

Übersicht

Nahrungsfolate – Eine aktuelle Übersicht Stabilität, Physiologische Bedeutung, Bioverfügbarkeit, analytische Bestimmungsmethoden, Einfluß der Lebensmittelbehandlung

Ch. Pfeiffer¹, J.F. Diehl¹ und W. Schwack²

¹ Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

² Institut für Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe (TH)

Food folates – a topical review Stability, physiological relevance, bioavailability, analytical methods of determination, effect of food processing

Zusammenfassung: Wegen der unterschiedlichen, zum Teil geringen Stabilität der einzelnen Folatvitamine gegenüber extremen Bedingungen bereitet sowohl die analytische Folatbestimmung als auch die Abschätzung der Folatverluste bei der Lebensmittelverarbeitung und -zubereitung erhebliche Schwierigkeiten. Mit Hilfe der HPLC ist es möglich, Aussagen über das native Folatderivatmuster zu treffen. Da die Bioverfügbarkeit der Folate von vielen Faktoren beeinflusst wird und zur Bioverfügbarkeitsbestimmung unterschiedliche Methoden eingesetzt wurden, ist die Inkonsistenz der Ergebnisse erheblich. Mit radioaktiven oder stabilen Isotopen markierte Folate haben neue Wege in Bioverfügbarkeits- und Metabolismusuntersuchungen eröffnet.

Summary: Because of the unequal and, in some instances, low stability of different folate vitamers against extreme conditions the analytical determination of folate and the estimation of folate losses in food processing and preparation cause considerable difficulties. HPLC allows determination of the native folate derivative patterns. As the bioavailability of folates is influenced by a variety of factors and different methods were employed for assessing bioavailability there is a considerable inconsistency in the results of these studies. Folates labeled with radioactive or stable isotopes provide new approaches to metabolic and bioavailability studies.

Schlüsselwörter: Nahrungsfolate – Folatanalytik – Folatverfügbarkeit – Folatmetabolismus

Key words: Food folates – analysis of folates – folate bioavailability – folate metabolism

1. Einleitung

Folate spielen bei der Synthese von Nukleinsäuren und einiger Aminosäuren eine entscheidende Rolle und haben neuerdings wegen ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe antioxidativ wirkender Vitamine verstärktes Interesse gefunden. In den letzten Jahren wurde zunehmend der Einfluß der Folsäurezufuhr auf die Vermeidung von Fehlgeburten und Neuralrohrdefekten untersucht. Empfehlungen für eine optimale Folatzufuhr sind schwer zu treffen, da Messungen der Serumkonzentration wenig repräsentativ für den intrazellulären Stoffwechselbedarf sind. Zur Bewertung der Qualität eines Lebensmit-

tels auf seine Eignung für die Folatversorgung des Menschen sind zuverlässige Daten über den nativen Folatgehalt, über Folatverluste bei der Verarbeitung und Zubereitung von Lebensmitteln und Aussagen über die Verfügbarkeit der Folate erforderlich. Dabei muß analytisch zwischen den einzelnen Derivaten der Folatgruppe, die unterschiedliche chemische und physiologische Eigenschaften besitzen, differenziert werden. Die herkömmliche mikrobiologische Methode zur Bestimmung des Folatgehaltes wird dieser Anforderung nicht gerecht. Erst die neueren HPLC-Methoden erlauben eine Differenzierung in die einzelnen Vitamere.

Umfangreiche Übersichtsartikel (72, 85) beschäftigen sich vorwiegend mit der Chemie der Folate, ihrer Reaktivität und Stabilität während der Lebensmittelverarbeitung, bzw. der Kinetik des Folatabbaus. Einige kürzere Artikel bieten Übersichten zum Stoffwechsel im Folatmangel (14, 79), zur Folatbioverfügbarkeit (13, 53, 71) und zur Folatanalytik (82). Die vorliegende Arbeit soll eine aktuelle Übersicht zum Stand der Folforschung geben, mit Schwerpunkt auf den neueren Methoden der Analytik und der Bioverfügbarkeitsbestimmung.

2. Nomenklatur der Folate

Die Zahl der Folsäurevitamere ist außerordentlich groß. Nach Tannenbaum et al. (176) könnten rund 140 verschiedene Folatderivate existieren, wenn die Anzahl der Glutaminsäurereste auf sechs begrenzt ist. Tatsächlich finden sich in biologischem Gewebe rund 100 verschiedene Abkömmlinge (115). Das Grundgerüst bildet dabei immer die **Pteroylmonoglutaminsäure (PteGlu)** oder **Folsäure (FA)**. Sie besteht aus einem 2-Amino-4-oxo-pteridinkern, der p-Aminobenzoesäure und einem Glutamylrest (Abb. 1). Die von der Folsäure ausgehenden Folatderivate unterscheiden sich an drei Stellen des Moleküls:

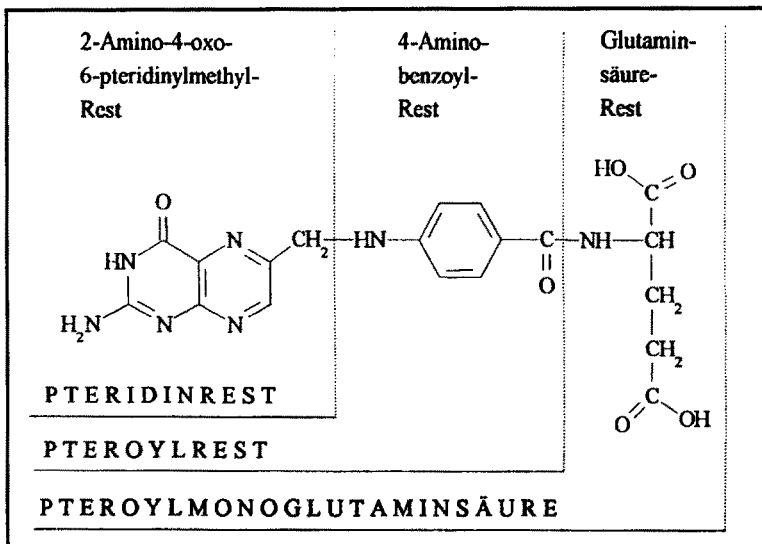


Abb. 1. Strukturformel der Folsäure

a) in der **Oxidationsstufe des Pteridinteils**, d.h. oxidiert, di- und tetrahydriert. Die biologisch aktiven Formen der Folsäure sind die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF) und ihre C₁-substituierten Abkömmlinge. 7,8-Dihydrofolsäure (DHF) tritt wahrscheinlich nur als Intermediärprodukt auf und entsteht bei der Thymidilatsynthetase-Reaktion aus 5,10-Methylen-THF (85). Folsäure selbst hat im Organismus keine Funktion, wird aber wie auch DHF durch die Dihydrofolatreduktase (E.C. 1.5.1.3.) zu THF reduziert und kann dadurch in den Metabolismus eingeschleust werden. In biologischen Materialien kommt sie nur in minimalen Mengen vor, die vermutlich durch oxidativen Zerfall reduzierter Folate entstehen (135).

b) An den Atomen 5-N und 10-N der THF können verschiedene **C₁-Substituenten** gebunden sein, wodurch sich folgende Derivate ergeben:

- 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure (5-CHO-THF)
- 10-Formyl-Tetrahydrofolsäure (10-CHO-THF)
- 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (5-CH₃-THF)
- 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure (5,10-CH₂-THF)
- 5,10-Methenyl-Tetrahydrofolsäure (5,10-CH=THF)
- 5-Formimino-Tetrahydrofolsäure (5-CHNH-THF).

Auf der Fähigkeit, solche C₁-Substituenten zu binden, beruht die Coenzymfunktion der Folate im Organismus. Das Folatverteilungsmuster variiert stark zwischen den verschiedenen Geweben, die vorherrschenden Formen in biologischem Material sind jedoch THF, 5-Methyl- und 10- sowie 5-Formyl-THF (160).

c) Das Molekül kann bis zu acht **Glutamylreste** enthalten, die über γ-Peptidbindungen verknüpft sind und nur von spezifischen, in vielen Geweben vorkommenden Pteroylpolylglutamathydrolasen (Dekonjugasen, E.C. 3.4.12.10) gespalten werden können. Sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren dominieren organabhängig verschiedene Kettenlängen, wobei die **Polyglutamate** den größten Teil der Folatmenge stellen. Ihnen kommt neben der Speicherfunktion vermutlich die eigentliche Coenzymfunktion zu. Dafür spricht, daß sie gegenüber verschiedenen Enzymen höhere Affinitäten haben als Monoglutamate (Übersicht bei Kisliuk (111)). Die Zellmembran kann hingegen nur von den **Monoglutamaten** durchquert werden; sie stellen die Transportform der Folate dar. Unter **freiem Folat** werden alle Folatformen verstanden, die in der mikrobiologischen Bestimmungsmethode vom Mikroorganismus direkt als Wachstumsfaktor verwertet werden können: in der Regel Monoglutamate, z.T. aber auch Folate mit bis zu drei Glutamatresten (173). Bei der Ermittlung des **Gesamtfolates** werden zusätzlich die aus den Polyglutamaten unter Enzymeinwirkung freigesetzten Monoglutamate miteingerechnet. Nach heutigem Verständnis und unter Einsatz chromatographischer Analyseverfahren werden nur die Monoglutamylformen dem freien Folat zugerechnet. In der Literatur herrscht bezüglich der Nomenklatur der Folate keine Einheitlichkeit. Oft wird z.B. von Folsäure gesprochen, obwohl Folate (reduzierte Derivate) gemeint sind. Im folgenden wird der Begriff Folat als Oberbegriff für die Folsäure und alle aus ihr abgeleiteten Derivate (unterschiedliche Reduktionsstufe, Substituenten und Anzahl von Glutaminsäureresten) verwendet. Die Bezeichnung Folsäure wird nur gewählt, wenn es sich um die Pteroylmonoglutaminsäure handelt.

3. Stabilität der Folate

Die hohe Empfindlichkeit vieler Folate gegenüber Hitze, Sauerstoff, Licht und extremen pH-Werten bereitet für die analytische Bestimmung dieser Substanzklasse, die Abschätzung der Zubereitungsverluste und der Verfügbarkeit aus Nahrungsmitteln erhebliche Schwierigkeiten. Die schnelle Entstehung vielfältiger Abbauprodukte führt leicht

zur Bildung von Artefakten und somit schließlich zu Meßfehlern und Fehlinterpretationen (81). Alle Folate können an der 9-C-10-N-Bindung des Moleküls gespalten werden, wodurch ihre Vitaminwirksamkeit verloren geht (121). Es entstehen verschiedene Pteridinfragmente und p-Aminobenzoylglutamatreste (p-ABG) unterschiedlicher Kettenlänge. Daneben können noch verschiedene Oxidationsprodukte auftreten. Auch die Neubildung anderer Moleküle aus den Fragmenten wurde unter bestimmten Bedingungen beobachtet (187).

Die Stabilität der einzelnen Derivate ist sehr unterschiedlich (Tab. 1) Das stabilste Derivat ist die **Folsäure (FA)**, die deshalb zur Vitaminierung von Lebensmitteln und als Bestandteil von Multivitaminpräparaten eingesetzt wird (158, 171). Sie ist resistent gegenüber Luft, durch Wärme wird sie nur langsam zersetzt und in Lösung ist sie bei neutralem pH-Wert unempfindlich. Reduktions- und Oxidationsmittel spalten jedoch das Molekül. Demgegenüber werden reduzierte Folate in Lösung schnell zersetzt und sind bereits in kristalliner Form oxidationsempfindlich.

Tab. 1. Stabilität von Folaten und oxidative Spaltung nach Aramouni [6]

Verbindung	Stabilität im sauren Milieu (pH 1.0)	Stabilität im alkalischen Milieu (pH 13.0)	Produkt nach KMnO_4 -Oxidation
FA	stabil	stabil	p-ABG
DHF	relativ stabil	instabil	p-ABG
THF	instabil	instabil	p-ABG
5-CHO-THF	Umlagerung zu 5,10-CH=THF	stabil	p-ABG
10-CHO-THF	Umlagerung zu 5,10-CH=THF	relativ stabil	10-CHO-FA
10-CHO-FA	stabil	Umwandlung zu FA	10-CHO-FA
10-CHO-FA ₇	stabil	Umwandlung zu FA ₇	10-CHO-FA ₇
5-CH ₃ -THF	relativ stabil	relativ stabil	5-CH ₃ -DHF
5,10-CH=THF	stabil	Umlagerung zu 10-CHO-THF	10-CHO-FA
p-ABG	stabil	stabil	p-ABG und Unbekannte

Dihydrofolsäure (DHF) wird als empfindlichstes Derivat sehr schnell zu verschiedenen Produkten oxidiert, wobei FA, aber auch p-ABG und verschiedene Pteridinabkömmlinge entstehen (179). Selbst bei Kühlung und in Gegenwart von Antioxidantien wird DHF innerhalb kürzester Zeit abgebaut (82).

Etwas stabiler ist die voll reduzierte **Tetrahydrofolsäure (THF)**. Sie kann partiell reoxidiert werden, wenn nicht eine Spaltung in nicht mehr verwertbare Fragmente wie p-ABG und Pterinabkömmlinge vorangegangen ist. Bei saurem pH-Wert (< pH 6) ist sie gegenüber Sauerstoff stabiler als im Neutralbereich, was auf die Protonierung des 5-N-Atoms zurückzuführen ist (131, 132).

Noch stabiler, besonders gegenüber Erhitzung, reagiert die **5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (5-Methyl-THF)**. Ihre Oxidationsrate beträgt nur 1/10 der Oxidationsrate von THF (133). Das Zersetzungsprodukt von 5-Methyl-THF ist im neutralen und alkalischen

Bereich in erster Linie das entsprechende 5,6-Dihydroderivat. In diesem pH-Bereich soll es recht stabil sein und in Gegenwart von Ascorbat wieder rehydriert werden. Ob 5-Methyl-THF bei niedrigen pH-Werten ebenfalls oxidiert wird, oder ob hier die MolekÜlsplaltung dominiert, ist unklar (131).

5-Formyl-Tetrahydrofolsäure (5-Formyl-THF) ist gegenüber Sauerstoff relativ stabil und wird auch bei längerem Erhitzen kaum zerstört, wogegen die Halbwertszeiten von DHF, THF und 5-Methyl-THF im Minutenbereich liegen. Bei neutralem und alkalischem pH-Wert beruht die Stabilität dieses Derivates auf dem Vorhandensein des Substituenten an der 5-N-Position. Im sauren Milieu (pH 1.0 bis 2.0) ist die Verbindung instabil und wird zu 5,10-Methenyl-THF umgelagert.

10-Formyl-Tetrahydrofolsäure (10-Formyl-THF) kann leicht zu 10-Formyl-DHF und zur biologisch aktiven, stabilen 10-Formyl-FA oxidiert werden. Die Umlagerung der Formylgruppe bei Erhitzung spielt jedoch eine größere Rolle als die Oxidation; es entsteht dabei die energetisch stabilere 5-Formyl-THF. Diese Reaktion verläuft sehr schnell (131) und kann zur gemeinsamen analytischen Erfassung der beiden Derivate herangezogen werden (70, 81).

Doppelt substituierte Derivate (an 5-N- und 10-N-Position) weisen eine recht gute Stabilität gegenüber Luftsauerstoff auf. Obwohl sie neben den Hauptderivaten THF, 5-Methyl-THF und 5- sowie 10-Formyl-THF beim Vorkommen in Lebensmitteln oder biologischem Material kaum eine Rolle spielen, können sie analytisch miterfaßt werden, da sie sich leicht in stabilere Produkte umwandeln: 5,10-Methylen-THF und 5,10-Methenyl-THF spalten Formiat ab und werden so zur THF.

Möglichkeiten der Probenstabilisierung sind durch Lichtschutz, Kühlung, Einstellung geeigneter pH-Werte, Sauerstoffausschluß durch Begasen mit einem inerten Gas und Zugabe von Antioxidantien gegeben. Während der **Lichtschutz** recht einfach durchgeführt werden kann, ist das **Einhalten niedriger Temperaturen** zumindest dann nicht möglich, wenn die Folate unter Erhitzen aus der Matrix extrahiert werden müssen. Auch die **Einstellung eines geeigneten Puffer-pH-Wertes**, bei dem alle zu untersuchenden Derivate geschützt werden, ist nicht möglich. Wie schon erwähnt, ist die Stabilität der THF im sauren Milieu höher, die der 5-Methyl-THF im neutralen bis schwach alkalischen Bereich. Den Puffersalzen kommt auch eine gewisse Bedeutung für die Stabilität der Derivate zu (131, 132), der Einfluß ist allerdings gering und die Ergebnisse hierzu uneinheitlich. Die **Begasung der Proben mit Stickstoff** führte bei Schulz (159) zwar zu einer Verdopplung der Halbwertszeit für 5-Methyl-THF, war aber weit weniger effektiv als der Zusatz von Ascorbat.

