel untersucht, um zusätzlich den Einfluss der Matrix und der Polyglutamate mit zu berücksichtigen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse wurden dann den Werten zur Bioverfügbarkeit von Folaten aus der oben erwähnten Humanstudie [19] gegenübergestellt.

Um verlässliche Werte sowohl für die Gesamtaufnahme an Folaten als auch über das

Vitamerenspektrum zu erhalten, bedarf es einer sensitiven Analytik, mit Hilfe welcher, die einzelnen Vitamere unterschieden und quantifiziert werden können. Dafür eignen sich HPLC-Methoden, welche eine Auftrennung in die einzelnen Vitamere ermöglichen. Eine Kopplung mit einem Tandemmassenspektrometer bietet zusätzliche Spezifität [23, 24]. Eine weitere Methode zur Analytik von Folaten ist das mikrobiologische Assay, welches keine Differenzierung der einzelnen Vitamere zulässt [25–27]. Verschiedene in der Literatur zu findende Vergleiche zwischen Ergebnissen aus HPLC-Methoden und dem mikrobiologischen Assay [28–31] zeigen größere Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden auf, wobei sich durch das mikrobiologische Assay in der Regel ein höherer Gesamtfolatgehalt ergibt [23, 28]. Doch nur selten wurden direkte Vergleiche mit dem selben Lebensmittel durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war deshalb die Durchführung dieses direkten Vergleichs zwischen LC-MS/MS und dem mikrobiologischen Assay, um mögliche Unterschiede genauer zu erforschen und, falls möglich, deren Ursache aufzuzeigen. Dafür wurde u.a. die LC-MS/MS-Methode optimiert, die an frühere Methoden aus der Arbeitsgruppe [19, 32, 33] angelehnt war. Die Optimierung umfasste u.a. das Einfügen weiterer bekannter Folate in die Methode. Dabei galt es zu beachten, dass sich einige Folate in Abhängigkeit vom pH-Wert und durch Oxidation ineinander umwandeln [34, 35]. Weiterhin wurden Lebensmittel in Hinblick auf zusätzlich potentiell folataktive Substanzen untersucht. Da sich die Wachstumsrate des verwendeten Mikroorganismus *Lactobacillus casei* in Abhängigkeit vom Vitamer unterscheiden kann [36–38], wurden auf Seiten des mikrobiologischen Assays verschiedene Folate zur Kalibration verwendet.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Allgemeines

#### 2.1.1 Struktur der Folate

Bei Folaten handelt es sich um eine Gruppe von Vitameren, die zu den wasserlöslichen Vitaminen gezählt werden. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist die Folsäure (PteGlu). Ihr vollständiger Name lautet N-[4-[(2-amino-4-hydroxy-6-pteridiny)methyl]amino]benzoyl]-L-glutaminsäure oder auch Pteroylmonoglutaminsäure. Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, handelt es sich bei PteGlu um ein Pterin, welches an C<sub>6</sub> über eine Methylenbrücke an die Aminogruppe der p-Aminobenzoessäure geknüpft ist. Diese Einheit wird auch Pterinsäure genannt. Bei der PteGlu ist an der Carboxylgruppe zusätzlich über eine Amidbindung L-Glutaminsäure gebunden.

Dieses Grundgerüst von PteGlu ist auch bei den anderen Folaten zu finden. Die Variationen zu PteGlu sind zum einen im Oxidationszustand des Pterinringes zu finden und zum anderen in zusätzlichen Substituenten in Form von C<sub>1</sub>-Einheiten an den Positionen N<sup>5</sup> und/oder N<sup>10</sup>. Bei PteGlu liegt der Pterinring in der oxidierten Form vor. Weiterhin existieren die reduzierten Formen der 5,6- und 7,8-Dihydrofolate und der 5,6,7,8-Tetrahydrofolate. Hier liegen ein oder zwei der Doppelbindungen im Pterinring reduziert vor. Bei den C<sub>1</sub>-Einheiten handelt es sich um Methyl-, Formyl- und Formiminogruppen an N<sup>5</sup> und/oder N<sup>10</sup> bzw. um Methylen- (-CH<sub>2</sub>-) und Methenylbrücken (-CH=) zwischen N<sup>5</sup> und N<sup>10</sup>.

Durch die Reduktion des Pterinringes kommt es bei den Tetrahydrofolaten in jedem Fall und bei den Dihydrofolaten in Abhängigkeit von der Position der verbliebenen Doppelbindung zu Bildung eines Stereozentrums an C<sup>6</sup>. Von den beiden Stereoisomeren (6S) und (6R) (früher auch als 6l und 6d bekannt [12]) kommt in der Natur, mit Ausnahme von Methenyltetrahydrofolat (5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat), Methylen tetrahydrofolat (5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folat) und 10-Formyltetrahydrofolat (10-HCO-H<sub>4</sub>folat) [39–41], bei denen das (6R)-Isomer das natürliche ist, nur das (6S)-Isomer vor [12, 41].

Bei den bisher erwähnten Vitameren handelt es sich um die sogenannten Monoglutama-

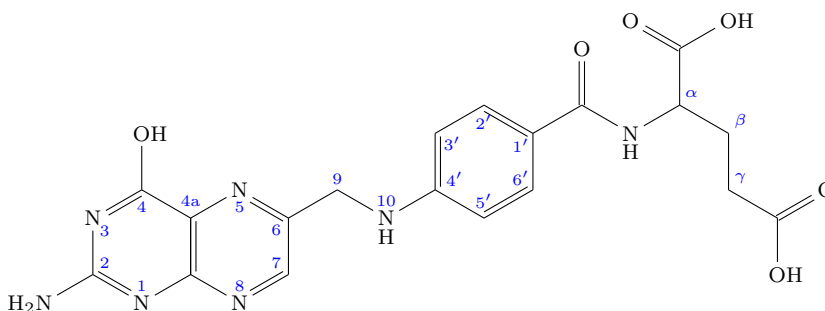


Abbildung 2.1: Strukturformel der Folsäure

te mit einer Glutaminsäureeinheit. In Lebensmitteln und Geweben liegen die Folate jedoch häufig in Form der Polyglutamaten vor [11, 42–47]. Dabei handelt es sich um Folate, bei denen weitere L-Glutaminsäureeinheiten über Isopeptidbindungen an das jeweilige  $\gamma$ -Carboxylende gebunden sind. Die  $\gamma$ -Verknüpfung der Glutaminsäureeinheiten ist in der Natur fast einzigartig [12]. Die Peptidkette kann eine Länge von bis zu sieben oder acht L-Glutaminsäureeinheiten haben [11, 12, 25, 47–49]. Es wurde aber auch schon von Polyglutamaten mit 10 - 14 L-Glutaminsäureeinheiten berichtet [50]

### 2.1.2 Stabilität der Folate

Viele Vitamine sind für ihre schlechte Stabilität bekannt. Dazu sind auch die Folate zu zählen. Sie sind empfindlich gegenüber Hitze, Licht und Oxidation [25]. Auch der pH-Wert spielt eine Rolle bei der Stabilität. Es kann dadurch sowohl zum Abbau der Folate als auch zu Umlagerungen kommen. Potentielle Angriffspunkte sind die C<sup>9</sup>-N<sup>10</sup>-Bindung oder der Pterinring bzw. der Pyrazinring.

Das stabilste Vitamer ist PteGlu [12, 25]. Deshalb wird dieses Folat meist zur Supplementierung von Lebensmitteln verwendet. In den USA wurde sogar eine obligatorische Anreicherung von Getreideprodukten (z.B. Mehl, Reis und Pasta) mit PteGlu eingeführt [22]. In Deutschland existiert eine solche verpflichtende Anreicherung zwar nicht, dennoch sind auch hier mehrere Produkte zu finden, denen PteGlu zugesetzt wird (z.B. Salz und Cornflakes).

PteGlu zeigt gegenüber den anderen Folaten eine deutliche Instabilität in Phosphatpuffer. Diese kann durch Zugabe von Citrat wieder aufgehoben werden [51]. Unter Einwirkung von Ameisensäure (98 %) auf PteGlu entsteht 10-Formylfolsäure (10-HCO-PteGlu) [35, 52] (Abbildung 2.2), welche eine vergleichbar gute Stabilität wie PteGlu aufweist [12]. Im Alkalischen kommt es jedoch zur Abspaltung der Formylgruppe, wobei wieder PteGlu entsteht [25, 35, 52]. 10-HCO-PteGlu entsteht außerdem durch Oxidation des 10-HCO-H<sub>4</sub>folats, mit 10-Formyldihydrofolat (10-HCO-H<sub>2</sub>folat) als Zwischenstufe [34, 35]. Doch 10-HCO-H<sub>4</sub>folat ist nicht nur sehr empfindlich gegenüber Oxidation, sondern zeigt auch pH- und hitzebedingte Umlagerungen. Unter Hitzeeinwirkung oder bei längerem Stehen in neutralen oder leicht alkalischen Lösungen wird 10-HCO-H<sub>4</sub>folat in 5-Formyltetrahydrofolat (5-HCO-H<sub>4</sub>folat) umgewandelt [35]. Im Säuren kommt es zur Umwandlung zu 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat [35], wobei das Gleichgewicht zwischen 10-HCO-H<sub>4</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat schon unterhalb eines pH-Wertes von 6 auf der Seite des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats liegt [34].

Auch 5-HCO-H<sub>4</sub>folat wandelt sich im Säuren in 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat um, wobei diese Reaktion nur unterhalb von pH 2 vollständig abläuft [34]. 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat lagert sich wiederum in Abhängigkeit vom pH-Wert zu 5-HCO-H<sub>4</sub>folat oder zu 10-HCO-H<sub>4</sub>folat zurück. Im leicht Säuren entsteht 5-HCO-H<sub>4</sub>folat [53] und oberhalb von pH 7 liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Seite des 10-HCO-H<sub>4</sub>folats [34] bzw. entsteht ausschließlich 10-HCO-H<sub>4</sub>folat [34] oder hauptsächlich 10-HCO-H<sub>4</sub>folat und kaum 5-HCO-H<sub>4</sub>folat [35]. Im stark Alkalischen ( $c(OH^-) = 0,1\text{ N}$ ) wird auch beim 10-HCO-H<sub>4</sub>folat die Formylgruppe abgespalten. Dabei entsteht Tetrahydrofolat (H<sub>4</sub>folat) [35]. Bei 5-HCO-H<sub>4</sub>folat kommt es nicht zu dieser Abspaltung [52]. Dieses Folat ist sowohl stabiler gegenüber der alkalischen Hydrolyse [35] als auch gegen Oxidation in neutralen oder leicht basischen Lösungen [34, 52]. Es könnte sich um eine sterische Hinderung für O<sub>2</sub> oder andere Oxidationsmittel durch die Formylgruppe handeln, weshalb Tetrahydrofolate mit einem Substituenten an N<sup>5</sup> stabiler sind als ohne, wie z.B. H<sub>4</sub>folat oder 10-HCO-H<sub>4</sub>folat [11, 52].



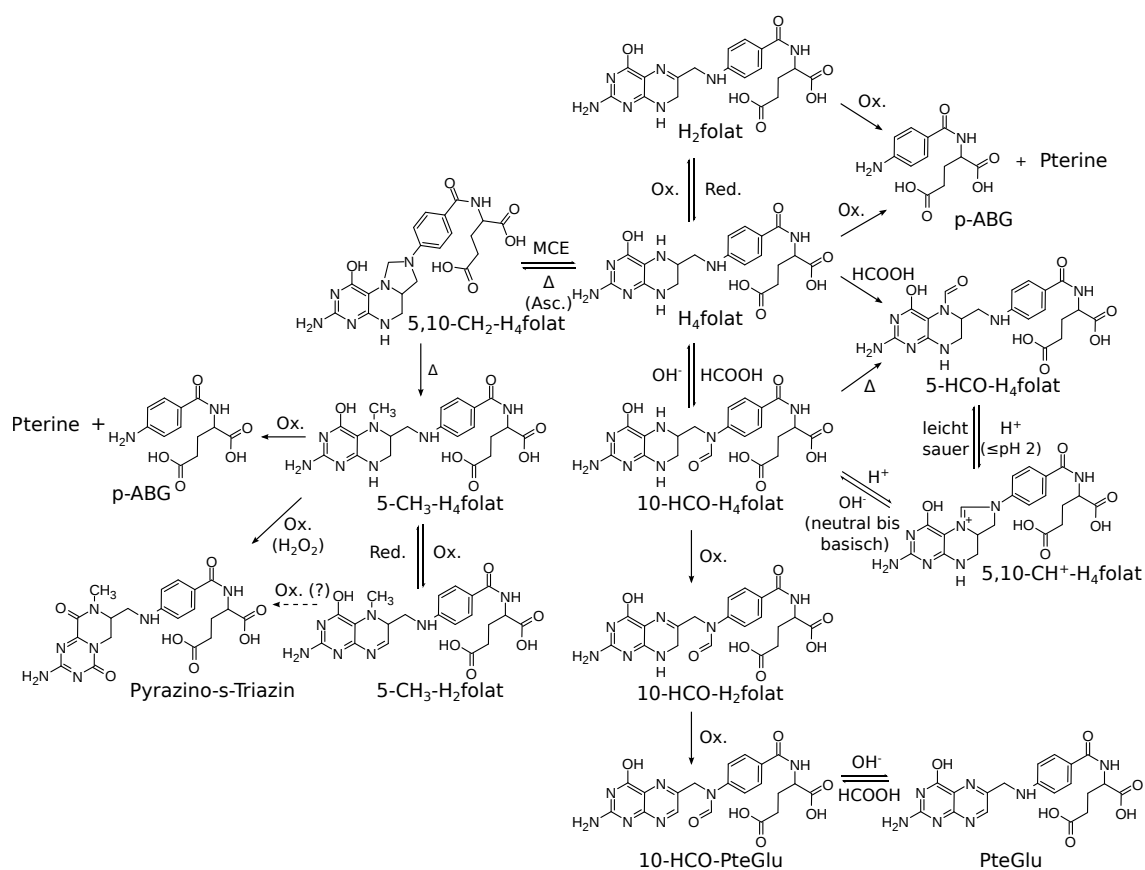


Abbildung 2.2: Stabilität und pH-bedingte Umlagerungen der Folate.

$H_4$ folat ist das instabilste Folat [11]. Es wird durch Luftsauerstoff zu p-Aminobenzoylglutamat (pABG) und zu Pterinprodukten abgebaut [54]. Im Basischen (pH 10) kann es auch zur Oxidation zum Dihydrofolat ( $H_2$ folat) kommen, so dass der Vitamincharakter und die biologische Aktivität erhalten bleibt. Doch auch dieses Folat kann durch Oxidation zu pABG und 6-Formylpterin abgebaut werden [54]. Zum Schutz vor Oxidation wird deshalb bei der Analytik von Folaten oft Ascorbinsäure zugegeben. Beim Erhitzen (für 10 min bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ) in einer 2%igen Ascorbinsäurelösung (pH 7,4, Hepes-Puffer) entsteht aus  $H_4$ folat jedoch 5,10-Methylenetetrahydrofolat (5,10- $CH_2$ - $H_4$ folat) und 5-Methyltetrahydrofolat (5- $CH_3$ - $H_4$ folat) [55]. Der Grund für die Umwandlung ist die Zersetzung von Ascorbinsäure im neutralen pH-Bereich [55]. Ascorbinsäure ist in einem pH-Bereich von 4 - 5 hingegen stabiler als bei pH 7 [56], so dass in Abhängigkeit vom pH-Wert Formaldehyd entstehen kann. Dieses reagiert zusammen mit  $H_4$ folat zum 5,10- $CH_2$ - $H_4$ folat [57]. Es wird außerdem angenommen, dass 5,10- $CH_2$ - $H_4$ folat durch die Ascorbinsäure zum 5- $CH_3$ - $H_4$ folat reduziert werden kann [55]. Doch ließ sich diese Reaktion von DE BROUWER et al. nicht bestätigen [58]. Durch Zugabe von Mercaptoethanol kann die Bildung des 5,10- $CH_2$ - $H_4$ folat aus  $H_4$ folat jedenfalls unterbunden werden, da Mercaptoethanol mit dem Formaldehyd ein Hemithioacetal bildet und es somit aus der Lösung entfernt [59].

Das 5- $CH_3$ - $H_4$ folat besitzt eine Methylgruppe an Position  $N^5$ , die wie beim 5-HCO- $H_4$ folat vermutlich durch sterische Hinderung vor Oxidation schützt [11], dennoch kann 5- $CH_3$ - $H_4$ folat leicht oxidiert werden. Bei der Oxidation entsteht 5-Methyldihydrofolat

(5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat), welches u.a. durch Ascorbinsäure, Cystein, Homocystein oder Mercaptoethanol zurück zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat reduziert werden kann [60]. Ein weiteres Oxidationsprodukt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats und des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folats ist das 4a-Hydroxy-5-Methyltetrahydrofolat, welches z.B. durch Einwirkung von Wasserstoffperoxid entsteht [61]. Laut JONGEJAN et al. handelt es sich beim Oxidationsprodukt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats jedoch nicht um 4a-Hydroxy-5-Methyltetrahydrofolat, sondern um ein Pyrazino-s-Triazin [62]. Von WHITELEY et al. [63] wurde später bestätigt, dass es sich bei dem in [61] beschriebenen Oxidationsprodukt wirklich um dieses Pyrazino-s-Triazin handeln kann und nicht um das 4a-Hydroxy-5-Methyltetrahydrofolat, wie zuvor angenommen wurde. Obwohl die Summenformeln eine Differenz von zwei H-Atomen aufwiesen, erlaubte die Elementaranalyse dennoch den Rückschluss auf dieses Pyrazino-s-Triazin mit hinreichender Genauigkeit. Es wird aus dem Peroxid des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats durch eine Umlagerung am Pterinring gebildet [62], so dass auch keine Rückreaktion zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat möglich ist.

Dieses Pyrazino-s-Triazin wurde auch im humanem Serum bzw. Plasma gefunden [64–68], ohne dass dieses mit Wasserstoffperoxid behandelt wurde. Es wird angenommen, dass es während der Lagerung aus 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat entsteht [65,68], wobei der Abbau des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats im Plasma und die Bildung dieses Pyrazino-s-Triazins auch vom verwendeten gerinnungshemmenden Mittel abhängt. Im EDTA-Plasma wurde die größte Menge an diesem Oxidationsprodukt gefunden, bzw. der schnellste Abbau, und in Na-Heparin und Na-Citrat-Plasma die geringste Menge [65,68]. Von HANNISDAL et al. [65] wird vorgeschlagen, dass dieses Pyrazino-s-Triazin zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat dazugerechnet werden sollte, um den Verlust während der Lagerung zu berücksichtigen. Innerhalb der ersten 48 h in EDTA-Plasma kann das abgebaute 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat fast vollständig in Form dieses Pyrazino-s-Triazins detektiert werden, bzw. in Serum und Na-Citrat-Plasma noch innerhalb der ersten 96 h und in Na-Heparin-Plasma sogar noch bis zu 192 h [65]. Danach kann es zusätzlich zu anderen, unbekanntem Abbauprodukten kommen. Bei diesem Pyrazino-s-Triazin, welches auch als MeFox (Methyl folinate oxidation product) bezeichnet wird [67], kommt hingegen die Frage auf, ob dieses Oxidationsprodukt nicht doch schon *in vivo* vorhanden ist. Eine Antwort auf diese Frage steht noch aus [67].

### 2.1.3 Vorkommen der Folate

Folate können vom Menschen *de novo* nicht synthetisiert werden [25,56,69] und müssen demzufolge über die Nahrung aufgenommen werden. Sehr gute Folatquellen stellen grünes Gemüse, Hülsenfrüchte, Keime und Leber dar [70,71]. In getrockneten Sojabohnen wurde z.B. ein Gesamtfolatgehalt von 318 µg/100 g ermittelt und in gefrorenen Erbsen 128 - 146 µg/100 g [31]. Letzteres ist vergleichbar mit dem Gesamtfolatgehalt in Spinat von 159 µg/100 g. Die Variationen können jedoch recht groß sein, so wurde von AISO und TAMURA [72] ein Gesamtfolatgehalt für Spinat von 338 µg/100 g angegeben und von PANDRANGI und LABORDE [73] sogar von bis zu 410 µg/100 g. Dafür wurde von CHEN und EITENMILLER [74] in den von ihnen untersuchten Erbsen nur ein Gesamtfolatgehalt von 71 µg/100 g gefunden. Weniger folatreich ist dahingegen Parmaschinken mit einem Folatgehalt von 1,8 µg/100 g oder Rindfleisch (1,2 µg/100 g) [26].

Die Folate liegen in vielen Lebensmitteln zum überwiegenden Teil als Polyglutamate vor [11,42–47]. Doch es existieren auch endogene Enzyme, z.B. in Spinat oder Brokkoli, welche die Polyglutamatkette spalten - sogenannte Pteroylpolyglutamathydrolasen [42,45]. Bei Pflanzen befinden sie sich in den Vakuolen der Zellen [75]. Dadurch werden die

Polyglutamate dieser Lebensmittel nach dem Zerkleinern mit der Zeit dekonjugiert [42,45].

Das in Lebensmitteln am Häufigsten vorkommende Folat ist das 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat [43]. In Spinat nimmt es z.B. einen Anteil von 86 % ein [24]. In Weizenbrot, Erdnüssen und Weizenkeimen ist 5-HCO-H<sub>4</sub>folat das Folat mit dem größten Anteil [19,24,31,43], wohingegen in Sojabohnen [31], Camembert [19] und Rinderleber [43,76] H<sub>4</sub>folat das Folatspektrum prägt. PteGlu soll in der Natur dagegen kaum vorkommen [53]. 10-HCO-PteGlu und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurden hingegen schon nachgewiesen, obwohl FREISLEBEN et al. [27] das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat nur als Artefakt bei der Analytik ansehen, welches während der Aufarbeitung durch Oxidation des 10-HCO-H<sub>4</sub>folats entstanden ist. RUGGERI et al. [29], PFEIFFER et al. [77] und KARILUOTO et al. [30] konnten jedoch große Menge an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat detektieren (bis zu 46 %) und KONINGS et al. [43] gehen auf Grund der guten Wiederfindungen der einzelnen Folate sogar davon aus, dass es während der Analyse nicht zu Umlagerungen gekommen ist, sondern 10-HCO-H<sub>2</sub>folat schon in den entsprechenden Lebensmitteln enthalten war, bzw. dass es während der Verarbeitung der Lebensmittel entstanden ist.

Ein weiteres Folat ist das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat. Es wird bei der Analyse von Lebensmitteln seltener erwähnt. DE BROUWER et al. fanden dieses Folat mit einem Anteil von ungefähr 10 % in Reis [78], wohingegen in einer späteren Untersuchung nur ein Anteil von 5 - 6 % bzw. in einer anderen Reissorte (durch Biofortifikation) sogar trotz des hohen Gesamtfolatgehaltes kein (nennenswerter) Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat detektiert wurde [79]. In Spinat wurde von GARRATT et al. ein Anteil von 4,1 % ermittelt [50].

## 2.2 Physiologie der Folate

### 2.2.1 Dekonjugation und Absorption

Die Aufnahme der Folate erfolgt im Jejunum [80], wobei die Absorptionsrate im vorderen Teil des Jejunums größer ist als im hinteren und auch dort wiederum deutlich größer als im Ileum, bzw. im Ileum findet so gut wie keine Absorption mehr statt [12,81]. Nach neuesten Erkenntnissen können Folate auch aus dem Kolon aufgenommen werden, in dem durch die Mikroflora größere Mengen an Folaten produziert werden [82].

Da die Absorption nur in Form der Monoglutamate stattfindet, muss zuvor eine Dekonjugation der Polyglutamate zu den Monoglutamaten stattfinden [12]. Für die Dekonjugation der Polyglutamate werden Pteroylpolyglutamathydrolasen (PPGH) benötigt. Diese Enzyme sind in der Lage, die  $\gamma$ -Glutamylbindung zu spalten. Sie kommen sowohl beim Menschen als auch beim Schwein im Pankreassekret und in der Bürstensaummembran des Jejunums vor. Über die Aktivität dieser Enzyme und ihren Beitrag zur Dekonjugation gibt es verschiedene Auffassungen. JÄGERSTAD et al. [83] ermittelten die höchste Aktivität für die PPGH im Pankreassekret, wohingegen HOFFBRAND und PETERS die bei weitem höchste Aktivität in der Schleimhaut (Mukosa) des Jejunums und Ileums fanden. Aber selbst wenn die Aktivität im Pankreassekret doch höher sein sollte, wird davon ausgegangen, dass der Beitrag zur Dekonjugation relativ niedrig sein wird, da der pH-Wert im Darmlumen meist höher als 4,6 ist - dem pH-Optimum der PPGH im Pankreassekret [84].

Die PPGH in der Mukosa besteht jedoch nicht nur aus einem Enzym. Es hat sich herausgestellt, dass in der Mukosa neben einer membrangebundenen PPGH (Glutamat-Carboxypeptidase II; EC 3.4.17.21), auch eine intrazelluläre PPGH existiert. Für erstere wird ein breites pH-Optimum zwischen 4,5 - 8,0 angegeben [85], mit einem Maximum bei 5 [85] bis 5,5 [86]. REISENAUER et al. geben hingegen ein Maximum bei 7,5 an [87]. Das pH-

Optimum der intrazellulären PPGH liegt etwas niedriger - bei 4,5 [87], bzw. 4,5 - 5,0 [85]. Für die Verdauung hat die intrazelluläre Dekonjugase vermutlich keine Bedeutung, wohl aber für den Metabolismus in den Enterozyten [12]. Die Enzyme der Bürstensaummembran im Schwein unterscheiden sich bis auf die Aktivität kaum von den humanen. Im Schwein ist die Aktivität jedoch um die Hälfte geringer als beim Menschen [85].

Für die PPGH wird in der Literatur des Öfteren der Name „Konjugase“ verwendet. Da diese Bezeichnung irreführend ist [53], wird im Folgenden die Bezeichnung Dekonjugase bevorzugt.

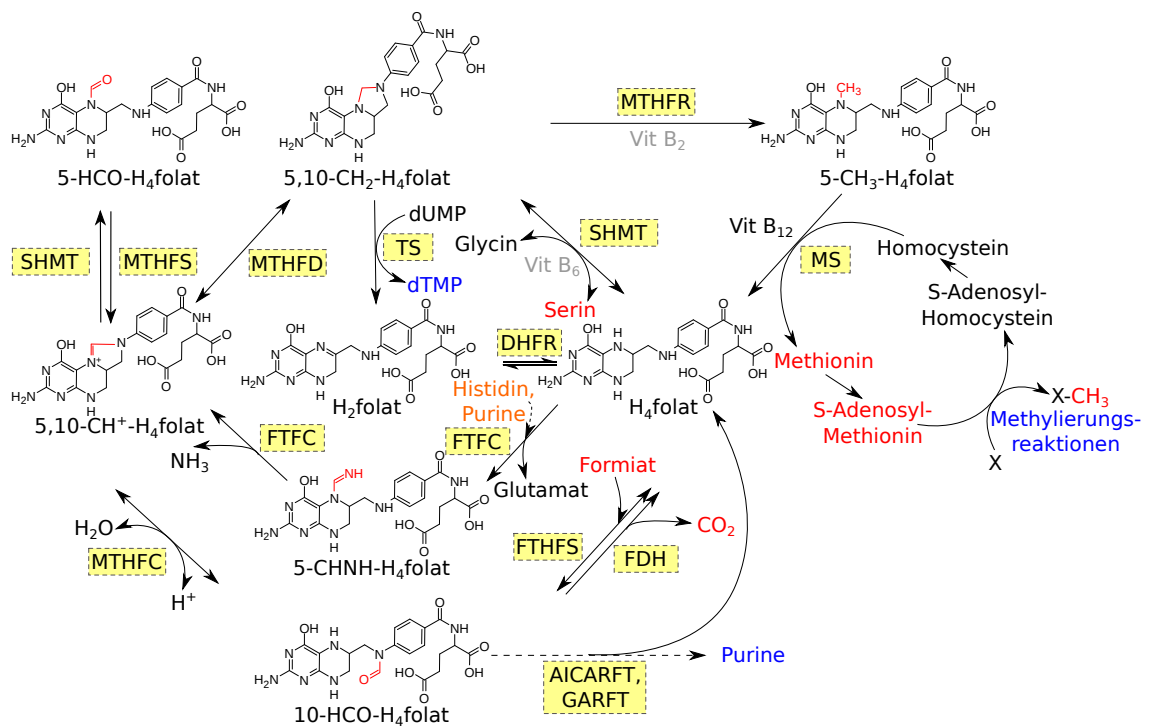
Die Absorption der Monoglutamate kann im Anschluss an die Dekonjugation sowohl aktiv durch einen Protonen-gekoppelten-Folat-Transporter erfolgen [6] oder passiv durch Diffusion. Die Diffusion ist dabei vernachlässigbar [6], denn sie soll erst oberhalb einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  stattfinden [16, 17]. Im Darmlumen werden aber physiologische Konzentrationen von  $<5 \mu\text{mol/l}$  angenommen [17]. Nach der Aufnahme in die Enterozyten kommt es zur Umwandlung der einzelnen Vitamere zu 5- $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{folat}$  [88, 89], der zirkulierenden Form im Plasma. Zuerst werden die oxidierten Folate durch die Dehydrofolatdehydrogenase bis zu den Tetrahydrofolaten reduziert und anschließend methyliert [88, 89], wobei davon ausgegangen wird, dass zuerst eine Formylierung stattfindet und die Formylgruppe dann zur Methylgruppe reduziert wird [90]. Anschließend erfolgt der Übergang in die Portalvene, von der es weiter zur Leber geht. Dort werden die Folate entweder in Form der Polyglutamate gespeichert oder ins Blut oder die Galle weitertransportiert [69]. Über das Blut gelangen die Folate zu den einzelnen Geweben.

Im Zytosol und den Mitochondrien der Zellen erfolgt dann wiederum die Synthese zu den Polyglutamaten [4, 69], bei denen es sich um die eigentlichen Substrate der für den  $\text{C}_1$ -Metabolismus relevanten Enzyme handelt [69], denn viele am Folatmetabolismus beteiligten Enzyme zeigen eine höhere Affinität zu den (längerkettigen) Polyglutamaten, verglichen mit den Monoglutamaten oder kurzkettigen Polyglutamaten [2]. Außerdem kann so der Konzentrationsgradient aufrechterhalten werden, um den Monoglutamaten den Zugang zu den Zellen zu erleichtern [2]. Bei multifunktionalen Enzymen mit mehreren aktiven Zentren dient die Polyglutamatkette vermutlich zusätzlich als Anker, damit die Zwischenprodukte gar nicht erst wieder gelöst werden [69]. Die Monoglutamatformen dienen eher dem Transport [69].

### 2.2.2 Metabolismus und Funktion der Folate

Folate spielen eine wichtige Rolle im  $\text{C}_1$ -Metabolismus (Abbildung 2.3) [1–7]. Sie dienen als Akzeptoren oder Donatoren von  $\text{C}_1$ -Einheiten für die Nukleotidsynthese oder den Aminosäuremetabolismus [69]. Der  $\text{C}_1$ -Metabolismus findet im Zytosol, in den Mitochondrien und im Zellkern statt [1].

Die Methylgruppe des 5- $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{folats}$  wird auf Homocystein übertragen, woraus Methionin entsteht. Dieses wird weiter zu S-Adenosylmethionin umgewandelt, dem Cofaktor für Methylierungsreaktionen der DNA, der RNA und anderen. Die Methylierung des Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zum Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), einem Baustein der DNA, erfolgt hingegen über 5,10- $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{folat}$ . Für die Synthese der Purine, die ebenfalls Bestandteile der DNA und RNA sind, wird 10- $\text{HCO-H}_4\text{folat}$  als Überträger der Formylgruppe benötigt. 10- $\text{HCO-H}_4\text{folat}$  kann sowohl durch die Übertragung von Formiat auf  $\text{H}_4\text{folat}$  bereitgestellt werden, als auch durch die Umwandlung des 5,10- $\text{CH}^+\text{-H}_4\text{folats}$ . Letzteres kann wiederum in 5- $\text{HCO-H}_4\text{folat}$  umgewandelt werden, welches zwar



**Abbildung 2.3:** Zusammenfassung wichtiger Reaktionen der Folate im Zusammenhang mit dem  $C_1$ -Metabolismus. Die teilnehmenden Enzyme sind gelb hinterlegt und die Träger der  $C_1$ -Einheit rot markiert. AICARFT = 5-Amino-4-imidazol-carboxamidribonucleotid-Formyltransferase, DHFR = Dehydrofolatreduktase, dTMP = Desoxythymidinmonophosphat, dUMP = Desoxyuridinmonophosphat, FDH = 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase, FTFC = Glutamat- oder Glycin-Formiminotransferase + Formiminotetrahydrofolat-Cyclodeaminase, FTHFS = 10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase, GARFT =  $\beta$ -Glycinamidribonucleotid-Formyltransferase, MS = Methioninsynthase, MTHFC = Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase, MTHFD = Methenyltetrahydrofolat-Dehydrogenase, MTHFR = Methenyltetrahydrofolat-Reduktase, MTHFS = Methenyltetrahydrofolat-Synthetase, SHMT = Serinhydroxymethyl-Transferase, TS = Thymidylat-Synthase

keinen Cofaktor im  $C_1$ -Metabolismus darstellt, aber vermutlich der Speicherung dient [1].

Ein weiteres Folat ist das 5-Formiminotetrahydrofolat (5-CHNH- $H_4$ folat), welches neben Glutamat im Rahmen des Histidin- oder Purinabbaus durch eine Übertragung der Formiminogruppe von Formiminoglutamat (aus dem Histidinabbau) auf  $H_4$ folat gebildet wird. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym besitzt ein weiteres aktives Zentrum (Cyclodeaminase), so dass das 5-Formiminotetrahydrofolat im Anschluss zu 5,10- $CH^+$ - $H_4$ folat weiter reagiert [1,2].

Neben Histidin und Glutamat sind noch weitere Aminosäuren, wie Serin und Glycin, am  $C_1$ -Metabolismus beteiligt. Serin ist ein wichtiger Lieferant für  $C_1$ -Einheiten. Die Hydroxymethylgruppe des Serins wird auf  $H_4$ folat übertragen, woraus das oben beschriebene 5,10- $CH_2$ - $H_4$ folat und Glycin entsteht. Die Rückreaktion kann ebenfalls stattfinden und stellt  $H_4$ folat wieder zur Verfügung, welches das für Zellen möglicherweise toxische Formiat [2] binden kann. In den Mitochondrien wird Formiat hingegen aus 10- $HCO$ - $H_4$ folat freigesetzt.

### 2.2.3 Mangelerscheinungen und Empfehlungen

Anhand der Reaktionen, an denen Folate beteiligt sind, lässt sich erkennen, dass ein Folatmangel weitreichende Folgen haben kann. Sowohl durch einen Folat- als auch durch einen Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel kann es zu einer Anreicherung von Homocystein kommen, einem Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [3,8]. Für die Umwandlung des Homocysteins zum Methionin existiert neben der folatabhängigen Reaktion zwar noch ein Weg über die Betain-Homocystein-Methyltransferase, doch diese wird nur in der Leber und den Nieren exprimiert [91,92] und auch das für den Abbau des Homocysteins zu Cystein (über Cystathionin) notwendige Enzym Cystathionin- $\beta$ -Synthase ist nicht in allen Geweben vorhanden [92]. In kardiovaskulärem Gewebe konnte z.B. nur wenig oder keine Aktivität an Cystathionin- $\beta$ -Synthase ermittelt werden [91].

Durch einen Mangel an Folaten oder Vitamin B<sub>12</sub> werden außerdem Methylierungsreaktionen unterbunden, z.B. die Methylierung der DNA, was wiederum die Genexpression beeinflusst [93]. Weiterhin kann ohne Folate auch keine Methylierung von dUMP zu dTMP stattfinden, weshalb Uracil fälschlicherweise in die DNA eingebaut wird, was zu Chromosomenbrüchen führen kann [94,95]. Diese Schädigungen in der DNA-Synthese manifestieren sich in Form von megaloblastischer Anämie [93,95] und tragen vermutlich zum erhöhten Risiko für Krebs, der im Zusammenhang mit Folatmangel steht, bei [94]. Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel zeigt das gleiche klinische Bild. Dies wird dadurch erklärt, dass durch das Fehlen von Vitamin B<sub>12</sub> keine Umwandlung von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zu H<sub>4</sub>folat mehr stattfinden kann und es somit zu einem Mangel an anderen Folaten kommt, die für die Synthese der DNA-Bestandteile, die Purine und Pyrimidine (in Form von dTMP), notwendig sind. 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat reichert sich dafür an („Methyl-Trap“), da die Reaktion von 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folat zu 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat irreversibel ist [4,12].

Um eine ausreichende Versorgung mit Folaten zu erreichen, wird von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) seit 2013 eine Zufuhr von 300  $\mu$ g Folatequivalenten empfohlen [9]. Zuvor lag die Empfehlung, wie auch in den USA (vom *Institute of Medicine*) [96,97] bei 400  $\mu$ g [98]. Frauen mit dem Wunsch, schwanger zu werden, sollen zusätzlich zur folatreichen Ernährung 400  $\mu$ g PteGlu zu sich nehmen, um Neuralrohrdefekte vorzubeugen, denn die Supplementierung mit Folaten kann das Risiko von Neuralrohrdefekten senken [10]. In den USA wurde deshalb eine verpflichtende Anreicherung von Getreideprodukten eingeführt [4,22]. Dies hat bei einigen Personen zu einer täglichen Aufnahme von >1 mg Folat geführt [4]. Es soll zwar keine Toxizität von hohen Folatdosen ausgehen, doch es ist auch nicht auszuschließen, dass Folate das Risiko für Krebs erhöhen könnten, in dem sie den Krebs begünstigende Gewebeveränderungen fördern [99]. Dem entgegen steht eine Studie, in der eine inverse Beziehung zwischen Folataufnahme und dem Risiko für bestimmte Darmkrebsarten festgestellt wurde [100].

## 2.3 Analytik von Folaten

### 2.3.1 Aufarbeitung

#### Stabilisierung der Folate während der Extraktion

Zur Stabilisierung der Folate werden den Extraktionspuffern (z.B. Ches/Hepes-Puffer pH 7,85 [59] oder 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) pH 5 [32]) Reduktionsmittel zugegeben. Die häufigsten Reduktionsmittel sind Ascorbinsäure und Mercaptoethanol [23]. Wie

in Abschnitt 2.1.2 schon erwähnt wurde, kann es bei alleiniger Anwendung von Ascorbinsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Hitzeeinwirkung zur Abspaltung von Formaldehyd kommen [55], weshalb oft Mercaptoethanol zugegeben wird, da es Formaldehyd abfängt [59]. Eine Kombination aus diesen beiden Reduktionsmitteln bei einem pH-Wert von 5 (MES-Puffer) wurde auch in der eigenen Arbeitsgruppe verwendet [19, 32, 33, 101, 102]. Aus ökologischen und toxikologischen Gründen wurde von PATRING et al. 2,3-Dimercapto-1-propanol (BAL) als Alternative zum Mercaptoethanoleinsatz empfohlen [103]. Außerdem zeigte BAL im Vergleich mit Mercaptoethanol eine bessere stabilisierende Wirkung.

### Dekonjugation

Da die Folate in Lebensmitteln häufig in Form der Polyglutamate vorliegen [42–47], werden sie vor der Detektion häufig dekonjugiert. Für mikrobiologische Methoden ergibt sich die Notwendigkeit daraus, dass der häufig eingesetzte Mikroorganismus *Lactobacillus rhamnosus* Folate mit unterschiedlicher Kettenlänge nicht in gleicher Weise verstoffwechselt [104, 105]. Bei HPLC-Methoden ist der Grund für die Dekonjugation die Vielzahl an Kongeneren mit Unterschieden im Grundgerüst und in der Kettenlänge, die in Abhängigkeit vom verwendeten Detektor alle nur schwer parallel zu analysieren sind.

Für die Dekonjugation werden die schon erwähnten Dekonjugasen bzw.  $\gamma$ -Glutamylhydrolasen benötigt. Am Häufigsten sind die Dekonjugasen aus Rattenserum, Hühnerpankreatin und Schweinenieren [53]. In Abhängigkeit von der Quelle der Dekonjugasen gibt es Unterschiede im Endprodukt. Die Dekonjugase im Hühnerpankreatin spaltet die Polyglutamate z.B. nur bis zu den Diglutamaten [106], wohingegen die Dekonjugasen im Rattenserum oder aus Schweinenieren die Monoglutamate generieren [28, 56, 107, 108]. Des Weiteren unterscheiden sich die Dekonjugasen im Aktivitätsmodus und in ihrem pH-Optimum. Bei der Dekonjugase im Hühnerpankreatin handelt es sich um eine Endopeptidase [109] mit einem pH-Optimum von 7,0 - 8,5 [106, 110, 111], wohingegen es sich bei der Dekonjugase aus der Schweineniere und aus dem Rattenplasma um Exopeptidasen handeln soll [108, 112–114] mit einem pH-Optimum zwischen 4,3 - 4,5 [110] (Schweineniere) und zwischen 6,2 - 7,5 [107] (Rattenplasma). Für das pH-Optimum in Rattenplasma wird aber auch ein Optimum von 4,5 angegeben [115].

Durch Bestandteile aus Lebensmitteln können die Dekonjugasen inhibiert werden [31, 116]. Der Einfluss dieser Substanzen kann sich zwischen den verschiedenen Dekonjugasequellen unterscheiden. Die Dekonjugase aus dem Hühnerpankreatin soll weniger anfällig für Inhibitoren sein [28] bzw. weniger anfällig als die Schweinenierendekonjugase [56]. Im Gegensatz zur Schweinenierendekonjugase [117] wird sie aber durch die Anwesenheit von Citrat inhibiert [109, 117].

### Trienzymbehandlung

Bei der Trienzymbehandlung handelt es sich um eine von MARTIN et al. [118] eingeführte Variante der Extraktion von Folaten aus Lebensmitteln, bei der neben der Dekonjugase noch zwei weitere Enzyme zum Einsatz kommen und zu einer Verbesserung der Extraktion führen. Dabei handelt es sich um  $\alpha$ -Amylase und Protease. Über die Notwendigkeit, die Reihenfolge und die Dauer der einzelnen Anwendungen gibt es verschiedene Ansichten [28]. Zum Teil wird auch nur eine Dienzymbehandlung mit Amylase oder Protease als Zusatz zur Dekonjugation durchgeführt [73]. Von CHEN und EITENMILLER [74] wird jedenfalls die

Trienzymbehandlung mit einer 1,5-stündigen Inkubation mit Protease, gefolgt von einem Erhitzungsschritt und einer 1,5-stündigen Inkubation mit  $\alpha$ -Amylase empfohlen, an die sich wiederum die Inkubation mit der Dekonjugase über einen Zeitraum von 3 h anschließt. Laut PFEIFFER et al. [77] soll sich die Trienzymbehandlung sowohl für Methoden mit dem mikrobiologischen Assay anbieten, als auch für HPLC-Methoden.

### 2.3.2 Quantifizierung

Die Messung der Folate erfolgt, wie schon erwähnt, u.a. mit Hilfe von mikrobiologischen Assays und über HPLC-Methoden mit UV-Detektoren, Fluoreszenz-Detektoren (FLD) oder Massenspektrometern (MS).

#### Mikrobiologisches Assay

Eine sensitive und weit verbreitete Methode zur Analyse des Gesamtfolatgehaltes bietet das mikrobiologische Assay. Hierbei handelt es sich um eine turbimetrische Messung einer Probenlösung, die mit Mikroorganismen inkubiert wurde, die auf die Zugabe von Folaten zum Wachsen angewiesen sind. Es gibt mehrere Mikroorganismen, die für die Analyse der Folate verwendet werden können, wobei *Lactobacillus rhamnosus*, auch als *Lactobacillus casei* bezeichnet, am Häufigsten Verwendung findet [11]. Dieser Mikroorganismus kann alle Vitamere der Folate verstoffwechseln [11, 53], wohingegen z.B. *Streptococcus faecalis*, eigentlich *Enterococcus hirae*, kein 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat verarbeiten kann [53].

Weiterhin ist zu beachten, dass die Mikroorganismen nur auf das (6*S*)-Isomer und nicht auf das (6*R*)-Isomer ansprechen [11, 12, 104, 119]. Eine Ausnahme hiervon bilden 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>4</sub>folat, bei denen das (6*R*)-Isomer das biologisch aktive ist<sup>1</sup> [39]. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Fakt, dass die Aktivität mit zunehmender Kettenlänge bei den Polyglutamaten abnimmt [104, 105]. Der *Lactobacillus rhamnosus* zeigt für die Mono-, Di- und Triglutamate dennoch eine vergleichbare Aktivität [105], weshalb eine Dekonjugation zu den Diglutamaten mit Hühnerpankreatin ausreicht. Doch es gibt nicht nur Unterschiede im Ansprechen auf die Polyglutamaten in Abhängigkeit von der Kettenlänge, sondern auch auf die Monoglutamate der verschiedenen Vitamere [36–38]. Dieser Unterschied soll sich bei einer ausreichenden Pufferung und einem pH-Wert von 6,2 wieder aufheben [36].

Das mikrobiologische Assay bietet auch die Möglichkeit, die Analyse im Mikrotiterplattenformat durchzuführen. Diese Variante ist besonders für Labore ohne Expertise in mikrobiologischen Techniken geeignet [38]. Bei Verwendung von Chloramphenicol resistenten Mikroorganismen wird sogar die Notwendigkeit der Sterilisation der Reagenzien und das keimfreie Arbeiten obsolet [120].

#### HPLC-Methoden

Messungen über HPLC-UV [29, 30, 43, 48, 77], -FLD [29, 30, 43, 47, 48] oder -MS [121, 122] bzw. -MS<sup>n</sup> [24, 26, 27, 31–33, 46, 58, 78, 123, 124] bieten die Möglichkeit, die einzelnen Vitamere zu detektieren und zu quantifizieren. Es existieren auch einzelne Methoden zur Kopplung

<sup>1</sup>Laut SHANE et al. [104] soll das (6*S*)-10-HCO-H<sub>4</sub>folat biologisch aktiv sein. Dafür wäre eine Änderung der Konfiguration am C<sup>6</sup>-Atom notwendig. Vermutlich wurde die Bezeichnung falsch gewählt.



von HPLC und mikrobiologischem Assay (HPLC-MA) [125, 126]. Eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung aller Vitamere mit allen ihren Polyglutamaten nebeneinander ist mit UV und FLD kaum zu erreichen, weshalb meist eine Dekonjugation zu den Monoglutamaten z.B. mit Rattenplasma/-serum oder Schweinenieren stattfinden muss. Aber um das Polyglutamatspektrum zu erhalten, können alle Vitamere auch in 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat umgewandelt werden und anschließend die Polyglutamate dieses einen Vitamers analysiert werden [45, 47, 49, 127].

Eine Alternative bietet die Tandemmassenspektrometrie, mit der es auf Grund der großen Selektivität möglich ist, alle Vitamere mit ihren jeweiligen Polyglutamaten parallel zu erfassen [50]. Durch diese Methode konnte z.B. gezeigt werden, dass die einzelnen Vitamere ein unterschiedliches Polyglutamatspektrum aufweisen.

Außerdem ist die Tandemmassenspektrometrie durch ihre hohe Selektivität weniger anfällig für Störpeaks, so dass ein Clean-up über die Affinitätschromatographie mit folatbindendem-Protein, wie sie bei UV- und Fluoreszenz-Detektoren häufig angewendet wird [29, 30, 43, 47, 48, 77], nicht mehr notwendig ist [24]. Zusätzlich ist es bei der Detektion mit einem Massenspektrometer möglich, während der Analytik die entsprechenden isotoopenmarkierten Standards zuzugeben [24, 26, 27, 31–33, 46, 78] - die sogenannte Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) - und somit Verluste bei der Aufarbeitung oder Matrixeffekte zu kompensieren. Denn diese Isotopologen weisen die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften auf [128]. Häufig werden nur strukturverwandte Interne Standards verwendet, z.B. Methotrexat [50, 124, 129] oder die Quantifizierung erfolgt über den isotoopenmarkierten Standard eines anderen Folats [78]. Dies bietet sich vor allem bei der Analyse der Polyglutamate an. Dort werden entweder die isotoopenmarkierten Monoglutamate verwendet [46] oder die Polyglutamate von PteGlu [50].

Für die chromatographische Trennung werden häufig RP-Phasen verwendet. Der Nachteil ist, dass für die Retention entweder ein saurer pH-Wert eingestellt werden muss, für die Massenspektrometrie z.B. mit Ameisensäure [24, 26, 27, 31, 46, 78, 102, 124] oder Essigsäure [33, 121, 122], oder Ionenpaarreagenzien zugegeben werden müssen [15, 50, 59, 107], die sich bei Verwendung eines MS-Detektors häufig nicht eignen [130]. Durch den sauren pH-Wert kann es jedoch zu Umwandlungen der Folate auf der HPLC-Säule kommen [58], so dass die ursprüngliche Folatverteilung nicht erfasst werden kann. Neben der Chromatographie auf Umkehrphasen (Reversed Phase) wurde auch schon die Hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic Liquid Chromatographie - HILIC) verwendet [129]. Hierfür musste mit Ammoniumacetat im Eluenten ein pH-Wert von 6,9 eingestellt werden.

### Vergleich zwischen HPLC und MA

In der Literatur ist des Öfteren der Vergleich zwischen HPLC und mikrobiologischem Assay zu finden. Anhand einer Zusammenfassung von HYUN und TAMURA [28] zeigt sich, dass das mikrobiologische Assay dabei meist die höheren Gesamtfolatgehalte ergibt. Doch teilweise stimmen die Werte auch wieder gut überein, wie bei PFEIFFER et al. zu sehen ist [77]. Dort wurden die identischen Proben sowohl über HPLC/UV als auch über das mikrobiologische Assay untersucht. So wurde es auch bei RUGGERI et al. [29] gehandhabt. Die Letztgenannten fanden aber 24 - 52 % niedrigere Resultate über HPLC im Vergleich zum mikrobiologischen Assay. Bei KARILUOTO et al. [30] und RYCHLIK et al. [31], die ebenfalls von geringeren HPLC-Ergebnissen berichteten, wurde hingegen nicht das gleiche Probenmaterial untersucht.

Der Grund für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden wird u.a. in unidentifizierten Folaten bzw. folataktiven Substanzen gesehen, die über das mikrobiologische Assay erfasst werden, nicht aber über HPLC-Methoden [29,30]. Denn trotz Affinitätschromatographie mit folatbindendem Protein waren zusätzliche Peaks im Chromatogramm zu erkennen [29].

## 2.4 Bioverfügbarkeit

### 2.4.1 *in vivo*-Studien

Bei der Bioverfügbarkeit von Folaten handelt es sich um den Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen Folate, der absorbiert wird und dadurch für metabolische Vorgänge zur Verfügung steht oder gespeichert werden kann [131,132]. Nahrungsfolate sollen eine geringere Bioverfügbarkeit als PteGlu (in Form von Supplementen oder angereicherten Lebensmitteln) aufweisen [131], weshalb sogenannte „Folatequivalente“ definiert wurden [133]:

$$\text{Folatequivalente} = \text{Lebensmittelfolate} + 1,7 \cdot \text{PteGlu}_{\text{mit Nahrung}} \quad (2.1)$$

Der Faktor von 1,7 geht zum einen auf die Annahme zurück, dass Lebensmittelfolate im Mittel nur zu 50 % bioverfügbar sind [134], und zum anderen darauf, dass PteGlu bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme ( $\text{PteGlu}_{\text{mit Nahrung}}$ ) eine um 15 % verringerte Bioverfügbarkeit aufweist als in Abwesenheit von Lebensmitteln [77]. Die Nahrung hat dementsprechend einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Folaten, obwohl über das Ausmaß keine Einigkeit besteht, bzw. dies von den verwendeten Lebensmitteln abhängt. WINKELS et al. [135] ermittelten eine Bioverfügbarkeit der Folate aus Früchten, Gemüse und Leber im Vergleich zu PteGlu von 80 %. BABU et al. [136] geben für die meisten Lebensmittel zwar eine durchschnittliche Bioverfügbarkeit der Folate von über 50 % (37 - 72 %) an, sie konnten für Hefe hingegen nur eine Bioverfügbarkeit von 10 % ermitteln. Im Gegensatz dazu wurde von HANNON-FLETCHER et al. [137] eine Bioverfügbarkeit für Folate in Hefe von 59 % angegeben und in Spinat dafür nur von 30 % (statt 63 % [136]). In einer Studie von MÖNCH et al. [19,138] wurde in Abhängigkeit vom Ansatz bzgl. der Definition des körpereigenen Folatspiegels<sup>2</sup> für Spinat wiederum eine Bioverfügbarkeit von 90 % [19] bzw. 73 % [138] ermittelt und für zwei weitere Lebensmittel, Weizenkeime und Camembert, Bioverfügbarkeiten von 71 % und 31 % [19] bzw. 33 % und 9 % [138]. Diese Werte stehen der Studie von TAMURA und STOKSTAD [139] gegenüber, die für Weizenkeime eine Bioverfügbarkeit von 30 % ergab.

Es gibt verschiedene Faktoren, die sich auf die Bioverfügbarkeit der Folate auswirken können. Neben der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der einzelnen Vitamere (Monoglutamate) [18], ist hier auch die Dekonjugation der Polyglutamate zu den Monoglutamaten zu nennen. Zwar existieren laut KONINGS et al. [100] keine Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Poly- und Monoglutamaten, doch GREGORY et al. [140] zufolge weisen die Polyglutamate im Vergleich zu den Monoglutamaten sogar eine wesentlich geringere Bioverfügbarkeit auf. Dies konnte auch von MELSE-BOONSTRA et al. [141] bestätigt werden.

<sup>2</sup> [19]: Der geringste Wert der Folat-Plasmakurve wurde als körpereigenes Grundlevel angesehen und von allen anderen Werten abgezogen, [138]: Das jeweilige Plasmalevel vor Verzehr der Lebensmittel bzw. der Folsäurelösung wurde als körpereigenes Grundlevel angesehen. Dies führte dazu, dass das Plasmalevel teilweise unter das definierte Grundlevel sank und deshalb nicht mit berücksichtigt wurde.

Durch die Anwesenheit von Lebensmitteln kann die Bioverfügbarkeit von Polyglutamaten jedenfalls verschlechtert werden [139], denn Nahrungsbestandteilen wie Citrat und Ascorbinsäure wird eine inhibierende Wirkung auf die Bürstensaummembrandekongjugase zugeschrieben [13]. Doch zugleich kann Ascorbinsäure die Bioverfügbarkeit von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat auch erhöhen [127].

Die Folate könnten auch an Matrixbestandteile gebunden bleiben [17] und somit nicht zur Absorption zur Verfügung stehen. Für folatbindende Proteine (FBP) aus Milch konnte diese Vermutung, die sich aus einem *in vitro*-Versuch mit FBP-Zusatz zu Joghurt ergeben hat [142], *in vivo* nicht bestätigt werden [143]. Ballaststoffe führten bei PteGlu ebenfalls zu keiner Verschlechterung der Absorption [144,145] und es kam weder zu einer physikalischen noch zu einer chemischen Bindung von PteGlu durch verschiedene Ballaststoffe [144,145]. Letzteres steht zwar im Gegensatz zu ÖHRVIK [146–148], die eine Verminderung der Biozugänglichkeit durch ballaststoffreiche Lebensmittel ermittelt hat, doch ließen *in vivo*-Ergebnisse nicht auf einen Einfluss von Ballaststoffen auf die Bioverfügbarkeit schließen. Im Gegenteil, bei KEAGY et al. hat Weizenkleie die Absorption von PteGlu im Vergleich zu PteGlu<sub>7</sub> sogar verbessert [149]. Ein Effekt auf PteGlu<sub>7</sub> konnte dabei nicht festgestellt werden. Auf Grundlage einer Korrelation zwischen dem Folatstatus und der Ballaststoffaufnahme wird sogar die Vermutung aufgestellt, dass Ballaststoffe die Biosynthese im Darm fördern, wodurch es zu einem Anstieg der Folatserumkonzentration kommt, und Ballaststoffe somit zu einem verbesserten Folatstatus beitragen [150].

Eine weitere Möglichkeit, wie Nahrungsbestandteile die Bioverfügbarkeit beeinflussen könnten, besteht in der Inhibition der Absorption durch Matrixbestandteile. Hier sind z.B. die Catechine aus grünem und schwarzem Tee zu nennen, die vermutlich den Folattransporter inhibieren [151].

Ein zusätzlicher Aspekt ist die Konfiguration der Folate am C<sup>6</sup>-Atom. Dies spielt aber vermutlich nur im Bereich der Anreicherung von Lebensmitteln und in der Forschung eine Rolle, denn in der Natur sollen nur die biologisch aktiven Stereoisomere vorkommen [12], welche für die Vitaminwirkung im Menschen notwendig sind [11]. Doch auch unnatürliche Stereoisomere können eine biologische Aktivität aufweisen ((6R)-5-HCO-H<sub>4</sub>folat und (6S)-5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat: Bioaktivität von 14 - 50 %) [39]. Es wird angenommen, dass (6R)-5-HCO-H<sub>4</sub>folat und (6S)-5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat sich pH-bedingt im Darm zu 10-HCO-H<sub>4</sub>folat umwandeln (bzw. (6R)-5-HCO-H<sub>4</sub>folat im Magen zuvor zu (6S)-5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat) und dieses weiter zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat oxidiert wird, wobei das Stereozentrum an C<sup>6</sup> verloren geht. Durch die AICAR-Transformylase entsteht H<sub>2</sub>folat [152], welches, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, weiter metabolisiert werden kann.

#### 2.4.2 *in vitro*-Simulationen

Zur Thematik der Bioverfügbarkeit wurden nicht nur *in vivo*-Studien durchgeführt, sondern auch *in vitro*-Studien. In diesen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Glutamat-Carboxypeptidase II (Bürstensaummembrandekongjugase) durch Lebensmittel bzw. Bestandteile aus Lebensmitteln inhibiert werden kann [13–15]. Dazu zählen u.a. organische Säuren, wie Citronensäure, Äpfelsäure, Phytinsäure und Ascorbinsäure bzw. deren Salze [13]. Bei den Lebensmitteln sind vor allem Hülsenfrüchte, Orangensaft und Tomaten zu nennen [14]. Mehl, Eier, Milch, Kohl, Blumenkohl und Eisbergsalat zeigten nur wenig Einfluss auf die Aktivität der Bürstensaummembrandekongjugase, wohingegen SEYOUM und SELHUB [15] beim Eisbergsalat eine deutlich schlechtere Dekongjugation erhalten haben, als

beim Orangensaft. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass eine vollständige Dekonjugation in Anwesenheit von Bestandteilen aus Lebensmitteln unterbunden werden kann, was einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Folate haben könnte.

Neben dem Aspekt der Dekonjugation wurde auch die Stabilität von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat im Magensaft [153] untersucht. Bei einem pH-Wert von 1,47 und einem niedrigen endogenen Ascorbinsäuregehalt wurden beide Folate in pABG gespalten. Nach Zugabe von 58 µmol/l Ascorbinsäure (moderater endogener Gehalt) konnte das 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat stabilisiert werden, wohingegen 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat zum Teil zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat reduziert wurde und der andere Teil dennoch zur pABG abgebaut wurde.

Eine Kombination aus Peptidverdau bei pH 2 und anschließender Dekonjugation mittels aufgereinigter Bürstensaummembrandekongugase erfolgte durch SEYOUM und SELHUB [15] am Beispiel verschiedener Lebensmittel. Der Proteinverdau ergab Verluste zwischen 14 - 73 %. Der Monoglutamatgehalt lag trotz Dekonjugation nur bei 1 - 25 %, konnte aber durch Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie vor der Dekonjugation auf 6 - 57 % erhöht werden. Dies unterstützt, dass Bestandteile in Lebensmitteln die Aktivität der Bürstensaummembrandekongugase beeinflussen. Die Ergebnisse zur Stabilität und Dekonjugation konnten in Form eines Folat-Verfügbarkeits-Indexes (erhaltener Monoglutamatgehalt) sogar mit Bioverfügbarkeitsdaten von BABU und SRIKANTIA [136] und TAMURA und STOKSTAD [139] korreliert werden ( $R^2 = 0,529$ ).

Ein weitaus aufwendigeres Design für *in vitro*-Studien bildet das TNO-Intestinal-Modell (TIM) - ein dynamisches, computergesteuertes Modell zur Simulation des Magens und des Dünndarms [154]. Auf Grundlage von mathematischen Modellen, welche auf *in vivo*-Daten beruhen, wird die Verweilzeit im Magen und Darm simuliert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt nach voreingestellten Kurven und die Konzentration der Gallensalze wird, basierend auf Literaturdaten, über die Zeit hinweg variiert. Zusätzlich wird die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt simuliert und die Absorption der Nährstoffe erfolgt durch Diffusion (semipermeable Membranen). Dieses Modell wurde auch für die Simulation der Verdauung von Folaten angewandt [142, 147, 148, 155, 156]. Da sowohl die Mono- als auch die Polyglutamate die Membranen passieren können, erfolgte die Dekonjugation jedoch erst im Nachhinein [155]. Mit Hilfe dieses Modells wurde z.B. der Einfluss von FBP in Milch und Joghurt untersucht [142, 155]. Dabei wurde PteGlu in Joghurt stärker von den FBPs gebunden als 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bzw. wurde PteGlu in Milch im Gegensatz zu 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat überhaupt gebunden. Wie in Abschnitt 2.4.1 schon erwähnt wurde, konnte der Einfluss von FBP auf PteGlu in Milch *in vivo* aber nicht bestätigt werden [143].

Um auch die Absorption im Darm zu simulieren wurde von ÖHRVIK et al. [148] an die Verdauungssimulation mittels TIM die Untersuchung der Aufnahme in Caco-2-Zellen angeschlossen. Die Aufnahme von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aus Brot lag niedriger als bei einer Standardlösung, weshalb ein Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Absorption nicht auszuschließen ist. VERWEI et al. [156] entwickelten aus dem *in vitro*-Modell TIM in Kombination mit Caco-2-Zellen sogar ein Vorhersagemodell für die Serumkonzentration von Folaten. Dafür wurde ein mathematisches Modell verwendet, welches die *in vitro*-Daten mit dem kinetischen Verhalten der Folate im menschlichen Körper nach Aufnahme einer Mahlzeit korreliert.

## Teil II

# Ergebnisse und Diskussion



## 3 Methodenoptimierung und -vergleich

### 3.1 Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Methode

#### 3.1.1 5,10-Methenyltetrahydrofolat und 10-Formyldihydrofolat in Lebensmitteln

In der Literatur sind neben den 5 Folaten, die bisher in der Arbeitsgruppe mittels SIVA analysiert wurden (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, H<sub>4</sub>folat, PteGlu), noch weitere in Lebensmitteln vorkommende Folate beschrieben. Dabei handelt es sich um 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Die Relevanz dieser beiden Folate für die Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes wurde daraufhin untersucht.

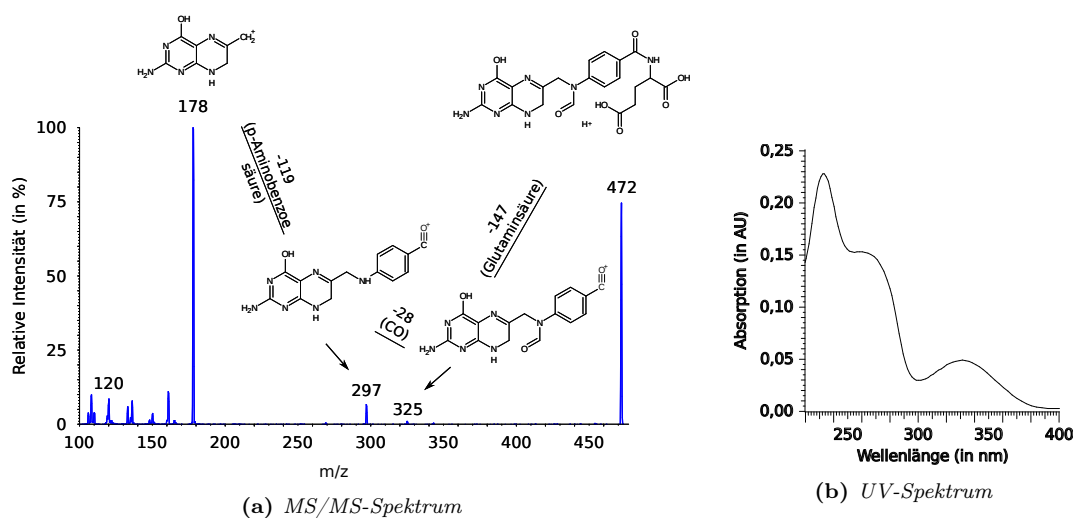
#### Synthese von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat

Die Synthese von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat erfolgte in Anlehnung an mehrere Publikationen [58, 77, 157, 158]. Jedoch anstatt vom 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat auszugehen, wie es in der Publikation von PFEIFFER et al. beschrieben steht [77], wurde das 10-HCO-H<sub>4</sub>folat direkt eingesetzt und in einem Tris-HCl-Puffer bei pH 8,5 [58] mittels Luftsauerstoff oxidiert. Nach 2 - 3 h konnte nur eine Umsetzung von ~ 50 % erreicht werden, woraufhin die Dauer der Oxidation auf 20 h erweitert wurde, so dass sich eine Ausbeute von 90 % ergab. Zur Stabilisierung bzw. zum Schutz vor weiterer Oxidation zu 10-HCO-PteGlu wurde der Syntheselösung im Anschluss entweder Mercaptoethanol [157] oder Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Die Lösung wurde anschließend mit MES-Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Die Reinheit des Syntheseproduktes wurde durch LC-MS/MS bestimmt. Hierfür wurde nicht oxidiertes 10-HCO-H<sub>4</sub>folat als 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und weiter oxidiertes 10-HCO-H<sub>2</sub>folat als 10-HCO-PteGlu bestimmt. Da 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat bei pH 5 in Anwesenheit von Reduktionsmitteln in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat übergeht, wurde auch dieses Folat quantifiziert. Der Anteil dieser Folate im Syntheseprodukt nahm 10 % ein, wobei 6 % auf 10-HCO-PteGlu, 3 % auf 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 1 % 5-HCO-H<sub>4</sub>folat entfielen.

Zur Bestätigung des synthetisierten Produktes wurden UV-Spektren bei pH 3,3 (HPLC-DAD) (Abbildung 3.1b) und 7,4 aufgenommen und mit denen der Literatur verglichen (Diskussion S. 31 f.). Die UV-Spektren ließen ein absolutes Maximum bei einer Wellenlänge von 233 nm, ein lokales Maximum bei 331 nm und ein absolutes Minimum bei 300 nm erkennen. Im HPLC-DAD-Lauf zeigte sich bei einer Konzentration von ~ 10 µg/ml (Stammlösung) eine zusätzliche Schulter bei 260 nm.

Zur weiteren Bestätigung wurde ein Produkt-Ionen-Spektrum aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 3.1a gezeigt. Charakteristisch sind die Fragmente mit dem *m/z*-Verhältnis 178, 297, 325 und 120. Der Basispeak und damit das stabilste Fragment ist dasjenige mit dem *m/z*-Verhältnis von 178.



**Abbildung 3.1:** UV- und MS-Spektren von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. a) Produkt-Ionen-Spektrum (Kollisionsenergie CE von 5 - 130 V, mit Vorschlägen zur Fragmentierung, b) UV-Spektrum während eines HPLC-DAD-Laufs mit 0,1%iger Essigsäure und Methanol.

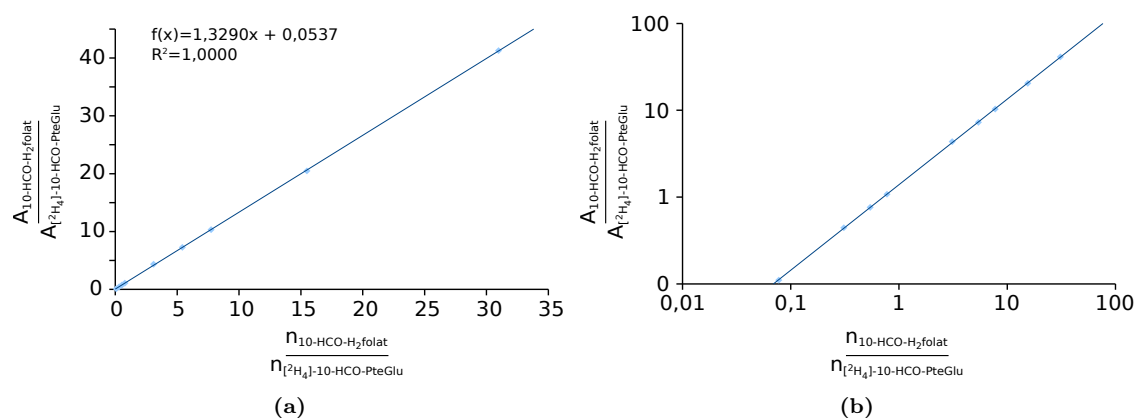
### Quantifizierung und Matrixeffekte

Die Quantifizierung von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat erfolgte über strukturähnliche [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierte interne Standards. Für 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurde [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat als interner Standard ausgewählt, da diese beiden Substanzen fast coeluierten und eventuell auftretende Matrixeffekte somit kompensiert werden mussten. Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat gab es für keine der verwendeten HPLC-Säulen coeluiierende Folate. Auf Grund der größten strukturellen Ähnlichkeit wurde [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu als interner Standard ausgewählt. Diese Substanz eluierte jedoch erst nach 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, weshalb anhand verschiedener Matrices auch auf die Anwesenheit von Matrixeffekten geprüft wurde.

Die Quantifizierung erfolgte über Responsefaktoren, die auf Ausreißer analysiert wurden. Am Beispiel von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu als internem Standard, ist in Abbildung 3.2 zu erkennen, dass über einen großen Bereich nichts gegen einen linearen Zusammenhang einzuwenden war. Dies konnte anhand der logarithmischen Auftragung und durch einen Test nach Mandel bestätigt werden. Es ist aber zu erwähnen, dass es bei einer hohen Analytkonzentration notwendig war, die Lösung zu verdünnen, da im hohen Konzentrationsbereich keine Linearität mehr gegeben war. Dies kann entweder auf den limitierenden linearen Bereich des Detektors oder die Kapazität für die Ionisation zurückgeführt werden. Die Responsefaktoren von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat für die verschiedenen HPLC-Säulen und für zwei verschiedene Puffer sind zusammen mit den Responsefaktoren der anderen Folate, die ebenfalls auf Ausreißer und Linearität überprüft wurden, in Tabelle 9.2 im Abschnitt 9.2.2 aufgeführt.

Zusätzlich wurde auf die Anwesenheit von Matrixeffekten hin untersucht. Dafür wurde die Methode der *postcolumn infusion*-Technik angewendet [130, 159–162]. Die Lebensmittel wurden ohne Zugabe von Rattenserum aufgearbeitet, so dass der Anteil an Monoglutamaten des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats vernachlässigbar klein bzw. nicht detektierbar war. Dies erwies sich als notwendig für die Fälle, bei denen die entsprechende Matrix bezogen auf den Gesamtfolatgehalt nicht vollständig frei vom entsprechenden Vitamer war. Diese Extrakte





**Abbildung 3.2:** Responsegerade von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu als internem Standard: Stoffmengenverhältnisse (x-Achse) gegen Peakflächenverhältnisse (y-Achse) in linearer (a) und in logarithmischer Auftragung (b).

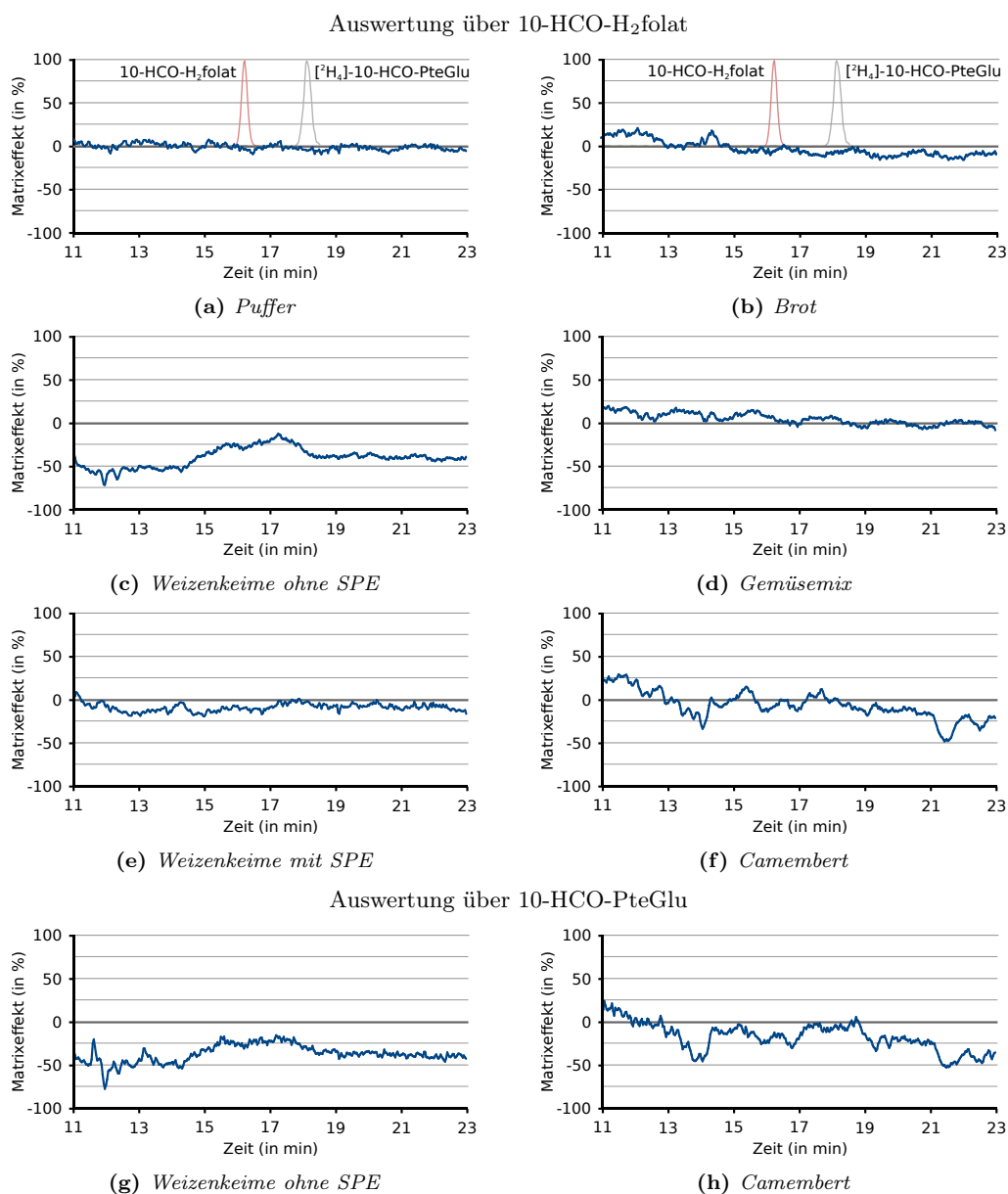
wurden im Vergleich zu einer reinen Elutionspufferlösung vermessen, wobei eine Standardlösung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats nach der HPLC kontinuierlich in den Eluentenstrom der HPLC zugegeben wurde, um ein kontinuierliches Signal in der MS/MS zu erzeugen. Würden Matrixbestandteile eluieren, welche die Ionisation des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats beeinflussen, wäre dies an einem Signalanstieg oder Signalabfall des sonst relativ kontinuierlichen MS-Signals zu erkennen gewesen. Die Matrixprofile für verschiedene Lebensmittel (bzw. bei Weizenkeimen die Lösungen der Verdauungssimulation mit und ohne SPE) sind in Abbildung 3.3a-f dargestellt. Die Matrixprofile wurden zusätzlich auch für den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu aufgenommen, indem 10-HCO-PteGlu, stellvertretend für [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu, parallel mit 10-HCO-H<sub>2</sub>folat kontinuierlich in den Eluentenstrom injiziert wurde. Zwei dieser Profile sind in Abbildung 3.3g und h dargestellt.

