

# Neue methodische Grundlagen zur Folatanalytik in Lebensmitteln

## Hochdruckflüssig-Chromatographie von Folsäure-Derivaten/Von Arne Schulz

Zahlreiche Untersuchungen belegen eine marginale bis defizitäre Versorgung mit den vitaminwirksamen Derivaten der Folsäure (den Folaten) etlicher Bevölkerungsgruppen in Deutschland und anderen Industrienationen, aber auch in Entwicklungsländern. Ein manifester Folatmangel offenbart sich in erster Linie in Veränderungen des Blutbildes (megaloblastische Anämie) und der Schleimhäute (Gastrointestinale Störungen). Laut Lehrbuch ist der Folatmangel der am weitesten verbreitete Vitaminmangel in Westeuropa und Nordamerika. International zählt die Gruppe der Folate zur sogenannten "Conflicting Category". Die letzten beiden Ernährungsberichte 1980 und 1984 machen dies für den deutschen Bereich deutlich: Der Vergleich der tatsächlichen täglichen Zufuhr an Folaten pro Person mit den Zufuhrempfehlungen der DGE offenbart eine Versorgungslücke von bis zu 50%. Sofort stellt sich hier die zentrale Frage: Wo liegen die Ursachen für diese Tatsache, und wie kann dieser Fehlernährung begegnet werden?

Über die verursachenden Faktoren liegen praktisch keine gesicherten Kenntnisse vor. Eine verbreitete Hypothese lautet jedoch, eine unzureichende Folatezufuhr mit der Nahrung sei als Hauptursache für den genannten Vitaminmangel zu betrachten. Diese resultiert aus einer Bevorzugung folatarmer Lebensmittel sowie aus der hohen Verlustrate der instabilen Folate bei der Verarbeitung und Zubereitung von Lebensmitteln. So wird bei den „Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr“ der Deutschen Gesellschaft für Ernährung pauschal ein Zubereitungsverlust für Folat in Höhe von 50% einkalkuliert, während er z. B. für Vitamin C und Vitamin B<sub>1</sub> nur mit 30% berechnet wird.

Hier setzen nun die Basisfragen der 1987 mit einem Dissertationspreis der Justus-Liebig-Universität ausgezeichneten Arbeit an:

- Wie werden Folsäure und Folate in Lebensmitteln überhaupt bestimmt; gibt es eine zuverlässige Analysenmethode?
- Wie hoch ist der tatsächliche Folatgehalt unserer Lebensmittel und wie hoch sind effektiv die Zubereitungsverluste?

Bisher mußte die Antwort lauten: Es gibt keine zuverlässige, empfindliche und gleichwohl spezifische Methode zur Folatbestimmung in Lebensmitteln. Daher sind auch die wenigen veröffentlichten Werte über die Folatgehalte einiger untersuchter Lebensmittel fehlerbehaftet und unterliegen Schwankungsbreiten von mehreren 100%

(s. Tabelle). Nach neuesten Erkenntnissen gehen Wissenschaftler heutzutage von einer bisherigen Unterschätzung der tatsächlichen Folatgehalte und einer Überschätzung der Zubereitungsverluste aus.

### Inhalte der Arbeit

Da offensichtlich ein unzureichender Wissensstand über den Folatgehalt unserer Kost besteht, waren grundlegende Forschungen bezüglich der Folatbestimmung in Lebensmitteln unausweichlich. Ziel der Forschungsarbeiten war daher die Entwicklung und Anwendung einer praktikablen Methode (Hochdruckflüssig-Chromatographie, HPLC) zur Folatanalytik unter Berücksichtigung chemischer und reaktionskinetischer Untersuchungen.

Die wesentlichen Aspekte der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen

- Erarbeitung einer empfindlichen und spezifischen HPLC-Methode: Ionenaarchromatographie auf reversed-phase Säulen: eine bewußt einfach konzipierte, leicht zu reproduzierende Methode, die alle wichtigen Folsäure-Derivate in einem Analysengang erfaßt (Abb. 1).

- Beweis der Spezifität der Methode durch Aufnahme von Massenfragmentogrammen, ein Novum in Verbindung mit der HPLC-Fotoanalytik. (Standardsubstanz und der aus Weißkohl isolierte „HPLC-Peak“ - Abb. 2 - sind identisch.)

- Grundlagenforschung zur Reaktionskinetik der zwei wichtigsten temperaturempfindlichen, in Lebensmitteln vorkommenden Folate Tetrahydrofolsäure und 5-Methyltetrahydrofolsäure.

- Erarbeitung eines stabilisierenden Milieus, welches während des gesamten Analysenverfahrens einen effektiven Oxidationsschutz für die labilen Folate leistet.

- Durch die weitgehend verlustfreie Aufarbeitung des Analysenmaterials trotz notwendiger Erhitzungsschritte kann die relativ unempfindliche UV-Detektion zur Quantifizierung eingesetzt werden. Eine Anreicherung oder Derivatisierung ist somit nicht erforderlich; dadurch werden zwei wesentliche Fehlerquellen vermieden.