Die größte Bedeutung für die Stabilisierung von Folatderivaten kommt dem **Zusatz von Antioxidantien**, im Idealfall in Verbindung mit einer Stickstoffbegasung zu. Der Sinn dieser Maßnahmen liegt in der Senkung des Sauerstoffgehaltes im Medium. Die hierfür gebräuchlichsten Antioxidantien sind Mercaptoethanol (23, 33, 104, 113, 141, 167) und vor allem die Ascorbinsäure mit ihren Salzen (4, 31, 44, 70, 83, 142, 159). Durch Kombination von Ascorbat mit der Stickstoffbegasung blieben bei Schulz (159) sowohl THF als auch 5-Methyl-THF während einer einstündigen Inkubation bei 97 °C vollständig erhalten. Es muß allerdings erwähnt werden, daß diese Erhaltungsraten bei verschiedenen pH-Werten (8.0 für 5-Methyl-THF und 9.0 für THF) ermittelt wurden. Bei einem pH-Wert von 8.0 wurde die THF dagegen zu 38 % zerstört. Dies zeigt sehr deutlich, daß die Zahlen nur für Modellösungen gelten und in der Praxis mit höheren Verlusten gerechnet werden muß.

Mercaptoethanol wird als nicht so günstiges Antioxidationsmittel angesehen. Seine

stabilisierende Wirkung zeigt sich erst beim Einsatz relativ hoher Konzentrationen (131), bei der Chromatographie treten Störpeaks auf (117, 159), seine Absorption bei 254 nm stört die UV-Detektion der Folatpeaks, und es wurden auch Einflüsse auf die Retentionszeit berichtet (4, 167). Von Mercaptoethanol ist außerdem bekannt, daß es mit THF zu Kondensationsprodukten reagieren kann (196), die möglicherweise Probleme bei der Chromatographie aufwerfen. Aus diesen Gründen und wegen der Geruchsbelästigung durch Mercaptoethanol wird in jüngeren Untersuchungen fast ausschließlich Ascorbat als Stabilisator verwendet.

4. Stoffwechsel

Biochemie

Im Intermediärstoffwechsel wirkt Folsäure nach Reduktion zu THF als Coenzym bei Transferreaktionen von Einkohlenstoffeinheiten wie Methyl-, Formyl-, Hydroxymethyl-, Methylen-, Methenyl- und Formiminogruppen. Sie spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Purinen, Thymin, Serin, Methionin und bei weiteren Methylierungsreaktionen. Abb. 2 gibt eine Übersicht über einige wichtige folatabhängige Reaktionen. Eukaryotische Zellen können keine Folat-de-novo-Synthese durchführen und sind somit von der Aufnahme fertiger Folate abhängig. Prokaryonten können aus Folatvorläufern wie 6-CH₂OH-7,8-H₂-pterin, p-Aminobenzoat in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen folatähnliche Produkte herstellen.

Resorption, Transport, Speicherung und Ausscheidung von Folaten

Die Hauptfraktion des Nahrungsfolates liegt als Polyglutamat vor. Da die Resorption jedoch ausschließlich in Form reduzierter oder oxidiert Monoglutamate erfolgt, kommt der Hydrolyse und damit der intestinalen Dekonjugase eine besondere Bedeutung zu. Beim Menschen liegen zwei Dekonjugasesysteme vor: eines im Bürstensaum der Darmmukosa und eines im Darmsaft als Pteroylpolyglutamathydrolase (PPH) (19).

Die **Bürstensaum-PPH** ist eine Exo- und Carboxypeptidase mit dem pH-Optimum im Neutralbereich und offenbar gleicher Aktivität für Polyglutamate mit unterschiedlicher Kettenlänge. Ähnliche Eigenschaften der Bürstensaum-PPH wurden auch beim Schwein gefunden, wohingegen dieses Enzym bei der Ratte und beim Affen zu fehlen scheint (184).

Die **im Darmsaft gelöste PPH** ist keine Carboxypeptidase, sondern eine cytosolische Endopeptidase, deren maximale Aktivität bei pH 4.5 zu finden ist und die bei Mensch, Schwein, Ratte, Affe und Huhn nachgewiesen wurde. Beim Huhn spaltet diese Endopeptidase zuerst an der Diglutamatposition, danach erst werden Monoglutamate aus den Diglutamaten freigesetzt. Die Ratten-PPH ist eine Endopeptidase, die direkt Monoglutamate freisetzt (154).

Die Hydrolyse der Polyglutamate ist beim Vorgang der Resorption der schnellere Schritt. Der Transport der Folate durch die Zellmembran der Darmzelle ist 5 bis 10 mal langsamer, und somit geschwindigkeitsbestimmend. Das Folatmonoglutamatresorptionssystem des Menschen ist vermutlich sehr leistungsfähig. So werden Monoglutamatgaben bis zum 50fachen des Tagesbedarfs noch zu ca. 90 % resorbiert (80). Die **Resorption** ist ein pH-abhängiger, der Sättigung unterliegender Prozeß, der im Dünndarm, hauptsächlich im proximalen Jejunum auftritt und durch Folsäure kompetitiv gehemmt werden kann (162).

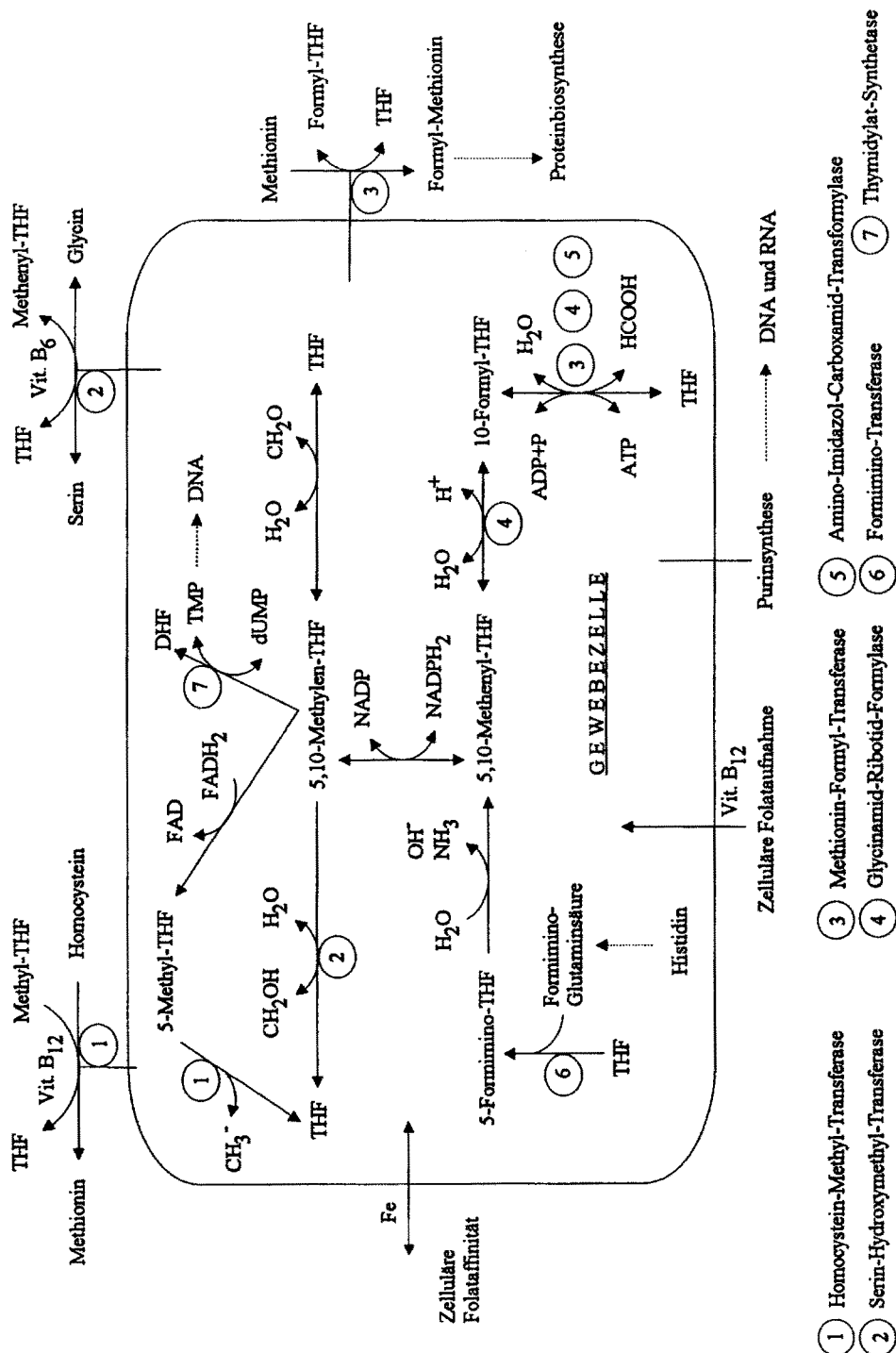


Abb. 2. Wichtige folatabhängige Stoffwechselreaktionen (modifiziert nach Hages et al. [79])

Für den intestinalen Folattransport werden zwei Resorptionsmechanismen angenommen. Ein strukturspezifisches Transportsystem mit hoher Affinität liegt für die Resorption physiologischer Folatdosen vor. Es handelt sich dabei um einen **Folat/Hydroxyl-Carrier**, der bei niedrigen Substratkonzentrationen den Transport des Vitamins durch die intestinale Bürstensaummembran vermittelt. Die Energetisierung erfolgt unter physiologischen Bedingungen vermutlich durch den transmembranären pH-Gradienten (81). Bei höheren Substratkonzentrationen erfolgt passive Diffusion.

Nach Aufnahme physiologischer Nahrungsfolatmengen in die Darmzelle werden die Folate fast quantitativ in 5-Methyl-THF überführt und über das Blut der Leber sowie peripheren Geweben zugeführt. Obwohl die Mukosazellen des Dünndarms sehr effizient oxidierte Folate reduzieren und methylieren, wird dennoch ein kleiner Anteil der Folate unverändert in den Blutkreislauf abgegeben (166). Die in der Darmmukosa vorkommende 5-Methyl-THF stammt entweder aus dem Folsäuremetabolismus der Mukosazellen, die die Folsäure zu THF und 5,10-CH₂-THF reduzieren, aus denen schließlich das methylierte Derivat entsteht oder aus dem enterohepatischen Kreislauf. Da die 5-Methyl-THF schnell in den Stoffkreislauf aufgenommen wird, ist ihre Konzentration in der Darmmukosa auch bei starker Folatüberladung konstant (116).

80 % der Folatkonzentration im **Serum** besteht aus 5-Methyl-THF (63). Ein Großteil der Serumfolatverbindungen ist mit niedriger Affinität unspezifisch an Proteine wie α -Makroglobulin, Albumin, Transferrin gebunden. Zusätzlich existiert ein spezifisches **Folatbindungsprotein (FABP)**, an das Folat zwar nur in sehr geringer Menge, aber mit hoher Affinität gebunden ist. Primäre Aufgabe der Bindungsproteine ist der Transport oxidierten Folate zur Leber, wo sie zu biologisch verwertbaren Tetrahydrofolaten reduziert werden (55). Die Bindungsproteinkonzentration und der Umfang der Folatproteinbindung wird nicht von der Folatversorgungssituation, sondern hormonell beeinflusst (5).

In den **Erythrozyten** liegt das Folat ausschließlich in konjugierter Form vor, hauptsächlich als Tetra- bis Hexaglutamat. Es ist unspezifisch an ein oder mehrere Makromoleküle gebunden, wobei Hämoglobin als ein mögliches Bindungsprotein diskutiert wird (84). Reife Erythrozyten sind für Folat weitgehend inpermeabel, jedoch inkorporieren Retikulozyten größere Folatmengen. Da das Folat in den reifen Erythrozyten keinerlei Stoffwechselaufgaben mehr erfüllt, dient es dort nur noch der Speicherung.

Der Folattransport in die **peripheren Körperzellen** erfolgt mit Hilfe eines speziellen, in der Membran lokalisierten Proteins, das ähnlich dem Serum-FABP für oxidierte, nichtsubstituierte Folate eine höhere Affinität hat als für methylierte Folate (166). Die Aufnahme der Monoglutamate in die Körperzellen ist ein energieabhängiger, carrier-vermittelter Prozeß. Reduzierte Folate werden 100 mal effektiver an die Zelloberfläche angelagert und internalisiert als oxidiertes Folat (41). Horne et al. (101) zeigten, daß es für die Aufnahme von 5-Formyl-THF in Mitochondrien (aus Rattenleber isoliert) einen Carrier gibt, der für reduzierte, natürlich vorkommende Folate spezifisch ist.

In der Zelle werden die Folatmonoglutamate durch die **Folylpolyglutamatsynthetase** zu Polyglutamaten konjugiert und entweder als solche deponiert oder ihrer biologischen Coenzymfunktion zugeführt (Abb. 3). Die Fähigkeit einer Zelle, Folat zurückzuhalten, ist vom Umfang der Polyglutamatbildung abhängig, da nur Polyglutamate zellulär gespeichert werden können. Der Umwandlung in Polyglutamate geht eine Demethylierung und evtl. Formylierung voraus. Bei fehlender Demethylierung, wie z.B. bei Vitamin-B₁₂-Mangel, kann daher 5-Methyl-THF nicht in der Zelle gehalten werden und wird wieder ins Serum abgegeben (166).

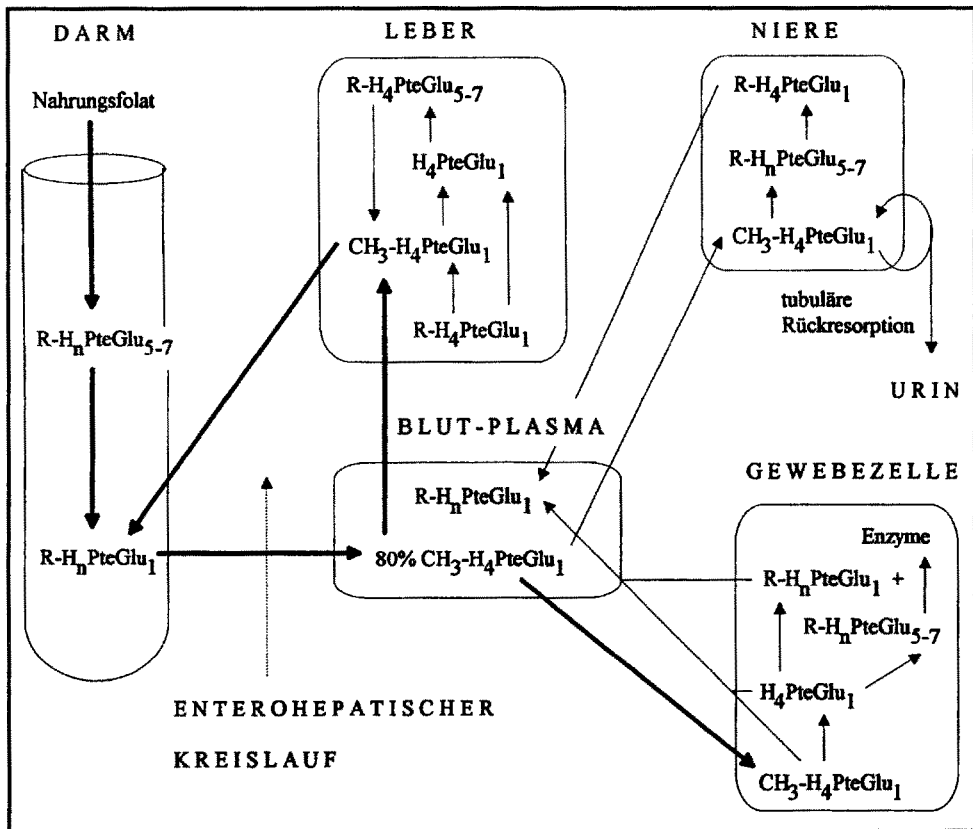


Abb. 3. Regulation der intrazellulären Polyglutamatgehalte

Die **Leber** ist das Hauptspeicherorgan für Folate. Nur 10 bis 20 % der aufgenommenen Folatmenge werden jedoch während der ersten Passage in der Leber zurückgehalten. 5-Methyl-THF wird schnell und quantitativ in die Galle sezerniert und unterliegt somit dem enterohepatischen Kreislauf. Die biliäre Folatkonzentration beträgt dabei das Zehnfache der Serumfolatkonzentration (79). Nichtmethylierte Folate werden bei der ersten Leberpassage zum Teil in den hepatischen Polyglutamatpool inkorporiert, zum Teil werden sie methyliert und an die Galle abgegeben. Damit stellt der **enterohepatische Kreislauf** einen wesentlichen Faktor der Folathomöostase dar: der schnell verfügbare, vergleichsweise große extrazelluläre Folatmonoglutamatpool der Galle fängt zusammen mit dem kleinen intrazellulären Monoglutamatpool kurzfristige Schwankungen der Folatzufuhr zwischen den Mahlzeiten bzw. im frühen Folatmangel auf (79). Abb. 4 gibt einen Überblick über die wesentlichen Elemente der Folathomöostase.