Um die methodenbedingten Variationen der Methode der *postcolumn infusion*-Technik zu ermitteln, wurden zwei Pufferinjektionen miteinander verglichen (Abbildung 3.3a). Über das gesamte Profil konnte eine Standardabweichung von 4 % ermittelt werden, bzw. von 5 % mit 10-HCO-PteGlu als Analyten. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Profile über 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-PteGlu einen ähnlichen Verlauf nahmen (Abbildung 3.3c und g bzw. f und h).

Wie in Abbildung 3.3c für die Weizenkeime ohne Clean-up zu sehen ist, bewirkten reine Lebensmittelextrakte vor allem am Anfang des HPLC-Laufes eine starke Suppression von >50%. Durch das Clean-up mittels SPE wurden dann einige der Matrixbestandteile abgetrennt und die Matrixeffekte damit deutlich verringert. Das Signal sank zwar an einigen Stellen immer noch um 18 %, aber im Elutionsbereich von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat nur um  $10 \pm 2\%$ <sup>1</sup> und im Elutionsbereich von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu um  $6 \pm 2\%$ , wobei zu beachten ist, dass auch für den Puffer in diesen Bereichen Matrixeffekte von  $-3 \pm 3\%$  und  $-4 \pm 2\%$  ermittelt wurden.

Für Camembert sind einzelne Bereiche zu erkennen, die auf etwas stärkere Matrixeffekte schließen lassen, doch im Elutionsbereich von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu wurden vergleichbare Matrixeffekte von  $-7 \pm 4\%$  und  $-8 \pm 4\%$  abgeschätzt. Für Brot und den Gemüsemix sind weitestgehend kontinuierliche Profile zu sehen, mit Matrixeffekten

<sup>1</sup>Matrixeffekte in % ± Standardabweichung s



**Abbildung 3.3:** Zeitprofile der durch coeluerende Komponenten von Lebensmittelextrakten bedingte Matrixeffekte auf die Signalintensität von Folaten im LC-MS/MS-Lauf

von  $-4 \pm 3\%$  und  $-5 \pm 2\%$  für Brot und  $4 \pm 3\%$  und  $-1 \pm 3\%$  für den Gemüsemix.

Für die Matrix Brot wurde auch eine weitere Variante zur Untersuchung von Matrixeffekten angewandt. Im Rahmen der Bestimmung der Nachweisgrenze für das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde analytfreies Brot (Vollkornbrot) aufgearbeitet und erst im Anschluss mit 10-HCO-H<sub>2</sub>folat dotiert (4 Level). Es folgte ein Vergleich mit reinen Standardlösungen der gleichen Konzentration. Diese Vorgehensweise entspricht dem Ansatz von MATUSZEWSKI et al. [163] zur Bestimmung der Matrixeffekte ME:

$$ME(in\%) = \frac{\text{Gehalt}_{\text{Matrix}}}{\text{Gehalt}_{\text{Lösung}}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

bzw. normiert

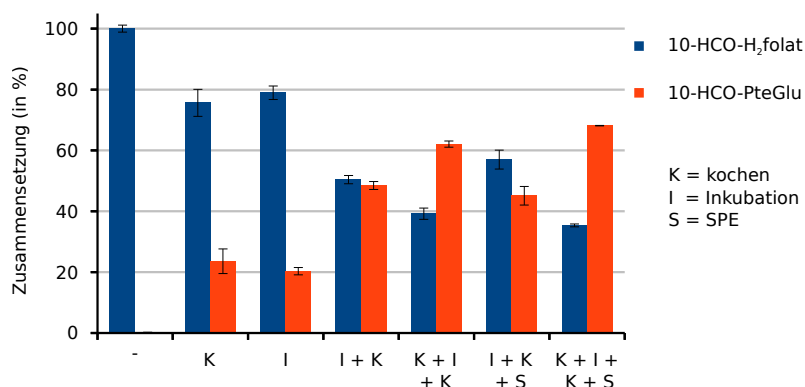
$$ME(in\%) = \left( \frac{\text{Gehalt}_{\text{Matrix}}}{\text{Gehalt}_{\text{Lösung}}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (3.2)$$

Für die vier Level ergab sich im Mittel ein ME-Wert von 104 % bzw. normiert von 4 %.

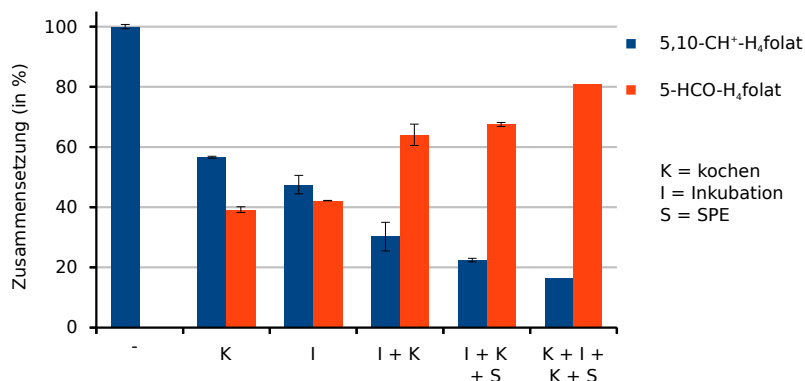
### Umlagerungen während der Aufarbeitung

Sowohl für 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat als auch für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat ist aus der Literatur bekannt, dass diese Folate zu Umlagerungen bzw. Oxidationen neigen. Bei 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat sind diese abhängig vom pH-Wert und der Anwesenheit von Reduktionsmitteln, wobei im sauren pH-Bereich 5-HCO-H<sub>4</sub>folat entsteht und im Basischen 10-HCO-H<sub>4</sub>folat. Das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat kann einer Oxidation zu 10-HCO-PteGlu unterliegen. Das Ausmaß dieser Umlagerungen bzw. Oxidation während der Analyse der Folate sollte näher untersucht werden. Dafür wurden Standardlösungen beider Folate den einzelnen Schritten der Analytik unterzogen und die Wiederfindung bzw. die Menge an Umlagerungs-/Oxidationsprodukten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 und 3.5 dargestellt.

Nachdem 10-HCO-H<sub>2</sub>folat in MES-Puffer (mit DTT) bei pH 5 für 10 min gekocht wurde, hatte sich 24 ± 4 % des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats in 10-HCO-PteGlu umgewandelt und 76 ± 4 %



**Abbildung 3.4:** Zusammensetzung einer 10-HCO-H<sub>2</sub>folat-Lösung bei verschiedenen Aufarbeitungsschritten in Anwesenheit von DTT - 10 min kochen, Inkubation über Nacht bei 37 °C und SPE.



**Abbildung 3.5:** Zusammensetzung einer 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat-Lösung bei verschiedenen Aufarbeitungsschritten - 10 min kochen, Inkubation über Nacht bei 37 °C und SPE.

verblieben als 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Eine Inkubation bei 37 °C über Nacht ergab eine ähnliche Umsatzrate. Es bildete sich  $20 \pm 1 \%$  10-HCO-PteGlu und  $79 \pm 2 \%$  des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats blieb erhalten. Der Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen ist nicht signifikant. Die Kombination aus beiden Schritten ergab eine verstärkte Oxidation zu 10-HCO-PteGlu, so dass nur noch  $50 \pm 1 \%$  des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats in der Lösung verblieben. Die Vitamendistribution nach einer Dreifachbehandlung, bei der ein weiterer Kochschritt zu Beginn erfolgte, betrug  $44 \pm 9 \%$  10-HCO-H<sub>2</sub>folat und  $58 \pm 7 \%$  10-HCO-PteGlu bzw. nach Streichen eines ausreißerverdächtigen Wertes bzw. Wertepaares<sup>2</sup>  $39 \pm 2 \%$  10-HCO-H<sub>2</sub>folat und  $62 \pm 1 \%$  10-HCO-PteGlu. Bei einer vollständigen Aufarbeitung mit SPE und nur einem Kochschritt konnte am Ende noch  $57 \pm 3 \%$  des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats detektiert werden und entsprechend  $45 \pm 2 \%$  10-HCO-PteGlu. Als ein weiterer Kochschritt hinzukam, kehrte sich das Verhältnis von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat zu 10-HCO-PteGlu um ( $35,4 \pm 0,5 \%$  10-HCO-H<sub>2</sub>folat und  $68,1 \pm 0,3 \%$  10-HCO-PteGlu).

In Anwesenheit von Mercaptoethanol ergaben sich für den gesamten Prozess vergleichbare Ergebnisse zu DTT. Die Wiederfindung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats lag bei  $53 \pm 1 \%$  (einmaliger Kochschritt) und  $36 \%$  (zwei Kochschritte).

5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wandelte sich nach einem 10minütigem Kochschritt in MES-Puffer bei pH 5 zu  $39 \pm 1 \%$  in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat um, wobei die Wiederfindung als 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat bei  $56,6 \pm 0,3 \%$  lag. Sehr geringe Mengen an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-PteGlu in der Lösung waren nicht ganz auszuschließen, spielten aber nur eine sehr untergeordnete Rolle. Bei der Inkubation über Nacht (37 °C) war die Wiederfindung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats noch geringer ( $47 \pm 3 \%$ ) und die entstandene Menge an 5-HCO-H<sub>4</sub>folat dementsprechend höher ( $42,2 \pm 0,1 \%$ ). Die Kombination dieser beiden Aufarbeitungsschritte führte zu einer ausgeprägten Umwandlung zum 5-HCO-H<sub>4</sub>folat ( $64 \pm 4 \%$ ), so dass nur noch  $30 \pm 5 \%$  5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat in der Lösung verblieb. Als noch die SPE-Aufreinigung hinzu kam, führte das zwar nicht zu einem signifikanten Anstieg des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats ( $67 \pm 1 \%$ ), aber scheinbar zu einer weiteren Verringerung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats ( $p = 0,027$ ). Bei einer vollständigen Aufarbeitung mit zwei Kochschritten lag die direkte Wiederfindung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats nur noch bei  $17 \%$ , aber auf Grund der Umwandlung zum 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu  $81 \%$  doch insgesamt bei  $98 \%$ .

## Validierung

**Nachweisgrenzen** Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für die 7 Folate wurden nach VOGELGESANG und HÄDRICH [164, 165] bestimmt. Es erwies sich jedoch als schwierig, eine analytfreie Matrix zu finden. Ein Brot (Vollkornbrot), welches erst nach mehrmaligem Einfrieren, Auftauen und Oxidation an der Luft sowohl frei von H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat war, wurde für diesen Zweck verwendet. Für 4 verschiedene Dotierungslevel wurde jeweils dreimal 1,5 g der Brotmatrix eingewogen, entsprechend dotiert und aufgearbeitet. Dabei wurde jedoch nur Hühnerpankreatin zugegeben, um eventuell doch noch vorhandene Mengen an Folaten nicht bis zu den Monoglutamaten

<sup>2</sup>Die jeweiligen Werte für den Anteil an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-PteGlu werden auf Grund der größeren Abweichung als Ausreißer angesehen. Dies konnte zwar nicht durch Ausreißertests mit einer statistischen Sicherheit von 95 % bestätigt werden, sondern nur mit einer statistischen Sicherheit von  $P = 90 \%$  für den Anteil an 10-HCO-PteGlu (Ausreißertest nach Dixon), doch unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der anderen Ergebnisse wurde in diesem Fall diese etwas niedrigere statistische Sicherheit als ausreichend angesehen und das gesamte Wertepaar daraufhin verworfen.

**Tabelle 3.1:** Dotierungsvarianten für die Bestimmung der Nachweisgrenze am Beispiel von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bzw. [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat.

Dotierungsvariante	Nachweisgrenze (in µg/100 g)
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat in Brot	0,072
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat in Brot	0,065
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat in Lösung	0,043
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat in Lösung	0,060

zu dekonjugieren. Durch die zusätzlichen Enzyme des Hühnerpankreatins sollte die Matrix aber aufgeschlossen werden. Das Brot enthielt dennoch gewisse Mengen an 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu und PteGlu. Aus diesem Grund wurden 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, PteGlu und zusätzlich auch 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat in Form der [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierten Substanzen zugegeben. Zusätzlich wurde überprüft, ob überhaupt große Abweichungen zwischen Ergebnissen mit und ohne Matrix bestehen oder ob die Bestimmung auch in reinen Lösungen durchgeführt werden kann, da 10-HCO-PteGlu nicht als [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierter Standard vorhanden war.

Am Beispiel von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat wurden die verschiedenen Varianten für die Dotierung miteinander verglichen (Tabelle 3.1). Es ist zu erkennen, dass zwischen der Nachweisgrenze, die über das unmarkierte 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bestimmt wurde und der Nachweisgrenze, die über das [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bestimmt wurde, kein großer Unterschied bestand. Die Werte für die Nachweisgrenzen, die in Lösung, also ohne Matrix, bestimmt wurden, sind etwas niedriger, doch immer noch vergleichbar. Außerdem sollten die Nachweisgrenzen auch eher als Anhaltspunkte betrachtet werden, da die Intensität des Massenspektrometers selbst gewissen Schwankungen unterliegt und sich damit tagesabhängige Nachweisgrenzen ergeben.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden daraufhin auch für die anderen Folate bestimmt. Bei den Bestimmungsgrenzen sind jeweils drei Kriterien nach VOGELGESANG und HÄDRICH zu berücksichtigen, wobei sich die Bestimmungsgrenze dann aus dem höchsten Wert der drei Berechnungen ergibt, da nur so alle drei Kriterien erfüllt werden.

Für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat konnte die übliche Dotierungsvariante mit unmarkierten Standards verwendet werden, wohingegen 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und PteGlu in Form der [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierten Analyten zum Brot zugegeben werden mussten. Für 10-HCO-PteGlu stand kein [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierter Standard zur Verfügung, so dass für dieses Folat die Bestimmung der Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze in reiner Lösung erfolgte.

Für die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde die Brotmatrix ohne die Zugabe des Analyten aufgearbeitet. Die Dotierung erfolgte erst nach der SPE. Dieses Verfahren wurde auf Grund der Oxidation des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats zu 10-HCO-PteGlu während der Aufarbeitung gewählt. Die Dotierung vor der Aufarbeitung hätte die Wiederfindung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats mit berücksichtigt, die Quantifizierung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats über den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu erfasst jedoch nur die Menge, die am Schluss in der aufgereinigten Probenlösung vorhanden ist.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurden nur anhand von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat abgeschätzt, da 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat noch stärkere Umlagerungen als 10-HCO-H<sub>2</sub>folat aufwies. Auf Grund der ähnlichen Intensität von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, wurde von vergleichbaren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ausgegangen. Die Ergebnisse für die drei Validierungsparameter aller sieben Folate sind in Tabelle 3.2 zu-

**Tabelle 3.2:** Nachweis- (NWG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenzen (BG) (in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), bei einer Einwaage von 1,5 g

Folat	NWG	EG	BG
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat <sup>1</sup>	0,07	0,14	0,26
5-HCO-H <sub>4</sub> folat <sup>1,2</sup>	0,11	0,22	0,38
10-HCO-PteGlu <sup>3</sup>	0,08	0,16	0,31
H <sub>4</sub> folat <sup>1</sup>	0,04	0,09	0,15
PteGlu <sup>1,2</sup>	0,10	0,20	0,38
10-HCO-H <sub>2</sub> folat <sup>1</sup>	0,07	0,13	0,24
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat <sup>4</sup>	(0,1)	(0,2)	(0,3)

<sup>1</sup> in (Vollkorn-) Brot, <sup>2</sup> [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiert, <sup>3</sup> in Lösung,

<sup>4</sup> anhand von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat abgeschätzt

sammengefasst. Die Werte für die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen liegen bei allen Folaten in einem ähnlichen Bereich. Die höchsten Werte wurden für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat bestimmt; was auch zu erwarten war, da dieses Folat die breiteste Peakform und damit die niedrigste Intensität aufwies. H<sub>4</sub>folat wurde zuerst eluiert und hatte eine sehr schmale Peakform und deshalb eine höhere Intensität.

**Wiederfindung** Die Wiederfindung für das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde u.a. in Anwesenheit von Brot (Vollkornbrot) bestimmt. Auf Grund der in dieser Matrix enthaltenen Stärke erfolgte die Aufarbeitung mit nur einem Kochschritt. Dafür wurde eine 10-HCO-H<sub>2</sub>folatfreie Brotmatrix an drei Tagen mit 10-HCO-H<sub>2</sub>folat dotiert, aufgearbeitet und der verbliebene 10-HCO-H<sub>2</sub>folat-Gehalt bestimmt. Es ergab sich eine Wiederfindung von  $54 \pm 4\%$ . Verluste über die SPE spielten dabei keine Rolle, da diese zum Teil über den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu ausgeglichen werden sollten.

Am Beispiel von Spinat (gehackt) wurde die Wiederfindung bei zwei Kochschritten ermittelt. Dies erfolgte in diesem Fall über eine Standardaddition. Zusätzlich wurde eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Umlagerungsrate untersucht. Es wurden 5 Aufstockniveaus gewählt, die den Gehalt um  $\frac{1}{3}$  bzw. bis um das doppelte erhöhen sollten. Der Gehalt nach der Aufarbeitung wurde mit  $5,2\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  bestimmt und der ursprüngliche Gehalt über die Standardaddition mit  $12,3\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ . Daraus ergab sich eine Wiederfindung von 42%. Eine aufgearbeitete reine Standardlösung ergab eine Wiederfindung von 39%. Unter Berücksichtigung der Umlagerung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats (auf Grundlage der Umlagerung der aufgearbeiteten Standardlösung) ergab sich im Spinat eine Wiederfindung von 107%. Auf Grundlage des Tests nach Mandel, der auf die Daten der Standardaddition angewendet wurde, ist ein linearer Zusammenhang zwischen der zugegebenen Menge an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und der analytisch ermittelten anzunehmen.

Für das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurde, auf Grund der nicht vorhandenen analytfreien Matrix, keine Bestimmung der Wiederfindung durchgeführt. Auch auf die Möglichkeit der Ermittlung über Standardaddition wurde verzichtet. Die Wiederfindungen für die anderen fünf Folate wurden im Rahmen der Nachweisgrenzen bestimmt und waren mit 93 - 105%, unter Beachtung der Methodenpräzision, im Bereich der 100% zu finden. Dies war für die SIVA auch zu erwarten.

Ein Zusatz an Acetonitril vor dem Zentrifugationsschritt, um Proteine zu fällen, und damit ein Ausfallen auf der HPLC-Säule zu verhindern, führte bei 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und

allen anderen Folaten, abgesehen von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, zu keiner Veränderung in der Wiederfindung. Für diesen Versuch wurde Erbsencremesuppe in einer Dreifachbestimmung aufgearbeitet und vor der SPE in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde direkt auf die SPE aufgegeben und die andere Hälfte zuvor mit Acetonitril versetzt, zentrifugiert und der Überstand dann auf die SPE gegeben. Es konnte für keines der Folate, abgesehen von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat (0,2 statt 0,3 µg/100 g), ein signifikanter Unterschied im Gehalt oder der Intensität ermittelt werden und damit auch nicht in der Wiederfindung. Für die Auswertung der Intensität wurde für jede Probe das Verhältnis aus der Intensität ohne Acetonitril und der Intensität mit Acetonitril berechnet und auf einen Unterschied zu 1 hin untersucht. Der signifikante Unterschied bei 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat ist vermutlich auf einen Verlust bei der SPE zurückzuführen.

Die Gesamtwiederfindung der Methode wurde zusätzlich anhand eines zertifizierten Referenzmaterials (Gemüsemix) bestimmt. Die Wiederfindung betrug mit  $336 \pm 6$  µg/100 g 107 % und war von den angegebenen  $315 \pm 44$  µg/100 g nicht signifikant verschieden. Da dieses kaum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat enthielt, sondern hauptsächlich 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, ist damit aber keine Aussage über die Güte der Quantifizierung der beiden neu in die Methode aufgenommenen Folate möglich.

**Präzision** Ein weiterer wichtiger Validierungsparameter ist die Präzision. Mit diesem Parameter wird zum einen die zu erwartende Streuung der Ergebnisse angegeben, welche unter Wiederholbedingungen innerhalb eines Tages generiert wurden (intraday-Präzision bzw. Wiederholpräzision) und zum anderen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Tagen (interday-Präzision). Für die Bestimmungen der intraday-Präzision der Folate wurden an einem Tag verschiedene Lebensmittel in einer Drei- oder Vierfachbestimmung aufgearbeitet und analysiert, wohingegen für die interday Präzision an zwei weiteren Tagen innerhalb von zwei Wochen verschiedene Lebensmittel in einer Doppelbestimmung aufgearbeitet und analysiert wurden (daraus ergeben sich insgesamt drei Messreihen). Die Ergebnisse für die intraday Präzision der sieben Folate, die in insgesamt fünf verschiedenen Lebensmitteln und für drei verschiedene Aufarbeitungsvarianten bestimmt wurde, sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst und die Ergebnisse für die interday-Präzision, die in drei Lebensmitteln bestimmt wurde, in Tabelle 3.4.

Die jeweiligen Werte für die intraday-Präzision der Folate in Spinat, Camembert und Weizenkeimen wurden parallel bestimmt. Für die fünf Folate, die über die SIVA analysiert wurden, traten Schwankungen von 1 - 11 % auf, wobei es sich meist um Schwankungen zwischen 1 - 5 % handelte. In Spinat wurden Schwankungen von 1 - 2 % ermittelt (mit Ausnahme von PteGlu), in Camembert von 1 - 5 % und in Weizenkeimen von 4 - 5 %. Bei den Weizenkeimen wurde später festgestellt, dass es sich um eine unvollständige Dekonjugation gehandelt hat, so dass die Methode optimiert werden musste. Danach ergaben sich Schwankungen von 2 - 6 %, wobei die Schwankungen im Mittel kleiner geworden sind, vor allem bezogen auf den Gesamtfolatgehalt und das, obwohl die Einwaage deutlich reduziert wurde. Die Suppe wurde sowohl mit als auch ohne Acetonitrilzugabe aufgearbeitet und die Auswirkungen auf die Präzision untersucht. Ohne Acetonitril zeigten sich Schwankungen von 2 - 10 % und mit Acetonitril von <1 - 9 %. Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat sind bei den untersuchten Lebensmitteln Schwankungen von 2 - 6 % aufgetreten und bei 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat von 2 - 14 %.

Neben der intraday-Präzision wurde auch die interday-Präzision der einzelnen Fola-

**Tabelle 3.3:** Gehalte der sieben Folate in verschiedenen Lebensmitteln in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (berechnet als PteGlu), mit Angabe der intraday-Präzision in Form des Variationskoeffizienten (in Klammern, in %).

	Spinat		Camembert		Weizenkeime	
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	47	(2)	38	(3)	23	(4)
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	23	(2)	32	(1)	198	(4)
10-HCO-PteGlu	136	(1)	17	(3)	29	(5)
H <sub>4</sub> folat	2,7	(1)	9,5	(3)	2,0	(5)
PteGlu	2,0	(11)	3,9	(5)	31	(4)
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	18	(2)	6,1	(4)	1,5	(6)
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	0,4	(10)	0,3	(13)	2,3	(13)
Summe	228	(2)	107	(2)	287	(4)

	Suppe				Weizenkeime		Kichererbsen	
	ohne ACN		mit ACN		opt.		opt.	
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	23	(5)	23	(2)	36	(2)	117	(1)
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	12	(2)	12	(0,3)	267	(2)	181	(2)
10-HCO-PteGlu	2,7	(2)	2,8	(2)	34	(3)	24	(4)
H <sub>4</sub> folat	1,1	(10)	1,1	(9)	2,6	(6)	42	(1)
PteGlu	0,6	(8)	0,6	(5)	46	(4)	16	(5)
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	0,3	(6)	0,3	(4)	4,6	(2)	7,7	(5)
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	0,4	(14)	0,3	(4)	3,0	(2)	4,5	(4)
Summe	40	(3)	40	(1)	391	(1)	391	(1)

ACN: Acetonitril (Zugabe vor der SPE zum Fällen von Proteinen); opt.: Anwendung einer optimierten Probenaufarbeitung (kleinere Einwaage und höhere Menge an Dekonjugasen)

**Tabelle 3.4:** Folatgehalte in drei Lebensmitteln in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (berechnet als PteGlu), mit Angabe der interday-Präzision in Form des Variationskoeffizienten (in Klammern, in %).

	Spinat		Camembert		Weizenkeime	
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	46	(1)	36	(5)	23	(3)
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	24	(3)	32	(3)	199	(5)
10-HCO-PteGlu	132	(2)	17	(7)	28	(4)
H <sub>4</sub> folat	2,7	(1)	9,1	(8)	2,0	(1)
PteGlu	1,9	(6)	3,5	(10)	29	(6)
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	19	(4)	5,9	(5)	1,4	(9)
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	0,5	(8)	0,3	(3)	2,2	(7)
Summe	227	(1)	104	(3)	285	(4)

te bzw. der Summe bestimmt. In Spinat, Camembert und Weizenkeimen wurden für die sieben Folate Schwankungswerte von 1 - 10% ermittelt. In Camembert lagen die interday-Schwankungen, mit Ausnahme von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, durchgängig höher als bei der intraday-Präzision und bei 10-HCO-PteGlu und H<sub>4</sub>folat sogar deutlich höher. Bei Spinat und Weizenkeimen war kein solcher Trend zu erkennen. Innerhalb eines Tages ergaben sich für einige Folate teilweise Schwankungen, die höher waren als die Schwankungen zwischen verschiedenen Tagen und vice versa.

Die Summe der Folate zeigte sowohl bei der intraday- als auch bei der interday-Präzision Werte zwischen 1 - 4%.



## Relevanz im Lebensmittel

Nachdem die beiden Folate 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat in die Methode zur Quantifizierung der Folate mit aufgenommen wurden, folgte die Überprüfung der Relevanz dieser beiden Folate für die Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes. Es wurden verschiedene Lebensmittel auf ihren Gehalt an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat hin untersucht und den Gehalten an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, H<sub>4</sub>folat und PteGlu gegenübergestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt. Der Anteil an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat lag zwischen 0,1 - 8 % und der Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat zwischen 0,04 - 1 %.

## Diskussion

10-HCO-H<sub>2</sub>folat konnte nicht käuflich erworben werden und wurde daraufhin synthetisiert. Statt den angegebenen 2 - 3 h wurden jedoch 20 h benötigt, um eine gute Ausbeute zu erzielen. Doch auch TYAGI et al. [158] führten die Oxidation über eine Dauer von 16 h durch. Die Unterschiede könnten auf die Durchführung zurückzuführen sein, bzw. ob und wie stark die Lösung während der Oxidation gerührt wurde. Da es keine genauen Angaben über die Versuchsbedingungen gibt, handelt es sich jedoch nur um eine Vermutung.

Das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat ist während der Synthese dennoch zu einem gewissen Teil weiter zu 10-HCO-PteGlu oxidiert. Nicht umgesetztes 10-HCO-H<sub>4</sub>folat war auf Grund der pH-bedingten Umwandlungen im Puffer (pH 5) oder auf der HPLC-Säule (0,1 % Ameisensäure) als 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und als 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu detektieren. Der Anteil war allerdings recht gering. Bei einer längeren Dauer wäre das entstandene 10-HCO-H<sub>2</sub>folat noch weiter zur 10-HCO-PteGlu oxidiert, so dass es zu keiner Steigerung der Ausbeute gekommen wäre.

Das Produkt zeigte ein vergleichbares UV-Spektrum mit solchen aus der Literatur. PFEIFFER et al. [77] ermittelten bei pH 7 Maxima bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 234 und

**Tabelle 3.5:** Folatzusammensetzung ausgewählter Lebensmittel. Die Gehalte der einzelnen Vitamine, berechnet als PteGlu, sind in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  angegeben. Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat sind in Klammern die Anteile am Gesamtfolatgehalt in % angegeben.

Lebensmittel	5-CH <sub>3</sub> - H <sub>4</sub> folat	5-HCO- H <sub>4</sub> folat	10-HCO- PteGlu	H <sub>4</sub> folat	PteGlu	10-HCO- H <sub>2</sub> folat	5,10-CH <sup>+</sup> - H <sub>4</sub> folat	$\Sigma$
Gemüsemix	321	5,0	1,1	8,0	0,8	0,2	(0,1)	336
Blattspinat	44	10	22	0,5	0,8	2,0	(3)	79
Spinat, frisch	46	24	132	2,7	1,9	19	(8)	226
Spinat, gehackt	86	11	15	0,6	n.q.	4,1	(4)	117
Brokkoli	142	18	10	1,9	0,8	3,6	(2)	177
Blumenkohl	83	12	3,4	1,2	n.d.	1,2	(1)	101
Wirsing	100	25	12	16	0,6	6,7	(4)	163
Erbsensuppe	23	11	2,7	1,1	0,5	0,4	(1)	39
Kichererbsen	110	194	22	42	17	5,9	(2)	393
Weizenkeime	36	267	34	2,6	46	4,6	(1)	392
Spaghetti	0,8	6,5	6,2	0,2	1,4	0,2	(1)	15
Baguette	15	7,8	4,5	2,1	1,0	1,5	(5)	32
Roggenbrot	0,7	8,1	6,5	n.q.	1,2	0,2	(1)	17
Mischbrot	4,6	15	8,5	n.q.	2,5	0,5	(1)	31
Camembert	36	32	17	9,1	3,5	5,9	(6)	104

n.q. < Bestimmungsgrenze, n.d. < Nachweisgrenze, Camembert: Geramont cremig-leicht

328 nm und ein Minimum bei 307 nm, im Vergleich zu den hier bestimmten Extrema bei  $\lambda = 233$  nm, 331 nm und 300 nm bei pH 7,4. Und auch bei PFEIFFER et al. zeigte sich im Sauren (pH = 1) ein zusätzliches Maximum (bei 257 nm, im Vergleich zu 260 nm bei pH 3,3). Weiterhin zeigte sich bei einer zweiten Arbeitsgruppe, die das UV-Spektrum ebenfalls bei pH 7,4 aufgenommen hat [157], ein vergleichbares Spektrum, mit einem absoluten Maximum bei 234 nm, einem lokalen Maximum bei 333 nm und einem absoluten Minimum bei 301 nm.

Zur weiteren Bestätigung wurde das Produkt-Ionen-Spektrum herangezogen. Dieses zeigte, wie auch bei anderen Folaten, einen Verlust eines Fragments mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 147, welches der Glutaminsäure zugeordnet wurde. Das entstandene Produkt von  $m/z = 325$  war jedoch kaum zu erkennen, ganz im Gegensatz zu den entsprechenden Produkt-Ionen von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat ( $m/z = 327$ ) und 10-HCO-PteGlu ( $m/z = 323$ ). Doch auch bei 10-HCO-PteGlu war dieses Fragment deutlich kleiner als das Fragment ( $\Delta m/z = 28$ ), welches sich vermutlich aus der zusätzlichen Abspaltung der Formylgruppe ergab. Die noch deutlich geringere Intensität des Fragments der Glutaminsäureabspaltung beim 10-HCO-H<sub>2</sub>folat deckte sich aber mit dem Spektrum von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat, bei dem das Fragment der Glutaminsäureabspaltung ( $m/z = 311$ ) auch so gut wie nicht zu erkennen war (Abbildung A.1 - A.3).

Die Intensität des Fragments mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 297, das vermutlich der Abspaltung der Formylgruppe zugeordnet werden kann, war zwar deutlich weniger intensiv als bei 10-HCO-PteGlu, aber dies deckte sich mit dem Spektrum des H<sub>2</sub>folats, welches das gleiche Fragment aufwies und damit vermutlich die gleiche Struktur.

Anhand von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat und H<sub>2</sub>folat war außerdem zu erkennen, dass das Fragment des Pterinringes ( $m/z = 176$ ) bei den Dihydrofolaten die größte Intensität aufwies. Das Fragment des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folats ließ jedoch ein um 2 erhöhtes  $m/z$ -Verhältnis erkennen ( $m/z = 180$ ). Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass es sich beim 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und beim H<sub>2</sub>folat jeweils um ein 7,8-Dihydropterin handelte [157] und beim 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>folat um ein 5,6-Dihydropterin, so dass sich die Stabilität der Fragmente deshalb unterschied und es zu einer abweichenden Umlagerung gekommen ist.

Bei den meisten Folaten war auch ein Fragment mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 120 bzw. bei den [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folaten mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 124 zu sehen und damit der p-Aminobenzoessäure zuzuordnen. Dieses Fragment mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 120 zeigte sich auch hier.

Die für Folate typischen Abspaltungen der Glutaminsäure ( $\Delta = 147$ ), der C<sub>1</sub>-Einheit ( $\Delta = 28$ ) und der p-Aminobenzoessäure ( $\Delta = 119$ ) waren zu erkennen. Die Fragmente ließen sich damit gut mit der Struktur des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats in Einklang bringen.

Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurde keine SIVA entwickelt, sondern nur eine Quantifizierung über strukturähnliche interne Standards. 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wäre zwar als [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierte Substanz käuflich zu erwerben gewesen und es hätte daraus auch ein markiertes 10-HCO-H<sub>2</sub>folat synthetisiert werden können, doch auf Grund von Umlagerungen während der Aufarbeitung (siehe Abschnitt 3.1.1) in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat bzw. 10-HCO-PteGlu wurde diese Möglichkeit ausgeschlossen. Der Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, der in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-PteGlu übergegangen ist, wäre dann nämlich doppelt erfasst worden und zwar in Form des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats bzw. des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats und in Form des umgewandelten 5-HCO-H<sub>4</sub>folats bzw. der 10-HCO-PteGlu. Über die Menge an umgewandeltem internen Standard ([<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-5-HCO-H<sub>4</sub>folat aus [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-10-HCO-PteGlu aus [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-10-HCO-H<sub>2</sub>folat) hätte dann die

doppelt erfasste Folatmenge berechnet und abgezogen werden müssen. Dadurch wäre es zu zusätzlichen Ungenauigkeiten bzw. größeren Schwankungen gekommen, die den Vorteil der SIVA wieder aufgehoben hätten.

Ein Vorteil der SIVA ist, dass die Problematik der Matrixeffekte meist keine Rolle spielt, da der Analyt und der isotopologe Standard in der Regel coeluierten, wobei es aber auch Ausnahmen gibt. Bei der Quantifizierung über einen strukturähnlichen Standard, der oft nicht coeluiert, müssen Matrixeffekte hingegen in Betracht gezogen werden. Um diese zu untersuchen bzw. auszuschließen, wird des öfteren die *postcolumn infusion*-Technik angewendet. Damit lassen sich chromatographische Profile der Matrixeffekte erstellen. Diese Technik wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Wie auch schon von BODI et al. [162] und STAHNKE et al. [161] beschrieben, wirken sich Matrixbestandteile auf die Ionisation verschiedener Analyten gleich aus, so dass sich ähnliche Matrixprofile ergeben. Dies wird auch von den Matrixprofilen von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-PteGlu bestätigt. Die etwas größeren Schwankungen für das Profil von 10-HCO-PteGlu sind vermutlich auf die geringere Intensität des Analyten zurückzuführen. Es war demnach möglich, die Auswertung nur über das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat durchzuführen und für den entsprechenden Elutionsbereich auf [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu zu schließen.

Anhand der Weizenkeime ist deutlich zu erkennen, dass Matrixeffekte ohne Clean up nicht zu vernachlässigen gewesen wären. Durch die Aufreinigung mittels SPE konnten diese deutlich verringert werden, so dass sie für das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu als internen Standard kaum noch eine Rolle gespielt haben. Die Abweichungen, die sich im Elutionsbereich des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats und von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu dennoch ergaben, sind zum Großteil auf die Schwankungen in der Messtechnik zurückzuführen, z.B. durch die Spritzenpumpe oder das Massenspektrometer. Dies wird durch die Schwankungen der reinen Pufferlösungen bestätigt. Des Weiteren muss beachtet werden, dass es sich bei den ermittelten Werten um Einfachbestimmungen handelte, da nur ein Eindruck gewonnen werden sollte, ob starke Matrixeffekte zu erwarten gewesen wären und ob es bei Schwankungen in der Chromatographie zur Beeinflussung der Quantifizierung hätte kommen können.

Es zeigte sich, dass die für die verschiedenen Matrices ermittelten Matrixeffekte im interessierenden Elutionsbereich nicht sehr groß waren. Die Werte unterlagen Schwankungen, die vergleichbar mit der Messunsicherheit der Methode für die Quantifizierung von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat waren (Variationskoeffizient von bis zu 6 % bei Mehrfachbestimmungen und bis zu 9 % bei Wiederholungsmessungen). Diese Variationskoeffizienten waren wiederum vergleichbar mit anderen Folaten, die über SIVA bestimmt wurden. Auch die Bestimmung der Matrixeffekte nach MATUSZEWSKI ergab Werte, die verglichen mit der Standardabweichung der Methode vernachlässigbar waren. Es war demnach nicht davon auszugehen, dass die Quantifizierung stark von Matrixeffekten beeinflusst wurde, weshalb nichts gegen eine Quantifizierung über den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu sprach.

Für 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurde keine genauere Betrachtung der Matrixeffekte durchgeführt, da das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und das als internen Standard gewählte [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ähnliche Retentionszeiten aufwiesen und damit in ähnlicher Weise beeinflusst wurden.

Wie schon erwähnt, unterliegt 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat pH-bedingten Umwandlungen und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wird weiter zu 10-HCO-PteGlu oxidiert. Das Ausmaß dieser Umwandlungen bzw. Oxidation sollte während der Aufarbeitung verfolgt werden. Es zeigte sich, dass 10-HCO-H<sub>2</sub>folat während der Aufarbeitung trotz Anwesenheit von DTT oder Mercapto-

ethanol zu 10-HCO-PteGlu oxidierte. Dabei spielte die Temperatur eine entscheidende Rolle, denn obwohl das Kochen nur 10 min dauerte, entstand eine vergleichbare Menge an 10-HCO-PteGlu wie bei der Inkubation über Nacht, die bei einer Temperatur von 37°C stattfand. In einem Versuch mit Mercaptoethanol waren die einzelnen Schritte sogar weitestgehend additiv; wohingegen beim Versuch mit DTT die Addition der Teilschritte etwas weniger gut übereinstimmte. Doch wie an der Standardabweichung beim Kochschritt zu sehen ist, können dafür die Schwankungen des Versuchs verantwortlich gewesen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Reduktionsmittel nach der Inkubation über Nacht deutlich reduziert wurde und es deshalb zu einer stärkeren Oxidation kam. Anhand der gesamten Aufarbeitung mit SPE und einem Kochschritt ist allerdings ersichtlich, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Schwankungen der Analytik oder um versuchsbedingte Abweichungen handelte (verschieden große Probengefäße und dadurch Abweichungen in der Erhitzungs- und Abkühlzeit).

Die SPE hat auf die Weiteroxidation einen geringen bis gar keinen Einfluss. Denn die Unterschiede in der Wiederfindung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats waren nicht signifikant und damit wieder auf versuchsbedingte Schwankungen zurückzuführen. Es kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, dass es z.B. beim Trockensaugen der Kartusche nicht doch zu weiteren Oxidationen gekommen ist. Die Dauer des Trockensaugens sollte deshalb nicht zu lange ausgedehnt werden. Eindeutig erkennbar ist jedoch, dass das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat in 10-HCO-PteGlu übergegangen ist bzw. der Verlust an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat vollständig in Form von 10-HCO-PteGlu wiedergefunden werden konnte und damit im Gesamtfolatgehalt mit erfasst wurde.

10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen analysiert. Dies könnte teilweise darauf beruhen, dass das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat bei einigen Arbeitsgruppen während der Aufarbeitung vollständig zu 10-HCO-PteGlu oxidiert ist und deshalb nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Der Grund für die vollständige Oxidation könnte in der Verwendung anderer Reduktionsmittel oder von mengenmäßig weniger Reduktionsmitteln zu finden sein. Eine stärkere bzw. längere Hitzeeinwirkung ist ebenfalls denkbar. Bei der Analyse verschiedener Lebensmittel zeigte sich auch hier nur bei wenigen ein relevanter Anteil.

Bei der Aufarbeitung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats (Abbildung 3.5) wurde dieses zum Großteil zu 5-HCO-H<sub>4</sub>folat umgewandelt. Die Gesamtwiederfindung lag aber immer etwas unterhalb von 100%. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat größeren Schwankungen bei der Analytik unterlag, höchstwahrscheinlich auf Grund der Quantifizierung über einen internen Standard mit ähnlicher aber nicht mit gleicher Struktur, und zum anderen auf einen gewissen Durchbruch bei der SPE. Es handelte sich dabei um eine starke Anionenaustauscherchromatographie (SAX), wobei Anionen (bei Folaten in Form der Salze der Glutaminsäure) durch Wechselwirkungen mit den quarternären Ammoniumfunktionen auf der Kartusche zurückgehalten werden und z.B. durch Salze mit stärkerer Elutionskraft anschließend eluiert werden. Bei 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat handelt es sich jedoch um ein Folat, welches eine zusätzliche positive Ladung trägt, was die Retention auf einer SAX-Kartusche etwas verschlechtert. So ist es dann vermutlich teilweise zu einem vorzeitigen Durchbruch gekommen. Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von Acetonitril vor der SPE bzw. vor dem Zentrifugationsschritt noch etwas verstärkt.

In Abbildung 3.5 ist weiterhin zu erkennen, dass sowohl durch die Inkubation über Nacht als auch durch das Kochen ein Großteil des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats in das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat übergegangen ist. Bei einer Kombination aus beiden Schritten erhöhte sich der Anteil an

5-HCO-H<sub>4</sub>folat bzw. sank der Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat entsprechend den Einzelschritten. Als die SPE hinzugenommen wurde, verringerte sich der Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat nochmals geringfügig, wobei der 5-HCO-H<sub>4</sub>folatgehalt relativ konstant blieb. Wie schon erwähnt, ist dies vermutlich auf einen gewissen Durchbruch bei der SPE zurückzuführen.

Die Wiederfindung für die gesamte Aufarbeitung lag für eine Aufarbeitung mit nur einem Kochschritt bei  $22 \pm 1\%$  und bei  $17\%$  für die Aufarbeitung mit doppeltem Kochschritt (vor und nach der Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht). Bei Verwendung von Acetonitril hätten sich diese Werte vermutlich nochmal vermindert, jedoch ohne als 5-HCO-H<sub>4</sub>folat wiedergefunden zu werden. Da ein Großteil des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats aber schon bei den vorhergehenden Schritten in das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat übergegangen war, spielte der Verlust während der SPE nur noch eine untergeordnete Rolle.

Für den Gehalt von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, H<sub>4</sub>folat, PteGlu und 10-HCO-PteGlu konnte trotz veränderter Aufarbeitung, in Form der Acetonitrilzugabe, kein Unterschied festgestellt werden, was sich aber auf Grund der SIVA auch von selbst versteht. Doch selbst für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat gab es keinen Unterschied. Die Stabilität des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats wurde durch den Zusatz an Acetonitril für den benötigten Zeitraum folglich nicht beeinträchtigt und auch nicht das Verhalten auf der SPE im Vergleich zum internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu. Durch die Verwendung von Acetonitril während der Aufarbeitung konnte jedoch die Lebensdauer der HPLC-Säulen erheblich verlängert werden, da ein Ausfallen von Proteinen auf der Säule verhindert wurde.

Im Rahmen der Validierung wurde die Wiederfindung der einzelnen Folate während der gesamten Aufarbeitung größtenteils auch in Matrix bestimmt. Bis auf 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat erfolgte die Bestimmung der Wiederfindung zusammen mit der Nachweisgrenzenbestimmung. Da durch die Verwendung der SIVA auch Verluste während der Aufarbeitung ausgeglichen werden, ergab sich, wie zu erwarten, jeweils eine Wiederfindung im Bereich von  $100\%$ .

Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde die Wiederfindung in Brot (ein Kochschritt) bestimmt und ergab einen Wert von  $54 \pm 4\%$  (Schwankungen über drei verschiedene Tage). Damit weist dieses Ergebnis keinen signifikanten Unterschied gegenüber der entsprechenden Untersuchung der einzelnen Aufarbeitungsschritte mit reinen Standardlösungen auf ( $57 \pm 3\%$ ). Die Umlagerung scheint unabhängig von der Matrix zu sein. Der Puffer enthielt so viel Reduktionsmittel, dass die Bestandteile der Matrix keinen Einfluss auf die Oxidationsrate des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats hatten. Dies wird von folgendem Versuch zusätzlich unterstützt. Im Rahmen einer Standardaddition wurde die Wiederfindung in der Matrix Spinat (zwei Kochschritte) bestimmt und parallel dazu eine reine Standardlösung aufgearbeitet. Auch hier wurden ähnliche Werte für die Wiederfindung in Matrix und in reiner Lösung gefunden ( $42$  und  $39\%$ ). Diesmal unterschieden sich die Werte jedoch ein wenig vom Versuch, der über die verschiedenen Etappen durchgeführt wurde ( $35\%$ ). Dies zeigt aber vielmehr, dass sich Abweichungen in der Erhitzungs- und Abkühlzeit in der Wiederfindung niederschlagen können. Bei genauer Zeiteinhaltung war die Wiederfindung bzw. die Oxidation zu 10-HCO-PteGlu dennoch recht präzise, wie der Versuch zur Wiederfindung mit Brot an drei verschiedenen Tagen gezeigt hat.

Bei 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat wurde auf eine Bestimmung der Wiederfindung verzichtet, da auch hier ein Versuch mit reinen Lösungen stattgefunden hat. Hinzu kam, dass es während der Lagerung der Messlösung noch zusätzlich zu einer deutlichen Umlagerung gekommen wäre und die Wiederfindung damit bei diesem Folat vom Messzeitpunkt abgehangen hätte. Bei 10-HCO-H<sub>2</sub>folat schritt die Oxidation dagegen langsamer voran.

Die Varianz in der Umlagerung während der Aufarbeitung ist vor allem beim 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat an Hand der größeren Werte für die Schwankungen zu sehen.

Doch auch bei der Aufarbeitung von Lebensmitteln zeigten sich für 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat große Schwankungen. Erst durch die Zugabe von Acetonitril konnte eine Verbesserung für parallel laufende Aufarbeitungen erzielt werden. Vermutlich ist dies auf einen gleichmäßigeren Verlauf der SPE zurückzuführen, auch wenn durch das Acetonitril ein etwas stärkerer Durchbruch stattfand.

Bei den anderen Folaten sind meist kleinere Schwankungen aufgetreten, wobei es einzelne Ausnahmen gab. Der hohe Wert von 11 % für die intraday-Präzision von PteGlu im Spinat ist vermutlich auf den niedrigen Gehalt zurückzuführen. Ein niedriger Gehalt bedeutet jedoch nicht zwingend größere Schwankungen, wie am Beispiel des H<sub>4</sub>folats zu sehen ist. Doch auch bei diesem Folat konnten bei sehr kleinen Gehalten, wie zum Beispiel bei der Erbsensuppe, größere Messunsicherheiten auftreten.

Bei allen fünf Folaten, die über SIVA analysiert wurden, waren meist Schwankungen von 1 - 5 % zu sehen, bzw. bei sehr geringen Gehalten zum Teil etwas höhere. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sich die Präzisionen der einzelnen Folate nicht sehr unterscheiden. Doch die Matrix könnte einen Einfluss haben. Abgesehen von PteGlu, zeigten sich bei Spinat die kleinsten Schwankungen. Bei Camembert waren sie hingegen etwas größer, vor allem bei der interday-Präzision. Der Grund könnte in der Inhomogenität zu finden sein. Um die Tagesschwankungen zu minimieren, wurde vor der Einwaage ein gewisser Teil des Camemberts zusätzlich homogenisiert. Dies erklärt die großen Schwankungen des H<sub>4</sub>folats zwischen den Tagen, denn es ist zu einem erneuten Lufteintrag gekommen, der das H<sub>4</sub>folat unterschiedlich stark oxidiert hat. Für 10-HCO-PteGlu ist der Grund für den etwas größeren Wert für die interday-Präzision vermutlich in gewissen Schwankungen bei der Oxidation des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats während der Aufarbeitung zu sehen. Diese machten sich bei dem nicht ganz unerheblichen Anteil an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat verglichen mit 10-HCO-PteGlu eventuell deutlicher bemerkbar als z.B. bei Spinat.

Auch bei der Suppe könnten die großen Schwankungen des H<sub>4</sub>folats auf die Handhabung zurückzuführen sein, da es an der Oberfläche der im gefrorenen Zustand gelagerten Suppe zur Oxidation gekommen sein kann. Die oberste Schicht wurde zwar verworfen, doch vermutlich war die Dicke der verworfenen Schicht zu gering.

Die Weizenkeime zeigten ebenfalls recht große Schwankungen. Dies ist auf die unvollständige Dekonjugation zurückzuführen, denn die Schwankungen der optimierten Methode waren trotz kleinerer Einwaage im Durchschnitt etwas kleiner und damit vergleichbar mit den Ergebnissen der ursprünglichen Methode, die bei Spinat und Camembert angewendet wurde.

Die Summe der Folate zeigte sowohl bei der intraday- als auch bei der interday-Präzision Werte für die relative Standardabweichung (RSD) zwischen 1 - 4 %. Die Schwankungen waren damit teilweise sogar etwas kleiner als bei den einzelnen Folaten. Dies könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, dass beim Gesamtfolatgehalt die Umlagerungen von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat keine Rolle mehr gespielt haben, da die entstandene 10-HCO-PteGlu und das entstandene 5-HCO-H<sub>4</sub>folat als solche mit erfasst wurden und sich die Schwankungen der Umlagerungen somit vermutlich herausgemittelt haben.

Im Großen und Ganzen waren die Werte für die interday-Präzision sowohl der einzelnen Folate als auch der Summe vergleichbar mit den Werten der intraday-Präzision. Die Größenordnung der Schwankungen deckt sich mit der Literatur [19,33] bzw. den Vorhersagen von HORWITZ [166].

Bei den Nachweisgrenzen konnten ebenfalls ähnlich gute Werte wie bei MÖNCH [19] erzielt werden. Die Werte wurden in der genannten Publikation in pmol/Ansatz angegeben und lagen bei 1,4 - 5,6 pmol/Ansatz. Die eigenen Werte lagen umgerechnet zwischen 1,5 und 3,7 pmol/Ansatz, wobei ein echtes Brot verwendet wurde, anstatt eines Brotrekombinats. Doch haben die Versuche auch gezeigt, dass sich die Werte mit und ohne Matrix kaum unterschieden haben und eher auf Geräteschwankungen zurückzuführen waren. Es wäre deshalb auch möglich, eine reine Lösung aufzuarbeiten und für die Bestimmung zu verwenden. Für drei Folate konnte auf [ $^{13}\text{C}_5$ ]-markierte Substanzen zurückgegriffen werden. Eine SIVA mit [ $^2\text{H}_4$ ]-markierten internen Standards war dennoch möglich, da sich die MRM-Übergänge der Quantifier deutlich unterschieden, wie auch schon von BÜTTNER et al. berichtet wurde [33].

10-HCO- $\text{H}_2$ folat wurde in den zuvor genannten Studien nicht analysiert. Im Vergleich zu den über SIVA bestimmten Folaten waren aber vergleichbare Werte für die Präzision zu sehen, obwohl die Quantifizierung nur über einen strukturähnlichen internen Standard erfolgte und außerdem eine Umwandlung während der Aufarbeitung stattfand. Bei 5,10- $\text{CH}^+$ - $\text{H}_4$ folat waren dafür deutlich größere Schwankungen zu sehen. Dies wird neben der Umwandlung während der Aufarbeitung und der Quantifizierung über einen strukturähnlichen internen Standard vermutlich auch auf die sehr geringen Mengen dieses Folats zurückzuführen sein. Bei diesem Folat ist außerdem anzumerken, dass es während der Lagerung der Messlösung auch zu Umwandlungen gekommen ist. Auch bei 10-HCO- $\text{H}_2$ folat kann es mit der Zeit zur weiteren Oxidation kommen, doch dauert dies deutlich länger und spielte damit eine untergeordnete Rolle.

Die Nachweisgrenze für das 10-HCO- $\text{H}_2$ folat war ebenfalls vergleichbar mit den über SIVA bestimmten Werten. Bei der Bestimmung wurde das 10-HCO- $\text{H}_2$ folat jedoch nicht über die gesamte Aufarbeitung mitgeführt, da es dabei zur Oxidation zu 10-HCO-PteGlu gekommen wäre und sich die Ergebnisse auch nur auf die Endlösung beziehen. Außerdem ist am Versuch mit den einzelnen Zwischenschritten der Aufarbeitung zu erkennen, dass mit keinem großen Verlust bei der Aufarbeitung zu rechnen war. Es ist demzufolge nur wichtig, den Einfluss der Matrix auf die Detektion bzw. auf die Intensität und das Grundrauschen zu ermitteln. Der Einfluss auf die Intensität wurde auch im Rahmen der oben diskutierten Matrixeffektuntersuchung mit erfasst.

Es wurden nun verschiedene Lebensmittel auf ihren Anteil an 5,10- $\text{CH}^+$ - $\text{H}_4$ folat und 10-HCO- $\text{H}_2$ folat am Gesamtfolatgehalt hin untersucht. Für 5,10- $\text{CH}^+$ - $\text{H}_4$ folat konnten nur sehr kleine Gehalte ermittelt werden. Der Anteil am Gesamtfolatgehalt betrug maximal 1 %. Unter Berücksichtigung der Wiederfindung hätten sich dann Gehalte ergeben, die im Schnitt zwar um das fünffache höher gewesen wären, aber am Ergebnis für den Gesamtfolatgehalt hätte dieser Umstand nicht viel geändert, da 5,10- $\text{CH}^+$ - $\text{H}_4$ folat zum Großteil während der Aufarbeitung in 5-HCO- $\text{H}_4$ folat übergegangen ist und dementsprechend in Form dieses Folats mit erfasst wurde.

Der Anteil an 10-HCO- $\text{H}_2$ folat wies bei einigen Lebensmitteln deutliche höhere Anteile auf bzw. teilweise sogar höhere Gehalte als andere Folate. Im Spinat konnte z.B. ein Anteil von 8 % detektiert werden. Der ursprüngliche Gehalt lag sogar deutlich höher. Im Vergleich zur Literatur sind die Gehalte an 10-HCO- $\text{H}_2$ folat dennoch teilweise recht gering. RUGGERI et al. [29] haben in Kichererbsen (gekocht) einen Anteil an 10-HCO- $\text{H}_2$ folat von 46 % gefunden und KARILUOTO et al. [30] in Roggenmehl einen Anteil von 26 %. KONINGS et al. [43] und PFEIFFER et al. [77] haben Brot an sich untersucht. KONINGS et al. fanden in verschiedenen Brotsorten (darunter auch Roggenbrot) Gehalte von 0 - 7  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  und da-

mit teilweise mehr als 20 % der Folate in Form des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats. In Roggenbrot wurde hingegen kein 10-HCO-H<sub>2</sub>folat detektiert. Dies passt gut zum oben genannten Roggenbrot, bei dem 10-HCO-H<sub>2</sub>folat mit einem Anteil von nur 1 % detektiert wurde. PFEIFFER et al. fanden in Weiß- und Weizenbrot vergleichbare Ergebnisse zu KONINGS et al., von 19 und 25 %. Selbst in Spaghetti konnte ein Anteil von 21 % detektiert werden. Letztere zeigten in den eigenen Untersuchungen jedoch nur einen 10-HCO-H<sub>2</sub>folatanteil von 1 %.

Zu beachten ist, dass eine natürliche Variation bei Lebensmitteln vorherrscht, wie es auch KARILUOTO et al. [167] an verschiedenen Weizentypen von verschiedenen Standorten gezeigt haben. Das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat variierte von 2 - 35 %. Einige Unterschiede sind auch von der Art der Zubereitung abhängig. Dennoch ist auffällig, dass nicht nur bei Brot sondern auch bei Brokkoli, Blumenkohl und Spinat, die eigenen Ergebnisse zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat niedriger liegen als bei KONINGS et al. Ein möglicher Grund könnte in kürzeren Inkubationszeiten zu finden sein, aber vor allem im verwendeten pH-Wert von 7,85, der von einem Großteil der genannten Publikationen verwendet wurde und auf die Methode von PFEIFFER et al. zurückgeht. Bei KARILUOTO et al. und RUGGERI et al. wird der pH-Wert zwischendurch zwar für 3 h auf 4,9 gesenkt (Inkubation mit Rattenserum), aber anschließend wieder auf pH 7 gebracht und erst dann gekocht. Bei 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ist die Stabilität auch vom pH-Wert abhängig [168] und somit könnte dies auch eine Erklärung für die hohen Gehalte an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat in den genannten Publikationen sein. Die Wiederfindung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats von 97 % bei PFEIFFER et al. unterstützt diese Vermutung.

Dies kann aber nur ein Teilaspekt sein, denn selbst wenn die Oxidationsrate bei den eigenen Ergebnissen berücksichtigt wird, resultieren geringere Gehalte an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Eine Möglichkeit wäre, dass in den anderen Studien das in den Lebensmitteln vorhandene 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat bei pH-Werten  $\geq 7$  in 10-HCO-H<sub>4</sub>folat übergegangen ist und dieses trotz der Antioxidantien in den Extraktionspuffern zu 10-HCO-H<sub>2</sub>folat oxidiert wurde. Wahrscheinlicher ist hingegen, dass sich das eventuell gebildete 10-HCO-H<sub>4</sub>folat wiederum beim Kochen in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat umgelagert hat [34, 35, 114, 169] und dann nur ein kleiner Anteil des ursprünglich vorhandenen 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats als 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wiedergefunden wurde.

Es ist aber auch zu erwähnen, dass bei den genannten Publikationen UV- bzw. Fluoreszenz-Detektoren verwendet wurden. Diese sind unspezifischer als ein Tandemmassenspektrometer, wodurch es zu Fehlinterpretationen gekommen sein könnte. Denn obwohl Affinitätssäulen für das Clean-up verwendet wurden, berichteten RUGGERI et al. von zusätzlichen Peaks [29]. Damit existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten, welche die Unterschiede zwischen den 10-HCO-H<sub>2</sub>folatgehalten der erwähnten Publikationen und der vorliegenden Arbeit erklären könnten bzw. für diese Unterschiede verantwortlich sind.

### 3.1.2 Substanz mit folatähnlicher Struktur

#### Charakterisierung

In der MRM-Spur des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats ( $m/z$  474  $\rightarrow$  327) war z.B. bei Weizenkeimen zusätzlich ein intensiver Peak mit einer früheren Retentionszeit zu sehen. Es handelte sich um die Massenspur, die auf die Glutaminsäureabspaltung zurückgeführt werden kann. Eine solche Abspaltung ist zunächst nicht außergewöhnlich, allerdings war auch bei den MRM-Spuren der Polyglutamate des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats (jeweils vollständige Abspaltung der Glutaminsäurekette) ein solcher zusätzlicher Peak zu sehen (Abbildung 3.13). Dies führte



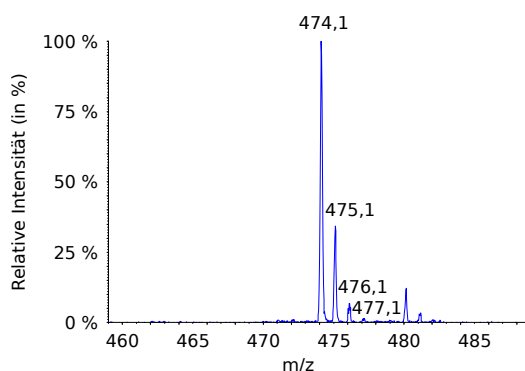


Abbildung 3.6: MS-Spektrum bzw. Isotopenmuster der unbekannt Substanz.

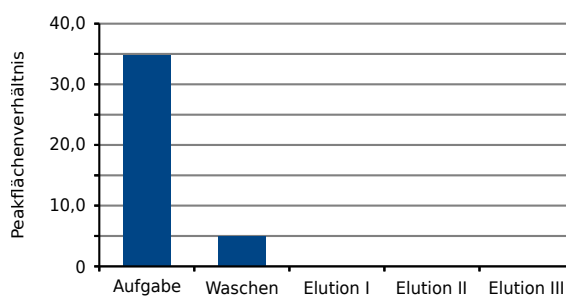


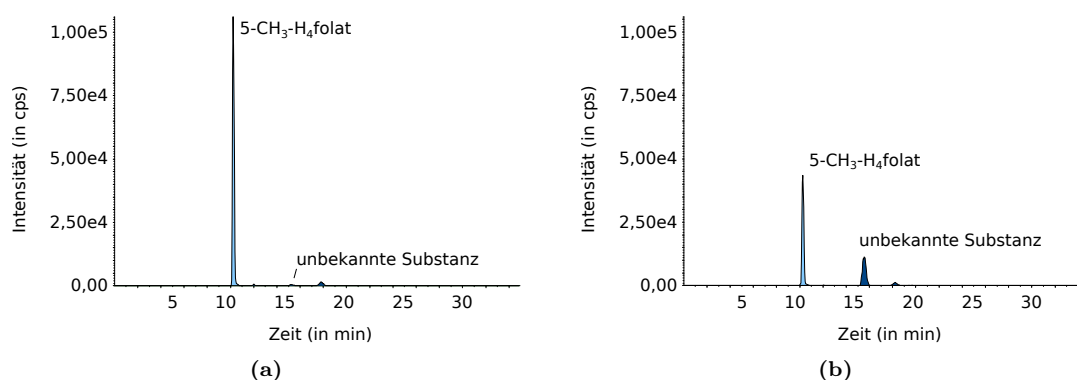
Abbildung 3.7: Peakflächenverhältnisse ( $A_{\text{unbekannte Substanz}}/A_{[2\text{H}_4]\text{-10-HCO-PteGlu}}$ ) für die einzelnen Schritte der Aufreinigung über eine Affinitätssäule.

zu der Vermutung, dass es sich um Polyglutamate eines weiteren Folats handeln könnte.

Das Massenspektrum, welches mit Hilfe der Ionenfalle des API 4000 Q-Trap (positiver Modus) aufgenommen wurde (Abbildung 3.6), ließ anhand des Isotopenmusters und den Abständen der  $m/z$ -Verhältnisse von  $\pm 1$  ein einfach geladenes Molekül (eventuell  $[M+H]^+$ ) aus den Atomen C, N, O und H vermuten. Für Elemente wie S, Cl und Br gab es keinen Anhaltspunkt.

Die Substanz wurde daraufhin mittels HPLC isoliert und an den Flugzeitmassenspektrometern (TOF-MS) des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie in Freising und des Lehrstuhls für Molekulare Sensorik in Freising vermessen. Die größte Wahrscheinlichkeit wurde im positiven Modus für die Zusammensetzung  $C_{20}H_{24}N_7O_7$  ermittelt und im negativen Modus für die Zusammensetzung  $C_{20}H_{22}N_7O_7$ , so dass sich daraus die Summenformel von  $C_{20}H_{23}N_7O_7$  für die ungeladene Substanz ergibt.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie auf Basis eines folatbindenden Proteins (FBP) sollte überprüft werden, ob es sich bei der unbekannt Substanz um eine Struktur mit einem Folatgrundgerüst handeln kann. Dafür wurde eine Weizenkeimprobe, die einen verhältnismäßig großen Gehalt der gesuchten Substanz enthielt, über eine Affinitätssäule aufgereinigt und die einzelnen Schritte (Beladung, Waschen und Elution) auf die Anwesenheit dieser Substanz hin untersucht. Die Peakflächenverhältnisse der unbekannt Substanz zu  $[2\text{H}_4]\text{-10-HCO-PteGlu}$  sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es zu einem starken Durchbruch während der Beladung gekommen ist und der Rest während des Waschens von der Säule eluierte, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es nicht zu einer Bindung der Substanz am folatbindenden Protein gekommen ist und es sich demnach vermutlich nicht um ein Folat handelte.



**Abbildung 3.8:** Chromatogramm einer reinen 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Lösung vor (a) und nach (b) der Verdauungssimulation (ohne Verdauungssäfte).

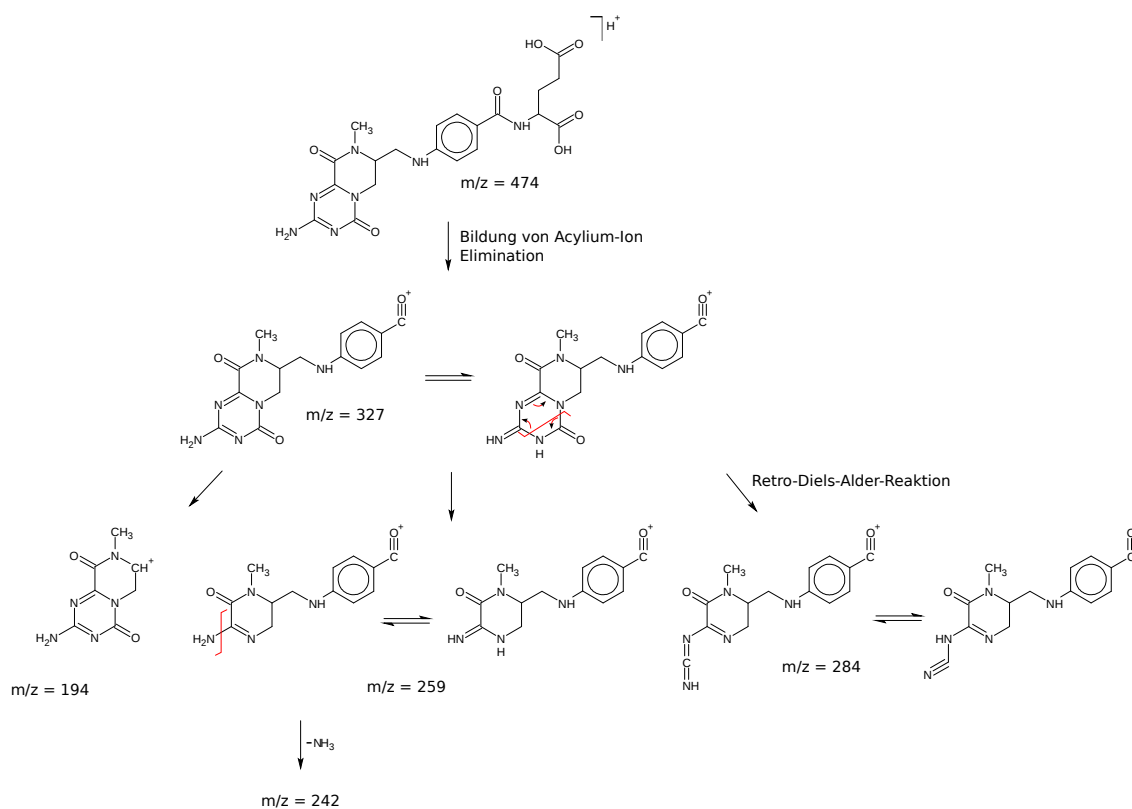
Bei der gesuchten Substanz scheint es sich aber um ein Produkt zu handeln, welches aus dem Folat 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat entsteht. Denn bei einer Simulation der Verdauung einer 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Lösung ist diese unbekannte Substanz entstanden (Abbildung 3.8). Es kam die Vermutung auf, dass es sich um das Oxidationsprodukt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats mit der Pyrazino-s-Triazin-Struktur [62,64,67] handeln könnte (Abbildung 3.9), welches von GAPSKI et al. [61, 170] noch als 4a-Hydroxy-5-methyltetrahydrofolat (hmTHF) postuliert wurde und durch Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat entsteht. Weiterhin soll es den beobachteten Massenübergang von  $m/z$  474  $\rightarrow$  327 aufweisen [64,67].

Für zwei der MRM-Fragmente wurde mittels TOF-MS am Lehrstuhl für Molekulare Sensorik die mögliche Zusammensetzung ermittelt. Darauf aufbauend wurde dann ein mögliches Fragmentierungsmuster erstellt, um zu sehen, ob diese Pyrazino-s-Triazin-Struktur in Frage kommen könnte. Das Fragment mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 327 hat eine Summenformel von C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> und das Fragment 284 eine Zusammensetzung von C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Für das 327er-Fragment handelt es sich demnach um eine Abspaltung von C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub> und damit um eine Abspaltung der Glutaminsäure, wie sie auch in Folaten vorkommt. Dies konnte in einem späteren Experiment anhand der Fragmentierung eines an der Glutaminsäure fünffach [<sup>13</sup>C]-markierten Pyrazino-s-Triazins bestätigt werden (siehe unten).

Für das 284er Fragment kommt eine weitere Abspaltung von CHNO hinzu. Diese Abspaltung ist bei der Fragmentierung der Folate nicht zu beobachten. Ein solche Abspaltung tritt aber z.B. bei Uracil durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion auf [171]. Der gleiche Mechanismus [172] könnte auch bei der Fragmentierung des Triazinrings dieses Pyrazino-s-Triazins stattgefunden haben, wenn zuvor von einer Imin-Enamin-Tautomerie ausgegangen wird, so dass ein Carbodiimid bzw. das Tautomer, also ein Cyanamid entsteht.

Für die weiteren Fragmente liegen keine zusätzlichen Daten vor, so dass nur Vermutungen angestellt werden können. Bei dem 259er-Fragment könnte es sich insgesamt um eine Abspaltung von C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> handeln, wobei sich diese wiederum aus einer Abspaltung der Glutaminsäure und zusätzlich aus einer Abspaltung von C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O am Triazinring zusammensetzen könnte, so dass vermutlich ein Imino-methyl-piperazinon entsteht. Durch eine weitere NH<sub>3</sub>-Abspaltung vom ersten Ring würde sich das 242er-Fragment erklären lassen und das 194er-Fragment durch eine Spaltung zwischen dem kompletten Ringsystem und der Methylbrücke.

Da sich mehrere Fragmente in Einklang mit dieser Pyrazino-s-Triazin-Struktur bringen



**Abbildung 3.9:** Strukturvorschlag für die unbekannte Substanz: Pyrazino-s-Triazin nach JON-GEJAN [62], mit Vorschlägen für die Fragmentierung im ESI-MS/MS.

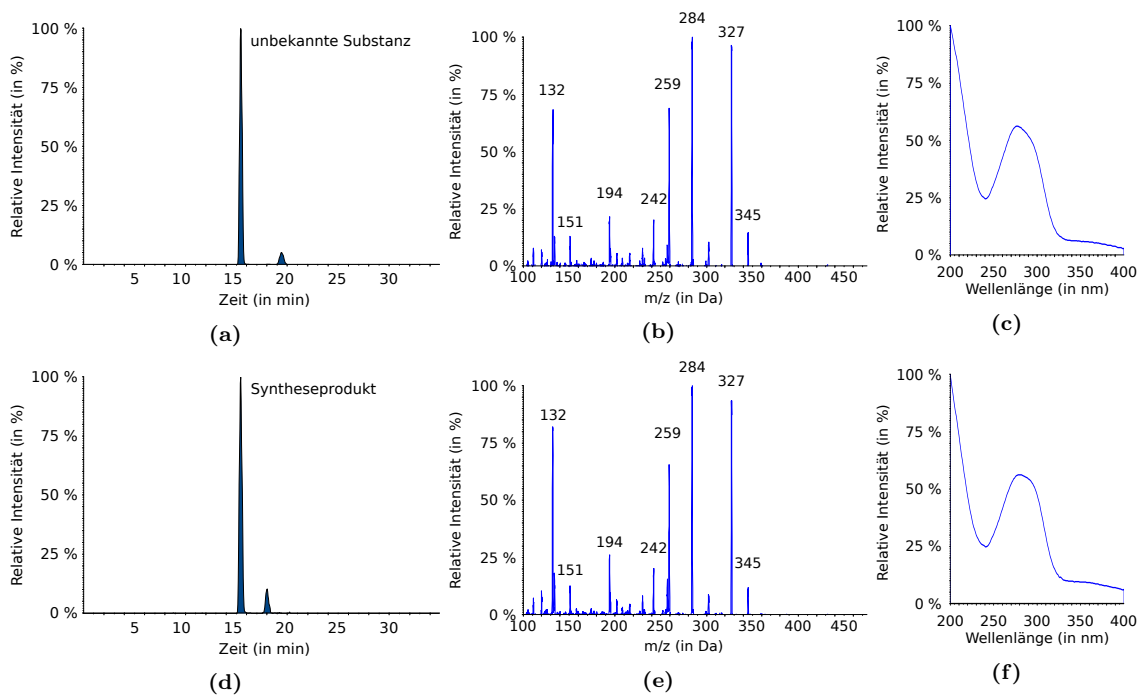
lassen, wurde die Substanz synthetisiert und mit der unbekannten Substanz verglichen. Die Fragmentierung der an der Glutaminsäurekette [ $^{13}C_5$ ]-markierten Substanz, die im späteren Verlauf auch synthetisiert wurde, hat gezeigt, dass jedes der Fragmente mindestens durch Abspaltung der Glutaminsäure entstanden ist und die Vermutungen zum Fragmentierungsmuster damit unterstützt werden.