- Die Eignung der erarbeiteten Methode zur Folatanalytik in Lebensmitteln und zur Ermittlung von Zubereitungsverlusten konnte am Beispiel Weißkohl bewiesen werden. Im Vergleich zu allen bisher bekannten Literaturangaben wurden viel höhere Folatkonzentrationen (s. Tabelle) und geringere Zubereitungsverluste (25%) in diesem Lebensmittel bestimmt.

### Potentielle Anwendungsmöglichkeiten

Sollten sich die letztgenannten Befunde bei anderen Lebensmitteln bestätigen, müßten sämtliche Folatdaten in den Nährwerttabellen und die Zufuhrempfehlungen überdacht werden. Die Hypothese einer unzureichenden nahrungsbedingten Folatezufuhr könnte nicht wie bisher aufrechterhalten werden. Eine Fülle von ernährungsphysio-

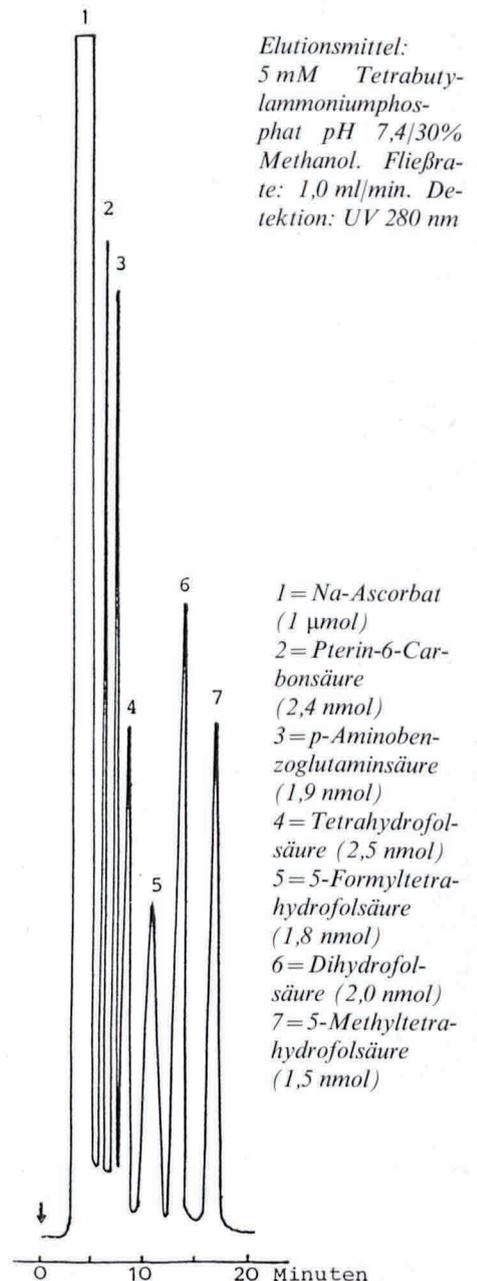


Abb. 1: Typisches Chromatogramm nach Auftrennung reduzierter Folate, zweier Abbauprodukte und Ascorbat mittels RP-18-Säule.

logischen und lebensmittelchemischen Folgeuntersuchungen scheint zwingend erforderlich. Die methodischen Voraussetzungen hierfür sollten mit dieser Arbeit geschaffen werden, um eine weiterführende Frage in Zukunft beantworten zu können:

– Kann der erhöhte Bedarf an Folat bzw. eine reduzierte Folatverwertung bestimmter Bevölkerungsgruppen (Risikogruppen) durch gezielte, folatreiche Ernährung kompensiert werden?

Dies ist gerade für die Lebensmittel- und chemisch pharmazeutische Industrie, die sich mit der Vitaminergänzung unserer Kost befaßt (Vitaminierung von Lebensmitteln, Vitamintabletten) eine nicht unbedeutende Frage. Denn die betroffenen Risikogruppen einer unzureichenden Folat-Bedarfsdeckung stellen eine große Zahl an Zielpersonen dar: Erwachsene Frauen, insbesondere Schwangere und Stillende, aber auch Kinder und Jugendliche, Senioren, alkoholabhängige Personen sowie Patienten, die bestimmte Medikamente einnehmen müssen, wie z. B. Antikonvulsiva (Mittel gegen Anfallsleiden), Sedativa (Beruhigungsmittel) oder Folatanaloga zur Tumorbekämpfung (Methotrexat).

Das hier angewandte Verfahren erlaubt es im Gegensatz zu früheren Methoden, sowohl natürliche als auch die den Lebensmitteln zugesetzten Folate getrennt, aber in einem Analysengang zu erfassen. Diese Tatsachen können gerade in der amtlichen Lebensmittelüberwachung von großer Bedeutung sein, ebenso wie in der Qualitätskontrolle der obengenannten Industriezweige. Des weiteren kann die vorgestellte Methode sicherlich Bedeutung für Haushaltsgeräte-Hersteller (Mikrowellenherd, Kochgeschirr) haben, die als Marktstrategie eine nährstoffschonende Zubereitung verfolgen und dieses belegen müssen (z. B. anhand von geringen Vitaminverlusten).