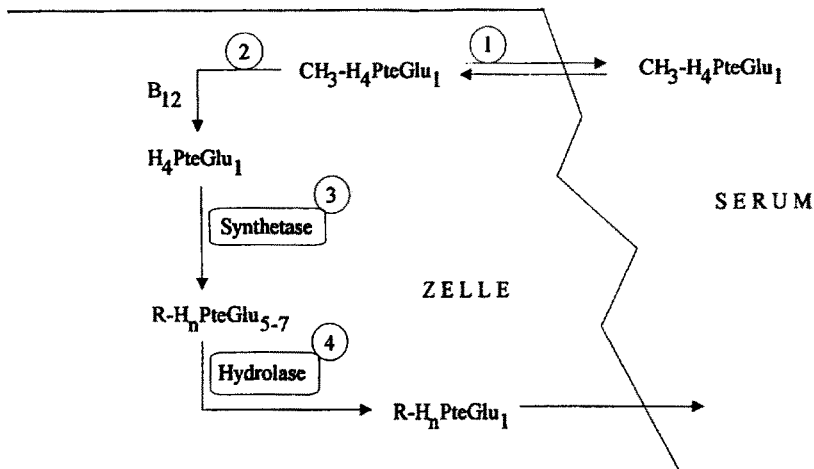


Abb. 4. Die wesentlichen Elemente der Folathomöostase (modifiziert nach Steinberg und Stephen [166])

Eine Überladung mit Folat ($> 2 \text{ mg Folsäure/Tag}$) hat einen Anstieg im Folatgehalt der Leber, der Darmmukosa und des Gesamtblutes zur Folge; auf den Folatgehalt im Gehirn wirkt sie sich jedoch nicht aus (116).

Die **Folatausscheidung im Urin** ist bei normaler, bedarfsadäquater Folatzufuhr gering. Aufgrund tubulärer Rückresorption in der Niere beträgt die Ausscheidung biologisch aktiver Folatformen ca. 10 bis 20 % der resorbierten Folatmonoglutamatmenge (118). Auch biologisch inaktive Abbauprodukte werden über den Urin ausgeschieden. Liegt die Folataufnahme unterhalb des Bedarfs, wird die Folatexkretion minimiert, während bei erheblicher Überschreitung der Bedarfsmenge die Rückresorptionskapazität der Niere überfordert wird, und die Folatkonzentration im Urin in Abhängigkeit von der zugeführten Menge ansteigt (190).

Die **fäkale Folatausscheidung** umfaßt neben nicht resorbierten Nahrungsfolaten auch enteral synthetisierte Folatverbindungen, die nach allgemeiner Auffassung nicht wesentlich zur Folatbedarfsdeckung beitragen. Ein Teil der durch Mikroorganismen im Dickdarm der Ratte synthetisierten Folate wird in den Gewebefolatpool des Wirtes, hauptsächlich in den Pool der Penta- und Hexaglutamatderivate mitaufgenommen (152).

In-vivo-Kinetik der Folate

Mit Hilfe deuteriummarkierter Folsäure wurden beim Menschen Untersuchungen zur In-vivo-Kinetik der Folate durchgeführt (180). Dabei wurde festgestellt, daß das Serumfolat bei Folatsupplementierung nach 18 Tagen eine maximale Konzentration aufwies, während die Folatausscheidung nach 1–2 Wochen einen Gleichgewichtszustand erreichte. Wurde die Folatsupplementierung unterbrochen, nahm die Folatausscheidung im Urin linear ab, während der Abfall im Serumfolat durch ein biexponentielles Modell mit einer Halbwertszeit von 18,7 Tagen beschrieben werden konnte. Dieses Modell ließ auf einen Umsatz von 4,5 % des Gesamtkörperfolates pro Tag schließen. Die Poolgrößen des Gesamtkörperfolates vor und nach Folsäuresupplementierung wurden zu $10 \mu\text{mol}$ bzw. $99 \mu\text{mol}$ berechnet.

Folatkatabolismus

Farrar und Blair (54) stellten fest, daß ein Großteil des Folatkatabolismus schon im Magen abläuft. Der intrazelluläre Abbau kann in der Regel wegen der Gegenwart von Proteinen, Antioxidantien und Enzymen, die eine Schutzfunktion ausüben, vernachlässigt werden. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Folsäure und Ascorbinsäure im Vergleich zu Folsäure allein beobachteten diese Autoren einen 2–3fachen Anstieg des 5-Methyl-THF im Plasma. Die Gegenwart von Nitrit im Magen hielten sie für den wahrscheinlich wichtigsten Faktor beim Folatkatabolismus.

Einfluß des Fastens auf den Stoffwechsel

Untersuchungen von Pietrzik (138) ergaben, daß der Plasmafolatgehalt von Probanden nach 8stündigem Fasten anzusteigen beginnt, bei fortschreitendem Fasten bis zu 2 Tage lang weiter ansteigt und dabei den zwei- bis dreifachen Gehalt des Ausgangswertes erreicht. Bei Gabe einer folatfreien Diät nach Beendigung des Fastens fiel der Folatgehalt wieder auf den Ausgangswert zurück. Erklärt wurde dieser starke Anstieg des Plasmafolatgehaltes mit der Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs während des Fastens, da im nüchternen Zustand keine Sekretion von Gallenflüssigkeit zur Verdauung stattfinden muß.

In einem Rattenfütterungsversuch wurde der Einfluß 14stündigen über Nacht Fastens auf den Folatgehalt in der Leber sowie im Plasma und auf die Folatausscheidung in Urin und Fäces getestet (136). Bei über Nacht fastenden Tieren kam es zu einem signifikanten Anstieg der Folatkonzentration im Plasma, Urin und in den Fäces. Auf die Leberfolatkonzentration und die Gesamtleberfolatmenge hatte das Fasten keinen Einfluß.

5. Folatbedarf

Nach neueren Erkenntnissen wird von der *Deutschen Gesellschaft für Ernährung* (47) eine tägliche Folatzufuhr von 300 µg anstatt bis dahin 400 µg Gesamtfolat empfohlen. Geht man von einer Verteilung Mono- zu Polyglutamaten von 40 zu 60 % (früher 25 zu 75 %), einer 100 %igen Resorbierbarkeit der Monoglutamate und einer 20 %igen Resorption der Polyglutamate aus, so errechnet sich eine resorbierbare Folsäuremenge von 156 µg/Tag. Ausgehend von einem täglichen Folsäurebedarf von 100 µg wird man mit diesem um etwa 50 % höher liegenden Wert auch individuellen Schwankungen bei der Resorption oder Verfügbarkeit gerecht. Bis 1989 lag der RDA-Wert für Folat in den USA bei 400 µg Gesamtfolat/Tag. Dieser Wert basierte auf einem täglichen Folsäurebedarf von 100 µg und einer Verfügbarkeit der Nahrungsfolate zwischen 25 und 50 %. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die neuen RDA-Werte (114).

Tab. 2. Seit 1989 geltende RDA-Werte für Folat

Bevölkerungsgruppe	RDA (Recommended Dietary Allowance)
Männer, 25-50 Jahre	200 µg/Tag (entspricht 3 µg/Tag und kg KG)
Frauen, 25-50 Jahre	180 µg/Tag (entspricht 3 µg/Tag und kg KG)
Schwangere	400 µ/Tag
Stillende Frauen	280 µg/Tag in den ersten 6 Monaten 260 µg/Tag in den nächsten 6 Monaten
Säuglinge bis zu 1 Jahr	3.6 µ/Tag und kg KG

6. Folatmangel

Aus Platzgründen kann auf dieses Thema nur ganz kurz eingegangen werden. Eine ausführliche Übersicht bietet Herbert (89).

In den letzten Jahren wird zunehmend die Rolle der Folsäure bei der Schwangerschaft zur Vermeidung von Fehlgeburten sowie von Neuralrohrdefekten in der Fachliteratur diskutiert (61, 86). In einer Studie der *MRC Vitamin Study Research Group* (125) des Medical Research Council wurde festgestellt, daß durch Supplementierung mit 4 mg Folsäure pro Tag eine substantielle Reduktion von Neuralrohrdefekten erzielt werden kann.

Es gibt sowohl metabolische als auch epidemiologische Daten, die die Hypothese bestärken, daß Folatmangel bei der Induktion von Krebs eine Rolle spielen kann (28, 52). Im Gegensatz dazu ist auch bekannt, daß Folat zum Tumorwachstum gebraucht wird (88). Aus diesem Grund werden Antifolate wie Methotrexat und Aminopterin in der Krebschemotherapie eingesetzt. Baggott et al. (11) untersuchten den Einfluß von Folatmangel auf die Entwicklung eines durch MNU (Methylnitrosoharnstoff) ausgelösten Brustkrebses in Ratten und stellten fest, daß Folatmangel den Start oder die frühe Weiterentwicklung von MNU-induziertem Brustkrebs in Ratten unterdrückt und eine Fولاتsupplementierung einen fördernden Einfluß hat.

Vor diesem Hintergrund scheint die Skepsis Rosenbergs (155) gegenüber der Einführung einer **Folatsupplementierung verschiedener Lebensmittel**, wie sie in den USA zur Behebung von Neuralrohrdefekten diskutiert wird, durchaus berechtigt. Jedes einzelne dieser folatangereicherten Lebensmittel mag sich positiv auswirken, nimmt man jedoch gleich eine Fülle von folatsupplementierten Lebensmitteln zu sich, kann die Folataufnahme um das Zehnfache oder mehr zunehmen. Die Sicherheit solch eines Anstiegs der Folatzufuhr wurde bisher nicht überprüft.

7. Verfahren zur Analyse von Folaten

Eine der Hauptbeschränkungen der Folatforschung liegt in der analytischen Methodik der Bestimmung der Folatvitamere. Im Laufe der Jahre ist man auf eine Reihe von Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Folatgehaltes in biologischem Material gestoßen. Die meisten biologischen Proben enthalten relativ geringe Folatkonzentrationen, dafür aber eine große Anzahl verschiedener Derivate, die es zu trennen gilt. Dazu kommt, daß Folate ziemlich instabil gegenüber Hitze, pH-Wert und Sauerstoff sind. Weiterhin gibt es Probleme mit der unterschiedlichen Aktivität der endogenen Dekonjugase und der Einteilung in freies Folat und Gesamtfolat. All diese Faktoren beeinflussen die Ergebnisse, so daß es schwierig ist, Literaturwerte miteinander zu vergleichen, zumal diese mit sehr unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden. Bislang sind drei grundsätzliche Möglichkeiten bekannt, Folate zu bestimmen: mikrobiologische, radio-metrische und chromatographische Verfahren.

Mikrobiologische Methoden

Zur Bestimmung des Folatgehaltes in Lebensmitteln wurden bisher hauptsächlich mikrobiologische Verfahren eingesetzt. Sie beruhen darauf, daß verschiedenen Mikroorganismen die Fähigkeit zur Bildung von Folaten fehlt und sie deshalb abhängig vom exogenen Folatangebot wachsen (131).

Der am häufigsten eingesetzte Testkeim ist *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Er spricht auf die meisten Folatmonoglutamate sowie Di- und Triglutamate an. Längere Polyglutamate werden hingegen nur teilweise und zunehmend schlechter (tetra-65,6 %, penta-

19,9 %, hexa-3,5 %) verwertet und müssen daher hydrolysiert werden (151). Der Einsatz von Human plasma conjugase oder Chicken pankreas conjugase zur Hydrolyse der Polyglutamate führt bei pH-Werten zwischen 6 und 7 zu den geringsten Folatverlusten (64).

Als weiterer Testorganismus wird *Streptococcus faecalis* eingesetzt. Im Gegensatz zu *L. casei* reagiert dieser Organismus jedoch nicht auf 5-Methyl-THF, die wichtigste Form im Plasma, den roten Blutkörperchen und der Leber, kann aber Pteroate, die vom Menschen nicht zum Aufbau von Folaten benutzt werden können, metabolisieren.

Der Vorteil mikrobiologischer Methoden liegt in erster Linie in ihrer **hohen Empfindlichkeit** im unteren ng- bzw. pmol-Bereich (192). Erst durch Kombination von HPLC und elektrochemischer Detektion wurde diese von Kohashi et al. (113) übertroffen.

Nachteile der mikrobiologischen Bestimmung sind die **Dauer** des Assays, die **geringe Reproduzierbarkeit** zwischen den einzelnen Labors und die **fehlende Differenzierung** in die verschiedenen Derivate. So können sowohl Stimulierungen als auch Hemmungen des Testorganismus durch im Extrakt enthaltene Nichtfolate auftreten und zu falschen Ergebnissen führen. Um das Problem der fehlenden Differenzierung in die verschiedenen Derivate zu lösen, wurde verschiedentlich der mikrobiologische Wachstumstest zur Quantifizierung von chromatographisch getrennten Folaten angewendet (30, 100, 192). Eine sichere Differenzierung zwischen Mono- und Polyglutamaten ist nicht möglich. Selbst die Reaktion von *L. casei* auf verschiedene Monoglutamate soll unterschiedlich sein (63, 137, 145). Die Wachstumsrate von *L. casei* wird nur im oberen Konzentrationsbereich (> 2 ng/10 ml) von Folsäure und 5-Methyl-THF gleichermaßen stimuliert. Im Bereich zwischen 0 und 2 ng/10 ml dagegen hat die 5-Methyl-THF, welche den Hauptteil der Folate in biologischem Material darstellt, eine wesentlich geringere Wirksamkeit als die Folsäure, mit der die Eichgerade erstellt wird (194, 195). Eine weitere Fehlerquelle sind stärke- bzw. proteinreiche Lebensmittel, in denen ein Teil des Gesamtfolates an Polysaccharide oder Proteine gebunden und somit nicht mittels *L. casei* erfassbar ist (29).

All diese Nachteile sowie verschiedene methodische Fehler (falsche Wahl des Konjugasepräparates, Nichteinhaltung der enzymatischen und mikrobiellen pH-Optima, unzureichende Stabilisierung von Redoxpotential und Wasserstoffionenkonzentration, falsche Ascorbatmengen zur Probenstabilisierung) führten dazu, daß die bislang publizierten, mit Hilfe dieser Methode gewonnenen Analysendaten stark schwanken.

Radiometrische Verfahren

Das Prinzip, auf dem der Radioassay basiert, ist folgendes: markierte und nichtmarkierte Folate konkurrieren um eine beschränkte Anzahl von Bindungsstellen an einem Folatbindungsprotein (FABP). Es gibt **kompetitive und nichtkompetitive Radioassays**. Im ersten Fall ist der Gehalt an Bindungsprotein so bemessen, daß nur 50 % der Folate gebunden werden können. Der Gehalt an gebundenen markierten Folaten hängt vom Gehalt an nichtmarkierten Folaten in der Probenlösung ab und fällt indirekt proportional mit steigender Menge an nichtmarkierten Folaten. Nach Abtrennung der nicht gebundenen Substanzen kann anhand der Isotopenverdünnung der Folatgehalt der Probe berechnet werden. Als Folatbindungsprotein wird in der Regel ein Kuhmilchprotein verwendet, als markierte Folate dienen ^3H -PteGlu, ^{125}I -PteGlu und ^{75}Se -PteGlu. Beim nichtkompetitiven Radioassay werden die nichtmarkierten Folate der Probenlösung mit dem Binder inkubiert und anschließend die freien Stellen am Bindungsprotein mit markierten Folaten titriert. Diese Methode benötigt eine kürzere Inkubationszeit und ist in der Antwort empfindlicher.

Radiometrische Verfahren sind vorwiegend für die Analyse von Plasma, Serum und

Erythrozyten geeignet (163), in denen die 5-Methyl-THF den bei weitem überwiegenden Teil der Folate darstellt. Bei diesen Substraten hat der Radioassay einige Vorteile gegenüber der mikrobiologischen Methode: er ist wesentlich schneller und billiger, es kann parallel ein hoher Probendurchsatz erfolgen und er ist weniger Schwankungen unterworfen, wenn z.B. Antibiotika oder Folatantagonisten in der Probe enthalten sind.

Für komplexe Folatgemische sind radiometrische Verfahren kaum anwendbar, weil die folatbindenden Proteine unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Derivaten zeigen. 5-Formyl-THF hat nur eine schwache Affinität zum Folatbindungsprotein der Milch (67), wohingegen Polyglutamate eine höhere Affinität zum Bindungsprotein aufweisen als Monoglutamate (67, 163). Somit kann es beim Vergleich der Messungen mit den Ergebnissen von Eichkurven zu Fehlinterpretationen kommen. Zu erheblichen Analysefehlern kann es auch kommen, wenn die Probe selbst folatbindende Proteine hoher Affinität besitzt (68).

Chromatographische Methoden

Von den klassischen chromatographischen Verfahren wurden lange Zeit die Dünnschicht- und die herkömmliche Säulenchromatographie eingesetzt. Die geringe Empfindlichkeit und hohe Störanfälligkeit dieser Verfahren hat allerdings dazu geführt, daß sie inzwischen kaum noch angewendet werden. McCormack und Newman (122) stellten übereinstimmend mit Scott (161) fest, daß sich eine zufriedenstellende Trennung von Folaten mit der **Dünnschichtchromatographie** nur mit einem System aus nichtionischer Cellulose als stationärer und einer 3 %igen Ammoniumchloridlösung als mobiler Phase erreichen läßt. Die Auswertung kann anhand Fluoreszenz, Fluoreszenzlöschung bzw. Absorption erfolgen.