### Synthese des Pyrazino-s-Triazins

Die Synthese wurde in Anlehnung an GAPSKI et al. [61] durchgeführt. Dafür wurde 5- $CH_3$ - $H_4$ folat in einem Puffer mit einem pH-Wert von 5 (in der genannten Publikation: pH 6) gelöst und die Lösung mit  $H_2O_2$  versetzt. Die Oxidation wurde 2 h lang, anstatt 1 h, bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt (verbleibende Menge an 5- $CH_3$ - $H_4$ folat nach 2 h: 2%, nach 1 h: 30%). Abweichend von GAPSKI wurde das  $H_2O_2$  anschließend durch  $NaS_2O_3$  reduziert und das Produkt über eine semi-präparative HPLC aufgereinigt.

Das Produkt konnte mit einer Reinheit von 90,4% erhalten werden (Abschätzung über HPLC-DAD bei 282 nm). Bei den Verunreinigungen handelte es sich u.a. um 10-HCO-PteGlu und 10-HCO- $H_2$ folat, wobei Messungen mit LC-MS/MS insgesamt 5,5% dieser zwei Substanzen ergeben haben.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem synthetisierten Produkt wirklich um die unbekannte Substanz in den Weizenkeimen und anderen Lebensmitteln handelt, wurden die UV-Spektren, die Produkt-Ionen-Spektren und die Retentionszeiten der unbekannt-



**Abbildung 3.10:** Chromatogramm (MRM  $474 \rightarrow 325$ ), Produkt-Ionen-Spektren und UV-Spektren einer Weizenkeimprobe bzw. der daraus isolierten Substanz (a - c) und des Syntheseproduktes (d - f).

Substanz und des Syntheseproduktes miteinander verglichen (Abbildung 3.10). Wie die Chromatogramme in Abbildung 3.10a und 3.10d erkennen lassen, wurde das Syntheseprodukt zur gleichen Zeit wie die gesuchte Substanz eluiert. Es war auch nur ein einzelner Peak ohne Schultern zu erkennen, als eine Lösung des Syntheseproduktes zu einer Lösung einer aufgearbeiteten Weizenkeimprobe gegeben wurde. Weiterhin waren die gleichen Fragmente mit vergleichbarer Intensität in den Produkt-Ionen-Spektren zu erkennen und ebenfalls vergleichbare UV-Spektren. Es ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit von der gleichen Substanz auszugehen und damit von 2-Amino-8-methyl-4,9-dioxo-7-methyl-p-aminobenzoylglutamate-6,7,8,9-tetrahydro-4H-pyrazino(1,2- $\alpha$ )-s-triazine (im Folgenden Pyrazino-s-Triazin genannt).

Das Syntheseprodukt wurde im Institut Kirchhoff Berlin mikrobiologisch untersucht. Im Vergleich zu einem PteGlu-Standard ergab sich für das Syntheseprodukt eine Aktivität von 6,5 %, wohingegen 10-HCO-PteGlu eine Aktivität von 95 % aufwies. Bei Annahme eines Anteils von 5,5 % 10-HCO- $H_2$ folat und 10-HCO-PteGlu im Syntheseprodukt, lassen sich 5,3 % durch die Anwesenheit dieser zwei Folate erklären. Unter Verwendung der Vergleichspräzision (7,8 %) handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied (erweiterte Messunsicherheit).

### Abschätzung des Gehaltes in Lebensmitteln

Wie schon des Öfteren erwähnt wurde, konnte u.a. in Weizenkeimen eine relativ große Menge des Pyrazino-s-Triazins detektiert werden. Von der Intensität in der MS/MS kann jedoch nicht automatisch auf den Gehalt geschlossen werden. Deshalb sollte eine Abschätzung

**Tabelle 3.6:** *Abgeschätzter Gehalt des Pyrazino-s-Triazins in verschiedenen Lebensmitteln. Zusätzlich ist das molare Verhältnis dieser Substanz zum Gesamtfolatgehalt (Summe aller erfassbaren Mono- + Digtumatformen) angegeben und der Gehalt an Ascorbinsäure (aus Literaturquellen).*

Lebensmittel	Pyrazino-s-Triazin (in µg/100 g)	Verhältnis Pyrazino-s-Triazin: Gesamtfolatgehalt	Ascorbinsäure (in mg/100 g)	
Karottensaft	159	8,6	3,8	1
Karotten	364	6,2	7	1
Blumenkohl	19	0,19	64	1
Erbsen	113	0,96	25	1
Sojabohnen	187	0,57	34	2
Azuki Bohnen	541	2,5		
Weizenkeime	2581	5,4	0	2
Buchweizen	140	2,4	0	1
Couscous	591	34	0	2
Maisgrieß	139	9,0	0	1
Gerstengraupen	54	1,7	0	1
Haferflocken	1182	30	0	1
Hirse	216	5,1	0	2
Basmati Reis	759	59	0	1
Spaghetti	767	41	0	1
Kartoffel	13	0,61	17	1
Walnuss	2425	17	2,6	1
Haselnuss	597	8,4	3	1
Erdnuss	1394	8,6	0	1
Mandeln	95	3,1	3,7	1
Pistazien	943	7,3	7	1

Literaturquellen für die Ascorbinsäuregehalte: <sup>1</sup> SOUCI, FACHMANN, KRAUT [173];

<sup>2</sup> BUNDESLEBENSMITTELSCHLÜSSEL II.3 [174]

des Gehaltes in Lebensmitteln über das Verhältnis zum internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu stattfinden, indem ein Responsefaktor (Tabelle 9.2) für das Pyrazino-s-Triazin zu [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu ermittelt wurde. Die Wahl fiel auf [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu, da das Pyrazino-s-Triazin eine ähnliche Retentionszeit wie 10-HCO-H<sub>2</sub>folat aufweist und sich für dieses Folat die Quantifizierung über [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu bewährt hat. Außerdem waren für [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-10-HCO-PteGlu keine Umlagerungen oder weiteren Oxidationen zu erwarten. Die wiederholte Messung der gleichen Lösungen (an drei Tagen, jeweils mit aktuellem Responsefaktor) lag bei einer Präzision von 11 - 18 % und die Wiederholpräzision (interday Präzision, Dreifachbestimmung) bei 12 - 23 %. Die Wiederfindung, die über die Aufarbeitung reiner Standardlösungen ermittelt wurde, lag bei 93 ± 16 %. Die abgeschätzten Gehalte für das Pyrazino-s-Triazin sind in Tabelle 3.6 exemplarisch für einige Lebensmittel zusammengefasst. Zusätzlich ist der durchschnittliche Gehalt an Ascorbinsäure angegeben. Weiterhin wurde auch das Verhältnis des Pyrazino-s-Triazins zum Gesamtfolatgehalt berechnet, um einschätzen zu können, welche Relevanz dieses Oxidationsprodukt im Vergleich zum Folatgehalt aufweist.

Bei den meisten der untersuchten Lebensmitteln lag der Gehalt des Pyrazino-s-Triazins deutlich oberhalb des Gesamtfolatgehaltes und bei einigen Lebensmitteln sogar um einen

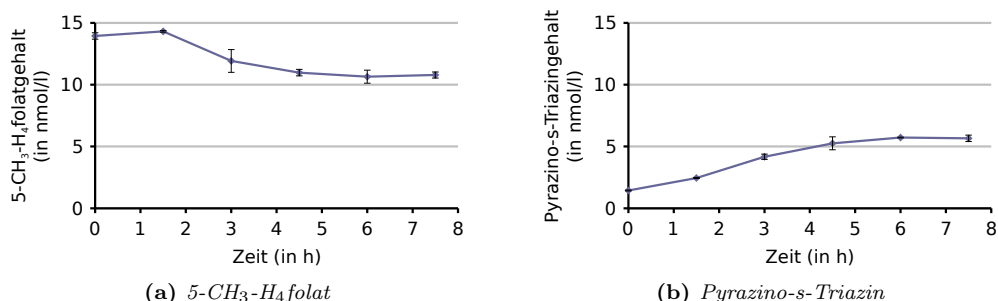
Faktor von 30 - 59 darüber. Dabei fällt auf, dass die Lebensmittel mit den höchsten Vitamin C-Gehalten (17 - 64 mg/100 g [173, 174]) das geringste Verhältnis an Pyrazino-s-Triazin zum Gesamtfolatgehalt (Verhältnis:  $< 1$ ) aufwiesen und Lebensmittel mit einem niedrigeren Vitamin C-Gehalt (0 - 7 mg/100 g) deutlich höhere Verhältnisse von 1,7 - 17. Weiterhin ist zu erkennen, dass diejenigen Lebensmittel, die einen vernachlässigbaren Vitamin C-Gehalt aufweisen und zusätzlich verarbeitet wurden, z.B. in Form eines Trocknungsvorganges, sogar Verhältnisse des Pyrazino-s-Triazins verglichen zum Gesamtfolatgehalt von 31 - 59 erreicht haben.

### Bioverfügbarkeit

HANNISDAL et al. [65] und FAZILI et al. [67] beschrieben, dass das Pyrazino-s-Triazin, welches auch als MeFox (Methyl folinate oxidation product) [67] oder als 5-Hydroxymethyltetrahydrofolat (5hmTHF) bezeichnet wird, im Plasma aus 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat entsteht und deshalb zum Folatgehalt im Plasma dazugerechnet werden kann. Da die Struktur eine gewisse Ähnlichkeit mit Folaten aufweist, kam jedoch die Vermutung auf, dass diese Substanz vielleicht auch vom Körper mit der Nahrung aufgenommen wird und deshalb im Plasma zu finden ist. Diese Vermutung sollte mit einer kleinen Humanstudie überprüft werden. Daneben ist jedoch nicht auszuschließen, dass es zusätzlich auch zu einer nachträglichen Oxidation kommen kann.

Für die Ein-Personen-Humanstudie wurde 3 h nach dem Frühstück, bestehend aus folat- und pyrazino-s-triazinarmem Joghurt, Blut zur Bestimmung des körpereigenen Folat-Grundniveaus abgenommen und anschließend 250 g eines reich an Pyrazino-s-Triazin, aber folatarmen Couscous verabreicht. Die vorhergehende Joghurtmahlzeit wurde gewählt, da es nach einem Fasten über Nacht bei früheren Studien [19] zu einem Anstieg des Folatgehaltes im Plasma gekommen ist, welcher aber auf körpereigenes Folat zurückzuführen war. Damit wäre dann ein erhöhter Grundspiegel zu verzeichnen. Es sollte aber ein möglichst geringer 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folatspiegel und möglichst kein Anstieg des Folatspiegels zu verzeichnen sein, wohl aber ein deutlicher Anstieg des Pyrazino-s-Triazins. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass ein Anstieg des Pyrazino-s-Triazins rein auf eine Oxidation des resorbierten 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zurückzuführen ist. Weiterhin wurde dem gewonnenen Plasma Ascorbinsäure zugesetzt, um eine nachträgliche Oxidation zu unterdrücken.

In Abbildung 3.11 ist zu erkennen, dass der Gehalt an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zuerst absank



**Abbildung 3.11:** Gehalt an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat (a) und Pyrazino-s-Triazin (b) im Plasma (in nmol/l) nach Aufnahme eines pyrazino-s-triazinreichen aber folatarmen Couscous, unter Angabe der Analysenschwankung in Form der Standardabweichung (Doppel- oder Dreifachbestimmung).

(hochsignifikanter Unterschied zwischen 0 und 4,5 h,  $p = 0,0001$ , jeweils  $n = 3$ ), wobei der Anstieg zwischen 0 und 1,5 h nicht signifikant war ( $p = 0,08$ ). Nach ungefähr 4,5 h wurde ein Plateau erreicht. Dabei könnte es sich aber auch um ein Minimum bei 6 h mit einem darauffolgenden Anstieg gehandelt haben. Bei der Plasmakurve des Pyrazino-s-Triazins (Konzentration des Pyrazino-s-Triazins im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit) ist hingegen ein stetiger Anstieg zu erkennen (signifikanter Unterschied zwischen 0 und 4,5 h,  $p = 0,0001$ , jeweils  $n = 3$ ), der ebenfalls nach 4,5 h in ein Plateau übergegangen ist bzw. auch als Maximum bei 6 h angesehen werden kann.

## Diskussion

Des Öfteren wird berichtet, dass das mikrobiologische Assay höhere Werte für den Gesamtfolatgehalt liefert, als HPLC-Methoden (UV, Fluoreszenz oder MS). In einer eigenen Versuchsreihe ist dieses Phänomen bei Weizenkeimen aufgetreten (Abschnitt 3.2). Es stellte sich die Frage, ob ein unbekanntes Folat die Ursache für die Differenz gewesen sein könnte. In der MRM-Spur des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats (474 → 327) war vor allem bei Weizenkeimen ein zusätzlicher Peak zu sehen. Bei Folaten handelt es sich bei diesem Übergang ( $\Delta m/z = 147$ ) um die Abspaltung der Glutaminsäure. Bei der Untersuchung der Polyglutamate wurde jeweils das entsprechende Fragment betrachtet, welches aus der Abspaltung der gesamten Glutaminsäurekette entsteht bzw. das dem Fragment des entsprechenden Monoglutamates nach Abspaltung der Glutaminsäure entsprach. In den Chromatogrammen der MRM-Spuren der Polyglutamate des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats war auch jeweils ein zusätzlicher Peak zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass diese Substanz ebenfalls eine Polyglutamatkette aufweisen könnte und es sich deshalb vielleicht um ein Folat oder eine folatähnliche Struktur handelt.

Nach einer Isolierung der unbekannt Substanz aus Weizenkeimen wurde das Molekulargewicht mittels TOF-MS bestimmt. Auf Grund der Isotopenverteilung und der Fragmentierung wurde angenommen, dass die Substanz aus den Elementen C, H und/oder N und O besteht. Die Summenformel, die sich aus den Messungen ergeben hat, ist identisch mit der Summenformel des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats. Jedoch ergab sich aus dem Versuch mit einer Affinitätssäule, die mit Folat-Bindungs-Protein gefüllt war, dass es sich wahrscheinlich nicht um ein weiteres Folat handelt, denn die unbekannt Substanz ist schon bei der Aufgabe auf die Affinitätssäule und beim anschließenden Waschen eluiert worden. Es ist zwar zu bedenken, dass die Bindung auch beim 5-HCO-H<sub>4</sub>folat etwas schwächer sein kann und die Affinitätssäule deshalb nur zu 25 % beladen werden sollte [30,77], doch wurde, im Gegensatz zur unbekannt Substanz, das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat wenigstens zu 38 % gebunden (bei einer Beladung mit 26 % der bekannten Folate). Würde man die unbekannt Substanz aber hinzuzählen, wäre die Beladung natürlich deutlich höher ausgefallen. Aber dafür hätte die Substanz auch gebunden werden müssen und es wären deutliche Mengen im Eluat zu erwarten gewesen. Folglich war nicht davon auszugehen, dass es sich um ein Folat handelt.

Naheliegender war eine folatähnliche Substanz bzw. ein Abbauprodukt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats, denn die unbekannt Substanz war bei der Verdauungssimulation des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats ohne die Zugabe von Verdauungssäften (nur pH-Einstellung) entstanden. Da in Anwesenheit von Ascorbinsäure der Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat deutlich geringer war und auch weniger der unbekannt Substanz entstanden ist als in Abwesenheit von Ascorbinsäure, könnte es sich um einen oxidativen Abbau handeln.

Ein häufig in der Literatur beschriebenes Oxidationsprodukt ist das Pyrazino-s-Triazin

[62, 63], welches zuerst fälschlicherweise als ein 4a-Hydroxymethyltetrahydrofolat identifiziert wurde [61, 63]. Es wurde von HANNISDAL et al. [64–66] und FAZILI et al. [67] in Serum detektiert und zeigt einen MRM-Übergang von 474 → 327 und von 474 → 284, so wie die unbekannte Substanz in dieser Arbeit. Für die wichtigsten Fragmente wurden mögliche Strukturen vorgeschlagen, die in Einklang mit der Struktur des Pyrazino-s-Triazins sind.

Daraufhin wurde das Pyrazino-s-Triazin in Anlehnung an GAPSKI et al. [61] mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  synthetisiert. Die Synthesedauer hat sich auf Grund des gewählten pH-Wertes von 5 statt 6 etwas erhöht, denn laut BLAIR et al. [170] nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen pH 5,6 und 4 deutlich ab. Die identische Retentionszeit, das vergleichbare UV-Spektrum und das vergleichbare Massenspektrum weisen darauf hin, dass es sich um die gleiche Substanz handelt.

Wie sich gezeigt hat, ist das Pyrazino-s-Triazin nicht nur im Serum vorhanden, sondern auch in Lebensmitteln. Es soll jedoch keine mikrobiologische Aktivität aufweisen [175]. Dies wird von der mikrobiologischen Untersuchung am Institut Kirchhoff Berlin auch unterstützt, da die sich ergebende Aktivität auf die Anwesenheit anderer Folate in der Lösung des synthetisierten Pyrazino-s-Triazins zurückgeführt werden konnte. Die Analyse verschiedener Lebensmittel auf die Anwesenheit dieses Oxidationsproduktes zeigte, dass es in einigen Lebensmittel in nicht unerheblichen Mengen vorhanden war. Bei den Ergebnissen ist zu bedenken, dass es sich nur um eine Abschätzung handelt, denn die Quantifizierung über  $[^2\text{H}_4]$ -10-HCO-PteGlu zeigte bei einer Kurzvalidierung große Schwankungen. Für Couscous wurde aber zusätzlich eine Quantifizierung mittels SIVA durchgeführt, die einen vergleichbaren Wert (603  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  statt 591  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) ergeben hat und die Abschätzung über das  $[^2\text{H}_4]$ -10-HCO-PteGlu damit bestätigt. Dennoch ist nicht ganz auszuschließen, dass sich noch Kristallwasser im synthetisierten Pyrazino-s-Triazin befunden hat und somit die Einwaage bzw. Konzentration der Standardlösung etwas verfälscht haben könnte.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Menge an Pyrazino-s-Triazin (bezogen auf den Gesamtfolatgehalt) abhängig vom Vitamin C-Gehalt zu sein scheint. Bei hohen Gehalten an Vitamin C war im Vergleich zum Gesamtfolatgehalt kaum Pyrazino-s-Triazin enthalten, wohl aber bei niedrigen Vitamin C-Gehalten. Bei einigen Lebensmitteln war der Gehalt an Pyrazino-s-Triazin sogar noch höher. Bei diesen Produkten handelte es sich um getrocknete Lebensmittel. Das lässt darauf schließen, dass das Pyrazino-s-Triazin während des Trocknens aus dem 5- $\text{CH}_3$ - $\text{H}_4$ folat entstanden sein könnte und damit den Folatgehalt reduziert hat. In Anwesenheit von Vitamin C oder anderen antioxidativen Substanzen wurde das 5- $\text{CH}_3$ - $\text{H}_4$ folat vermutlich vor Oxidation geschützt, so dass kaum Pyrazino-s-Triazin entstehen konnte, denn laut LIU et al. [176] kann die antioxidative Aktivität einiger Lebensmittelbestandteile die Stabilität von 5- $\text{CH}_3$ - $\text{H}_4$ folat erhöhen. Doch es ist auch nicht auszuschließen, dass das Pyrazino-s-Triazin schon während des Wachstums bzw. der Reifung der Pflanzen gebildet wurde und nicht nur/erst während der Lagerung und/oder Verarbeitung. Diese Fragestellung ist sowohl aus ernährungsphysiologischer, pflanzenphysiologischer als auch aus lebensmitteltechnologischer Sicht relevant. Sollte es möglich sein, die Bildung dieses Oxidationsproduktes beim Wachstum, der Reifung, der Lagerung oder der Verarbeitung zu minimieren und damit den Gehalt an 5- $\text{CH}_3$ - $\text{H}_4$ folat zu erhöhen, würde sich dies positiv auf die Folatversorgung auswirken.

Wie gezeigt werden konnte, ist das Pyrazino-s-Triazin in mehreren Lebensmitteln vorhanden, teilweise sogar in deutlich größeren Mengen als die Folate. Nun stellte sich die Frage, ob es vom menschlichen Körper auch resorbiert wird, so wie es bei Ratten der Fall ist [177], und damit ins Plasma übergeht oder ob es erst bei der Lagerung des Plas-



mas/Serums/Blutes entsteht. Dies wurde bis jetzt noch nicht weiter untersucht [67, 178, 179]. HANNISDAL et al. untersuchten zwar die Lagerung von Plasmaproben mit verschiedenen Gerinnungshemmern und fanden heraus, dass der Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat (bei Raumtemperatur) in den ersten 48 h in Form des Pyrazino-s-Triazins wiedergefunden werden kann [64]. Doch ist damit noch nicht ausgeschlossen, dass das Pyrazino-s-Triazin auch aufgenommen werden kann und damit bei einer Addition zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat der Gesamtfolatgehalt der Probe überschätzt wird.

In einer Human-Vorstudie mit einem Probanden, bei der Pyrazino-s-Triazinreicher Couscous als Testmahlzeit gereicht wurde, ist es zu einem signifikanten Anstieg des Pyrazino-s-Triazins im Plasma gekommen. Der Couscous wurde ausgewählt, da er nur wenig Folat enthielt, im Gegensatz dazu aber eine große Menge des Pyrazino-s-Triazins. Das Maximum ( $t_{max}$ ) wurde erst nach 6 h erreicht, doch wurden solche hohe  $t_{max}$ -Werte auch für Folate in der Humanstudie von Sabine Mönch [19] verzeichnet ( $t_{max}(\text{Cerealien}) = 7, 2$ ) und könnten damit typisch für diese Art von Matrix sein.

Etwas verwunderlich ist das Absinken des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats, vor allem da dieses fast im gleichen Maße abgesunken ist, wie das Pyrazino-s-Triazin anstieg. Von einer nachträglichen Oxidation ist aber nicht auszugehen, da das Plasma direkt nach der Blutabnahme gewonnen und 10 - 15 min später mit Ascorbinsäure versetzt wurde, bzw. jede zweite Probe für 1,5 h im Kühlschrank zwischen gelagert wurde. Wenn es sich um eine nachträgliche Oxidation gehandelt hätte, wäre zu erwarten gewesen, dass die ersten Proben den höchsten Gehalt an Pyrazino-s-Triazin aufweisen, bzw. ein Muster zu erkennen gewesen wäre, das die 1,5 h-Wartezeit jeder zweiten Probe widerspiegelt. Dem ist aber nicht so, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Verlauf der Plasmakurve größtenteils auf eine Resorption des Pyrazino-s-Triazins zurückzuführen ist und der Abfall des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zufällig in der gleichen Größenordnung stattgefunden hat. Ein ähnlicher Verlauf der Plasmakurve des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats ist nämlich auch bei der Aufnahme der Weizenkeime/Cerealien in der Humanstudie von Sabine Mönch [19] zu verzeichnen gewesen, obwohl eine deutlich größere Menge an Folaten aufgenommen wurde. Die hohen Anfangswerte können teilweise auf einen Anstieg während der Fastenzeit über Nacht zurückgeführt werden. Im vorliegenden Beispiel wurde zwar eine Joghurtmahlzeit 3 h vor der eigentlichen Testmahlzeit eingenommen, um hohe Anfangswerte auf Grund des Fastens über Nacht zu umgehen, doch ist nicht auszuschließen, dass es sich immer noch um einen Abfall auf das Grundniveau gehandelt hat. Für eine konkretere Aussage müsste eine weitere Humanstudie angeschlossen werden, bei der der Verlauf der Plasmakurve nach ausschließlicher Aufnahme des Joghurts ermittelt wird, wobei sich hier die Frage ergibt, was anstatt der Couscous-Mahlzeit gereicht wird, um mögliche Einflüsse und Komplikationen durch die sonst fehlende Mahlzeit auszuschließen.

### 3.1.3 Optimierung der Dekonjugation

#### Di- und Trienzymbehandlung

In der Literatur wird häufig eine Di- oder Trienzymbehandlung zur vollständigen Extraktion der Folate aus der Lebensmittelmatrix empfohlen [28, 73, 74, 77]. MÖNCH, welche die Extraktion im MES-Puffer eingeführt hat, konnte zwar keine Erhöhung des Folatgehaltes durch Inkubation mit Protease und/oder Amylase ermitteln, aber dafür eine Erhöhung der Signalstärke [19]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von Protease und

**Tabelle 3.7:** Vergleich der ermittelten Gesamtfolatgehalte verschiedener Camembertproben mit und ohne Proteasebehandlung (ausgedrückt als Summe der einzelnen Folate, berechnet als PteGlu in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , zum einen unter Berücksichtigung von  $\text{H}_4\text{folat}$  und zum anderen ohne). Gesamtfolatgehalte, die mit Proteasebehandlung erhalten wurden und sich signifikant von den jeweiligen Werten ohne Proteasebehandlung unterscheiden, sind mit einer Fußnote hervorgehoben.

Camembert	ohne Protease	mit Protease	ohne Protease ohne $\text{H}_4\text{folat}$	mit Protease ohne $\text{H}_4\text{folat}$
A	59	55	29	26
B	67	57 <sup>1</sup>	34	32
C	106	102	76	76
D	113	98 <sup>2</sup>	81	73 <sup>3</sup>

Camembert A: Tip, B: Geramont, C: Geramont cremig-leicht, D: Saint-Albray cremig-leicht;

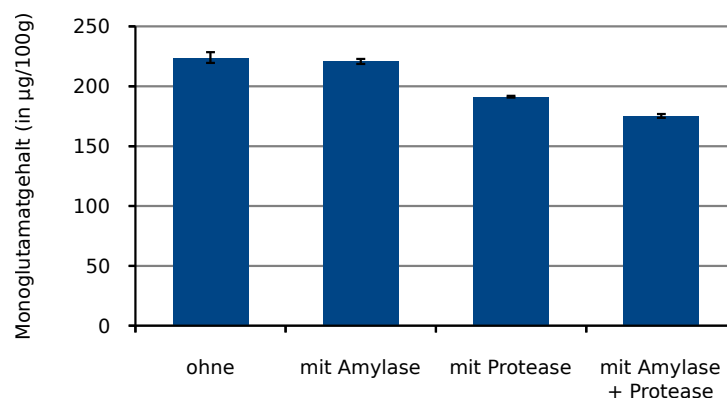
<sup>1,2</sup>:  $p < 0,01$ , <sup>3</sup>:  $p < 0,001$

Amylase sowohl auf den Gesamtfolatgehalt als auch auf die Signalstärke für verschiedene Lebensmittel genauer untersucht.

Dafür wurden u.a. vier Camemberts einer Proteasebehandlung unterzogen (Tabelle 3.7). Bei allen vier Camemberts wurden mit der Proteasebehandlung geringere Gehalte ermittelt, wobei dieser Unterschied bei zwei Camembertsorten nicht signifikant war, wohl aber bei den anderen zwei. Es zeigte sich, dass der Peak des [ $^2\text{H}_4$ ]- $\text{H}_4\text{folat}$ s in allen Camembertproben überlagert wurde und der Gehalt an  $\text{H}_4\text{folat}$  deshalb unterschätzt wurde. Wenn das  $\text{H}_4\text{folat}$  bei der Berechnung des Gesamtfolatgehaltes nicht mit berücksichtigt wurde, ergab dies bei drei Camemberts keinen signifikanten Unterschied zwischen den Aufarbeitungen. Beim Saint-Albray cremig-leicht war dennoch ein hochsignifikanter Unterschied zu verzeichnen. Eine Signalverbesserung konnte bei keinem der untersuchten Lebensmittel festgestellt werden. Für 10-HCO-PteGlu war hingegen eine deutliche Verschlechterung des Signals zu vermerken.

Auch die Notwendigkeit der Zugabe von Amylase zum Aufschluss der Matrix wurde überprüft. Dafür wurde Vollkornbrot einmal mit und einmal ohne Amylase aufgearbeitet (jeweils in einer Doppelbestimmung). Ohne die Amylasebehandlung wurde ein Gehalt von  $25,0 \pm 0,7 \mu\text{g}/100\text{ g}$  ermittelt und mit Amylase ein Gehalt von  $24,7 \pm 0,4 \mu\text{g}/100\text{ g}$ . Die Ergebnisse sind nicht signifikant verschieden. Wurde die Probe hingegen ohne Amylasebehandlung aufgearbeitet und zusätzlich vor der Dekonjugation gekocht, ergab sich nur ein Gehalt von  $23,0 \pm 0,8 \mu\text{g}/100\text{ g}$ . Der Unterschied war aber ebenfalls nicht signifikant verschieden. Dies könnte auf die geringe Probenanzahl zurückzuführen sein, denn bei anderen stärkehaltigen Proben wurde nach einem zusätzlichem Erhitzungsschritt ebenfalls ein geringerer Gehalt ermittelt. Zum Beispiel bei Kartoffeln: ohne Amylase ergab sich ein Gehalt von  $17,4 \mu\text{g}/100\text{ g}$ , mit Amylase ein Gehalt von  $15,7 \mu\text{g}/100\text{ g}$  und ohne Amylase aber mit zusätzlichem Erhitzungsschritt ein Gehalt von  $15,6 \mu\text{g}/100\text{ g}$ . Das gleiche Phänomen konnte bei Erbsen beobachtet werden. Ohne zusätzlichen Erhitzungsschritt wurde ein Gehalt von  $78 \mu\text{g}/100\text{ g}$  ermittelt und mit zusätzlichem Erhitzungsschritt ein Gehalt von  $68 \mu\text{g}/100\text{ g}$ .

Am Beispiel von Weizenkeimen, die mittels Mikrobiologischem Assay einen höheren Gehalt ergeben haben (siehe Abschnitt 3.2), wurde sowohl die Dienzymbehandlung mit Amylase bzw. Protease als auch die Kombination aus beiden (Trienzymbehandlung) jeweils



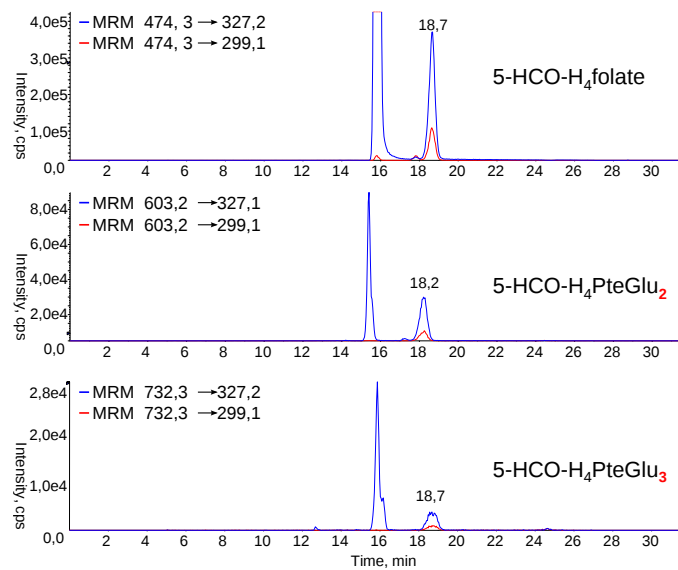
**Abbildung 3.12:** Monoglutamatgehalte einer Weizenkeimprobe mit verschiedenen zusätzlichen Enzymbehandlungsmethoden (in µg/100 g); unter Angabe der Standardabweichungen der Doppelbestimmungen).

in einer Doppelbestimmung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Aufarbeitung ohne zusätzliche Enzymbehandlungsmethoden (abgesehen von der Dekonjugation) ergab den höchsten Gehalt an Monoglutamaten. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant verschieden von der Aufarbeitung mit Amylase ( $p > 0,05$ ), wohl aber von den Ergebnissen der anderen Aufarbeitungen, die deutlich geringere Monoglutamatgehalte ergaben ( $p < 0,01$ ). Das geringste Ergebnis wurde mit der Trienzymbehandlung ermittelt. Die Ergebnisse der zusätzlichen Enzymbehandlungsmethoden untereinander ergaben ebenfalls signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ).

### Diglutamate und höhere Polyglutamate

Zur Überprüfung, ob eine vollständige Dekonjugation vorgelegen hat, wird von einigen Arbeitsgruppen das PteGlu<sub>3</sub> zugegeben und über die Wiederfindung als PteGlu die Dekonjugationseffizienz berechnet [24, 29, 31, 48]. Dafür ist jedoch zum einen eine zusätzliche Aufarbeitung notwendig und zum anderen stellt sich die Frage, ob das zugesetzte PteGlu<sub>3</sub> nicht sogar bevorzugt dekonjugiert wird und damit das Ergebnis verfälscht. Im Rahmen einer Forschungsarbeit [180] wurde der Triglutamatzusatz u.a. am Beispiel von Pistazien untersucht. Der Monoglutamatgehalt wurde mit 49 µg/100 g bestimmt und die Dekonjugationseffizienz über das PteGlu<sub>3</sub> mit 81 %. Bei späteren Untersuchungen mit annähernd vollständiger Dekonjugation wurde der Gesamtfolatgehalt der Pistazien aber mit 118 µg/100 g bestimmt, so dass in der vorliegenden Probe eigentlich eine Dekonjugationseffizienz von 42 % vorgelegen hat.

Ein Test auf vollständige bzw. unvollständige Dekonjugation ohne eine zusätzliche Aufarbeitung, wie beim PteGlu<sub>3</sub>-Zusatz, wäre die Messung der in der Probelösung eventuell noch vorhandenen Polyglutamate. Anhand von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub>, PteGlu<sub>3</sub> und PteGlu<sub>7</sub> stellte sich heraus, dass sich das intensivste Fragment aus der Abspaltung der gesamten Glutamatkette ergibt. Dies wurde auch schon von FAZILI et al. [181] für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> erwähnt. Die Polyglutamate zeigten außerdem ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie die Monoglutamate, was anhand von Scans des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats und dessen Polyglutamate in Abbildung A.4 zu sehen ist. Dies diente als Grundlage für die Wahl der Massenübergänge der anderen Polyglutamate. Bei einer Kollisionsenergie von 52 V kam es beim Monoglutamat zu einer stärkeren Fragmentierung als bei den Polyglutamaten und damit



**Abbildung 3.13:** Mono-, Di- und Triglutamate von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat in einer aufgearbeiteten Weizenkeimprobe.

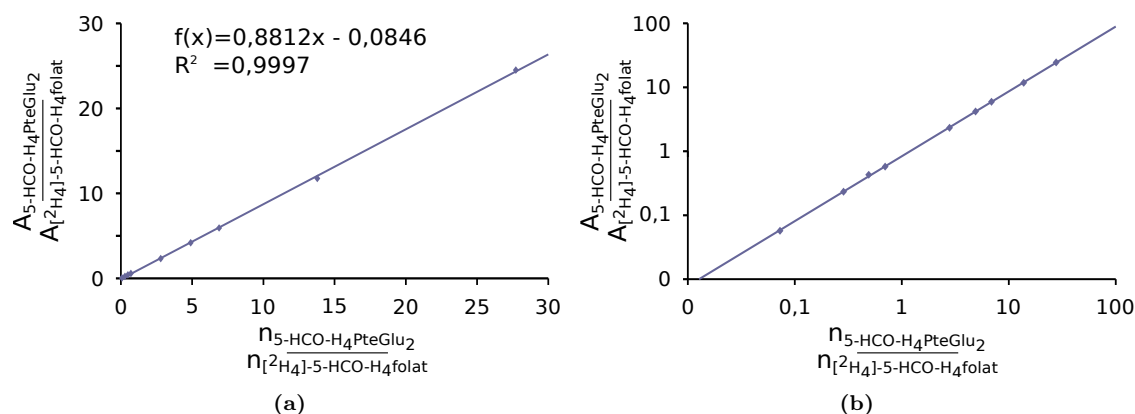
zu einer geringeren Intensität für das entsprechende Fragment (Abbildung A.4). Das De-clustering Potential und die Kollisionsenergie wurden deshalb durch mehrere Messungen mit jeweils ansteigenden Werten optimiert. Es bestätigte sich, dass mit steigender Anzahl an Glutamateinheiten eine höhere Kollisionsenergie notwendig war, um die Intensität des jeweiligen Fragments, welches sich aus der Abspaltung der Glutamatkette (bzw. teilweise mit zusätzlicher Abspaltung der C<sub>1</sub>-Einheit) ergab, zu optimieren.

Am Beispiel von Weizenkeimen ist in Abbildung 3.13 zu sehen, dass in der Probenlösung noch deutliche Menge an Di- und sogar Triglutamaten enthalten waren und diese damit einen Anteil an den geringeren Gehalten im Vergleich zum Mikrobiologischen Assay hatten. Um abzuschätzen, wie groß der Anteil an Diglutamaten in der Weizenkeimlösung war, wurde das 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> (Diglutamat des Hauptfolates in Weizenkeimen) käuflich erworben und eine Responsegerade für 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-HCO-H<sub>4</sub>folat als Internen Standard aufgenommen (Abbildung 3.14).

Da nicht alle Vitamere als Diglutamate erworben werden konnten, wurde untersucht, inwiefern sich die Responsefaktoren auch abschätzen lassen, um somit eine semiquantitative Bestimmung der Diglutamate zu ermöglichen. Dafür wurde der Responsefaktor für das 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> durch zwei Aufarbeitungen mit unterschiedlicher Dekonjugation abgeschätzt. Die Dekonjugation der einen Aufarbeitung wurde nur mit Hühnerpankreatin durchgeführt, so dass die Dekonjugation der Polyglutamate nur bis zur Diglutamatstufe erfolgte. Bei der anderen Aufarbeitung wurde zusätzlich Rattenserum zugegeben, so dass ausschließlich die Monoglutamate entstanden. Die Differenz der Monoglutamate zwischen den beiden Aufarbeitungen entsprach dann der Menge an Diglutamaten in der Hühnerpankreatinaufarbeitung und der Responsefaktor RF ergab sich damit wie folgt<sup>3</sup>:

$$RF = \frac{A_{5-HCO-PteGlu_2}}{A_{[{}^2H_4]-5-HCO-H_4folat}} \cdot \frac{\Delta n_{5-HCO-H_4folat}}{n_{[{}^2H_4]-5-HCO-H_4folat}} \quad (3.3)$$

<sup>3</sup>A: Fläche unter dem Peak, n: Stoffmenge



**Abbildung 3.14:** Responsegerade von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-HCO-H<sub>4</sub>folat als internem Standard: Stoffmengenverhältnisse (x-Achse) gegen Peakflächenverhältnisse (y-Achse) in linearer (a) und in logarithmischer Auftragung (b).

Für den Fall, dass auch in der mit Rattenserum behandelten Probenlösung noch kleine Mengen an Diglutamaten enthalten waren, wurde die entsprechende Fläche von der Fläche in der Hühnerpankreatinaufarbeitung ( $A_{5-HCO-H_4PteGlu_2}$ ) abgezogen. Der über die Responsegerade ermittelte Faktor von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> unterschied sich mit  $0,851 \pm 0,024$  nur wenig von dem abgeschätzten Faktor aus den Probenlösungen (0,814), so dass auch für die anderen Vitamere angenommen wurde, dass eine Abschätzung der Diglutamate über die durch dieses Verfahren ermittelten Responsefaktoren stattfinden konnte. Dies wurde für alle Diglutamate, abgesehen von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub>, jeweils in einer Doppelbestimmung bei drei verschiedenen Lebensmitteln (Brokkoli, Baguette, Erbsencremesuppe) durchgeführt. Die Faktoren sind in Tabelle 9.3 zusammengefasst. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 3 - 30 %.

Diese ausführliche semiquantitative Bestimmung der Responsefaktoren von sechs Folaten wurde auf der YMC-Säule durchgeführt. Für 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> ergab sich hier ein Responsefaktor von  $0,583 \pm 0,052$ . Zusätzlich wurde eine Responsegerade in Anwesenheit von DTT aufgenommen und ergab einen Responsefaktor von  $0,608 \pm 0,035$ . Weiterhin wurde auch ein wiederfindungskorrigierter Responsefaktor ermittelt, um Verluste bei der Aufarbeitung zu korrigieren, bzw. zu untersuchen, ob die Mono- und Diglutamate ein stark abweichendes Verhalten aufweisen. Dafür wurden die Lösungen für die Erstellung der Responsegeraden der üblichen Aufarbeitung für Lebensmittel, aber ohne Zugabe der Dekonjugasen, unterzogen. Hier ergab sich ein Faktor von  $0,591 \pm 0,011$ . Die Werte sind jeweils nicht signifikant verschieden.

Weiterhin wurde zur Bestätigung der Quantifizierung über den markierten internen Standard des Monoglutamats eine Standardaddition mit drei Aufstockniveaus an 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> in der Matrix Spinat durchgeführt. Dabei wurde jedoch nur Hühnerpankreatin und kein Rattenserum verwendet, damit die Dekonjugation nur bis zu den Diglutamaten erfolgte. Die Standardaddition ergab einen Gehalt an 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> von 12,9 µg/100 g statt 11,8 µg/100 g und somit eine Wiederfindung von 91 %. Erfolgte die Auswertung der Standardaddition über die Peakflächen und nicht über das Peakflächenverhältnis von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-HCO-H<sub>4</sub>folat, so ergab sich sogar eine Wiederfindung von 100 %.

### Screening auf unvollständige Dekonjugation

Wie schon erwähnt, fand bei Weizenkeimen keine vollständige Dekonjugation statt. Um zu erfahren, ob es sich bei den Weizenkeimen um einen Einzelfall handelte, sollten auch andere Lebensmittel daraufhin untersucht werden. Die Ergebnisse des Screenings auf Diglutamate und Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Bei mehreren Lebensmitteln konnten keine oder nur geringe Mengen an Diglutamaten ermittelt werden. Jedoch zeigten auch viele andere Lebensmittel, aus den unterschiedlichsten Bereichen, dass es des Öfteren zu einer unvollständigen Dekonjugation gekommen ist. Am Beispiel der Erbsen wurde z.B. deutlich, dass das Kochen der Probe vor der Dekonjugation ebenfalls einen Einfluss hatte. Hier zeigte sich eine deutlich schlechtere Dekonjugation. Doch auch ohne den zusätzlichen Erhitzungsschritt wurden bei Erbsen Tri- und weitere höhere Polyglutamate detektiert. Dieser negative Einfluss des Kochens vor der Dekonjugation konnte anhand einer früheren Kartoffelprobe bestätigt werden, bei der ohne zusätzlichen Kochschritt nur Monoglutamate zu detektieren waren und mit zusätzlichem Kochschritt sowohl Di- als auch deutliche Mengen an Triglutamaten.

Des Weiteren wurden bei Proben, bei denen hohe Mengen an Diglutamaten ermittelt wurde, häufig auch deutliche Mengen an höheren Polyglutamaten detektiert. Die Sojabohnenlösung hingegen enthielten zwar nur einen geringen Anteil an Diglutamaten, aber dennoch konnten auch hier Triglutamate detektiert werden. Eine Aussage über die genaue Menge ist jedoch nicht möglich. Im Rahmen einer Forschungsarbeit [180], in der die Dekonjugation der Sojabohnen ebenfalls untersucht wurde, konnten bei einem ähnlichen Monoglutamatgehalt ( $235 \pm 5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ), weder Di- noch höhere Polyglutamate detektiert werden, so dass der Triglutamatgehalt, der in der Sojabohnenprobe in der vorliegenden Arbeit detektiert wurde, vermutlich vernachlässigbar war. Bei Azuki Bohnen wurden dafür, trotz der nicht allzu großen Menge an Diglutamaten, noch deutliche Mengen an Tri- und höheren Polyglutamaten detektiert, die auch nach einer Optimierung der Dekonjugation noch zu sehen waren, obwohl der ermittelte Gesamtfolatgehalt von 178 auf 201  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  anstieg.

### Auswirkung von DTT und Mercaptoethanol auf die Dekonjugation

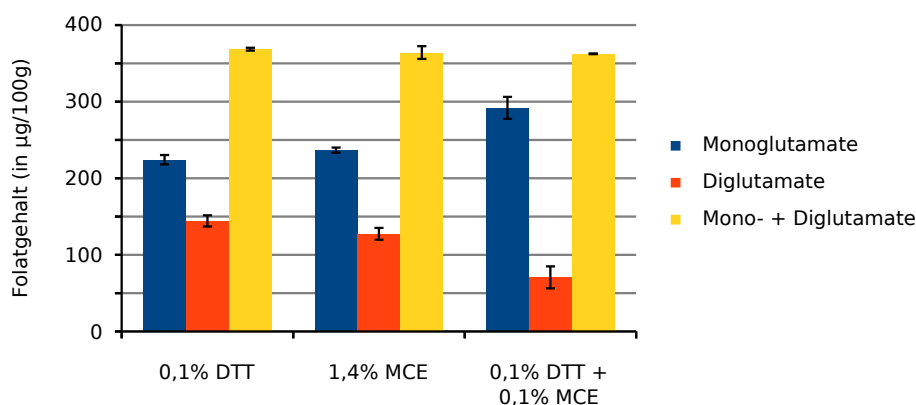
Auf Grund der Toxizität und des unangenehmen Geruchs von Mercaptoethanol sollte dieses durch ein etwas weniger gesundheitsschädliches und geruchsärmeres Reduktionsmittel ersetzt werden. Laut PATRING et al. [103] eignen sich sowohl Dithiothreitol (DTT) als auch 2,3-Dimercapto-1-propanol (BAL), jeweils in einer Konzentration von 0,1 %, sehr gut zur Stabilisierung der Folate. DTT (0,1 % bzw. 0,0065 mol/l) wurde in der vorliegenden Arbeit der Vorzug gegeben und im Rahmen einer Forschungsarbeit [180] mit dem bisher verwendeten Mercaptoethanol, in einer Konzentration von 1,4 % (v/v) bzw. 0,2 mol/l, verglichen. Dabei konnte keine Verschlechterung bzgl. der Stabilität der Folate (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, PteGlu und H<sub>4</sub>folat) festgestellt werden, obwohl die Konzentration an DTT deutlich geringer als an Mercaptoethanol war. Die Wiederfindungen nach einem 10 min-Kochschritt, einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und der Kombination aus beidem lagen bei DTT im Mittel bei 100 %, abgesehen vom H<sub>4</sub>folat, bei dem ein Verlust von 10 % zu verzeichnen war.

Für Mercaptoethanol ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass es sowohl die Aktivität der Dekonjugase im humanen Plasma erhöht [182], als auch die Aktivität der

**Tabelle 3.8:** Mono- und Diglutamatgehalte verschiedener Lebensmittel. Höhere Polyglutamate wurden bei mehreren der angegebenen Lebensmitteln untersucht und die Mengen relativ zueinander abgeschätzt bzw. in geringe, mittlere und größere Mengen an Tri- bzw. Polyglutamaten eingeteilt.

Lebensmittel	Mono- glutamate (in µg/100 g)	Mono- + Di- glutamate (in µg/100 g)	Diglutamat- anteil (in %)	Poly- glutamate
Johannisbeersaft	2,5	2,6	2	
Traubensaft	0,8	0,8	-	
Bananennektar	12	12	-	
Orangensaft	25	25	-	
Apfelsaft	0,1	0,1	-	
Tomatensaft	19,3	19,4	0,4	
Karottensaft	13	14	8	**
Karotten	53	55	3	*
Kartoffel	17	18	4	***
Spinat, gehackt	113	113	0,1	
Brokkoli	176	176	0,3	
Blumenkohl	86	88	2	*
Erbsen <sup>1</sup>	68	101	33	***
Erbsen <sup>2</sup>	78	101	23	***
Erbsensuppe	39	39	0,4	
Sojabohnen	244	245	0,5	**
Azuki Bohnen	172	178	4	***
Mungbohnen	300	422	29	**
Glasnudeln	0,2	0,2	-	-
Tellerlinsen	136	143	5	-
Kichererbsen	272	323	16	
Weizenkeime	244	321	24	***
Buchweizen	35	39	11	**
Couscous	16	17	2	-
Maisgrieß	14	14	-	-
Gerstengraupen	26	26	-	-
Haferflocken	28	30	8	**
Hirse	38	38	-	-
Basmati Reis	10	10	0,1	-
Spaghetti	17	17	-	-
Baguette	30	30	-	
Kokos	4,0	4,4	8	**
Walnuss	113	137	17	***
Haselnuss	61	66	7	**
Erdnuss	79	99	20	**
Mandeln	19	29	33	***
Pistazien	24	40	40	***
Leber	650	663	2	(*)
Lachs	2,2	2,2	-	-
Geramont	28	39	29	*
Geramont cremig-leicht	83	109	24	*

<sup>1</sup> kochen vor der Enzymzugabe und Inkubation, <sup>2</sup> ohne kochen vor der Enzymzugabe und Inkubation,  
 \* kleinere Mengen an Triglutamaten, \*\* mittlere Mengen an Triglutamaten, teilweise höhere Polyglutamate,  
 \*\*\* größere Mengen an Triglutamaten und höhere Polyglutamate, - keine Triglutamate detektiert



**Abbildung 3.15:** Folategehalte in Weizenkeimen nach Aufarbeitung mit MES-Puffern verschiedener Zusammensetzung an DTT und Mercaptoethanol (MCE).

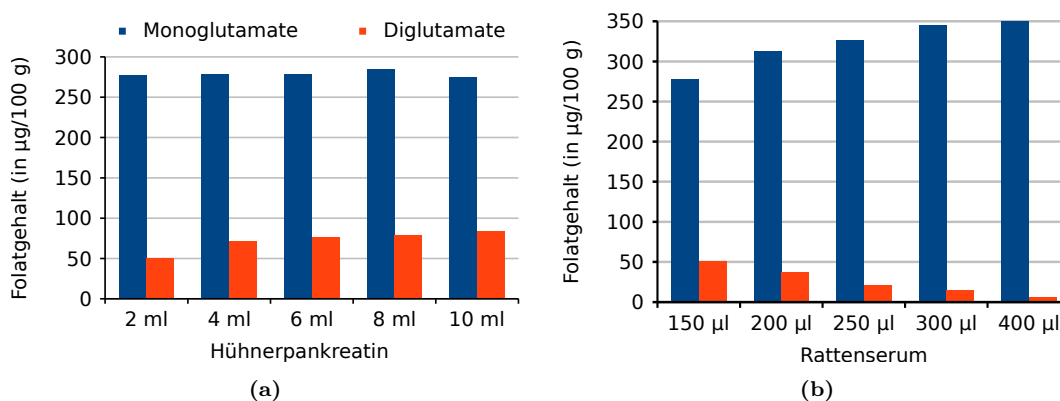
Dekonjugase im Rattenserum [107]. Zwar wurde die positive Wirkung auf die Aktivität der Dekonjugase auch für andere Thiole beschrieben, nur war das Ausmaß auf die Aktivität nicht immer identisch. Deshalb wurde die Dekonjugationseffizienz in Anwesenheit von Mercaptoethanol und DTT miteinander verglichen. Dafür wurden Weizenkeime, bei denen es zu keiner vollständigen Dekonjugation gekommen ist, mit verschiedenen Puffern in Dreifachbestimmung aufgearbeitet. Die Puffer enthielten entweder Mercaptoethanol oder DTT bzw. eine Kombination aus beiden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

Der Puffer mit DTT zeigte den geringsten Gehalt an Monoglutamaten und den höchsten Gehalt an Diglutamaten. Der Unterschied zwischen diesem und dem Puffer mit Mercaptoethanol war dabei bzgl. dem Diglutamatgehalt nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Ein wirklicher Unterschied zwischen den Monoglutamatgehalten der beiden Puffer war aber nicht ganz auszuschließen ( $p = 0,04$ ). Zwischen dem kombinierten Puffer und dem Puffer mit DTT handelte es sich dafür sowohl beim Monoglutamatgehalt als auch beim Diglutamatgehalt um einen signifikanten Unterschied (Monoglutamatgehalt:  $p = 0,002$ ; Diglutamatgehalt:  $p = 0,0014$ ). Der kombinierte Puffer zeigte den höchsten Gehalt an Monoglutamaten und damit auch den geringsten Diglutamatgehalt. Der Unterschied zum Mercaptoethanolpuffer, welcher jeweils bzgl. den ermittelten Gehalten dazwischen lag, war ebenfalls signifikant ( $p = 0,003$  und  $p = 0,004$ ). Die sich ergebende Summe aus Mono- und Diglutamaten war zwischen dem Mercaptoethanolpuffer und den beiden anderen Puffern jeweils nicht signifikant verschieden, wohl aber zwischen dem DTT-Puffer und dem Kombinationspuffer. Dies könnte auf die geringen Standardabweichungen zurückzuführen sein und sich damit eher um einen zufälligen Unterschied gehandelt haben, denn die einzelnen Standardabweichungen der Mono- und der Diglutamatgehalte waren größer und würden keinen signifikanten Unterschied ergeben.

### Optimierung der Einwaage und der Enzymmenge

Anhand von Weizenkeimen und einigen anderen Proben hat sich gezeigt, dass es häufiger zu einer unvollständigen Dekonjugation gekommen ist. Der Anteil an Diglutamaten war dabei teilweise nicht ganz unerheblich. Die Dekonjugation wurde deshalb anhand der Weizenkeime optimiert. Zuerst wurde die Menge an Hühnerpankreatin schrittweise erhöht (Abbildung 3.16a). Die Menge an Diglutamaten bezieht sich im folgenden Abschnitt nur





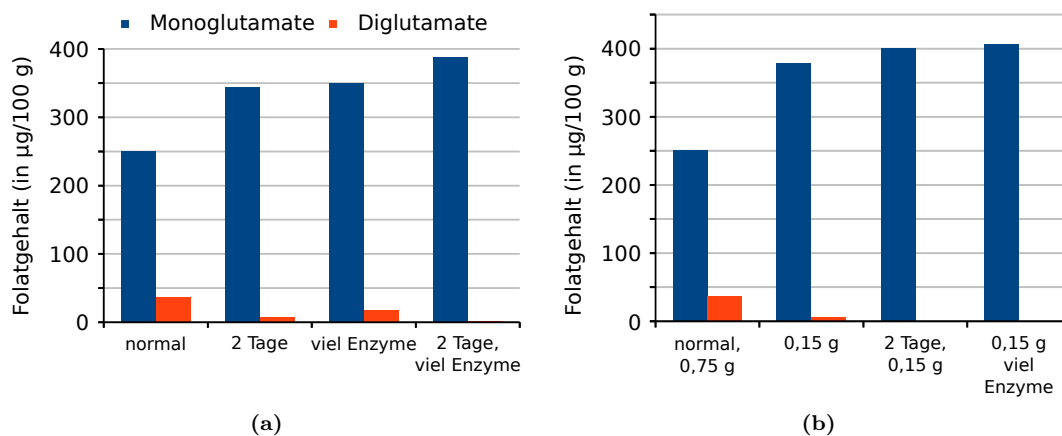
**Abbildung 3.16:** Variation der Menge von Hühnerpankreatin (a) und Rattenserum (b) zur Dekonjugation der Polyglutamate. Der Monoglutamatgehalt und der Diglutamatgehalt, in Form von  $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_2$  und  $5\text{-HCO-H}_4\text{PteGlu}_2$ , ist in µg PteGlu pro 100 g angegeben.

auf das  $5\text{-HCO-H}_4\text{PteGlu}_2$  und das  $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_2$ . Doch dabei ist zu erwähnen, dass es sich bei  $5\text{-HCO-H}_4\text{folat}$  und  $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{folat}$  auch um diejenigen Vitamere mit dem größten Anteil handelte. In Abbildung 3.16a ist zu erkennen, dass mit steigender Menge an Hühnerpankreatin die Menge an Diglutamaten leicht anstieg, trotz eines relativ konstanten Monoglutamatgehaltes. Demnach müssen noch höhere Polyglutamate vorhanden gewesen sein, die vom Hühnerpankreatin nun verstärkt zu den Diglutamaten dekonjugiert werden konnten.

Anschließend wurde eine steigende Menge an Rattenserum, bei konstanter Hühnerpankreatinzugabe, untersucht. Abbildung 3.16b zeigt, dass der Diglutamatgehalt mit zunehmender Rattenserumzugabe gesunken ist und der Monoglutamatgehalt anstieg. Die Summe blieb dabei, abgesehen von der ersten Probe, weitestgehend konstant. Daraus wurde geschlossen, dass eine Kombination aus höherer Hühnerpankreatin- und Rattenserumzugabe notwendig ist, damit die höheren Polyglutamate besser zu den Diglutamaten abgebaut werden können und diese wiederum besser zu den Monoglutamaten. Daraufhin wurden die Weizenkeime mit einer sechsfach konzentrierteren Hühnerpankreatinlösung und der doppelten Menge an Rattenserum versetzt.

Weiterhin wurde die Dauer der Dekonjugation untersucht. In Abbildung 3.17a ist zu erkennen, dass sowohl eine Verlängerung der Dekonjugation um einen ganzen Tag als auch die Erhöhung der Enzymmenge eine Erhöhung der Monoglutamate und eine Reduktion der Diglutamate zur Folge hatte. Demzufolge erhöhte sich auch die Summe aus Mono- und Diglutamaten. Die Kombination beider Varianten bewirkte eine weitere Erhöhung des Folatgehaltes, bei einem nur noch sehr geringen Diglutamatanteil.

Da eine Inkubation über zwei Tage die Aufarbeitung allzu sehr in die Länge gezogen hätte, wurde auch eine Reduktion der Einwaage in die Betrachtungen mit eingeschlossen (Abbildung 3.17b). Hier zeigte sich, dass diese Variante eine sehr effektive Methode war, um die Dekonjugationseffizienz zu verbessern. Dies konnte auch in einer Forschungsarbeit [180] am Beispiel von Mungbohnen bestätigt werden. Dort kam es ebenfalls zu einem kontinuierlichen Absinken des Diglutamatanteils bei steigendem Monoglutamatgehalt. Um auch die letzten Diglutamate und vermutlich noch vorhandene höhere Polyglutamate vollständig zu dekonjugieren, war es aber notwendig, entweder die Dauer der Inkubation oder



**Abbildung 3.17:** Variation der Dauer, der Enzymmenge und der Einwaage zur Dekonjugation der Polyglutamate. Der Monoglutamatgehalt und der Diglutamatgehalt, in Form von  $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}_2$  und  $5\text{-HCO-H}_4\text{PteGlu}_2$ , ist in µg PteGlu pro 100 g angegeben.

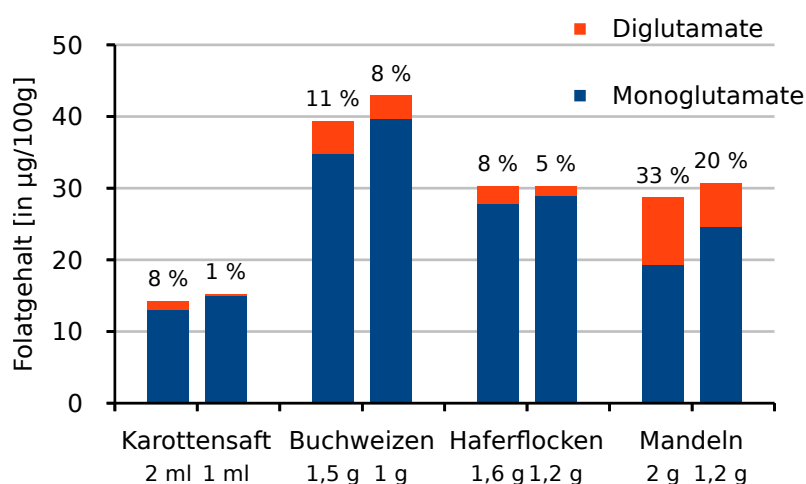
die Enzymmenge noch weiter zu erhöhen. Bei beiden Varianten konnte der Diglutamanteil auf 0,1% reduziert werden. Wie schon erwähnt, bot sich eher die Erhöhung der Enzymmenge an, da sich die Dauer der Aufarbeitung sonst deutlich erhöht hätte.

In der Literatur werden des Öfteren auch Dekonjugasen aus anderen Quellen erwähnt. Dazu zählt zum einen das Schweinepankreatin und die Schweineniere. In Anwesenheit des Schweinepankreatin wurden bei eigenen Untersuchungen jedoch immer geringere Monoglutamatgehalte und nur leicht höhere Diglutamatgehalte ermittelt, so dass sich ein geringerer Gesamtfolatgehalt ergab. Daraufhin wurde diese Enzymquelle als weniger optimal eingestuft.

Die Dekonjugase aus der Schweineniere wurde im Rahmen einer Forschungsarbeit [180] auf ihre Effizienz hin näher untersucht. Auf Grund großer Mengen an endogenem Folat musste das Schweinenierenhomogenisat (1 g Schweineniere + 3 ml Phosphatpuffer + Ascorbinsäure, pH 7) noch zusätzlich mit Aktivkohle (0,5 g/ml Homogenisat) aufgereinigt werden. Am Beispiel von Mungbohnen und Pistazien zeigte sich, dass die Schweinenierendekonjugase in der verwendeten Konzentration eine bessere Dekonjugation erzielte (Mungbohnen: 431 statt 401 µg/100 g Pistazien: 91 statt 49 µg/100 g). Nachdem die Konzentration des Hühnerpankreatins (zehnfach) und des Rattenserums (dreifach) erhöht wurde (jeweils gleiche Einwaagen), ergab sich auch mit diesen zwei Dekonjugasen bei Mungbohnen ein vergleichbarer Gehalt (430 µg/100 g). Bei Pistazien konnte mit der Schweinenierendekonjugase keine vollständige Dekonjugation erreicht werden. Dies gelang erst mit einer deutlichen Reduktion der Einwaage und der zwölffachen Menge an Hühnerpankreatin zusammen mit der dreifachen Menge an Rattenserum (siehe nächster Abschnitt).

### Anwendung der Optimierung

Am Beispiel von Weizenkeimen konnte gezeigt werden, dass mit einer optimierten Aufarbeitung eine vollständige Dekonjugation möglich war. Da Weizenkeime nicht die einzigen Lebensmittel waren, bei denen es zu einer unvollständigen Dekonjugation gekommen ist, sollte der Einfluss der Reduktion der Einwaage und die Kombination aus einer geringeren Einwaage und einer erhöhten Enzymmenge auch auf andere Lebensmitteln untersucht



**Abbildung 3.18:** Mono- und Diglutamatgehalt einiger Lebensmittel in Abhängigkeit von der Einwaage (in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  berechnet als PteGlu).

werden.

In Abbildung 3.18 ist am Beispiel von vier weiteren Lebensmitteln zu sehen, dass durch die Reduktion der Einwaage eine Erhöhung der Monoglutamate erzielt werden konnte. Bei Karottensaft konnten die Polyglutamate fast vollständig abgebaut werden, wohingegen bei Mandeln noch deutliche Mengen an Diglutamaten zu sehen waren. Beim Screening auf höhere Polyglutamate konnten außerdem noch größere Mengen an Tri- und höheren Polyglutamaten detektiert werden. Bei Buchweizen, Haferflocken und dem Karottensaft konnten hingegen nur noch kleine Mengen an Triglutamaten detektiert werden, so dass der Mono- und der Diglutamatgehalt weitestgehend dem Gesamtfolatgehalt entsprochen hat. Für Buchweizen erfolgte deshalb noch eine weitere Optimierung (Kombination). Diese ergab einen Gesamtfolatgehalt von  $45\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  statt  $43\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (kleinere Einwaage) bzw.  $39\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  (größere Einwaage). Damit konnte das Ergebnis für den Gesamtfolatgehalt nochmals um  $2\ \mu\text{g}/100\text{ g}$  gesteigert werden. Diese Differenz zeigte damit den Gehalt an Triglutamaten an, der trotz Reduktion der Einwaage nicht dekonjugiert werden konnte. Für die Haferflocken konnte durch die Reduktion der Einwaage zwar die Menge an Monoglutamaten erhöht und die Menge an Diglutamaten erniedrigt werden, doch kam es hier zu keiner weiteren Erhöhung der Summe aus Mono- und Diglutamaten, so dass die Menge der verbliebenen Triglutamate keinen großen Beitrag zum Gesamtfolatgehalt geleistet hat.

Bei anderen Lebensmitteln wurde die Kombination aus der Einwaagenreduktion und der Zugabe einer konzentrierteren Enzymlösung ebenfalls ausgetestet. In Abbildung 3.19 ist am Beispiel des  $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{folats}$  in einer Erbsenprobe zu sehen, dass sich die höheren Polyglutamate durch diese Kombination vollständig dekonjugieren ließen. Der kleine Peak bei den Diglutamaten ist nur schwer vom Grundrauschen zu unterscheiden und damit vernachlässigbar im Vergleich zu den Monoglutamaten. Auch bei anderen Lebensmitteln war diese Variante der Dekonjugation zielführend (Abbildung 3.20). Die Polyglutamate konnten meistens vollständig dekonjugiert werden, so dass entweder keine oder nur noch sehr geringe Mengen an Diglutamaten zu detektieren waren. Nur bei Pistazien musste die Einwaage verglichen zum Folatgehalt deutlich weiter reduziert und die Enzymmenge noch weiter erhöht werden (zweimal sechsfach konzentriertes Hühnerpankreatin und  $450\ \mu\text{l}$  Rattenserum). Und auch bei den Erbsen ist verglichen zum Folatgehalt eine deutliche Re-

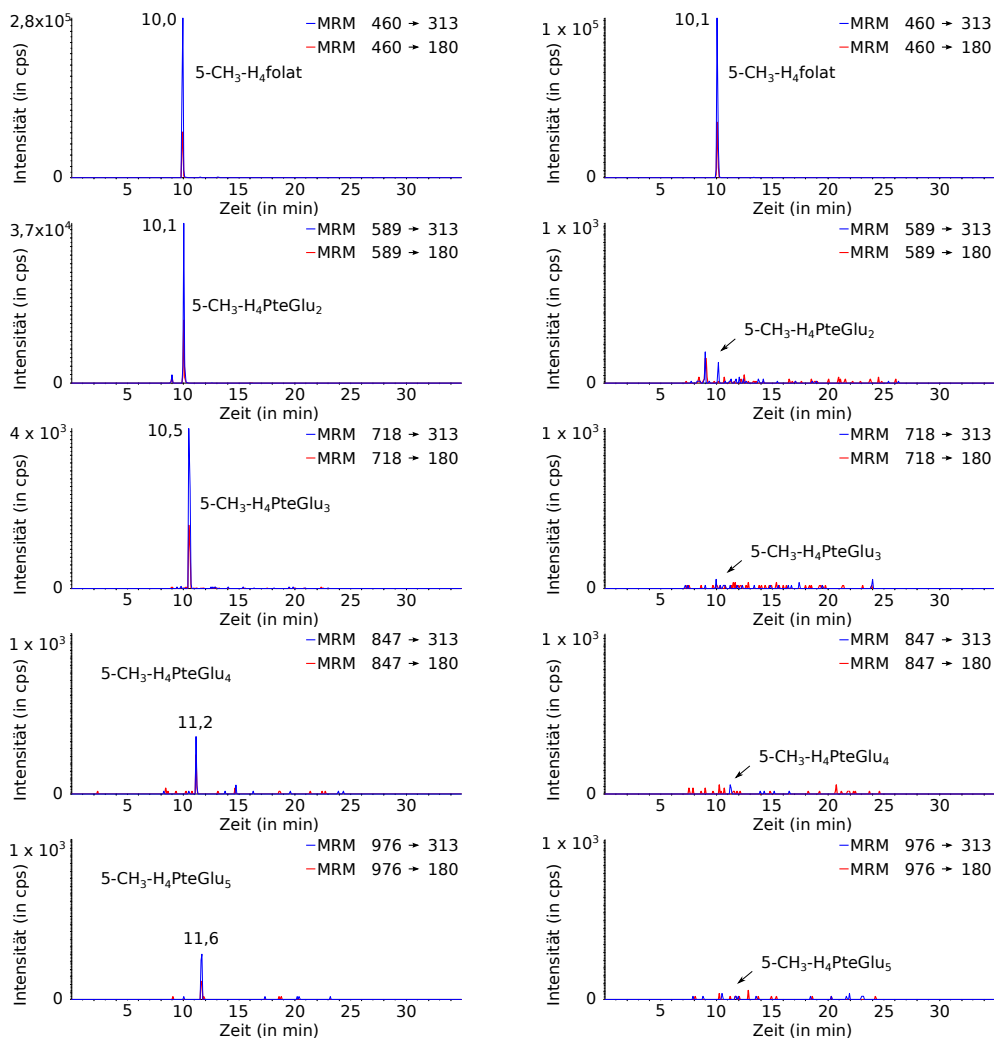


Abbildung 3.19: Chromatogramme der Mono- und Polyglutamate des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats vor (links) und nach der Optimierung (rechts) am Beispiel einer Erbsenprobe.

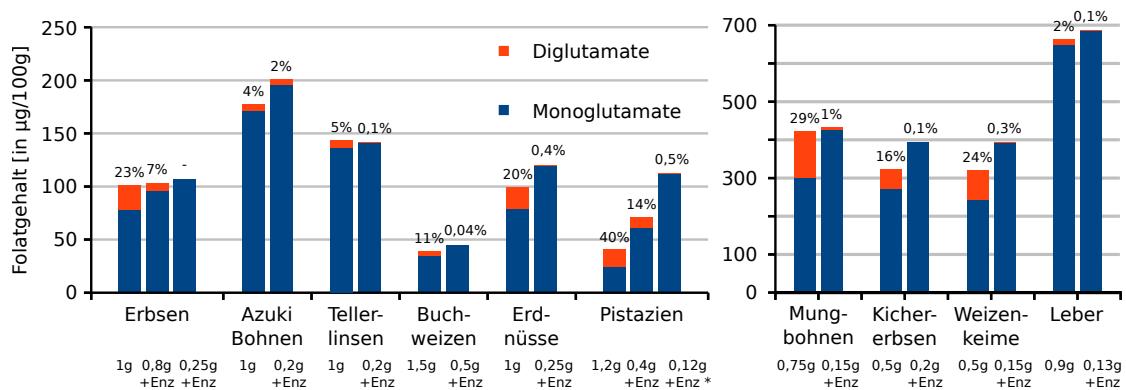


Abbildung 3.20: Mono- und Digtamatgehalte verschiedener Lebensmittel (in µg/100g berechnet als PteGlu) vor der Optimierung und mit Anwendung der optimierten Methode: Reduktion der Einwaage und erhöhte Enzymzugabe (+Enz) bzw. stark erhöhte Enzymzugabe (+Enz\*).

duktion der Einwaage notwendig gewesen. Hier reichte aber die sechsfach-Konzentrierung des Hühnerpankreatins und die Verdopplung des Rattenserums (300 µl) aus. Eine Ausnahme bildeten die Azuki Bohnen. Diese zeigten trotz Anwendung der optimierten Methode und einer eigentlich recht geringen Menge an Diglutamaten immer noch große Mengen an Triglutamaten und deutliche Mengen an Polyglutamaten. Eine weitere Reduktion der Einwaage und eine noch höhere Menge an Enzymen wurde jedoch nicht geprüft.

## Diskussion

Die von PFEIFFER et al. [77] auch für HPLC-Methoden empfohlene Trienzymbehandlung hat, wie schon von MÖNCH [19] festgestellt wurde, keine Erhöhung des Folatgehaltes der untersuchten Lebensmittel gebracht. Im Gegensatz zu MÖNCH war durch die Proteasebehandlung aber keine Signalverbesserung feststellbar. Im Gegenteil, die Intensität von 10-HCO-PteGlu hat sich sogar verschlechtert und es kam zusätzlich zur Überlagerung mit Matrixbestandteilen beim [ $^2\text{H}_4$ ]-H<sub>4</sub>folat. Die Gründe könnten in der stärker aufgeschlossenen Matrix zu finden sein. Dadurch könnte es u.a. zu Matrixeffekten gekommen sein, die zur Verschlechterung der Ionisation und damit zur Verminderung des Signals (Ionensuppression) geführt haben. Bei der Signalverbesserung von MÖNCH könnte es sich hingegen um ein *ionenhancement* gehandelt haben, welches mit dem LC-MS/MS-System in der vorliegenden Arbeit nicht aufgetreten ist, oder um einen durch den Proteaseabbau bedingten Wegfall einer zuvor vorhandenen Ionensuppression. Matrixeffekte sind abhängig vom Quellendesign der verschiedenen Hersteller [183], weshalb es zu diesen Unterschieden gekommen sein kann. Außerdem hat MÖNCH ein anderes HPLC-System verwendet, welches zwar das gleiche Säulenmaterial verwendete, aber das mit anderen Eluenten betrieben wurde, wodurch es wahrscheinlich zu einem abweichenden Elutionsprofil gekommen ist. In der vorliegenden Arbeit könnte hingegen erst durch die Proteasebehandlung eine Ionensuppression vorgelegen haben, denn ohne die zusätzliche Enzymbehandlung konnten, wie in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, bei den untersuchten Lebensmitteln keine bzw. keine nennenswerten Matrixeffekte entdeckt werden. Es handelte sich bei der zur Untersuchung der Matrixeffekte verwendeten HPLC-Säule um eine Säule mit einem anderen C18-Material und um andere Eluenten, da sich bei der zuvor verwendeten Säule eine Verschlechterung der Trennleistung ergeben hatte und mit der im folgenden benutzten Säule keine Chromatographie in der gleichen Güte erreicht werden konnte. Beim Wechsel auf eine HPLC-Säule mit einem anderem Säulenmaterial konnte ebenfalls eine gute Trennung von Folatvitameren mit gleichem MRM-Übergang wie bei den [ $^2\text{H}_4$ ]-markierten Standards anderer Folatvitamere erzielt werden. Dafür musste jedoch ein Eluentenwechsel stattfinden (Acetonitril und 0,1 %ige Ameisensäure statt Methanol und 0,1 %ige Essigsäure). Am Beispiel der Trienzymbehandlung bei Weizenkeimen konnte der Effekt der Signalverminderung durch die zusätzliche Enzymbehandlung dann auch nicht bestätigt werden.

Die beschriebene Coelution bzw. Überlagerung beim [ $^2\text{H}_4$ ]-H<sub>4</sub>folat mit einer durch die Proteasebehandlung bedingten Substanz mit gleichem *m/z*-Verhältnis war durch die Proteasebehandlung bei drei von vier Camemberts der Grund für den geringeren Wert des Gesamtfolatgehaltes. Bei einem der untersuchten Camemberts waren unabhängig vom H<sub>4</sub>folat weitere Unterschiede vorhanden. Dies trat auch bei der späteren Untersuchung am Beispiel der Weizenkeime auf. Hier wurde mit der Proteasebehandlung ein deutlich geringerer Folatgehalt ermittelt, ohne dass Störpeaks in der Nähe des entsprechenden Folatpeaks zu ermitteln waren. Eine Möglichkeit wäre, dass der Erhitzungsschritt nicht

ausgereicht hat, um die Enzyme der verwendeten Protease zu inaktivieren und diese dann die Dekonjugasen des Ratten- und/oder des Hühnerpankreatins abgebaut haben. Eine weitere Möglichkeit wären Substanzen, die auf die Dekonjugasen inhibierend gewirkt haben und entweder aus dem Proteasepulver gekommen sind oder erst durch den Proteaseabbau freigesetzt wurden.