Die ökonomische Analysenmethode (geringe Anzahl an erforderlichen Reagenzien, unproblematische Entsorgung der gebrauchten Lösungsmittel) erfordert mit Ausnahme der HPLC-Anlage einen geringen apparativen Aufwand. Da heutzutage nahezu jedes Labor mit einer HPLC-Anlage ausgestattet ist (bzw. sein sollte), dürfte eine Umstellung herkömmlicher, arbeitsintensiver und größtenteils ungenauer Methoden auf die moderne high-tech Analytik kein Problem mehr darstellen.

Tabelle 1: Literatur- und Tabellenwerte für den Folsäuregehalt in Weißkohl (*Brassica oleracea capitata alba*)

Autoren/Tabelle	Methode	µg Folsäure/ 100 g rohes Frischgewicht	
		Freies Folat	Gesamtfolat
Hurdle et al. (1968)	(L. casei)	240	– <sup>a</sup>
Butterfield u. Calloway (1972)	(L. casei)	68	100
Perloff u. Butrum (1977)	(L. casei)	33	66
Leichter et al. (1978)	(L. casei)	28	30
Nik-Daud u. Bender (1983)	(L. casei)	–	64
Bender (1985)	(L. casei)	–	640
Ristow et al. (1982)	(Hühner-Bioassay)	–	42
Gregory et al. (1982)	(HPLC, UV 280 nm)	–	225
	(Radioassay)	–	134
	(L. casei)	–	59
Gregory et al. (1984)	(HPLC, fluorimetr.)	–	8
	(L. casei)	–	13
McCanne u. Widdowson's The Composition of Foods (1978) "white cabbage" "winter cabbage"		19	26
		60	90
Haenel (1979)		? 80	?
Souci, Fachmann, Kraut (1981)		? 79	?
Elmadfa et al., Vitamin- und Mineralientabelle (1984)		? 79	?
Schulz u. Bitsch (1986)	(HPLC, UV 280 nm)	299 <sup>b</sup>	545 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Fehlende Angaben: Werte wurden nicht bestimmt

<sup>b</sup> Zerstörung der natürlichen Konjugase (Enzym zur Freisetzung von Folaten aus Bindungen an Glutamate) durch 15 min. Kochen vor dem Homogenisieren

<sup>c</sup> Aktivierung der natürlichen Konjugase durch Inkubation (1 h, 37 °C) nach dem Homogenisieren



Dr. oec. troph. Arne Schulz erhielt für seine Dissertation über „HPLC-Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Folsäure-Derivaten: Methodische Grundlagen für die Folanalytik in Lebensmitteln“ 1987 eine Dissertationsauszeichnung der Universität Gießen. Arne Schulz hat am Institut für Ernährungswissenschaft promoviert (Betreuerin: Frau Prof. Dr. Irmgard Bitsch) und ist heute im Applikationslabor der Firma KONTRON Instruments AG in Rotkreuz in der Nähe von Zürich beschäftigt.

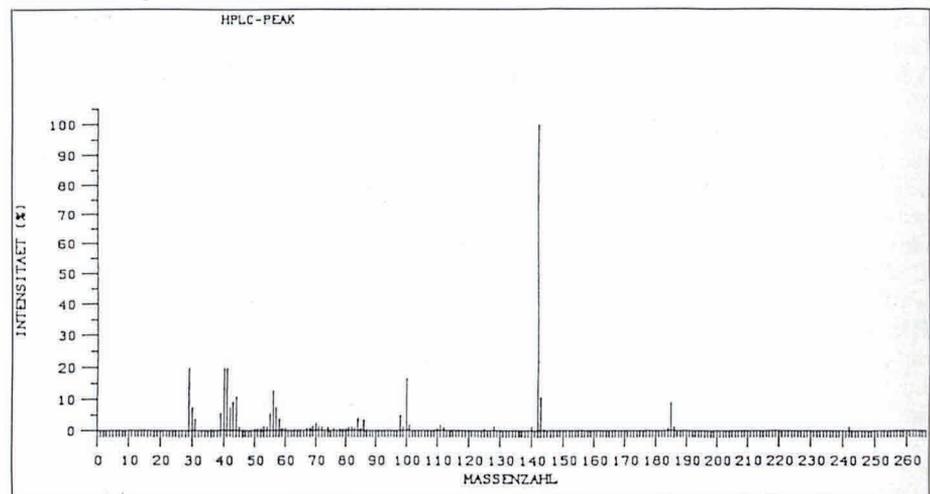


Abb. 2: Massenfragmentogramm von 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-CH<sub>3</sub>-THF). Aus Weißkohl isolierte Substanz