Für die **säulenchromatographische Trennung von Folaten** wurden verschiedene Methoden, basierend auf Ionenaustausch (DEAE-Sephadex A-25, (143)) oder Gelfiltration (Sephadex G-10, (103)), entwickelt. Die Quantifizierung der Folate erfolgte entweder durch Derivatisierung (Oxidation mit KMnO_4 oder Reduktion mit Zn und HCl) und anschließende photometrische oder fluorimetrische Detektion (22, 87, 179) oder durch differenzierende mikrobiologische Bestimmung mit verschiedenen Testorganismen (103, 143). Keines der Verfahren erlaubt jedoch die simultane Bestimmung aller Folatderivate (122).

In den letzten Jahren gelang verschiedenen Arbeitsgruppen eine Auftrennung und Quantifizierung von Folsäurederivaten mit Hilfe der **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**. Die bisher publizierten Arbeiten zielen nur zu einem Teil darauf ab, die verschiedenen Vitamere zu trennen und zu quantifizieren. Einige Methoden sind von vornherein auf einen bestimmten Zweck oder eine bestimmte Matrix zugeschnitten und nicht universell anwendbar. Tafolla et al. (171) beschrieben eine Methode zur Messung des Folsäuregehalts in Multivitaminpräparaten, Schieffer et al. (158) zur Messung der Folsäure in folatangereicherten Lebensmitteln. Mit der Methode von Lankelma et al. (117) kann nur die im Serum dominierende 5-Methyl-THF erfaßt werden. Viele Verfahren wurden nur an wässrigen Standardlösungen erprobt und nicht dahingehend untersucht, ob sie auch für biologische Systeme anwendbar sind (23, 24, 100, 141).

Einige Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe der HPLC auch die Länge der γ -Glutamylseitenkette bestimmen (51, 57, 164). Diese Verfahren beruhen meist darauf, daß die Folate zwischen den Atomen 9-C und 10-N oxidativ oder reduktiv gespalten werden. Die Länge der resultierenden p-Amino- γ -Glutamylkette kann durch Cochromatographie mit synthetischen Markern oder kolorimetrisch nach Bildung von Azoderivaten identifiziert werden. Da sich die Reaktion jedoch nicht standardisieren ließ, wird der prakti-

sche Wert dieser Methode angezweifelt. Außerdem erlaubt sie keine Differenzierung zwischen verschiedenen C_1 -Substituenten und Redoxformen.

Da vor der Analyse des Gesamtfolatgehaltes in Lebensmitteln eine enzymatische Hydrolyse der Glutamatkette stattfindet, kommt der Bestimmung der Monoglutamat-formen eine große Bedeutung zu. Bei den verschiedenen Ansätzen kristallisieren sich im wesentlichen drei methodische Prinzipien heraus:

- **Anionenaustauschchromatographie**
(30, 33, 141, 167)
- **Reversed-phase-Chromatographie mit Ionenpaarbildung**
(4, 23, 24, 30, 50, 100, 104, 124, 144, 145, 159)
- **Trennung auf reversed-phase-Materialien ohne Ionenpaarbildung**
(44, 66, 68, 70, 71, 82, 91, 113, 175, 186).

Das Prinzip des **Anionenaustausches** wurde nur in wenigen Arbeiten angewendet, die ausschließlich älteren Datums sind. Dies läßt sich auf die erheblichen Schwierigkeiten, die sich dabei zeigten, zurückführen. Mit den entwickelten Systemen lassen sich nur einige wenige Derivate trennen. So gibt es Probleme, 5-Methyl- und 5-Formyl-THF zu trennen (33, 167), 10-Formyl-THF läßt sich nach Reed und Archer (141) nicht von FA trennen, DHF und FA cochromatographieren nach Chapman et al. (30). Zum Teil sind deshalb weitere Analysen mit einem anderen Chromatographiesystem notwendig (30, 141). Für komplexe Gemische sind diese Verfahren daher zu aufwendig. Weitere Nachteile der Anionenaustauschchromatographie sind die langen Analysenzeiten (25–75 min Trennzeit), die langen Regenerierungszeiten der Säulen nach der Trennung, die relativ kurze Lebensdauer der Säulenmaterialien und die Empfindlichkeit des Systems gegenüber Temperatur- sowie pH-Schwankungen.

Die verschiedenen Verfahren auf der Basis der **Ionenpaarchromatographie** unterscheiden sich im wesentlichen nur in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Lösungsmittels und in der Wahl des Gradienten. In vielen Untersuchungen konnten nicht alle physiologisch relevanten Derivate erfaßt werden – so wird bei Branfman und McComish (23), Allen und Newman (4) und Schulz (159) THF nicht berücksichtigt – oder einige der Derivate konnten nur unzureichend getrennt werden (FA und 5-Methyl-THF bei (24, 30, 124)). Bei einigen Autoren mußte wegen der ungenügenden Nachweisempfindlichkeit eine mikrobiologische Quantifizierung an die HPLC-Trennung angeschlossen werden (30, 100, 104, 124). Diejenigen Verfahren, die eine Trennung aller wesentlichen Folatderivate erlauben (100, 104), benötigen Trennzeiten von etwa einer Stunde. Somit sind die Verfahren für Reihenuntersuchungen zu zeitintensiv, zumal gerade bei diesen beiden Verfahren an die HPLC-Trennung die mikrobiologische Quantifizierung angeschlossen wurde.

Die **reversed-phase-HPLC ohne Ionenpaarbildung** ist eine neuere Möglichkeit der Folattrennung. Bei der Ionenpaarchromatographie wurde die Retention der negativ geladenen Substanzen durch die Bildung eines nach außen hin neutralen Ionenpaares auf einer apolaren stationären Phase ermöglicht. Zur Elution wurden dabei mobile Phasen mit ca. 30 % organischem Lösungsmittelanteil eingesetzt. Der Folattrennung ohne Ionenpaarreagenz liegen zwei Prinzipien zugrunde. Der assoziiert und damit apolar vorliegende Anteil einer schwachen Säure wird durch ihren pK-Wert und den pH-Wert des Puffers bestimmt. Wenn der pH-Wert der mobilen Phase auf Werte zwischen 2 und 3 abgesenkt wird, lassen sich somit die Ladungen der negativ geladenen Folate maskieren.

Dieses **Prinzip der Ionenunterdrückung** machten sich die Verfahren von Day und Gregory (44), Gregory et al. (70), Kohashi et al. (113) und Gounelle et al. (66) zunutze

und setzten zur Elution eine mobile Phase mit 15–20 % organischem Lösungsmittelanteil ein. Das zweite Prinzip der Folattrennung ohne Ionenpaarreagenz beruht darauf, daß der Pteridinkern der Folate eine gewisse **Lipophilie** der Substanzklasse bedingt, die offenbar ausreicht, um selbst bei neutralem pH-Wert eine ausreichende Retention auf der Trennsäule zu ermöglichen (175, 186). Eluiert wurde mit einem sehr geringen Anteil an Methanol (1–5 %).

In allen Arbeiten wurden die in biologischem Material dominierenden reduzierten Derivate der Folsäure und meist auch FA getrennt. Das chromatographische Verhalten verschiedener Abbauprodukte wurde hingegen nur vereinzelt untersucht (44, 83, 175). Für die Mehrzahl der Verfahren konnte im Gegensatz zu den auf Anionenaustausch und Ionenpaarchromatographie basierenden Methoden gezeigt werden, daß sie zur Analyse biologischer Materialien geeignet sind. So demonstrierte die Gruppe um Gregory, daß das von ihnen entwickelte Verfahren auf verschiedene Lebensmittel anwendbar ist und Hahn (81) zeigte die Anwendbarkeit seiner optimierten Methode am Beispiel der Leber.

Die wichtigste Voraussetzung für die Anwendung dieser Methoden auf biologische Fragestellungen war sicherlich die erhöhte Spezifität und Sensitivität durch elektrochemische oder fluorimetrische Detektion.

Die **UV-Detektion** wurde nur noch in dem mit einer komplexen on-line-Probenreinigung arbeitenden System von Wegner et al. (186) sowie bei der Bestimmung von 5-Methyl-THF in Plasma und Vollblut bei Hoppner und Lampi (91) genutzt. Wenn auch die UV-Detektion in den letzten Jahren wesentlich verbessert wurde, ist sie immer noch zu unempfindlich und erfordert daher aufwendige Konzentrierungsschritte vor der eigentlichen HPLC-Trennung. Das Absorptionsmaximum der Folate liegt zwischen 280 und 300 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren jedoch verschiedene in biologischen Matrices vorkommende Substanzen, wie z.B. aromatische Aminosäuren, so daß es zwangsläufig zu Störpeaks kommen muß.

So läßt sich auch erklären, warum nur wenige mit UV-Absorption arbeitende Verfahren zur quantitativen Folatanalytik eingesetzt wurden oder die Quantifizierung mikrobiologisch erfolgte. Auch die von Clifford und Clifford (33) nach Hitzeextraktion in Grapefruitsaft gefundene extrem thermolabile „DHF“ als Hauptfolat, deutet darauf hin, daß sich unter den analysierten Peaks weitere Produkte befunden haben müssen, die zu Fehlinterpretationen führten. Die Folatbestimmung von Schulz (159) in Weißkohl erfolgte mit UV-Detektion (massenspektroskopische Untersuchung der Peaks) ohne Vorreinigung des Gewebeextraktes. In seinen Chromatogrammen erscheinen die Folate als kleine Peakspitzen auf einer hohen, matrixbedingten Grundabsorption. Die jeweiligen Fraktionen enthalten sicherlich die entsprechenden Derivate, doch können die massenspektroskopischen Daten nicht die Peakreinheit belegen. Es wäre daher denkbar, daß auch Störsubstanzen aus der Matrix mitchromatographiert wurden, wofür auch die publizierten Folatgehalte, die wesentlich über allen zuvor veröffentlichten Daten liegen, sprechen.

Die **fluorimetrische Detektion** in der Folatanalytik wurde von der Gruppe um Gregory ins Leben gerufen und von Gounelle et al. (66) sowie Hahn et al. (83) aufgenommen und optimiert. Sie besitzt systembedingt eine höhere Spezifität als die UV-Absorption und ist weitaus empfindlicher (Tab. 3). Ein Nachteil der fluorimetrischen Detektion ergibt sich daraus, daß nur die voll reduzierten Folate nativ fluoreszieren. Andere Derivate wie FA oder DHF können durch **oxidative Spaltung (Nachsäulenderivatisierung)** in fluoreszierende Pteridinabkömmlinge überführt werden, so daß eine Reihe oxidierter und reduzierter Derivate mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität bestimmt

Tab. 3. Nachweisgrenzen verschiedener Verfahren zur Folatbestimmung (pg/Injektion) nach Kohashi et al. [113]

Detektionsart	THF	5-CH ₃ -THF	10-CHO-THF	5-CHO-THF	FA	Quelle
UV(280nm)	1500	1500	2500	2500	1000	1
fluorimetrisch (295/356 nm)	70	20	–	200	1000	2
L.casei-Assay	30	50	25	30	25	3, 4
elektrochemisch (+ 750 mV)	3	1	125	150	80	5

1) Tani und Iwai, 1983; 2) Gregory et al., 1984; 3) McMartin et al., 1981; 4) Wilson und Horne, 1984; 5) Kohashi und Inoue, 1986.

werden können. Dies erfordert allerdings ein komplexes Chromatographiesystem mit zwei Fluoreszenzdetektoren und zwei Pumpen (81, 70).

Lankelma et al. (117) und Kohashi et al. (113) beschrieben in ihren Arbeiten eine **elektrochemische Detektion** der Folate. Hierbei wurden extrem niedrige Nachweisgrenzen erreicht. Die für die Serumfolatanalytik entwickelte Methode von Kohashi et al. (113) ist bislang die einzige, die es erlaubt, verschiedene Derivate zu trennen und elektrochemisch zu quantifizieren. Eine Analyse dauert allerdings 65 Minuten. Über die Validität der chromatographischen Anordnung und die Eignung für andere Matrices liegen noch keine Daten vor.

Rebello (140) führte eine Detektion mittels **Photodiodenarray** durch, was den Vorteil einer Peakreinheitskontrolle, jedoch den Nachteil der geringen Empfindlichkeit im Vergleich zur fluorimetrischen, aber sogar zur UV-Detektion hat.

8. Folatgehalte in Lebensmitteln und Einfluß der Lebensmittelbehandlung auf die

Folatgehalte

Besonders reich an Folat sind folgende Lebensmittel (Werte nach Souci et al. (165) in µg/100 g Frischsubstanz:

- grünes Blattgemüse: Spinat 78, Broccoli 33, Kopfsalat 37, Chicorée 52
- weiteres Gemüse: Spargel 86, Tomate 39
- Kohlarten: Weißkohl 79, Wirsingkohl 90, Rosenkohl 78, Blumenkohl 55
- Leguminosen: grüne Bohnen 44, Erbsen 33, Linsen 35, Sojabohnen 230
- Getreideprodukte: Weizenvollkornbrot 60, Weizenkleie 400, Weizenkeime 520
- Ei und Eiprodukte: Hühnerei 65, -flüssigeigelb 150, -flüssigeiweiß 16, Trockenvollei 180, Trockeneigelb 210, Trockeneiweiß 96
- Fleisch und Innereien: Rind, reines Muskelfleisch 15, Leber 220, Nieren 50
- Bierhefe 1002

Der Folatgehalt von **Gemüse** differiert nicht nur von Art zu Art, sondern er hängt auch von den Wachstumsbedingungen ab (130). Er schwankt zwischen unteren Werten von etwa 10 µg Gesamtfolat für Sellerie oder Möhren und oberen Werten von fast 100 µg Gesamtfolat/100 g Frischsubstanz für Spinat oder Spargel. Neben diesen beiden folatreichen Lebensmitteln gelten die roh verzehrten Salate als die ergiebigsten Folatquellen (45).

Nach HPLC-Untersuchungen von Müller (127) besteht der Folatgehalt in Gemüse zu etwa 35 % aus Mono- und 65 % aus Polyglutamaten. Das Folatderivatmuster teilt sich in etwa 70 % 5-Methyl-THF und 30 % THF sowie 5-Formyl-THF auf. Dies wirkt sich auf die Verfügbarkeit günstig aus, da die reduzierten Folatderivate – vor allem 5-Methyl-THF – biologisch hochaktiv sind.

Wichtig erscheint auch, daß die endogene Dekonjugase in den meisten Gemüsearten eine sehr hohe Aktivität besitzt (32, 127, 136). Sofern diese Lebensmittel also roh verzehrt, oder vor einer Hitzebehandlung einer Homogenisierung unterworfen werden, verschiebt sich das endogene Folatmuster von Poly- zu Monoglutamaten, denen allgemein eine bessere Verfügbarkeit bestätigt wird. Sogar bei Lagerung der frischen Produkte (auch bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt) steigt bei gleichbleibendem Gesamtfolatgehalt der Anteil an Monoglutamaten erheblich an (32).

Freies und Gesamtfolat unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Verfügbarkeit, sondern auch in Hinsicht auf ihre Stabilität gegenüber Herstellungs- und Zubereitungsverfahren. Nach Taguchi et al. (172) bleiben nach 5minütigem Kochen je nach Lebensmittel 10–15 % des freien Folates und 20–90 % des Gesamtfolates erhalten. Die Abnahme des Folatgehaltes beruht dabei primär auf dem Übertritt des Vitamins ins Kochwasser (Auslaugungseffekte) und erst sekundär auf einer Inaktivierung (32, 119). Deshalb fanden Chen et al. (32) beim Blanchieren von Spinat in der Mikrowelle nur 13 % Folatverlust (Hitzezerstörung), beim Blanchieren in Wasser hingegen 64 % Verlust an freiem Folat und 33 % Verlust an Gesamtfolat (Hitzezerstörung und Auslaugung).

Fast alle **Obstarten** enthalten pro 100 g eßbarem Anteil weniger als 20 µg Gesamtfolat. Eine Ausnahme machen Orangen (24 µg/100 g) und folglich frischer oder gefrorener Orangensaft. 100–250 ml davon sollen den Minimalbedarf eines Erwachsenen von 50 µg Folsäure/Tag (15) decken (168). Ergänzend muß jedoch gesagt werden, daß große Mengen Orangensaft den pH-Wert im Darm absenken und somit zu einer verschlechterten Resorption der Folate führen können. Ob es sich dabei um die Hemmung der Bürstensaum-PPH und/oder den Prozeß der Aufnahme in die Darmzellen handelt, ist noch unklar (19, 146, 174).

Bei Obst beträgt der Anteil der Monoglutamate am Gesamtfolat laut Müller (127) im Mittel 50 %. Auch hier ist die metabolisch günstige 5-Methyl-THF mit 65 % Hauptvertreter der Derivate. THF und 5-Formyl-THF stellen die restlichen 35 %.

Hefen sind sehr folatreich, allerdings besteht der Gesamtfolatgehalt zu nahezu 100 % aus Polyglutamaten. Die in den Hefen enthaltenen Nukleinsäuren werden als Dekonjugaseinhibitoren diskutiert. Ein großer Teil der Folate in Brot (aus Auszugsmehlen) stammt aus der Hefe.