Doch weder die Proteasebehandlung noch der Einsatz der  $\alpha$ -Amylase führte zu einer Verbesserung der Extraktion der Folate aus Lebensmitteln oder zu einer Signalerhöhung. Nach der Amylasebehandlung wurde teilweise sogar ein geringerer Folatgehalt ermittelt. Dies ist aber vermutlich auf den Umstand zurückzuführen, dass die Proben nach der Amylasebehandlung teilweise gekocht wurden, so dass es zu einer Verkleisterung der noch nicht abgebauten Stärke gekommen sein könnte und die Folate dadurch eingeschlossen wurden. Durch diesen Einschluss ist es denkbar, dass die Folate nicht mit der Dekonjugase in Kontakt gekommen sind und daraufhin nicht zu den Monoglutamaten abgebaut werden konnten. Da das zusätzliche Erhitzen nicht bei allen Lebensmitteln zu einer Verringerung des ermittelten Folatgehaltes führte, wurde nur bei stärkehaltigen Proben der zusätzliche Erhitzungsschritt weggelassen. Doch auch ohne diesen brachte die Amylasebehandlung keinen zusätzlichen Nutzen, wie am Beispiel der Weizenkeimen demonstriert werden konnte. Bei diesem Versuch wurde nämlich der zusätzliche Kochschritt weggelassen. Es ergab sich dennoch keine Verbesserung, aber auch keine Verschlechterung. Dies könnte auf die im Hühnerpankreatin vorhandene Amylase [184] zurückzuführen sein, die eine zusätzliche Behandlung mit Amylase unnötig gemacht hat. Die gleiche Erklärung könnte auch für die Proteasebehandlung gelten, denn es ist davon auszugehen, dass im Hühnerpankreatin auch Proteasen enthalten waren.

Obwohl PFEIFFER et al. [77] die Trienzymbehandlung auch für HPLC-Methoden empfohlen haben, konnte bei keinem der untersuchten Lebensmittel eine Verbesserung der Extraktion bzw. Erhöhung des ermittelten Folatgehaltes festgestellt werden. Doch auch in anderen Arbeitsgruppen konnte nicht immer eine signifikante Verbesserung erzielt werden, z.B. ebenfalls nicht bei Brot, wohl aber bei Spaghetti und Reis [77] oder laut KONINGS nicht bei Gemüse, Fleisch und Kartoffeln, aber dafür bei Obst und Milchprodukten [43]. Beide Arbeitsgruppen hatten zur Dekonjugation jedoch nur Rattenserum zugegeben, aber kein Hühnerpankreatin, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. NDAW et al. [47] hatten ebenfalls Hühnerpankreatin verwendet und kamen zu dem Schluss, dass bei den untersuchten Proben (Hefe, Spinat, Erbsen, Rinderleber und -filet) die alleinige Behandlung mit Hühnerpankreatin ausgereicht hat und weder eine Di- noch eine Trienzymbehandlung einen Effekt auf den detektierten Folatgehalt hat. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Enzyme des Hühnerpankreatin eine zusätzliche Behandlung mit weiteren Enzymen unnötig gemacht haben.

Die Dekonjugation spielt bei der Analyse der Folate mittels HPLC/UV, FLD oder MS eine entscheidende Rolle, da meist nur die Monoglutamate detektiert und quantifiziert werden. Eine Quantifizierung aller Folatvitamere, sowohl die Mono- als auch die Polyglutamate mit bis zu sieben Glutamateinheiten, wäre nämlich ein sehr aufwendiges Unterfangen. Um sich zu vergewissern, dass bei den analysierten Proben nur die Monoglutamate vorgelegen haben, wurden diese zusätzlich auf Polyglutamate hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einigen Lebensmitteln, z.B. den Weizenkeimen, keine vollständige Dekonjugation stattgefunden hat. Bei einigen Proben konnten zwar nur Diglutamate detektiert werden, doch bei anderen Proben wurden sogar Polyglutamate bis hin zum Penta- oder sogar Hexaglutamat detektiert. Eine Aussage über die Menge war nicht möglich, da bei

der LC-MS/MS von der Intensität nicht direkt auf die Konzentration geschlossen werden kann, da die Intensität von mehreren Parametern abhängt, z.B. von der Kollisionsenergie.

Da die Dekonjugase des Hühnerpankreatins wenig anfällig für Inhibitoren sein soll [28], wurde zuerst angenommen, dass eine unvollständige Dekonjugation eher auf eine zu geringe Aktivität des Rattenserums zurückzuführen sein könnte. Außerdem war die Intensität der Diglutamate bei Weizenkeimen deutlich höher als die der Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten, auch wenn das keine hohe Aussagekraft hat, wie oben schon erwähnt wurde. Daraufhin wurde eine semiquantitative Bestimmung für die Diglutamate entwickelt, um abschätzen zu können, welchen Anteil die Diglutamate im Vergleich zu den Monoglutamaten haben und ob der Anteil relevant ist.

Für das Verhältnis von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> zu [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-HCO-H<sub>4</sub>folat konnte über einen weiten Bereich ein lineares Verhalten angenommen werden. Außerdem zeigte sich, dass es möglich war, die Responsefaktoren der Diglutamate über die entsprechenden [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Monoglutamate mit Hilfe zweier Aufarbeitungen abzuschätzen - einmal unter Zugabe von Rattenserum und einmal ohne. Das Hühnerpankreatin wurde bei jeder Aufarbeitung verwendet. Die Schwankungsbreiten der abgeschätzten Responsefaktoren für die Diglutamate waren teilweise recht groß, was u.a. auf die geringen Gehalte in den Lebensmitteln zurückgeführt werden kann, in Kombination mit der jeweiligen Analysentoleranz, die sich aus zwei Aufarbeitungen ergibt. Von Vorteil ist hingegen, dass die Responsefaktoren auch gleich wiederfindungskorrigiert waren, obwohl sich bei 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> gezeigt hatte, dass es keine großen Unterschiede zwischen den wiederfindungskorrigierten Responsefaktoren (über aufgearbeitete Lebensmittel und über aufgearbeitete Standardlösungen) und dem auf übliche Weise ermittelten Responsefaktor gab. Dennoch hatte die Standardaddition trotz der Verwendung des wiederfindungskorrigierten Responsefaktors nur eine Wiederfindung von 91 % ergeben. Doch ist diese Abweichung vermutlich eher auf die Messunsicherheit als auf wirkliche Verluste zurückzuführen, wie eine Auswertung der Standardaddition über die Flächen anstatt über die Peakflächenverhältnisse gezeigt hatte. Diese hat sehr gut mit dem Ergebnis über den Responsefaktor übereingestimmt (Wiederfindung von 100 %), weshalb davon auszugehen ist, dass der Gehalt an Diglutamaten gut über die Quantifizierung mit den jeweiligen [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Monoglutamaten abgeschätzt werden kann. Auch FAZILI et al. [181] haben die Diglutamate über das Verhältnis zu den internen Standards der Monoglutamate ([<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiert) abgeschätzt. Jedoch wurden dort die gleichen Kalibrierkurven wie auch für die Monoglutamate verwendet.

Wie sich bei der Analyse verschiedener Lebensmittel gezeigt hat, waren in einigen Proben nicht nur Mono- und Diglutamate vorhanden, sondern auch Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten, weshalb davon auszugehen ist, dass nicht nur das Rattenserum inhibiert wurde, sondern auch das Hühnerpankreatin. Bei einigen Proben war es dennoch möglich, sich dem Gesamtfolatgehalt nur mit der Analyse der Mono- und Diglutamate sehr gut anzunähern, da der Anteil der verbliebenen Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten nur sehr gering war. Am Beispiel von Pistazien ist hingegen sehr deutlich zu erkennen, dass die Dekonjugation so stark beeinflusst wurde, dass der Anteil an Polyglutamaten deutlich größer war, als der Anteil an Monoglutamaten, selbst unter Berücksichtigung der Diglutamate. Bei diesem Lebensmittel versagte auch der Test auf vollständige Dekonjugation mit PteGlu<sub>3</sub>. Hier hätte sich vielleicht eine Überprüfung der Dekonjugation mit PteGlu<sub>7</sub> angeboten. Doch da laut GOLI und VANDERSCLICE [109] die Dekonjugation vermutlich direkt zum Diglutamat erfolgt, hätte sich auch mit dem PteGlu<sub>7</sub> kein Unterschied gezeigt, es sei denn die Affinität für die verschiedenen Ketten-

längen ist unterschiedlich. KÄFERSTEIN und JAENICKE [185] gingen im Gegensatz dazu von einer Exopeptidaseaktivität beim Hühnerpankreatin aus, wobei die Dekonjugation des Triglutamats verglichen mit dem Heptaglutamat nur 2 - 3 Mal so schnell verläuft, obwohl nur eine Glutamateinheit statt fünf abgespalten werden muss. Darauf aufbauend sind die oben genannten Autoren davon ausgegangen, dass längere Konjugate schneller abgebaut werden. In Kombination mit den eigenen Ergebnissen lässt sich daraus schließen, dass der Test mit einem zugesetzten Polyglutamat nicht unbedingt die Dekonjugationseffizienz der gesamten Probe widerspiegelt. Doch nur die Messung der Diglutamate reicht bei einigen Proben auch nicht aus. Es ist deshalb von Vorteil, wenn zusätzlich die höheren Polyglutamate mit analysiert werden, um sich ein besseres Bild von der Dekonjugationseffizienz machen zu können.

Wie schon erwähnt, waren bei vielen Lebensmitteln Diglutamate detektierbar, und bei einigen zusätzlich noch Tri- oder sogar Tetra- und Pentaglutamate. Die Lebensmittel, bei denen die Dekonjugation (weitestgehend) vollständig war, wiesen einen geringen bzw. mittleren Folatgehalt auf. Nun ist anzunehmen, dass der Folatgehalt einiger Lebensmittel für die Dekonjugation vielleicht zu hoch war. Doch am Beispiel der Leber ist zu sehen, dass trotz des sehr hohen Folatgehaltes (und einer Einwaage von 0,9 g) eine recht gute, wenn auch nicht ganz vollständige Dekonjugation erreicht werden konnte. Zusätzlich ist bei Spaghetti und Basmati Reis zu sehen, dass trotz eines hohen Gehaltes an Pyrazino-s-Triazin, welches ebenfalls dekonjugiert werden musste, eine vollständige Dekonjugation erzielt werden konnte. Es müssen dementsprechend noch andere Gründe für die unvollständige Dekonjugation einiger Proben vorliegen.

Ein Grund könnte der pH-Wert des Puffers sein. Für Hühnerpankreatin wird eigentlich ein Optimum von 7 - 8 angegeben [110, 111] und für Rattenserum bei 6,2 - 7,5 [107]. Eine Inkubation der Probe mit Hühnerpankreatin plus/minus Rattenserum bei pH 7 für 3 h mit anschließender Inkubation bei pH 5 über Nacht brachte im Rahmen einer Forschungsarbeit [180] keine Verbesserung. Im Rahmen einer weiteren Forschungsarbeit [186] ergab eine Aufarbeitung von Brokkoli, Spinat, Blumenkohl und Wirsing bei pH 7 (Phosphatpuffer) einen geringeren Monoglutamatgehalt als bei pH 5 (MES-Puffer). Letzteres muss aber nicht unbedingt am pH-Wert gelegen haben, sondern eventuell auch an den Phosphationen des Puffers. Laut KÄFERSTEIN [185] ist die Aktivität der Dekonjugase im Hühnerpankreatin abhängig vom Puffer und der Ionenstärke. Beim Phosphatpuffer (Anionenpuffer) ist die Aktivität z.B. geringer als in Trispuffer (Kationenpuffer). Zu vermuten wäre, dass es auch einen Unterschied zwischen MES-Puffer und dem Phosphatpuffer gibt, denn die Aufarbeitung von Weizenkeimen im Phosphatpuffer bei pH 5 ergab ebenfalls einen geringeren Monoglutamatgehalt als im MES-Puffer (pH 5). Und auch bei KIRSCH und CHEN [117] zeigte sich eine Abhängigkeit der Aktivität bzw. des Gesamtfolatgehaltes (über das mikrobiologische Assay) vom verwendeten Puffer. Im Phosphatpuffer wurde sogar eine höhere Aktivität bei pH 6 als bei 6,5 - 8 ermittelt. Demnach ist es gut möglich, dass sich der MES-Puffer bei pH 5, der von MÖNCH [19] eingeführt wurde, sehr gut für die Dekonjugation eignet.

Die Aktivität der jeweiligen Rattenserumcharge könnte ebenfalls einen Einfluss auf die große Anzahl der unvollständig dekonjugierten Proben gehabt haben, denn bei älteren Proben (Spinat, Camembert und Kartoffeln) wurden keine bzw. deutlich geringere Mengen an Diglutamaten detektiert. Dabei ist aber nicht ganz auszuschließen, dass dies auch an Unterschieden zwischen den verschiedenen Proben gelegen hat, da nicht die identischen Proben untersucht wurden.



Bei Proben mit höherem Folatgehalt könnte die frei gewordene Glutaminsäure einen Einfluss gehabt haben, denn laut KAZENKO und LASKOWSKI [187] wird die Dekonjugase des Hühnerpankreatins ab einer gewissen Konzentration an Glutaminsäure inhibiert. Hier spielt natürlich auch das Polyglutamatspektrum eine große Rolle und der Anteil an freier Glutaminsäure, der ursprünglich in der Probe vorhanden war. Um den Einfluss genauer zu untersuchen wäre es notwendig, das ganze Spektrum der Polyglutamate der einzelnen Lebensmittel zu analysieren und die Menge an freier Glutaminsäure, bzw. die Menge, die während der Inkubation frei wird.

Eine weitere Substanz, die inhibierend auf Dekonjugasen, z.B. des Hühnerpankreatins, wirkt, ist die Citronensäure [109]. Ein hoher Gehalt dieser organischen Säure könnte die nicht ganz vollständige Dekonjugation beim Johannisbeersaft erklären. Im Orangensaft ist zwar üblicherweise ein doppelt so hoher Gehalt enthalten, doch wurde bei dieser Probe eine geringere Einwaage gewählt, so wie auch beim Tomatensaft, bei dem ein ähnlicher Citronensäuregehalt wie beim Johannisbeersaft zu erwarten war. Die Dekonjugation verlief bei beiden Proben besser bzw. beim Orangensaft sogar vollständig. Unterschiede im Polyglutamatspektrum könnten zusätzlich einen Einfluss gehabt haben.

In Möhren bzw. Möhrensaft ist hingegen ein deutlich geringerer Gehalt an Citronensäure bzw. organischen Säuren enthalten. Auch die Glutaminsäure scheint keinen nennenswerten Beitrag zur Zusammensetzung dieses Lebensmittels zu leisten, so dass von weiteren Inhibitoren ausgegangen werden muss. Auch RYCHLIK et al. [31] gingen davon aus, dass es noch weitere Inhibitoren gibt, da nach einer SAX-Aufarbeitung, die die Citronensäure nur wenig dezimiert hatte, dennoch eine Verbesserung in der Dekonjugation erzielt werden konnte. Bei den Lebensmitteln, die laut Rychlik et al. einen inhibierenden Effekt aufwiesen, handelte es sich um Leguminosen. Bei den eigenen Untersuchungen war diese Gruppe ebenfalls von einer unvollständigen Dekonjugation gezeichnet. Das Ausmaß war zwischen den einzelnen Leguminosen jedoch verschieden.

Bei Tellerlinsen konnten zwar Diglutamate mit einem Anteil detektiert werden, der größer als die Schwankungen der Analyse der Folatmonoglutamate ist, jedoch keine Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten. Dies würde für eine Inhibition des Rattenserums und weniger des Hühnerpankreatins sprechen. Im Gegensatz dazu zeigten die Azuki Bohnen einen Diglutamatanteil, der in der Größenordnung der Analysentoleranz lag. Es konnten aber noch deutliche Mengen an Polyglutamaten mit mehr als zwei Glutamateinheiten detektiert werden, selbst nach einer Reduktion der Einwaage, obwohl diese zu einer Erhöhung der Monoglutamate und einer Verringerung des Diglutamatanteils führte. Hier wurde vermutlich vor allem das Hühnerpankreatin inhibiert, aber zusätzlich auch das Rattenserum. Es handelte sich folglich um verschiedene Substanzen, die auf die Dekonjugasen des Hühnerpankreatins und des Rattenserums eingewirkt haben.

Bei den Getreideproben konnte meist eine vollständige Dekonjugation erzielt werden. Der Buchweizen bildete dabei eine Ausnahme, wobei es sich aber auch um ein Pseudogetreide aus der Familie der Knöterichgewächse handelt. Zwei weitere Ausnahmen bildeten die Haferflocken und Weizenkeime. Bei diesen beiden Getreideproben sind neben größeren Mengen an Diglutamaten auch Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten zu sehen. Im Unterschied zu den anderen Getreidearten handelte es sich hierbei um Proben mit dem höchsten Fettgehalt. Da bei den Nüssen, Steinfrüchten und dem Camembert ebenfalls keine vollständige Dekonjugation erzielt werden konnte, untermauert dies die Vermutung einer Inhibition durch Fettkomponenten. Eine Möglichkeit wären die freien Fettsäuren, denn laut PANDE und MEAD [188] kann die Aktivität einiger Enzyme durch

freie Fettsäuren inhibiert werden.

Auch durch die Reduktionsmittel des Extraktionspuffers konnte die Dekonjugation beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass sich in Anwesenheit von DTT eine etwas schlechtere Dekonjugation ergab, als in Anwesenheit von Mercaptoethanol und dass beide Reduktionsmittel jeweils einzeln wiederum zu einer schlechteren Dekonjugation führten als eine Kombination aus beiden. Dabei ist aber zu beachten, dass der Mercaptoethanolgehalt in der Kombinationsvariante verringert war. Daraus lässt sich vermuten, dass sich Mercaptoethanol bis zu einer gewissen Konzentration positiv auf die Dekonjugation auswirkt, aber die Wirkung darüber hinaus wieder aufgehoben wird bzw. sogar eine Inhibition auftritt. Doch auch mit dem kombinierten Puffer war bei Weizenkeimen keine vollständige Dekonjugation möglich.

Bei den Weizenkeimen wurden entweder sowohl die Dekonjugasen des Hühnerpankreatins als auch des Rattenserums inhibiert oder die Kapazität dieser Enzyme war bereits ausgelastet. Eine Erhöhung der Konzentration einer einzelnen Dekonjugase reichte jedenfalls nicht aus, um der unvollständigen Dekonjugation entgegenzuwirken, bzw. es wäre beim Rattenserum eine sehr große Menge notwendig gewesen. Vermutlich wären dann aber immer noch Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten übrig geblieben. Denn die Summe aus Mono- und Diglutamaten hat nur bedingt zugenommen und der mit dem mikrobiologischen Assay ermittelte Gesamtfolatgehalt wurde dennoch nicht erreicht. Deshalb wurde sowohl eine Erhöhung der Konzentration beider Enzyme, dafür aber im geringeren Maße, als auch eine Verlängerung der Inkubationszeit in Betracht gezogen. Letzteres ist auf Grund der endogenen Folate in den Enzympräparaten vor allem bei Lebensmitteln mit geringem Folatgehalt von Vorteil, da durch eine Erhöhung der Enzymmenge zusätzliche Ungenauigkeiten durch diesen endogenen Folatgehalt mit eingebracht werden. Die endogenen Folate lassen sich zwar durch Aktivkohle beseitigen, es muss dann aber auch darauf geachtet werden, dass die Aktivkohle wieder vollständig entfernt wird.

Nachdem bei Weizenkeimen noch zusätzlich die Einwaage reduziert wurde, konnte eine weitestgehend vollständige Dekonjugation erzielt werden. Die Reduktion der Einwaage war eine einfache Methode, durch die bei einigen Lebensmitteln eine deutlich bessere Dekonjugation erreicht werden konnte. Doch vor allem bei kleinen Einwaagen sollte auf eine ausreichende Homogenität des Probenmaterials geachtet werden.

Da die Reduktion der Einwaage zu einer Verbesserung der Dekonjugation geführt hat, könnte man davon ausgehen, dass die Mengen an Polyglutamaten, die dekonjugiert werden mussten, zu groß für die Dauer und die Menge an Enzymen war. Doch wie schon erwähnt wurde, konnte bei Spaghetti und Basmati Reis trotz der großen Menge an Pyrazino-s-Triazin, dessen Polyglutamate ebenfalls zu dekonjugieren waren, eine vollständige Dekonjugation erreicht werden. Deshalb ist eher von Inhibitoren auszugehen, die die Aktivität der Enzyme beeinträchtigt haben. Um dies besser abzuklären, müsste sowohl das vollständige Polyglutamatspektrum analysiert und quantifiziert werden als auch der ursprüngliche Monoglutamatgehalt, um die genaue Menge, die dekonjugiert werden muss, zu ermitteln.

Für mehrere Lebensmittel konnte mit Hilfe der optimierten Aufarbeitung, in Form einer reduzierten Einwaage und einer erhöhten Enzymkonzentration für beide Dekonjugasen, eine nahezu vollständige Dekonjugation erreicht werden, so dass keine Polyglutamate mit mehr als zwei Glutamateinheiten und weitestgehend keine Diglutamate mehr detektiert werden konnten. Die Wahl einer anderen Dekonjugase brachte keine nennenswerten Vorteile, da auch mit der Schweineniere nur bei einigen Proben eine bessere Dekonjugation erzielt werden konnte. Dies gelang vermutlich nur, weil eine recht große Menge des Schwei-

nenierenhomogenisates verwendet wurde. Die Aktivität und Menge dieser Dekonjugase wurde nicht eingehender untersucht, so dass kein direkter Vergleich mit den anderen Dekonjugasen möglich war. Doch auch bei anderen Arbeitsgruppen konnte die Dekonjugase der Schweineniere keine Vorteile aufzeigen [47,117,184]. Außerdem bot das Hühnerpankreatin den Vorteil, dass zusätzliche Enzyme vorhanden waren, welche die Matrix vermutlich zusätzlich aufgeschlossen haben.

## 3.2 Methodenvergleich

### 3.2.1 Mikrobiologisches Assay

In der Literatur wurden teilweise unterschiedlich starke Wachstumsraten bzw. Kalibrierkurven für die einzelnen Vitamere der Folate ermittelt [36,38], was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Der Einfluss des Kalibranten wurde daraufhin für die Assays untersucht, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Dafür wurden in drei Laboren verschiedene Lebensmittel jeweils über zwei Vitamere als Kalibranten ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 zusammengestellt. Für die Kalibrierung in Labor 1 (eigene Werte) wurden die Hauptfolate der beiden untersuchten Lebensmittel verwendet (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und 5-HCO-H<sub>4</sub>folat) und in den Laboren 2 und 3 (auswärtige Handelslabore) neben PteGlu, welches dort üblicherweise als Kalibrant verwendet wird, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, das Hauptfolat der Weizenkeime, Kichererbsen, Pistazien und Spaghetti (bei Letzterem zusammen mit 10-HCO-PteGlu).

Labor 1 und 2 verwendeten jeweils ein Kit im Mikrotiterformat der Firma R-Biopharm und Labor 3 eine klassische Methode mit einer Inkubation in Reagenzgläsern (nach SLMB - Schweizer Lebensmittelbuch). Bei allen drei Laboratorien handelte es sich um den Mikroorganismus *Lactobacillus rhamnosus*. Im Labor 1 wurden aber Veränderungen beim Extraktions- und Verdünnungspuffer vorgenommen. Die Aufarbeitung erfolgte, in Anlehnung an die LC-MS/MS-Methode, im MES-Puffer. Für die Verdünnungen wurde dann ein Phosphatpuffer verwendet, dessen Konzentration zwar, wie vom Kit angegeben, 0,05 mol/l betrug, dem aber zusätzlich Mercaptoethanol und eine höhere Konzentration an Ascorbinsäure zugegeben wurde.

Im Rahmen einer Forschungsarbeit [186] wurde der Einfluss des Mercaptoethanols (0 - 0,2 mol/l) auf das Wachstum der Mikroorganismen untersucht. Am Beispiel von H<sub>4</sub>folat, zeigte sich mit ansteigendem Mercaptoethanolgehalt (0,02 - 0,2 mol/l) ein stärkeres Wachstum, was vermutlich auf die Stabilisierung des H<sub>4</sub>folats zurückzuführen war. Bei Konzen-

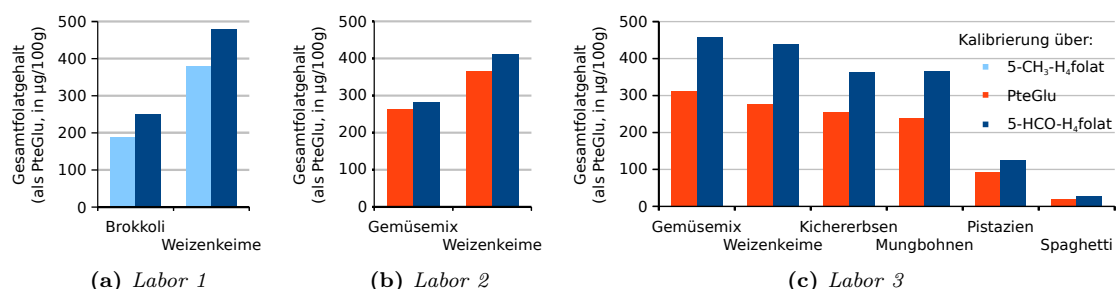


Abbildung 3.21: Vergleich von Ergebnissen des Mikrobiologischen Assays über Kalibrierungen mit verschiedenen Vitaminen in drei verschiedenen Laboren.

trationen  $<0,02$  mol/l war kein signifikanter Unterschied festzustellen, da diese Konzentrationen an Mercaptoethanol vermutlich noch nicht ausgereicht haben, um H<sub>4</sub>folat zu stabilisieren. Bei Folsäure zeigte sich zwischen den Mercaptoethanolkonzentrationen von 0,02 und 0,1 mol/l ebenfalls ein stärkeres Wachstum. Doch bei der höchsten Konzentration von 0,2 mol/l kam es dann zu einem etwas schlechteren Wachstum. Dies könnte entweder auf die mangelnde Präzision des Assays zurückgeführt werden (obwohl signifikant verschieden) oder auf einen inhibitorischen bzw. toxischen Effekt des Mercaptoethanols in höheren Konzentrationen. Der Anstieg bei einem geringeren Gehalt an Mercaptoethanol könnte hingegen auf einen wachstumsfördernden Effekt des Mercaptoethanols durch die reduzierenden Eigenschaften (z.B. durch Reduktion des Sauerstoffs) zurückzuführen sein. Da der positive Effekt beim H<sub>4</sub>folat größer war als der negative auf PteGlu, wurde eine Konzentration von 0,2 mol/l Mercaptoethanol als optimal eingestuft. Die Konzentration der Ascorbinsäure wurde ebenfalls erhöht. Die Entscheidung fiel auf eine Konzentration von 1 g/100 ml, da zwischen den Konzentrationen von 0,1 - 1 g/100 ml kein signifikanter Unterschied zu erkennen war.

Bei allen drei Laboratorien waren, auf Grund der unterschiedlichen Wachstumsraten der verschiedenen Vitamere im mikrobiologischen Assay, teilweise deutliche Unterschiede bei den Ergebnissen in Abhängigkeit vom Kalibranten zu verzeichnen. Bei Labor 2 waren die geringsten Unterschiede zu erkennen, wobei aber zu beachten ist, dass Labor 1 andere Vitamere zur Kalibration verwendet hat als Labor 2. Außerdem wurde bei Labor 3 die klassische Methode des Mikrobiologischen Assays in Anlehnung an SLMB 62/11.2.2 (2000) in Kombination mit ASU<sup>4</sup> L 00.00-87 (2004) bzw. DIN EN 14131 (2003) angewendet, wohingegen die Labore 1 und 2 das Kit von R-Biopharm verwendet haben.

### 3.2.2 Mikrobiologisches Assay vs. LC-MS/MS

Wie schon in Abschnitt 2.3 erwähnt wurde, ist es häufiger zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen HPLC-Methoden und dem mikrobiologischen Assay gekommen [28]. Dieser Umstand wurde näher untersucht, indem die selben Proben sowohl mit dem mikrobiologischen Assay als auch mit der LC-MS/MS-Methode analysiert wurden. Einige Lebensmittel wurden dafür in den drei oben genannten Laboren mittels mikrobiologischem Assay untersucht.

Bei Betrachtung der LC-MS/MS-Ergebnisse vor der Optimierung (Tabelle 3.9) fiel auf, dass für einige Lebensmittel mit dieser Methode deutlich niedrigere Ergebnisse erzielt wurden als mit dem mikrobiologischen Assay, wie es auch häufig in der Literatur beschrieben wurde. Der Brokkoli zeigte hingegen eine sehr gute Übereinstimmung und der Gemüsemix und die Erbsencremesuppe sogar ein etwas höheres Ergebnis. Doch das LC-MS/MS-Ergebnis vom Gemüsemix war, bezogen auf das Labor 3, nicht signifikant verschieden (unter Verwendung der erweiterten Messunsicherheit). Der mikrobiologische Wert aus Labor 3 stimmte sogar sehr gut mit dem zertifizierten Wert für den Gemüsemix von 315 µg/100 g überein. PteGlu konnte hier also für die Kalibrierung verwendet werden, auch wenn das Hauptfolat eigentlich 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat war.

Im Labor 1 wurde für den Gemüsemix eine Doppelbestimmung mit je zwei Verdünnungsstufen angesetzt. Es ergab sich eine relative Standardabweichung von 1%, so dass sich mittels t-Test sogar ein signifikanter Unterschied zum LC-MS/MS-Wert ergeben hätte

<sup>4</sup>Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG bzw. §64 LFGB

**Tabelle 3.9:** Vergleich zwischen LC-MS/MS und Mikrobiologischem Assay. Die Kalibrierung des Mikrobiologischen Assays erfolgte entweder über das Hauptfolat oder über PteGlu. Für die LC-MS/MS sind zum einen die Monoglutamatgehalte vor der Optimierung angegeben und zum anderen die Gesamtfolatgehalte (Monoglutamate und kleine Mengen an Diglutamaten zur Korrektur), die durch eine Optimierung der Einwaage und der Enzymmenge erhalten wurden. Alle Gehalte sind in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , berechnet als PteGlu, angegeben.

Lebensmittel	LC-MS/MS	LC-MS/MS	Mikrobiologisches Assay		
	nicht opt.	opt.	Labor 1	Labor 2	Labor 3
Brokkoli	183	- *	188 <sup>1</sup>	-	-
Erbsencremesuppe	41	- *	34 <sup>1</sup>	-	-
Gemüsemix (BCR 485)	336	- *	286 <sup>1</sup>	262 <sup>2</sup>	311 <sup>2</sup>
Weizenkeime	244	392	480 <sup>3</sup>	411 <sup>3</sup>	438 <sup>3</sup>
Kichererbsen	272	393	-	-	362 <sup>3</sup>
Mungbohnen	300	433	-	-	238 <sup>2</sup> , 367 <sup>3</sup>
Pistazien	24	112	-	-	124 <sup>3</sup>
Spaghetti	17	- *	-	-	20 <sup>2</sup> , 28 <sup>3</sup>

\* keine Optimierung notwendig, da keine oder vernachlässigbare Mengen an Polyglutamaten,

<sup>1</sup> Kalibrierung über 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, <sup>2</sup> Kalibrierung über PteGlu, <sup>3</sup> Kalibrierung über 5-HCO-H<sub>4</sub>folat

( $p > 0,001$ ). Doch wurde ein Wert der einen Verdünnung als Ausreißer beurteilt. Unter Berücksichtigung dieses Wertes würde sich dann eine Präzision von 10 % ergeben, die der Präzision der Doppelbestimmung des Brokkoli von 15 % deutlich näher kommt. Es handelt sich dann nur noch um einen möglichen Unterschied ( $p = 0,003$ ). Aber da der zertifizierte Wert eigentlich  $315 \pm 28 \mu\text{g}/100\text{ g}$  (Vertrauensintervall,  $P=95\%$ ) beträgt, ist beim mikrobiologischen Ergebnis auch eher von einem Minderbefund auszugehen. Der LC-MS/MS-Wert ist unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit ( $k = 2$ ) jedenfalls nicht signifikant verschieden vom zertifizierten Wert. Der Minderbefund beim mikrobiologischen Assay ist aber nicht auf Verluste während der Extraktion zurückzuführen, denn die selbe Lösung wurde anschließend mit internen Standards versetzt, aufgereinigt und per LC-MS/MS vermessen. Hier konnte eine Wiederfindung von 100 % festgestellt werden. Für die anderen Lebensmittel, die in Labor 1 mittels mikrobiologischem Assay untersucht wurden, kam es zu ähnlichen Wiederfindungen: Weizenkeime 99 %, Kichererbsen 98 %, Brokkoli 94 % und der Gemüsemix 100 %.

Für Weizenkeime, Kichererbsen und Pistazien bestand nach der Optimierung der LC-MS/MS-Methode kein signifikanter Unterschied mehr zu den Ergebnissen des mikrobiologischen Assays von Labor 3. Für die Weizenkeime wurde im Labor 1 mittels mikrobiologischem Assay zwar ein noch etwas höherer Wert ermittelt ( $p = 0,02$ ), doch Labor 2 bestätigte wiederum den Wert von Labor 3 und der LC-MS/MS. Deren Wert lag genau dazwischen und ausgehend von der Kit-Beschreibung von R-Biopharm und [38] sind ähnliche Schwankungen wie bei Labor 3 zu erwarten, so dass auch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ergebnis der LC-MS/MS und dem Ergebnis des mikrobiologischen Assays aus Labor 2 anzunehmen ist.

Für Mungbohnen ergab sich über die Kalibrierung mit 5-HCO-H<sub>4</sub>folat ebenfalls kein signifikanter Unterschied zum LC-MS/MS-Wert (bei Annahme einer Präzision von 4 % für das LC-MS/MS-Ergebnis, siehe Tabelle 3.4 Weizenkeime). Das Hauptfolat war hier

jedoch 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und wie am Gemüsemix zu erkennen war, konnte anstatt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats auch PteGlu zur Kalibrierung herangezogen werden. Damit hätte sich aber ein viel zu geringer Wert ergeben. Im Fall von Spaghetti verhielt es sich genau andersherum. Die Kalibrierung über PteGlu ergab zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch war das Hauptfolat, zusammen mit 10-HCO-PteGlu, eigentlich das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und die Kalibrierung über dieses Vitamer ergab einen deutlich höheren Wert.

### 3.2.3 Diskussion

Die von PHILLIPS und WRIGHT [36] und WEBER et al. [38] beschriebenen Unterschiede im Response des mikrobiologischen Assays auf die verschiedenen Vitamere konnten auch von den drei Laboratorien der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Laut PHILLIPS und WRIGHT soll sich der Unterschied bei einem pH-Wert des Puffers von 6,2 jedoch minimieren bzw. aufheben. Im Labor 3 wurde zwar ein pH Wert von  $6,1 \pm 0,1$  eingestellt, dennoch waren große Unterschiede im Response zu erkennen. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Unterschiede wäre, dass die Pufferkapazität nicht ausgereicht hat und der pH-Wert damit nicht stabil blieb, wodurch es dann doch zu einem Unterschied im Response kommen konnte [36]. Für das mikrobiologische Assay von R-Biopharm schien die Pufferkapazität jedenfalls nicht ausgereicht zu haben, denn bei eigenen Untersuchungen konnte mit steigender Konzentration an Folaten, z.B. 5-HCO-H<sub>4</sub>folat (0 - 0,8 nmol/l), nach der Inkubation ein fallender pH-Wert in den Kavitäten beobachtet werden (von pH 6,5 nach 5,2).

Auf Grund des variierenden Response zwischen den einzelnen Folatvitameren erfolgte die Kalibrierung über das Hauptfolat, um den Fehler zu minimieren. Beim Brokkoli konnte mit einer Kalibrierung über 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat dann auch eine gute Übereinstimmung zwischen den Werten der LC-MS/MS-Analyse und dem mikrobiologischen Assay erzielt werden. Eine Quantifizierung über 5-HCO-H<sub>4</sub>folat hätte einen deutlich höheren Wert ergeben. Anders verhielt es sich bei Spaghetti. Für dieses Lebensmittel wurde mit dem mikrobiologischen Assay mit beiden Kalibranten (5-HCO-H<sub>4</sub>folat und PteGlu) ein deutlich höherer Wert als mit der LC-MS/MS erzielt. Hier ist jedoch zu bedenken, dass 5-HCO-H<sub>4</sub>folat mit 42 % zwar einen großen Anteil am Folatspektrum einnahm, aber 10-HCO-PteGlu mit 40 % fast nochmal den gleichen Anteil. Bei Brokkoli nahm 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat einen Anteil von 81 % ein, so dass wirklich von einem Hauptfolat gesprochen werden konnte. Bei Spaghetti hingegen lag der Anteil weiterer Vitamere bei 58 %, so dass die unterschiedlichen Wachstumsraten des mikrobiologischen Assays auf die verschiedenen Vitamere vermutlich zu einer Überquantifizierung geführt haben. Das könnte auch auf die Erbsencremesuppe zugetroffen haben, denn der Anteil an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat betrug hier nur 59 % und der Anteil an 5-HCO-H<sub>4</sub>folat 27 %. Die Quantifizierung der Erbsencremesuppe erfolgte jedoch nur über 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, doch am Beispiel von Brokkoli und den Weizenkeimen zeigte sich für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ein stärkerer Response als für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat. Bei der Erbsencremesuppe könnte es sich deshalb um eine Unterquantifizierung gehandelt haben.

Bei der Quantifizierung mittels mikrobiologischem Assay darf aber auch nicht vergessen werden, dass es zu Verlusten bei der Extraktion gekommen sein könnte, die nicht wie bei der SIVA ausgeglichen werden. In Labor 1 konnte ein Verlust weitestgehend ausgeschlossen werden, da eine nachträgliche Zugabe der [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Standards zur Extraktionslösung und Messung per LC-MS/MS eine (fast) vollständige Wiederfindung ergeben hat. In den anderen Laboren wurde die Wiederfindung nicht per LC-MS/MS untersucht. Da

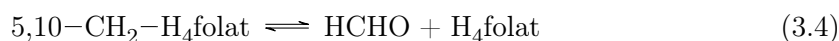
für die Extraktion dort außerdem ein anderer Puffer mit weniger Ascorbinsäure und ohne Mercaptoethanol verwendet wurde, ist ein Verlust nicht ganz auszuschließen. Außerdem kann es auch zu Verlusten während der Inkubation mit den Mikroorganismen gekommen sein, wie sich bei Vorversuchen in Labor 1 anhand von H<sub>4</sub>folat gezeigt hatte, weshalb in den sich anschließenden Versuchen Mercaptoethanol zugegeben wurde. Dies könnte bei den Mungbohnen eine entscheidende Rolle gespielt haben, da H<sub>4</sub>folat bei diesem Lebensmittel einen Anteil von 14 % einnahm. Zusätzlich könnte sich auch hier der Umstand bemerkbar gemacht haben, dass kein eindeutiges Hauptfolat existierte, sondern mehrere Vitamere mit jeweils größeren Anteilen vorhanden waren und deshalb eine Quantifizierung über ein einzelnes Vitamer nicht von Vorteil war. Bei anderen Lebensmitteln haben sich die durch die Folatverteilung ergebenden Unterschiede vermutlich teilweise ausgeglichen, so dass vergleichbare Ergebnisse zur LC-MS/MS erzielt werden konnten.

Weitere Effekte, die beim mikrobiologischen Assay zu berücksichtigen sind, sind inhibitorische oder auch promotorische Einflüsse durch Substanzen aus der Lebensmittelmatrix, die eventuell zu Über- oder Unterbefunden geführt haben [23, 25, 109]. Aber auch eine unvollständige Dekonjugation wäre denkbar. Bei der LC-MS/MS hatte sich jedenfalls gezeigt, dass durch eine unvollständige Dekonjugation bei einigen Lebensmitteln zu niedrige Ergebnisse für den Folatgehalt erzielt wurden. Nach einer Optimierung der Dekonjugation ergaben sich anschließend höhere Folatgehalte, die teilweise gut mit den Ergebnissen des mikrobiologischen Assays übereinstimmten. Doch auch beim mikrobiologischen Assay selbst kann die Dekonjugation eine Rolle spielen, da nur die Mono-, Di- und Triglutamate ein vergleichbares Wachstum beim *Lactobacillus rhamnosus* hervorrufen und höhere Polyglutamate schlechter bzw. langsamer verstoffwechselt werden [105]. Doch selbst der vergleichbare Response auf die Di- und Triglutamate ist anzuzweifeln, denn laut GOLI und VANDERSLICE [109] zeigten PteGlu<sub>2</sub> und PteGlu<sub>3</sub> verglichen zum Monoglutamat eine geringere Wachstumsrate auf (88 und 59 %). Und auch bei SHANE et al. [104] wurde selbst für die Triglutamate verschiedener Folate ein geringerer Response als auf die Monoglutamate festgestellt (Es wurden keine Diglutamate untersucht.). Eine unvollständige Dekonjugation könnte damit zu Minderbefunden geführt haben. Bei Mungbohnen konnte in Labor 1 vor der Optimierung jedenfalls keine vollständigen Dekonjugation erzielt werden. Es ist aber nicht bekannt, ob dies auch in den anderen Laboren zutreffend war.

### 3.3 Abschließende Diskussion

Der direkte Vergleich zwischen den Ergebnissen des mikrobiologischen Assays bzw. Referenzmaterialien, die auf Ergebnissen des mikrobiologischen Assays beruhen, und der HPLC-UV bzw. FLD oder MS ist schon von anderen durchgeführt worden [28, 29, 37, 48, 77, 123, 167, 189, 190]. In einem Review von HYUN und TAMURA [28] wurden mehrere Publikationen zusammengetragen. Bis auf PFEIFFER et al. [77], bei denen die Ergebnisse vergleichbar gewesen sind, wird von geringeren Folatgehalten über HPLC im Vergleich zum mikrobiologischen Assay berichtet. Doch auch bei PFEIFFER et al. war der über HPLC-UV/FLD ermittelte Gehalt von Spaghetti etwas geringer als über das mikrobiologische Assay. So auch in der vorliegenden Arbeit. Eine Ausnahme von den oben genannten Publikationen bildet die Publikation von VISHNUMOHAN et al. [123]. Hier wurden über LC-MS/MS teilweise sogar höhere Werte als mit dem mikrobiologischen Assay beschrieben.

In der Literatur werden als Grund für geringere Folatgehalte über HPLC-UV/FLD u.a. zusätzliche folataktive Substanzen angegeben, da trotz Affinitätschromatographie unbekannte Peaks im Chromatogramm entdeckt wurden [29]. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zwei weitere bekannte Folate mit in die Methode integriert, die in einigen anderen Publikationen ebenfalls mit berücksichtigt wurden und teilweise recht hohe Gehalte aufweisen sollten (10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat). Auf Grund von Umwandlungen während der Aufarbeitung in Folate, die schon in der Methode enthalten waren, konnte der ermittelte Gesamtfolatgehalt damit aber nur bei wenigen Lebensmitteln erhöht werden. Es wurde auch auf die Anwesenheit der ebenfalls bekannten Folate 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folat, H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-H<sub>4</sub>folat untersucht. Doch konnte keines dieser Folate in den untersuchten Proben detektiert werden. Dies ist nicht ganz verwunderlich ist, da 5,10-CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>folat während der Aufarbeitung u.a. auf Grund des Mercaptoethanols in H<sub>4</sub>folat übergeht, denn Mercaptoethanol fängt das Formaldehyd ab und zieht somit das Gleichgewicht



auf die Seite des H<sub>4</sub>folats [57–59]. Das 10-HCO-H<sub>4</sub>folat hingegen lagert sich auf Grund des pH-Wertes und den Erhitzungsschritten während der Aufarbeitung in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat um [34, 35, 114, 169], bzw. würde sich spätestens auf der HPLC-Säule in 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat umlagern [58].

Da die bekannten Folate also nicht der Hauptgrund für die Unterschiede zwischen den Methoden waren, wurde auf ein potentiell neues Folat hin untersucht. In der MRM-Spur des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats zeigte sich bei vielen Lebensmitteln ein zusätzlicher Peak, z.B. bei den Weizenkeimen, die einen deutlichen Unterschied zwischen LC-MS/MS und mikrobiologischen Assay aufzeigten. Es stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei der entsprechenden Substanz um ein Oxidationsprodukt des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats handelt (Pyrazino-s-Triazin bzw. MeFox), welches mikrobiologisch nicht aktiv ist [175]. Dies konnte durch mikrobiologische Messungen bestätigt werden. Des Weiteren wurde diese Substanz nicht auf der Affinitäts-säule reteniert, welche mit folatbindenden Proteinen befüllt war. Damit konnte sie nicht für den Unterschied zwischen den Analysemethoden verantwortlich sein und auch nicht für die zusätzlichen Peaks im Chromatogramm von RUGGERI et al. [29].

Ein entscheidender Fortschritt konnte mit der Analyse der Polyglutamate gemacht werden bzw. mit der Optimierung der Dekonjugation. Dabei hat sich die viel gelobte Trienzymbehandlung jedoch eher als nachteilig bzw. unnötig herausgestellt. Es musste nur das Enzym-Lebensmittel-Verhältnis erhöht werden, entweder durch Zugabe höherer Enzymmengen und/oder durch eine Verringerung der Probeneinwaage. Bei den meisten der oben genannten Publikationen wurde die Dekonjugationseffizienz zwar auch berücksichtigt, doch entweder nur im Form einer Aktivitätsmessungen der Dekonjugase bezüglich PteGlu<sub>3</sub> in reinem Puffer [77, 189] oder durch Zugabe des PteGlu<sub>3</sub> zum Lebensmittelextrakt [29, 48]. In der vorliegenden Arbeit hatte sich letzteres jedoch als irreführend herausgestellt. Es wurde teilweise eine deutlich bessere Dekonjugation errechnet, als tatsächlich vorgelegen hat.

Mit Di- oder höheren Polyglutamaten könnten sich die zusätzlichen Peaks bei RUGGERI et al. erklären lassen. Obwohl anzumerken ist, dass diese Peaks recht vereinzelt im Chromatogramm anzutreffen waren und die Polyglutamate eher in direkter Umgebung der entsprechenden Folate zu vermuten wären. In der eigenen Arbeit war die unvollständige Dekonjugation jedoch ein entscheidender Punkt im Vergleich zwischen LC-MS/MS



und dem mikrobiologischen Assay gewesen. Auch bei EDELMANN et al. [190] konnte ein zusätzlicher Peak im Chromatogramm dem 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> zugeordnet werden. Die Quantifizierung erfolgte in dieser Publikation über die Kalibrierkurve des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats und wurde dann als Summe aus dem Mono- und dem Diglutamat angegeben.

Ein weiterer Punkt, der zu abweichenden Ergebnissen zwischen der LC-MS/MS und dem mikrobiologischen Assay geführt hat, ist die unterschiedliche Wachstumsrate des *Lactobacillus rhamnosus* auf die verschiedenen Folate. PFEIFFER et al. haben diesen Umstand in ihrer Publikation von 2004 berücksichtigt. Nachdem 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat statt PteGlu als Kalibrant für die Quantifizierung des Gesamtfolatgehaltes in Serum verwendet wurde, konnte kein Unterschied zu den Ergebnissen über LC-MS/MS mehr festgestellt werden. Dabei ist anzumerken, dass es sogar zu Unterschieden zwischen PteGlu verschiedener Hersteller gekommen war. Dadurch ist die Verlässlichkeit des mikrobiologischen Assays deutlich in Frage zu stellen. In den anderen Publikationen wurde meist PteGlu als Kalibrant verwendet. Doch laut PHILLIPS und WRIGHT muss es nicht immer zu einem Unterschied im Response des *Lactobacillus rhamnosus* auf die verschiedenen Folate kommen. Dies ist u.a. vom pH-Wert und der Pufferkapazität des Mediums abhängig [36]. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass dieses Problem auch bei den anderen Arbeitsgruppen aufgetreten ist.

Auffällig ist auch, dass alle Publikationen die Reinheit bzw. Konzentration der Folatlösungen über das UV-Spektrometer bestimmt haben. Die Extinktionskoeffizienten gehen dabei auf BLAKLEY zurück [52]. MÖNCH et al. [19, 32] hat diese Koeffizienten teilweise überprüft bzw. in modifizierten Puffern neu bestimmt. Für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu und PteGlu wurde der gleiche Puffer wie bei BLAKLEY verwendet, dennoch ergab sich für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ein geringerer Extinktionskoeffizient und mit dessen Anwendung folglich eine höhere Konzentration bei der Quantifizierung der Stammlösung. Dies führt in der Auswertung der Proben zu einem höheren Folatgehalt. Bei PteGlu wurde hingegen kein Unterschied im Extinktionskoeffizienten festgestellt, wohl aber für 10-HCO-PteGlu. Für dieses Folat ergab sich ein etwas höherer Extinktionskoeffizient. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Bestimmung der Konzentration der Folatstammlösungen über HPLC-UV<sup>5</sup> stimmte weitestgehend mit der photometrischen Bestimmung unter Verwendung der von MÖNCH et al. ermittelten Extinktionskoeffizienten überein bzw. bestätigt diese (Abweichungen z.B. bei 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, den Hauptfolaten in den meisten Lebensmitteln, von 0 - 3% bzw. -1 - 2%). Der HPLC/UV-Bestimmung wurde dann der Vorzug gegeben, da sie auch die Quantifizierung in Puffern erlaubt, die z.B. Ascorbinsäure enthalten und die photometrische Bestimmung auf Grund ihrer Extinktion stören würden.

Ausgehend von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, und vielleicht auch von anderen Folaten, wäre es also möglich, dass die auf BLAKLEY zurückgehenden Extinktionskoeffizienten dieser Folate der Grund für die geringeren Gehalte über HPLC-UV/FLD in einigen Publikationen gewesen sind. In einer Publikation von KONINGS [48] wurde für das Referenzmaterial BCR 485 nur das Vitamer 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat detektiert und damit ein Gesamtfolatgehalt von 182 - 195 µg/100 g angegeben, obwohl der zertifizierte Wert für den Gesamtfolatgehalt mit 315 µg/100 g angegeben ist. In der vorliegenden Arbeit wurde, unter Verwendung der HPLC-UV zur Überprüfung der Standardkonzentration, die vergleichbare Ergebnisse wie die photometrische Bestimmung mit den von MÖNCH et al. [19, 32] ermittelten Extinkti-

<sup>5</sup>Für die Bestimmung der Konzentration der Folatstammlösungen über HPLC-UV wurde PteGlu immer frisch eingewogen und als interner Standard verwendet. Die Konzentration der anderen Folate ließ sich dann über das Peakflächenverhältnis aus Folat zu PteGlu mittels Responsefaktoren ermitteln. Nähere Erläuterungen dazu sind in Abschnitt 9.2.1 aufgeführt.

onskoeffizienten liefert, ein 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folatgehalt von 321 µg/100 g (berechnet als PteGlu) bzw. ein Anteil des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats am Gesamtfolatgehalt von 96 % ermittelt. Der Gesamtfolatgehalt von 336 µg/100 g stimmte deutlich besser mit dem zertifizierten Wert überein als der von KONINGS [48] bestimmte. Dies unterstützt die These, dass die geringeren Gehalte über HPLC-UV/FLD teilweise auf die Bestimmung der Folatkonzentration mittels der auf BLAKLEY [52] zurückgehenden Extinktionskoeffizienten zurückzuführen sind.

Anders verhielt es sich jedoch bei VISHNUMOHAN et al. [123]. In dieser Publikation wurde mittels LC-MS/MS ein höherer Gehalt an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat im BCR 485 angegeben (375 µg/100 g), obwohl auch hier das UV-Spektrometer für die Reinheitsbestimmung verwendet wurde. Doch für alle drei untersuchten Referenzmaterialien wurden höhere Gehalte als die zertifizierten gefunden, so dass der Unterschied vielleicht auf die Aufarbeitung zurückzuführen ist. Denn die [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierten Folate wurden erst vor der SPE zugegeben, so dass die vorhergehenden Schritte nicht korrigiert wurden. Vielleicht ist es auf diesem Wege zu einer zu hohen Wiederfindung gekommen. Für die angegebenen Wiederfindungen von 77 - 99 % wurden die Folate und entsprechenden internen Standards laut VISHNUMOHAN jedenfalls gleich zu Beginn zugegeben und nicht erst vor der SPE, wie es aber für die Routinemethode beschrieben wurde, weshalb die Aussagekraft dieser Werte nicht sehr hoch ist.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gründe für die Unterschiede zwischen HPLC-UV bzw. FLD oder MS und dem mikrobiologischen Assay vielfältig sind. Sie können sowohl beim mikrobiologischen Assay als auch auf der Seite der HPLC-Methoden zu finden sein, so dass der wahre Wert schwer zu ermitteln ist. Bei den HPLC-Methoden sollte auf eine vollständigen Dekonjugation geachtet werden und die Analyse der in dieser Arbeit erwähnten Folate durchgeführt werden (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, H<sub>4</sub>folat, PteGlu, 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat). Für das mikrobiologische Assay ist die Wahl des Kalibranten oder ein optimales Puffersystem wichtig. Um eine optimale Kalibration zu erreichen, würde es sich demnach anbieten, die Standardlösung bzw. die Standardmischung für die Kalibrierung der Folatverteilung des Lebensmittels entsprechend anzupassen. Da dies einen unverhältnismäßig großen Aufwand bedeutet, würde sich dies nur für einen erneuten Methodenvergleich anbieten, um dem Unterschied zwischen den Methoden und damit dem wahren Wert für den Gesamtfolatgehalt näher zu kommen, nicht aber für die Routineanalytik. Weiterhin sollte auch beim mikrobiologischen Assay am Besten auf eine vollständige Dekonjugation, wenigstens zu den Di- oder Triglutamaten geachtet werden, um Minderbefunde zu vermeiden. Dabei kann es aber auch hier zu Problemen kommen, denn bei der Analyse eines Referenzmaterials (Milchpulver) in einem der drei Labore mit einer Dekonjugation mittels Hühnerpankreatin über Nacht, wurde ein doppelt so hoher Wert ermittelt, als über die sonst üblichen 2 h. Bei einem anderen Referenzmaterial (Milchpulver II) ist dies nicht der Fall gewesen. Es stellt sich also die Frage, ob das mikrobiologische Assay doch noch auf andere Substanzen mit Wachstum reagiert bzw. was zu diesen starken Unterschieden des mikrobiologischen Assays geführt hat.

## 4 Simulation der Verdauung von Folaten

In einer von MÖNCH [19] durchgeführten Humanstudie wurden für die Lebensmittel Spinat, Weizenkeime und Camembert stark unterschiedliche relative Bioverfügbarkeiten für Folate ermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Ursachen für die unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten mittels einer *in vitro*-Simulation untersucht.

Die Vorlage für die *in vitro*-Simulation bildete die DIN 19738 zur „Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminiertem Bodenmaterial“ [191]. Es wurde der Kompakttitrator TitroWiCo von Cornelius Consult verwendet. Dabei handelt es sich um einen Mehrkanal-Multititrator mit 4 pH-Elektroden, die jeweils mit einer eigenen Dosiereinheit verknüpft sind und über einen PC separat angesteuert werden. Auf diese Weise konnten 4 Proben gleichzeitig im pH-stat-Modus laufen und somit die entsprechenden pH-Werte für die Simulation der einzelnen Verdauungsstationen eingestellt werden. Die Proben befanden sich dafür in Pyrexflaschen, in deren Deckel Bohrungen sowohl für die Elektrode als auch für die Titrierspitze enthalten waren. Diese Flaschen wurden während der Verdauungssimulation in ein Schüttelwasserbad bei 37 °C gestellt, um die menschliche Körpertemperatur und die Peristaltik des Magens und des Darms zu simulieren. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Für die Verdauungssimulation wurde die Probe eingewogen, mit künstlichem Magensaft nach DIN 19738 versetzt und der pH-Wert schrittweise mit 1 mol/l HCl auf pH 2 eingestellt. Nach 2 h wurde das System auf 1 mol/l NaHCO<sub>3</sub> umgespült, der künstliche Darmsaft nach DIN 19738 hinzugegeben und schrittweise auf pH 5,5 und dann auf pH 6,5 eingestellt, bzw. bei einigen Vorversuchen zusätzlich auf pH 7,5. Der DIN 19738 zufolge wird der pH-Wert eigentlich direkt mit festem NaHCO<sub>3</sub> auf 7,5 eingestellt und die Proben für 6 h inkubiert. Es wurden aber von der DIN 19738 abweichende pH-Werte für die Darmstufe ausgewählt. Für die Untersuchungen zur Notwendigkeit der Zugabe von Bürstensaummembran wurden pH-Werte von 5,5 - 7,5 verwendet, um einen weiten pH-Bereich

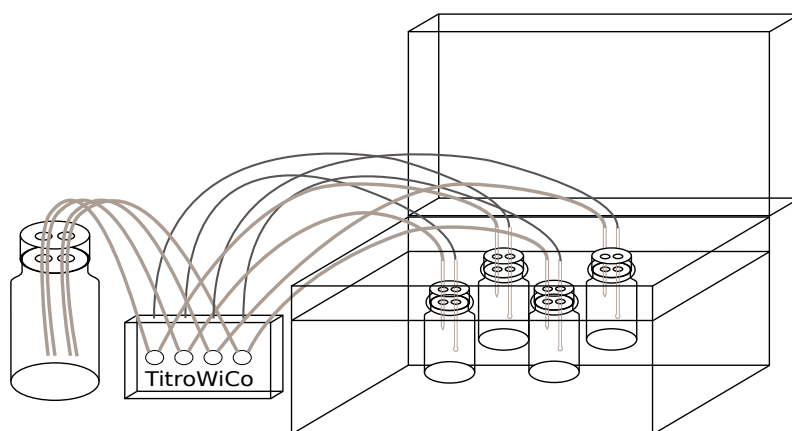


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Verdauungsapparatur.

bei den Untersuchungen zur Dekonjugation abdecken zu können. Für die Verdauungssimulation der Standardsubstanzen und der Lebensmittel wurde dann für 3 h ein pH-Wert von 5,5 eingestellt und für eine weitere Stunde ein pH-Wert von 6,5. Die pH-Werte wurden angepasst, da nach einer Mahlzeit üblicherweise etwas niedrigere pH-Werte als im Fastenzustand erreicht werden [192]. Laut den Gegenüberstellungen mehrerer Publikationen in [192] und [193] ist der pH-Wert im Duodenum und Jejunum, dem Bereich der Folatresorption, im Bereich von pH 5,5 zu erwarten und nimmt dann zum Ileum hin zu, in dem es praktisch zu keiner Aufnahme mehr kommt [81]. Der pH-Wert von 6,5 wurde vor allem deshalb ausgewählt, damit zusätzlich der pH an der Darmwand (6 - 6,8 [194–196]), dem Ort der Dekonjugation und Absorption, mit berücksichtigt wird. Da Folate im Jejunum nur in Form der Monoglutamate aufgenommen werden [25, 80], sollte auch die Dekonjugation mit in die Simulation der Biozugänglichkeit der Folate einfließen. Unter der Biozugänglichkeit wird in der vorliegenden Arbeit der Anteil an frei vorliegenden Folatmonoglutamaten verstanden, der zur Absorption zur Verfügung steht. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Dekonjugase der Bürstensaummembran in Form von Darmmukosa von Schweinen zugegeben werden muss oder ob die Dekonjugase des Schweinepankreatins ausreichend ist.

Da die Aufnahme der Folate schon im Jejunum stattfindet [17, 80] und die Verweildauer damit kürzer ist als von der DIN 19738 [191] vorgeschlagen, wurde auch die Dauer für die Darmstufe von 6 h auf insgesamt 4 h herabgesetzt. Dies liegt darin begründet, dass FALLINGBORG et al. eine Verweildauer für den gesamten Dünndarm von 8 h angegeben haben, wobei 65 % der Zeit auf den hinteren Teil des Dünndarms fallen [197] und für die Folatresorption damit weniger relevant sind. Dies ergibt eine Verweildauer im vorderen und mittleren Teil des Dünndarms von 3 h. Unter der Annahme, dass die Verweildauer in Anwesenheit von Nahrung etwas verzögert wird und außerdem noch etwas Zeit für die Dekonjugation der Folate an der Bürstensaummembran mit einzukalkulieren ist, wurde eine Gesamtzeit von 4 h für die Darmstufe angesetzt.

## 4.1 Verdauung einzelner Folate

Die Vitamere der Folate weisen unterschiedliche Stabilitäten auf und einige von ihnen unterliegen pH-abhängigen Umlagerungen. Anhand der einzelnen Substanzen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die verschiedenen pH-Werte während der Verdauungssimulation auf die Folate haben und wie die Wiederfindungen nach der Simulation sind. Die Erkenntnisse aus diesem Versuch sollten u.a. dazu dienen, die Ergebnisse der Verdauungssimulation von Lebensmitteln besser zu verstehen und die Ergebnisse der eingangs erwähnten Humanstudie von MÖNCH [19] zu erklären bzw. zu bestätigen.

Für diese Versuche wurden die einzelnen Folate sowohl in An- als auch in Abwesenheit der Verdauungssäfte im *in vitro*-Verdau inkubiert. Ein Zusatz von Ascorbinsäure in physiologischen Mengen (87  $\mu\text{mol/l}$  im Magensaft [198–205]) wurde ebenfalls untersucht.

### 4.1.1 Folsäure

PteGlu zeigte Wiederfindungen von 100 % sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ascorbinsäure und den Verdauungssäften. Ohne Ascorbinsäurezusatz und ohne die Verdauungssäfte ergab sich zwar eine Wiederfindung von 96 %, doch dieser etwas niedrigere Wert kann mit der Präzision der Analysenmethode erklärt werden, die für PteGlu in Le-

bensmitteln bei 4 - 11 % liegt bzw. bei Wiederholungsmessungen einer Standardlösung teilweise auch zwischen 3 - 4 % liegen kann.

#### 4.1.2 10-Formylfolsäure

Für 10-HCO-PteGlu wurde in Abwesenheit der Verdauungsenzyme eine Gesamtwiederfindung (Summe aller Folate) von 100 % und in Anwesenheit der Verdauungsenzyme von 99 % ermittelt. Die kleine Abweichung zu 100 % kann auf die Analysenpräzision zurückgeführt werden. Es ist demnach zu keinem Verlust an Folaten gekommen.

Die Wiederfindung von 10-HCO-PteGlu selbst lag jedoch nur bei 97 % in Ab- bzw. 92 % in Anwesenheit der Verdauungsenzyme. Die Differenz zu 100 % konnte jeweils als PteGlu detektiert werden. Der Anteil an PteGlu in der Verdaulösung betrug demnach ohne Zugabe der Verdauungsenzyme 4 % und bei Zugabe der Verdauungsenzyme 8 %, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Standardsubstanz von vornherein 1 % PteGlu enthielt. Bei einem Versuch bei dem nur die Verdauung im Magen simuliert wurde (ohne Ascorbinsäure), ergab sich für beide Versuchsanordnungen jeweils ein Gehalt von 3 % PteGlu. Auch bei einem Ascorbinsäurezusatz in physiologischen Mengen konnte PteGlu in der Verdaulösung nachgewiesen werden. Ohne die Zugabe der Enzymmischung wurden 5 % PteGlu bzw. bei der Verdauungssimulation mit Enzymmischung 4 % PteGlu gefunden, wobei der kleine Unterschied an detektierter PteGlu eher auf die Präzision durch die geringe Intensität zurückzuführen ist.

#### 4.1.3 Tetrahydrofolat

H<sub>4</sub>folat konnte nach der Simulation weder in An- noch in Abwesenheit von Ascorbinsäure wiedergefunden werden. Jedoch konnte bei Zugabe der Ascorbinsäure ein Anstieg an PteGlu in der Verdaulösung festgestellt werden - von 1 % auf 3 % (ohne Verdauenzymen) bzw. von 0,2 % auf 2 % (mit Verdauenzymen).

Bei alleiniger Betrachtung der Simulation der Verdauung im Magen kam es in Anwesenheit des künstlichen Magensaftes sowohl mit als auch ohne Ascorbinsäure schon zu einem vollständigen Verlust des H<sub>4</sub>folats, wohingegen in verdünnter Salzsäurelösung (pH 2) nur ein Verlust von 46 % bzw. 35 % (mit Ascorbinsäure) zu verzeichnen war.

Als Abbauprodukt für H<sub>4</sub>folat wird in der Literatur p-ABG genannt [54]. Deshalb wurden die Verdaulösungen nach der Magenstufe (ohne Ascorbinsäure) auch auf die Anwesenheit von pABG hin untersucht. Durch die chromatographische Nähe dieser Substanz zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat wurde [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat als interner Standard ausgewählt. Das Peakflächenverhältnis von pABG zu [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat für die Verdaulösung ohne den Zusatz an Verdauungssäften (Wiederfindung von H<sub>4</sub>folat von 54 %) war 4,4 und in Anwesenheit der Verdauungssäfte (bei vollständigem Verlust des H<sub>4</sub>folats) 8,2. Die Differenz (unter Berücksichtigung, dass eine gewisse Menge an pABG schon von vornherein in der Lösung vorhanden war) lässt vermuten, dass es einen stöchiometrischen Zusammenhang zwischen dem Abbau des H<sub>4</sub>folats und der Bildung von pABG gibt, bzw. dass H<sub>4</sub>folat unter den gegebenen Bedingungen vermutlich vollständig in pABG umgewandelt wurde.

#### 4.1.4 5-Formyltetrahydrofolat

Die Gesamtwiederfindung für dieses Folat lag sowohl in An- als auch in Abwesenheit der simulierten Verdauungssäfte bei 99 ± 5 %. Die direkte Wiederfindung für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat

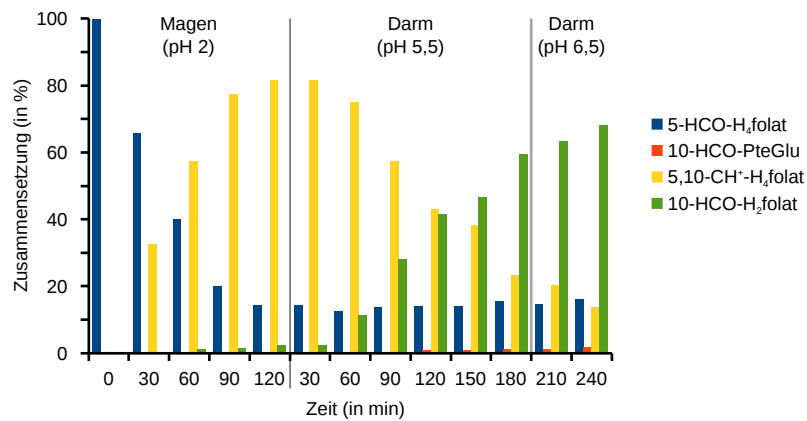


Abbildung 4.2: Zusammensetzung einer 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Lösung während der Verdauungssimulation.

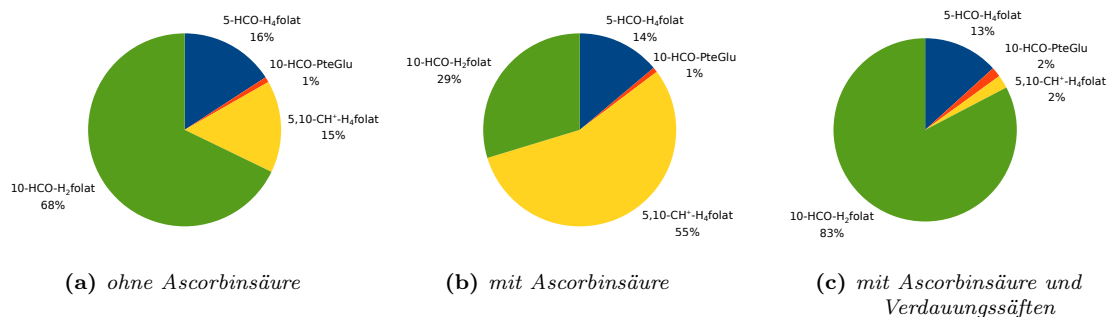


Abbildung 4.3: Zusammensetzung einer 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Lösung nach der Verdauungssimulation in An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure bzw. in Anwesenheit sowohl von Ascorbinsäure als auch der Verdauungssäfte.

lag jedoch deutlich niedriger, denn es kam während der Verdauungssimulation zu Umlagerungen. Die zeitaufgelöste Zusammensetzung der Lösung (ohne Verdauungssäfte) ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es während der Magensimulation, bei einem pH-Wert von 2, zu einer Umwandlung des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats zum 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat kam. Nachdem der pH-Wert für die Simulation des Darms auf 5,5 bzw. nach 3 h auf 6,5 erhöht wurde, wandelte sich das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat nicht in das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zurück, sondern zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat.

Am Ende der Verdauungssimulation (Abbildung 4.3a) konnten dann nur noch 16 % des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats wiedergefunden werden. Der Rest verteilte sich auf 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat (15 %) und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat (68 %). Ein sehr geringer Anteil war auch in Form von 10-HCO-PteGlu zu detektieren (1 %).

In Anwesenheit von Ascorbinsäure (Abbildung 4.3b) änderte sich kaum etwas an der Wiederfindung von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, jedoch verblieb diesmal ein Großteil als 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat (55 %) und nur insgesamt 30 % wandelten sich in 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 10-HCO-PteGlu um. Anders verhielt es sich wiederum bei Zugabe der Verdauungssäfte (Abbildung 4.3c). Neben dem verbliebenen Anteil an 5-HCO-H<sub>4</sub>folat setzte sich die Lösung fast ausschließlich aus 10-HCO-H<sub>2</sub>folat zusammen und zu jeweils 2 % aus 10-HCO-PteGlu und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat.

In Anwesenheit der Verdauungssäfte waren kaum noch Unterschiede zwischen An- und

Abwesenheit von Ascorbinsäure zu erkennen (Abbildung A.5). Hierfür konnten jedoch nur die nachträglich gekochten Lösungen verglichen werden. Da es während des Erhitzens, welches zur Denaturierung der Proteine aus den Verdauungslösungen diente, ebenfalls zu Umlagerungen kam, kann kein direkter Vergleich zwischen An- und Abwesenheit der Verdauungssäfte für die Versuche ohne Ascorbinsäure erfolgen. Da in Anwesenheit der Verdauungssäfte die gekochte Lösung mit Ascorbinsäure aber eine fast identische Zusammensetzung wie ohne Ascorbinsäure aufwies, war davon auszugehen, dass auch die Zusammensetzung vor dem Erhitzen vergleichbar war und demnach die Zugabe von Ascorbinsäure in Anwesenheit der Verdauungsenzyme keinen Einfluss auf die Folatverteilung hat.

#### 4.1.5 5-Methyltetrahydrofolat

Der *in vitro* Verdau einer reinen 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Lösung, ohne die Zugabe des simulierten Verdauungssaftes, ergab eine Wiederfindung von 49 %. In Anwesenheit dieses Verdauungssaftes war der Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat jedoch deutlich größer. Es ergab sich eine Wiederfindung von nur 4 %. Dieses Ergebnis konnte in Lebensmitteln hingegen nur teilweise bestätigt werden. Für Weizenkeime und Camembert wurden im Mittel Wiederfindungen an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat von 7 % und 20 % ermittelt und für Spinat von 62 %. Bei einem Versuch mit [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiertem 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat (Monoglutamat) als Zusatz zur Spinatmatrix ergab sich eine Wiederfindung von 60 %, die die Wiederfindung des intrinsischen 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats (in Form der Mono- und Polyglutamate) bestätigt.

Während der Magenstufe führte die Abwesenheit des Verdauungssaftes zu keinem nennenswerten Verlust (Wiederfindung von 97 %; könnte auch präzisionsbedingt sein). In Anwesenheit des Magensaftes kam es jedoch zu einem fast vollständigen Verlust, mit einer Wiederfindung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats von nur 3 %. Durch Zusatz von Ascorbinsäure in physiologischen Mengen konnte dieser Verlust zu einem Großteil verhindert werden. Es ergab sich dann eine Wiederfindung von 89 % und für die gesamte Verdauungssimulation in Anwesenheit der Verdauungssäfte von 76 %, bzw. in Abwesenheit der Verdauungssäfte von 93 %. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es bei der Quantifizierung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats nach der Verdauungssimulation ohne künstliche Verdauungssäfte zu etwas stärkeren Schwankungen gekommen ist und die Abweichung zu einem gewissen Teil auch präzisionsbedingt sein kann.

Bei einigen Verdauungslösungen des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats wurde die Anwesenheit von Abbauprodukten (Pyrazino-s-Triazin und pABG) untersucht. Es wurde ein Responsefaktor für pABG, mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat als internem Standard, unter der Annahme abgeschätzt, dass das parallel analysierte H<sub>4</sub>folat (siehe Abschnitt 4.1.3) vollständig zu pABG umgewandelt wurde. Damit ergab sich für die Magenstufe ohne Ascorbinsäurezusatz eine Wiederfindung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats als pABG von 2 bzw. 33 % (ohne bzw. mit Verdauungssäften). Der Verlust des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats in Abwesenheit des simulierten Magensaftes könnte unter Berücksichtigung der analytischen Schwankungen mit der Entstehung von pABG erklärt werden. Der Verlust des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats von 97 % bei Zugabe des simulierten Magensaftes kann hingegen nur zu 34 % erklärt werden. Für das Pyrazino-s-Triazin konnte weder ein deutlicher Anstieg, noch ein deutlicher Unterschied zwischen den Verdauungslösungen festgestellt werden.

In Anwesenheit der Ascorbinsäure wurde der gesamte Verdau auf Abbauprodukte hin untersucht. Das Peakflächenverhältnis des pABG stieg deutlich weniger an als in den Magensimulationen ohne den Zusatz von Ascorbinsäure. Die Wiederfindungen des 5-CH<sub>3</sub>-

H<sub>4</sub>folats in Form des pABG wurde mit 0,3 % (ohne Verdauungssäfte, mit Ascorbinsäure) bzw. 13 % (mit Verdauungssäften, mit Ascorbinsäure) abgeschätzt. Dies erklärt jeweils ungefähr 4 % bzw. 50 % des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Verlustes von 7 % bzw. 24 %. Durch die Ascorbinsäure konnte in Anwesenheit der Verdauungssäfte zusätzlich auch ein Anstieg für das Pyrazino-s-Triazin ermittelt werden, was einer Wiederfindung von 13 % entspricht bzw. bezogen auf den 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Verlust von ungefähr 53 %. In Abwesenheit der Verdauungssäfte wurde 2 % als Pyrazino-s-Triazin wiedergefunden (bzw. 32 % des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Verlustes von 7 %), wohingegen der Gehalt in Reinslösung, unter Verdaubedingungen und ohne den Zusatz von Ascorbinsäure, noch bei ungefähr 25 % lag, bzw. bei 49 % bezogen auf den 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat-Verlust von 51 %.