Im **Getreidekorn** ist der Hauptfolatanteil in den äußeren Randschichten des Korns lokalisiert (134). Lebensmittel aus Auszugsmehlen tragen somit nur unwesentlich zur Bedarfsdeckung mit Folat bei. Der Anteil freien Folates am Gesamtfolat bei Getreide und Getreideprodukten (Haferflocken, Weizenkleie) beträgt nach Müller (129) etwa 75 %. Neben den reduzierten Derivaten finden sich in allen Samen auch oxidierte Folatformen, wie Folsäure und 10-Formyl-Folsäure, die zusammen 25–50 % des Gesamtfolatgehaltes ausmachen.

Hülsenfrüchte sind gute Folatlieferanten. Uneinheitlich ist allerdings die Meinung darüber, ob Inhaltsstoffe der Leguminosen einen hemmenden Einfluß auf die Bürstensaum-PPH in der Darmmukosa haben und sich damit negativ auf die Verfügbarkeit auswirken. Butterworth et al. (27) berichteten, daß Extrakte aus vielen Bohnen-, Erbsen-, Linsen- und Sojabohnensorten inhibierend auf eine partiell gereinigte Schweinenieren-

Dekongjugasepräparation wirken. Bhandari und Gregory (19) fanden keine Hemmung der Bürstensaum-PPH durch gereinigte Phytohämagglutinine und Sojatrypsinninhibitor.

Bei Leguminosen findet man einen Monoglutamatanteil von im Mittel 73 % des Gesamtfolatgehaltes, was hinsichtlich der Resorbierbarkeit als sehr günstig zu bewerten ist. Die Folatverteilung auf die einzelnen Derivate, weist selbst innerhalb der gleichen Hülsenfruchtart große Unterschiede auf. Die Ursachen dafür dürften bei den Kulturbedingungen und eventuell bei einer Sortenabhängigkeit zu suchen sein. In Leguminosen findet man neben den drei wichtigsten reduzierten Derivaten THF, 5-Methyl-THF und 5-Formyl-THF auch noch oxidierte Folatformen, nämlich die Folsäure und die Formylfolsäure (129).

Hoppner und Lampi (99) untersuchten den Folatverlust in getrockneten Leguminosen nach unterschiedlichen Zubereitungsmethoden. Nach 20minütigem Kochen ohne vorherigem Einweichen blieben 60 % der Folate erhalten. Kurzes Einweichen (2 Minuten kochen, 1 Stunde zugedeckt ziehen lassen) führte bei allen drei getesteten Kochzeiten (20, 90 und 150 Minuten) zu einer niedrigeren Folatwiederfindung als langes Einweichen (16 Stunden über Nacht). Anscheinend bewirkte das 2minütige Vorkochen beim kurzen Einweichen eine stärkere Schädigung der Samen und ihrer Schalen als das lange Einweichen über Nacht, so daß eine größere Auslaugung des Folates ins Wasser erfolgte.

Muskelfleisch enthält nur etwa 10 µg Folat/100 g Rohware und trägt somit nur unwesentlich zur Verbesserung der Folataufnahme bei. Durch Verzehr von **Innereien** wird hingegen die Höhe der Folatzufuhr stark beeinflusst. 100 g gebratene Leber enthalten 145 µg Gesamtfolat (90). Die Zubereitungsverluste sind mit etwa 50 % relativ gering.

Eier und Eiprodukte sind ebenfalls geeignete Lebensmittel, um die Folatzufuhr zu erhöhen. So enthält ein hartgekochtes Ei noch 22 µg Gesamtfolat (134). 86 % des Folatgehaltes eines Eis befindet sich im Eigelb, 14 % im Eiweiß. Der Folatanteil im Eigelb besteht zu nahezu 100 % aus Monoglutamaten, und dabei wieder zu fast 100 % aus 5-Methyl-THF (128).

Der Folatgehalt der **Milch** unterliegt erheblichen Schwankungen, die auf die Fütterung der Tiere, sowie die Lagerung und Behandlung der Milch zurückzuführen sind. Untersuchungen von Ghitis und Candanosa (62) ergaben für frische Vollmilch eine Streubreite von 4.8–7.1 µg/100 g, bei einem Mittelwert von 5.5 µg/100 g. Milch und Milchprodukte tragen bei Aufnahme entsprechender Mengen im Säuglings- und Kleinkindalter in nennenswertem Umfang zur Deckung des Bedarfs bei (134). Nach Müller (128) liegt der Folatgehalt in Milch und Milchprodukten vorwiegend in Form von 5-Formyl-THF vor (70 %), und der Anteil von Monoglutamaten am Gesamtfolat beträgt etwa 70 %. Nach Rao et al. (139) verdoppelt sich der Folatgehalt von Magermilch bei der Fermentation zu Joghurt. Auch bei der Käseherstellung steigt der Folatgehalt. Hier wurden einige *Penicillium*-arten als Starterkultur für die Fermentation hochaktiver Folsäurebildner verantwortlich gemacht (178).

Die Beständigkeit der Vitamine bei der **Behandlung mit ionisierender Strahlung** ist sehr unterschiedlich (49) und hängt von vielen Faktoren, wie dem Wassergehalt des zu bestrahlenden Substrates, der Temperatur, bei der die Bestrahlung durchgeführt wird, und der Matrix, in der sich die strahlungsempfindlichen Substanzen befinden, ab (48, 178). Bezüglich des Einflusses der Bestrahlung auf Folate gibt es einige ältere Untersuchungen aus den 50er und 60er Jahren. Diese wurden mit Hilfe der unspezifischen und damals noch sehr fehlerbehafteten mikrobiologischen Methode durchgeführt. Der *Gemeinsame FAO/IAEA/WHO Expertenausschuß zur Prüfung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit bestrahlter Lebensmittel* stellte bei der Zusammenkunft von 1980 fest, daß

die neuen Methoden noch nicht zur Bestimmung der Bestrahlungsempfindlichkeit der verschiedenen Folatderivate eingesetzt worden waren, und empfahl zusätzliche Forschungsarbeit auf diesem Gebiet (188).

In den wenigen bisher durchgeführten Untersuchungen über die Strahlungsempfindlichkeit der Folsäure erwies sich dieses Vitamin als relativ stabil. Bei Versuchen zur Sterilisation von Fleisch durch Bestrahlung mit hoher Dosis zeigten sich keine oder nicht signifikante Verluste von Folsäure (3). Auch nach der Bestrahlung einer synthetischen Hühnerdiät mit einer Dosis von 28 kGy konnte kein veränderter Folsäuregehalt festgestellt werden (147). Bei der Behandlung tiefgefrorenen Hähnchenfleisches (-25 °C) mit einer Bestrahlungsdosis von 58 kGy ergab sich kein Folatverlust (177).

In einer bisher nur in Kurzfassung veröffentlichten Untersuchung zur Wirkung der Bestrahlung auf verschiedene Folatderivate in Trockenleguminosen mit Hilfe der HPLC wurden bei der hohen Dosis von 25 kGy geringe Verluste an Tetrahydrofolsäure festgestellt, während die Gehalte an Folsäure, Dihydrofolsäure, 5-Methyl- und 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure unbeeinflusst waren (126). Nach Bestrahlung einiger Trockenprodukte (Trockenspinat mit Dosen bis zu 20 kGy, Trockenspargel mit 5 kGy und Trockeneigelb mit 2 kGy) konnten mit Hilfe der HPLC keine Veränderungen bezüglich des Gesamtfolatgehaltes festgestellt werden. Auch das Folatderivatmuster sowie der Monoglutamatanteil am Gesamtfolat wurden durch das Bestrahlen nicht beeinflusst (136).

9. Bioverfügbarkeit von Folaten

Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen

Entscheidend für die Folatversorgung des Menschen ist neben dem Gehalt die Bioverfügbarkeit der Folate aus Lebensmitteln. Der Ausdruck „Bioverfügbarkeit“ beschreibt dabei das Ausmaß der Resorption und der metabolischen Utilisation eines Nährstoffs. Die Verfügbarkeit ist im wesentlichen von folgenden Faktoren abhängig:

Extrinsische Faktoren	Intrinsische Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> – Form der Folate (Reduktionsstufe, Derivate, Länge der Polyglutamatkette) – Aktivität der nativen Dekonjugase im Lebensmittel – Anwesenheit von Folatbindungsproteinen – Lebensmittelmatrix (z.B. Ballaststoffe) – Vorliegen möglicher Dekonjugaseinhibitoren 	<ul style="list-style-type: none"> – physiologische Konstitution des Einzelnen (wie Alter, Krankheit) – Aktivität der intestinalen Dekonjugase – pH-Wert im Darm

Form der Folate: Über die relative Bioverfügbarkeit der einzelnen Folatderivate gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Grossowicz et al. (77) beobachteten an Segmenten des Rattenintestinums einen im Vergleich zur synthetischen Folsäure schnelleren Transport reduzierter und methylierter Folate durch die Mukosazellen und schlossen daraus, daß natürlich vorkommende Folate anscheinend besser resorbiert werden als die synthetische FA. Tamura und Stokstad (174) fanden auch eine unterschiedliche Verfügbarkeit der nativen, reduzierten Folate für den Menschen:

FA 100 % THF 104,7 % 5-CH₃-THF 120,8 % 5-CHO-THF 70 %.

Bhandari und Gregory (20) untersuchten mit Hilfe von mit stabilen Isotopen markierten Folaten die intestinale Resorption und In-vivo-Kinetik von Folsäure, 5-Methyl-THF und 5-Formyl-THF in Ratten. Die Ergebnisse zeigten eine gleiche Bioverfügbarkeit für die drei untersuchten Folate.

Die Kettenlänge der in den Lebensmitteln überwiegend vorhandenen Polyglutamate hat auch einen Einfluß auf die Bioverfügbarkeit. So wird von den Folatpolyglutamaten eine geringere Verfügbarkeit im Vergleich zu den Monoglutamaten angenommen (46). Überschlagsmäßig wird bei der Berechnung des Folatbedarfs mit einer Verfügbarkeit der Polyglutamate von 20 % gerechnet, da noch nicht endgültig geklärt ist, bis zu welcher Kettenlänge Konjugate für den Menschen verfügbar sind. Tamura und Stokstad (174) veröffentlichten folgende Werte für die Bioverfügbarkeit von Folatpolyglutamaten, die jedoch nur für die synthetische FA und synthetische Tri- und Heptaglutamate ermittelt wurden:

FA 100 % FA₃ 85,2 % FA₇ 90,4 %.

Aktivität der nativen Dekonjugase im Lebensmittel: Die lysosomal lokalisierte Dekonjugase von Lebensmitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft hydrolysiert bereits bei Lagerung, vor allem aber bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln, die vor ihrer Zerkleinerung nicht thermisch vorbehandelt wurden, die Polyglutamate zu einem beträchtlichen Ausmaß zu Monoglutamaten.

In rohem Weißkohl kann hierdurch eine vollständige Spaltung der Polyglutamate in Folatmonoglutamate erreicht werden. Ristow et al. (148) fanden für rohen Weißkohl (aktive endogene Dekonjugase) eine 100 %ige Verfügbarkeit, hingegen für gekochten Weißkohl (endogene Dekonjugase inaktiviert) eine um 60 % verringerte Bioverfügbarkeit, die dem Anteil der Polyglutamate am Gesamtfolatgehalt in Weißkohl entspricht. Tamura und Stokstad (174) hingegen stellten sowohl für rohen als auch für gekochten Weißkohl eine Bioverfügbarkeit beim Menschen von 47 % fest. Allerdings waren die Schwankungen für die Ergebnisse bei rohem Weißkohl sehr hoch (0 bis 127 % Verfügbarkeit). Abad und Gregory (1) fanden im Ratten-Bioassay für blanchierten Kohl eine Bioverfügbarkeit von 68 %. Gee et al. (59) konnten zwar keinen genauen Wert für die Verfügbarkeit von Folat in gefriergetrocknetem Kohl berechnen, die Bioverfügbarkeit war jedoch in der gleichen Größenordnung wie die der Folsäure.

Anwesenheit von Folatbindungsproteinen: Die Folatbindungsproteine (FABP), die aus menschlicher, Kuh- und Ziegenmilch isoliert und charakterisiert wurden, sind heterogene Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 30.000 (169). Die physiologische Bedeutung dieser Bindungsproteine ist noch nicht klar. In-vitro-Studien von Ford et al. (58) zeigten, daß an Milch-FABP gebundenes Folat nicht von den Darmbakterien aufgenommen wurde. Colman et al. (39) konnten eine direkte Rolle der Bindungsproteine bei der Resorption nachweisen. Die Folataufnahme durch isolierte Rattendarmzellen war in vitro größer, wenn das Folat an ein Protein in Ziegenmilch gebunden war. Kohashi et al. (112) zeigten in In-vivo-Studien bei Ratten, daß die Denaturierung dieser Bindungsproteine (z.B. durch Pasteurisierung) die Bioverfügbarkeit der Folate aus Milch verringerte. Swiatlo et al. (170) fanden, daß die Zugabe von menschlicher oder Kuhmilch zu Diäten die Folatbioverfügbarkeit dieser Diäten im Vergleich zu Diäten mit synthetischer Folsäure im Rattenversuch erhöhte.

Lebensmittelmatrix: Da Nahrungsballaststoffe die Verfügbarkeit vieler Mikronährstoffe durch Ionenaustausch, Adsorption oder Komplexierung negativ beeinflussen können,

ist auch der Einfluß von Ballaststoffen auf die Folatbioverfügbarkeit von Interesse.

Ristow et al. (149) untersuchten über Dialyseversuche die Fähigkeit einiger gereinigter Ballaststoffkomponenten, Folatmonoglutamate zu binden oder zu komplexieren. Sie fanden für Lignin, Pectin und Weizenkleie eine geringe, für Cellulose und Natriumalginat keine Bindung zwischen Folat und Ballaststoff. Auch im Hühner-Bioassay fanden sie keinen Einfluß der Ballaststoffe auf die Folatverfügbarkeit. Übereinstimmend damit zeigte sich auch im Versuch von Keagy und Oace (106) kein Einfluß von Cellulose, Xylan oder Pectin auf die Utilisation von Monoglutamaten in Ratten. Abad und Gregory (2) hingegen zeigten, daß Pectin und Weizenkleie die Bioverfügbarkeit radio-markierter Mono- und Polyglutamate im Ratten-Bioassay reduziert.

Über einen negativen Einfluß von Weizenkleie auf die Verfügbarkeit von Polyglutamaten ist von mehreren Autoren berichtet worden. Laut Keagy (107) hat Weizenkleie zwar nur einen geringen Effekt auf die Bioverfügbarkeit der Monoglutamatform, reduziert aber die Utilisation der Heptaglutamylfolate in der Ratte. Sowohl Bailey (13) als auch Keagy et al. (108) berichteten von unterschiedlichen Folatbioverfügbarkeiten beim Menschen, wenn Mono- bzw. Heptaglutamylfolat zu Weizenkleie hinzugegeben wurde. Bei Zugabe des Heptaglutamates war die Fläche unter der Kurve (AUC) für das Serumfolat nach acht Stunden signifikant niedriger als bei Zugabe von Folsäure.

Keagy et al. (108) bieten folgende Erklärung für dieses Phänomen. Sowohl das Mono- als auch das Heptaglutamat sind an der 3-N-Position positiv geladen und haben negativ geladene α -Carboxylgruppen. Dies ermöglicht sowohl Anionen- als auch Kationenaustauschreaktionen. Das Heptaglutamat hat sechs zusätzliche α -Carboxylgruppen, was die Möglichkeiten anionischer Wechselwirkungen erhöht. Weizenkleie hat Kationenaustauscheigenschaften und kann die Wasserstoffionen- und Pepsinkonzentration im Magen absenken. Somit kann Weizenkleie direkt mit dem Heptaglutamat interagieren, die Folatbindung zu anderen Nahrungskomponenten beeinflussen, den pH-Wert des Mediums sowie die Rate und das Ausmaß der Verdauung anderer Nahrungsbestandteile verändern.

Lebensmittelinhaltsstoffe können einen fördernden bzw. hemmenden Einfluß auf die Folatverfügbarkeit ausüben. Es gibt Hinweise, daß die Ascorbinsäure durch ihre schützende Wirkung auf die Folatstabilität indirekt einen positiven Einfluß auf die Bioverfügbarkeit von Folaten hat (136).

Ob die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen einen Einfluß auf die einzelnen Folatvitamere oder die Lebensmittelmatrix – und damit auch auf die Folatverfügbarkeit – hat, ist noch ungeklärt. Erste Untersuchungen zum Einfluß der Lebensmittelbestrahlung auf die Bioverfügbarkeit von Folaten in Trockenspinat, -spargel und -eigeln ergaben im Rattenfütterungsversuch keinen negativen Effekt der Bestrahlung (136).