#### 4.1.6 Diskussion

Aus den Ergebnissen der Verdauungssimulation der einzelnen Folate wird ersichtlich, dass sich die Stabilität der einzelnen Folate stark unterscheidet und dass es zu Umwandlungen in andere Folate kommen kann. Der Grad der Umwandlung könnte sich eventuell durch die Anwesenheit von verschiedenen Lebensmitteln ändern, z.B. durch ein verzögertes Absinken des pH-Wertes im Magen oder durch einen großen Gehalt an Ascorbinsäure oder anderen reduzierenden Substanzen, woraus sich Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der entsprechenden Vitamere ergeben können.

PteGlu zeigte während der Verdauungssimulation weder einen Abbau, noch kam es zu Umwandlungen. Es handelt sich damit um das stabilste der untersuchten Folate. Dies deckt sich u.a. mit Ergebnissen von LUCOCK et al., die die Stabilität von PteGlu in Hinblick auf die Bioverfügbarkeit untersucht haben [153]. Die Stabilität während der Verdauung ist damit keine Erklärung dafür, dass für PteGlu teilweise eine geringere relative Bioverfügbarkeit ermittelt wurde [89, 206, 207]. WRIGHT et al. [208, 209] und Öhrvik et al. [207] haben die These aufgestellt, dass die abweichende Metabolisierung und die daraus folgende Reaktionskinetik dieses Folats verglichen mit 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und anderen reduzierten Folaten zu einem verzögerten Anstieg in der Plasmakurve (Folatgehalt im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit) führt und damit teilweise zu einer geringeren AUC (*Area under the curve* - Fläche unterhalb der Plasmakurve). Denn das Plasma wird/wurde nach einigen Stunden teilweise nur noch in längeren Zeitabständen untersucht und deshalb wird/wurde eventuell das Maximum ( $t_{max}$ ) verfehlt. Bzw. werden/wurden die Plasmakurven gar nicht lange genug verfolgt. Dies führt dann zu einem verminderten Ergebnis für die relative Bioverfügbarkeit. Die sich hier gezeigte Stabilität und die relativ vollständige Absorption von PteGlu [207] würden jedenfalls für eine (fast) vollständige absolute Bioverfügbarkeit sprechen und die These befürworten.

10-HCO-PteGlu weist ebenfalls eine gute Stabilität während der Verdauungssimulation auf. Bezogen auf das Gesamtfolat konnten keine Verluste festgestellt werden. Es kam jedoch zur Umwandlung in PteGlu in einem Ausmaß zwischen 3 - 8 %. Da sich durch die Zugabe von Ascorbinsäure der PteGlu-Anteil in der Simulation in Anwesenheit der Verdauungssäfte reduziert hat, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Umwandlung um einen oxidativen Prozess handelt. Doch weder bei der Simulation des Magens noch bei der gesamten Verdauungssimulation ohne die Verdauungssäfte konnte dieser Trend bestätigt werden. Vielmehr war bei der Simulation ohne die Verdauungssäfte in Anwesenheit von Ascorbinsäure ein leicht höherer Gehalt an PteGlu als in Anwesenheit der Verdauungssäfte zu verzeichnen. Der Unterschied lässt sich aber vermutlich auf die Präzision



zurückführen.

In der Literatur wird beschrieben, dass es im alkalischen Milieu zur Umwandlung von 10-HCO-PteGlu zu PteGlu kommt [25, 35, 52]. Während der Simulation der Verdauung stieg der pH-Wert jedoch nicht höher als 6,5. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass es an der Eintropfstelle des Natriumhydrogencarbonats zu einem lokalen Anstieg des pH-Wertes kam und somit kurzzeitig ein pH-Wert erreicht wurde, der eventuell alkalisch genug war, um zur Umwandlung von 10-HCO-PteGlu zu PteGlu zu führen. Ein Argument gegen diese These ist der Umstand, dass es auch während der Magensimulation (pH von 2) zu einem Anstieg von PteGlu gekommen ist. Die Stabilität von 10-HCO-PteGlu sollte vielleicht Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

5-HCO-H<sub>4</sub>folat wirkt auf den ersten Blick sehr instabil, da nach der Verdauungssimulation sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ascorbinsäure nur eine Wiederfindung von 13 - 16 % zu verzeichnen war. Dieser Eindruck täuscht jedoch, da sich das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat während der Verdauung in andere Folate umgewandelt hat und es bezogen auf den Gesamtfolatgehalt zu keinen Verlusten kam.

Innerhalb der ersten 2 h, in denen zur Simulation des Magens ein pH-Wert von 2 eingestellt wurde, wandelte sich das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu einem Großteil in 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat um. Anschließend folgte die Simulation des Darms und damit die Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 und nach 3 h auf 6,5. In Anwesenheit der Verdauungssäfte bildete sich während dieser Zeit fast ausschließlich 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, welches zu einem kleinen Teil weiter zu 10-HCO-PteGlu oxidierte. In Abwesenheit der Verdauungssäfte verblieb ein gewisser Teil als 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, doch auch hier kam es zur Umwandlung zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Die Ascorbinsäure verhinderte die Umwandlung von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat nur teilweise. Erst bei Verwendung von DTT als Reduktionsmittel blieb diese aus (Abbildung A.6).

Aus den Daten wird ersichtlich, dass eine Oxidation bei der Umwandlung von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat eine Rolle gespielt haben muss, die aber erst bei einem etwas neutraleren pH-Wert eintrat, denn innerhalb der ersten 2 h (pH 2) kam es zu keiner Umwandlung zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat oberhalb von pH 2 teilweise zum 10-HCO-H<sub>4</sub>folat umgewandelt hat, welches dann relativ schnell zu 10-HCO-H<sub>2</sub>folat oxidiert ist und somit nicht mehr zum 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat zurückgewandelt werden konnte bzw. durch die Oxidation aus dem Gleichgewicht zwischen 10-HCO-H<sub>4</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat entfernt wurde.

Eine Untersuchung dieser Umwandlung gestaltete sich jedoch als schwierig, da es während der Analyse mittels LC-MS/MS zu Umwandlungen auf Grund des pH-Wertes der verwendeten Fließmittel für die HPLC kam. Für eine Retention auf RP-Phasen war auf Grund des pK<sub>a</sub>-Wertes der Glutamatcarboxylgruppe in  $\alpha$ -Position von 3,5 [12, 56, 210] ein saurer pH-Wert, z.B. von 3,2, notwendig [37]. Dadurch kam es zur sofortigen Umwandlung des eventuell gebildeten 10-HCO-H<sub>4</sub>folats zum 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und eine Detektion war nicht mehr möglich. Mit Hilfe einer HILIC-Säule konnte 10-HCO-H<sub>4</sub>folat zwar detektiert werden, jedoch kam es nun zu einer Umwandlung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats zum 10-HCO-H<sub>4</sub>folat, da hier für die Retention und Trennung aller untersuchten Folate ein pH-Wert von 9 eingestellt werden musste. Folglich konnte die Umwandlung auch mit diesem System nicht untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit bildete die Flow-Injection-Analyse, bei der keine Chromatographiesäule eingebaut wurde und die Injektion direkt in das Tandemmassenspektrometer erfolgte. Auf Grund von Salzen, die u.a. durch das Lösen der

Folate und Einstellen der pH-Werte in der Lösung enthalten waren, wurde das Signal jedoch stark gestört, so dass auch mit dieser Methode kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt wurde. Doch sollte dieser Versuch in der Zukunft an einem anderen Massenspektrometer nochmals wiederholt werden, denn Matrixeffekte bzw. die Signalsuppression und die Signalverstärkung durch coeluiierende Substanzen sind quellenabhängig [183], so dass die Ionisation bei einem anderen Massenspektrometer mit einer anderen Quellensymmetrie vielleicht weniger stark beeinflusst wird.

Von der Entstehung des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats aus 5-HCO-H<sub>4</sub>folat bzw. 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat ist in der Literatur schon berichtet worden [211–213]. So fanden z.B. LUCOCK et al. [211] im Saft des Duodenums und Jejunums bzw. bei der Inkubation von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat mit diesen Verdauungssäften eine Substanz, welche als Oxidationsprodukt des 10-HCO-H<sub>4</sub>folats postuliert wurde. Es wird sich dabei vermutlich um das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat gehandelt haben. Von BAGGOTT [212] wurde beobachtet, dass sich in Anwesenheit von Ascorbinsäure oder anderen Reduktionsmitteln das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat bei einem leicht sauren pH-Wert von 4 - 4,5 zwar hauptsächlich in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat umgewandelt hat, nicht jedoch in Abwesenheit der Reduktionsmittel. Dann wurde neben 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zusätzlich 10-HCO-H<sub>2</sub>folat identifiziert. Auch TEMPLE et al. [213] erhielten 10-HCO-H<sub>2</sub>folat bei der Umsetzung von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat im leicht sauren pH-Bereich. In dieser Publikation ist zusätzlich ein Schema angegeben, welches Gleichgewichte von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>4</sub>folat aufzeigt, wobei zwischen allen drei Folaten ein Hydroxymethylentetrahydrofolat als Zwischenprodukt angegeben wird. Die Ringöffnung des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats über das postulierte Zwischenprodukt, die sowohl zum 5-HCO-H<sub>4</sub>folat als auch zum 10-HCO-H<sub>4</sub>folat führen kann [35], favorisiert auf Grund einer Energiebarriere das 10-HCO-H<sub>4</sub>folat [214]. Wird dieses nicht ausreichend stabilisiert, oxidiert es schnell zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und kann damit nicht wieder zum 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat zurückreagieren [34, 35]. In Anwesenheit von ausreichend Ascorbinsäure oder Thiolen wird das 10-HCO-H<sub>4</sub>folat aber stabilisiert [34] und reagiert zurück zum 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, denn unterhalb von pH 6 liegt das Gleichgewicht auf der Seite des 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folats [34].

Doch bei der Zugabe der Verdauungsenzyme entstand selbst in Anwesenheit der Ascorbinsäure fast ausschließlich 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Dies könnte sich damit erklären lassen, dass laut einer weiteren Publikation von BAGGOTT et al. [215] die Oxidation des 10-HCO-H<sub>4</sub>folats zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat durch Eisen katalysiert wird, welches sich u.a. im Gallensaft befindet. Auch Ascorbinsäure kann diesen Prozess nicht stoppen, da es Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> reduziert und damit die Fenton-Reaktion begünstigt, die für die Oxidation verantwortlich gemacht wird [215].

Der deutliche Unterschied zwischen der Simulation in An- und in Abwesenheit der Verdauungssäfte war zusätzlich sowohl beim H<sub>4</sub>folat als auch beim 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zu erkennen. Ausgehend von den Überlegungen zu 5-HCO-H<sub>4</sub>folat müssen Substanzen mit oxidativem Potential enthalten sein, wobei für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat Eisenionen aus dem Gallenextrakt als eine Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Wie die Versuche mit H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zeigten, müssen diese Substanzen, oder wenigstens einige von ihnen, aber schon im Magensaft zu finden sein, denn auch hier waren gravierende Unterschiede zwischen der An- und Abwesenheit des Magensaftes zu sehen. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um Substanzen handelt, die spezifisch für Schweine und deren Enzyme sind bzw. die durch die Zusammensetzung des simulierten Magensaftes bedingt sind, denn in einer Publikation von LUCOCK et al. [153] ist ebenfalls von einem verstärkten Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bei Zugabe von humanem Magensaft die Rede.

In einer weiteren Publikation von LUCOCK et al. [216] wurden neben Zink- und Eisenionen, welche den Abbau des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats beschleunigen, auch Calcium-, Magnesium-, Kalium- und Natriumionen erwähnt. Die letztgenannten Ionen sind im Magensaft enthalten und könnten damit bei nicht ausreichender Menge an Reduktionsmitteln zu einem beschleunigten Abbau des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats geführt haben und dementsprechend vermutlich auch zu einem Abbau des H<sub>4</sub>folats.

H<sub>4</sub>folat wies von den untersuchten Folaten die größten Verluste auf und damit die geringste Stabilität. Unabhängig vom Ascorbinsäuregehalt konnte nach der gesamten Verdauungssimulation kein H<sub>4</sub>folat wiedergefunden werden. Eine Wiederfindung von 54 - 65 % ergab sich nur nach der alleinigen Simulation der Verdauung im Magen, die 2 h dauerte, und auch nur dann, wenn kein simulierter Verdauungssaft zugegeben wurde. Der Zusatz an Ascorbinsäure sorgte hier zwar für eine gewisse Verbesserung der Stabilität, jedoch galt dies nicht in Anwesenheit der Verdauungssäfte. Letzteres sollte aber die Situation im Menschen besser widerspiegeln.

Ausgehend von den Ergebnissen des *in vitro*-Verdau, also einem vollständigen Verlust des H<sub>4</sub>folats, welcher von ÖHRVIK et al. in einem *in vitro*-Verdau durch das TIM am Beispiel von Brot und einer vollständigen Frühstücksmahlzeit bestätigt wurde [148], sollte H<sub>4</sub>folat keine Bioverfügbarkeit aufweisen, da es der Simulation zufolge während der Verdauung vollständig abgebaut wird. Auch in der Dissertation von MÖNCH [19] wurde ein möglicher Verlust des H<sub>4</sub>folats im menschlichen Magen-Darm-Trakt diskutiert, da ein Camembert mit hohem H<sub>4</sub>folatgehalt eine niedrigere Bioverfügbarkeit aufwies als ein Camembert mit geringerem H<sub>4</sub>folatgehalt. In einigen Publikationen wird jedoch erwähnt, dass H<sub>4</sub>folat aufgenommen wird und es zu einem Anstieg im Serumlevel oder in der Urinausscheidung kommt [18, 89, 139, 206]. Ein Grund für den Unterschied zur Verdauungssimulation könnte ein höherer Sauerstoffeintrag in der Verdauungssimulation als im Gastrointestinaltrakt sein, weshalb es zu keinem oder nur zu einem geringeren Abbau *in vivo* kommt, bzw. zu keinen oder weniger starken Umwandlungen, z.B. beim 5-HCO-H<sub>4</sub>folat. Die Verdauungssimulation hat aber auch gezeigt, dass hauptsächlich die Anwesenheit der Verdauungssäfte zu einem Abbau und zu Umlagerungen führten. Bezogen auf das H<sub>4</sub>folat könnten unterschiedliche Konzentrationen dieses Folates, die *in vivo* oder *in vitro* verwendet wurden, bzw. die Konzentration der Verdauungssäfte einen Einfluss haben und dementsprechend zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Weiterhin ist zu beachten, dass das Studiendesign der Humanstudien ebenfalls einen Einfluss auf das Ergebnis haben kann. BROWN et al. [206] z.B. haben den Probanden die Folate in einer 0,1 %igen Ascorbatlösung verabreicht. In Abhängigkeit von der Verdünnung durch den Magensaft im Menschen ergibt das mindestens eine um den Faktor 10 höhere Konzentration an Ascorbinsäure und könnte damit zum Schutz des H<sub>4</sub>folats beigetragen haben. Aber vielleicht ist es im menschlichen Körper auch eher zu einer Oxidation zu PteGlu gekommen, als es in *in vitro* beobachtet werden konnte.

In den Studien von BROWN et al. [206] und GREGORY et al. [18] sind die Werte für die Bioverfügbarkeit des H<sub>4</sub>folats jedenfalls niedriger als für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und PteGlu, wobei aber bei Gregory et al. [18] nur der Unterschied zu PteGlu signifikant ist. Diese geringe Signifikanz könnte auf die geringe Anzahl an Probanden zurückgeführt werden (n = 7). Bei BROWN et al. ist außerdem zu bedenken, dass die Blutabnahme schon nach 1 - 2 h erfolgte und die Bioverfügbarkeit von PteGlu auf Grund des von WRIGHT et al. [208, 209] und ÖHRVIK et al. [207] erwähnten verzögerten Anstiegs in der Plasmakurve

vermutlich unterschätzt wurde und damit vermutlich einen noch größeren Unterschied zu H<sub>4</sub>folat ergeben hätte. Gleiches ist auch für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat denkbar, da es höchstwahrscheinlich während des Verdaus über 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat in 10-HCO-H<sub>2</sub>folat übergeht bzw. oxidiert und Letzteres eine vergleichbare Metabolisierung wie PteGlu aufweisen könnte. Die genannten Publikationen unterstützen zusammengenommen auf alle Fälle die These, dass das H<sub>4</sub>folat eher zu einer schlechteren Bioverfügbarkeit neigt und dies an der geringen Stabilität und den sich daraus ergebenden Verlusten während der Verdauung liegen könnte. Dennoch ist zu beachten, dass das Ausmaß des Abbaus von H<sub>4</sub>folat *in vivo* geringer sein könnte als in der Verdauungssimulation.

5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat wird teilweise für die Supplementierung z.B. in der Schwangerschaft verwendet. In Abwesenheit von Ascorbinsäure zeigte dieses Folat jedoch deutliche Verluste auf. Es kam zu einem fast vollständigen Verlust, wenn der *in vitro*-Verdau mit den simulierten Verdauungssäften durchgeführt wurde. Wird Ascorbinsäure in einer Konzentration, wie sie auch *in vivo* vorhanden ist [198–205], zum Magensaft hinzugegeben, so kann dieser Verlust vermindert werden. Ein weiterer Zusatz könnte eine noch bessere Stabilisierung mit sich bringen, denn *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass Ascorbinsäure zu einer Steigerung der Bioverfügbarkeit von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat führt [127].

Die Stabilität von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ist jedoch auch von der Lebensmittelmatrix abhängig. In Spinat war die Wiederfindung auch ohne den Zusatz von Ascorbinsäure deutlich besser als in Weizenkeimen und Camembert und ebenfalls besser als bei der Simulation ohne Matrix aber in Anwesenheit der simulierten Verdauungssäfte. Dies kann u.a. auf den intrinsischen Gehalt an Ascorbinsäure in Spinat zurückgeführt werden, denn ausgehend von Durchschnittswerten [173] wurde durch den Spinat zusätzlich das Fünffache an Ascorbinsäure in die Verdauung eingebracht. Mit Ausnahme des Verdaus der Weizenkeime konnte durch die Zugabe von Ascorbinsäure in physiologischen Mengen eine deutliche Verbesserung der Stabilität erzielt werden. Dies spiegelt die Vorgänge bei der menschlichen Verdauung vermutlich besser wider, da Ascorbinsäure auch im menschlichen Magensaft zu finden ist. Doch darüber kann nur eine Untersuchung der absoluten Verluste während der Verdauung Aufschluss geben. Bei Weizenkeimen konnte kein stabilisierender Effekt der Ascorbinsäure auf 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat verzeichnet werden. Der Grund könnte die größere Menge an Zink sein, die in Lebensmitteltabellen [173] für Weizenkeime angegeben ist. Laut LUCOCK et al. [153, 216] nimmt die Halbwertszeit des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats mit zunehmender Menge an Zink ab. Zusätzlich sind in Weizenkeimen verglichen mit Spinat und Camembert durchschnittlich auch noch höhere Mengen an Eisen enthalten [173]. Dieses Element kann einen sofortigen Verlust des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats hervorrufen [153].

Wie der Versuch mit [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiertem 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat gezeigt hat, konnte in der Spinatmatrix kein signifikanter Unterschied zwischen der Stabilität dieses Monoglutamates und den entsprechenden intrinsischen Folaten, die zum Teil als Polyglutamate vorliegen, ermittelt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von NG et al. [217], bei denen ebenfalls kein Stabilitätsunterschied zwischen 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>3</sub> in Anwesenheit des Magensaftes festgestellt werden konnte, wohl aber in reinen Lösungen. Dort zeigten sich für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>3</sub> stärkere Verluste als beim Monoglutamat des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats, selbst als Ascorbinsäure zugegeben wurde.

Der Verlust des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl mit Zusatz von Ascorbinsäure als auch ohne genauer untersucht. Während der Verdauung im Magen kam es vor allem in Anwesenheit des Magensaftes zu einem Abbau des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats, wobei

pABG entstanden ist, jedoch so gut wie kein Pyrazino-s-Triazin. Nach einer Abschätzung des pABGs, ergab es sich, dass nur ein Drittel des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zum pABG abgebaut wurde, obwohl LUCOCK et al. [153] von einem vollständigen Abbau zum pABG berichtet haben. Bei einem pH-Wert von 6,4 in Wasser haben letztere Autoren jedoch ein zusätzliches Nebenprodukt entdeckt, bei dem es sich jedoch nicht um ein 5-Methyldihydropyrazino-s-triazin und damit um das zuvor angesprochene Pyrazino-s-Triazin handeln soll. Es ist aber zu beachten, dass bei LUCOCK et al. im Magensaft immer eine, wenn auch kleine Menge, an Ascorbinsäure enthalten war. Es liegt die Vermutung nahe, dass dies der Grund für den von LUCOCK et al. beobachteten vollständigen Abbau zum pABG in Anwesenheit des Magensaftes sein könnte.

Sollte bei der Verdauungssimulation des H<sub>4</sub>folats, welche zur Abschätzung eines Responsefaktors für pABG mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat als Internem Standard verwendet wurde (Abschnitt 4.1.5), doch nicht alles, sondern nur ein Teil des H<sub>4</sub>folats zum pABG abgebaut worden sein, dann wäre der Anteil des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats, welches als pABG wiedergefunden wurde, überschätzt worden und damit sogar noch geringer als oben erwähnt. Es müssen in jedem Fall noch andere Abbauprodukte entstanden sein. Bei Zugabe von Ascorbinsäure fiel der Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat hingegen deutlich geringer aus und konnte, unter Berücksichtigung der Präzision und Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung über strukturfremde interne Standards, vollständig in Form des pABGs und des Pyrazino-s-Triazins wiedergefunden werden. Letzteres entstand in Abwesenheit von Ascorbinsäure und bei Verwendung der simulierten Verdauungssäfte in deutlich geringerem Maße als in reinen Lösungen, obwohl ein fast vollständiger Verlust des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zu verzeichnen war. In reinen Lösungen kam es hingegen nur zu einem 51 %igen Verlust. Es zeigt sich, dass ein Zusatz an Ascorbinsäure zu einem unterschiedlichen Abbauverhalten des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats führt. Weitere Untersuchungen mit präziseren Quantifizierungen der Abbauprodukte (über SIVA) könnten einen besseren Eindruck der gezeigten Effekte vermitteln und sicherstellen, dass es nicht zu Fehlinterpretationen u.a. auf Grund von Matrixeffekten gekommen ist.

## 4.2 Verdauung von Lebensmitteln

Nachdem es bei der Verdauungssimulation der Folatstandards zu Verlusten und Umlagerungen gekommen ist, wurden auch einige Lebensmittel dem *in vitro*-Verdau unterworfen und die Auswirkungen auf die Folate analysiert. Der *in vitro*-Verdau wurde deshalb für die Verdauung von Lebensmitteln und den enthaltenen Folaten, die größtenteils als Polyglutamate vorliegen, angepasst.

Die Auswahl der Lebensmittel erfolgte in Anlehnung an die Bioverfügbarkeitsstudie von MÖNCH [19] - Spinat, Camembert und Weizenkeime. Die Ergebnisse wurden mit der Humanstudie korreliert und daraus mögliche Ursachen für die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Folate zwischen den von MÖNCH verwendeten Lebensmitteln abgeleitet.

Da die Folate nur in Form der Monoglutamate aufgenommen werden, kommt der Dekonjugation bei der Verdauung eine wichtige Rolle zu. Sie wurde in der Verdauungssimulation mit berücksichtigt, um der Frage nachzugehen, ob die Dekonjugation einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit gehabt haben könnte. Dafür wurde zuerst untersucht, ob die Dekonjugase aus dem Schweinepankreatin, gemäß DIN 19738 [19], für die Simulation der Dekonjugation ausreicht, oder ob die Dekonjugase der Bürstensaummembran zugegeben werden muss. Zur Gewinnung der Bürstensaummembran wurde die innere Auskleidung des

Schweinedarms (Mukosa), nach einem Waschschrift, mit einem Objektträger abgeschabt.

Weiterhin wurde überprüft, ob bei der Simulation auch eine Verdauung der Lebensmittelbestandteile stattfindet. Dafür wurde der Abbau der Triacylglyceride, der Proteine und der Stärke näher untersucht.

#### 4.2.1 Optimierung des *in vitro*-Verdaus

##### Dekonjugation

Im Pankreassaft von Mensch [83] und Schwein [218] ist ein Enzym lokalisiert, welches die Polyglutamate in die Monoglutamate spalten kann. Es sollte nun untersucht werden, inwiefern das Enzym aus dem Schweinepankreas ausreicht, um eine ausreichende Dekonjugation im *in vitro*-Verdau zu erzielen oder ob eine Zugabe der Bürstensaummembran notwendig ist. Diese enthält bei Mensch und Schwein sowohl eine membrangebundene als auch eine intrazelluläre Dekonjugase [87]. Dafür wurde eine PteGlu<sub>3</sub>-Lösung mit verschiedenen Varianten im *in vitro*-Verdau inkubiert und der Grad der Dekonjugation im Anschluss bestimmt (Dekonjugationseffizienz):

$$\text{Dekonjugationseffizienz (in \%)} = \frac{\text{Monoglutamatgehalt}}{\text{Gesamtfolatgehalt}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

In Tabelle 4.1 ist zu erkennen, dass mit der Zusammensetzung der Verdauungssäfte nach DIN 19738 [191] und einem pH-Profil für die Darmstufe von 5,5 - 7,5 fast keine Dekonjugation des PteGlu<sub>3</sub> erzielt werden konnte. Die Dekonjugation verbesserte sich, als Darmmukosa vom Schwein hinzugegeben wurde. Um auszuschließen, dass für die Enzyme der Bürstensaummembran die pH-Werte nicht optimal gewählt waren, wurde eine kurze Aktivitätsbestimmung bei drei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Dafür wurde eine aufgereinigte Bürstensaummembran (in Anlehnung an SCHMITZ et al. [219]) verwendet, die die membrangebundene Dekonjugase enthalten sollte. Es zeigte sich, dass ein pH-Wert von 5,5 am besten geeignet ist (Dekonjugationseffizienz von 65 % statt 24 % bei pH 6,5 und statt 23 % bei pH 7,5).

Der *in vitro*-Verdau mit Zugabe der Bürstensaummembran von Schweinen aber in Abwesenheit der simulierten Verdauungssäfte bestätigte, dass die Dekonjugation prinzipiell funktionierte. Die Menge an Bürstensaummembran bzw. Darmmukosa musste jedoch erhöht werden, um eine vollständige Dekonjugation zu erzielen. In Anwesenheit der Verdauungssäfte zeigte sich eine deutlich schlechtere Dekonjugationseffizienz (Faktor ~4), die

**Tabelle 4.1:** Dekonjugationseffizienz (in %) für den *in vitro*-Verdau einer PteGlu<sub>3</sub>-Lösung mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Verdauungssäfte und mit einem pH-Profil von 5,5 - 7,5 \*.

Verdauungssäfte	Dekonjugationseffizienz
ohne Zusätze	0
simulierte Verdauungssäfte (DIN 19738 [191])	1
simulierte Verdauungssäfte (DIN 19738 [191]) + Darmmukosa	9
ohne Zusätze + Darmmukosa	40

\* pH-Profil: 2,5 h pH 5,5, 1 h pH 6,5 und 0,5 h pH 7,5;

Anmerkung: Der pH-Wert von 7,5 wurde jedoch erst nach >20 min erreicht.

auch mit einem zusätzlichen Erhitzungsschritt vor der Darmmukosazugabe (zur Denaturierung anderer Proteine bzw. hauptsächlich der Proteasen) nicht behoben werden konnte. Die Menge an Darmmukosa wurde daraufhin von 0,5 auf 2,5 g erhöht und ergab damit für die PteGlu<sub>3</sub>-Lösung selbst in Anwesenheit der Verdauungssäfte eine relativ vollständige Dekonjugation (97 %). Für den Verdau von Spinat konnte nur eine Dekonjugationseffizienz von 56 % erzielt werden, bzw. von 82 % in Abwesenheit der Verdauungssäfte. Für alle folgenden Simulationen wurde für die Menge an Darmmukosa dann ein noch höherer Wert von 5 g festgelegt, da zum einen in Lebensmitteln auch Polyglutamate mit einer längeren Kettenlänge zu erwarten sind und zum anderen die Dekonjugase der Bürstensaummembran im Überschuss vorhanden sein soll [16, 220].

Anschließend wurde noch ein weiteres Experiment zur Dekonjugation durchgeführt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Aktivität des Enzyms der Bürstensaummembran der Schweine dadurch verringert wurde, dass sich die Darmmukosa nicht gut genug verteilt hatte und die Oberfläche für die Dekonjugation damit zu gering war. Dieser Versuch wurde am Beispiel von Spinat durchgeführt. Der Darm wurde zum einen ohne zusätzliche Zerkleinerung in die Verdaulösung gegeben und zum anderen mittels Ultra Turrax zusammen mit der Verdaulösung homogenisiert. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten der Darmmukosazugabe ermittelt werden (jeweils  $N = 2$ , t-test zweiseitig,  $p = 0,5$ ).

### Vollständigkeit der Folatextraktion

Ein weiterer Aspekt, der für die Anwendbarkeit des *in vitro*-Verdau von Bedeutung ist, ist die Vollständigkeit der Folatextraktion aus der Matrix. Es sollte sichergestellt werden, dass Ergebnisse mit kleiner Wiederfindung nicht auf eine unvollständige Extraktion der Folate zurückzuführen sind und es somit zu Fehlinterpretationen kommen könnte.

Für diesen Versuch wurden innerhalb eines Tages parallel vier Spinatproben dem *in vitro*-Verdau zugeführt. Danach wurden die Folate analysiert (Gesamtfolatgehalt), wobei drei der Verdaulösungen zuerst zentrifugiert wurden. Danach wurde jeweils ein Aliquot mit internen Standards und MES-Puffer versetzt und anschließend gekocht. Die vierte Verdaulösung wurde sofort nach dem Verdau mit den internen Standards (ISTD) und DTT zur Stabilisierung versetzt und noch vor dem Zentrifugieren gekocht, damit eine Equilibrierung der internen Standards in der gesamten Matrix erfolgen konnte und nicht nur im Zentrifugat. Dieser Versuch wurde an einem weiteren Tag mit jeweils einer Probe wiederholt.

Weder die Bestimmungen innerhalb eines Tages ( $N_{\text{normal}} = 3$  und  $N_{\text{ISTD}} = 1$ ), noch die gemittelten Bestimmungen von beiden Tagen ( $N_{\text{normal}} = 4$  und  $N_{\text{ISTD}} = 2$ ) ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Aufarbeitungen (t-test, zweiseitig,  $p = 0,8$  bzw.  $0,6$ ).

### Schwankungen der Simulation

Es wurde eine kurze Überprüfung der üblichen Variabilität der Verdauungssimulation durchgeführt, damit eine Aussage über die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse möglich ist, ohne jedes Mal mehrere Simulationen durchführen zu müssen. Dabei wurden die Schwankungen für mehrere parallel verlaufende Simulationen bzw. die Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages (intraday), die Wiederholbarkeit an verschiedenen Tagen (interday)

**Tabelle 4.2:** Daten zu Schwankungen der Verdauungssimulation (Präzisionen). Die Präzision wird in Form des Variationskoeffizienten angegeben (in %).

	intraday	interday	interbatch
Dekonjugationseffizienz	1,1	4	14
Gesamtwiederfindung	1,5	6	3
Biozugänglichkeit	0,6	5	15

und die Variabilität zwischen verschiedenen Darmchargen (interbatch) am Beispiel von Spinat ermittelt (jeweils  $n = 3$ ). Die ermittelten Schwankungen sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

## Diskussion

Die Verdauungssimulation des PteGlu<sub>3</sub> mit den von der DIN 19738 vorgegebenen Inhaltsstoffen der Verdauungssäfte [191] hat gezeigt, dass es auf diese Weise nicht möglich ist, die Dekonjugation der Polyglutamate, die bei der humanen Verdauung stattfindet, im *in vitro*-Verdau-Modell zu simulieren. Die Dekonjugase des Pankreassaftes führte zu einer vernachlässigbaren Dekonjugation, obwohl dieses Enzym nicht von Trypsin und Chymotrypsin abgebaut wird [218]. Der Grund könnte aber in den verwendeten pH-Werten von 5,5 - 7,5 zu finden sein, denn das pH-Optimum für die Dekonjugase im Pankreassaft liegt bei 4 - 4,5 [218].

Ein Zusatz an Darmmukosa bzw. Bürstensaummembran vom Schwein, die eine weitere Dekonjugase enthält, ergab eine höhere Dekonjugationseffizienz. Der pH-Wert war hierfür sogar optimal gewählt, da die höchste Aktivität bei 5,5 ermittelt wurde und dieser pH-Wert auch am längsten während der Simulation der Darmstufe gehalten wurde. In der Publikation von WANG et al. [85] ist für das Enzym der Bürstensaummembran vom Schwein ebenfalls ein Optimum bei 5 - 5,5 zu erkennen, welches den ermittelten Wert von 5,5 bestätigt. Außerdem soll dieses Enzym in einem breiten pH-Bereich aktiv sein, was die vergleichbaren Ergebnisse zwischen den pH-Werten 6,5 und 7,5 erklärt, auch wenn die Aktivität in diesem pH-Bereich deutlich niedriger war als bei pH 5,5.

In Anwesenheit der simulierten Verdauungssäfte zeigte sich eine deutliche Differenz in der Aktivität der Dekonjugase der Bürstensaummembran vom Schwein verglichen mit einer Verdauungssimulation, bei der nur die reine Darmmukosa zugegeben wurde (ohne die zusätzlichen Verdauungssäfte). Es lag die Vermutung nahe, dass die Enzyme der Bürstensaummembran von den proteolytischen Enzymen der Verdauungssäfte abgebaut wurden. Da diese sonst membrangebunden in der Darmwand bzw. in der Bürstensaummembran vorliegen, könnten sie *in vivo* zwar vor einem Abbau geschützt sein, aber während der *in vitro*-Simulation dennoch einem Angriff der Proteasen ausgesetzt sein. Bei einem Experiment, bei dem die Verdauung vor der Zugabe der Darmmukosa für 10 min erhitzt wurde, blieb der Unterschied in der Dekonjugationseffizienz dennoch erhalten. Daraus lässt sich schließen, dass die Enzyme der Darmmukosa vermutlich nicht von den Proteasen der Verdauungssäfte abgebaut werden, sondern andere Substanzen enthalten sind, die die Aktivität der Bürstensaummembranenzyme inhibieren.

Durch eine Erhöhung der zugegebenen Menge an Darmmukosa konnte für die PteGlu<sub>3</sub>-Lösung nun eine relativ vollständige Dekonjugation erreicht werden. Für Spinat gelang dies nicht. Eine allzu große Erhöhung wurde aber als nicht sinnvoll erachtet, da es u.a.



zu einem zusätzlichen Eintrag an Folaten gekommen wäre, die nachträglich hätten abgezogen werden müssen und somit zu größeren Ungenauigkeiten geführt hätten. Außerdem konnte so sichergestellt werden, dass Unterschiede in der Dekonjugation zwischen den einzelnen Lebensmitteln zu erkennen waren und nicht bei allen Proben auf Grund einer zu großen Menge an Darmmukosa eine vollständige Dekonjugation erreicht wurde. Damit wäre eine Untersuchung auf einen möglichen Einfluss der Dekonjugation auf die Bioverfügbarkeit nicht möglich gewesen. Weiterhin wurde das pH-Profil auf die pH-Werte 5,5 und 6,5 beschränkt, da pH-Werte im Bereich von 7,5, wie die DIN 19738 für die Verdauungssimulation vorschlägt [191], erst im späteren Teil des Verdauungstraktes vorkommen, in dem keine Folatresorption mehr stattfindet, bzw. im Fastenzustand, aber nicht während einer Mahlzeit [192].

Weitere Experimente am Beispiel von Spinat zeigten, dass es keine Rolle spielt, ob die abgeschabte Darmmukosa vorher mit den Verdauenzymen homogenisiert oder einfach so hinzugegeben wurde. Die Darmmukosa verteilte sich also ausreichend genug in der Verdauungslösung, um eine optimale Aktivität der Bürstensaummembrandekongugase zu gewährleisten. Wie der Versuch zur Extraktionseffizienz der Folate gezeigt hat, ist außerdem davon auszugehen, dass es zu einer vollständigen Extraktion der Folate in die Verdauungslösung kam und das Zentrifugat für die anschließende Aufarbeitung bzw. Analyse verwendet werden kann.

Aus den Ergebnissen zu den üblichen Schwankungen des *in vitro*-Verdaus wird ersichtlich, dass die Schwankungen innerhalb eines Tages klein sind, sowohl für die Dekonjugationseffizienz, die Gesamtwiederfindung als auch für die Biozugänglichkeit. Wie schon erwähnt, erfolgte die Dekonjugation damit sehr gleichmäßig und ist somit vergleichbar. Die Schwankungen zwischen den Tagen lagen etwas höher, aber im Bereich bzw. nur leicht oberhalb der Schwankungen der Methode zur Quantifizierung der Folate. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist damit sichergestellt. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Überprüfung der üblichen Schwankungen des *in vitro*-Verdaus nur anhand einer Matrix durchgeführt wurde und eventuell nur bedingt auf andere Matrices angewendet werden kann.

Die Schwankungen zwischen den verschiedenen Darmchargen war deutlich größer. Die Ergebnisse für die Dekonjugation und die Biozugänglichkeit, die mit unterschiedlichen Darmchargen ermittelt wurden, sollten deshalb zu Vergleichszwecken entweder normiert werden oder müssen mittels der interbatch-Präzision verglichen werden. Auf Grund der starken Variabilität bei Verwendung verschiedener Darmchargen sind Unterschiede jedoch schwer zu erkennen bzw. oft nicht signifikant. Gründe für die Schwankungen sind u.a. in der Gewinnung der Darmmukosa zu suchen. Da der Anfang des Dünndarms nicht immer bekannt war, aber der Darmabschnitt teilweise doch etwas zu lang, wurden vermutlich auch Bereiche mit geringerer Enzymdichte verwendet, denn die Bürstensaummembrandekongugase befindet sich vorwiegend im proximalen Teil des Jejunums [16]. Außerdem gab es vermutlich auch Variationen auf Grund der verschiedenen Schweine, selbst wenn 2 - 3 Därme gemischt wurden. Zusätzlich könnte sich auch die Menge an Verunreinigungen und Waschwasser in der gewonnenen Darmmukosa unterschieden haben und damit die Konzentration an Dekongugasen bei einer Einwaage von 5 g Darmmukosa. Denn diese wurde mit einem scharfen Objektträger abgeschabt, so dass die Eindringtiefe variiert haben könnte.

Um eine bessere Vergleichbarkeit über einen langen Zeitraum hinweg zu erzielen, wäre ein definiertes Präparat der Bürstensaummembrandekongugase notwendig. Die Bürstensaummembran der Ratte soll käuflich zu erwerben sein, aber die Aktivität der membran-

gebundenen Dekonjugase der Ratte ist deutlich geringer als bei Mensch und Schwein [85] und unterscheidet sich z.B. auch im Aktivitätsmodus - Mensch und Schwein weisen hauptsächlich eine exo-Aktivität auf und Ratten eine zufällige exo- und endo-Aktivität [221]. Das Schwein wird jedenfalls von vielen Publikationen für die Simulation der Verdauung bzw. die Dekonjugation und Absorption beim Menschen als geeignetes Tiermodell beschrieben [14, 85, 221, 222] und wurde für die vorliegende Arbeit deshalb auch beibehalten.

#### 4.2.2 Effektivität der Verdauungssimulation

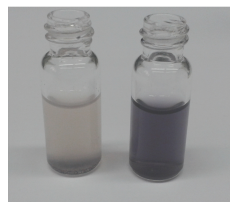
Die Methode zur Simulation wurde größtenteils von der DIN 19738 [191] übernommen. Es wurde jedoch die Speichelstufe weggelassen, die pH-Werte für die Darmstufe wurden abgeändert und auch die Verweildauer in der Darmstufe wurde verkürzt. Daraufhin sollte untersucht werden, inwiefern eine Verdauung der Matrix dennoch stattfindet. Dies sollte in Form von drei semi- bzw. quantitativen Bestimmungen erfolgen, die den Grad des Stärkeabbaus, des Proteinverbaus und des Fettverbaus analysieren.

Als Probenmaterial wurden Weizenkeime ausgewählt, da diese sowohl Stärke, als auch Proteine und Fett in größeren Mengen enthalten. Es wurde jedoch auf die Zugabe der Schweinedarmmukosa verzichtet, da damit der Eintrag an zusätzlichen Proteinen sehr groß gewesen wäre und es vermutlich zu stärkeren Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung gekommen wäre.

#### Stärkeabbau

Stärke bildet mit Iod und Iodid ( $I_3^-$ ) eine Einschlussverbindung mit dunkel-lila Färbung. Dieser Umstand wurde für den semiquantitativen Nachweis von Stärke in Weizenkeimen und deren Verdaulösung ausgenutzt. Iod und Iodid wurde in Form der Lugolschen Lösung sowohl zu der verdünnten Verdaulösung von Weizenkeimen als auch zu einer Lösung aus Weizenkeimen (frisch) mit einem Zusatz an einer dem *in vitro*-Verdau unterzogenen Lösung der Verdauungssäfte (ohne Probe) zugegeben. Die Probenlösungen wurden vor dem Zusatz der Lugolschen Lösung für  $\sim 20$  min stehen gelassen, damit sich starke Trübungen etwas absetzen können. Der obere Teil der Lösung wurde dann verwendet, damit ein Auswerten mittels Photometer ( $\lambda = 660$  nm [223]) und/oder visuell möglich ist.

Bei der photometrischen Auswertung (Verdünnung 1/20) wurde nach Abzug der jeweiligen Trübung eine Extinktion von 0,252 für die Verdaulösung und eine Extinktion von 0,425 für die unverdaute Weizenkeimprobe ermittelt. In Abbildung 4.4 sind die mit Lugolscher Lösung versetzten Proben (Verdünnung: 1/10) dargestellt. Sowohl die photometrische Messung als auch der visuelle Vergleich ergaben einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Proben. Bei beiden Proben setzte sich jedoch ein Teil der verbliebenen Trübungen



**Abbildung 4.4:** Stärkenachweis mit Lugolscher Lösung einer verdauten (links) und einer unverdauten Weizenkeimprobe (rechts).

als dunkel-lila Rückstand am Boden ab. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um kristalline Stärke, die beim Verdau nicht aufgeschlossen und nicht abgebaut wurde.

### Proteinverdau

Der Abbau von Proteinen findet im Magen-Darm-Trakt an mehreren Orten statt. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Magen. Hier werden die Proteine durch das Enzym Pepsin, bei welchem es sich um eine Endopeptidase handelt, die bei einem sauren pH-Wert aktiv ist, in Bruchstücke zerkleinert. Eine weitere Zerkleinerung findet dann im Duodenum und Jejunum statt. Durch den Pankreassaft werden hier weitere Enzyme zugefügt, u.a. das Trypsin und das Chymotrypsin. Auch bei diesen Enzymen handelt es sich um Endopeptidasen mit spezifischen Spaltstellen. Im Pankreassaft befinden sich aber auch Exopeptidasen, die endständige Aminosäuren von den Peptiden abspalten. [70, 224]

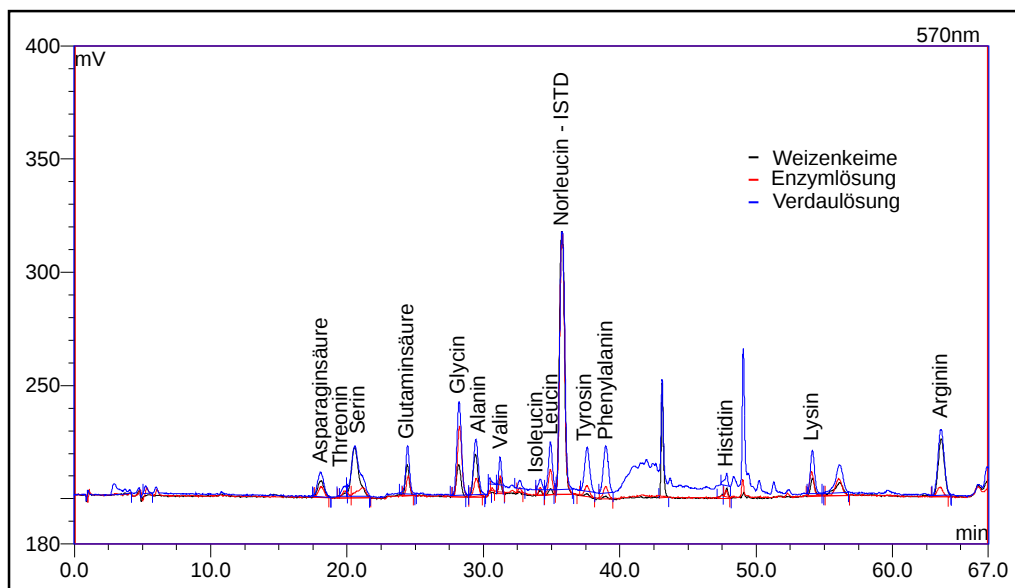
Um zu überprüfen, ob ein Abbau der Proteine während des *in vitro*-Verdaus stattfindet, wurde die Menge an freigesetzten Aminosäuren anhand des Verdaus der Weizenkeime bestimmt. Dafür wurden sowohl die freien als auch der Gesamtgehalt der Aminosäuren in Weizenkeimen und in der entsprechenden Verdaulösung analysiert. Zusätzlich wurde auch die Enzymmischung (Verdauungssäfte) auf ihren Eintrag an Aminosäuren hin untersucht. Die Analyse erfolgte durch die BIOANALYTIK Weihenstephan.

Der Gehalt der freien Aminosäuren bezogen auf den Gesamtgehalt ist während der Verdauungssimulation bei Weizenkeimen von 3,6 % auf 4,8 % angestiegen. Ein deutlicher Anstieg konnte jedoch nur bei 3 der 14 untersuchten Aminosäuren verzeichnet werden. In Tabelle 4.3 sind die Gehalte der freien Aminosäuren in Weizenkeimen, der Weizenkeimverdaulösung und der Enzymmischung exemplarisch dargestellt. Für viele Aminosäuren konnte kein Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren ermittelt werden, bzw. ist der Gehalt der Weizenkeimverdaulösung abzüglich der Enzymlösung teilweise sogar etwas ge-

**Tabelle 4.3:** Gehalt an freien Aminosäuren (in g/100 g) in Weizenkeimen vor und nach der Verdauung (Differenz der Verdaulösung der Weizenkeime und der reinen Enzymlösung ohne Zugabe von Lebensmitteln).

Aminosäure	Verdaulösung der Weizenkeime	Enzymlösung	Differenz	Weizenkeime vor Verdau
Asparaginsäure	0,095	0,037	0,058	0,068
Threonin	0,026	0,024	0,002	0,011
Serin	0,213	0,046	0,167	0,176
Glutaminsäure	0,132	0,052	0,080	0,079
Glycin	0,139	0,102	0,037	0,045
Alanin	0,118	0,036	0,082	0,091
Valin	0,044	0,027	0,017	0,025
Isoleucin	0,026	0,019	0,007	0,011
Leucin	0,115	0,060	0,055	0,013
Tyrosin	0,173	0,043	0,130	n.q.
Phenylalanin	0,174	0,044	0,130	n.q.
Histidin	0,032	0,011	0,021	0,025
Lysin	0,114	0,065	0,050	0,054
Arginin	0,319	0,047	0,273	0,269

n.q.: wurde auf Grund der geringen Menge nicht quantifiziert



**Abbildung 4.5:** Chromatogramme der freien Aminosäuren in Weizenkeimen, der entsprechenden Weizenkeimverdauung und der Enzymmischung der simulierten Verdauungssäfte. Norleucin wurde als interner Standard (ISTD) verwendet.

ringer. Für die drei Aminosäuren Leucin, Tyrosin und Phenylalanin ist jedoch ein deutlicher Anstieg im Gehalt zu verzeichnen. Der Gehalt von Tyrosin und Phenylalanin in der unverdauten Probe war so niedrig, dass eine Auswertung nicht möglich war. Der Anstieg dieser beiden Aminosäuren ist jedoch zur Bestätigung nochmal in Form der übereinandergelegten Chromatogramme dargestellt (Abbildung 4.5). Auch unter Berücksichtigung des Eintrags an freien Aminosäuren aus den Verdauungssäften ist für Tyrosin und Phenylalanin (bei einer Retentionszeit von 38 - 39 min) ein deutlicher Anstieg zu erkennen.

Auf Grund der erwartungsgemäß geringeren Relevanz von Cystein, Methionin, Tryptophan und Prolin bzgl. des Aminosäurespektrums in Weizenkeimen und des notwendigen zusätzlichen Aufwands für die Bestimmung wurde auf die Analyse dieser Aminosäuren verzichtet.

## Fettverdau

Während der Verdauung kommt es zu einem Abbau der Triacylglyceride zu den freien Fettsäuren und 2-Monoacylglyceriden. Inwiefern ein solcher Abbau auch während der Verdauungssimulation stattfindet, sollte durch die Quantifizierung der freien Fettsäuren vor und nach dem *in vitro*-Verdau ermittelt werden.

Die freien Fettsäuren wurden nach einer Methode von FIRL et al. [225] in der Versuchstation Thalhausen/BIOANALYTIK Weihenstephan bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand von vier Hauptfettsäuren (Tabelle 4.4). Für die drei ungesättigten Fettsäuren konnte ein Anstieg der freien Fettsäuren um einen Faktor von 1,4 - 2,5 ermittelt werden, wohingegen bei der gesättigten Fettsäure (Palmitinsäure) nach dem Verdau (nach Abzug des Eintrags aus den Verdauungssäften) kein Anstieg, sondern sogar ein etwas kleinerer Gehalt, ermittelt wurde.

**Tabelle 4.4:** Anteil der freien Fettsäuren in Weizenkeimen vor und nach dem Verdau, bezogen auf den Gesamtgehalt der entsprechenden Fettsäure (in %). Die aus der Enzymlösung stammenden freien Fettsäuren wurden abgezogen.

Fettsäure	Anteil freier Fettsäuren	
	vor dem Verdau	nach dem Verdau
Palmitinsäure (C16:0)	5,3	4,9
Ölsäure (C18:1(9c))	2,8	4,0
Linolsäure (C18:2(9c,12c))	2,9	6,6
Linolensäure (C18:2(9c,12c,15c))	2,4	5,9

## Diskussion

Auf Grund der geringeren Färbung bzw. Extinktion der Verdaulösung beim Stärkenachweis kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Stärke während der Verdauungssimulation abgebaut wurde. Anhand der sich absetzenden dunkel-lila gefärbten Rückstände, ist jedoch zu sehen, dass ein gewisser Teil der Stärke, hauptsächlich in Form von kristalliner Stärke, noch vorhanden ist. Dennoch zeigt dieses Experiment, dass ein Abbau der Stärke stattgefunden hat und die Funktion des *in vitro*-Verdaus bzgl. dem Abbau der Stärke damit bestätigt wird.

Auch bei der Analyse der freien Aminosäuren ist ein Unterschied zwischen der verdauten und der unverdauten Weizenkeimprobe zu erkennen. Dieser fällt jedoch sehr gering aus und ist auch nur bei drei der untersuchten Aminosäuren zu verzeichnen. Bei einigen Aminosäuren ist der Gehalt in der Weizenkeimverdaulösung weitestgehend identisch zum ursprünglichen Gehalt an freien Aminosäuren und bei anderen sogar etwas niedriger. Letzteres könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Gehalt an freien Aminosäuren aus den Verdauungssäften überschätzt wird. Es könnte während der Verdauungssimulation der reinen Verdauungssäfte ein stärkerer Abbau zu den freien Aminosäuren stattgefunden haben, als beim Weizenkeimverdau. Damit kommt es nach Abzug der Gehalte aus der Enzymmischung von der Weizenkeimverdaulösung zu einem Minderbefund an freien Aminosäuren für den Weizenkeimverdau.

Dennoch ist der Grad an freigewordenen Aminosäuren sehr gering. Es kam zu einem Anstieg von 3,6 auf 4,8 %. Dies könnte auf eine Inhibition durch Endprodukte zurückzuführen sein [226]. KOPF-BOLANZ et al. berichten hingegen von einem deutlichen Anstieg bei einem *in vitro*-Verdau von Milchproteinen von 0,6 auf 10 % [227]. Die Quelle des Proteins hat bei der Verdaubarkeit jedoch einen entscheidenden Einfluss. Bei Milchproteinen handelt es sich um tierische Proteine, die laut SAVOIE et al. leichter verdaubar sind als pflanzliche Proteine [228]. Proteine mit einem hohen Anteil an Prolin und Glutaminsäure zeigen zusätzlich eine noch schlechtere Verdaubarkeit [224, 228]. Bei Weizenkeimen handelt es sich um eine pflanzliche Proteinquelle, die reich an Glutaminsäure ist, bzw. Gluten enthält, welches von SAVOIE et al. [228] mit einer deutlich schlechteren Verdaubarkeit beschrieben wird. Weizenkeimproteine sind damit deutlich schlechter verdaubar als Milchproteine, was den geringen Anstieg an freien Aminosäuren im Vergleich zu KOPF-BOLANZ et al. [227] erklärt.

Für die Magenstufe wurde ein künstlicher Magensaft verwendet, der Mucine enthält. Dabei handelt es sich um die Glykoproteine der Schleimstoffe, die u.a. die Magenwand auskleiden. Im Mucin (Sigma-Aldrich) befindet sich auch ein gewisser Anteil an Sialin-

säuren. Diese Sialinsäuren leisten einen entscheidenden Beitrag zur Viskosität der Glykoproteinlösungen, aber sie können auch vor einem proteolytischen Abbau schützen [229]. Diese Substanzen könnten damit eventuell dazu beigetragen haben, dass der Proteinabbau teilweise inhibiert wurde.

Eine Erklärung dafür, dass der Unterschied nur an einigen Aminosäuren zu erkennen ist, kann mit der Spezifität der Enzyme begründet werden. Chymotrypsin spaltet ein Protein an aromatischen Aminosäuren, wozu Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan gehören, und an sperrigen unpolaren Seitenketten, wie bei Leucin. Pepsin spaltet ebenfalls an Stellen mit Tyrosin- und Phenylalaninresten [70, 224]. An den Endstücken befinden sich somit gehäuft die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und auch Leucin, die dann von den Exopeptidasen abgespalten werden können. Dabei handelt es sich dann auch noch um diejenigen Aminosäuren, die sowieso am schnellsten von den Carboxypeptidasen abgespalten werden [224].

In diesem Experiment konnten außerdem nur die freien Aminosäuren quantifiziert werden. Während der Verdauung im Magen und Jejunum kommt es jedoch nicht zu einem vollständigen Abbau der Proteine zu den Aminosäuren. Ein Großteil der Proteine liegt im Jejunum in Form von Peptiden mit einer Kettenlänge von 3 - 6 Aminosäuren vor [230]. In der Bürstensaummembran findet dann die weitere Spaltung in die freien Aminosäuren und vor allem in die Di- und Tripeptide statt, die dann mit Hilfe eines Transporters aufgenommen werden können. Bei dem durchgeführten Experiment wurde jedoch auf die Zugabe der Bürstensaummembran verzichtet, da damit der Eintrag an Proteinen zu groß gewesen wäre und zu stärkeren Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung geführt hätte. Aber selbst dann wäre die zusätzliche Quantifizierung der kurzkettigen Peptide notwendig gewesen, um den genauen Grad des Proteinabbaus zu bestimmen. Dennoch konnte ein Unterschied festgestellt werden, der bestätigt, dass der Proteinabbau während des *in vitro*-Verdaus zu einem gewissen Teil stattfindet.

Beim Abbau der Fette zu den freien Fettsäuren konnte für drei von vier Hauptfettsäuren ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden. Dabei handelte es sich um drei ungesättigte Fettsäuren. Eine der vier Hauptfettsäuren zeigte keinen Anstieg, sondern sogar einen verminderten Gehalt. Dabei handelte es sich um die gesättigte Palmitinsäure. Die drei ungesättigten Fettsäuren zeigten, dass ein Abbau des Fettes zu den freien Fettsäuren stattgefunden hat. Der Anteil dieser Fettsäuren bezogen auf den gesamten Gehalt der jeweiligen Fettsäure hat sich von 2,4 - 2,9 % auf 4,0 - 6,6 % gesteigert. Es ist also nur ein geringer Teil der jeweiligen Fettsäuren frei geworden. Zu einem geringen Teil lässt sich dies damit erklären, dass nur die Fettsäuren in Position 1 und 3 abgespalten werden [70, 231] und die Fettsäure an Position 2 am Glycerinrest verbleibt (2-Monoacylglycerid). Sollte es sich an dieser Position vor allem um die Palmitinsäure handeln, würde dies erklären, warum bei dieser Fettsäure kein Anstieg festgestellt wurde. Dies widerspricht jedoch einer Regel zur Verteilung der einzelnen Fettsäuren bei Pflanzenfetten, nach der es heißt, dass sich die Palmitinsäure bevorzugt an Position 1 und 3 befindet [231].

Weiterhin sei erwähnt, dass die Lipase eine höhere Affinität zu kurz- und mittelkettigen Fettsäuren aufweist, die in der Auswertung jedoch nicht weiter berücksichtigt wurden. Außerdem wurde die Methode eigentlich für die freien Fettsäuren in Plasmaproben entwickelt und validiert, wodurch es auch zu Fehlern gekommen sein könnte. Hinzu kommt, dass der Gehalt an freien Fettsäuren in der Enzymlösung bei einigen Fettsäuren relativ hoch war und bei Palmitin- und Ölsäure fast die Hälfte der freien Fettsäuren in der Weizenkeimverdaulösung ausmacht. Wie schon beim Proteinverdau vermutet, könnte es auch hier zu einer

Überschätzung des Eintrags an freien Fettsäuren aus der Enzymlösung gekommen sein. Bei Ölsäure ist zwar dennoch ein Anstieg im Gehalt der freien Fettsäuren zu verzeichnen, aber dieser ist auch geringer als bei den anderen beiden ungesättigten Fettsäuren (Faktor 1,4 statt 2,3 - 2,5). Dies spricht dafür, dass die Differenzbildung Probleme mit sich bringen kann.

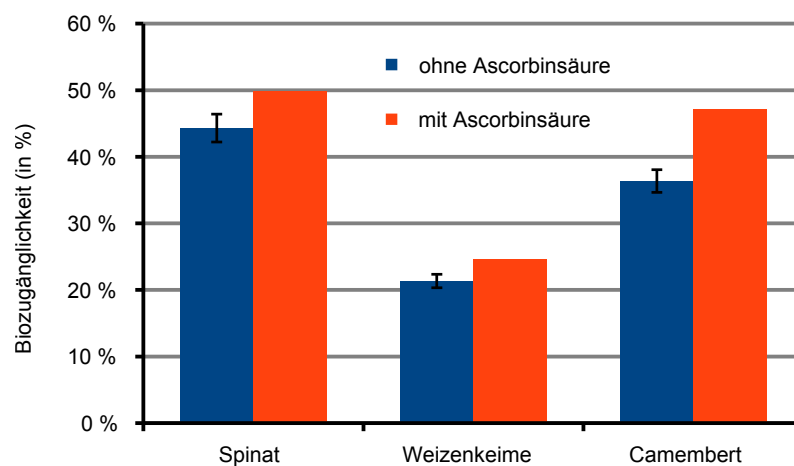
Dennoch ist zu sehen, dass es zu einem Anstieg an freien Fettsäuren gekommen ist und die Verdauungssimulation in gewissem Maße auch zu einem Abbau der Fette geführt hat.

### 4.2.3 Biozugänglichkeit von Folaten in Lebensmitteln

#### Steigerung der Biozugänglichkeit durch Ascorbinsäurezusatz

In Abschnitt 4.1.5 konnte gezeigt werden, dass ein Zusatz an Ascorbinsäure in physiologischen Mengen, eine deutliche Verbesserung bzgl. der Stabilität von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat mit sich gebracht hat und es deshalb notwendig ist, diesen Zusatz auch für die Simulation der Verdauung von Lebensmitteln anzuwenden. In Abbildung 4.6 ist der Einfluss des Ascorbinsäurezusatzes bei der Verdauungssimulation für verschiedene Lebensmittel dargestellt. Zur Abschätzung ob es sich um signifikante Unterschiede handeln könnte, wurden die Standardabweichungen auf Grundlage der interday-Präzision aus Abschnitt 4.2.1 mit angegeben.

Für alle drei Lebensmittel ist ein Anstieg in der Biozugänglichkeit zu sehen. Für Camembert ergab sich der größte Unterschied, wohingegen für die anderen beiden Lebensmittel kleinere Unterschiede zu sehen sind (für Spinat nicht signifikant). Es ist jedoch zu beachten, dass die Überprüfung der üblichen Schwankungen am Beispiel von Spinat durchgeführt wurde. Bei Camembert und Weizenkeimen ist die Folatezusammensetzung jedoch ganz anders. Vor allem bei Weizenkeimen nimmt das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat den Hauptanteil ein und geht während des Verdaus zu einem Großteil in 10-HCO-H<sub>2</sub>folat über. Dieses Folat zeigt auf Grund der Analyse über einen strukturähnlichen, aber nicht identischen internen



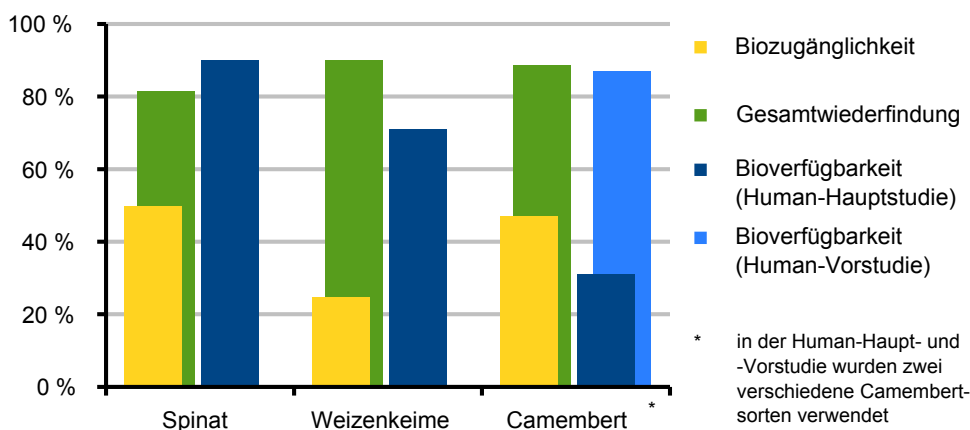
**Abbildung 4.6:** Biozugänglichkeit mit und ohne Ascorbinsäurezusatz. Für die Ergebnisse ohne Ascorbinsäure wurde eine auf das entsprechende Lebensmittel normierte Standardabweichung angegeben, die bei der Überprüfung der üblichen Schwankungen für parallel durchgeführte Simulationen ermittelt wurde (interday-Präzision).

Standard eine etwas größere Schwankung, die sich auch in den Schwankungen der Verdauungsergebnisse bemerkbar machen dürften. Es könnte sich bei den Weizenkeimen dementsprechend auch um einen zufälligen Unterschied handeln, denn am 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat konnte keine Verbesserung der Stabilität festgestellt werden, wohl aber beim 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat im Spinat (Gesamtwiederfindung von 76 statt 62 %, bzw. Biozugänglichkeit von 42 statt 37 %) und vor allem beim Camembert (Gesamtwiederfindung von 84 statt 19 %, bzw. Biozugänglichkeit von 52 statt 12 % von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat). Beim Spinat war von vornherein eine größere Menge an Ascorbinsäure enthalten, so dass der Unterschied wahrscheinlich deshalb auch weniger stark ausgeprägt war als beim Camembert.

### Vergleich der drei Lebensmittel

In Anlehnung an die vorangegangene Humanstudie von MÖNCH [19] wurden als Lebensmittel Spinat, Weizenkeime und Camembert (Geramont cremig-leicht) ausgewählt und die Verdauung dieser Lebensmittel mit dem *in vitro*-Modell (mit Ascorbinsäurezusatz) simuliert. Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Lebensmitteln zu erreichen, wurde die gleiche Charge der Darmmukosa verwendet. Die Parameter Biozugänglichkeit und Gesamtwiederfindung sind der relativen Bioverfügbarkeit aus der Humanstudie gegenübergestellt (Abbildung 4.7).

Bei Betrachtung der Gesamtwiederfindung, bei der die vollständige Dekonjugation während der Analytik erfolgte und ihr Einfluss damit nicht in die Simulation mit einging, zeigen die Weizenkeime den größten Wert mit 90 %, dicht gefolgt vom Camembert mit 89 % und dann erst der Spinat mit 82 %. Für die Weizenkeime und den Camembert handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die relative Bioverfügbarkeit (Humanstudie) zeigen hingegen einen anderen Trend. Bei dieser Studie wurde die höchste relative Bioverfügbarkeit bei Spinat festgestellt (90 %), gefolgt von Weizenkeimen mit 71 % und Camembert (Saint Albray cremig-leicht) mit nur 31 %. Beim Camembert ist jedoch zu beachten, dass in der Vorstudie ein anderer Camembert als in der Hauptstudie verwendet wurde (Geramont cremig-leicht). Dieser hatte eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % ergeben. Dies war auch der Camembert, der für den *in vitro*-Verdau verwendet wurde. Dabei handelte es sich zwar um eine andere Charge, da die entsprechende Probe von der



**Abbildung 4.7:** Biozugänglichkeit und Gesamtwiederfindung (mit nachträglicher Dekonjugation während der Analytik) von verschiedenen Lebensmitteln (*in vitro*) im Vergleich zur relativen Bioverfügbarkeit (*in vivo*).



Human-Vorstudie nicht mehr verfügbar war, dennoch ähnelte sich die Folatvitamerenverteilung der beiden Geramont cremig-leicht-Chargen, vor allem in Hinblick auf die weniger stabilen Folate 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und H<sub>4</sub>folat (siehe Abbildung 4.10c und g). Die Verteilungen des Geramont cremig-leicht des *in vitro*-Verdau und des in der Hauptstudie verwendeten Saint Albray cremig-leicht unterschieden sich hingegen deutlich (siehe Abbildung 4.10c und h). Weiterhin gab es auch Unterschiede in der Art bzw. der Zusammensetzung der beiden Camembertsorten Geramont cremig-leicht und Saint Albray cremig leicht. Unter anderem handelte es sich bei dem einen Camembert um einen Weichkäse mit Schimmelpilzkulturen auf der Oberfläche (Geramont cremig-leicht) und bei dem anderen um einen Weichkäse, der sowohl mit Schimmelpilzkulturen als auch mit Rotschmierekulturen hergestellt wurde. Auf Grund der größeren Ähnlichkeit zwischen dem Camembert der *in vitro*-Simulation und dem der Human-Vorstudie (jeweils Geramont cremig-leicht) bieten sich die Daten dieser beiden zur Gegenüberstellung an. Doch nur unter Berücksichtigung der Gesamtwiederfindung zeigt sich auch hier immer noch ein etwas abweichender Trend zu den Ergebnissen zur Bioverfügbarkeit.

Die Biozugänglichkeiten der drei Lebensmittel, für die neben der Gesamtwiederfindung auch die Dekonjugation berücksichtigt wurde, verfolgen hingegen einem vergleichbaren Trend wie die entsprechenden relativen Bioverfügbarkeiten. Die mit in die Biozugänglichkeit eingehenden Dekonjugationseffizienzen unterschieden sich teilweise recht deutlich zwischen den drei Lebensmitteln. Spinat zeigte eine Dekonjugationseffizienz von 61 %, die Weizenkeime von 27 % und der Camembert Geramont cremig-leicht von 53 %. Es ergaben sich damit Werte für die Biozugänglichkeit von 50 % für Spinat, 25 % für die Weizenkeime und 47 % für den Camembert Geramont cremig-leicht.

### **Vergleich zwischen verschiedenen Lebensmitteln einer Art und Unterscheidung beim Camembert in Teig und Rinde**

Bei den Lebensmitteln, die für den *in vitro*-Verdau verwendet wurden, handelt es sich zwar um die gleiche Art, aber nicht um die selben Lebensmittel wie in der Humanstudie. Nur der Spinat, welcher in der Humanstudie verwendet wurde (Blattspinat), war noch eingefroren verfügbar und konnte der Verdauungssimulation zu Vergleichszwecken unterzogen werden. Von den Weizenkeimen und dem Camembert waren keine Reste mehr vorhanden.

Ein Camembert der gleichen Sorte, aber einer etwas späteren Charge und mit einer abweichenden Folatverteilung, war noch zu finden und konnte auf seine Verdaubarkeit hin untersucht werden. Dieser Camembert, ein Saint Albray cremig-leicht, zeigte eine ganz anderes Verhältnis von Teig zu Rinde auf als der Geramont cremig-leicht, der in der Vorstudie und den bisherigen Verdauungssimulationen verwendet wurde, und steht u.a. deshalb in Verdacht, für die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Human-Haupt- und Vorstudie verantwortlich zu sein. Daraufhin wurde die Verdauungssimulation sowohl für den Saint Albray cremig-leicht als auch für den Geramont cremig-leicht getrennt an Teig und Rinde durchgeführt (jeweils andere Charge als in der Haupt- bzw. Vorstudie).

Weiterhin wurde ein Camembert des gleichen Herstellers und mit ähnlicher Folatzusammensetzung aber niedrigerem Gesamtfolatgehalt und höherer Fettstufe untersucht (Geramont).

Da nicht für alle Lebensmittel die gleiche Charge an Darmmukosa zur Verfügung stand, wurde eine weitere Charge verwendet. Für diese war die Dekonjugationseffizienz der bisher verwendeten Lebensmittel jedoch aus vorhergehenden Versuchen (ohne die Anwesenheit

**Tabelle 4.5:** Vergleich der Dekonjugationseffizienz, der Biozugänglichkeiten und der Gesamtwiederfindung von Lebensmitteln gleicher Art und Unterteilung von Camembert in Teig und Rinde. Die Werte sind jeweils in % angegeben.

	Spinat		Camembert				
	jung (gehackt)	Blatt- spinat	Geramont	Geramont cremig-leicht	Saint Albray cremig-leicht		
Dekonj.eff.	56 <sup>1</sup>	52	46 <sup>1</sup>	48 <sup>1</sup>	44		
Biozugänglichkeit	46 <sup>2</sup>	44	44 <sup>2</sup>	43 <sup>2</sup>	36		
Gesamtwdf.	82	86	95	89	81		
				Teig	Rinde	Teig	Rinde
Dekonj.eff.				64	34	46	37
Biozugänglichkeit				61	30	42	26
Gesamtwdf.				96	88	91	71

<sup>1</sup> Dekonjugationseffizienz, die mit der gleichen Darmcharge ermittelt wurde (aus Versuchen ohne Ascorbinsäurezusatz)

<sup>2</sup> unter Verwendung der Dekonjugationseffizienz der gleichen Charge berechnet; tatsächliche Werte für die Dekonjugationseffizienz: junger Spinat: 61 %, Geramont: 55 %, Geramont cremig-leicht: 53 %

von Ascorbinsäure) bekannt und die Werte dieser Lebensmittel konnten deshalb umgerechnet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Ascorbinsäure [13, 232] und die Lagerung einen Einfluss auf die Aktivität gehabt haben könnten. Zusätzlich sind aber auch die Schwankungen der Simulation bei Verwendung unterschiedlicher Chargen bekannt und können ebenfalls zur Entscheidung, ob Unterschiede vorliegen, herangezogen werden.

Die Gesamtwiederfindungen der beiden Spinatsorten („Blattspinat“ und „junger Spinat, gehackt“, aber beide nochmals zerkleinert), die in Tabelle 4.5 angegeben sind, zeigten keinen deutlichen Unterschied, obwohl der „junge Spinat“ bei vergleichbarem Gesamtfolatgehalt ursprünglich einen etwas höheren Anteil an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aufwies. Unter Berücksichtigung der interday-Präzision aus Abschnitt 4.2.1 ist der Unterschied in der Gesamtwiederfindung nicht signifikant. Die Biozugänglichkeit zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, auch dann nicht, wenn angenommen wird, dass die Dekonjugationseffizienz gleich war. Auch bei den Dekonjugationseffizienzen der beiden Spinatsorten (Werte jeweils von der gleichen Darmcharge), die in Tabelle 4.5 zur Gegenüberstellung verwendet wurden, ist nicht von einem wirklichen Unterschied auszugehen. Selbst wenn die tatsächlich ermittelten Dekonjugationseffizienzen verwendet werden, ist der Unterschied nicht signifikant. Auf Grund der unterschiedlichen Darmchargen wurde dafür die interbatch-Präzision zum Vergleich herangezogen.

Die beiden Camembertsorten von Geramont, die sich in ihrem Fettgehalt und ihrem Gesamtfolatgehalt (Faktor 3,6) unterscheiden, aber so gut wie nicht in ihrer Folatverteilung, lassen für keinen der Parameter einen deutlichen Unterschied erkennen. Die Abweichung bei der Gesamtwiederfindung geht wahrscheinlich auf Schwankungen bei der Quantifizierung zurück.

Für die beiden cremig-leicht-Sorten ist ebenfalls kein deutlicher Unterschied in der Dekonjugationseffizienz zu ermitteln. Hierbei ist zu beachten, dass die Verwendung der in vorhergehenden Versuchen ermittelten Dekonjugationseffizienz fehlerbehaftet sein kann,

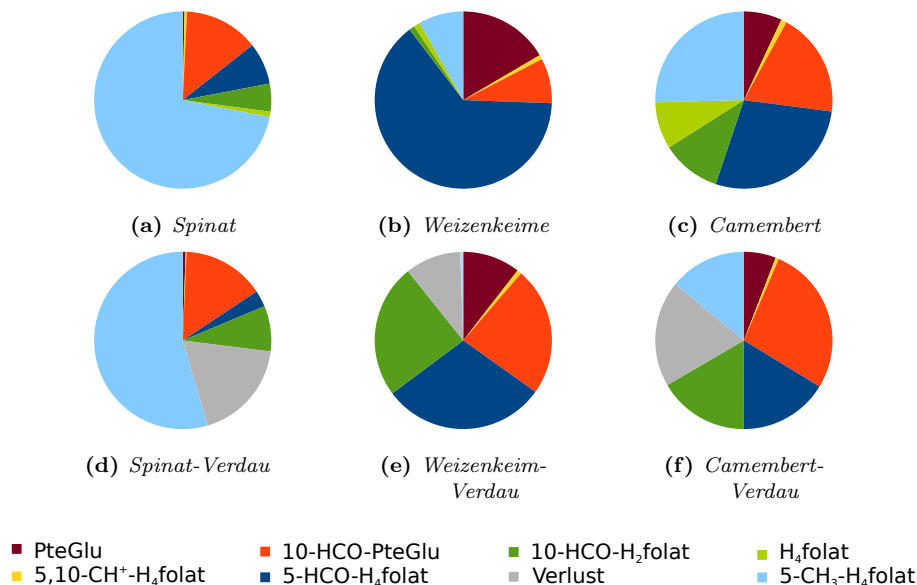
da die Werte ohne Ascorbinsäure ermittelt wurden und diese in Verdacht steht, die Dekonjugation zu beeinflussen [13, 232]. Unter Berücksichtigung der tatsächlich ermittelten Werte und unter Zuhilfenahme der interbatch-Präzision handelt es sich jedenfalls nicht um einen signifikanten Unterschied. Für die Gesamtwiederfindung und die Biozugänglichkeit ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass es sich doch um wirkliche Unterschiede handelt.