Aktivität der intestinalen Dekonjugase und Vorliegen möglicher Dekonjugaseinhibitoren: Die niedrige Bioverfügbarkeit für Orangensaft von 31 % (174) ist nach diesen Autoren auf die pH-Wert-Absenkung im Darm durch die Zitronensäure und damit vermutlich auf die herabgesetzte Hydrolyse der Polyglutamate in der Mukosazelle zurückzuführen. Nukleinsäuren in Hefen werden als Dekonjugaseinhibitoren diskutiert (153). Grossowicz et al. (78) vermuteten jedoch, daß viele Daten, die nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit für Hefefolat angeben, das Ergebnis viel zu hoher, unphysiologischer Dosen sind. Auch den Inhaltsstoffen der Leguminosen wird ein hemmender Einfluß auf die Dekonjugaseaktivität in der Darmmukosa nachgesagt. Allerdings sind die Meinungen dazu uneinheitlich.

pH-Wert im Darm: Der einer Sättigung unterliegende Mechanismus der Folatresorption ist stark pH-abhängig. Das pH-Optimum liegt bei 6.3 und fällt zu 7.6 hin stark ab (156). Der Effekt eines steigenden Darm-pH-Wertes auf die Folatresorption wurde durch orale Gabe von Bicarbonat in vivo getestet. Russell et al. (156) fanden dabei eine verringerte Folatresorption, während Hoppner und Lampi (95) keinen negativen Einfluß auf die Folatbioverfügbarkeit feststellen konnten. Tamura und Stokstad (174) zeigten, daß mit steigendem Säureanteil die Bioverfügbarkeit der Polyglutamate stark abfiel.

Physiologische Konstitution des Einzelnen: Das Vorliegen verschiedener Darmkrankheiten, die allgemein die Resorption und Utilisation der Nährstoffe verschlechtern, wirkt sich auch auf die Verfügbarkeit von Folaten negativ aus. Über eine unzureichende Folatversorgung bei einem relativ hohen Anteil alter Menschen ist wiederholt berichtet worden, zuletzt in einer belgisch-deutsch-niederländischen Gemeinschaftsuntersuchung (102). Der Einfluß des Alters auf die Resorptionsfähigkeit bzw. die Dekonjugaseaktivität im Darm ist noch unklar. Baker et al. (16) sprechen von einer verschlechterten Verfügbarkeit der Polyglutamate im Alter, da die Dekonjugase eine reduzierte Aktivität aufweist. Bailey et al. (12) hingegen fanden in ihrer Perfusionsstudie am Jejunum mit ^{14}C - und ^3H -markierten Mono- sowie Polyglutamaten keine Unterschiede in der Resorption der Isotope oder ihrer Ausscheidung im Urin bei jungen bzw. alten Menschen. Sicher ist jedoch, daß der Mangel an Folat bei älteren Menschen häufiger vorkommt und durch eine falsche bzw. mangelhafte Ernährung begünstigt wird (17).

Methoden zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit

Einige Jahrzehnte lang galt der **Hühner-Bioassay** zur Bestimmung der Folatbioverfügbarkeit als die Methode der Wahl, da Hühner bei Gabe einer folatfreien Diät ein vermindertes Wachstum zeigen und eine Anämie entwickeln, ohne daß Antibiotika (Unterdrückung der enteralen Folatsynthese) eingesetzt werden müssen (67, 148, 149).

Parallel dazu wurden Methoden entwickelt, die die Bestimmung der Bioverfügbarkeit aus der **Folatausscheidung im Urin beim Menschen** erlaubten (9, 174). Auch der **Anstieg des Serumfolates** nach Verabreichung eines folatreichen Lebensmittels ist beim Menschen ein leicht zugänglicher Parameter für Bioverfügbarkeitsversuche.

Nachteile solcher Untersuchungen sind jedoch, daß zum einen unkontrollierbare Schwankungen in der Urinfolatausscheidung beobachtet wurden, zum anderen die Änderungen im Urin recht unempfindlich auf die orale Verabreichung von Nahrungsfolaten reagierten. So mußten in vielen Studien nichtphysiologische Folatdosen eingesetzt werden, was es schwierig macht, die Daten auf normale Ernährungsbedingungen zu übertragen (15). Dabei wurden entweder große Mengen des folatenthaltenden Nahrungsmittels verabreicht, was die Folatutilisation negativ beeinflussen kann, oder der Organismus wurde in einer Vorphase zum eigentlichen Bioverfügbarkeitsversuch in einen folatgesättigten Zustand gebracht, so daß schon kleinere Nahrungsmengen eine meßbare Änderung der Parameter bewirkten.

Erst Anfang der achtziger Jahre wurden **Ratten-Bioassays** zur Bestimmung der Folatverfügbarkeit entwickelt, die nicht mehr das Wachstum, sondern den Folatgehalt von Geweben als Parameter für den Folatversorgungszustand heranzogen.

Da die Darmbakterien der Ratte normalerweise genügend Folat synthetisieren, um keine Symptome des Folatmangels auftreten zu lassen, wurden in manchen Versuchen **Antibiotika** eingesetzt, um dieses Phänomen zu minimieren. Sie verringern die Konzentration des Leberfolats bei einer ballaststofffreien Diät um $1\mu\text{g/g}$ Leber (110). Ist eine durch Bakterien verwertbare Energiequelle wie z.B. Xylan in der Diät enthalten, wird

die Folsäuresynthese durch die Darmbakterien erhöht. Dieser Effekt erscheint als Anstieg des Leberfolates und wird durch Antibiotika ausgeschaltet (109). Daher ist es wichtig, daß Cellulose als nicht verwertbare Energiequelle in der Diät enthalten ist. Sie „verdünn“ die Folatkonzentration in den Fäces, so daß durch die Coprophagie der Ratte viel geringere Folatgehalte beigetragen werden. Außerdem bewirkt sie eine schnellere Darmpassage, wodurch weniger Zeit für bakterielle Folsäuresynthese verbleibt (106).

Die wesentlichen Elemente eines Bioassays sind ein oder mehrere Gewebe, die empfindlich auf Unterschiede in der Folsäurezufuhr reagieren, eine folatfreie oder zumindest folatarne Grunddiät, eine angemessene Depletionsphase und eine Repletionsphase, in der Proben oder Standards zur Diät zugegeben werden. Zur **Wahl des Gewebes** als Parameter für die Berechnung der Bioverfügbarkeit gibt es verschiedene Ansätze. Grundsätzlich kann jedoch gesagt werden, daß das Verhältnis der Gewebefolatkonzentration bei Folatgabe zur Konzentration bei Folatentzug ein Indikator für die Steigung der Standardkurve und damit auch für die Eignung des entsprechenden Antwortparameters ist.

Die Gruppe um Keagy (105, 106, 107, 108, 109) entwickelte einen Ratten-Bioassay, der die Folatkonzentration der Leber als Indikator zugrunde legt. Auch Hoppner und Lampi (92, 93, 94, 95, 97, 98, 99) sowie Babu und Lakshmaiah (10) benutzten die Leber als Antwortorgan. Bei Abad und Gregory (1) und Swiatlo et al. (170) gab die Leber keine gute Dosis-Wirkungs-Beziehung, während das Plasmafolat brauchbare Ergebnisse lieferte. Gründe dafür könnten die hohen Leberfolat-Blank-Konzentrationen (bei Fütterung folatarmer Diäten), die geringe Steigung aber hohe Varianz der Dosis-Wirkungs-Geraden sowie der relativ hohe Restfolatgehalt der Grunddiäten von 0.3 µg/g anstatt wie sonst üblich 0.1 µg/g sein (110).

Walzem et al. (182) und Walzem und Clifford (183) entwickelten einen Ratten-Bioassay basierend auf Aminosäurediäten, nicht wie sonst auf Caseindiäten, bei dem sie ein ganzes Spektrum an Parametern zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit heranzogen. Der Vorteil der Aminosäurediäten im Vergleich zu den Caseindiäten ist, daß sie folatfrei und nicht nur folatarm sind und dadurch der Assay empfindlicher wird. Aus diesem Grund konnten Walzem und Clifford und später auch Clifford et al. (34, 35, 36, 37) sogar das Wachstum als Parameter zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit heranziehen. Allerdings ergaben nur niedrige Folsäurekonzentrationen in den Diäten bis zu einem Wert von 674 nmol/kg Diät eine positive Korrelation mit dem Wachstum als Parameter zur Bioverfügbarkeitsbestimmung (38). Weitere Parameter waren das Serum-, Leber- und Erythrozytenfolat sowie vereinzelt auch die Folatkonzentration der Nieren oder der Darmmukosa. Die empfindlichste Antwort wurde im Serum, gefolgt von der Leber erhalten. Weniger empfindlich waren die Antworten in den Nieren und Erythrozyten.

Da nur junge Retikulozyten Folat inkorporieren, das bis zum Zelltod erhalten bleibt, reflektieren die Erythrozyten die Folsäureversorgungssituation der letzten drei Monate und können in Kurzzeitbioassays keinen empfindlichen Parameter darstellen (110). Das Plasmafolat reagiert empfindlich auf eine vorangehende Folsäurezufuhr und wird durch das Intervall der Nahrungsaufnahme beeinflusst. Es gibt Auskunft über die Rate und das Ausmaß der Resorption, jedoch kann es nichts über die Folsäureverteilung in den Geweben und ihre Utilisation aussagen (110). Die Leberfolatkonzentration gibt die Resorption und Utilisation der Folate während des gesamten Bioassays wieder, da der in der Leber gespeicherte Folatgehalt im Vergleich zur täglichen Folsäurezufuhr viel größer ist (110).

Die Auswahl geeigneter **Depletions- und Repletionsphasen** erfordert Einsicht auf dem Gebiet der Kinetik der Folsäurehomöostase. Die Depletion und Repletion des Leber-

folates folgt einer Sättigungskinetik, die durch die Michaelis-Menten-Gleichung und ihre integrierte Form beschrieben wird (105). Die Halbwertszeit für Leberfolate beträgt damit etwa 8 Tage und ist ähnlich der Halbwertszeit für Folate im Serum oder in der Niere (123).

Eine Depletionsphase von drei Halbwertszeiten, also 3 bis 4 Wochen, führt zu einer Absenkung des Anfangswertes um 87,5 % und wurde von den meisten Arbeitsgruppen angewendet. Es gibt jedoch auch Gruppen, die mit 6 (10, 59) bzw. 12wöchiger Depletionsphase arbeiteten (170). Die Länge der Repletionsphase bestimmt die Folataufnahme und die Empfindlichkeit der Standardkurve. Die Aufnahme von Folat in die Leber ist bei folatdefizienten Ratten direkt und linear proportional zum Serumfolatgehalt (166). Mit steigendem intrazellulären Polyglutamatgehalt wird eine weitere Folatakkumulation in der Leber gehemmt. Bei einer längeren Repletionsphase (allerdings noch unterhalb des Sättigungszustandes der Leber) wird die Steigung der Standardkurve steiler und erlaubt somit eine höhere Empfindlichkeit bei geringen Nahrungsfolatkonzentrationen (103). In jedem Fall sollten lange Depletions- und Repletionsphasen vermieden und schnelle Wachstumsraten erzielt werden. Mit zunehmendem Alter der Tiere nimmt nämlich die Wachstumsrate und damit auch der Folatbedarf ab. Dadurch steigt bei gleicher Folatzufuhr durch die Nahrung die Leberfolatkonzentration an.

Die eingesetzten **Folatkonzentrationen für die Standardkurve** bewegen sich meist zwischen 0 und 1 mg Folat/kg Diät. Auf die Trockensubstanz bezogen, besitzen viele Lebensmittel Folatgehalte, die es erlauben, Diäten, die in diesem Bereich liegen, mit den Lebensmitteln als Folatquelle zuzubereiten. Für Nahrungsmittel mit einem geringen Folatgehalt muß ein anderer Versuchsaufbau gewählt werden (z.B. Nahrungsmittel + eine bestimmte Folat-Grunddosis).

In den letzten 5 Jahren wurde eine neue Technik zur Bioverfügbarkeitsbestimmung entwickelt: der **Einsatz von mit Radioisotopen oder stabilen Isotopen markierten Verbindungen**. Neben dem Vorteil hoher Spezifität bietet diese Technik noch eine Reihe weiterer Vorteile, wie z.B. die Möglichkeit, in einem Versuch gleichzeitig verschiedene markierte Formen eines Nährstoffes einzusetzen oder gleichzeitig orale und parenterale Verabreichung durchzuführen (76).

Abad und Gregory (2) reicherten die Diäten in ihrem Ratten-Bioassay mit radiomarkierten Folaten (Tritium, ^3H) an und beobachteten die Inkorporierung dieser Folate in die Leber sowie ihre Ausscheidung im Urin. Dabei stellten sie fest, daß Monoglutamyl-(^3H)-Tetrahydrofolate in vivo besser zurückgehalten werden als die analogen Polyglutamate bzw. (^3H)-Folsäure.

Die Entwicklung deuteriummarkierter Folate stellt eine bedeutende Verbesserung der Methodik für Bioverfügbarkeits- und Metabolismusstudien dar. Glutamatmarkierte Tetradeutero-Folsäure (d4) und 3',5'-Bideutero-Folsäure (d2) können in der Monoglutamatform hergestellt werden, d2-Folatpolyglutamate können ebenfalls synthetisiert werden (74). Monoglutamyl-d2- bzw. -d4-Folate zeigen in vivo gleiche Verfügbarkeit (73). Der Indikator für die Bioverfügbarkeit ist das Verhältnis der d2-/d4-Ausscheidung im Urin (bideuteriertes Folat wird oral verabreicht, tetradeuteriertes intravenös).

Mit Hilfe dieser Technik stellten Gregory et al. (74) fest, daß Hexaglutamylfolat vom Menschen auch verwertet werden kann, seine Bioverfügbarkeit jedoch im Vergleich zum Monoglutamat nur etwa halb so hoch ist. Eine weitere Studie (75) ergab, daß es Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der einzelnen Monoglutamylfolate gibt (Reihenfolge abfallender Bioverfügbarkeit: FA, 5-Methyl-THF, 5-Formyl-THF, 10-Formyl-THF, THF).

Neben dem großen Vorteil der hohen Spezifität haben isotopische Methoden jedoch einen entscheidenden Nachteil: die Schwierigkeit, solch kleine Konzentrationen eines Vitamins oder seiner Metaboliten zu isolieren, reinigen, derivatisieren und anschließend mit GC/MS zu messen ist immer noch erheblich (76).

Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Bioverfügbarkeit

Der Ausdruck „Bioverfügbarkeit“ stammt ursprünglich aus dem Bereich der experimentellen Pharmakologie und wurde dort als der Anteil einer Testdosis, der für ein bestimmtes Zielgewebe nach Adsorption verfügbar ist, definiert. Dieses Konzept kann nicht zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffen angewendet werden, da schon vorhandene Körperspeicher und postadsorptive Effekte für Nährstoffe und Arzneimittel im allgemeinen unterschiedlich sind. Außerdem sind die Vitamingehalte in natürlichen Nahrungsmitteln und Diäten für genaue Messungen meist zu niedrig. Deshalb werden manchmal synthetische Vitamine zugesetzt, die sich jedoch in ihrem Verhalten von den natürlichen Formen unterscheiden können. Aufgrund dieser Beschränkungen wurden in den meisten Studien Tierversuche eingesetzt. In-vitro-Modelle wurden zur Untersuchung des Vitamin-Adsorptionsmechanismus verwendet, aber nicht, um die Bioverfügbarkeit aus komplexen Lebensmittel zu bestimmen. Die Messung der Ausscheidung im Urin ist eine weitere Möglichkeit der Bioverfügbarkeitsbestimmung. Die Verwendung unterschiedlicher Modelle zur Bestimmung der Folatbioverfügbarkeit führt zu uneinheitlichen Ergebnissen (Tab. 4). Vergleicht man diese Daten miteinander, so stellt man fest, daß die im Ratten-Bioassay ermittelten Bioverfügbarkeiten immer höher sind als die beim Menschen über die Folatausscheidung im Urin ermittelten Verfügbarkeiten. Erstere übersteigen meist 80 %, manchmal sogar 100 % und kein Wert liegt unter 50 %.

Tab. 4. Verfügbarkeit von Nahrungsfolaten in %

Lebensmittel	Folatausscheidung im Urin (Mensch)		Quelle	Lebensmittel	Ratten- Bioassay	Quelle
	Mittelwert	Intervall			Mittelwert \pm SD	
Leber (gekocht)	50	22-103	1	Leber (Rind, gebraten)	101 \pm 10	3
Leber (Ziege)	70	9-125	2			
Bierhefe	60	55-67	1	Bierhefe	126	4
Bierhefe	10	0-36	2	Bierhefe	56	5
Spinat	63	26-99	2	Spinat	84	5
Eigelb	39	0-129	1	Spinat	112	4
Hühnerei	72	35-137	2	Spinat	75 \pm 5	3
Kohl (gekocht)	47	0-127	1	Kohl (gekocht)	83 \pm 45	6
Kohl (roh)	47	0-93	1	Kohl (blanchiert)	68	7
Limabohnen	79	0-138	1	Limabohnen	81 \pm 7	3
Orangensaft	31	17-40	1	Orangensaft	106 \pm 7	3
				Orangensaftkonzentrat	146	7

1) Tamura und Stokstad, 1973; 2) Babu und Srikantia, 1976; 3) Clifford et al., 1991; 4) Hoppner und Lampi, 1986; 5) Babu und Lakshmaiah, 1987; 6) Clifford et al., 1990; 7) Abad und Gregory, 1987.

Angesichts der Unterschiede in der Bestimmungsmethode erscheint dieser Effekt plausibel, da der Umfang und die Geschwindigkeit der Folatverteilung und -ausscheidung wesentlich vom Füllungszustand der Körperspeicher mitbestimmt wird (80). Bei der Messung der Folatausscheidung im Urin geht man von einem mit Folat gesättigten Organismus aus, während im Ratten-Bioassay depletierte Tiere herangezogen werden.

Da im Vitaminmetabolismus und in der Kinetik zumindest quantitative Unterschiede zwischen Mensch und Tier vorliegen können, ist die Übertragbarkeit der im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ein weiteres Problem bei Bioverfügbarkeitsversuchen. Dabei ist besonders auf die unterschiedlichen Dekonjugationssysteme im Darm des Menschen bzw. der Ratte hinzuweisen. Beim Menschen liegen zwei Enzymsysteme vor, die Bürstensaum-PPH und die im Darmsaft gelöste PPH, während die Dekonjugation der Polyglutamate bei der Ratte nur durch die im Darmsaft gelöste PPH vollzogen wird.

All dies zeigt, wie schwierig es ist, allgemein gültige Aussagen zur Bioverfügbarkeit von Folaten zu machen. Man muß sich dessen bewußt sein, daß man immer nur einen Teilaspekt betrachtet und die eingesetzte Technik eine wesentliche Rolle spielt.

10. Ausblick

Der erste BCR-Ringversuch (56) zum Vergleich der Folatbestimmung in Lebensmitteln mit Hilfe der mikrobiologischen Methode, der HPLC sowie mit Proteinbindungsassays (PBA) ergab eine gute Übereinstimmung zwischen den mikrobiologisch und mit HPLC bestimmten Gesamtfolatgehalten. Bei den eingesetzten HPLC-Methoden traten jedoch Schwachpunkte bei der Peakidentifizierung und Kalibrierung des Systems auf. Die mit Hilfe des PBA bestimmten Folatgehalte lagen im allgemeinen um 50–60 % höher als die mikrobiologisch und mit HPLC bestimmten Gehalte. Da mit den älteren Methoden zur Folatbestimmung kaum zuverlässige Ergebnisse über das native Folatderivatmuster, sowie den Monoglutamatanteil am Gesamtfolat zu erzielen sind, muß die differenzierende HPLC-Analytik weiter optimiert und standardisiert werden. Dabei ist die fluorimetrische Detektion der Folate wegen der wesentlich höheren Empfindlichkeit, aber vor allem wegen ihrer Selektivität zu bevorzugen.

Die bisherigen Daten zur Folatbioverfügbarkeit sind uneinheitlich und können kaum miteinander verglichen werden, da zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit unterschiedliche Modelle eingesetzt wurden. Der Einsatz von mit Radioisotopen oder stabilen Isotopen markierten Verbindungen kann in Zukunft zu neuen Erkenntnissen zur Absorption, dem Transport und Metabolismus dieser Vitamingruppe führen, und damit das Verständnis der Bioverfügbarkeit dieser Mikronährstoffe erweitern. Erst wenn bezüglich des Bedarfs, des Gehaltes und der Verfügbarkeit von Folaten Klarheit geschaffen ist, kann man entscheiden, ob eine Folatsupplementierung bestimmter Lebensmittel – wie sie zur Zeit in den USA diskutiert wird – nötig und sinnvoll ist.

Literatur

1. Abad AR, Gregory III JF (1987) Determination of folate bioavailability with a rat bioassay. *J Nutr* 117:866–873
2. Abad AR, Gregory III JF (1988) Assessment of folate bioavailability in the rat using extrinsic dietary enrichment with radiolabeled folates. *J Agric Food Chem* 36:97–104
3. Alexander HD, Day EJ, Sauberlich HE, Salmon WD (1956) Radiation effect on water-soluble vitamins in raw beef. *Fed Proc* 15:921

4. Allen BA, Newman RA (1980) HPLC-separation of clinically important folic acid derivatives using ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 190:241–245
5. Anonym (1982) Serumfolate binders are not correlated to folate nutritional status. *Nutr Rev* 40:234
6. Aramouni FM (1986) Dynamics and bioavailability of folates in bovine liver as a function of processing and frozen storage. Dissertation, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical Col
7. Aramouni FM, Godber JS (1991) Folate losses in beef liver due to cooking and frozen storage. *J Food Quality* 14:357–365
8. Augustin J, Beck CB, Kalbfleisch G, Kagel LC (1981) Variation of the vitamin and mineral content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes. *J Food Sci* 46:1697–1700
9. Babu S, Srikantia MSc und SG (1976) Availability of folates from some foods. *Am J Clin Nutr* 29:376–379
10. Babu S, Lakshmaiah N (1987) Availability of food folate by liver folate repletion in rats. *Nutr Rep Intern* 35:831–836
11. Baggott JE, Vaughn WH, Juliana MM, Eto I, Krumdieck CL, Grubbs CJ (1992) Effects of folate deficiency and supplementation on methylnitrosourea-induced rat mammary tumors. *J National Cancer Institute* 84:40–44
12. Bailey LB, Cerda JJ, Block BS, Busby MJ, Vargas L, Chandler CJ, Halsted CH (1984) Effect of age on poly- and monoglutamyl folacin absorption in human subjects. *J Nutr* 114:1770–1776
13. Bailey LB (1988) Factors affecting folate bioavailability. *Food Technology* 42 (10):206–212, 238
14. Bailey LB (1990) The role of folate in human nutrition. *Nutrition today* 25:12–19
15. Bailey LB (1992) Evaluation of a new recommended dietary allowance for folate. *J Am Diet Assoc* 92:463–471
16. Baker H, Jaslow SP, Frank O (1978) Severe impairment of dietary folate utilization in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 26:218–221
17. Baroni MC, Delsignore R, Cuzzupoli M, Candelora P, Passeri M (1991) Kalziumfolat im Alter. *Zeitschrift für Altersmedizin, Geriatrie und Forschung* 1:48–56
18. Bates CJ, Phillips DR (1983) Folic acid – established facts and new horizons. *BNF Nutr Bulletin* 8:81–92
19. Bhandari SD, Gregory III JF (1990) Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity. *Am J Clin Nutr* 51:87–94
20. Bhandari SD, Gregory III JF (1992) Folic acid, 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats. *J Nutr* 122:1847–1854
21. Bills ND, Jones AD, Clifford AJ (1991) Biological activity of racemic folate mixtures fed to folate-depleted rats. *J Nutr* 121:1643–1648
22. Blakley RL (1969) The biochemistry of folic acid and related pteridines. North-Holland Publishing Company, Amsterdam
23. Branfman AR, McComish M (1978) Rapid separation of folic acid derivatives by paired-ion high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 151:87–89
24. Briggs DR, Jones GP, Panadda SE (1982) Isocratic separation of food folacin by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 246:165–168
25. Brody T, Watson JE, Stokstad ELR (1982) Folate pentaglutamate and folate hexaglutamate mediated one-carbon metabolism. *Biochemistry* 21:276–282
26. Brody T, Shane B, Stokstad ELR (1984) Folic acid. In: Machlin LJ (ed) *Handbook of vitamins, nutritional, biochemical and clinical aspects*. Marcel Dekker, New York, pp 459–496
27. Butterworth CE, Newman AJ, Krumdieck CL (1974) Tropical sprue: A consideration of possible etiologic mechanism with emphasis of pteroylpolyglutamate metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assn* 86:11–22
28. Butterworth CE (1991) Folate deficiency and cancer. In: Bendich A, Butterworth CE (eds) *Micronutrients in health and disease prevention*. Marcel Dekker, New York, pp 165–183
29. Cerna J, Kas J (1983) New conception of folacin assay in starch or glycogen containing food samples. *Nahrung* 27:957–964
30. Chapman SK, Greene BC, Streiff RR (1978) A study of serum folate by high-performance ion-exchange and ion-pair partition chromatography. *J Chromatogr* 145:301–306

31. Chen TS, Cooper RG (1979) Thermal destruction of folacin: effect of ascorbic acid, oxygen and temperature. *J Food Sci* 44:713–716
32. Chen TS, Song YO, Kirsch AJ (1983) Effects of blanching, freezing and storage on folacin contents of spinach. *Nutr Rep Internat* 28:317–324
33. Clifford CK, Clifford AJ (1977) High pressure liquid chromatographic analysis of food folates. *J Ass Offic Anal Chem* 69:1248
34. Clifford AJ, Wilson DS, Bills ND (1989) Repletion of folate-depleted rats with an aminoacid-based diet supplemented with folic acid. *J Nutr* 119:1956–1961
35. Clifford AJ, Heid MK, Müller HG, Bills ND (1990) Tissue distribution and prediction of total body folate of rats. *J Nutr* 120:1633–1639
36. Clifford AJ, Jones AD, Bills ND (1990) Bioavailability of folates in selected foods incorporated into aminoacid-based diets fed to rats. *J Nutr* 120:1640–1647
37. Clifford AJ, Heid MK, Peerson JM, Bills ND (1991) Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *J Nutr* 121:445–453
38. Clifford AJ, Bills ND, Peerson JM, Müller H-G, Burk GE, Rich KD (1993) A depletion-repletion folate bioassay based on growth and tissue folate concentrations of rats. *J Nutr* 123:926–932
39. Colman N, Hetiarachchy YN, Herbert V (1981) Detection of a milk factor that facilitates folate uptake by intestinal cells. *Science* 211:1427
40. Cooper RG, Chen TS, King MA (1978) Thermal destruction of folacin in microwave and conventional heating. *J Am Diet Assoc* 73:406–410
41. Cooper BA (1984) Folate: Its metabolism and utilisation. *Clin Biochem* 17:95
42. Couvercelle-Halbwachs C, Baccaunaud M, Castagnos C, Kermarec G, Piau V (1989) Les traitements ionisants: application aux fruits et légumes. *Ann Fais: Exp Chim* 876:183–190
43. Cravo ML, Mason JB, Selhub J, Rosenberg IH (1991) Use of the deoxyuridine suppression test to evaluate localized folate deficiency in rat colonic epithelium. *Am J Clin Nutr* 53:1450–1454
44. Day BPF, Gregory III JF (1981) Determination of folacin derivatives in selected foods by HPLC. *J Agric Food Chem* 29:374–377
45. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1984) Ernährungsbericht 1984. Frankfurt
46. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1985) Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr. Umschau Verlag, Frankfurt/Main, 4. Aufl.
47. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1991) Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr. Umschau Verlag, Frankfurt/Main, 5. Überarbeitung
48. Diehl JF (1990) Safety of irradiated foods. Marcel Dekker, Inc, New York Basel
49. Diehl JF, Hasselmann C, Kilcast D (1991) Sind bestrahlte Lebensmittel ohne Nährwert? *Internat Z Lebensmitteltechnologie und -verfahrenstechnik* 6:314–323
50. Duch DS, Seaton SW, Nichol CA (1983) Analysis of folate cofactor levels in tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 130:385–392
51. Eto I, Krumdieck CL (1982) Determination of three different pools of reduced one-carbon substituted folates III. Reversed-phase HPLC of the azo dye derivatives of p-aminobenzoyl- γ -glutamates and its application to the study of unlabeled endogenous pteroylpolyglutamates of rat liver. *Anal Biochem* 120:323–329
52. Eto I, Krumdieck CL (1986) Role of vitamin B₁₂ and folate deficiencies in carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 206:313–330
53. Farrar G, Blair JA (1989) Folate bioavailability. In: Southgate et al. (eds) *Nutrient availability; chemical and biological aspects*. Royal Soc of Chemistry, London
54. Farrar G, Blair JA (1989) Folate catabolism: site and mechanisms. *Pteridines* 1:216–218
55. Fernandez-Costa F (1981) The specific folate binding capacity of serum. Evidence that levels are not related to folate nutrition but influenced by hormonal status. *J Lab Clin Med* 98:119
56. Finglas PM, Faure U, Southgate DAT (1993) First BCR [Community Bureau of Reference] – intercomparison on the determination of folates in food. *Food Chem* 46:199–213
57. Foo SK, Cichowicz DJ, Shane B (1980) Cleavage of naturally occurring folates to unsubstituted p-aminobenzoylpoly- γ -glutamates. *Anal Biochem* 197:109–115
58. Ford JE, Salter PN, Scott KJ (1969) The folate-binding protein in milk. *J Dairy Res* 36:435–447
59. Gee JM, Bhabuta A, Johnson IT (1989) A technique for assessing the biological availability of folate in foods. *Food Chemistry* 31:149–158
60. Gee JM, Bhabuta A, Johnson IT (1989) Use of the rat for measuring the biological availability of

- folates in foods. In: Southgate et al. (eds) Nutrient availability; chemical and biological aspects. Royal Soc of Chemistry, London, pp 362–364
61. Erster H (1991) Rolle der Folsäure bei der Verhinderung von Neuralrohrdefekten (NRD). *Ernährung* 15:214–216
 62. Ghitis J, Candanosa C (1966) The labile folate in milk. *Am J Clin Nutr* 18:452–457
 63. Givas JK, Gutcho S (1975) pH dependence of the binding of folate to milk binder in radioassay of folates. *Clin Chem* 21:427
 64. Goli DM, Vanderslice JT (1989) Microbiological assays of folacin using a CO₂ analyser system. *J Micronutr Analysis* 6:19–33
 65. Goli DM, Vanderslice JT (1992) Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. *Food Chem* 43:57–64
 66. Gounelle J-C, Ladijimi H, Progmom P (1989) A rapid and specific extraction procedure for folate determination in rat liver and analysis by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Biochem* 176:406–411
 67. Graham DC, Roe DA, Osterdag SG (1980) Radiometric determination and chick bioassay of folacin in fortified and unfortified frozen foods. *J Food Sci* 45:47–51
 68. Gregory III JF, Day BPF, Ristow KA (1982) Comparison of high performance liquid chromatographic, radiometric and *Lactobacillus casei* methods for the determination of folacin in selected foods. *J Food Sci* 47:1568–1571
 69. Gregory III JF (1983) Methods of vitamin assay for nutritional evaluation of food processing. *Food Technol* 13(1):75–80
 70. Gregory III JF, Sartain DB, Day BPF (1984) Fluorimetric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *J Nutr* 114:341–353
 71. Gregory III JF (1988) Recent developments in methods for the assessment of vitamin bioavailability. *Food technology* 42(10):230–238
 72. Gregory III JF (1989) Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. In: *Advances in food and nutrition research*, Vol 33. Academic Press, pp 1–101
 73. Gregory III JF, Bailey LB, Toth JP, Cerda JJ (1990) Stable-isotope methods for assessment of folate bioavailability. *Am J Clin Nutr* 51:212–215
 74. Gregory III JF, Bhandari SD, Bailey LB, Toth JP, Baumgartner TG, Cerda JJ (1991) Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human studies. *Am J Clin Nutr* 53:736–740
 75. Gregory III JF, Bhandari SD, Bailey LB, Toth JP, Baumgartner TG, Cerda JJ (1992) Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl tetrahydrofolates and folic acid in human subjects. *Am J Clin Nutr* 55:1147–1153
 76. Gregory III JF (1993) Benefits and problems of radioactive and stable isotopes in studying the bioavailability of vitamins. In: Schlemmer U (ed) *Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability*. Ettlingen, May 9–12, 1993. Proceedings part 2, pp 279–288
 77. Grossowicz N, Rachmilewitz M, Izak G, Galewski K (1973) Absorption of liver folates from small intestinal segments of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:387–389
 78. Grossowicz N, Rachmilewitz M, Izak G (1975) Utilization of yeast polyglutamate folates in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 150:77–79
 79. Hages M, Märgel C, Pietrzik K (1987) Folsäure – ein kritisches Vitamin; eine Übersicht zum aktuellen Stand der Forschung. *Vita Min Spur* 2:155–169
 80. Hages M, Pietrzik K (1987) Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Folsäure aus unterschiedlichen Dosierungen. *Ern-Umschau* 9:298–302
 81. Hahn A (1990) Zum Mechanismus der intestinalen Aufnahme von Pteroylmonoglutaminsäure. Dissertation, Wissenschaftlicher Fachverlag, Gießen
 82. Hahn A, Rehner G (1990) Analytik von Folsäure-Derivaten. *Ern-Umschau* 37:356–364
 83. Hahn A, Flaig H, Rehner G (1991) Optimized high-performance liquid chromatographic procedure for the separation and determination of the main folacins and some derivatives. *J Chromatogr* 545:91–100
 84. Hansen SI (1981) Evidence, that the low-affinity folate binding protein in erythrocyte hemolysate is identical to hemoglobin. *Clin Chem* 27:1247–1249