Weiterhin ist zu erkennen, dass sich die Verdauung zwischen Teig und Rinde bei beiden Camembertsorten sehr stark unterschieden hat. Der Teig zeigte für alle drei Parameter (Tabelle 4.5 unten) jeweils höhere Werte. Ein Vergleich zwischen dem Teig des Geramont cremig-leicht und dem Saint Albray cremig-leicht zeigte ebenfalls einen deutlichen Unterschied in der Dekonjugation, wohingegen es sich bei der Dekonjugationseffizienz der beiden Rinden nicht um einen signifikanten Unterschied handelte.

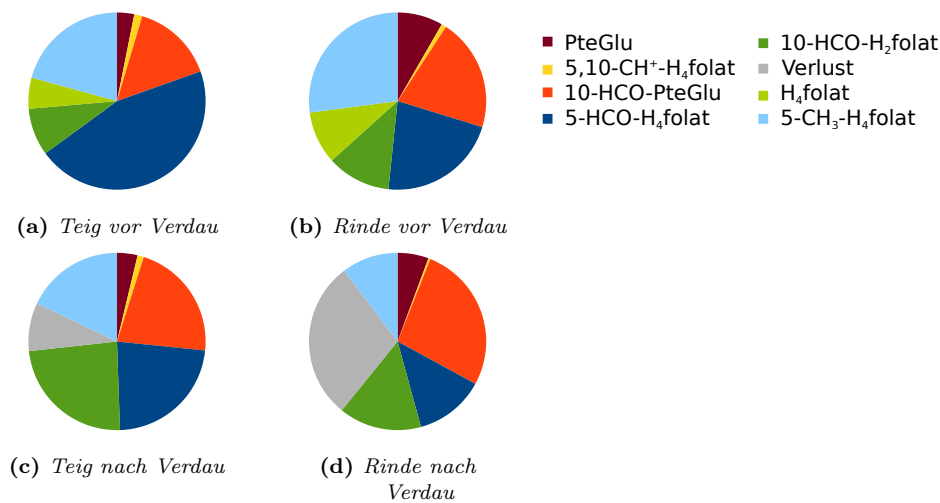
### Einfluss der Folatverteilung der Lebensmittel

Die *in vitro*-Verdauung der einzelnen Lebensmittel in Abschnitt 4.1 hat gezeigt, dass es Unterschiede in der Stabilität der einzelnen Folate gibt. Wie schon in Abschnitt 4.1.6 erwähnt, gibt es für die Stabilität von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat auch Unterschiede innerhalb der Lebensmittel. In Abbildung 4.8 sind die Zusammensetzungen drei verschiedener Lebensmittel vor und nach dem Verdau sowie der Verlust, der während der Verdauungssimulation eintrat, dargestellt. Es handelt sich dabei jeweils um den Gesamtfolatgehalt. Die Dekonjugation findet bei dieser Auftragung keine Berücksichtigung.

Anhand dieser Darstellung ist sehr gut zu erkennen, dass der Verlust, welcher während der Verdauungssimulation stattfindet, auf die beiden Folate H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zurückzuführen ist. H<sub>4</sub>folat wies, wie auch schon bei den reinen Standardsubstanzen (Abschnitt 4.1.3) festgestellt werden konnte, einen vollständigen Verlust auf. 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ist hingegen nur zu einem gewissen Teil verloren gegangen. Der Grad des Verlustes an



**Abbildung 4.8:** Zusammensetzung verschiedener Lebensmittel vor und nach dem Verdau in Anwesenheit von Ascorbinsäure - junger Spinat (Iglo), Weizenkeime und Camembert (Saint Albray cremig-leicht).



**Abbildung 4.9:** Zusammensetzung der Rinde und des Teigs des Camembert Saint Albray cremig-leicht vor und nach der Verdauungssimulation in Anwesenheit von Ascorbinsäure.

5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ist jedoch abhängig vom Lebensmittel, denn obwohl sich ein Zusatz an Ascorbinsäure positiv auf die Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats bei Spinat und Camembert ausgewirkt hat, konnte dieser Effekt bei Weizenkeimen nicht bestätigt werden. Der Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat lag trotz Ascorbinsäure bei 94 %, wohingegen er bei Spinat nur bei 19 - 24 % lag und bei dem aufgeführten Camembert bei 45 %. Andere Camembertsorten zeigten nur einen Verlust von 16 - 17 %.

In Abbildung 4.9 ist am Beispiel des Camemberts zu sehen, dass es auch innerhalb eines Lebensmittels zu Unterschieden kommen kann. Die Verluste am Gesamtfolatgehalt unterscheiden sich zwischen dem Teig und der Rinde des Camemberts. Dies geht u.a. auf den unterschiedlichen Gehalt an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und H<sub>4</sub>folat und den damit verbundenen Verlusten dieser Folate in den beiden Teilen des Camemberts zurück. Die Rinde hat einen größeren Anteil an diesen beiden Folaten und auch den größeren Verlust. Die abweichende Folatverteilung allein hat also schon zu unterschiedlichen Verlusten und damit zu unterschiedlichen Biozugänglichkeiten in der jeweiligen Matrix geführt. Zusätzlich trat aber auch ein unterschiedlicher Grad an Verlusten bei 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat auf. Im Teig sind prozentual deutlich geringere Verluste an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zu verzeichnen gewesen als in der Rinde. Beim Teig trat ein Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat von 13 % auf und bei der Rinde von 62 %.

## Diskussion

Ascorbinsäure wird im Magen sezerniert [233] und im Ileum absorbiert [234, 235]. Es hat sich in der Verdauungssimulation der einzelnen Folate gezeigt, dass ein Zusatz an Ascorbinsäure in physiologischen Mengen einen entscheidenden Einfluss auf 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat hat. Der Einfluss dieses Reduktionsmittels wurde deshalb auch für die komplexen Lebensmittel untersucht.

Vor allem für Camembert konnte eine Steigerung der Biozugänglichkeit und der Gesamtwiederfindung erreicht werden. Dies ist auf die Stabilisierung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zurückzuführen. Denn in Abschnitt 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass der Verlust an Folaten und

damit die verminderte Gesamtwiederfindung auf einen vollständigen Verlust an H<sub>4</sub>folat und einen teilweisen Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zurückzuführen ist. Für Spinat fiel der Unterschied bzgl. dem Gesamtfolatgehalt in Abhängigkeit von Ascorbinsäure zwar deutlich geringer aus als beim Camembert, aber der Unterschied lässt sich dennoch anhand der Steigerung der Wiederfindung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats von 62 auf 76 % bestätigen. Beim Camembert ist dieser Effekt deutlich größer (Geramont cremig-leicht: Wiederfindung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats von 84 % durch Ascorbinsäure statt 19 %). Aber es sollte berücksichtigt werden, dass Spinat von vornherein größere Mengen an Ascorbinsäure enthält, die zur Stabilisierung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat geführt haben. In Weizenkeimen konnte keine Verbesserung der Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat durch den Zusatz an Ascorbinsäure erzielt werden. Der Unterschied, der in Abbildung 4.6 zu sehen ist, hat vermutlich einen präzisionsbedingten Hintergrund. Die Ergebnisse zur Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats und des H<sub>4</sub>folats zeigen damit, dass es eine Abhängigkeit von der Matrix gibt, die sich je nach Gehalt an H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat in den Gesamtwiederfindungen der einzelnen Lebensmitteln widerspiegelt.

Doch es lassen sich nicht nur Unterschiede in der Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats zwischen verschiedenen Lebensmitteln finden, sondern teilweise auch innerhalb der gleichen Art von Lebensmitteln. Sowohl für Spinat als auch für Camembert wurden mehrere Varianten des jeweiligen Lebensmittels untersucht. Für Spinat konnten keine großen Unterschiede in der Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats festgestellt werden. Beim jungen Spinat war ein Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat von 24 % zu verzeichnen gewesen und beim Blattspinat, der auch in der Humanstudie von MÖNCH [19] verwendet wurde, ein Verlust von 19 %. Dieser Unterschied im Verlust von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat könnte präzisionsbedingt, aber auch wirklich vorhanden sein und damit die ähnliche Gesamtwiederfindung der beiden Spinatarten erklären. Denn der junge Spinat zeigte den etwas größeren Verlust, bei gleichzeitig höherem Ausgangsgehalt an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat. Eine mögliche Erklärung für einen unterschiedlichen Verlust könnte auf einen abweichenden Ascorbinsäuregehalt zurückzuführen sein oder auf einen unterschiedlichen Gehalt an anderen Substanzen, die die Stabilität beeinflussen, wie z.B. Eisenionen. Für Camembert sind weitaus deutlichere Unterschiede zu erkennen. Für die beiden Geramontsorten waren Verluste an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat von 16 - 17 % zu verzeichnen und für den Camembert Saint Albray cremig-leicht von 45 %. Das bekräftigt, dass es sich bei der Gesamtwiederfindung dieser beiden Lebensmittel um wirkliche Unterschiede handelt.

Unterschiede in der Stabilität beschränken sich jedoch nicht nur auf die gleiche Art des Lebensmittels, sondern sind beim Camembert auch innerhalb ein und desselben Lebensmittels festzustellen. Bei der Unterteilung in Teig und Rinde wurde bei beiden cremig-leicht Sorten im Teig eine bessere Stabilität für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ermittelt als in der Rinde (Abbildung 4.9 und A.7). Zusätzlich unterschied sich auch noch die Folatverteilung zwischen Teig und Rinde. Doch folgte dies keinem Trend. Für den Camembert Saint Albray cremig-leicht enthielt die Rinde einen etwas größeren Anteil an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, bei gleichzeitig größeren Verlusten an diesem Folat. Beim Geramont cremig-leicht verhielt es sich andersherum. Hier war der Anteil an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat im Teig zwar deutlicher größer als in der Rinde. Doch durch die bessere Stabilität ist es zu einem geringeren Verlust gekommen. Dies spiegelt sich in dem weniger deutlichen Unterschied in den jeweiligen Gesamtwiederfindungen der Teige im Vergleich zu den Rinden wider. Beim Saint Albray cremig-leicht wurde der Verlust, bezogen auf den gesamten Camembert, dadurch erhöht, dass der Gewichtsanteil der Rinde fast identisch mit dem Anteil an Teig war und bezogen auf den Folatgehalt sogar 74 % einnahm, wohingegen beim Geramont cremig-leicht die Rinde nur einen Anteil von 25 % ausmachte und bezogen auf den Gesamtfolatgehalt einen Anteil von 45 %.

Dies alles unterstützt die Tatsache, dass es sich bei der Gesamtwiederfindung der beiden cremig-leicht-Sorten um einen wirklichen Unterschied gehandelt hat.

Wie die Ergebnisse verdeutlichen, ist der Verlust an Folaten und damit die Gesamtwiederfindung während des Verdaus abhängig von der Matrix. Dabei kann es sich sowohl um sehr verschiedene Matrices handeln, aber auch um ähnliche Matrices, wie anhand der beiden cremig-leicht Camembertsorten gezeigt werden konnte. Zu den Unterschieden in der Gesamtwiederfindung auf Grund der variierenden Stabilität des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats und dem vollständigen Verlust an H<sub>4</sub>folat, kommt hinzu, dass sich auch die Dekonjugation zwischen den Lebensmitteln unterscheidet. Vor allem für Weizenkeime war eine deutlich schlechtere Dekonjugationseffizienz verglichen mit Spinat und Camembert zu verzeichnen.

Eine erste Vermutung für die geringe Dekonjugationseffizienz der Weizenkeime war, dass zu wenig Zink in den Lebensmitteln bzw. der Darmmukosa vorhanden war, um eine optimale Aktivität der membrangebundenen Bürstensaummembrandekongjugase zu gewährleisten, denn Zinkionen sollen die Aktivität des Enzyms stimulieren [85]. Im Versuch mit der PteGlu<sub>3</sub>-Lösung zur Dekonjugation konnte jedoch eine vollständige Dekonjugation mit der Hälfte an Darmmukosa erreicht werden (Abschnitt 4.2.1), weshalb davon auszugehen ist, dass Zink im *in vitro*-Verdau kein limitierender Faktor ist. Außerdem befindet sich auch ein gewisser Anteil an Zink in den Lebensmitteln. In Weizenkeimen ist der Anteil an Zink laut Lebensmitteltabellen sogar am größten (18 mg/100 g statt 0,6 mg/100 g im Spinat und 3 mg/100 g für Camembert [173]) und damit kein Grund für die geringste relative Dekonjugationseffizienz.

Es muss jedoch auch beachtet werden, dass die Verdauungssimulation auf die gleiche Einwaage normiert wurde und nicht auf den gleichen Gesamtfolatgehalt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass sich Unterschiede in der Dekonjugation auf eine geringere Matrixbelastung zurückführen lassen. Diese Überlegung war vor allem für den Vergleich ähnlicher Matrices gedacht, da der Einfluss von Inhibitoren auf die Aktivität der Bürstensaummembrandekongjugase konzentrationsabhängig ist [232].

Bei Betrachtung der absoluten Mengen an freierwerdenden Monoglutamaten, zeigten die Weizenkeime den höchsten Gehalt an freigesetzten Monoglutamaten, gefolgt vom Geramont cremig-leicht, dem Spinat und am Schluss vom Geramont. Eine Möglichkeit wäre also, dass nur eine gewisse absolute Menge an Polyglutamaten dekonjugiert werden kann. Dementsprechend wäre es vielleicht doch notwendig gewesen, die Einwaage der Lebensmittel an den Folatgehalt anzupassen. Dagegen spricht aber, dass die beiden Geramontsorten trotz abweichendem Gesamtfolatgehalt (Geramont: 39 µg/100 g im Vergleich zu Geramont cremig-leicht: 107 mg/100 g, mit anfänglichem Monoglutamatanteil von 14 und 19 %), aber vermutlich ähnlicher Zusammensetzung der Matrix, abgesehen vom Fettgehalt, und ähnlicher Folatzusammensetzung, eine ähnliche Dekonjugationseffizienz aufwiesen. Zusätzlich zeigt z.B. der Spinat der Humanstudie trotz des etwas höheren Gesamtfolatgehaltes (111 statt 88 µg/100 g) die bessere Dekonjugationseffizienz (52 statt 44 %), sowie auch der Teig des Geramont cremig-leicht (86 µg/100 g) verglichen mit dem Teig des Saint Albray cremig-leicht (45 µg/100 g). Es ist zwar nicht auszuschließen, dass auch der Gesamtfolatgehalt einen Einfluss hat, aber der Effekt unterschiedlicher Dekonjugationsraten kann nicht allein auf den Gesamtfolatgehalt oder den Gehalt an Polyglutamaten zurückzuführen sein und scheint wenn dann eher einen geringeren Einfluss zu haben. Es ist also davon auszugehen, dass trotz gleicher Einwaage aber teilweise abweichendem Gesamtfolatgehalt die Dekonjugationseffizienz zu einem gewissen Teil für Vergleiche zwischen den Lebensmitteln herangezogen werden kann.

Bei der Dekonjugationseffizienz sind die Unterschiede zwischen ähnlichen Lebensmitteln weniger deutlich. Wie schon erwähnt, konnte für die zwei Geramontsorten, die sich sowohl im Fettgehalt als auch im Gesamtfolatgehalt, nicht jedoch in der Folatverteilung unterscheiden, kein Unterschied in der Dekonjugationseffizienz festgestellt werden. Auch bei den beiden Spinatvarianten ist nicht von einem signifikanten Unterschied auszugehen. Ein Vergleich der Letztgenannten gestaltet sich jedoch etwas schwieriger, da die gleiche Darmcharge nicht mehr zur Verfügung stand, bzw. die Ergebnisse mit der gleichen Darmcharge beim jungen Spinat ohne Ascorbinsäure durchgeführt wurde und Letztere die Dekonjugation beeinflussen könnte [13, 232]. Das Gleiche gilt auch für die zwei cremig-leicht Camembertsorten. Es ist gut möglich, dass die angenommene Dekonjugationseffizienz aus den Vorversuchen nicht für die Simulation in Anwesenheit von Ascorbinsäure anwendbar sind oder dass die Unterschiede auf Verluste bei der Lagerung der Darmmukosa zurückzuführen sind. Doch die weitergehenden Untersuchungen, die für die cremig-leicht Camembertsorten durchgeführt wurden, lassen darauf schließen, dass es, wie nachfolgend näher erläutert wird, deutliche Unterschiede in der Dekonjugation zwischen verschiedenen Camemberts geben kann.

Sowohl für den Geramont cremig-leicht als auch den Saint Albray cremig-leicht gab es Abweichungen in der Dekonjugationseffizienz von Teig und Rinde. Doch auch zwischen dem Teig des einen Camemberts und dem Teig des anderen waren deutliche Unterschiede zu erkennen und lassen auf einen möglichen Einfluss der Matrix auf die Dekonjugation schließen. Es stellt sich z.B. die Frage, ob die beiden Teige unterschiedlich gut in den simulierten Verdauungssäften verteilt bzw. suspendiert wurden und es deshalb zu einer abweichenden Verdauung und Dekonjugation gekommen ist oder ob Substanzen, die z.B. von den Schimmel- bzw. Rotschmierekulturen des Käses gebildet wurden, einen Einfluss auf die Dekonjugation gehabt haben. Dies könnte auch der Grund für die schlechtere Dekonjugationseffizienz der Rinden im Vergleich zu den Teigen gewesen sein. Die Rinden untereinander haben keinen so deutlichen Unterschied in der Dekonjugationseffizienz ergeben wie die beiden Teige und sie folgten außerdem einem entgegengesetzten Trend. Denn beim Teig des Geramont cremig-leicht war die Dekonjugationseffizienz höher als beim Saint Albray cremig-leicht und bei den Rinden war es andersherum. Es wäre auch hier ein unterschiedliches Lösungsverhalten der Rinden bzw. Suspendieren in der Verdauung denkbar. Doch in diesem Fall könnte es konträr zum Einfluss bestimmter Substanzen auf die Aktivität der Dekonjugasen verlaufen sein, so dass Letzteres nicht zur Geltung gekommen ist und deshalb kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Rinden zu erkennen war. Weitere Einflussfaktoren könnten Unterschiede in der Verdauung anderer Matrixkomponenten sein, wodurch möglicherweise Substanzen freigesetzt wurden, welche die Aktivität der Bürstensaummembrandekonjugase dann mehr oder weniger stark beeinflusst haben.

Je nach Anteil an Teig und Rinde und den entsprechenden Folatgehalten kann es somit zu Unterschieden in der Dekonjugation der jeweiligen Camemberts kommen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass es sich auch bei den beiden untersuchten cremig-leicht Camemberts um Unterschiede in der Dekonjugationseffizienz bezogen auf den gesamten Camembert handelt, die dann zusammen mit dem unterschiedlichen Gehalt und Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat der einzelnen Kompartimente der Camemberts zu einem Unterschied in der Biozugänglichkeit geführt haben.

Unterschiede in der Dekonjugation und in der Gesamtwiederfindung können für die verschiedenen Lebensmittel also teilweise Unterschiede in der Biozugänglichkeit ergeben, sich aber auch wieder aufheben. Es stellt sich nun die Frage, wie sich die Verdauung von

Lebensmitteln und den enthaltenen Folaten auf die *in vivo*-Bioverfügbarkeit beim Menschen auswirkt.

Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, verfolgen die Werte zur Gesamtwiederfindung der Verdauungssimulation einen abweichenden Trend von den Werten der relativen Bioverfügbarkeit aus der Humanstudie von MÖNCH [19] und reichen damit nicht aus, um diese zu beschreiben bzw. die Einflüsse vollständig zu erklären. Unter Berücksichtigung der Dekonjugation und in Verbindung mit dem Ergebnis zur relativen Bioverfügbarkeit des Camembert der Human-Vorstudie, der eine deutlich bessere Vergleichbarkeit mit dem Camembert der Simulation aufwies, wird der Trend der relativen Bioverfügbarkeiten deutlich besser beschrieben. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Dekonjugation auch bei der Bioverfügbarkeit der Folate eine Rolle spielen könnte. Eine umfangreichere Diskussion zu diesem Punkt erfolgt im folgenden Abschnitt.

### 4.3 Korrelation der Verdauungssimulation mit einer Humanstudie

Die Verdauungssimulation wurde mit der Intention durchgeführt, dass die Werte aus der vorangegangenen Humanstudie von MÖNCH [19]<sup>1</sup> mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse besser erklärt bzw. nachvollzogen oder sogar korreliert werden können.

Die Werte der Bioverfügbarkeit und der Biozugänglichkeit können nicht direkt miteinander verglichen werden, da die für die verwendete Menge an Lebensmitteln notwendige Menge an Darmmukosa nicht genau abgeschätzt werden konnte. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass für die Simulation Darmmukosa von Schweinen verwendet wurde, deren Bürstensaummembrandekonjugase eine schlechtere Aktivität als die humane aufweist [85]. Die Ergebnisse der Simulation sind damit als Trend zu sehen. Weiterhin ist der absolute Verlust an H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat bei der Humanstudie nicht bekannt. Mit den Ergebnissen der Verdauungssimulation kann aber ein Vergleich der Stabilität der Folate und der Dekonjugation untereinander stattfinden und damit mögliche Rückschlüsse auf die Ergebnisse bzw. Trends der Humanstudie gezogen werden. Doch auch bei den Ergebnissen der Bioverfügbarkeit handelt es sich nur um relative Werte, da die AUC, die sich nach der Aufnahme eines Lebensmittels ergeben hat, auf die AUC bezogen wurde, die sich aus der Aufnahme einer PteGlu-Lösung ergab. PteGlu steht jedoch in Verdacht, auf Grund der notwendigen Reduktion zum H<sub>2</sub>folat bzw. H<sub>4</sub>folat [69], die möglicherweise erst in der Leber stattfindet, eine langsamere Metabolisierung zum 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aufzuweisen, als ein schon vollständig reduziertes Folat, wie 5-HCO-H<sub>4</sub>folat. Es wird angenommen, dass PteGlu sogar in der Leber stärker zurückgehalten wird (first-pass effect), so dass teilweise eine kleinere AUC ermittelt wird [207–209]. Bei ÖHRVIK et al. [207] wurde nämlich trotz einer weitestgehend vollständigen Aufnahme aus dem Darm eine AUC ermittelt, die

<sup>1</sup>Auf Grund der schlüssigen Argumentation in [19] wurde diese Auswertung, bzw. die entsprechenden Werte für die relative Bioverfügbarkeit, der zweiten Auswertung [138] vorgezogen. Ein möglicher Nachteil der zweiten Auswertung [138], ist der schon in Abschnitt 2.4.1 erwähnte Umstand, dass das Plasmalevel bei einigen Probanden unterhalb des definierten körpereigenen Grundlevels (bei 0 h, bzw. Blutabnahme direkt vor der Folataufnahme) sank und die entsprechenden Flächen dadurch nicht mitberücksichtigt wurden. In [19] wurde für das körpereigene Grundlevel deshalb der jeweils niedrigste Wert der Plasmakurve gewählt. Die beiden Auswertungen ergeben dadurch abweichende Werte für die relative Bioverfügbarkeit, aber der Trend der Lebensmittel untereinander ist der gleiche, so dass die folgenden Resultate auch auf die Auswertung in [138] anzuwenden sind bzw. dafür gelten.



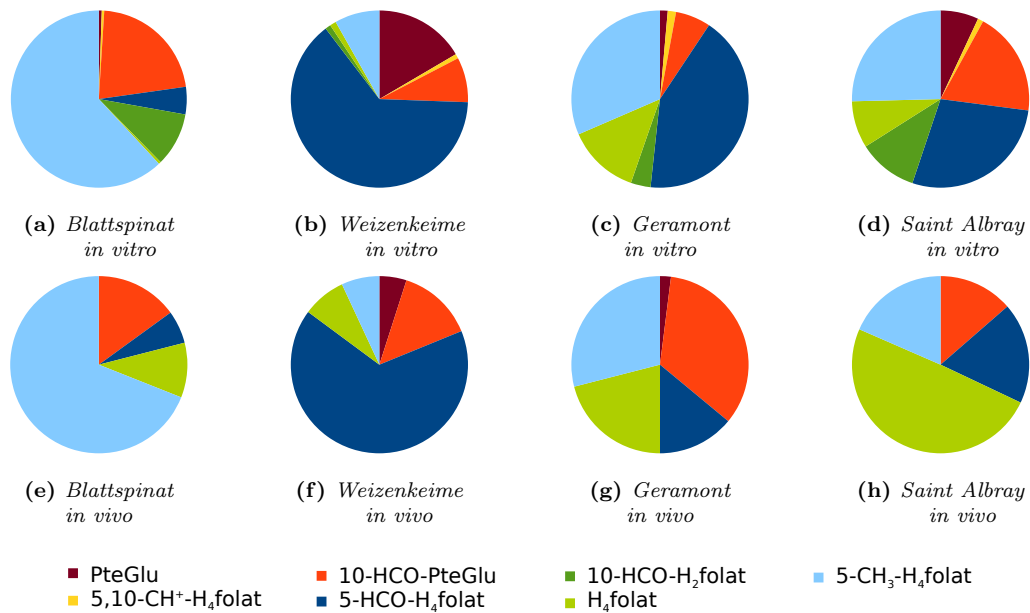
nur 50 % der AUC von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aufwies und damit eigentlich auf eine verringerte Bioverfügbarkeit hätte schließen lassen. Es könnte dadurch zu einem Überschätzen der Bioverfügbarkeit eines Lebensmittels kommen, wenn diese als relative Bioverfügbarkeit bezogen auf PteGlu angegeben wird.

Wie schon erwähnt wurde, ist in Abbildung 4.7 erkennbar, dass alleine anhand der Gesamtwiederfindung die Bioverfügbarkeitsdaten nicht erklärt werden können. Die Weizenkeime und der Camembert zeigten dabei größere Gesamtwiederfindungen auf als der Spinat, der in der Humanstudie mit 90 % die höchste relative Bioverfügbarkeit aufgezeigt hat. Beim Camembert, der für die Verdauungssimulation verwendet wurde (Geramont cremig-leicht), handelt es sich jedoch nicht um die gleiche Marke, wie *in vivo* verwendet wurde (Saint Albray cremig-leicht), aber dafür um den Camembert der Vorstudie. Dieser zeigt auch eine bessere Übereinstimmung in der Folatezusammensetzung und eignet sich deshalb besser für die Entwicklung eines Modells, als der Camembert der Humanstudie. Die Vorstudie wurde jedoch mit nur 2 Probanden durchgeführt. Da die unterschiedlichen Ergebnisse der zwei Camembertmarken aus Vor- und Hauptstudie Fragen aufwerfen, sollten auch diese näher betrachtet werden.

Unter Verwendung des Geramont cremig-leicht und unter Einbeziehung der Dekonjugation in die Betrachtungen zum Vergleich zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten wird ersichtlich, dass sich eine bessere Korrelation ergibt als mit dem Saint Albray cremig-leicht bzw. verglichen mit der alleinigen Betrachtung der Gesamtwiederfindung. Der Spinat zeigt jeweils den höchsten Wert und die Weizenkeime den geringsten. Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass die Dekonjugation einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit haben könnte.

In der Literatur wird die Bioverfügbarkeit von Polyglutamaten im Vergleich zu Monoglutamaten und damit der Einfluss der Dekonjugation auf die Bioverfügbarkeit kontrovers diskutiert [16, 17, 22]. Es gibt sowohl Publikationen, die keinen signifikanten Unterschied zwischen Mono- und Polyglutamaten ermittelt haben, trotz verschiedener Ansätze zu Bestimmung der Bioverfügbarkeit, und wiederum andere, die einen signifikanten Unterschied feststellen konnten. BROUWER et al. [17] gehen auf Grund von einer größeren Anzahl an Publikationen, die den Unterschied in der Bioverfügbarkeit befürworten, davon aus, dass Polyglutamate eine schlechtere Bioverfügbarkeit als Monoglutamate aufweisen. Hierbei ist aber zu beachten, dass dies auch auf eine längere Aufnahmedauer zurückzuführen sein kann und sich somit doch kein Unterschied ergibt. MCNULTY und PENTIEVA [16] gehen nicht davon aus, dass Polyglutamate an sich schlechter bioverfügbar sind als Monoglutamate, u.a. da die Aktivität der Bürstensaummembran eigentlich den Bedarf für die Dekonjugation übersteigt und damit nicht die Aufnahme limitieren sollte [220]. Dies wird von mehreren Publikationen, die eine hohe Bioverfügbarkeit für die Polyglutamate ermittelt haben, unterstützt [22]. Es werden aber Unterschiede in der Durchführung für die Unterschiede in den Ergebnissen verantwortlich gemacht, wobei nicht die Menge an Polyglutamaten, sondern u.a. die An- und Abwesenheit bzw. Konzentration an Ascorbinsäure eine Rolle spielen könnte [22]. Ascorbinsäure gehört laut WEI et al. [13, 232] nämlich zu den Substanzen, die die Aktivität der Bürstensaummembrandekongase beeinflussen können. Es wird aber auch angenommen, dass es sich nicht immer um einzelne Substanzen handelt, sondern eher um ein Zusammenspiel aus mehreren. Außerdem soll es Konzentrationsabhängigkeiten geben [232].

MCNULTY und PENTIEVA [16] erwarten selbst für Polyglutamate und Monoglutamate aus der Nahrung keinen Unterschied in der Bioverfügbarkeit. Wenn hierbei aber in Betracht



**Abbildung 4.10:** Folatverteilung in den Lebensmitteln: a-d) für die Verdauungssimulation (*in vitro*) und e-h) für die Humanstudie (*in vivo*). Bei den Camembertvarianten handelt es sich jeweils um die cremig-leicht Sorten.

gezogen wird, dass sowohl die Konzentration der Inhibitoren und zusätzlich synergistische Effekte durch verschiedene Substanzen eine Rolle bei der Aktivität der Dekonjugase spielen, wäre es möglich, dass die Ergebnisse der *in vivo*-Studie von MÖNCH [19] und der vorliegenden Verdauungssimulation aber auf eine unterschiedliche Dekonjugation auf Grund der Matrix zurückzuführen sind. Die Antwort auf die Frage, ob bzw. in welchem Ausmaß die Lebensmittelmatrix einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Folate hat, dürfte u.a. davon abhängen, wie viel des entsprechenden Lebensmittels aufgenommen wurde.

Durch das Einbeziehen der Dekonjugation in die Betrachtungen zum Vergleich der *in vivo*- und *in vitro*-Daten lässt sich der Unterschied zwischen Spinat und Weizenkeimen nun etwas besser erklären. Denn auf Grund der geringeren Stabilität für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und vor allem für H<sub>4</sub>folat wäre die geringere relative Bioverfügbarkeit der Weizenkeime (71 % statt 90 %) allein nicht zu erklären gewesen. Die Weizenkeime in der Humanstudie hatten einen Anteil von 8 % H<sub>4</sub>folat und 7 % 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, wohingegen der Spinat 10 % H<sub>4</sub>folat aufwies und 69 % 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat (Abbildung 4.10, Tabelle B.1). Der prozentuale Verlust an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat in der Verdauungssimulation war bei Weizenkeimen zwar deutlich größer, doch auch bei einem vollständigen Verlust an H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat lässt sich der Unterschied von 21 % zwischen der relativen Bioverfügbarkeit der beiden Lebensmittel nicht gänzlich erklären. Wie anfangs schon erwähnt, ist ein direkter Vergleich zwischen den Werten aus der Humanstudie zur Bioverfügbarkeit und den Ergebnissen der Verdauungssimulation nicht möglich, weshalb die Lebensmittel untereinander verglichen werden, und damit die jeweiligen Trends.

In der Verdauungssimulation ist die Biozugänglichkeit der Weizenkeime nur halb so groß verglichen mit dem Spinat, wohingegen die Human-Bioverfügbarkeitsdaten nur den schon erwähnten Unterschied von 21 % aufweisen. Diese Abweichung lässt sich möglicherweise auf die zu geringe Dekonjugationseffizienz in der Verdauungssimulation zurückführen,

denn auch der Spinat konnte nicht vollständig dekonjugiert werden, obwohl in einer Publikation von KONINGS et al. [100] kein Unterschied in der Bioverfügbarkeit zwischen einem zuvor vollständig dekonjugierten Spinat und einem Spinat mit 60 % Polyglutamaten ermittelt werden konnte. Es wäre damit möglich, dass bei Annahme einer vollständigen Dekonjugation für Spinat und gleichzeitig einer besseren aber dennoch nicht vollständigen Dekonjugation für Weizenkeime, die Ergebnisse der Humanstudie gut erklärt werden können.

Neben der Dekonjugation könnte es aber noch einen weiteren Grund für die Abweichung in der Bioverfügbarkeit von Weizenkeimen und Spinat geben. In der Literatur wird teilweise von unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten der einzelnen Folate berichtet [18,89,139,206]. Für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat wurde immer ein kleinerer Wert im Vergleich zu 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat ermittelt, wobei aber die Schwankungen oft relativ groß sind, so dass es sich nicht unbedingt um signifikante Unterschiede handeln muss. Unterschiede bei PteGlu werden, wie schon erwähnt, teilweise auf die abweichende Metabolisierung verglichen mit den Tetrahydrofolaten zurückgeführt. Wodurch teilweise kleinere Werte für die relative Bioverfügbarkeit ermittelt werden, obwohl PteGlu so gut wie vollständig absorbiert wurde [207]. Die Bioverfügbarkeit von PteGlu kann damit unterschätzt bzw. die Bioverfügbarkeit z.B. von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat überschätzt werden, wenn PteGlu als Vergleichssubstanz herangezogen wird.

Es handelt sich jedoch nicht nur bei PteGlu um ein oxidiertes Folat, sondern auch bei 10-HCO-PteGlu und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. Diese Folate könnten ebenfalls die von den Tetrahydrofolaten abweichende Metabolisierung aufweisen und damit den Effekt der unterschätzten Bioverfügbarkeit. 10-HCO-H<sub>2</sub>folat ist während der Verdauungssimulation zu einem Großteil aus 5-HCO-H<sub>4</sub>folat entstanden, welches mit 67 % das Hauptfolat der Weizenkeime ist. Damit könnte sich die geringere Bioverfügbarkeit von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat verglichen mit 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aus den oben genannten Publikationen erklären lassen und auch die geringere Bioverfügbarkeit aus den Weizenkeimen in der Humanstudie von MÖNCH bzw. das späte Maximum ( $t_{max} = 7,2$  h) der Plasmakurve nach der Gabe der Weizenkeime, die zusätzlich zum 5-HCO-H<sub>4</sub>folat einen größeren Anteil an PteGlu aufweisen. Ob dieser Effekt für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat bzw. 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wirklich eintritt, welches Ausmaß er einnehmen würde und wie sich dies im Verhältnis zum Einfluss der Dekonjugation verhält, müsste intensiver untersucht werden. Außerdem ist zu beachten, dass die Umwandlung von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat im Magen in Anwesenheit von Lebensmitteln in einem geringeren Ausmaß stattfinden kann, da es auf Grund der puffernden Wirkung der Lebensmittel länger dauert, bis ein saurer pH-Wert im Bereich von 2 erreicht wird. Die Geschwindigkeit der Umlagerung von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat ist jedoch pH-abhängig bzw. verläuft bei pH-Werten oberhalb von pH 2 nur unvollständig [34].

Für Spinat und den Camembert Geramont cremig-leicht (Vorstudie) konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine großen Unterschiede in der relativen Bioverfügbarkeit (90 und 87 %) bzw. in der Biozugänglichkeit (50 und 47 %) festgestellt werden. Für den Camembert Saint Albray cremig-leicht der Hauptstudie wurde nur 1/3 der relativen Bioverfügbarkeit verglichen zum Spinat ermittelt. In der Verdauungssimulation ist der Unterschied zwischen den Biozugänglichkeiten deutlich geringer (36 % verglichen mit 44 %, entspricht 3/4). Hierbei ist zu beachten, dass es sich zwar diesmal um den Spinat der Humanstudie handelte und die gleiche Darmcharge verwendet wurde, damit eine bessere Vergleichbarkeit gegeben ist, aber die Zusammensetzung des für die Verdauungssimulation verwendeten Camemberts Saint Albray cremig-leicht stark von der Zusammensetzung des in der Humanstudie verwendeten Camemberts abweicht (9 und 25 % für H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat

verglichen mit 51 und 16 %). Ausgehend von der gleichen Verlustrate für die beiden Folate würde sich damit eine Gesamtwiederfindung von 42 % und unter Berücksichtigung einer vergleichbaren Dekonjugation eine Biozugänglichkeit von 18 % ergeben, die wiederum  $\sim 41$  % der Biozugänglichkeit des Spinates entspricht. Dieser Wert ist natürlich nur als Schätzung zu sehen, denn auch die Zusammensetzung im Spinat hat sich mit der Zeit etwas verändert (Verlust an  $H_4$ folat). Gleichzeitig hat dafür wahrscheinlich der Gehalt an Ascorbinsäure abgenommen und damit ein stabilisierender Faktor für das 5- $CH_3$ - $H_4$ folat.

Aus den Ergebnissen der Verdauungssimulation wurde aber auch ersichtlich, dass der Verlust an 5- $CH_3$ - $H_4$ folat matrixabhängig ist. Die Biozugänglichkeit des Saint Albray cremig-leicht in der Hauptstudie hätte demnach noch geringer sein können als in der Verdauungssimulation. Hinzu kommt, dass es Unterschiede in der Dekonjugationseffizienz von Teig und Rinde gibt, wobei dieser Unterschied auch nicht immer gleich stark ausgeprägt ist. Es handelte sich bei der Betrachtung zwar um unterschiedliche Camembertmarken, doch wurden Variationen zwischen den einzelnen Chargen eines Camemberts nicht untersucht. Die zwei Camemberts der gleichen Marke lassen bzgl. der gesamten Dekonjugationseffizienz zwar erst einmal nicht vermuten, dass Unterschiede zu erwarten sind, doch wurden diese beiden gleichzeitig gekauft. Sie könnten sich demnach u.a. im Alter ähneln. Bei dem Saint Albray cremig-leicht der Verdauungssimulation und dem der Human-Hauptstudie handelt es sich höchstwahrscheinlich um verschiedene Chargen. Sie können sich demnach im Alter unterscheiden und damit auch in der Zusammensetzung der Substanzen in Teig und Rinde, die z.B. von den Pilz- bzw. Rotschmierekulturen gebildet wurden und eventuell einen Einfluss auf die Dekonjugation haben. Eine schlechtere Dekonjugationseffizienz für die Rinde im Saint Albray cremig-leicht würde vor allem auf Grund des großen Anteils der Rinde und dem ebenfalls großen Anteil am Folatgehalt, deutlich zu einer Verminderung der Biozugänglichkeit und damit auch der Bioverfügbarkeit beitragen.

Der Unterschied in der relativen Bioverfügbarkeit, der in der Humanstudie zwischen dem Spinat und dem Camembert Saint Albray cremig-leicht ermittelt wurde, könnte demnach aus einem Zusammenspiel aus der Stabilität der Folate und der Dekonjugation erklärt werden. Es wäre jedoch sehr interessant zu untersuchen, inwiefern  $H_4$ folat wirklich vollständig verloren geht, denn wie in Abschnitt 4.1.6 erwähnt, wurde die Bioverfügbarkeit von  $H_4$ folat als Einzelsubstanz schon früher untersucht und ließ nicht auf einen vollständigen Verlust schließen. Die vorliegenden Ergebnisse und auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [148] weisen hingegen darauf hin. Für den Camembert Saint Albray cremig-leicht scheint der Unterschied in der relativen Bioverfügbarkeit zu einem großen Anteil auf den Verlust des  $H_4$ folats zurückzuführen sein. Doch es stellt sich die Frage, ob die Bioverfügbarkeit der Folate dieses Camemberts im Vergleich zum Spinat auf Grund der unterschiedlichen Kinetik der Folate ein wenig unterschätzt wurde, so wie es auch schon bei den Weizenkeimen angesprochen wurde. Der Anteil an 10-HCO-PteGlu ist zwar vergleichbar mit dem in Spinat, aber der Anteil an 5-HCO- $H_4$ folat unterscheidet sich (6 % im Spinat und 19 % im Camembert). Diese Unterschiede sind jedoch deutlich geringer als zwischen dem Spinat und den Weizenkeimen und haben, wenn überhaupt, wohl einen geringeren Einfluss.

Bei einem direkten Vergleich der beiden Camembert cremig-leicht-Sorten haben diese in *in vitro*-Verdau keinen so deutlichen Unterschied ergeben, wie *in vivo*. Die Zusammensetzung der Folate hat sich in der Simulation jedoch auch deutlich weniger unterschieden als in der Humanstudie. Vor allem der  $H_4$ folat-Gehalt hat, wie aus den anderen Ergebnissen zu sehen ist, einen großen Einfluss. Der Geramont cremig-leicht der Humanstudie wies

einen Anteil an H<sub>4</sub>folat von 21 % auf und der Saint Albray cremig-leicht einen Anteil von 51 %, wohingegen die Camemberts der Verdauungssimulation mit 10 und 9 % vergleichbar sind. Ausgehend von der Zusammensetzung, wie sie in der Humanstudie vorgelegen haben, würde sich für die Biozugänglichkeit allein schon ein Unterschied von 30 % ergeben. Hinzu kommt, dass sich die Dekonjugation zwar nicht sehr deutlich unterscheidet, aber auf Grund der unterschiedlichen Dekonjugationseffizienzen von Teig und Rinde auch hier von einem Unterschied auszugehen ist, der wie schon erwähnt, vielleicht auch chargenabhängig sein kann und damit auch ein noch größerer Unterschied zwischen den beiden Camembertsorten möglich ist.

Bei Betrachtung dieser beiden Lebensmittel bzgl. ihrem 10-HCO-PteGlu und 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Gehalt fällt auf, dass der postulierte Einfluss von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-PteGlu wohl einen geringeren Einfluss haben muss, wenn er überhaupt auftritt. Beim Camembert Geramont cremig-leicht würde sich die relative Bioverfügbarkeit stärker verringern, als beim Saint Albray cremig-leicht, da der Gehalt an 10-HCO-PteGlu im Geramont cremig-leicht deutlich höher liegt (34 verglichen mit 14 %), bei einem ähnlichen 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Gehalt (14 % im Vergleich zu 19 %), und die Werte für die relative Bioverfügbarkeit würden näher zusammenrutschen anstatt den ermittelten großen Unterschied aufzuzeigen. Es muss aber auch beachtet werden, dass der absolute Gehalt für den Geramont cremig-leicht niedriger war (Gesamtfolat: 99 µg/100 g statt 286 µg/100 g). Für eine präzise Aussage müssten die Bioverfügbarkeiten der einzelnen Folate nochmals gründlicher untersucht werden und auch eventuelle Konzentrationsabhängigkeiten. Für den Camembert ist es derzeit wahrscheinlicher, dass die Stabilität und die Dekonjugation zu den Unterschieden in der Bioverfügbarkeit beitragen und damit vermutlich auch bei den Weizenkeimen.

Bis jetzt wurde hauptsächlich die Dekonjugation der Polyglutamate und die Stabilität von H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat betrachtet. Neben diesen möglichen Einflussfaktoren könnte es aber noch andere geben. Es wird u.a. angenommen, dass die Folate von der Matrix gebunden bzw. eingeschlossen werden können (Reviews von [17, 133]) oder mit ihr interagieren [16] und damit zu einer verringerten Bioverfügbarkeit führen. Es könnte aber auch sein, dass es zur Beeinflussung der Carrier vermittelten Absorption der Folate im Dünndarm durch Inhaltsstoffe aus der Matrix kommen kann [151].

Ein Einschluss in die Matrix kann anhand des *in vitro*-Modells nicht ausgeschlossen werden, da die Verdauungslösungen zur Inaktivierung der Verdauungsenzyme gekocht wurden, wodurch eventuell gebundene Folate wieder frei geworden sein könnten. Die Reaktion der Folate mit Bestandteilen der Matrix wurde ebenfalls nicht näher untersucht, aber die hohe Gesamtwiederfindung für die untersuchten Lebensmittel bzw. die Verluste, die nur bei H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat aufgetreten sind und nicht bei den anderen Folaten, die sich dafür teilweise umlagern, sind eher auf die Stabilität zurückzuführen und lassen für die untersuchten Lebensmittel nicht darauf schließen, dass es zu Interaktionen mit der Matrix gekommen ist. Ein wichtiger Aspekt, der in Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit steht, ist die Absorption der Folate im Jejunum. Mögliche ernährungsbedingte Einflussfaktoren, die sich auf diesen Carrier vermittelten Prozess ergeben, wurden laut GREGORY et al. [22] noch nicht sehr intensiv untersucht. In Abwesenheit von Lebensmitteln soll die Absorption jedoch effizient und vergleichbar zwischen den einzelnen Vitameren sein.

Diese weiteren Einflussfaktoren können sich also ebenfalls auf die Bioverfügbarkeit auswirken, aber nicht mit dem *in vitro*-Modell nachgestellt werden. Hinzukommt, dass auch die Quantifizierung der Folate in die Betrachtungen einzubeziehen ist. Bei einer unvollständigen Dekonjugation während der Analytik kann es zu Minderbefunden kommen, die

in der Humanstudie zum Unterschätzen der aufgenommenen Folatmenge und damit zum Überschätzen der Bioverfügbarkeit geführt haben könnten. Im *in vitro*-Verdau wäre es zum Unterschätzen des ursprünglichen Gehaltes und zum Überschätzen der Dekonjugationseffizienz gekommen, wodurch sich dann eine überschätzte Biozugänglichkeit ergeben hätte. Weiterhin wurde das 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und das 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat nicht in den Lebensmitteln der Humanstudie untersucht oder gefunden, obwohl 10-HCO-H<sub>2</sub>folat z.B. im Blattspinat aus der Humanstudie nachträglich detektiert wurde. Die Quantifizierung dieser zwei Folate zeigt jedoch auf Grund des fehlenden isotoopenmarkierten Standards größere Fehlermöglichkeiten bzw. Variationen auf. Durch Umlagerungen während der Analyse können diese zwei Folate auch in Form von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-PteGlu wiedergefunden werden, weshalb sie in den Analysen für die Humanstudie vielleicht nicht detektiert werden konnten bzw. nur in Form von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-PteGlu. Am Beispiel von Spinat wäre dann aber ein größerer Gehalt an 10-HCO-PteGlu zu erwarten gewesen.

Wie diese Diskussion erkennen lässt, gibt es mehrere Faktoren, die bei der Korrelation der *in vivo*- und *in vitro*-Daten zu berücksichtigen sind. Dennoch ist es möglich, einen Großteil der Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Folate verschiedener Lebensmittel nachzustellen und hauptsächlich auf die Stabilität von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat und H<sub>4</sub>folat und die matrixabhängige Dekonjugation der Polyglutamate zu den Monoglutamaten zurückzuführen. Denn für den Spinat, die Weizenkeime und den Geramont cremig-leicht lässt sich durch Einbeziehen der Stabilität und der Dekonjugation eine sehr gute Korrelation erzielen. Die Ergebnisse des Saint Albay cremig-leicht lassen sich im Vergleich zum Spinat mit Hilfe dieses Modells größtenteils gut erklären.

#### 4.4 Abschließende Diskussion

Ein Modell zur Simulation der Verdauung nach DIN 19738 [191] wurde auf die Verdauung von Folaten angepasst. Da Folate schon im Jejunum absorbiert werden, wurde die Dauer der Darmstufe verkürzt und der pH-Wert gesenkt. Die Untersuchung der Einzelstandards hat gezeigt, dass es vor allem beim 5-HCO-H<sub>4</sub>folat zu Umwandlungen während der Passage des Magen-Darm-Trakts kommen kann. Das Ausmaß der Umwandlung könnte in Anwesenheit von Lebensmitteln geringer sein, da diese eine größere Pufferwirkung aufweisen. Damit dauert es länger, einen saureren pH-Wertes zu erreichen. Dadurch entsteht weniger 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, welches anschließend vermutlich über 10-HCO-H<sub>4</sub>folat zum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat oxidieren kann. Sowohl für 5-HCO-H<sub>4</sub>folat als auch für PteGlu und 10-HCO-PteGlu konnte aber kein direkter Verlust ermittelt werden. Ganz im Gegenteil zu H<sub>4</sub>folat, das während der Simulation vollständig abgebaut wurde. Selbst ein Zusatz an Ascorbinsäure konnte dies nicht verhindern. Anders verhielt es sich bei 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat. Dieses Folat ließ sich durch die Ascorbinsäure besser stabilisieren, so dass ein deutlich geringerer Verlust zu verzeichnen war.

Die Verdauungssimulation von Lebensmitteln und die Korrelation der gewonnenen Ergebnisse mit der Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Folaten von MÖNCH [19] hat gezeigt, dass neben der Stabilität der einzelner Folate auch die Dekonjugation der Polyglutamate einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Lebensmittelfolate haben muss, da erst unter Einbeziehen beider Aspekte eine gute Korrelation zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Daten erreicht werden konnte. Die Ergebnisse aus dem Lebensmittelverdau bestätigen, dass die für die Dekonjugation der Polyglutamate notwendige Bürstensaummem-

brandekongugase von Substanzen aus den Lebensmitteln inhibiert wird [13–15], weshalb die Zugabe dieser Dekongugase (in Form von Darmmukosa) in Modelle zur Verdauung von Lebensmitteln in Hinblick auf Folate aufgenommen werden sollte.

Mit einem Computer gesteuerten *in vitro*-Modell aus den Niederlanden - das TIM (TNO-gastrointestinal-Model) [154], konnte zwar zusätzlich der Einfluss des FBPs untersucht werden [142, 155] und z.B. die Peristaltik der Magen- und Darmwände besser simuliert werden, aber die Dekongugation konnte mit diesem Modell nicht nachgestellt werden. Die Biozugänglichkeit von Folaten wurde von VERWEI et al. [21] mit Hilfe dieses Modells am Beispiel mehrerer Lebensmittel untersucht. Die Werte lagen alle oberhalb von 78 %, abgesehen von einem Versuch mit Zusatz an FBP, dessen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit jedoch in der selben Dissertation von VERWEI für die Bioverfügbarkeit von PteGlu aus Milch widerlegt wurde [21, 143]. Die Ergebnisse aus diesem Verdaumodell spiegeln damit wahrscheinlich eher die Stabilität der Folate wieder.

Für einige Lebensmittel scheint die Dekongugation jedoch einen entscheidenden Einfluss zu haben. Dies wird von einer Publikation von SEYOUM und SELHUB unterstützt [15]. Diese Arbeitsgruppe hat sowohl den Einfluss des Magens auf die Stabilität der Folate, als auch die Unterschiede in der Dekongugation verschiedener Lebensmittel untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Daten zur Bioverfügbarkeit aus anderen Publikationen korreliert. Der Nachteil dieses Modells ist, dass die Stabilität nur für die Magen-, nicht aber für die Darmstufe untersucht wurde. Außerdem erfolgte die Inkubation der Bürstensaummembrandekongugase nach einem Kochschritt unter folatstabilisierenden Bedingungen und zusätzlich unter Zugabe von Zinkionen, die für die Funktion der Dekongugase benötigt werden. In der Magenstufe wurde keine Ascorbinsäure zugegeben, so dass die Stabilität der Folate für die Verweildauer im Magen vermutlich teilweise unterschätzt wurde.

Die Dekongugation wurde von SEYOUM und SELHUB [15] mit einer aufgereinigten Bürstensaummembrandekongugase durchgeführt, wobei es wahrscheinlich ist, dass zu wenig des Enzyms eingesetzt wurde und die Dekongugationsraten für die meisten Lebensmittel deshalb deutlich niedriger ausgefallen sind als in der vorliegenden Arbeit. Dennoch konnten auch in genannter Publikation deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lebensmitteln ermittelt werden. Dies unterstützt, dass die Dekongugation einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Lebensmittelfolate hat. Bei dem Modell von SEYOUM und SELHUB [15] ist jedoch zu beachten, dass die Menge des verwendeten Lebensmittels an den Folatgehalt angepasst wurde, im Gegensatz zu den Simulationen am TIM [142, 147, 155] und der vorliegenden Simulation. Wenn die Humanstudie auf den gleichen Folatgehalt normiert würde, könnte dies zu einer besseren Korrelation führen. Es ist aber zu beachten, dass die relative Bioverfügbarkeit eine Abhängigkeit von der Menge des verwendeten Lebensmittels aufweisen soll [133]. Dies könnte auch in der Korrelation zwischen der Humanstudie von MÖNCH und der vorliegenden Simulation einen Einfluss gehabt haben, denn in der Humanstudie gab es keine durchgängige Normierung auf den Gesamfolatgehalt und auch nicht auf die Menge der Testmahlzeit. Dadurch könnte z.B. die relative Bioverfügbarkeit der Weizenkeime verglichen mit dem Spinat überschätzt worden sein, da bei der Weizenkeimtestreihe zum einen ein geringerer Gesamfolatgehalt und zum anderen eine geringere Größe der Testmahlzeit verwendet wurde. Beim letzten Argument ist aber auch zu beachten, dass der Spinat einen deutliche größeren Wasseranteil aufweist und sich die Menge bzgl. der Trockenmasse der Testmahlzeit dadurch wieder angleicht.

Um eine bessere Korrelation zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Daten zu erzielen, müssten genau die selben Lebensmittel untersucht werden, damit ein Unterschied in der Zusam-

mensetzung der Folate und in der Matrix ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wäre es von Vorteil eine größere Menge an Lebensmitteln zu untersuchen und für die Verdauungssimulation eine standardisierte Bürstensaummembrandekongase zu verwenden. Weiterhin könnte die Untersuchung des Einflusses von folatbindender Matrix mit in die Betrachtungen der Verdauungssimulation mit einbezogen werden sowie die Absorption der Folate (z.B. in Form von Caco-2-Zellen, wie es von OHRVIK et al. schon angewendet wurde [148]). Außerdem wäre die Untersuchung der Bioverfügbarkeit der einzelnen Folate, auch von 10-HCO-PteGlu und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, und der Polyglutamate, vor allem in Anwesenheit von Matrix sinnvoll. Alle Aspekte zusammen könnten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Vorgänge bei der Verdauung von Folaten beitragen und wären im Hinblick auf ein Vorhersagemodell zur Bioverfügbarkeit von Lebensmittelfolaten sehr wertvoll.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem die Ergebnisse der Bestimmungen des Gesamtfolatgehaltes mittels LC-MS/MS und mikrobiologischem Assay gegenübergestellt. Mehrere Lebensmittel wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der zwei Methoden auf, obwohl 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat bei der LC-MS/MS-Methode zusätzlich berücksichtigt wurden, um ein vollständiges Folatspektrum und damit einen verlässlicheren Gesamtfolatgehalt zu ermitteln. Bei 4 Lebensmitteln ergab sich über die LC-MS/MS-Methode ein geringeres Ergebnis als über das mikrobiologische Assay (um 15 - 81 %). Für 2 Lebensmittel konnte hingegen ein deutlich höherer Gesamtfolatgehalt mittels LC-MS/MS (um 21 - 26 %) ermittelt werden. Dies ist vermutlich auf die Wahl des Kalibranten für das mikrobiologische Assay zurückzuführen. Denn es zeigte sich, dass die Ergebnisse des mikrobiologischen Assays in Abhängigkeit vom Kalibranten deutliche Unterschiede aufweisen. So ergab sich z.B. bei einem der letztgenannten Lebensmittel nach der Auswertung über 5-HCO-H<sub>4</sub>folat als Kalibranten das genaue Gegenteil zum Ergebnis nach Auswertung über PteGlu. Der über das mikrobiologische Assay bestimmte Gesamtfolatgehalt lag nun wieder höher als der Folatgehalt über LC-MS/MS. Deshalb wurde bevorzugt das Folat mit dem größten Anteil am Vitamerenspektrum für die Kalibration verwendet. Doch bei einigen Lebensmitteln ist der Anteil weiterer Folate sehr groß und kann somit zu Unter- oder Überbefunden führen. Bei einigen Proben würde sich deshalb vielleicht ein Mix aus mehreren Vitameren zur Kalibration anbieten, um eine verlässliche Quantifizierung über das mikrobiologische Assay zu erzielen. Des Weiteren kann auch eine unvollständige Dekonjugation beim mikrobiologischen Assay zu Minderbefunden führen und damit zu den Unterschieden zwischen den beiden Methoden beitragen. Verschiedene, im Folgenden aufgeführte Ansätze, wurden verfolgt, um die Unterschiede zwischen LC-MS/MS und mikrobiologischem Assay zu erklären bzw. zu minimieren.

Die neu in die LC-MS/MS-Methode aufgenommenen Folate 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat gingen während der Aufarbeitung auf Grund von Umwandlungen und Oxidation zu einem Großteil in 5-HCO-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-PteGlu über. Da diese ebenfalls mit quantifiziert wurden und der verbleibende Anteil an 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat nur bei 0,04 - 1 % und an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat bei 0,1 - 8 % lag, konnten diese beiden Folate keinen nennenswerten Beitrag zur Aufklärung der häufig kleineren Gesamtfolatgehalte über LC-MS/MS im Vergleich zum mikrobiologischen Assay leisten. Diese Umwandlungen waren auch der Grund, warum 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat jeweils nur über einen strukturverwandten [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten internen Standard quantifiziert wurden und nicht mittels SIVA. Es wäre sonst zu einer Doppelerfassung des umgewandelten Anteils gekommen.

Auf der Suche nach weiteren folataktiven Substanzen, welche die höheren Ergebnisse des mikrobiologischen Assays hätten erklären können, wurde ein im Chromatogramm des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats (MRM-Spur 474 ⇒ 327) zusätzlich detektierbarer Peak näher untersucht. Es handelte sich dabei um das Pyrazino-s-Triazin, welches durch eine Umlagerung des Pterinringes bei der Oxidation des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats entsteht [62]. Das Pyrazino-s-Triazin stellte sich allerdings im mikrobiologischen Assay als nicht folataktiv heraus und konnte

daher ebenfalls nicht zur Erklärung der Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden herangezogen werden. Durch die analytische Untersuchung verschiedener Lebensmittel konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Substanz weit verbreitet ist und mit der Nahrung aufgenommen wird. Außerdem entsteht das Pyrazino-s-Triazin vermutlich zu einem gewissen Teil während der Verdauung. Es besteht weiterhin Klärungsbedarf bzgl. der Entstehung des Pyrazino-s-Triazins im Lebensmittel. Aus pflanzenphysiologischer und lebensmitteltechnologischer Sicht stellt sich die Frage, ob das Pyrazino-s-Triazin schon während der Wachstums- oder Reifephase der Lebensmittel entsteht oder erst während der Lagerung bzw. Verarbeitung und ob die Bildung verhindert werden kann. In diesem Fall, würde der Folatgehalt ansteigen, was sich wiederum positiv auf die Folataufnahme auswirken würde.

Ein wichtiger Aspekt in der Optimierung der LC-MS/MS-Methode war die Überprüfung der Dekonjugation der Folatpolyglutamate zu den -monoglutamaten. Hier zeigte sich, dass bei vielen Lebensmitteln keine vollständige Dekonjugation vorgelegen hatte. Bei einigen Lebensmitteln genügte die Quantifizierung der Diglutamate, um den Gesamtfolatgehalt zu erhalten, doch bei anderen Lebensmitteln lagen noch höhere Polyglutamate undekonjugiert in der Messlösung vor, so dass die Einwaage verringert und die zugegebene Enzymmenge erhöht werden musste. Dadurch konnte dann bei fast allen Proben eine weitestgehend vollständige Dekonjugation erreicht werden. Für viele Proben war anschließend kein signifikanter Unterschied zum mikrobiologischen Assay mehr feststellbar. Die Notwendigkeit für zusätzliche Enzymbehandlungen des Lebensmittelextraktes mit  $\alpha$ -Amylase oder Protease konnte für die LC-MS/MS-Methode nicht bestätigt werden. Die verbleibenden Unterschiede sind vermutlich, wie eingangs schon erwähnt wurde, auf eine unzureichende Dekonjugation auf Seiten des mikrobiologischen Assays und die Wahl eines ungeeigneten Kalibranten zurückzuführen.

Durch die Optimierung der LC-MS/MS-Methode und den direkten Vergleich der sich über LC-MS/MS und mikrobiologischen Assay ergebenden Gesamtfolatgehalte konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse, unter Beachtung einer vollständigen Dekonjugation bei beiden Methoden und der Wahl des richtigen Kalibranten bzw. -Mixes beim mikrobiologischen Assay, angleichen und damit die Möglichkeit einer verlässlichen Quantifizierung des Folatgehaltes gegeben ist. Hierbei bietet sich vor allem die LC-MS/MS an, da für eine verlässliche Quantifizierung über das mikrobiologische Assay das Folatspektrum bekannt sein muss und damit zusätzliche Untersuchungen notwendig wären. Es könnte auch eine Methode angewendet werden, die ein gleichmäßiges Wachstum aller Vitamere gewährleistet, z.B. durch eine ausreichende Pufferung bei einem pH-Wert von 6,2 [36]. Doch auch diese Methode liefert nur den Gesamtfolatgehalt, der für mehrere Fragestellungen nicht ausreicht. Bei der Untersuchung zum Hintergrund der unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten dreier Lebensmittel, die sich aus der Humanstudie von MÖNCH [19] ergeben haben, handelt es sich zum Beispiel um eine solche Fragestellung. Für diese Untersuchung wurde in der vorliegenden Arbeit, in Anlehnung an die Vorschrift der DIN 19738 [191], ein Modell zur Simulation der Verdauung von Lebensmitteln entwickelt, welches vor allem auf die Biozugänglichkeit von Folaten zugeschnitten ist. Um den Anforderungen gerecht zu werden, wurde der pH-Wert der Darmstufe von 7,5 auf 5,5 herabgesetzt, die Dauer der Darmstufe von 6 h auf 4 h verringert, Ascorbinsäure zum Magensaft hinzugefügt und die Enzyme zur Dekonjugation der Polyglutamate in Form von Darmmukosa vom Schwein in die Simulation mit aufgenommen.

Die beiden Folate 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat und 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, die auf Grund ihres teilwei-

se fast vernachlässigbaren Anteils in der Messlösung zur Quantifizierung von Folaten in Lebensmitteln kaum einen Beitrag am Gesamtfolatgehalt geleistet haben, spielten bei der Aufklärung der Geschehnisse während der Verdauung hingegen eine entscheidende Rolle. Denn das 5-HCO-H<sub>4</sub>folat geht in der Magenstufe (pH 2) in 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat über und dieses in der Darmstufe bei pH 5,5 und 6,5 zu 10-HCO-H<sub>2</sub>folat. 5-HCO-H<sub>4</sub>folat ist das mengenmäßig dominierende Folat mehrerer Lebensmittel, wie z.B. den Weizenkeimen. Wäre es nicht in Form des 10-HCO-H<sub>2</sub>folat am Ende der Verdauungssimulation erfasst worden, wäre es zu einer falschen Schlussfolgerung gekommen. Bei Weizenkeimen wäre dann ein größerer Verlust angenommen worden, als eigentlich vorgelegen hat.

Mit dem *in vitro*-Modell zur Simulation der Folatverdauung konnten die Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit der drei Lebensmittel von MÖNCH [19] durch das Einbinden der Dekonjugation in Form der Bürstensaummembrandekongugase aus Schweinedarm und den Zusatz von Ascorbinsäure in physiologischen Mengen hinreichend gut erklärt werden. Die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit sind den Ergebnissen der *in vitro*-Simulation zu Folge sowohl auf eine abweichende Dekonjugationseffizienz zwischen den einzelnen Lebensmitteln als auch auf die Folatverteilung zurückzuführen. Denn trotz der im Magen vorliegenden Ascorbinsäure sind Verluste bei H<sub>4</sub>folat und 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat zu erwarten, auch wenn diese Verluste im Menschen vermutlich geringer ausfallen, als in der Simulation, bei der sich ein vollständiger Verlust des H<sub>4</sub>folats ergeben hat. Vielleicht würde eine eher anaerobe Umgebung in der Darmstufe der Simulation durch Inertgas (z.B. Argon) dem menschlichen System näher kommen. Zur Verbesserung des Modells wäre auch eine reproduzierbare und definierte Quelle für die Dekonjugase aus der Bürstensaummembran anzudenken. Außerdem wäre zu klären, ob die oxidierten Folate, wie PteGlu und 10-HCO-PteGlu, einem abweichenden Metabolismus unterliegen und ihre Bioverfügbarkeit bzw. die Bioverfügbarkeit der Lebensmittel auf Grund des Studiendesigns in [19] deshalb unterschätzt wurde. Dennoch wäre schon jetzt denkbar, dass dieses Modell weitere Hinweise zur Biozugänglichkeit von Folaten aus den verschiedensten Lebensmitteln liefert, um womöglich aufwendige Humanstudien zu ersetzen oder zielgerichtet zu planen.



## 6 Summary

This work provides in its first part a comparison of the total folate analysis by LC-MS/MS and microbiological assay. Although 10-HCO-H<sub>2</sub>folate and 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate were additionally included in the LC-MS/MS method to determine a complete folate spectrum obtaining a more reliable total folate content, significant differences between the results of these two methods appeared. In detail, for four foodstuffs the total folate amount determined by LC-MS/MS was lower as compared to the microbiological assay (by 15 - 81 %), while it was noticeably higher for two foodstuffs (by 21 - 26 %). These differences are presumably caused by the choice of calibrant used for the microbiological assay, because the results from the microbiological assay showed significant differences depending on the calibrant. This resulted in the exact opposite evaluation for one of the last mentioned foodstuffs after the choice of 5-HCO-H<sub>4</sub>folate as the calibrant compared with PteGlu. The value resulting from the microbiological assay was now higher than from LC-MS/MS. Therefore, the folate with the largest portion of the vitamin spectrum was used for calibration. But in some foods, the amount of other folates is very large and can thus lead to over- or underfindings. For some samples, a mix of several vitamers might be useful for calibration in order to achieve a reliable quantification by the microbiological assay. In addition, an incomplete deconjugation can also result in underfindings using the microbiological assay and can contribute to the differences between the two methods. Various approaches listed as in the following have been pursued to explain or to minimize the differences between LC-MS/MS and microbiological assay.

The newly in the LC-MS/MS method included folates 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate and 10-HCO-H<sub>2</sub>folate turned into 5-HCO-H<sub>4</sub>folate and 10-HCO-PteGlu due to interconversion and oxidation during sample preparation. Since the latter folates were quantified, too, and the remaining amount of 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate and 10-HCO-H<sub>2</sub>folate ranged only between 0,04 - 1 % respectively 0,1 - 8 %, these two folates made no appreciable contribution to the elucidation of the often smaller total folate amount by LC-MS/MS in comparison to the microbiological assay. These interconversions were the reason why 10-HCO-H<sub>2</sub>folate and 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate were only quantified over a structurally related [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-labeled internal standard and not by stable isotope dilution assay (SIDA). Otherwise it would have come to a double counting of the converted portion.

In search of another folate active substance, which could have explained the higher results of the microbiological assay, an additionally detectable peak in the chromatogram of 5-HCO-H<sub>4</sub>folate (MRM 474 ⇒ 327) was examined in more detail. It turned out to be the pyrazino-s-triazine which originates from rearrangement of the pteridine ring while oxidation of 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate [62]. However, the pyrazino-s-triazine is not active in the microbiological assay. Therefore, it could not be used to explain the differences between the results of the two methods. The analytical study revealed that this substance is widely distributed and ingested. Furthermore, the pyrazino-s-triazine is thought to arise to a certain extent during digestion. There is still a need for clarification regarding the origin of the pyrazino-s-triazine in foodstuffs. From a plant physiological and food technological

perspective the question arises whether the pyrazino-s-triazine is already formed during growth or maturation of the food or during storage and processing and whether the formation can be prevented. In this case, the folate content would increase, which would have a positive effect on folate intake.

An important aspect in the optimization of the LC-MS/MS method was the verification of the deconjugation of folate polyglutamates to the monoglutamates. This indicated that the deconjugation had been not complete in many foods. In some foods it was sufficient to quantify the diglutamates to obtain the amount of total folate, but in other foods higher polyglutamates were still undeconjugated in the measuring solution. Therefore, it was necessary to decrease the sample weight and to increase the amount of enzymes. Thereby, a widely complete deconjugation in almost all samples could be achieved. For many samples no significant difference to the microbiological assay was noticeable. The need for additional enzyme treatments of food extracts with  $\alpha$ -amylase or protease could not be confirmed for the LC-MS/MS method. The remaining differences are probably due to insufficient deconjugation on the part of the microbiological assay and the choice of an inappropriate calibrant, as was already mentioned above.

By optimizing the LC-MS/MS method and by the direct comparison of the amount of total folate resulting from LC-MS/MS and microbiological assay the results assimilate, taking into account the complete deconjugation in both methods and the choice of the proper calibrant. Therefore, a reliable quantification of the amount of folates is possible. Particularly the LC-MS/MS method is suitable, because for a reliable quantification using the microbiological assay the folate spectrum must be known. This requires additional investigations. A method that ensures a uniform growth of all vitamers, for example using an adequate buffering at a pH value of 6.2, could also be applied [36]. However, this method provides only the totale folate amount that is insufficient for several issues. An example for such a question is the investigation of the background of the different bioavailabilities of three foods that have resulted from the human study of MÖNCH [19]. For this investigation, a model for simulating the digestion of food was developed in the present work, which is especially tailored to the bioaccessability of folates. The model is based on the approach according to DIN 19738 [191]. To meet the requirements for folates, the pH of the intestinal level of 7.5 was reduced to 5.5, the duration of the intestinal level was reduced from 6 h to 4 h, ascorbic acid was added to the gastric juice and the enzymes for deconjugation of the polyglutamates in form of porcine intestinal mucosa were included into the simulation.

The two folates 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate and 10-HCO-H<sub>2</sub>folate contributed scarcely to the amount of total folates in food, due to their partly negligible amount in the measuring solution. However, they played a crucial role in the elucidation of processes during digestion, because 5-HCO-H<sub>4</sub>folate transforms to 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folate in the stomach simulation (pH 2). This folate in turn transforms to 10-HCO-H<sub>2</sub>folate in the intestinal stage at pH 5.5 and 6.5. 5-HCO-H<sub>4</sub>folate is the quantitatively dominant folate in many foodstuffs, such as wheat germs. If it was not recorded in the form of 10-HCO-H<sub>2</sub>folate at the end of the digestion simulation, it would have come to a wrong conclusion. In wheat germs, a greater loss would have been assumed than actually has been present.

With the *in vitro*-model for simulating the digestion of folates, which included the deconjugation by the addition of the deconjugase from porcine brush-border-membrane and the addition of ascorbic acid in physiological amounts, the results of the bioavailability of the three foodstuffs of MÖNCH [19] are sufficiently well explained. The differences in bioavailability are in accordance with the results of the *in vitro*-simulation due to a different

efficiency in deconjugation between the foodstuffs as well as the folate distribution. Despite the ascorbic acid being present in the stomach, losses in H<sub>4</sub>folate and 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate are to be expected, even if such losses might be lower in human than in the simulation, which resulted in a complete loss of H<sub>4</sub>folate. Perhaps a more anaerobic environment by using inert gas (e.g. argon) in the intestinal stage of the simulation would better approximate to the human system. To improve the model, a reproducible and defined source for deconjugase from brush border would be essential. Besides, it needs to be resolved whether PteGlu and 10-HCO-PteGlu have a differing metabolism and their bioavailability and the bioavailability from the foodstuffs respectively were underestimated due to the study design. However, it is conceivable that this model gives further information about the bioavailability of folates from different foodstuffs replacing probably complex human studies or planing them more effectively.





Teil III

Experimenteller Teil



# 7 Chemikalien, Reagenzien, Lebensmittel

## 7.1 Chemikalien

Acetonitril (LiChrosolv), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ameisensäure (for LC-MS), Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
 $\alpha$ -Amylase, von *Aspergillus oryzae*, Sigma/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Ascorbinsäure (p.a.), VWR, Darmstadt, Deutschland  
Calciumchlorid-Dihydrat, Riedel-de-Haen, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Chicken Pankreas (Hühnerpankreatin), Difco, Becton Dickinson, Sparks, USA  
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (p.a.), Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschl.  
Dithiothreitol (DTT), VWR, Darmstadt, Deutschland  
Essigsäure (HPLC-Grade), VWR, Darmstadt, Deutschland  
Gallenextrakt vom Schwein (B8631), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Harnstoff (p.a.), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Iod, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Kaliumchlorid(p.a.), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Kaliumiodid, Honeywell, Seelze, Deutschland  
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland  
MES Hydrat (Min 99,5 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Methanol (LiChrosolv), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Millipore-Wasser durch das MilliQ Integral Wasseraufbereitungssystem, Merck Millipore,  
Darmstadt, Deutschland  
Mucin vom Schweinemagen (M2378), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Natriumacetat-Trihydrat (p.a.), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumazid, Aldrich/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Natriumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Niederlande  
Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumhydroxid, J.T. Baker, Deventer, Niederlande  
Natriumiodid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Natriumthiosulfat, wasserfrei, Applichem, Darmstadt, Deutschland  
Pancreatin vom Schweinepankreas (P-8096), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Pepsin von der Schweine-Magen-Mukosa (77160), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
pH-Pufferlösung 1,68, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz  
pH-Pufferlösung 6,865, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland  
Protease, Typ XIV von *Streptomyces griseus*, Sigma/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschl.  
Rattenserum (azidfrei), Biozol, Eching, Deutschland  
1 mol/l Salzsäurelösung, Titrisol, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (p.a.), Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Trypsin vom Schweinepankreas (93613), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
 Wasserstoffperoxid, 30 %ig, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Zinkacetat-Dihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

## 7.2 Standards

Folsäure, Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
 (6R,S)-5-Methyltetrahydrofolat-Calciumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6S)-5-Methyltetrahydrofolat-Calciumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6R,S)-5-Formyltetrahydrofolat-Calciumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6S)-5-Formyltetrahydrofolat-Calciumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 10-Formylfolsäure, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6S)-Tetrahydrofolat · 3 HCl, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6R,S)-5,10-Methenyltetrahydrofolat-Chlorid, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6R,S)-5,10-Methyltetrahydrofolat-Magnesiumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6R,S)-10-Formyltetrahydrofolat-Natriumsalz, Merck Eprova, Schaffhausen, Schweiz  
 (6R,S)-5-Methyldihydrofolat-Ammoniumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 (6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyldi- $\gamma$ -L-glutamat, Lithiumsalz, Schircks, Schweiz  
 Pteroyltri- $\gamma$ -L-glutaminsäure, Schircks, Jona, Schweiz  
 Pteroylhepta- $\gamma$ -L-glutamat-Ammoniumsalz, Schircks, Jona, Schweiz  
 $[^2\text{H}_4]$ -Folsäure<sup>1</sup>, synthetisiert von FREISLEBEN et al. [236]  
 $[^2\text{H}_4]$ -5-Methyltetrahydrofolat<sup>1</sup>, synthetisiert von oder nach FREISLEBEN et al. [236]  
 $[^2\text{H}_4]$ -5-Formyltetrahydrofolat<sup>1</sup>, synthetisiert von oder nach FREISLEBEN et al. [236]  
 $[^2\text{H}_4]$ -10-Formylfolsäure<sup>1</sup>, synthetisiert von oder nach FREISLEBEN et al. [236]  
 $[^2\text{H}_4]$ -Tetrahydrofolat<sup>1</sup>, synthetisiert von oder nach FREISLEBEN et al. [236]  
 $[^{13}\text{C}_5]$ -5-Methyltetrahydrofolat-Calciumsalz<sup>2</sup>, Merck Eprova, Schaffhausen, Schweiz  
 $[^{13}\text{C}_5]$ -5-Formyltetrahydrofolat-Calciumsalz<sup>2</sup>, Merck Eprova, Schaffhausen, Schweiz  
 $[^{13}\text{C}_5]$ -Folsäure<sup>2</sup>, Merck Eprova, Schaffhausen, Schweiz

## 7.3 Lebensmittel

Apfelsaft, aus Apfelsaftkonzentrat, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
 Azuki Bohnen, Rapunzel Naturkost GmbH, Legau, Deutschland  
 Baguette, vom Bäcker, Freising, Deutschland  
 Bananennektar, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
 Basmati Reis, Le Gusto, Müller's Mühle GmbH, Gelsenkirchen-Schalke, Deutschland  
 Blattspinat, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
 Blattspinat, tiefgefroren (Humanstudie), iglo GmbH, Hamburg, Deutschland  
 Blumenkohl, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
 Brokkoli, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
 Buchweizen, Vitax-Unternehmensgruppe SILCO GmbH & Co. KG, Bindlach, Deutschland  
 Camembert Geramont, Bongrain Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland

<sup>1</sup>  $[^2\text{H}_4]$ -Markierung am Benzolring der p-Aminobenzoessäure

<sup>2</sup>  $[^{13}\text{C}_5]$ -Markierung an der Glutaminsäure

Camembert Geramont cremig-leicht, Bongrain Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschl.  
Camembert Saint Albray leicht und cremig, Bongrain Deutschland, Wiesbaden, Deutschl.  
Camembert, Tip, real Handels GmbH, Düsseldorf, Deutschland  
Chinesische Glasnudeln, Feinkost Dittmann, Reichold Feinkost, Mannheim, Deutschland  
Couscous, Baktat, BAK Kardeşler GmbH, Mannheim, Deutschland  
Erbsencremesuppe mit Gemüseeinlage, Deutschland  
Erdnüsse, Seeberger KG, Ulm, Deutschland  
Frühkartoffeln, frisch, Supermarkt, Deutschland  
Gemüsemix, zertifiziertes Referenzmaterial BCR 485, IRMM, Belgien  
Gerstengraupen, Davert GmbH, Senden, Deutschland  
Haferflocken, Golden Breakfast, Norma W. Smidt & Co. KG, Lübeck, Deutschland  
Hartweizen-Spaghetti, Cucina, Glaseritalia GmbH, München, Deutschland  
Hirse, Monolith-Nord GmbH, Rosengarten, Deutschland  
Junge Erbsen, iglo GmbH, Hamburg, Deutschland  
Kalbsleber, frisch, Vinzenzmurr Vertriebs GmbH, München, Deutschland  
Karotten, frisch, Supermarkt, Deutschland  
Karottensaft, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
Kichererbsen, trocken, Baktat Gida San. Tic. Ltd. Şti, Sungurlu-Çorum, Türkei  
Kokosnuss Raspeln, Ja, Rewe-Handelsgruppe, Köln, Deutschland  
Maisgrieß Bio, Verival Bio, Vita + Naturprodukte AG, Langkampfen, Österreich  
Mandeln gemahlen, Rewe-Handelsgruppe, Köln, Deutschland  
Mischbrot (45 % Roggen, 55 % Weizen), vom Bäcker, Freising, Deutschland  
Mungbohnen, Davert GmbH, Senden, Deutschland  
Orangensaft, Direktsaft, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
Pistazien, Seeberger KG, Ulm, Deutschland  
Räucherlachs, Krone Fisch GmbH, Steinbach/Ts., Deutschland  
Roggenbrot (90 % Roggen, 10 % Weizen), vom Bäcker, Freising, Deutschland  
Schwarzer Johannisbeersaft, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
Sojabohnen, Rapunzel Naturkost GmbH, Legau, Deutschland  
Spinat, frisch, Düngungsstudie, Weihenstephan/Freising, Deutschland  
Spinat, gehackt, iglo GmbH, Hamburg, Deutschland  
Tellerlinsen, Le Gusto, Müller's Mühle GmbH, Gelsenkirchen-Schalke, Deutschland  
Tomatensaft, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
Traubensaft, direkt gepresst, Rewe-Handelsgruppe GmbH, Köln, Deutschland  
Vollkornbrot, Tip, real Handels GmbH, Düsseldorf, Deutschland  
Walnüsse, Ja, Rewe-Handelsgruppe, Köln, Deutschland  
Weizenkeime, bleib gesund, Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel, Deutschland  
Wirsing, frisch, Rewe-Markt, Freising, Deutschland

## 7.4 Lösungen, Puffer und Standardlösungen

### 7.4.1 Lösungen und Puffer

#### Natronlauge (5 mol/l)

40 g Natriumhydroxid wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 200 ml aufgefüllt.

**Natronlauge (1 mol/l)**

8 g Natriumhydroxid wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 200 ml aufgefüllt.

**MES-Puffer**

4,265 g MES-Hydrat und 2 g Ascorbinsäure wurden mit  $\sim 80$  ml destilliertem Wasser versetzt und mit Natronlauge (5 mol/l) auf pH 5,0 eingestellt. Anschließend wurde entweder 1,395 ml Mercaptoethanol, 0,1 g DTT oder 0,1 g DTT plus 0,1 ml Mercaptoethanol zugegeben und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Für die Aktivitätsmessung der Bürstensaummembrandekongjugase (aus der aufgereinigten Darmmukosa) wurde der pH-Wert des Puffers auf 6,5 eingestellt.

**Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,0)**

A: 1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt

B: 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt

Lösung A wurde mit B auf pH 7,0 eingestellt.

**Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 5,0)**

Lösungen A und B wurden wie beim Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,0) hergestellt. Lösung B wurde dann mit A auf pH 5,0 eingestellt.

**Equilibrierungspuffer**

10 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,0) wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol bzw. 0,02 g DTT versetzt und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**Elutionspuffer**

5 g Natriumchlorid, 1,361 g Natriumacetat-Trihydrat, 1 g Ascorbinsäure und 1,395 ml Mercaptoethanol oder 0,1 g DTT wurden mit destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt

**Hühnerpankreatin**

150 ml Phosphatpuffer pH 7,0 wurde mit 1,5 g Ascorbinsäure versetzt und der pH-Wert mit Natronlauge (1 mol/l) wieder auf pH 7,0 eingestellt. 25 mg Hühnerpankreatin wurden darin für 15 min unter Rühren suspendiert und die Suspension anschließend 2 ml-weise in Eppendorf-Cups abgefüllt und eingefroren.

**Hühnerpankreatin konzentriert**

50 ml Phosphatpuffer pH 7,0 wurde mit 0,5 g Ascorbinsäure versetzt und der pH-Wert mit Natronlauge (1 mol/l) wieder auf pH 7,0 eingestellt. 50 mg Hühnerpankreatin wurden darin für 15 min unter Rühren suspendiert und die Suspension anschließend 2 ml-weise in Eppendorf-Cups abgefüllt und eingefroren.

**0,1 %ige Essigsäure (v/v) - Eluent**

1 ml Essigsäure wurde mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt.

**0,1 %ige Ameisensäure (v/v) - Eluent**

1 ml Ameisensäure wurde mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt

**Acetonitril mit 0,1 %ige Ameisensäure (v/v) - Eluent**

1 ml Ameisensäure wurde mit Acetonitril auf 1 l aufgefüllt.

**Salzsäure (0,1 mol/l)**

50 ml Salzsäure (1 mol/l) wurde mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

**Tris/HCl-Puffer (pH 8,5)**

1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurde in ~80 ml destilliertem Wasser gelöst und mit Salzsäure (2 mol/l und 0,1 mol/l) auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Für die Aktivitätsmessung der Bürstensaummembrandekongjugase (aus der aufgereinigten Darmmukosa) wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

**Natriumthiosulfatlösung (1 mol/l)**

0,158 g Natriumthiosulfat (wasserfrei) wurden in 1 ml Wasser gelöst.

**Elutionslösung für die Affinitätschromatographie**

77  $\mu$ l Trifluoressigsäure und 155 mg DTT wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 50 ml aufgefüllt ( $\hat{=}$  jeweils 0,02 mol/l).

**Waschpuffer für die Affinitätschromatographie (0,025 mol/l)**

25 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 7,0) wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**25 %ige Ascorbinsäure für die Affinitätschromatographie**

0,5 g Ascorbinsäure wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 2 ml aufgefüllt.

**0,2 %ige Natriumazidlösung**

0,2 g Natriumazid wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

**Phosphatpuffer für das mikrobiologische Assay (MA- Puffer)**

0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1 g Ascorbinsäure wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit Natronlauge (5 und 1 mol/l) auf pH 7,2 eingestellt. Anschließend wurde 1,395 ml Mercaptoethanol zugegeben und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**Medium für das mikrobiologische Assay (Kit)**

Das Medium aus dem Kit (R-Biopharm) wurde mit 1 ml Folsäure-Puffer (Kit) versetzt, 10 ml steriles Wasser (Kit) zugegeben, geschüttelt und für 5 min in frisch aufgekochtem Wasser erhitzt, dabei wurde das Fläschchen ab und zu geschüttelt und das kochende Wasser 1 - 2 Mal erneuert. Der Puffer wurde nun unter fließendem Wasser abgekühlt und über einen 0,2 µm-Membranfilter (RC) in ein steriles Zentrifugenröhrchen steril filtriert.

**Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mol/l)**

84,01 g Natriumhydrogencarbonat wurde in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

**Ascorbinsäurelösung für die Verdauungssimulation**

0,2528 g Ascorbinsäure wurde im 50 ml-Braunglasmesskolben mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

**synthetischer Magensaft**

290 mg Natriumchlorid, 70 mg Kaliumchlorid, 27 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 100 mg Pepsin und 300 mg Mucin wurden mit destilliertem Wasser versetzt und unter Rühren mit Salzsäure (1 mol/l) auf einen pH von 2,0 eingestellt. Die Suspension wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**synthetischer Darmsaft**

30 mg Kaliumchlorid, 50 mg Calciumchlorid-Dihydrat, 20 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 100 mg Natriumhydrogencarbonat, 30 mg Trypsin, 30 mg Harnstoff, 900 mg Pankreatin und 900 mg Gallenextrakt wurden mit destilliertem Wasser unter Rühren gelöst bzw. suspendiert (10 - 15 min) und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**Lugolsche Lösung**

0,5 g Kaliumiodid wurde in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und darin 0,25 g Iod gelöst.

**Tris-Mannitol-Puffer**

0,048 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurde mit 150 ml destilliertem Wasser versetzt, mit 0,1 mol/l Salzsäure auf pH 7,1 eingestellt und mit 1,82 g Mannit versetzt (pH eventuell nachstellen). Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

**7.4.2 Standardlösungen****Stammlösungen - 100 µg/ml**

10 mg des entsprechenden Folatstandards wurden in einen 100 ml-Braunglasmaßkolben eingewogen, in MES-Puffer gelöst und der Kolben anschließend mit MES-Puffer aufgefüllt. H<sub>4</sub>folat und PteGlu wurden zuvor mit 10 - 15 ml Phosphatpuffer (pH 7) angelöst und dann mit MES-Puffer aufgefüllt.



**Standardlösungen - 10 µg/ml**

1 ml der Stammlösung wurde in einen 10 ml-Braunglasmaßkolben pipettiert und dieser mit MES-Puffer aufgefüllt.

**Standardlösungen - 0,01 - 1 µg/ml**

100 µl der 10-fach höher konzentrierten Standardlösung (10 µg/ml) wurde mit 900 µl MES-Puffer oder Elutionspuffer (für die Responsegeraden von 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-H<sub>2</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> und Pyrazino-s-Triazin) versetzt und diese Lösung jeweils zur Herstellung der nächsten Verdünnungsstufe verwendet.

**[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Stammix, 8 - 10 µg/ml**

Von den in Lösung vorliegenden [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Standards (in MES-Puffer oder Phosphatpuffer mit Ascorbinsäure und Mercaptoethanol) wurde jeweils ein entsprechendes Volumen in ein 4 ml Braunglasvial pipettiert und eine entsprechende Menge an MES-Puffer zugegeben, so dass ein Endvolumen von 2 ml entstand und die einzelnen [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folate eine Endkonzentration von 8 - 10 µl hatten.

**[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Standardmix (0,4 - 0,5 µg/ml)**

500 µl des [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Stammixes wurde im 10 ml-Braunglasmesskolben mit MES-Puffer auf 10 ml aufgefüllt.



# 8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

## 8.1 Geräte

- LC-MS/MS:
  - Communication bus Module prominence CBM-20A, Shimadzu, Duisburg
  - 2 Hochdruckgradientenpumpen prominence LC-20AD<sub>SP</sub>, Shimadzu, Duisburg
  - Autosampler prominence SIL-20AC<sub>HT</sub>, Shimadzu, Duisburg
  - Säulenofen prominence CTO-20AC, Shimadzu, Duisburg
  - Degaser prominence DGU-20A<sub>3</sub>, Shimadzu, Duisburg
  - Waste Ventil, Techlab GmbH, Braunschweig, Deutschland
  - Triplequadrupolmassenspektrometer API 4000 Q-Trap, Applied Biosystems MDS SCIEX
- HPLC/DAD:
  - DAD LaChrom L-7455, Merck Hitachi
  - Niederdruckgradientenpumpe LaChrom L-7100, Merck Hitachi
  - Autosampler LaChrom L-7200, Merck Hitachi
  - Interface LaChrom D-7000, Merck Hitachi
- semi-präparative HPLC/UV:
  - UV-Detektor Sapphire 600 Variable Wavelength Detector, ECOM spol.s r.o. Americka, Prag, Tschechische Republik
  - 2 Hochdruckgradientenpumpen, Kronlab Chromatography Technology, YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland
  - Autosampler FCV-20AH2, Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA
  - Valve Unit, Kronlab High Speed Valve, YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland
  - Software, PrepCon5
- Tischzentrifuge CR 412, Jouan, Unterhaching, Deutschland
- pH-Meter Five easy, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
- Biomek 1000 Automated Laboratory Workstation (Mikrotiterplattenphotometer), Beckman, USA
- Autoklav, Adolf Wolf, Bad Überkingen, Deutschland
- Verdauungsapparatur
  - Kompakttitrator, TitroWiCo - Ingenieurbüro Wittenfeld und Cornelius GbR, Bochum, Deutschland
  - Schüttelwasserbad, GFL, Burgwedel, Deutschland
  - pH-Elektroden Single Pore Glass, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

## 8.2 Geräteparameter

### 8.2.1 HPLC-UV

Die Konzentration der Analyten wurde mittels HPLC-UV überprüft (Abschnitt 9.2.1). Für die chromatographische Trennung der Folate wurde die Nucleosil-HPLC-Säule mit dem in Tabelle 8.1 aufgeführten Gradienten und den entsprechenden Parametern verwendet:

**Tabelle 8.1:** Gradient für die HPLC-UV-Bestimmung mit der Nucleosil HPLC-Säule (0,5 ml/min).

Zeit [min]	% A	% E
0	90	10
5	90	10
6	80	20
7	80	20
15	70	30
19	50	50
22	0	100
23	0	100
25	90	10
35	90	10

A: 0,1 % Essigsäure; E: Methanol, Injektionsvol.: 10  $\mu$ l

Neben drei fixen Wellenlängen (272 nm, 282 nm und 290 nm) wurde in Abhängigkeit der zu analysierenden Folate noch eine weitere Wellenlänge hinzugenommen (siehe Tabelle 9.1) bzw. über den ganzen Lauf hinweg ein DAD-Spektrum im Bereich von 220 - 400 nm aufgenommen.

### 8.2.2 Präparative HPLC

Für die Aufreinigung nach der Synthese des Pyrazino-s-Triazins wurde eine semipräparative C18-Säule (YMC semiprä.) mit dem in Tabelle 8.2 angegebenen Gradienten gewählt. Die Isolation des Pyrazino-s-Triazins aus den Weizenkeimen erfolgte hingegen in zwei Schritten: zuerst mit Hilfe einer C18-Säule (HyperClone, Gradient siehe Tabelle 8.3) und anschließend mit Hilfe einer Säule mit Phenyl-Hexyl-Phase (Gradient siehe Tabelle 8.2). Die Detektion erfolgte jeweils bei einer Wellenlänge von 282 nm.

### 8.2.3 LC-MS/MS

Die chromatographische Trennung vor der massenspektrometrischen Detektion erfolgte zu Beginn der Arbeit auf einer Nucleosil-HPLC-Säule, anschließend auf eine HyperClone-HPLC-Säule und zum Schluss auf einer YMC Pro C18-HPLC-Säule. Die verschiedenen Gradienten, Flussraten und Eluenten sind in Tabelle 8.3 zusammengestellt. Der Wechsel auf andere Säule erfolgte auf Grund abnehmender Trennleistung und einer abweichenden Qualität bei Nachbestellungen der HPLC-Säulen.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels MS<sup>2</sup>. Es wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus verwendet. Die Quellenparameter, die Auflösung und das Kollisionsgas in der Kollisionszelle sind in Tabelle 8.4 aufgelistet und die substanzspezifischen Parameter der einzelnen MRM-Übergänge in Tabelle 8.5 und Tabelle 8.6.

**Tabelle 8.2:** Gradienten für die präparative HPLC

YMC semipräp., 2 ml/min			PhenylHexyl, 0,3 ml/min		
Zeit [min]	% C	% D	Zeit [min]	% C	% E
0	95	5	0	80	20
2	95	5	12	80	20
3	90	10	14	50	50
15	90	10	15	80	20
16	50	50	25	80	20
17	50	50			
18	95	5			
26	95	5			

C: 0,1% Ameisensäure; D: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure;  
E: Methanol; Injektionsvol.: 20 - 50 µl

**Tabelle 8.3:** Gradienten für die verschiedenen HPLC-Säulen der LC-MS/MS-Methoden

Nucleosil, 0,5 ml/min			HyperClone, 0,2 ml/min			YMC, 0,2 ml/min		
Zeit [min]	% A	% E	Zeit [min]	% A	% B	Zeit [min]	% C	% D
0	90	10	0	98	2	0	95	5
1	80	20	2	98	2	5	90	10
2	80	20	7	90	10	10	90	10
10	70	30	10	90	10	20	85	15
13	50	50	18	85	15	22	50	50
15	0	100	20	0	100	24	50	50
16	0	100	22	0	100	26	95	5
18	90	10	24	98	2	35	95	5
25	90	10	32	98	2			

A: 0,1% Essigsäure; B: Acetonitril; C: 0,1% Ameisensäure; D: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure; E: Methanol; Ofen (LC-MS/MS): 30 °C; Autosampler (LC-MS/MS): 4 °C; Injektionsvol.: 10 µl

**Tabelle 8.4:** allgemeine MS-Parameter

Courtain Gas:	10 psi
Collision Gas:	Medium
Ionspray Voltage:	5500 V
Temperatur der Heizer:	550 °C
Gas 1:	75 psi
Gas 2:	75 psi
Auflösung :	0,7 ± 0,1 u

**Tabelle 8.5:** MRM-Übergänge der Mono- und Diglutamate und der Internen Standards.

Analyt	Vorläuferion (m/z)	Produktion <sup>1</sup> (m/z)	DP <sup>2</sup> (in V)	EP <sup>3</sup> (in V)	CE <sup>4</sup> (in V)	CXP <sup>5</sup> (in V)
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	460,3	313,3 180,0	71	10	29 55	8 10
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	464,4	317,1 180,0	71	10	29 55	8 10
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	465,3	313,3 180,1	71	10	29 55	8 10
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	474,3	327,2 299,1	66	10	29 45	14 16
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-HCO-H <sub>4</sub> folat	478,3	331,1 303,1	66	10	29 45	14 16
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-HCO-H <sub>4</sub> folat	479,3	327,3 299,0	66	10	29 45	14 16
10-HCO-PteGlu	470,2	295,0 176,1	76	15	35 59	16 8
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	474,3	299,1 176,0	76	15	35 59	16 8
H <sub>4</sub> folat	446,3	299,1 166,1	66	10	29 59	16 8
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-H <sub>4</sub> folat	450,3	303,1 166,2	66	10	29 59	16 8
PteGlu	442,2	295,1 176,3	56	8	23 53	17 8
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PteGlu	446,2	299,1 176,0	56	8	23 53	17 8
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-PteGlu	447,2	295,1 176,0	56	8	23 53	17 8
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	456,3	412,1 282,1	136	15	41 67	18 16
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	472,2	178,1 297,0	66	10	35 31	8 16
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	603,2	327,1 299,1	61	10	35 57	18 16
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	589,3	313,3 180,0	60	10	40 65	8 10
10-HCO-PteGlu <sub>2</sub>	599,2	295,0 176,1	70	15	50 70	16 8
H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	575,3	299,1 166,1	60	10	35 65	16 8
PteGlu <sub>2</sub>	571,2	295,1 176,3	60	8	30 65	14 8
10-HCO-H <sub>2</sub> PteGlu <sub>2</sub>	601,2	178,1 297,0	75	10	45 40	8 16

<sup>1</sup> Dwelltime: 100 ms für Quantifier und 50 s für Qualifier, <sup>2</sup> DP: Declustering Potential,<sup>3</sup> EP: Entrance Potential, <sup>4</sup> CE: Collision Energy, <sup>5</sup> CXP: Cell Exit Potential

Tabelle 8.6: MRM-Übergänge der Polyglutamate.

Analyt	Vorläuferion (m/z)	Produktion <sup>1</sup> (m/z)	DP <sup>2</sup> (in V)	EP <sup>3</sup> (in V)	CE <sup>4</sup> (in V)	CXP <sup>5</sup> (in V)
Mono- und Digtamate siehe Tabelle 8.5						
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>3</sub>	718,3	313,3 180,0	70	10	50 75	8 10
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>4</sub>	847,3	313,3 180,0	80	10	60 85	8 10
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>5</sub>	976,3	313,3 180,0	90	10	70 95	8 10
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>6</sub>	1105,3	313,3	90	10	80	8
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>7</sub>	1234,3	313,3	90	10	90	8
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>3</sub>	732,3	327,2 299,1	80	10	50 60	14 16
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>4</sub>	861,3	327,2 299,1	80	10	60 70	14 16
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>5</sub>	990,3	327,2 299,1	70	10	70 80	14 16
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>6</sub>	1119,3	327,2	70	10	80	14
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>7</sub>	1248,3	327,2	70	10	90	14
10-HCO-PteGlu <sub>3</sub>	728,2	295,0 176,1	70	15	55 80	16 8
10-HCO-PteGlu <sub>4</sub>	857,2	295,0 176,1	70	15	65 90	16 8
10-HCO-PteGlu <sub>5</sub>	986,2	295,0 176,1	70	15	75 100	16 8
H <sub>4</sub> PteGlu <sub>3</sub>	704,3	299,1 166,1	60	10	50 80	16 8
H <sub>4</sub> PteGlu <sub>4</sub>	833,3	299,1 166,1	70	10	60 90	16 8
H <sub>4</sub> PteGlu <sub>5</sub>	962,3	299,1 166,1	80	10	70 100	16 8
PteGlu <sub>3</sub>	700,2	295,1 176,3	60	8	40 70	14 8
PteGlu <sub>4</sub>	829,2	295,1 176,3	70	8	50 80	14 8
PteGlu <sub>5</sub>	958,2	295,1 176,3	80	8	60 90	14 8

<sup>1</sup> Dwelltime: 50 ms für alle Übergänge, <sup>2</sup> DP: Declustering Potential,<sup>3</sup> EP: Entrance Potential, <sup>4</sup> CE: Collision Energy, <sup>5</sup> CXP: Cell Exit Potential

### 8.2.4 Verdauungsapparatur

Für den Parameter „Totzeit“ (Zeit bis zur nächsten Zugabe bzw. Überprüfung des pH-Wertes) wurde ein Wert von 40 s eingegeben. Somit ergab sich für die pH-Einstellung im Magen (pH 2) ein Zeitraum von 10 - 15 min ohne Lebensmittel, von 30 - 40 min für Spinat und von 50 - 70 min für Weizenkeime. Das maximale Volumen pro Zugabe wurde auf 50  $\mu$ l festgesetzt und die Schüttelfrequenz im Wasserbad (37 °C) lag bei 120 - 140 Schwingungen pro Minute.

### 8.3 Verbrauchsmaterialien

- VitaFast<sup>®</sup> Folsäure, mikrobiologischer Mikrotiterplatten-Test (P1001), R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland
- Nucleosil (C18 EC, 250 · 3 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) + Vorsäule (C18, CC, 8 · 3 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å), Macherey Nagel, Düren, Deutschland
- HyperClone (C18 BDS, 150 · 3,2 mm, 3  $\mu$ m, 130 Å) + Vorsäule (C18, 4 · 2 mm), Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
- Pro-C18 (C18 EC, 150 · 3 mm, 3  $\mu$ m, 120 Å), YMC, Japan + Vorsäule (C18, 4 · 2 mm), Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
- Luna Phenyl-Hexyl (Hexyl linked Phenyl, 150 · 3 mm, 3  $\mu$ m, 100 Å) + Vorsäule (C18, 4 · 2 mm), Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
- Pro-C18 (C18 EC, 150 · 10 mm, 5  $\mu$ m, 120 Å), YMC, Japan + Vorsäule (C18, 4 · 2 mm), Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
- Strata SAX-Kartuschen (500 mg, 3 ml, 55  $\mu$ m, 70 Å), Phenomenex, Deutschland
- Membranfilter PVDF, 0,22  $\mu$ m, Zefa, Harthausen, Deutschland
- Membranfilter Hydrophilic PVDF, 0,45  $\mu$ m, Millipore Millex-HV, Billerica, MA, USA
- Membranfilter Regenerierte Cellulose (RC) 0,2  $\mu$ m, steril, Roth
- 50 ml Zentrifugenröhrchen, VWR, Darmstadt, Deutschland
- 2 ml Reaktionsgefäße, VWR, Darmstadt, Deutschland
- 1,5 ml Reaktionsgefäße, steril, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Peroxid-Test (kolorimetrisch mit Teststäbchen; 0,5-25 mg/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Merck, Darmstadt, Deutschland



# 9 Durchführung

## 9.1 Synthese

### 9.1.1 10-Formyldihydrofolat (10-HCO-H<sub>2</sub>folat)

10 mg 10-HCO-H<sub>4</sub>folat wurde in einen 100 ml Braunglasmaßkolben eingewogen und in 50 ml Tris-HCl-Puffer (0,1 mol/l, pH 8,5) gelöst. Die Lösung wurde für 20 h durch Luftsauerstoff oxidiert. Dafür wurde die Lösung alle 30 min (abgesehen von ~12 h über Nacht) geschüttelt und Luft in den Kolben geblasen. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1,395 ml Mercaptoethanol (0,02 mol/l) gestoppt und der Kolben mit Tris-HCl-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Die Verdünnungen erfolgten in MES-Puffer.

### 9.1.2 Pyrazino-s-Triazin (MeFox)

Die Synthese wurde in Anlehnung an GAPSKI et al. [61] durchgeführt. 1 - 10 mg 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat wurde in 1 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 5 statt pH 6) gelöst, mit 50 µl 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur unter Rühren oxidiert (verbleibende Menge an 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat: 2%). Zusätzlich zur Methode von GAPSKI wurde der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überschuss durch NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 mol/l) mit einem Zusatz an NaI (Spatelspitze) reduziert. Mit Hilfe eines Teststäbchens wurde auf Abwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überprüft. Die Lösung wurde anschließend über semi-präparative HPLC aufgereinigt, gefriergetrocknet und im Exsikkator nochmal über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet (3 - 5 Tage).

Für das [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierte Pyrazino-s-Triazin wurde 0,1 mg [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]- (6S)-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat verwendet, mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und für 2 h gerührt. Anschließend wurde 1 ml NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 mol/l) zugegeben und mit MES-Puffer auf 5 mL aufgefüllt. Für das [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markierte Pyrazino-s-Triazin wurde keine zusätzliche Aufreinigung durchgeführt.

## 9.2 Analytik

### 9.2.1 HPLC-UV - Überprüfung der Konzentration der Standardlösungen

#### Durchführung der HPLC-UV-Bestimmung

Für die Überprüfung der Konzentration wurde eine PteGlu-Stammlösung (~100 µg/ml) jeweils frisch hergestellt. Anschließend wurde 100 µl dieser PteGlu-Stammlösung zu 900 µl einer Standardlösung eines anderen Folats oder eines Folatmixes (jeweils ~10 µg/ml) gegeben und diese Lösung mittels HPLC/DAD vermessen. Für die Messung wurde die Nucleosil-Säule verwendet (Gradient siehe Tabelle 8.1). Die Auswertung erfolgte in Abhängigkeit vom betreffenden Folat bei verschiedenen Wellenlängen (siehe Tabelle 9.1) und

**Tabelle 9.1:** UV-Responsefaktoren für verschiedene Folate ( $\pm$  Standardabweichung), mit PteGlu als internem Standard.

Folat	Responsefaktoren	Wellenlänge
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	0,701 $\pm$ 0,002	290 nm
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	0,937 $\pm$ 0,009	290 nm
10-HCO-PteGlu	0,949 $\pm$ 0,002	272 nm
H <sub>4</sub> folat	0,839 $\pm$ 0,003	272 nm
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	0,936 $\pm$ 0,013	233 nm
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	0,845 $\pm$ 0,013	359 nm
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	0,796 $\pm$ 0,012	287 nm
MeFox	0,569 $\pm$ 0,003	282 nm
PteGlu		282 nm

MeFox = Pyrazino-s-Triazin

die Berechnung der Konzentration  $c$  der Folat-Standardlösung nach folgender Gleichung<sup>1</sup>:

$$c(\text{Analyt}) = \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{PteGlu})} \cdot \frac{c(\text{PteGlu}) \cdot V(\text{PteGlu})}{RF \cdot V(\text{Analyt})} \quad (9.1)$$

Die Konzentrationen wurden dafür in nmol/ml verwendet. Die Responsefaktoren (RF) sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.

### Responsefaktoren für die HPLC-UV

Für die Erstellung der Responsefaktoren wurde für jedes Folat eine frische Stammlösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hergestellt und eine Kalibriergerade mit PteGlu als Internen Standard erstellt. Dafür wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  und 250  $\mu\text{l}$  dieser Stammlösungen mit 100  $\mu\text{l}$  einer frischen PteGlu-Stammlösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und mit MES-Puffer auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Konzentrationen entsprachen 1 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (2 - 55 nmol/ml), bzw. für PteGlu 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Für jede Konzentrationsstufe wurde der Responsefaktor (RF) nach

$$RF = \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{PteGlu})} \cdot \frac{n(\text{PteGlu})}{n(\text{Analyt})} \quad (9.2)$$

berechnet<sup>1</sup>, ein Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt (siehe Gleichung (9.13)) und die einzelnen Faktoren gemittelt. Die sich daraus ergebenden Responsefaktoren sind in Tabelle 9.1 zusammengefasst. Der ausreißerfreie Konzentrationsbereich lag für alle Folate zwischen 5 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Nur für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat lag er zwischen 1 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und für 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> zwischen 2 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Es wurde zusätzlich eine Kurzvalidierung für 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, H<sub>4</sub>folat und PteGlu in Form einer dreifach-Injektion und einer 10fach-Bestimmung (Wiederholbarkeit, 10 Mal zusammenpipettiert und in einer Sequenz vermessen) durchgeführt, um zu ermitteln, welche Schwankungen von dieser Methode zu erwarten waren. Der Variationskoeffizient der Peakflächenverhältnisse (entsprechendes Folat zu PteGlu) für die dreifach-Injektion lag zwischen 0,6 - 2,5 % und für die 10fach-Bestimmung (Wiederholpräzision) zwischen 0,5 - 1,1 % (bei 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. 0,7 - 2,5 % (bei 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

<sup>1</sup>A = Fläche unter dem Peak, V = Volumen, n = Stoffmenge ( $n = c \cdot V$ )

## 9.2.2 Quantifizierung mittels LC-MS/MS

### Responsefaktoren für die LC-MS/MS

Die Quantifizierung per LC-MS/MS erfolgte in Abhängigkeit vom Folat über den entsprechenden isotoopenmarkierten internen Standard (ISTD) oder über einen strukturverwandten internen Standard (isotoopenmarkiert). Für die Ermittlung der Responsefaktoren wurden Kalibriergeraden mit variierendem Verhältnis von Analyt zu internem Standard erstellt (teilweise von 0,04:1 - 50:1, bzw. ca. 0,004 µg/ml:0,1 µg/ml - 5 µg/ml:0,1 µg/ml). Dabei wurde die Menge an internem Standard zwar konstant gehalten, doch auf Grund zu großer Intensitäten der Analyten während der Messungen mittels LC-MS/MS im oberen Konzentrationsbereich wurde ab einem Konzentrationsverhältnis von 10:1 oder 20:1 eine verdünnte Lösung injiziert (zwischen 1:2 und 1:10). Für die Responsegerade des Pyrazino-s-Triazins (MeFox) wurde statt von zusätzlichen Verdünnungen im oberen Konzentrationsbereich ein geringeres Injektionsvolumen gewählt.

Die Berechnung der Responsefaktoren (RF) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$RF = \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{interner Standard})} \cdot \frac{n(\text{interner Standard})}{n(\text{Analyt})} \quad (9.3)$$

Die Werte für die einzelnen Konzentrationsstufen bzw. Verhältnisse wurde auf Normalverteilung (nach David), Ausreißer (nach Nalimov) und einen möglichen Trend (nach Neumann) hin untersucht (Berechnungen siehe Abschnitt 9.5) und anschließend gemittelt. Die einzelnen Folate (Monoglutamate), ihre jeweiligen internen Standards, die Responsefaktoren und die Gültigkeitsbereiche in Form des Peakflächenverhältnisses (PFV)

$$PFV = \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{ISTD})} \quad (9.4)$$

sind in Tabelle 9.2 zusammengetragen.

Für die Diglutamate wurden die Responsefaktoren anhand zwei verschiedener Aufarbeitungen mit drei verschiedenen Matrices ermittelt. Die Vorgehensweise wurde in Abschnitt 3.1.3 näher beschrieben. Die Responsefaktoren sind in Tabelle 9.3 aufgeführt.

Für pABG wurde ein Responsefaktor mit [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat als Internem Standard auf Grundlage der Annahme abgeschätzt, dass H<sub>4</sub>folat bei der Verdauungssimulation der Magenstufe (ohne Ascorbinsäure) vollständig zu pABG abgebaut wurde. Die Konzentration des pABGs entsprach demzufolge der ursprünglich in der Lösung vorhandenen Konzentration an H<sub>4</sub>folat. Der Responsefaktor berechnete sich dann wie folgt:

$$RF = \frac{A(\text{pABG})}{A([\textsuperscript{2}\text{H}_4]\text{-5-CH}_3\text{-H}_4\text{folat})} \cdot \frac{n([\textsuperscript{2}\text{H}_4]\text{-5-CH}_3\text{-H}_4\text{folat})}{n(\text{H}_4\text{folat})} \quad (9.5)$$

Für den Responsefaktor ergab sich ein Wert von 1,586.

### Durchführung der LC-MS/MS-Bestimmung

0,5 - 2 g der Probe wurde in eine Pyrexflasche (50 ml) eingewogen, mit 50 - 100 µl eines internen Standardgemisches der [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folate (0,4 - 0,5 µg/ml) und mit 10 ml MES-Puffer versetzt. Zusätzlich wurde ein Magnetkern hinzugegeben und die Probe verschlossen für 15 min auf einer Rührplatte bei Raumtemperatur equilibriert. Proben mit

**Tabelle 9.2:** Responsefaktoren (RF) für die Monoglutamate mit den entsprechenden internen Standards (ISTD) und ihr Gültigkeitsbereich in Form der Peakflächenverhältnisse (PFV).

Folat	ISTD	RF	s	VK [%]	PFV
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	1,248	0,013	1,1	0,07 - 52
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-HCO-H <sub>4</sub> folat	1,199	0,027	2,2	0,41 - 52
10-HCO-PteGlu	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,208	0,015	1,2	0,10 - 54
H <sub>4</sub> folat	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-H <sub>4</sub> folat	1,212	0,029	2,4	0,40 - 51
PteGlu	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PteGlu	1,022	0,032	3,2	0,39 - 52
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	1,234	0,014	1,1	0,21 - 21
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-HCO-H <sub>4</sub> folat	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-HCO-H <sub>4</sub> folat	1,164	0,007	0,6	0,13 - 12
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-PteGlu	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-PteGlu	1,099	0,013	1,1	0,12 - 11
<i>HyperClone</i>					
10-HCO-H <sub>2</sub> folat <sup>1</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,377	0,044	3,2	0,11 - 41
10-HCO-H <sub>2</sub> folat <sup>2</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,241	0,050	4,0	0,10 - 37
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat <sup>1</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	1,406	0,050	3,5	0,13 - 36
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat <sup>2</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	0,876	0,040	4,6	0,06 - 22
<i>YMC</i>					
10-HCO-H <sub>2</sub> folat <sup>1</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,149	0,056	4,9	0,09 - 31
10-HCO-H <sub>2</sub> folat <sup>2</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,259	0,066	5,3	0,09 - 18
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat <sup>1</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	1,056	0,057	5,5	0,10 - 10
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat <sup>2</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	1,057	0,094	8,9	0,10 - 11
MeFox <sup>1</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-10-HCO-PteGlu	1,496	0,063	4,2	0,03 - 320
MeFox	[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-MeFox	0,886	0,015	1,7	0,03 - 99

<sup>1</sup> in Elutionspuffer; <sup>2</sup> in MES-Puffer; MeFox = Pyrazino-s-Triazin; s = Standardabweichung;

VK = Variationskoeffizient

geringem Stärkegehalt wurden anschließend für 10 min in ein kochendes Wasserbad gegeben und danach sofort im Eisbad abgekühlt.

Alle Proben wurden mit 2 ml Hühnerpankreatin und 150 µl Rattenserum versetzt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad (100 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden alle Proben für 10 min in ein kochendes Wasserbad gegeben und danach sofort im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden die Proben geschüttelt, mit 10 ml Acetonitril versetzt, nochmals kurz geschwenkt und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation der Proben erfolgte für 20 min, bei 4 °C und 4000 rpm bzw. 3000 · g.

Der Überstand wurde über SAX-Kartuschen (starke Anionenaustauscher-Kartuschen) aufgereinigt. Die SAX-Kartusche wurde zuvor mit 2 Säulenvolumina Methanol (2 · 3ml) und nachfolgend mit 2 Säulenvolumina Equilibrierungspuffer konditioniert. Nach der Aufgabe der Probenlösung wurde die Kartusche mit 3 Säulenvolumina Equilibrierungspuffer gewaschen und trockengesaugt (20 - 30 s). Die Elution erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer in Braunglasvials (4 ml). Nach dem die Elutionslösung kurz geschüttelt wurde, erfolgte die Membranfiltration (PVDF, 22 µm) in Braunglasvials (1,5 ml). Die Proben wurden bis zur Messung entweder im Kühlschrank (1 - 2 Tage) oder im Gefrierfach aufbewahrt. Die Proben wurden während der Aufarbeitung, soweit es möglich war, abgedeckt bzw. abgedunkelt gehandhabt.

Parallel mit den Proben wurde eine Responselösung aus den [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Standards

**Tabelle 9.3:** Responsefaktoren (RF) für die Diglutamate mit den entsprechenden deuterierten Monoglutamaten als Interne Standards; über Differenzrechnung ermittelt.  $s$  = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient,  $N$  = Anzahl der Werte, die in den Mittelwert des Responsefaktors eingegangen ist.

	RF	s	VK [%]	N
5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	0,583	0,052	8,9	21
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	0,721	0,071	9,8	24
10-HCO-PteGlu <sub>2</sub>	0,774	0,131	17,0	24
H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub>	0,772	0,026	3,3	16
PteGlu <sub>2</sub>	0,480	0,068	14,1	16
10-HCO-H <sub>2</sub> PteGlu <sub>2</sub>	0,183	0,056	30,3	16

(50 - 100 µl) hergestellt, die auch zu den Proben dazugegeben wurden. Diese wurden mit je 50 µl der mit der HPLC-UV überprüften Standardlösungen (10 µg/ml) versehen und mit MES-Puffer auf 2 ml verdünnt. Die Messung erfolgte zusammen mit den Proben. Über diese Responserlösung wurde die aktuelle Konzentration der [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Standards ermittelt (Gleichung entsprechend Gleichung (9.1)). Die Konzentration von PteGlu<sub>3</sub> und PteGlu<sub>7</sub> wurde über die freigewordene Menge an PteGlu (über [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PteGlu) nach der Inkubation der PteGlu<sub>3</sub>- und PteGlu<sub>7</sub>-Lösung mit Rattenserum ermittelt.

Die Berechnung des Gehaltes (in µg/100 g berechnet als PteGlu) der einzelnen Folate in den Proben erfolgte dann nach folgender Gleichung<sup>2</sup>:

$$\omega(\text{Analyt}) = \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{interner Standard})} \cdot \frac{n(\text{interner Standard})}{RF} \cdot \frac{M(\text{PteGlu})}{EW \cdot 10} \quad (9.6)$$

Die Konzentration der in den Enzymlösungen enthaltenen Folate, die äquivalent zu den Proben erfolgte (Abweichung: 20 µl interner Standard Mix), wurde nachträglich abgezogen.

**Amylasebehandlung** Abweichend von der normalen Aufarbeitung wurde bei der Einwaage der Probe sogleich 10 mg  $\alpha$ -Amylase/g Lebensmittel zugegeben. Nach Zugabe der Internen Standards und 10 ml MES-Puffer wurde die Lösung für 2 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe entweder direkt mit Hühnerpankreatin versetzt und wie oben beschrieben weiter verfahren oder für 10 min in ein kochendes Wasserbad gegeben und erst anschließend mit Hühnerpankreatin versetzt oder der Proteasebehandlung unterzogen.

**Proteasebehandlung** Für die Proteasebehandlung wurde der Probe abweichend von der normalen Aufarbeitung bei der Einwaage oder nach der Amylasebehandlung 3 mg Protease/g Lebensmittel zugegeben und die Probenlösung (mit internen Standards und MES-Puffer) für 4 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde die Probenlösung für 10 min in ein kochendes Wasserbad gestellt und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von Hühnerpankreatin wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

<sup>2</sup>M = molare Masse (in ng/nmol  $\hat{=}$  g/mol); n = Stoffmenge (in nmol); EW = Einwaage (in g); der Faktor 10 ergibt sich aus der Umrechnung von ng in µg und in den im Lebensmittelbereich typischen Bezug auf 100 g

**optimierte Methode** Bei der optimierten Methode wurde eine kleinere Einwaage als bei der normalen Aufarbeitung verwendet. Diese lag in Abhängigkeit vom Lebensmittel, dem zu erwartenden Folatgehalt und dem Grad der unvollständigen Dekonjugation zwischen 0,12 - 1 g. Vom Hühnerpankreatin wurden 2 ml einer Lösung mit sechsfach höherem Enzymgehalt verwendet (1 mg/ml) und vom Rattenserum 300 µl statt 150 µl. Für eine Probe (Pistazien) wurden sogar 4 ml der konzentrierten Hühnerpankreatinlösung verwendet und 450 µl des Rattenserums.

### Versuche zu Stabilität und Umlagerungen

Für die Untersuchung der Stabilität von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat und 5,10-CH<sup>+</sup>-H<sub>4</sub>folat während der gesamten Aufarbeitung und während den einzelnen Schritten, wurden jeweils dreimal 100 µl einer Standardlösung (10 µg/ml) mit 400 µl der [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folate (0,4 - 0,5 µg/ml) versetzt und mit MES-Puffer auf 4 ml aufgefüllt. Aliquote dieser Lösungen (450 - 500 µl) wurden den einzelnen Schritten (kochen und Inkubation über Nacht bei 37 °C) und Kombinationen (Inkubation+kochen, kochen+Inkubation+kochen) unterzogen. Für die Untersuchung der gesamten Aufarbeitung (Inkubation + kochen + SPE oder kochen + Inkubation + kochen + SPE) wurden 1 - 2 ml in die Pyrexflaschen gegeben, die auch für die Aufarbeitung von Lebensmittelproben verwendet wurden, und mit 10 ml MES-Puffer versetzt. Anschließend erfolgte die für Lebensmittel typische Aufarbeitung.

### Validierung

**Nachweisgrenzen** Für die Nachweisgrenzen der über SIVA quantifizierten Folate (5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat, 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu, H<sub>4</sub>folat und PteGlu) wurde für vier Konzentrationsstufen jeweils dreimal 1,5 g Brot (Vollkornbrot) eingewogen und mit der entsprechenden Menge an Standardlösung (markiert oder/und unmarkiert) versetzt. Parallel wurde die Nachweisgrenze auch in reinen Lösungen (ohne Matrix) bestimmt. Die Konzentrationsstufen in Brot und reiner Lösung lagen ungefähr bei 0,2 µg/100 g, 0,8 µg/100 g, 1,4 µg/100 g und 2,0 µg/100 g. Anschließend wurden die [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folate zugegeben und die Proben der üblichen Aufarbeitung unterzogen (ohne zusätzlichen Kochschritt vor der Inkubation mit den Dekonjugasen). Die Berechnungen der Nachweisgrenzen erfolgte nach VOGELGESANG und HÄDRICH [164,165].

Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde ebenfalls Brot als Matrix verwendet. Da die Nachweisgrenze in der Endlösung bestimmt werden sollte, ohne dass die Wiederfindung eine Rolle spielt, wurde die Matrix ohne den Zusatz der Standards aufgearbeitet und erst im Nachhinein sowohl mit 10-HCO-H<sub>2</sub>folat als auch mit den [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folaten dotiert.

**Präzision** Für die Bestimmung der *intraday*-Präzision (Schwankungen innerhalb eines Tages/einer Messreihe bzw. Wiederholpräzision) wurden verschiedene Lebensmittel in Drei- oder Vierfachbestimmung aufgearbeitet und vermessen. Für Spinat (frisch), Camembert (Geramont cremig-leicht) und Weizenkeime (Vierfachbestimmung) wurde die ursprüngliche Methode (ohne Acetonitrilzugabe) verwendet. Bei der Erbsencremesuppe (Dreifachbestimmung) wurde die Probe anfangs wie üblich aufgearbeitet. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde sie jedoch in zwei Hälften geteilt, wobei die eine Hälfte mit dem gleichen Volumen an Acetonitril versetzt und erneut zentrifugiert wurde. Anschließend

erfolgte die übliche Aufreinigung über SAX-Kartuschen. Für die Kichererbsen und Weizenkeime (Dreifachbestimmung) wurde die für Proben mit unvollständiger Dekonjugation optimierte Methode angewendet.

Die Bestimmung der *interday*-Präzision erfolgte mit der ursprünglichen Methode am Beispiel von Spinat, Camembert und Weizenkeimen. Hierfür wurden die Proben an drei Tagen innerhalb von 2 Wochen aufgearbeitet und unabhängig voneinander vermessen. Am ersten Tag wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt und an den anderen beiden Tagen eine Doppelbestimmung. Die Ergebnisse der einzelnen Tage wurden jeweils gemittelt.

**Wiederfindung** Die Wiederfindung der über SIVA quantifizierten Folate wurde im Rahmen der Nachweisgrenzenbestimmung ermittelt.

Für 10-HCO-H<sub>2</sub>folat wurde die Wiederfindung separat zum einen durch die Dotierung von analytfreiem Brot mit einer 10-HCO-H<sub>2</sub>folat-Lösung ( $\cong 54 \mu\text{g}/100 \text{g}$ ) bestimmt und zum anderen über die Methode der Standardaddition. Hierfür wurde Spinat (jeweils 1 g), neben einer Doppelbestimmung, mit 5 Konzentrationsniveaus an 10-HCO-H<sub>2</sub>folat dotiert (3 - 20  $\mu\text{g}/100 \text{g}$ , mit äquidistanten Abständen zwischen den ersten 4 Konzentrationsniveaus und unter Auslassung eines Konzentrationsniveaus zwischen dem 4. und 5. Dotierungslevel).

Für die Wiederfindung von 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> wurde ebenfalls eine Standardaddition am Beispiel der Matrix Spinat durchgeführt. Damit das 5-HCO-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>2</sub> bei der Aufarbeitung nicht zu den Monoglutamaten dekonjugiert wird, wurde bei der Aufarbeitung kein Rattenserum zugegeben. Jeweils 1 g Spinat wurde mit drei Konzentrationsniveaus in äquidistanten Abständen dotiert (4 - 13  $\mu\text{g}/100 \text{g}$ ).

### 9.2.3 postcolumn infusion-Technik

Für die *postcolumn infusion*-Technik wurde eine 10-HCO-H<sub>2</sub>folat-Lösung durch Verdünnen mit Wasser (Millipore Anlage) in einer Konzentration hergestellt, die bei direkter Infusion ins Tandemmassenspektrometer ein Signal ergibt, welches mit der Intensität des 10-HCO-H<sub>2</sub>folats in den untersuchten Lebensmitteln bei normalem LC-MS/MS-Betrieb vergleichbar ist. Diese Standardlösung wurde, wie in Abbildung 9.1 dargestellt, mit Hilfe einer Spritzenpumpe kontinuierlich zusammen mit dem von der HPLC kommenden Fluss in das Tandemmassenspektrometer infundiert. Zuerst wurde der Elutionspuffer injiziert und über die LC-MS/MS vermessen. Direkt im Anschluss, ohne die Spritzenpumpe zu stoppen, wurde eine Lebensmittel-/Matrixprobe (weitestgehend analytfrei - von vornher-

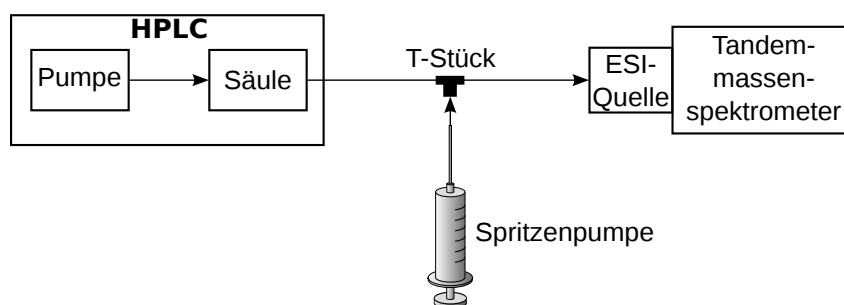


Abbildung 9.1: Schema der *postcolumn infusion*-Technik.

ein oder durch eine Aufarbeitung ohne Rattenserum) injiziert. Die einzelnen Messpunkte  $I_x$  wurden mit einem Glättungsfaktor ( $F=0,6$ ) und der Glättungsfunktion in Gleichung (9.7)

$$I(\text{smooth})_x = I_x \cdot F + I_{x+1} \cdot (F - 1) \quad (9.7)$$

geglättet. Anschließend wurde der Matrixeffekt an jedem einzelnen Messpunkt nach Gleichung (9.8)

$$ME = \left( \frac{I_{\text{Lebensmittel}}}{I_{\text{Puffer}}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (9.8)$$

berechnet und für alle Punkte in einem Zeit-Matrixeffekt-Diagramm dargestellt (Matrixprofil).

### 9.2.4 Affinitätschromatographie

**Probenvorbereitung** 0,06 g Weizenkeime wurden mit 5 ml MES-Puffer versetzt, Hühnerpankreatin und Rattenserum zugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Probe für 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt und im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 5 ml 0,1 mol/l-Phosphatpuffer (pH 7,0) zugegeben, die Probe zentrifugiert und membranfiltriert (0,45 µm-Membranfilter).

**Folsäurelösung für die Bestimmung des Bindungsvermögens der Affinitätssäule (maximale Beladung)** 50 µl einer Folsäurestammlösung (0,1 mg/ml) wurde mit 5 ml MES-Puffer versetzt und anschließend mit 0,1 mol/l-Phosphatpuffer (pH 7,0) auf 10 ml aufgefüllt.

**SPE** Die Lösung innerhalb der Affinitätssäule wurde bis kurz oberhalb des Geles abgelassen. Die Säule wurde mit 5 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,0) equilibriert und immer bis kurz oberhalb des Gels geleert. Anschließend folgte die Aufgabe der Probe bzw. der Folsäurelösung (10 ml). Die Säule wurde dann zweimal mit jeweils 5 ml Waschpuffer gewaschen und in mehreren Schritten eluiert (1 ml, 5 ml und 2 ml). In die Vorlage für das Eluat (bezogen auf 5 ml) wurden zuvor 200 µl einer 25 %igen Ascorbinsäurelösung und 40 µl 5 mol/l-Natronlauge vorgelegt. Nach der Elution wurden die [ $^2\text{H}_4$ ]-markierten Internen Standards zugegeben. Die Säule wurde am Ende mit 5 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, pH 7,0) gewaschen und zur Aufbewahrung mit 5 ml Natriumazidlösung gespült.

Die maximale Beladung für die Affinitätssäule betrug 1,0 µg PteGlu.

### 9.2.5 Mikrobiologisches Assay (MA)

Die Probenaufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die SIVA. 0,5 - 2 g eines Lebensmittels (bzw. 0,2 g für das gefriergetrocknete Referenzmaterial BCR 485) wurden in ein PET-50 ml-Zentrifugenglas eingewogen, 10 ml MES-Puffer zugegeben und bei nicht stärkehaltigen Proben für 10 min gekocht und im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 2 ml der Hühnerpankreatinlösung und 150 µl Rattenserum zugegeben und die Probe über Nacht in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe erneut für 10 min gekocht, im Eisbad abgekühlt, wieder auf Raumtemperatur temperiert und mit MES-Puffer auf 20 ml aufgefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (4000 rpm bzw. 3000 g, 4 °C, 20 min). Für den direkten Vergleich zwischen MA und LC-MS/MS wurde von dieser



Lösung 500 µl für das mikrobiologische Assay abgenommen und der Rest mit den Internen Standards für die SIVA versetzt. Die Lösung für das mikrobiologische Assay wurde in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit MA-Puffer verdünnt (z.B: 100 µl + 900 µl MA-Puffer) und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (steril) sterilfiltriert (RC-Membranfilter). Zur Überprüfung, ob inhibierende Substanzen das Assay stören, wurden zwei verschiedene Verdünnungen hergestellt, die beide innerhalb der Kalibrierung liegen sollten. Weiterhin wurde eine Kalibriergerade mit (6S)-5-HCO-H<sub>4</sub>folat und/oder (6S)-5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat vorbereitet (Verdünnung mit MA-Puffer und Sterilfiltration). Dabei handelte es sich um die Hauptfolate der untersuchten Lebensmittel (Folate mit dem größten Anteil an der Folatverteilung).

Die benötigte Menge an Kavitäten wurde aus der Verpackung (Kit von R-Biopharm) entnommen und in einen Mikrotiterplattenrahmen eingeklickt. In jede Kavität wurden der Anleitung folgend zuerst 150 µl des Mediums pipettiert und anschließend 150 µl der Standardlösungen (für die Kalibrierung) bzw. der verdünnten Probelösungen. Die Kavitäten wurden mit einer selbstklebenden Folie (Kit) abgedeckt und für 46 h in einem kleinen Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen in den Kavitäten über Kopf aufgeschüttelt und die Trübung der Lösungen bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte über eine kubische Gleichung mit der Auswertesoftware von R-Biopharm (Spline).

## 9.3 Humanstudie (Vorstudie)

Die Vorstudie zur Resorption des Pyrazino-s-Triazins erfolgte mit einem Probanden (48 Jahre, männlich, BMI <25). 3 h nach einem Frühstück mit 150 g Joghurt, der sowohl wenig Folat (5 µg/100 g) als auch kaum Pyrazino-s-Triazin (0,8 µg/100 g) enthielt (Gesamtaufnahme: 8 µg bzw. 19 nmol Folat und 1,2 µg bzw. 2,7 nmol Pyrazino-s-Triazin), wurde dem Probanden Blut abgenommen, um die Grundkonzentration mit Folaten und Pyrazino-s-Triazin im Plasma zu ermitteln (0 h). Direkt im Anschluss wurde Couscous als Testmahlzeit gereicht (17 µg/100 g Folat und 603 µg/100 g Pyrazino-s-Triazin; Gesamtaufnahme: 44 µg bzw. 99 nmol Folat und 1506 µg bzw. 3182 nmol Pyrazino-s-Triazin). Im 1,5 h-Rhythmus wurde Blut abgenommen und direkt im Anschluss das Plasma gewonnen (Heparinplasma). Dieses wurde zeitnah mit Ascorbinsäure versetzt (20 g/l; 10 - 15 min nach der Blutabnahme).

2 ml des Plasmas wurde mit [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiertem Pyrazino-s-Triazin und mit den [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-markierten Folaten versetzt und mit der üblichen LC-MS/MS-Methode aufgearbeitet und analysiert.

## 9.4 *in vitro*-Verdau

### 9.4.1 Darmpräparation

1 - 5 Därme wurden am Morgen frisch vom Metzger geholt (Transport auf Eis) und sofort weiterverarbeitet. Die ersten 10 cm (Duodenum) wurden verworfen und der folgende 1/2 bis 3/4 m verwendet. Der Darm wurde mit Hilfe eines scharfkantigen Objektträgers aufgeschnitten und kurz in einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung gewaschen. Die Darmmukosa wurde mit Hilfe des Objektträgers unter leichtem Druck vorsichtig abgeschabt und durch Rühren weitestgehend homogenisiert.

### 9.4.2 Aufreinigung der Darmmukosa (Differentialzentrifugation)

1 g der Darmmukosa wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 30 - 35 ml Tris-Mannitol-Puffer versetzt und für 20 s bei 10 500 rpm mittels Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend wurde mit dem Puffer auf 50 ml aufgefüllt, 0,055 g  $\text{CaCl}_2$  zugegeben, geschüttelt und für 10 min mit Hilfe eines Magnetkerns auf Eis gerührt, wobei zusätzlich ab und zu geschüttelt wurde. Die Suspension wurde 15 min bei 4 °C und 3000 rpm bzw.  $\sim 2000 \cdot g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 20 min bei 5 °C und 20 000  $\cdot g$  zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgossen wurde, konnte das durch Differentialzentrifugation gewonnene Pellet in 1 ml Tris-Mannitol-Puffer suspendiert werden.

Die aufgereinigte Darmmukosa, bzw. die gewonnene Bürstensaummembrandekongjugase, wurde für die Bestimmung des optimalen pH-Bereiches verwendet (Aktivitätsmessung). Dafür wurde jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer PteGlu<sub>3</sub>- (7,4  $\mu\text{mol/l}$ ) oder PteGlu<sub>7</sub>-Lösung (3,8  $\mu\text{mol/l}$ ) mit 50  $\mu\text{l}$  [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-PteGlu-Lösung sowie 1 ml Puffer versetzt (MES-Puffer bei pH 5,5 oder 6,5 oder Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5; jeweils mit Zinkacetat-Dihydrat (0,1 mmol/l)) und für 1 h im Schüttelwasserbad inkubiert (37 °C). Anschließend wurde die Lösung für 10 min in ein kochendes Wasserbad gegeben und direkt im Anschluss im Eisbad gekühlt. Die Lösung wurde membranfiltriert (PVDF, 22  $\mu\text{m}$ ) und mittels LC-MS/MS vermessen.

### 9.4.3 Durchführung der Verdauungssimulation

#### allgemeine Vorgehensweise

Die Proben (5 g Lebensmittel oder 1 ml frisch hergestellte Standardlösung, 10  $\mu\text{g/ml}$ , in Phosphatpuffer, pH 5 oder pH 7) wurden in 100 ml-Duran-Flaschen eingewogen, mit 100  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäurelösung und mit 33 ml synthetischem Magensaft (oder mit Salzsäure auf pH 2 eingestelltes destilliertes Wasser) versetzt und danach für 2 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert, dabei wurde der pH-Wert mit 1 mol/l-Salzsäurelösung 50  $\mu\text{l}$ -weise und einer Totzeit von 40 s auf einen pH-Wert von 2,0 titriert und bei diesem pH-Wert konstant gehalten (pH-stat-Methode). Anschließend wurde der Kompakttitrator mit 1 mol/l-Natriumhydrogencarbonatlösung befüllt, 33 ml synthetischer Darmsaft (oder 0,1 %ige Natriumhydrogencarbonatlösung) und 5 g Darmmukosa zur Probe zugegeben und diese dann für 4 h inkubiert, dabei wurde mit 1 mol/l-Natriumhydrogencarbonatlösung für 3 h ein pH-Wert von 5,5 eingestellt und gehalten. Anschließend wurde für 1 h ein pH-Wert von 6,5 eingestellt.

Die Probe wurde nach dem Verdau in 100 ml-Braunglasmesskolben überführt, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und ein Teil der Probe zentrifugiert (4000 rpm bzw. 3000  $\cdot g$ , 4 °C, 20 min). 5 ml des Überstandes wurden mit 5 ml MES-Puffer und Internen Standards versetzt und mit dem üblichen Clean-up aufgereinigt bzw. teilweise über Nacht mit Hühnerpankreatin und Rattenserum inkubiert (für die Bestimmung des Gesamtfolatgehaltes) und anschließend aufgereinigt.

Die statistische Auswertung zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Lebensmittel zur Biozugänglichkeit, Gesamtwiederfindung und Dekonjugationseffizienz erfolgte über die erweiterte Messunsicherheit, wobei die Standardabweichungen aus den Variationskoeffizienten der üblichen Schwankungen der Simulation (Abschnitt 4.2.1) berechnet wurden. Bei Mehrfachbestimmungen (z.B. bei der Extraktionseffizienz) wurde der t-Test verwendet.

### zeitaufgelöste Verdauungssimulation des 5-HCO-H<sub>4</sub>folats

Für die Bestimmung der zeitaufgelösten Zusammensetzung der 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Lösung wurde während der Simulation des Magens im Abstand von 30 min 500 µl entnommen, mit 50 µl [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Folatmix versetzt und direkt im Anschluss mit der LC-MS/MS vermessen. Während der Darmstufe wurde jeweils 1 ml der Verdaulösung entnommen und ebenfalls mit 50 µl [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Folatmix versetzt. Die Entnahme der Volumina wurde in der Berechnung berücksichtigt.

### Vorversuche zur Dekonjugation

2 ml einer PteGlu<sub>3</sub>-Lösung (2,5 µg/ml, berechnet als PteGlu) wurde der Verdauungssimulation in 4 Varianten unterworfen: 1.) kein Zusatz der simulierten Verdauungssäfte und kein Zusatz des Darmes, 2.) Zugabe der simulierten Verdauungssäfte, 3.) Zugabe von 0,5 g Darm und 4.) Zugabe der simulierten Verdauungssäfte und von 0,5 g Darm. Der Darm wurde nach 30 min zur Darmstufe hinzugegeben. Das pH-Profil der Darmstufe verlief abweichend von der oben angegebenen Vorgehensweise: 2,5 h bei pH 5,5, 1 h bei pH 6,5 und anschließend 0,5 h bei pH 7,5.

#### 9.4.4 Stärkenachweis

500 µl der Weizenkeimverdaulösung (direkt nach der Verdauungssimulation gekocht) und 500 µl destilliertes Wasser bzw. 500 µl einer Weizenkeimlösung (gleiche Konzentration wie bei der Verdauungssimulation; gekocht) und 500 µl einer reinen Enzymlösung, die der Verdauungssimulation unterworfen und anschließend gekocht wurde, wurden für ≈20 min stehen gelassen, damit sich große Schwebeteilchen absetzen konnten. Für den optischen Vergleich wurde anschließend davon je 200 µl mit 800 µl Wasser verdünnt und 50 µl Lugolsche Lösung zugegeben, bzw. für die Photometrie 100 µl mit 900 µl Wasser verdünnt, 50 µl Lugolsche Lösung zugeben und sofort bei 660 nm vermessen. Als Blindwert wurde die gleiche Verdünnung verwendet, nur statt der Lugolschen Lösung wurde 50 µl destilliertes Wasser zugegeben.

#### 9.4.5 Quantifizierung der freien Aminosäuren und des Gesamtgehaltes an Aminosäuren

Es handelt sich um eine Methode an der BIOANALYTIK Weihenstephan/Freising nach VDLUFA. Für die Bestimmung der freien Aminosäuren in den Weizenkeimen, der Enzymlösung und der Verdaulösung wurde eine äquivalente Menge bzgl. der Weizenkeimeinwaage verwendet. Die Probe bzw. die Lösungen wurden mit 0,2 mol/l Salzsäure versetzt, für 30 min gerührt, auf einen pH-Wert von 2,20 eingestellt und mit dem Internen Standard Norleucin versetzt. Nach einer Membranfiltration erfolgt die Injektion in den Aminosäure-Analysator. Dieser beruht auf dem Trennprinzip der Ionenaustauscherchromatographie. Die Detektion erfolgt mittels Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin durch UV bei 570 nm.

Für die Quantifizierung des Gesamtgehaltes an Aminosäuren wurde zu Beginn eine Hydrolyse mit 6 mol/l (über Nacht bei 110 °C) durchgeführt und anschließend entsprechend der Methode für die freien Aminosäuren verfahren.

### 9.4.6 Quantifizierung der Fettsäuren - gesamt und frei

Die Quantifizierung der freien Fettsäuren erfolgte nach einer Methode von FIRL et al. [225] in der Versuchsstation Thalhausen (BIOANALYTIK Weihenstephan). Dafür wurde die Probe(-lösung) mittels einer Ultraschallsonotrode und eines Chloroform-Methanol-Gemisches extrahiert. Als interner Standard wurde die Margarinsäure (C17:0) verwendet. Die Chloroformphase wurde eingedampft und der Rückstand wieder in Chloroform aufgenommen und anschließend über eine Aminopropyl-SPE aufgereinigt bzw. in eine freie-Fettsäuren-Fraktion aufgetrennt (neben einer Neutrallipid und einer Phospholipidfraktion). Nach der Elution wurde die Fraktion der freien Fettsäuren eingedampft, in MTBE aufgenommen, mit TMSH umgesetzt und mittels GC-FID vermessen.

Für das Gesamtfettsäuremuster wurde ein C13-Triacylglycerid als interner Standard verwendet, die Extraktion erfolgte analog zu den freien Fettsäuren, jedoch ohne anschließende Fraktionierung mittels SPE. Anschließend wurden die Proben ebenfalls in MTBE aufgenommen, mit TMSH umgesetzt und direkt mittels GC-FID vermessen.

## 9.5 Statistische Auswertungen

Literaturquellen: [237–239]

### Arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (9.9)$$

$x$  = Messwert,  $N$  = Anzahl der Messwerte

### Standardabweichung

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (9.10)$$

### Standardabweichung des Mittelwertes

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{N}} \quad (9.11)$$

### Variationskoeffizient

$$VK = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (9.12)$$

### Ausreißertest nach Nalimov

$$PW = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s_x} \cdot \sqrt{\frac{N}{N - 1}} \quad (9.13)$$

$x^*$  = ausreißerverdächtiger Wert

Prüfwert  $PW \leq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $N$ )  $\Rightarrow$  kein Ausreißer

$PW >$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $N$ )  $\Rightarrow$  Ausreißer

### Ausreißertest nach Dixon

Für 3 - 7 Messwerte ( $N$ ):

$$PW = \frac{x_2 - x_1}{x_N - x_1} \quad (9.14)$$

bzw.

$$PW = \frac{x_N - x_{N-1}}{x_N - x_1} \quad (9.15)$$

Prüfwert  $PW \leq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $N$ )  $\Rightarrow$  kein Ausreißer

$PW >$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $N$ )  $\Rightarrow$  Ausreißer

**Anmerkung:** Dieser Ausreißertest kam in Abschnitt 3.1.1 mit einer statistischen Sicherheit von  $P = 90\%$  zur Anwendung.

### Einfacher t-Test

$$PW = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s_x} \cdot \sqrt{N} \quad (9.16)$$

$\mu_0 =$  Sollwert oder Grenzwert

$PW \leq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $f = N - 1$ )  $\Rightarrow \bar{x} = \mu_0$

$PW \geq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 99\%$ ,  $f$ )  $\Rightarrow \bar{x} \neq \mu_0$

$f =$  Freiheitsgrade

### Doppelter t- Test

$$PW = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_g} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}} \quad (9.17)$$

mit

$$s_g = \sqrt{\frac{f_1 \cdot s_1^2 + f_2 \cdot s_2^2}{f_1 + f_2}} \quad (9.18)$$

$PW \leq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 95\%$ ,  $f_g = f_1 + f_2$ )  $\Rightarrow \bar{x} = \mu_0$

$PW \geq$  kritischer Wert (statistische Sicherheit  $P = 99\%$ ,  $f_g$ )  $\Rightarrow \bar{x} \neq \mu_0$

### Erweiterte Messunsicherheit, nach [240]

$$U_\Delta = 2 \cdot \sqrt{s_{\bar{x}_1}^2 + s_{\bar{x}_2}^2} \quad (9.19)$$

und

$$\Delta c = |c_1 - c_2| \quad (9.20)$$

$c =$  Konzentration,  $2 =$  Erweiterungsfaktor  $k$  ( $\sim$  Konfidenzlevel von  $95\%$ )

$\Delta c \leq U_\Delta \Rightarrow c_1$  und  $c_2$  sind nicht signifikant verschieden

**Prüfung auf Normalverteilung nach David**

$$PW = \frac{x_{max} - x_{min}}{s_x} \quad (9.21)$$

Eine Normalverteilung liegt vor, wenn der Prüfwert PW zwischen gewissen Grenzen liegt (P = 90 %, N).

**Linearitätstest nach Mandel**

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad (9.22)$$

mit

$$DS = (N - 2) \cdot S_{y_1}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2 \quad (9.23)$$

$s_{y_1}$  und  $s_{y_2}$  = Reststandardabweichung

$$s_{y_{1|2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{f}} \quad (9.24)$$

lineare Funktion:  $\hat{y}_i = a + bx_i$  (Berechnung aus der Kalibriergeraden),  $f = N - 2$

quadratische Funktion:  $\hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2$  (Berechnung aus der Kalibriergeraden),  $f = N - 3$

$PW \leq F$  (F-Test,  $P = 99\%$ ,  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = N - 3$ )  $\Rightarrow$  es spricht nichts gegen eine lineare Kalibrierung

**Trendtest nach Neumann**

$$PW = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} (x_i - x_{i+1})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (9.25)$$

Messwerte müssen in chronologischer Reihenfolge geordnet sein.

$PW \leq$  kritischer Wert (P = 99 %, N)  $\Rightarrow$  Trend

$PW >$  kritischer Wert (P = 95 %, N)  $\Rightarrow$  kein Trend

# Literaturverzeichnis

- [1] P. J. STOVER: *Folate Biochemical Pathways and Their Regulation*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [2] B. FOWLER: *The folate cycle and disease in humans*. *Kidney International* **59**(78), S. S221–S229 (2001).
- [3] K. ROBINSON: *Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease*. *Heart* **83**(2), S. 127–130 (2000).
- [4] P. J. STOVER: *Physiology of folate and vitamin B<sub>12</sub> in health and disease*. *Nutrition Reviews* **62**(s1), S. S3–S12 (2004).
- [5] U. HINTERBERGER: *Der C1-Stoffwechsel*. *Zeitschrift für Chemie* **5**(2), S. 41–56 (1965).
- [6] R. ZHAO, L. H. MATHERLY und I. D. GOLDMAN: *Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues*. *expert reviews in molecular medicine* **11** (2009).
- [7] E. L. STOKSTAD und J. KOCH: *Folic acid metabolism*. *Physiol. Rev* **47**, S. 83–116 (1967).
- [8] E. ARNESEN et al.: *Serum total homocysteine and coronary heart-desease*. *International Journal of Epidemiology* **24**(4), S. 704–709 (1995).
- [9] *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Neuer Umschau Buchverlag, Neustadt an der Weinstraße, 1. Aufl. (2013). 5. korrigierter Nachdr.
- [10] A. E. CZEIZEL und I. DUDAS: *Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation*. *The New England journal of medicine* **327**(26), S. 1832–1835 (1992).
- [11] O. R. FENNEMA: *Food chemistry*. Dekker, New York, 3. Aufl. (1996).
- [12] G. F. M. BALL: *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. Chapman & Hall, London [u.a.], 1. Aufl. (1998), S. 439–496.
- [13] M. M. WEI und J. F. GREGORY: *Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: Potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamyl folate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(1), S. 211–219 (1998).
- [14] S. D. BHANDARI und J. F. GREGORY: *Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity*. *American Journal of Clinical Nutrition* **51**(1), S. 87–94 (1990).