85. Hawkes JG, Villota R (1989) Folates in foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. *Critical Rev Food Sci Nutr* 28:439–538
86. Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH, Clifford AJ (1992) Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice. *J Nutr* 122:888–894
87. Herbert V, Bertino JR (1967) Folic acid. In: György P, Pearson WN (eds) *The vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods*. Academic Press, New York, Vol VII, 2. ed, pp 243–276
88. Herbert V (1985) The inhibition and promotion of cancers by folic acid, vitamin B₁₂ and their antagonists. In: Finley JW, Schwass DW (eds) *Xenobiotic metabolism: nutritional effects*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 31–37
89. Herbert V (1990) Development of human folate deficiency. In: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory III JF (eds) *Folic acid metabolism in health and disease*. Wiley-Liss, Inc, New York, pp 195–210
90. Hoppner K, Lampi B, Smith DC (1977) Data on folacin activity in foods: availability, applications and limitations. In: *Folic Acid*. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, DC, chapt 6, pp 69–81
91. Hoppner K, Lampi B (1983) Reversed phase high pressure liquid chromatography of folates in human whole blood. *Nutr Rep Intern* 27:911–919
92. Hoppner K, Lampi B (1985) Liver folacin as a response parameter for a folacin bioassay in rats. *Nutr Rep Intern* 3:203–211
93. Hoppner K, Lampi B (1986) Bioavailability of food folacin as determined by rat liver bioassay. *Nutr Rep Intern* 34:489–494
94. Hoppner K, Lampi B (1986) Effect of aspirin ingestion on folate bioavailability evaluated by rat liver bioassay. In: Cooper BA (ed) *Chemistry and biology of pteridines*. Berlin, pp 531–537
95. Hoppner K, Lampi B (1988) Antacid ingestion and folate bioavailability in the rat. *Nutr Rep Intern* 38:539–546
96. Hoppner K, Lampi B (1991) Improving the response of the rat liver folate bioassay. *J Nutritional Biochemistry* 2:319–322
97. Hoppner K, Lampi B (1991) Bioavailability of folate following ingestion of cholestyramine in the rat. *Int J Vit Nutr Research* 61:130–134
98. Hoppner K, Lampi B (1992) Effect of nitrite ingestion on the bioavailability of folate in the rat. *Int J Vit Nutr Research* 62:244–247
99. Hoppner K, Lampi B (1993) Folate retention in dried legumes after different methods of meal preparation. *Food Research International* 26:45–48
100. Horne DW, Briggs WT, Wagner C (1981) HPLC-separation of the naturally occurring folic acid monoglutamate derivatives. *Anal Biochem* 116:393–397
101. Horne DW, Holloway RS, Said HM (1992) Uptake of 5-formyltetrahydrofolate in isolated rat liver mitochondria is carrier-mediated. *J Nutr* 122:2204–2209
102. Joosten E, Van den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 58:468–476
103. Kas J, Cerna J (1976) Chromatography of folates on Sephadex G-10. *J Chromatogr* 124:53–59
104. Kashani SA, Cooper BA (1985) Endogenous folate of normal fibroblasts using high-performance liquid chromatography and modified extraction procedure. *Anal Biochem* 146:40–47
105. Keagy PM, Oace SM (1982) Development of a folacin bioassay in rats. *J Nutr* 112:87–91
106. Keagy PM, Oace SM (1984) Folic acid utilization from high fiber diets in rats. *J Nutr* 114:1252–1259
107. Keagy PM (1985) Rat bioassay of folate monoglutamate, heptaglutamate and wheat bran. *Fed Proc* 44:777
108. Keagy PM, Shane B, Oace SM (1988) Folate bioavailability in humans: Effects of wheat bran and beans. *Am J Clin Nutr* 47:80–88
109. Keagy PM, Oace SM (1989) Rat bioassay of wheat bran folate and effects of intestinal bacteria. *J Nutr* 119:1932–1939
110. Keagy PM (1990) Animal assays for folate bioavailability: A critical evaluation. In: Picciano MFP, Stokstad ELR, Gregory III JF (eds) *Folic acid metabolism in health and disease*. Wiley-Liss, Inc, New York, pp 139–150
111. Kisliuk RL (1981) Pteroylpolyglutamates. *Mol Cell Biochem* 39:331–345
112. Kohashi M, Honda S, Iwai K (1985) Denaturation of the folate-binding protein in pasteurized milk. *Agric Biol Chem* 49:1885–1886

113. Kohashi M, Inoue K, Sotobayashi H, Iwai K (1986) Microdetermination of folate monoglutamates in serum by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 382:303–307
114. Kones R (1990) Folic acid, 1991: An update, with new recommended daily allowances. *Southern Medical Journal* 83:1454–1458
115. Krumdieck CL, Tamura T, Eto J (1983) Synthesis and analysis of the pteroylpolyglutamates. *Vitam Horm* 40:45–104
116. Ladjimi H, Gounelle J-CI, Auchere D (1992) Effect of diet on folate levels and distribution in selected tissues of the rat. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique* 100:67–72
117. Lankelma J, Van der Kleijn E, Lansen MJT (1980) Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid in plasma and spinal fluid by HPLC, using on-column concentration and electrochemical detection. *J Chromatogr* 182:35–45
118. Loew D, Eberhardt A, Hesecker H, Kübler W (1987) Zur Plasmakinetik und Elimination der Folsäure. *Klin Wochenschr* 65:520–524
119. Mallin JD (1977) Total folate activity in Brussels sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic acid content. *J Food Technol* 12:623–632
120. Martin JJ, Landen WO, Soliman AM, Eitenmiller RR (1990) Application of a trienzyme extraction for total folate determination in foods. *J Assoc Anal Chem* 73:805–808
121. Maruyama T, Shiota T, Krumdieck CL (1978) The oxidative cleavage of folates – a critical study. *Anal Biochem* 84:277–296
122. McCormack JJ, Newman RA (1986) Chromatographic studies of folic acid and related compounds. In: De Leenheer AP, Lambert WE, De Ruyter MGM (eds) *Modern chromatographic analysis of the vitamins*. Marcel Dekker, Inc, New York Basel
123. McGuffin R, Toff P, Hillman RS (1975) The effect of diet and alcohol on the development of folate deficiency in the rat. *Br J Haematol* 31:185–192
124. McMartin KE, Virayotha V, Tephly TR (1981) High-pressure liquid chromatography separation and determination of rat liver folates. *Arch Biochem Biophys* 209:127–136
125. MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council vitamin study. *Lancet (British edition)* 338:131–137
126. Müller H (1991) Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Lebensmitteln – der Einfluß der Verarbeitung auf das Verteilungsmuster. *Ern-Umschau* 38:101
127. Müller H (1993) Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Gemüse und Obst mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Z Lebensm Unters Forsch* 196:137–141
128. Müller H (1993) Die Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Lebensmitteln tierischer Herkunft mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Z Lebensm Unters Forsch* 196:518–521
129. Müller H (1993) Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Getreide, Getreideprodukten, Backwaren und Hülsenfrüchten mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). *Z Lebensm Unters Forsch*, 197:573–577
130. Mullin WJ, Wood DF, Howsam SG (1982) Some factors affecting folacin content of spinach, swiss chard, broccoli and brussels sprouts. *Nutr Rep Internat* 26:7–16
131. O'Broin JD, Temperley IJ, Brown JP, Scott JM (1975) Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *Am J Clin Nutr* 28:438–444
132. Paine-Wilson B, Chen TS (1979) Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. *J Food Sci* 44:717–722
133. Pearson AJ (1974) Kinetics and mechanism of the autoxidation of tetrahydropterins. *Chem Ind* 6:233
134. Perloff BP, Butrum RR (1977) Folacin in selected foods. *J Am Diet Ass* 70:161–172
135. Perry J, Chanarin I (1970) Intestinal absorption of reduced folate compounds in man. *Br J Haematol* 18:329–339
136. Pfeiffer C (1993) Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Folaten mit Hilfe der HPLC, Einfluß der ionisierenden Bestrahlung auf den Gehalt und die Bioverfügbarkeit von Folaten in Lebensmitteln. Dissertation, Universität Karlsruhe
137. Phillips DR, Wright AJA (1982) Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates. *Br J Nutr* 47:183–189
138. Pietrzik K (1993) Problems of folate bioavailability. In: Schlemmer U (ed) *Bioavailability '93*.

- Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability. Ettlingen, May 9–12, 1993. Proceedings part 2, pp 289–299
139. Rao DR, Reddy AV, Pulusani SR, Cornwell PE (1984) Biosynthesis and utilisation of folic acid and vitamin B₁₂ by lactic cultures in skim milk. *J Dairy Sci* 67:1169–1174
 140. Rebello T (1987) Trace enrichment of biological folates on solid-phase adsorption cartridges and analysis by HPLC. *Anal Biochem* 166:55–64
 141. Reed LS, Archer MC (1976) Separation of folic acid derivatives by HPLC. *J Chromatogr* 121:100–103
 142. Reed LS, Archer MC (1979) Action of sodium nitrite on folic acid and THF. *J Agric Food Chem* 27:995
 143. Reed LS, Scott JM (1980) Identification of the intracellular folate coenzymes of different cell types. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, Vol 66 (Vitamins and coenzymes, part E), pp 501–507
 144. Reingold RN, Picciano MF, Perkins EG (1980) Separation of folate derivatives by in situ paired-ion HPLC. *J Chromatogr* 190:237–240
 145. Reingold RN, Picciano MF (1982) Two improved HPLC-separations of biologically significant forms of folate. *J Chromatogr* 234:171–179
 146. Rhode BM, Cooper BA, Farmer FA (1983) Effect of orange juice, folic acid, and oral contraceptives on serum folate in women taking a folate-restricted diet. *J Am Coll Nutr* 2:221–230
 147. Richardson LR, Martin JL, Hart S (1958) The activity of certain water-soluble vitamins after exposure to gamma radiations in dry mixtures and in solutions. *J Nutr* 65:409–418
 148. Ristow KA, Gregory III JF, Damron BL (1982) Effects of dietary fiber on the bioavailability of folic acid monoglutamate. *J Nutr* 112:750–758
 149. Ristow KA, Gregory III JF, Damron BL (1982) Thermal processing effects on folacin bioavailability in liquid model systems, liver and cabbage. *J Agric Food Chem* 30:801–806
 150. Robinson DR (1971) The nonenzymatic hydrolysis of 5-N,10-N-methenyltetrahydrofolic acid and related reactions. In: Chyntil F (ed) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, Vol 18B, pp 716–725
 151. Rodriguez MS (1978) A conspectus of research on folacin requirements of man. *J Nutr* 108:1983–2075
 152. Rong NI, Selhub J, Goldin BR, Rosenberg IH (1991) Bacterially synthesized folate in rat large intestine is incorporated into host tissue folyl polyglutamates. *J Nutr* 121:1955–1959
 153. Rosenberg IH, Godwin HA (1971) Inhibition of intestinal α -glutamyl carboxypeptidase by yeast nucleic acid: An explanation of variability in utilization of dietary polyglutamyl folate. *J Clin Invest* 50:78a
 154. Rosenberg IH (1990) 1989 Herman Award Lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. *Am J Clin Nutr* 51:531–534
 155. Rosenberg IH (1992) Could food labels be dangerous to health? *Nutr Rev* 50:298–299
 156. Russell RM, Dhar GJ, Dutta SK, Rosenberg IH (1979) Influence of intraluminal pH on folate absorption: Studies in control subjects and in patients with pancreatic insufficiency. *J Lab Clin Med* 93:428–436
 157. Santini R, Brewster C, Butterworth CE (1964) The distribution of folic acid and active compounds in individual foods. *Am J Clin Nutr* 14:205–210
 158. Schieffer GM, Wheeler GP, Cimino CO (1984) Determination of folic acid in commercial diets by anion exchange solid phase extraction and subsequent reversed-phase HPLC. *J Liq Chromatogr* 7:2659–2669
 159. Schulz A (1986) HPLC-Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Folsäure-Derivaten: Methodische Grundlagen für die Folatanalytik in Lebensmitteln. Dissertation, Gießen
 160. Scott JM, Weir DG (1976) Folate composition, synthesis and function in natural materials. *Clin Haemat* 5:547–568
 161. Scott JM (1980) Thin-layer chromatography of pteroylmonoglutamates and related compounds. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, Vol 66 (Vitamins and coenzymes, part E), pp 437–443
 162. Selhub J, Powell GM, Rosenberg IH (1984) *Am J Physiol* 246:G515–G520
 163. Shane B, Tamura T, Stokstad ELR (1980) Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. *Clin Chim Acta* 100:13–19

164. Shane B (1982) High performance liquid chromatography of folates: identification of poly- γ -glutamates chain lengths of labeled and unlabeled folates. *Am J Clin Nutr* 35:599–608
165. Souci, Fachmann, Kraut (1989/90) Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 4. revidierte und ergänzte Ausgabe
166. Steinberg SE, Stephen E (1984) Mechanisms of folate homeostasis. *Am J Physiol* 246:319–324
167. Stout RW, Cashmore AR, Coward JK, Horvath CG, Bertino JR (1976) Separation of substituted pteroyl-monoglutamates and pteroyl- γ -L-glutamates by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 71:119–124
168. Streiff RR (1971) Folate levels in citrus and other juices. *Am J Clin Nutr* 24:1390–1392
169. Svendsen I, Hansen SI, Holm J (1984) The complete amino acid sequence of the folate binding protein from cow's milk. *Carlsberg Res Commun* 49:123
170. Swiatlo N, O'Connor DL, Andrews J, Picciano MF (1990) Relative folate bioavailability from diets containing human, bovine and goat milk. *J Nutr* 120:172–177
171. Tafolla WH, Sarapu AC, Dukes GR (1981) Rapid and specific high pressure liquid chromatographic assay for folic acid in multivitamin-mineral pharmaceutical preparations. *J Pharm Sci* 70:1273–1276
172. Taguchi H, Hara K, Hasei T (1973) Study of the folic acid contents of foods. (II) Loss of folate in foods by boiling. *Vitamins* 47:21–25
173. Tamura T, Shin YS, Williams MA, Stokstad ELR (1972) *Lactobacillus casei* response to pteroylpolyglutamates. *Anal Biochem* 49:517–521
174. Tamura T, Stokstad ELR (1973) The availability of food folate in man. *Brit J Haematol* 25:513–532
175. Tani M, Iwai K (1983) HPLC-separation of physiological folate monoglutamate compounds – investigation of absorption and conversion of pteroylglutamic acid in the small intestine of the rat in situ. *J Chromatogr* 267:175–181
176. Tannenbaum SR, Young VR, Archer MC (1985) In: Fennema OR (ed) Food chemistry. Marcel Dekker, Inc, New York Basel, p 504
177. Thayer DW (1990) Food irradiation: benefits and concerns. *J Food Quality* 13:147–169
178. Thayer DW, Fox JB, Lakritz L (1991) Effects of ionizing radiation on vitamins. In: Thorne S (ed) Food irradiation. Elsevier Applied Science, London New York, pp 285–325
179. Tönne J (1974) Über die Anwendung chemischer und enzymatischer Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Folsäure-Derivaten. Dissertation, Bonn
180. Von der Porten AE, Gregory III JF, Toth JP, Cerda JJ, Curry SH, Bailey LB (1992) In vivo folate kinetics during chronic supplementation of human subjects with deuterium-labeled folic acid. *J Nutr* 122:1293–1299
181. Wachol-Drewek Z, Roczniak B, Grabowska E (1986) Soft ripened cheese as a source of folacin. *Przem Spozyw* 40:216
182. Walzem RL, Clifford CK, Clifford AJ (1983) Folate deficiency in rats fed amino acid diets. *J Nutr* 113:421–429
183. Walzem RL, Clifford AJ (1988) Folate deficiency in rats fed diets containing free amino acids or intact proteins. *J Nutr* 118:1089–1096
184. Wang TTY, Reisenauer AM, Halsted CH (1985) Comparison of folate conjugase activities in human, pig, rat and monkey intestine. *J Nutr* 115:814–819
185. Wang TTY, Chandler CJ, Halsted CH (1986) Intracellular pteroylpolyglutamate hydrolase from jejunal mucosa – isolation and characterization. *J Biol Chem* 261:13551–13555
186. Wegner C, Trotz M, Nau H (1986) Direct determination of folate monoglutamates in plasma by high-performance liquid chromatography using an automatic precolumn-switching system as sample clean-up procedure. *J Chromatogr* 378:55–65
187. Whiteley JM, Russell R (1981) Structural reassignment of the peroxide oxidation product of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate. *Biochim Biophys Res Commun* 101:1259–1265
188. WHO (1981) Wholesomeness of irradiated food. Techn Rept Series 659. WHO, Geneva
189. WHO (1988) Food irradiation. A technique for preserving and improving the safety of food. Geneva
190. Williams WM, Huang KC (1982) Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey. *Am J Physiol* 242:484
191. Wilson SD, Horne DW (1983) Evaluation of ascorbic acid in protecting labile folic acid derivatives. *Proc Nat Acad Sci USA* 80:6500–6504
192. Wilson SD, Horne DW (1984) High-performance liquid chromatographic determination of the distribution of naturally occurring folic acid derivatives in rat liver. *Anal Biochem* 142:529–535

193. Wilson SD, Horne DW (1986) High-performance liquid chromatographic separation of the naturally occurring folic acid derivatives. In: Chytil F, McCormick DB (eds) *Methods in enzymology*. Academic Press, London, Vol 122 (part G)
194. Wright AJA, Phillips DR (1984) Effect of choice of calibration curve range on results of *Lactobacillus casei* assay of folate. *Proc Nutr Soc* 43:24A
195. Wright AJA, Phillips DR (1985) The threshold growth response of *Lactobacillus casei* to 5-methyltetrahydrofolic acid: Implications for folate assays. *Brit J Nutr* 53:569–573
196. Zakrzewski SF, Nichol CA (1966) Labile reduced derivatives of pteroylglutamic acid. *Fed Proc* 15:390

Eingegangen 12. November 1993
akzeptiert 20. Januar 1994

Für die Verfasser:

Prof. Dr. J.F. Diehl, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstr. 20, 76131 Karlsruhe