- [15] E. SEYOUM und J. SELHUB: *Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action*. Journal of Nutrition **128**(11), S. 1956–1960 (1998).
- [16] MCNULTY H. und PENTIEVA K.: *Folate Bioavailability*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [17] I. A. BROUWER et al.: *Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man*. Nutrition Research Reviews **14**(2), S. 267–293 (2001).
- [18] J. F. GREGORY et al.: *Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl tetrahydrofolates and folic acid in human subjects*. American Journal of Clinical Nutrition **55**(6), S. 1147–1153 (1992).
- [19] S. MÖNCH: *Methodenentwicklung und -optimierung der Stabilisotopenassays von Fولاتen in Lebensmitteln und Humanproben unter spezieller Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit der Lebensmittelfolate*. Dissertation, Technische Universität München, München (2010).
- [20] P. ETCHEVERRY, M. A. GRUSAK und L. E. FLEIGE: *Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, and E*. Frontiers in physiology **3**, S. 317 (2011).
- [21] M. VERWEI: *Bioavailability of folate from fortified milk products*. Dissertation, Wageningen University, Wageningen (2004).
- [22] J. F. GREGORY, E. P. QUINLIVAN und DAVIS: *Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification*. Trends in Food Science & Technology **16**(6-7), S. 229–240 (2005).
- [23] J. ARCOT und A. SHRESTHA: *Folate: methods of analysis*. Trends in Food Science & Technology **16**(6-7), S. 253–266 (2005).
- [24] A. FREISLEBEN, P. SCHIEBERLE und M. RYCHLIK: *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**(2), S. 247–255 (2003).
- [25] C. PFEIFFER, J. F. DIEHL und W. SCHWACK: *Nahrungsfolate - Eine aktuelle Übersicht: Stabilität, Physiologische Bedeutung, Bioverfügbarkeit, analytische Bestimmungsmethoden, Einfluss der Lebensmittelbehandlung*. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft **33**(2), S. 85–119 (1994).
- [26] M. RYCHLIK: *Revised folate content of foods determined by stable isotope dilution assays*. Journal of Food Composition and Analysis **17**(3-4), S. 475–483 (2004).
- [27] A. FREISLEBEN, P. SCHIEBERLE und M. RYCHLIK: *Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **376**(2), S. 149–156 (2003).



- [28] T. H. HYUN und T. TAMURA: *Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review*. *Experimental Biology and Medicine* **230**(7), S. 444–454 (2005).
- [29] S. RUGGERI et al.: *Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* **855**(1), S. 237–245 (1999).
- [30] M. S. KARILUOTO, L. T. VAHTERISTO und V. I. PIIRONEN: *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**(9), S. 938–942 (2001).
- [31] M. RYCHLIK et al.: *Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays*. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**(5), S. 411–419 (2007).
- [32] S. MÖNCH und M. RYCHLIK: *Improved Folate Extraction and Tracing Deconjugation Efficiency by Dual Label Isotope Dilution Assays in Foods*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(6), S. 1363–1372 (2012).
- [33] B. E. BUETTNER et al.: *Quantification of isotope-labelled and unlabelled folates in plasma, ileostomy and food samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**(1), S. 429–439 (2011).
- [34] D. R. ROBINSON: [184] *The nonenzymatic hydrolysis of  $N^5, N^{10}$ -methenyltetrahydrofolic acid and related reactions*. In: D. B. MCCORMICK und L. D. WRIGHT (Hg.): *Vitamins and Coenzymes*, Bd. 18, Part B von *Methods in Enzymology*, S. 716 – 725. Academic Press (1971).
- [35] M. MAY et al.: *Synthetic and Degradative Investigations of the Structure of Folinic Acid-SF*. *Journal of the American Chemical Society* **73**(7), S. 3067–3075 (1951).
- [36] D. R. PHILLIPS und A. J. WRIGHT: *Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates*. *British Journal of Nutrition* **47**(2), S. 183–189 (1982).
- [37] C. M. PFEIFFER et al.: *Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay*. *Clinical Chemistry* **50**(2), S. 423–432 (2004).
- [38] W. WEBER et al.: *Quantitation of Vitamins using Microbiological Assays in Microtiter Formats*. In: M. RYCHLIK (Hg.): *Fortified foods with vitamins*. Wiley-VCH, Weinheim (2011).
- [39] J. E. BAGGOTT und T. TAMURA: *Bioactivity of orally administered unnatural isomers, [6R]-5-formyltetrahydrofolate and [6S]-5,10-methenyltetrahydrofolate, in humans*. *Biochemica et Biophysica ACTA-General Subjects* **1472**(1-2), S. 323–332 (1999).

- [40] J. C. FONTECILLA-CAMPS et al.: *Absolute Configuration of Biological Tetrahydrofolates. A Crystallographic Determination*. Journal of the American Chemical Society **101**(20), S. 6114–6115 (1979).
- [41] INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY und INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY: *Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds: Recommendations 1986 (prepared for publication by Cornish-Bowden, A.)*. Pure and Applied Chemistry **59**(6), S. 833–836 (1987).
- [42] J. LEICHTER, A. F. LANDYMORE und C. L. KRUMDIECK: *Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content*. American Journal of Clinical Nutrition **32**(1), S. 92–95 (1979).
- [43] E. J. KONINGS et al.: *Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods*. American Journal of Clinical Nutrition **73**(4), S. 765–776 (2001).
- [44] A. MELSE-BOONSTRA et al.: *Influence of processing on total, monoglutamate and polyglutamate folate contents of leeks, cauliflower, and green beans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(12), S. 3473–3478 (2002).
- [45] A. W. MUNYAKA et al.: *Acidification, crushing and thermal treatments can influence the profile and stability of folate poly-gamma-glutamates in broccoli (*Brassica oleracea L. var. italica*)*. Food Chemistry **117**(3), S. 568–575 (2009).
- [46] C. WANG, K. M. RIEDL und S. J. SCHWARTZ: *A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables*. Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **878**(29), S. 2949–2958 (2010).
- [47] S. NDAW et al.: *Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates*. Journal of Chromatography A **928**(1), S. 77–90 (2001).
- [48] E. J. KONINGS: *A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour*. Journal of AOAC International **82**(1), S. 119–127 (1999).
- [49] A. W. MUNYAKA et al.: *Influence of Thermal Processing on Hydrolysis and Stability of Folate Poly-gamma-glutamates in Broccoli (*Brassica oleracea var. italica*), Carrot (*Daucus carota*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(7), S. 4230–4240 (2010).
- [50] L. C. GARRATT et al.: *Comprehensive metabolic profiling of mono- and polyglutamated folates and their precursors in plant and animal tissue using liquid chromatography/negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(17), S. 2390–2398 (2005).
- [51] J. D. O'BROIN et al.: *Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid*. American Journal of Clinical Nutrition **28**(5), S. 438–444 (1975).

- [52] R. L. BLAKLEY: *The Biochemistry of the Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1969), S. 58–105.
- [53] E. P. QUINLIVAN, A. D. HANSON und J. F. GREGORY: *The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples*. Analytical Biochemistry **348**(2), S. 163–184 (2006).
- [54] L. S. REED und M. C. ARCHER: *Oxidation of Tetrahydrofolic acid by air*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **28**(4), S. 801–805 (1980).
- [55] S. D. WILSON und D. W. HORNE: *Evaluation of ascorbic acid in protecting labile folic acid derivatives*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences **80**(21), S. 6500–6504 (1983).
- [56] J. F. GREGORY III: *Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates*. Advances in food and nutrition research **33**, S. 1–101 (1989).
- [57] M. J. OSBORN, P. T. TALBERT und F. M. HUENNEKENS: *The Structure of Active Formaldehyde ( $N^5, N^{10}$ -Methylene Tetrahydrofolic Acid)*. Journal of the American Chemical Society **82**(18), S. 4921–4927 (1960).
- [58] V. D. BROUWER et al.: *pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates*. Phytochemical Analysis **18**(6), S. 496–508 (2007).
- [59] S. D. WILSON und D. W. HORNE: *High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of the Distribution of Naturally-Occurring Folic Acid Derivatives in Rat Liver*. Analytical Biochemistry **142**(2), S. 529–535 (1984).
- [60] K. O. DONALDSON und J. C. KERESZTESY: *Naturally occurring forms of Folic Acid .III. Characterization and properties of 5-methyldihydrofolate, an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate*. Journal of Biological Chemistry **237**(12), S. 3815–3819 (1962).
- [61] G. R. GAPSKI, J. M. WHITELEY und F. M. HUENNEKENS: *Hydroxylated Derivatives of 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate*. Biochemistry **10**(15), S. 2930–2934 (1971).
- [62] J. A. JONGEJAN, H. I. X. MAGER und W. BERENDS: *Autoxidation of 5-Alkyl-Tetrahydropteridines. The Oxidation Product of 5-Methyl-THF*. In: R. L. KISLIUK und G. M. BROWN (Hg.): *Chemistry and Biology of Pteridines*. Elsevier/North-Holland, New York (1979).
- [63] J. M. WHITELEY und A. RUSSELL: *Structural reassignment of the peroxide oxidation-product of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate*. Biochemical and Biophysical Research Communications **101**(4), S. 1259–1265 (1981).
- [64] R. HANNISDAL, P. M. UELAND und A. SVARDAL: *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Folate and Folate Catabolites in Human Serum*. Clinical Chemistry **55**(6), S. 1147–1154 (2009).

- [65] R. HANNISDAL et al.: *Analytical Recovery of Folate Degradation Products Formed in Human Serum and Plasma at Room Temperature*. *Journal of Nutrition* **139**(7), S. 1415–1418 (2009).
- [66] R. HANNISDAL et al.: *Analytical Recovery of Folate and Its Degradation Products in Human Serum Stored at -25 degrees C for up to 29 Years*. *Journal of Nutrition* **140**(3), S. 522–526 (2010).
- [67] Z. FAZILI und C. M. PFEIFFER: *Accounting for an Isobaric Interference Allows Correct Determination of Folate Vitamers in Serum by Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Tandem MS*. *Journal of Nutrition* **143**(1), S. 108–113 (2013).
- [68] Z. FAZILI et al.: *A high-throughput LC-MS/MS method suitable for population biomonitoring measures five serum folate vitamers and one oxidation product*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**(13), S. 4549–4560 (2013).
- [69] B. SHANE: *Folate Chemistry and Metabolism*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [70] H.-K. BIESALSKI, S. NOWITZKI-GRIMM und P. GRIMM: *Taschenatlas der Ernährung*. Thieme, Stuttgart, 4. Aufl. (2007).
- [71] M. RYCHLIK und S. ASAM: *Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik*. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **21**, S. 470–482 (2009).
- [72] K. AISO und T. TAMURA: *Trienzyme treatment for food folate analysis: Optimal pH and incubation time for alpha-amylase and protease treatments*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **44**(3), S. 361–370 (1998).
- [73] S. PANDRANGI und L. F. LABORDE: *Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach*. *International Journal of Food Science and Technology* **39**(5), S. 525–532 (2004).
- [74] L. CHEN und R. R. EITENMILLER: *Optimization of the trienzyme extraction for the microbiological assay of folate in vegetables*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(10), S. 3884–3888 (2007).
- [75] G. ORSOMANDO et al.: *Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates*. *Journal of Biological Chemistry* **280**(32), S. 28877–28884 (2005).
- [76] L. T. VAHTERISTO et al.: *Improvements in the analysis of reduced folate mono-glutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(2), S. 477–482 (1996).
- [77] C. M. PFEIFFER, L. M. ROGERS und J. F. GREGORY: *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**(2), S. 407–413 (1997).

- [78] V. D. BROUWER et al.: *Optimisation and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for folates in rice*. Journal of Chromatography A **1215**(1-2), S. 125–132 (2008).
- [79] V. D. BROUWER et al.: *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice*. Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **878**(3-4), S. 509–513 (2010).
- [80] C. H. HALSTED: *The intestinal absorption of folates*. American Journal of Clinical Nutrition **32**(4), S. 846–855 (1979).
- [81] G. W. HEPNER et al.: *Absorption of crystalline folic acid in man*. Lancet **2**(7563), S. 302–306 (1968).
- [82] S. AUFREITER et al.: *Folate is absorbed across the colon of adults: evidence from cecal infusion of  $^{13}\text{C}$ -labeled [6S]-5-formyltetrahydrofolic acid*. American Journal of Clinical Nutrition **90**(1), S. 116–123 (2009).
- [83] M. JÄGERSTAD, H. DENCKER und A. K. WESTESSON: *The Hydrolysis and Absorption of Conjugated Folates in Man*. Scandinavian Journal of Gastroenterology **11**(3), S. 283–287 (1976).
- [84] A. V. HOFFBRAND und T. J. PETERS: *Recent advances in knowledge of clinical and biochemical aspects of folate*. Schweizerische Medizinische Wochenschrift **100**(46), S. 1954–1960 (1970).
- [85] T. T. WANG, A. M. REISENAUER und C. H. HALSTED: *Comparison of Folate Conjugase Activities in Human, Pig, Rat and Monkey Intestine*. Journal of Nutrition **115**(6), S. 814–819 (1985).
- [86] C. J. CHANDLER, T. T. WANG und C. H. HALSTED: *Pteroylpolyglutamate Hydrolase from Human Jejunal Brush Borders - Purification and Characterization*. Journal of Biological Chemistry **261**(2), S. 928–933 (1986).
- [87] A. M. REISENAUER, C. L. KRUMDIECK und C. H. HALSTED: *Folate Conjugase - Two Separate Activities in Human Jejunum*. Science **198**(4313), S. 196–197 (1977).
- [88] I. CHANARIN und J. PERRY: *Evidence for reduction and methylation of folate in the intestine during normal absorption*. The Lancet **294**(7624), S. 776–778 (1969).
- [89] J. PERRY und I. CHANARIN: *Intestinal Absorption of Reduced Folate Compounds in Man*. British Journal of Haematology **18**(3), S. 329–339 (1970).
- [90] J. PERRY und I. CHANARIN: *Formylation of Folate as Step in Physiological Folate Absorption*. British Medical Journal **2**(5866), S. 588–589 (1973).
- [91] P. CHEN et al.: *Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease*. Advances in Enzyme Regulation **39**(1), S. 93–109 (1999).

- [92] J. D. FINKELSTEIN: *Methionine metabolism in mammals*. The Journal of nutritional biochemistry **1**(5), S. 228–237 (1990).
- [93] L. HANNIBAL, A. GLUSHCHENKO und D. JACOBSEN: *Folate and Vascular Disease*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [94] B. C. BLOUNT et al.: *Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(7), S. 3290–3295 (1997).
- [95] W. S. BECK: *Diagnosis of megaloblastic-anemia*. Annual Review of Medicine **42**, S. 311–322 (1991).
- [96] FOOD und NUTRITION BOARD - INSTITUTE OF MEDICINE: *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid, biotin, and choline*. National Academy Press, Washington and D.C (1998).
- [97] J. J. OTTEN, J. P. HELLWIG und L. D. MEYERS: *DRI, dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements*. National Academies Press, Washington and D.C (2006).
- [98] *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Umschau, Neustadt an der Weinstrasse, 1. Aufl. (2008). 3., vollst. durchges. und korr. Nachdr.
- [99] J. CHEN et al.: *Folate and Cancer: Epidemiological Perspective*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [100] E. J. KONINGS et al.: *Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma - Results from the Netherlands Cohort Study*. Cancer **95**(7), S. 1421–1433 (2002).
- [101] B. BÜTTNER: *Analysis of intact Folate and Folate Catabolites in Bioavailability and Stability Studies using Stable Isotope, Ileostomy and Breast Milk Designs*. Dissertation, Technische Universität München, München (2014).
- [102] S. MÖNCH et al.: *Quantitation of folates and their catabolites in blood plasma, erythrocytes, and urine by stable isotope dilution assays*. Analytical Biochemistry **398**(2), S. 150–160 (2010).
- [103] J. D. M. PATRING et al.: *Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis*. Analytica Chimica Acta **553**(1-2), S. 36–42 (2005).
- [104] B. SHANE, T. TAMURA und E. L. R. STOKSTAD: *Folate Assay: A Comparison of Radioassay and Microbiological Methods*. Clinica Chimica Acta **100**(1), S. 13–19 (1980).
- [105] T. TAMURA et al.: *Lactobacillus casei Response to Pteroylpolyglutamates*. Analytical Biochemistry **49**(2), S. 517–521 (1972).

- [106] J. LEICHTER, C. E. BUTTERWORTH und C. L. KRUMDIECK: *Partial-Purification and some Properties of Pteroylpolyglutamate Hydrolase (Conjugase) from Chicken Pancreas*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **154**(1), S. 98–101 (1977).
- [107] D. W. HORNE, C. L. KRUMDIECK und C. WAGNER: *Properties of Folic-Acid  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase Hydrolase (Conjugase) in Rat Bile and Plasma*. Journal of Nutrition **111**(3), S. 442–449 (1981).
- [108] B. P. F. DAY und J. F. GREGORY: *Determination of folylpoly-gamma-glutamate carboxypeptidase (folacin conjugase) activity using reversed-phase high-performance liquid-chromatography*. Journal of Chromatography **318**(2), S. 387–392 (1985).
- [109] D. M. GOLI und J. T. VANDERSLICE: *Investigation of the Conjugase Treatment Procedure in the Microbiological Assay of Folate*. Food Chemistry **43**(1), S. 57–64 (1992).
- [110] O. D. BIRD et al.: *Observations on Vitamin-B<sub>c</sub> Conjugase from Hog Kidney*. Journal of Biological Chemistry **163**(3), S. 649–659 (1946).
- [111] V. MIMS und M. LASKOWSKI: *Studies on Vitamin-B<sub>c</sub> Conjugase from Chicken Pancreas*. Journal of Biological Chemistry **160**(2), S. 493–503 (1945).
- [112] L. M. KOZLOFF, L. K. CROSBY und C. M. BAUGH: *Structural role of the polyglutamate portion of the folate found in T4D bacteriophage baseplate*. Journal of Virology **32**(2), S. 497–506 (1979).
- [113] EDELMANN und MINNAMARI: *Occurrence and natural enhancement of folate in oats and barley*. Dissertation, University of Helsinki, Helsinki (2014).
- [114] C. M. PFEIFFER, Z. FAZILI und M. ZHANG: *Folate Analytical Methodology*. In: L. B. BAILEY (Hg.): *Folate in health and disease*. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [115] N. LAKSHMAIAH und B. V. RAMASASTRI: *Folic Acid Conjugase from Plasma: II. Studies on the source of the enzyme in blood*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research **45**(2), S. 104–200 (1975).
- [116] R. ENGELHARDT und J. F. GREGORY: *Adequacy of Enzymatic Deconjugation in Quantification of Folate in Foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**(1), S. 154–158 (1990).
- [117] A. J. KIRSCH und T. S. CHEN: *Comparison of Conjugase Treatment Procedures in the Microbiological Assay for Food Folacin*. Journal of Food Science **49**(1), S. 94–98 (1984).
- [118] J. I. MARTIN et al.: *Application of a Tri-Enzyme Extraction for Total Folate Determination in Foods*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **73**(5), S. 805–808 (1990).
- [119] D. B. COSULICH, J. M. SMITH und H. P. BROQUIST: *Diastereoisomers of leucovorin*. Journal of the American Chemical Society **74**(16), S. 4215–4216 (1952).

- [120] S. O'BROIN und B. KELLEHER: *Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells*. Journal of Clinical Pathology **45**(4), S. 344–347 (1992).
- [121] P. STOKES und K. WEBB: *Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. I*. Journal of Chromatography A **864**(1), S. 59–67 (1999).
- [122] J. D. M. PATRING und J. A. JASTREBOVA: *Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity*. Journal of Chromatography A **1143**(1-2), S. 72–82 (2007).
- [123] S. VISHNUMOHAN, J. ARCOT und R. PICKFORD: *Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. Food Chemistry **125**(2), S. 736–742 (2010).
- [124] G. F. ZHANG et al.: *Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A **1078**(1-2), S. 59–66 (2005).
- [125] S. BELZ und H. NAU: *Determination of folate patterns in mouse plasma, erythrocytes, and embryos by HPLC coupled with a microbiological assay*. Analytical Biochemistry **265**(1), S. 157–166 (1998).
- [126] U. KEHLENBACH: *Optimierung und Anwendung einer Analysenmethode zur selektiven und sensitiven Bestimmung von Folatmustern in klinischen Proben und Lebensmitteln*. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover (2004).
- [127] P. H. C. J. VERLINDE et al.: *L-ascorbic acid improves the serum folate response to an oral dose of [6S]-5-methyltetrahydrofolic acid in healthy men*. European Journal of Clinical Nutrition **62**(10), S. 1224–1230 (2008).
- [128] M. RYCHLIK: *Die Vitamine der Folatgruppe, Eine Übersicht*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau **105**(5), S. 292–296 (2009).
- [129] S. D. GARBIS et al.: *Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry **73**(22), S. 5358–5364 (2001).
- [130] T. M. ANNESLEY: *Ion suppression in mass spectrometry*. Clinical Chemistry **49**(7), S. 1041–1044 (2003).
- [131] M. A. CAUDILL: *Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status*. American Journal of Clinical Nutrition **91**(5), S. 1455S–1460S (2010).
- [132] H. MCNULTY und K. PENTIEVA: *Folate bioavailability*. Proceedings of the Nutrition Society **63**(4), S. 529–536 (2004).
- [133] J. F. GREGORY: *Case study: Folate bioavailability*. Journal of Nutrition **131**(4), S. 1376S–1382S (2001).



- [134] H. E. SAUBERLICH et al.: *Folate requirement and metabolism in nonpregnant women*. American Journal of Clinical Nutrition **46**(6), S. 1016–1028 (1987).
- [135] R. M. WINKELS et al.: *Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid*. American Journal of Clinical Nutrition **85**(2), S. 465–473 (2007).
- [136] S. BABU und S. G. SRIKANTIA: *Availability of folates from some foods*. American Journal of Clinical Nutrition **29**(4), S. 376–379 (1976).
- [137] M. P. HANNON-FLETCHER et al.: *Determining bioavailability of food folates in a controlled intervention study*. American Journal of Clinical Nutrition **80**(4), S. 911–918 (2004).
- [138] S. MÖNCH et al.: *Folate bioavailability from foods rich in folates assessed in a short term human study using stable isotope dilution assays*. Food & function **6**(1), S. 241–247 (2015).
- [139] T. TAMURA und E. L. R. STOKSTAD: *Availability of Food Folate in Man*. British Journal of Haematology **25**(4), S. 513–532 (1973).
- [140] J. F. GREGORY et al.: *Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects*. American Journal of Clinical Nutrition **53**(3), S. 736–740 (1991).
- [141] A. MELSE-BOONSTRA et al.: *Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults*. American Journal of Clinical Nutrition **79**(3), S. 424–429 (2004).
- [142] K. ARKBÅGE et al.: *Bioaccessibility of folic acid and (6S)-5-methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model*. Journal of Nutrition **133**(11), S. 3678–3683 (2003).
- [143] R. J. D. JONG et al.: *Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans*. European Journal of Clinical Nutrition **59**(8), S. 906–913 (2005).
- [144] K. A. RISTOW, J. F. GREGORY und B. L. DAMRON: *Effects of Dietary Fiber on the Bioavailability of Folic Acid Monoglutamate*. Journal of Nutrition **112**(4), S. 750–758 (1982).
- [145] R. M. RUSSELL, F. ISMAIL-BEIGI und J. G. REINHOLD: *Folate content of Iranian breads and effect of their fiber content on intestinal absorption of folic acid*. American Journal of Clinical Nutrition **29**(7), S. 799–802 (1976).
- [146] V. ÖHRVIK: *Folate bioavailability: In vitro experiments and human trials*. Dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala (2009).
- [147] V. E. ÖHRVIK und C. WITTHOFT: *Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion*. European Journal of Nutrition **47**(2), S. 92–98 (2008).

- [148] V. ÖHRVIK et al.: *Folates in bread: retention during bread-making and in vitro bio-accessibility*. European Journal of Nutrition **49**(6), S. 365–372 (2010).
- [149] P. M. KEAGY, B. SHANE und S. M. OACE: *Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans*. American Journal of Clinical Nutrition **47**(1), S. 80–88 (1988).
- [150] A. HOUGHTON et al.: *Association between dietary fiber intake and the folate status of a group of female adolescents*. American Journal of Clinical Nutrition **66**(6), S. 1414–1421 (1997).
- [151] N. C. ALEMDAROGLU et al.: *Influence of Green and Black Tea on Folic Acid Pharmacokinetics in Healthy Volunteers: Potential Risk of Diminished Folic Acid Bio-availability*. Biopharmaceutics & Drug Disposition **29**(6), S. 335–348 (2008).
- [152] J. E. BAGGOTT und T. TAMURA: *Evidence for the hypothesis that 10-formyldihydrofolate is the in vivo substrate for aminoimidazolecarboxamide ribotide transformylase*. Experimental Biology and Medicine **235**(3), S. 271–277 (2010).
- [153] M. D. LUCOCK et al.: *Nonenzymatic Degradation and Salvage of Dietary Folate: Physicochemical Factors Likely to Influence Bioavailability*. Biochemical and Molecular Medicine **55**(1), S. 43–53 (1995).
- [154] M. MINEKUS et al.: *A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small-Intestine*. ATLA-Alternatives to Laboratory Animals **23**(2), S. 197–209 (1995).
- [155] M. VERWEI et al.: *Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bio-accessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model*. Journal of Nutrition **133**(7), S. 2377–2383 (2003).
- [156] M. VERWEI et al.: *Predicted serum folate concentrations based on in vitro studies and kinetic modeling are consistent with measured folate concentrations in humans*. Journal of Nutrition **136**(12), S. 3074–3078 (2006).
- [157] J. E. BAGGOTT et al.: *Cofactor role for 10-formyldihydrofolic acid*. Biochemical Journal **308**(Part 3), S. 1031–1036 (1995).
- [158] A. TYAGI et al.: *Thermal degradation of (6R,S)-5,10-methenyltetrahydrofolate in aqueous solution at pH 8*. Chemical Physics **358**(1-2), S. 132–136 (2009).
- [159] R. BONFIGLIO et al.: *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry **13**(12), S. 1175–1185 (1999).
- [160] P. J. TAYLOR: *Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. Clinical Biochemistry **38**(4), S. 328–334 (2005).
- [161] H. STAHNKE, T. REEMTSMA und L. ALDER: *Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS*. Analytical Chemistry **81**(6), S. 2185–2192 (2009).

- [162] D. BODI et al.: *Investigation of Matrix Effects on the Determination of Carbadox and Olaquinox in Feed by LC-MS/MS*. *Chromatographia* **76**(11-12), S. 651–662.
- [163] B. K. MATUSZEWSKI, M. L. CONSTANZER und C. M. CHAVEZ-ENG: *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. *Analytical Chemistry* **75**(13), S. 3019–3030 (2003).
- [164] J. VOGELGESANG und J. HADRICH: *Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners*. *Accreditation and Quality Assurance* **3**(6), S. 242–255 (1998).
- [165] J. HÄDRICH und J. VOGELGESANG: *Konzept'96 zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze: Weiterentwicklung der Verfahren nach DFG und DIN 32645 unter besonderer Berücksichtigung der analytischen Praxis*. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **92**(11), S. 341–350 (1996).
- [166] W. HORWITZ, L. R. KAMPS und K. W. BOYER: *Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents*. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **63**(6), S. 1344–1354 (1980).
- [167] S. KARILUOTO, M. EDELMANN und V. PIIRONEN: *Effects of Environment and Genotype on Folate Contents in Wheat in the HEALTHGRAIN Diversity Screen*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(17), S. 9324–9331 (2010).
- [168] M. D. LUCOCK et al.: *Physicochemical and biological factors influencing methylfolate stability: use of dithiothreitol for HPLC analysis with electrochemical detection*. *Food Chemistry* **47**(1), S. 79–86 (1993).
- [169] J. F. GREGORY, D. B. SARTAIN und B. P. F. DAY: *Fluorometric-Determination of Folic Acid in Biological-Materials Using High-Performance Liquid-Chromatography*. *Journal of Nutrition* **114**(2), S. 341–353 (1984).
- [170] J. A. BLAIR, A. J. PEARSON und A. J. ROBB: *Autoxidation of 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (1), S. 18–21 (1975).
- [171] C. C. NELSON und J. A. MCCLOSKEY: *Collision-Induced Dissociation of Uracil and Its Derivatives*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**(5), S. 339–349 (1994).
- [172] M. HESSE, H. MEIER und B. ZEEH: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 114 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, 8. Aufl. (2012).
- [173] S. W. SOUCI et al.: *Food composition and nutrition tables: Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen = La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 7. Aufl. (2008).
- [174] DEUTSCHES ERNÄHRUNGSBERATUNGS- UND -INFORMATIONENNETZ: DEBINET - ERNAEHRUNG.DE: *Bundeslebensmittelschlüssel (BLS II.3 und BLS 3.01)*. URL: <http://www.ernaehrung.de/lebensmittel/>, letzter Abruf: 01.07.2014

- [175] K. R. RATANASTHIEN et al.: *Serum folates in man*. Journal of Clinical Pathology **30**(5), S. 438–448 (1977).
- [176] Y. LIU et al.: *Thermal Oxidation Studies on Reduced Folate, L-5-Methyltetrahydrofolic Acid (L-5-MTHF) and Strategies for Stabilization Using Food Matrices*. Journal of Food Science **77**(2), S. C236–C243 (2012).
- [177] J. C. KENNELLY, J. A. BLAIR und A. E. PHEASANT: *The metabolism of 5-methyltetrahydropteroyl-l-glutamic acid and its oxidation-products in the rat*. Biochemical Journal **206**(2), S. 373–378 (1982).
- [178] R. A. STAMM, M. J. HARPER und L. A. HOUGHTON: *Quantitation of Whole-Blood Total Folate within Defined MTHFR C677T Genotype Groups by Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Differs from Microbiologic Assay*. Journal of Nutrition **142**(12), S. 2154–2160 (2012).
- [179] E. A. YETLEY et al.: *Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary*. American Journal of Clinical Nutrition **94**(1), S. 303S–312S (2011).
- [180] K. KOVALOVA: *Erweiterte Untersuchungen zu Folaten in Lebensmitteln*. Forschungsarbeit, Technische Universität München, München (2012).
- [181] Z. FAZILI et al.: *Erythrocyte folate extraction and quantitative determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of results with microbiologic assay*. Clinical Chemistry **51**(12), S. 2318–2325 (2005).
- [182] N. LAKSHMAIAH und B. V. RAMASASTRI: *Folic acid conjugase from plasma: I. Partial purification and properties*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research **45**(2), S. 183–193 (1975).
- [183] H. MEI et al.: *Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery*. Rapid Communications in Mass Spectrometry **17**(1), S. 97–103 (2003).
- [184] J. C. PEDERSEN: *Comparison of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (conjugase; EC 3.4.22.12) and amylase treatment procedures in the microbiological assay for food folates*. British Journal of Nutrition **59**(2), S. 261–271 (1988).
- [185] H. KÄFERSTEIN und L. JAENICKE: *Eine  $\gamma$ -Glutamyl-Carboxypeptidase aus Hühnerpankreas*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie **353**(7), S. 1153–1158 (1972).
- [186] M. GRÜBNER: *Folatanalytik in Lebensmitteln durch Mikrobiologie und LC-MS*. Forschungsarbeit, Technische Universität München, München (2011).
- [187] A. KAZENKO und M. LASKOWSKI: *On the specificity of chicken pancreas conjugase (gamma-glutamic acid carboxypeptidase)*. Journal of Biological Chemistry **173**(1), S. 217–221 (1948).
- [188] S. V. PANDE und J. F. MEAD: *Inhibition of Enzyme Activities by Free Fatty Acids*. Journal of Biological Chemistry **243**(23), S. 6180–6185 (1968).

- [189] E. GINTING und J. ARCOT: *High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring folates during tempe preparation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(26), S. 7752–7758 (2004).
- [190] M. EDELMANN et al.: *Folate in oats and its milling fractions*. Food Chemistry **135**(3), S. 1938–1947 (2012).
- [191] DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.: *DIN 19738: Bodenbeschaffenheit - Respirationsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminiertem Bodenmaterial*. (Juli 2004).
- [192] V. A. GRAY und J. B. DRESSMAN: *Change of pH requirements for simulated intestinal fluid TS*. Pharmacopeial Forum **22**(1), S. 1943–1945 (1996).
- [193] D. M. MUDIE, G. L. AMIDON und G. E. AMIDON: *Physiological Parameters for Oral Delivery and in Vitro Testing*. Molecular Pharmaceutics **7**(5), S. 1388–1405 (2010).
- [194] J. M. RAWLINGS, M. L. LUCAS und R. I. RUSSELL: *Measurement of Jejunal Surface pH in Situ by Plastic pH Electrode in Patients with Celiac Disease*. Scandinavian Journal of Gastroenterology **22**(3), S. 377–384 (1987).
- [195] M. L. LUCAS et al.: *Acid Microclimate in celiac and Crohn's disease: a model for folate malabsorption*. Gut **19**(8), S. 735–742 (1978).
- [196] I. KNÜTTER: *Strukturelle Anforderungen an Substrate und Inhibitoren epithelialer H<sup>+</sup>/Peptidsymporter*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle-Wittenberg (2003).
- [197] J. FALLINGBORG et al.: *pH-Profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics **3**(6), S. 605–613 (1989).
- [198] A. J. WARING et al.: *Ascorbic acid and total vitamin C concentrations in plasma, gastric juice, and gastrointestinal mucosa: Effects of gastritis and oral supplementation*. Gut **38**(2), S. 171–176 (1996).
- [199] G. M. SOBALA et al.: *Ascorbic Acid in the Human Stomach*. Gastroenterology **97**(2), S. 357–363 (1989).
- [200] G. M. SOBALA et al.: *Levels of nitrite, nitrate, N-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of the stomach*. Carcinogenesis **12**(2), S. 193–198 (1991).
- [201] Z. W. ZHANG et al.: *The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and CagA seropositivity in the human stomach*. Gut **43**(3), S. 322–326 (1998).
- [202] G. CAPURSO et al.: *Intragastric ascorbic but not uric acid is depleted in relation with the increased pH in patients with atrophic body gastritis and H. pylori gastritis*. Helicobacter **8**(4), S. 300–306 (2003).

- [203] P. CORREA et al.: *Review article: antioxidant micronutrients and gastric cancer*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **12**(1), S. 73–82 (1998).
- [204] A. G. FRASER und G. A. WOOLLARD: *Gastric juice ascorbic acid is related to Helicobacter pylori infection but not ethnicity*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **14**(11), S. 1070–1073 (1999).
- [205] H. J. O'CONNOR et al.: *Vitamin C in the human stomach: relation to gastric pH, gastroduodenal disease, and possible sources*. *Gut* **30**(4), S. 436–442 (1989).
- [206] J. P. BROWN et al.: *Ingestion and absorption of naturally occurring pteroylmonoglutamates (folates) in man*. *Gastroenterology* **64**(2), S. 223–232 (1973).
- [207] V. E. ÖHRVIK et al.: *Folate bioavailability from breads and a meal assessed with a human stable-isotope area under the curve and ileostomy model*. *American Journal of Clinical Nutrition* **92**(3), S. 532–538 (2010).
- [208] A. J. WRIGHT et al.: *Single oral doses of C-13 forms of pteroylmonoglutamic acid and 5-formyltetrahydrofolic acid elicit differences in short-term kinetics of labelled and unlabelled folates in plasma: potential problems in interpretation of folate bioavailability studies*. *British Journal of Nutrition* **90**(2), S. 363–371 (2003).
- [209] A. J. WRIGHT et al.: *Differential kinetic behavior and distribution for pteroylglutamic acid and reduced folates: a revised hypothesis of the primary site of PteGlu metabolism in humans*. *Journal of Nutrition* **135**(3), S. 619–623 (2005).
- [210] R. G. KALLEN und W. P. JENCKS: *The dissociation constants of tetrahydrofolic acid*. *Journal of Biological Chemistry* **241**(24), S. 5845–5850 (1966).
- [211] M. D. LUCOCK und Z. C. A. YATES: *Gastro-intestinal pH modulates facile interconversion of native formylfolates during absorption*. In: S. MILSTIEN et al. (Hg.): *Chemistry and biology of pteridines and folates*. Springer, New York (2002).
- [212] J. E. BAGGOTT: *Hydrolysis of 5,10-methenyltetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate at pH 2.5 to 4.5*. *Biochemistry* **39**(47), S. 14647–14653 (2000).
- [213] C. TEMPLE et al.: *Preparation and Purification of L-(±)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid*. *Journal of Medicinal Chemistry* **22**(6), S. 731–734 (1979).
- [214] S. J. BENKOVIC, P. A. BENKOVIC und W. P. BULLARD: *Studies on Models for Tetrahydrofolic acid . III. Hydrolytic Interconversions of Tetrahydroquinoxaline Analogs at the Formate Level of Oxidation*. *Journal of the American Chemical Society* **94**(21), S. 7542–7549 (1972).
- [215] J. E. BAGGOTT et al.: *Iron compounds catalyze the oxidation of 10-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid to 10-formyl-7,8-dihydrofolic acid*. *Journal of Inorganic Biochemistry* **71**(3-4), S. 181–187 (1998).
- [216] M. D. LUCOCK et al.: *Methylfolate exhibits a negative in-vitro interaction with important dietary metal cations*. *Food Chemistry* **50**(3), S. 307–310 (1994).

- [217] X. NG, M. D. LUCOCK und M. VEYSEY: *Physicochemical effect of pH and antioxidants on mono- and triglutamate forms of 5-methyltetrahydrofolate, and evaluation of vitamin stability in human gastric juice: Implications for folate bioavailability*. Food Chemistry **106**(1), S. 200–210 (2008).
- [218] S. D. BHANDARI et al.: *Properties of Pteroylpolyglutamate Hydrolase in Pancreatic Juice of the Pig*. Journal of Nutrition **120**(5), S. 467–475 (1990).
- [219] J. SCHMITZ et al.: *Purification of the human intestinal brush border membrane*. Biochimica et Biophysica Acta **323**(1), S. 98–112 (1973).
- [220] A. M. REISENAUER und C. H. HALSTED: *Human Folate Requirements*. Journal of Nutrition **117**(3), S. 600–602 (1987).
- [221] B. P. F. DAY und J. F. GREGORY: *Characteristics of Human, Pig and Rat Intestinal Folicin Conjugases*. Federation Proceedings **43**(4), S. 986 (1984).
- [222] J. F. GREGORY, S. L. INK und J. J. CERDA: *Comparison of Pteroylpolyglutamate Hydrolase (Folate Conjugase) from Porcine and Human Intestinal Brush-Border Membrane*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **88**(4), S. 1135–1141 (1987).
- [223] DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.: *DIN 10750: Untersuchung von Honig – Bestimmung der Diastase-Aktivität*. (Februar 2009).
- [224] G. REHNER und H. DANIEL: *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg and Neckar, 3. Aufl. (2010).
- [225] N. FIRL et al.: *Determination of the fatty acid profile of neutral lipids, free fatty acids and phospholipids in human plasma*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **51**(4), S. 799–810 (2013).
- [226] S. BOISEN und B. O. EGGUM: *Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals*. Nutrition Research Reviews **4**(01), S. 141–162 (1991).
- [227] K. A. KOPF-BOLANZ et al.: *Validation of an In Vitro Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans*. Journal of Nutrition **142**(2), S. 245–250 (2012).
- [228] L. SAVOIE et al.: *In vitro determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins*. Journal of AOAC International **88**(3), S. 935–948 (2005).
- [229] R. JÄCKH: *Chemie und Biologie der Sialinsäuren*. Chemie in unserer Zeit **10**(5), S. 139–146 (1976).
- [230] H. DANIEL: *Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport*. Annual Review of Physiology **66**, S. 361–384 (2004).
- [231] H.-D. BELITZ, W. GROSCH und P. SCHIEBERLE: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin [u.a.], 5. Aufl. (2001).

- [232] M. M. WEI et al.: *Bioavailability for humans of deuterium-labeled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods*. Journal of Nutrition **126**(12), S. 3100–3108 (1996).
- [233] B. J. RATHBONE et al.: *Ascorbic-acid: a factor concentrated in human gastric-juice*. Clinical Science **76**(3), S. 237–241 (1989).
- [234] R. C. ROSE: *Water-soluble vitamin absorption in intestine*. Annual Review of Physiology **42**, S. 157–171 (1980).
- [235] C. S. TSAO: *An Overview of Ascorbic Acid Chemistry and Biochemistry*. In: L. PACKER und J. FUCHS (Hg.): *Vitamin C in health and disease*. Dekker, New York and NY (1997).
- [236] A. FREISLEBEN, P. SCHIEBERLE und M. RYCHLIK: *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**(17), S. 4760–4768 (2002).
- [237] S. KROMIDAS: *Validierung in der Analytik*. Wiley, Weinheim (1999).
- [238] F. W. KÜSTER, A. THIEL und A. RULAND: *Rechentafeln für die chemische Analytik*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 105. Aufl. (2002).
- [239] R. MATISSEK, G. STEINER und M. FISCHER: *Lebensmittelanalytik*. Springer-Spektrum, Berlin, 5. Aufl. (2014).
- [240] T. LINSINGER: *Application Note 1: Comparison of a measurement result with the certified value* (Januar 2010).  
URL: [http://www.erm-crm.org/ERM\\_products/application\\_notes/application\\_note\\_1/Documents/erm\\_application\\_note\\_1\\_english\\_rev3.pdf](http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf),  
letzter Abruf: 21.09.2014



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturformel der Folsäure . . . . .	5
2.2	Stabilität und pH-bedingte Umlagerungen der Folate. . . . .	7
2.3	C <sub>1</sub> -Metabolismus . . . . .	11
3.1	UV- und Produkt-Ionen-Spektrum von 10-HCO-H <sub>2</sub> folat . . . . .	22
3.2	Responsegerade von 10-HCO-H <sub>2</sub> folat . . . . .	23
3.3	Zeitprofile der durch coeluiierende Komponenten von Lebensmittelextrakten bedingte Matrixeffekte. . . . .	24
3.4	Zusammensetzung einer 10-HCO-H <sub>2</sub> folat-Lösung bei verschiedenen Aufarbeitungsschritten . . . . .	25
3.5	Zusammensetzung einer 5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat-Lösung bei verschiedenen Aufarbeitungsschritten . . . . .	25
3.6	MS-Spektrum bzw. Isotopenmuster der unbekanntes Substanz. . . . .	39
3.7	Peakflächenverhältnisse für die einzelnen Schritte der Aufreinigung über eine Affinitätssäule. . . . .	39
3.8	Chromatogramm einer reinen 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat-Lösung vor (a) und nach (b) der Verdauungssimulation (ohne Verdauungssäfte). . . . .	40
3.9	Strukturvorschlag für die unbekanntes Substanz: Pyrazino-s-Triazin nach JONGEJAN [62], mit Vorschlägen für die Fragmentierung im ESI-MS/MS. . . . .	41
3.10	Chromatogramm, Produkt-Ionen-Spektren und UV-Spektren einer Weizenkeimprobe bzw. der daraus isolierten Substanz und des Syntheseproduktes. . . . .	42
3.11	Gehalt an 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat (a) und Pyrazino-s-Triazin (b) im Plasma . . . . .	44
3.12	Monoglutamatgehalte einer Weizenkeimprobe mit verschiedenen zusätzlichen Enzymbehandlungsmethoden. . . . .	49
3.13	Mono-, Di- und Triglutamate von 5-HCO-H <sub>4</sub> folat in einer aufgearbeiteten Weizenkeimprobe. . . . .	50
3.14	Responsegerade von 5-HCO-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2</sub> . . . . .	51
3.15	Folatgehalte in Weizenkeimen nach Aufarbeitung mit MES-Puffern verschiedener Zusammensetzung an DTT und Mercaptoethanol. . . . .	54
3.16	Variation der Menge von Hühnerpankreatin und Rattenserum . . . . .	55
3.17	Variationen bei der Inkubation . . . . .	56
3.18	Mono- und Diglutamatgehalt einiger Lebensmittel in Abhängigkeit von der Einwaage. . . . .	57
3.19	Chromatogramme der Polyglutamate vor und nach der Optimierung. . . . .	58
3.20	Mono- und Diglutamatgehalte verschiedener Lebensmittel vor der Optimierung und mit Anwendung der optimierten Methode . . . . .	58
3.21	Vergleich von Ergebnissen des Mikrobiologischen Assays über Kalibrierungen mit verschiedenen Vitameren in drei verschiedenen Laboren. . . . .	65
4.1	Schematische Darstellung der Verdauungsapparatur. . . . .	73

4.2	Zusammensetzung einer 5-HCO-H <sub>4</sub> folat-Lösung während der Verdauungssimulation. . . . .	76
4.3	Zusammensetzung einer 5-HCO-H <sub>4</sub> folat-Lösung nach der Verdauungssimulation in An- und Abwesenheit von Ascorbinsäure bzw. in Anwesenheit sowohl von Ascorbinsäure als auch der Verdauungssäfte. . . . .	76
4.4	Stärkenachweis mit Lugolscher Lösung einer verdauten (links) und einer unverdauten Weizenkeimprobe (rechts). . . . .	88
4.5	Chromatogramme der freien Aminosäuren in Weizenkeimen, der entsprechenden Weizenkeimverdaulösung und der Enzymmischung der simulierten Verdauungssäfte. . . . .	90
4.6	Biozugänglichkeit mit und ohne Ascorbinsäurezusatz. . . . .	93
4.7	Biozugänglichkeit und Gesamtwiederfindung (mit nachträglicher Dekonjugation während der Analytik) von verschiedenen Lebensmitteln (in vitro) im Vergleich zur relativen Bioverfügbarkeit (in vivo). . . . .	94
4.8	Zusammensetzung verschiedener Lebensmittel vor und nach dem Verdau in Anwesenheit von Ascorbinsäure - junger Spinat (Iglo), Weizenkeime und Camembert (Saint Albray cremig-leicht). . . . .	97
4.9	Zusammensetzung der Rinde und des Teigs des Camembert Saint Albray cremig-leicht vor und nach der Verdauungssimulation in Anwesenheit von Ascorbinsäure. . . . .	98
4.10	Folatverteilung in den Lebensmitteln: a-d) für die Verdauungssimulation ( <i>in vitro</i> ) und e-h) für die Humanstudie ( <i>in vivo</i> ). . . . .	104
9.1	Schema der <i>postcolumn infusion</i> -Technik. . . . .	141
A.1	Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von H <sub>4</sub> folat und 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat. . . . .	173
A.2	Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von 5-HCO-H <sub>4</sub> folat, 10-HCO-PteGlu und PteGlu. . . . .	174
A.3	Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> folat, H <sub>2</sub> folat und 5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat. . . . .	175
A.4	Massenspektren des Monoglutamates und der Polyglutamate von 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat. . . . .	176
A.5	Zusammensetzung einer 5-HCO-H <sub>4</sub> folat-Lösung nach der Verdausimulation in Anwesenheit von Enzymen ± Ascorbinsäure jeweils nach einem zusätzlichen Erhitzungsschritt. . . . .	176
A.6	Zusammensetzung einer 5-HCO-H <sub>4</sub> folat-Lösung nach der Verdausimulation ohne Enzymzugabe in Anwesenheit von DTT. . . . .	177
A.7	Zusammensetzung der Rinde und des Teigs des Camembert Geramont cremig leicht vor und nach der Verdauungssimulation in Anwesenheit von Ascorbinsäure. . . . .	177
A.8	DAD-Spektren der untersuchten Folate. . . . .	178

# Tabellenverzeichnis

3.1	Dotierungsvarianten für die Bestimmung der Nachweisgrenze am Beispiel von 5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat bzw. [ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]-5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat. . . . .	27
3.2	Nachweis- (NWG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenzen (BG) . . .	28
3.3	intraday-Präzision . . . . .	30
3.4	interday Präzision . . . . .	30
3.5	Folatzusammensetzung ausgewählter Lebensmittel . . . . .	31
3.6	Abgeschätzter Gehalt an der unbekanntem Substanz (MeFox) in verschiedenen Lebensmitteln . . . . .	43
3.7	Vergleich der ermittelten Gesamtfolatgehalte verschiedener Camembertproben mit und ohne Proteasebehandlung. . . . .	48
3.8	Mono- und Diglutamatgehalte verschiedener Lebensmittel. . . . .	53
3.9	Vergleich zwischen LC-MS/MS und Mikrobiologischem Assay. . . . .	67
4.1	Dekonjugationseffizienz für den <i>in vitro</i> -Verdau einer PteGlu <sub>3</sub> -Lösung mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Verdauungssäfte. . . . .	84
4.2	Daten zu Schwankungen der Verdauungssimulation. . . . .	86
4.3	Gehalt freier Aminosäuren in Weizenkeimen vor und nach der Verdauung. . . . .	89
4.4	Anteil der freien Fettsäuren in Weizenkeimen vor und nach dem Verdau. . . . .	91
4.5	Vergleich der Dekonjugationseffizienz, der Biozugänglichkeiten und der Gesamtwiederfindung von Lebensmitteln gleicher Art und Unterteilung von Camembert in Teig und Rinde. . . . .	96
8.1	Gradient für die HPLC-UV-Bestimmung mit der Nucleosil HPLC-Säule. . . . .	130
8.2	Gradienten für die präparative HPLC . . . . .	131
8.3	Gradienten für die verschiedenen HPLC-Säulen der LC-MS/MS-Methoden . . . . .	131
8.4	allgemeine MS-Parameter . . . . .	131
8.5	MRM-Übergänge der Mono- und Diglutamate. . . . .	132
8.6	MRM-Übergänge der Polyglutamate. . . . .	133
9.1	UV-Responsefaktoren verschiedener Folate, mit PteGlu als internem Standard. . . . .	136
9.2	Responsefaktoren (RF) für die Monoglutamate mit den entsprechenden internen Standards (ISTD) und ihr Gültigkeitsbereich in Form der Peakflächenverhältnisse (PFV). . . . .	138
9.3	Responsefaktoren (RF) für die Diglutamate mit den entsprechenden deuterierten Monoglutamaten als Interne Standards. . . . .	139
B.1	Folatzusammensetzung der Lebensmittel der Humanstudie. . . . .	179
B.2	Folatzusammensetzung der Lebensmittel der Verdauungssimulation. . . . .	179

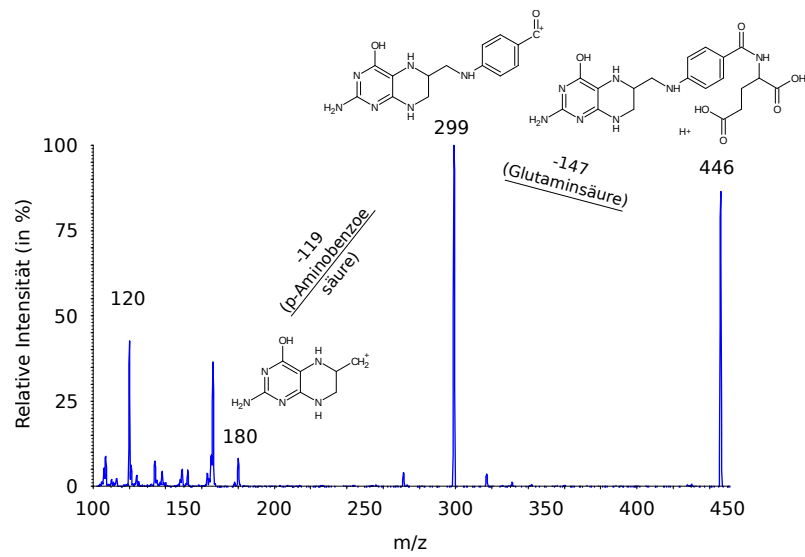


# Abkürzungsverzeichnis

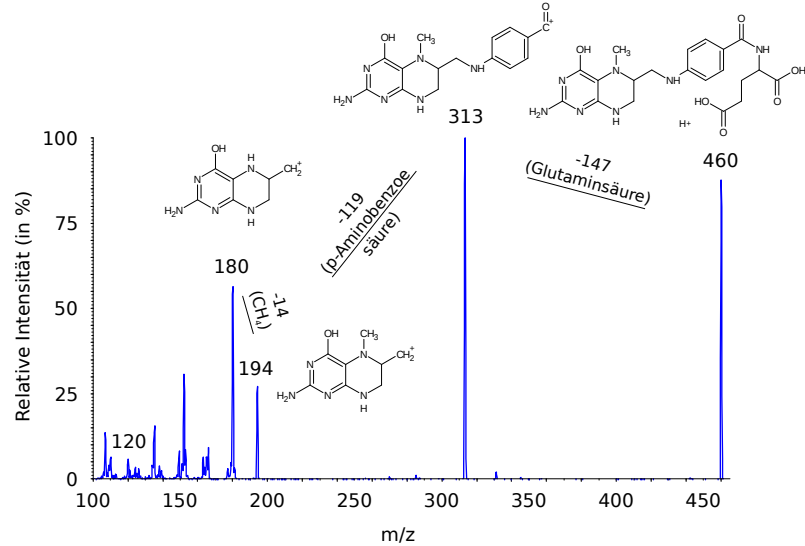
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	10-Formyldihydrofolat
10-HCO-H <sub>4</sub> folat	10-Formyltetrahydrofolat
10-HCO-PteGlu	10-Formylfolsäure
[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]	5fach <sup>13</sup> C-markiert
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]	4fach deuteriert
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	5,10-Methenyltetrahydrofolat
5,10-CH <sub>2</sub> -H <sub>4</sub> folat	5,10-Methylen tetrahydrofolat
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	5-Methyltetrahydrofolat
5-CHNH-H <sub>4</sub> folat	5-Formimino-tetrahydrofolat
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	5-Formyltetrahydrofolat
5hmTHF	5-Hydroxymethyltetrahydrofolat
-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2-7</sub>	Di- bis Heptaglutamate der Tetrahydrofolate
-H <sub>4</sub> PteGlu <sub>2-7</sub>	Di- bis Heptaglutamate der Dihydrofolate
-PteGlu <sub>2-7</sub>	Di- bis Heptaglutamate der Folsäuren
A	Area (Fläche unter dem Peak)
ACN	Acetonitril
API	Atmospheric Pressure Ionization
AUC	Area under the curve (engl.)
BAL	2,3-Dimercapto-1-propanol
BMI	Body-Mass-Index
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
cps	counts per second
CE	Collision Energy
CXP	Cell Exit Potential
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Declustering Potential
DTT	Dithiothreitol
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBP	folatbindendes Protein
GC-FID	Gaschromatographie gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor

H <sub>4</sub> folat	Tetrahydrofolat
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
ISTD	Interner Standard
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
M	molare Masse
MA	mikrobiologisches Assay
MeFox	Methyl folinate oxidation product (Pyrazino-s-Triazin)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MTBE	Methyl-tert-butylether (2-Methoxy-2-methylpropan)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
n	Stoffmenge
N	Anzahl der Messdaten
opt.	optimiert
Ox.	Oxidation
p	Signifikanzwert, t-Test
P	statistische Sicherheit (in %)
pABG	para-Aminobenzoylglutamat
PFV	Peakflächenverhältnis
PPGH	Pteroylpolyglutamathydrolasen
PteGlu	Folsäure (Pteroylglutamat)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RC	regenerierte Cellulose
Red.	Reduktion
RF	Responsefaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RSD	relative Standardabweichung
s	Standardabweichung
SAX	starke Anionentauscher (Strong Anion Exchange)
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOF-MS	Time-of-Flight-Massenspektrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
u	atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett(-strahlung)
V	Volumen
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

# A zusätzliche Abbildungen

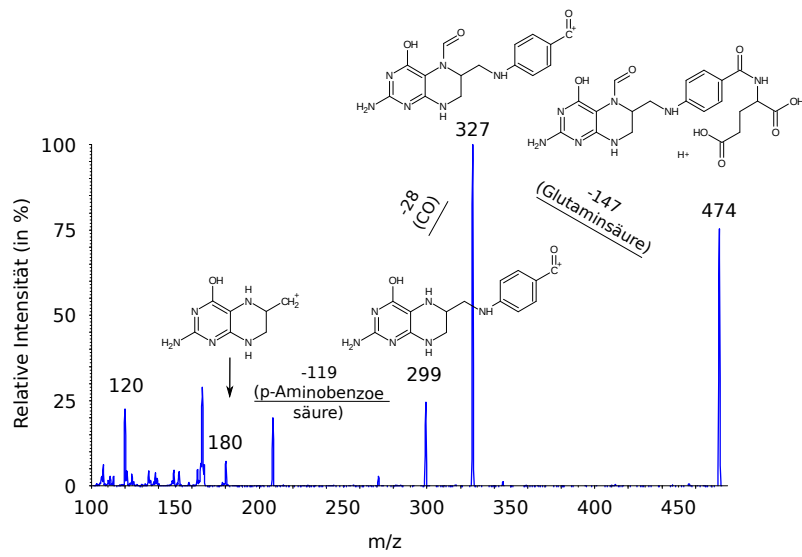
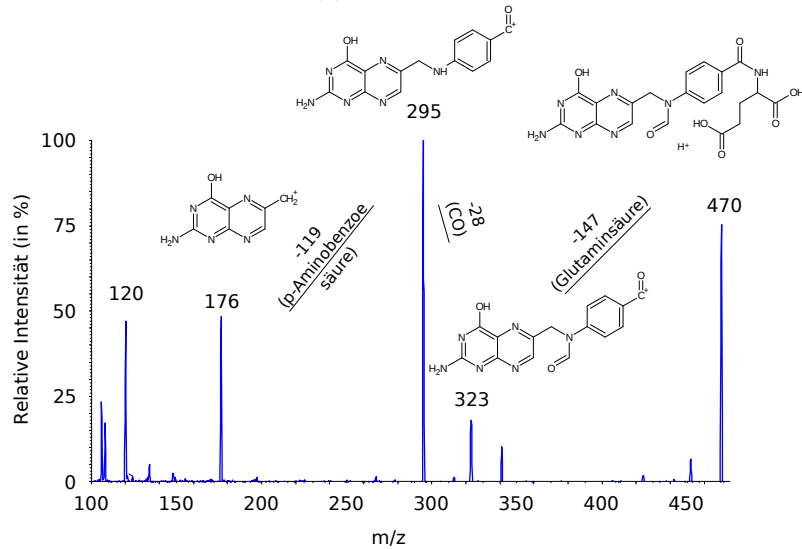


(a)  $H_4$ folat

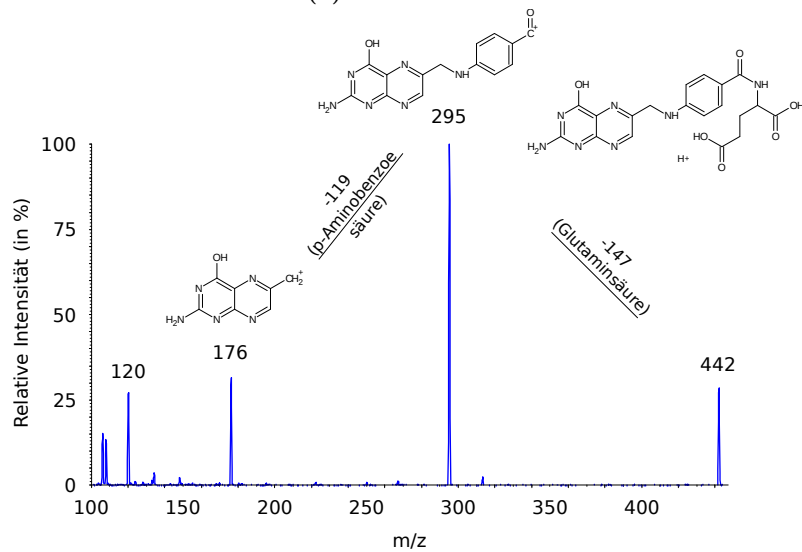


(b)  $5-CH_3-H_4$ folat

Abbildung A.1: Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von  $H_4$ folat und  $5-CH_3-H_4$ folat.

(a) 5-HCO-H<sub>4</sub>folat

(b) 10-HCO-PteGlu



(c) PteGlu

Abbildung A.2: Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von 5-HCO-H<sub>4</sub>folat, 10-HCO-PteGlu und PteGlu.



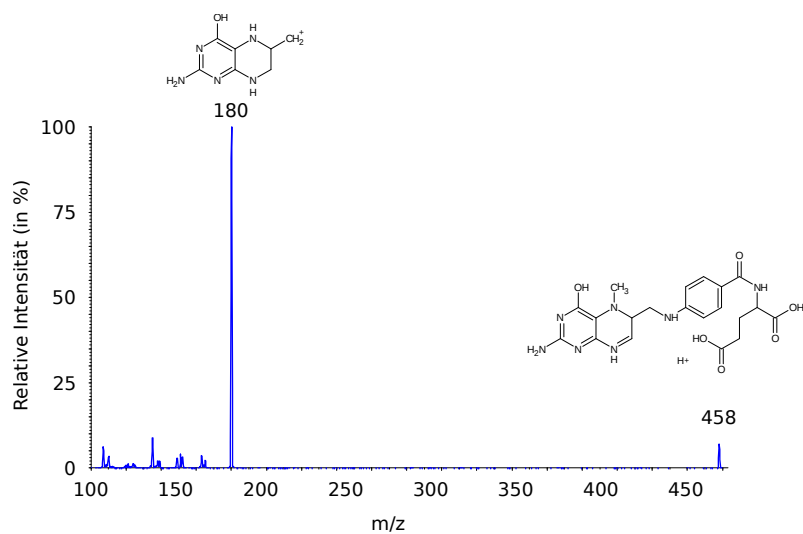
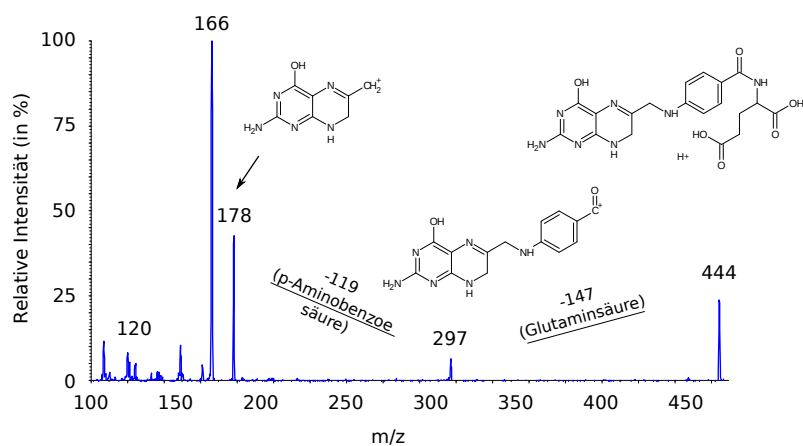
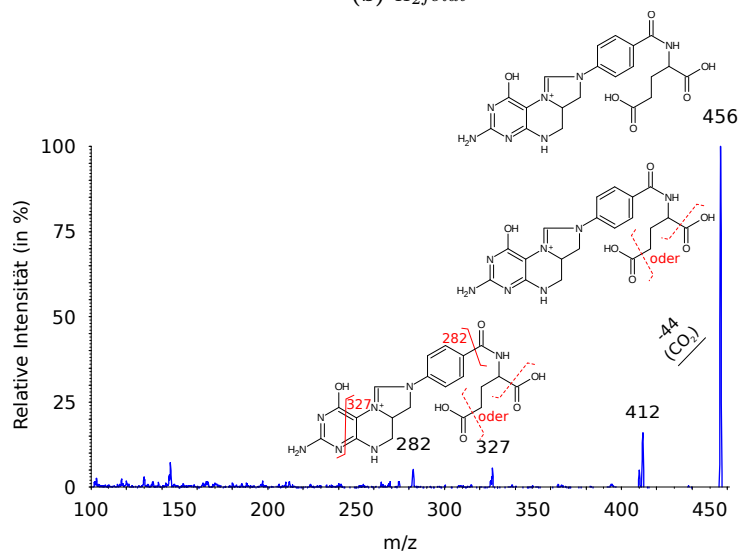
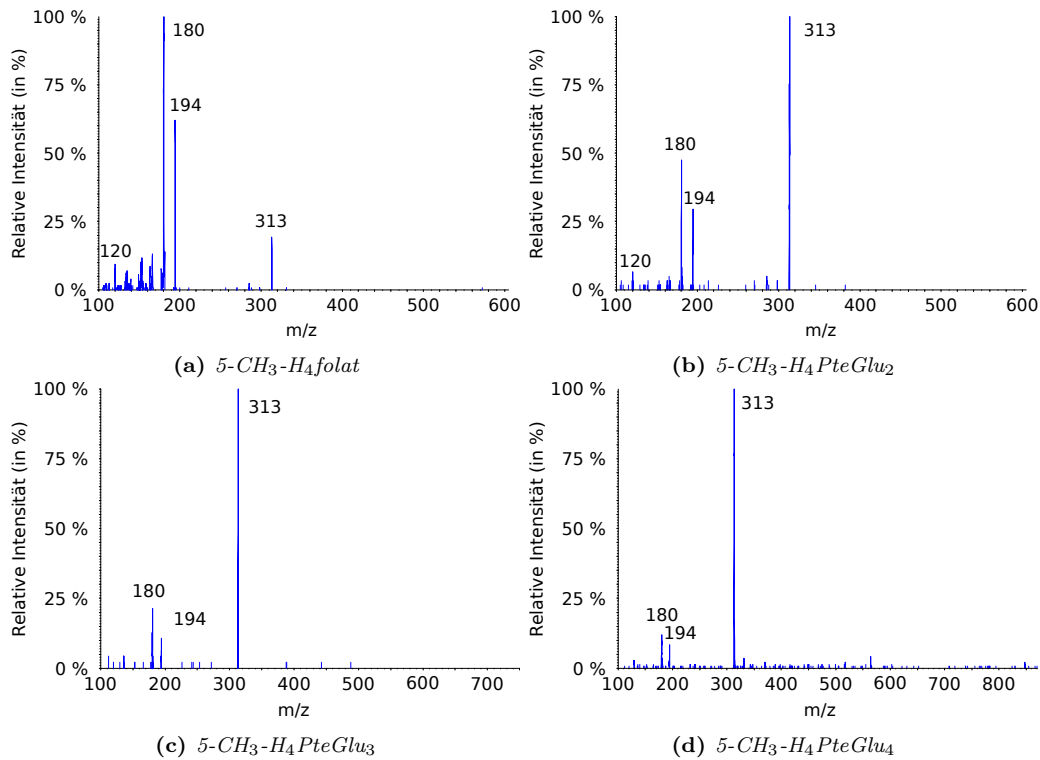
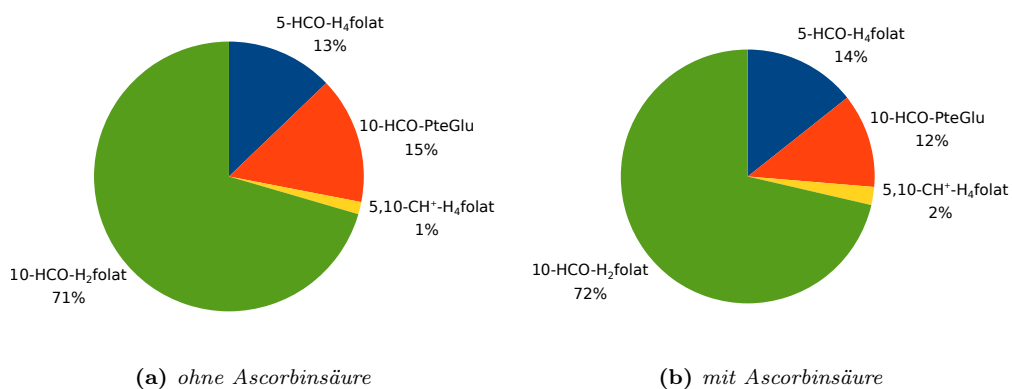
(a) 5- $CH_3$ - $H_2$ folat(b)  $H_2$ folat(c) 5,10- $CH^+$ - $H_4$ folat

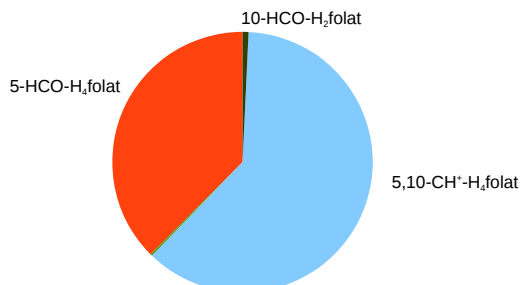
Abbildung A.3: Produkt-Ionen-Spektren und Vorschläge für die Fragmentierung von 5- $CH_3$ - $H_2$ folat,  $H_2$ folat und 5,10- $CH^+$ - $H_4$ folat.



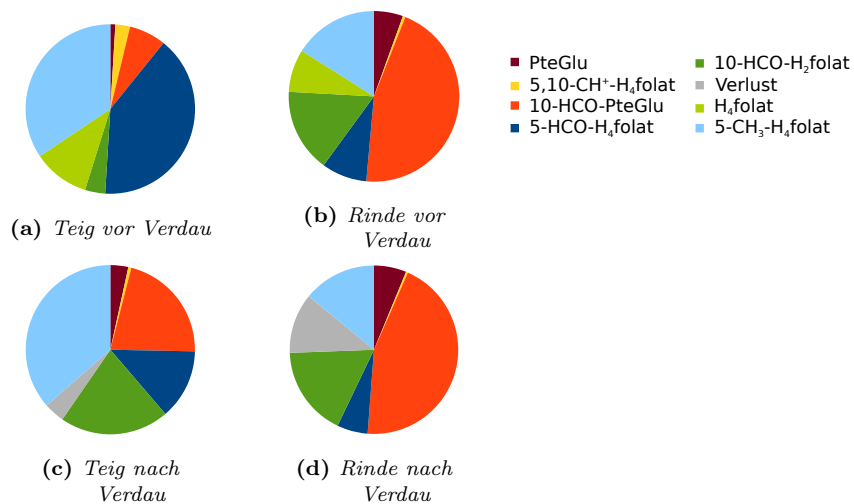
**Abbildung A.4:** Massenspektren des Monoglutamates und der Polyglutamate (Di- bis Tetra-) von 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folat. Die Scans erfolgten bei einer Kollisionsenergie CE von 52 V während der Analyse einer Erbsenprobe bzw. einer Standardlösung des 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folats.



**Abbildung A.5:** Zusammensetzung einer 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Lösung nach der Verdausimulation in Anwesenheit von Enzymen ± Ascorbinsäure jeweils nach einem zusätzlichen Erhitzungsschritt.



**Abbildung A.6:** Zusammensetzung einer 5-HCO-H<sub>4</sub>folat-Lösung nach der Verdausimulation ohne Enzymzugabe in Anwesenheit von DTT (0,2 mmol/l in der Magenstufe bzw. 0,1 mmol/l in der Darmstufe).



**Abbildung A.7:** Zusammensetzung der Rinde und des Teigs des Camembert Geramont cremig leicht vor und nach der Verdausimulation in Anwesenheit von Ascorbinsäure.

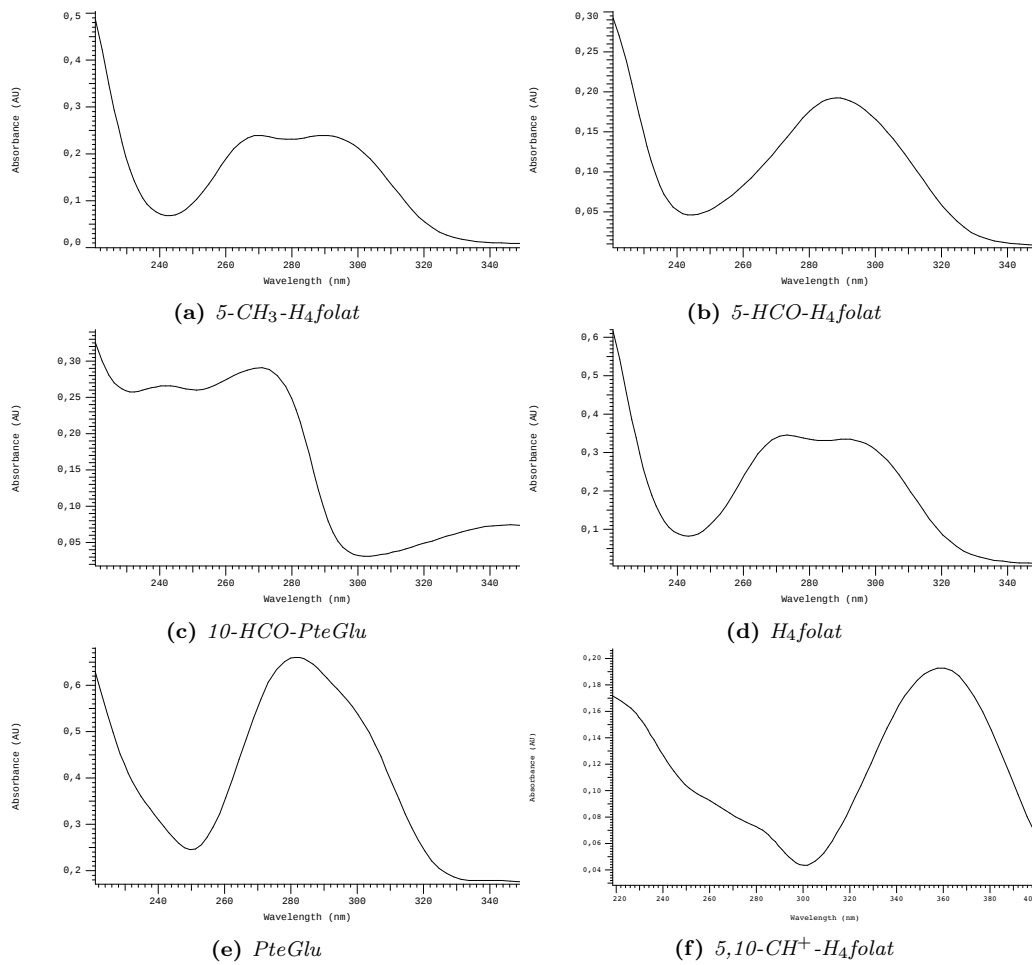


Abbildung A.8: DAD-Spektren der untersuchten Folate. Das DAD-Spektrum von 10-HCO-H<sub>2</sub>folat ist in Abbildung 3.1b zu sehen.

## B zusätzliche Tabellen

**Tabelle B.1:** Folatzusammensetzung der Lebensmittel der Humanstudie (in %).

Folat	Spinat I	Weizenkeime I	Camembert I	Camembert II
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	69	7	29	16
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	6	67	14	19
10-HCO-PteGlu	15	14	34	14
H <sub>4</sub> folat	10	8	21	51
PteGlu	-	5	2	-

Spinat I: Blattspinat; Camembert I: Geramont cremig-leicht; Camembert II: Saint-Albray cremig-leicht

**Tabelle B.2:** Folatzusammensetzung der Lebensmittel der Verdauungssimulation (in %).

Folat	Spinat II	Spinat III	WK II	Cam. III	Cam. IV	Cam. V
5-CH <sub>3</sub> -H <sub>4</sub> folat	72	62	10	30	33	25
5-HCO-H <sub>4</sub> folat	8	5	60	38	35	28
10-HCO-PteGlu	13	22	9	11	11	19
H <sub>4</sub> folat	1	< 1	1	14	10	9
PteGlu	< 1	1	11	2	2	7
10-HCO-H <sub>2</sub> folat	5	10	2	3	6	11
5,10-CH <sup>+</sup> -H <sub>4</sub> folat	1	< 1	1	2	3	1

Spinat II: junger Spinat gehackt; Spinat III: gelagerter Spinat I der Humanstudie; Cam. III: Geramont; Cam. IV: Geramont cremig-leicht; Cam. V: Saint-Albray cremig-leicht