

**ALVA-
FORSCHUNGSPREIS**



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-
UND AGRARWESEN

Der erweiterte Vorstand der
Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen
hat in seiner Sitzung vom 7. März 2023 beschlossen

Frau Dipl.-Ing. Dr. nat. tech. Sabrina Van den Oever

den

ALVA-Forschungspreis 2023

zu verleihen.

Der Vorstand der ALVA bekundet Ihnen hiermit, sehr geehrte
Frau Dipl.-Ing. Dr. nat. tech. Sabrina Van den Oever,
eine hervorragende Dissertation abgefasst zu haben, die jene
Fachgebiete betrifft, die von der ALVA vertreten und bearbeitet
werden und daher für die weitere wissenschaftliche Arbeit
innerhalb der ALVA von großer Bedeutung ist.

Linz, am 22. Mai 2023

Univ.-Doz. Dr. Gerhard BEDLAN
Präsident

Mag. Astrid PLENK
Vizepräsidentin

Dipl.-Ing. Martin ROGENHOFER
Geschäftsführer

Spermidin und Vitamin B₁₂ als analytische Herausforderungen bei der Untersuchung von Nahrungsergänzungsmitteln

Spermidine and vitamin B12 as analytical challenges in monitoring nutritional supplements

Sabrina P. Van den Oever, Helmut K. Mayer

Einleitung

Ultrahochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (UHPLC) gehört zu den wichtigsten Werkzeugen in der analytischen Chemie zur Qualitätskontrolle verschiedener Lebensmittel. Durch die Entwicklung sogenannter „sub-2 µm-Partikel“ wurde die Effizienz gesteigert, sodass eine erhöhte Flussgeschwindigkeit und Auflösung erreicht werden konnten (SWARTZ und MURPHY, 2005). Bei der Entwicklung und Produktion von bestimmten Nahrungsergänzungsmitteln können komplexe Lebensmittelmatrices entstehen, welche Anpassungen bestehender UHPLC-Methoden erfordern.

Das Polyamin Spermidin hat stark an Bedeutung gewonnen wegen vieler potenzieller Vorteile für die menschliche Gesundheit, da es unter anderem als „Anti-Aging“-Substanz beschrieben wird. Natürlich vorkommende Polyamine kommen in allen Säugetierzellen vor, und haben spezifische physiologische und regulatorische Funktionen, die sie unentbehrlich für das Zellwachstum und die Proteinbiosynthese machen, aber auch entzündungshemmende Eigenschaften und antioxidative Aktivitäten wurden berichtet. Eine erhöhte orale Aufnahme von Spermidin mit der Nahrung soll die Stressresistenz erhöhen sowie das Auftreten von altersbedingten Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Krankheiten und den Verlust der motorischen Fähigkeiten reduzieren (MADEO et al., 2010). Etliche Spermidin-reiche Nahrungsergänzungsmittel wurden in den letzten Jahren auf Basis verschiedener Rohstoffe wie Sojabohnen, Weizenkeimen oder Algen entwickelt. Neben Spermidin findet man auch oligomere Proanthocyanidine (OPC; werden als kondensierte Tannine klassifiziert und sind weit verbreitet z.B. in Kakao, Äpfeln, Traubenkernen und Preiselbeeren) in diversen Präparaten, da auch OPC mit positiven Wirkungen auf die menschliche Gesundheit beworben werden. Die UHPLC-Analyse von Spermidin könnte in Gegenwart von OPC durch Wechselwirkungen beeinflusst werden, sodass eine exakte Quantifizierung erschwert wird. Daher wurde der Einfluss von oligomeren Proanthocyanidinen auf die UHPLC-Analyse von Spermidin untersucht, weil Spermidin in einem handelsüblichen Nahrungsergänzungsmittel, das beide gesundheitsfördernden Verbindungen (Spermidin + OPC) enthält, nicht (vollständig) nachgewiesen werden konnte.

Neben Spermidin wurden in den letzten Jahren unzählige Nahrungsergänzungsmittel für Vitamin B₁₂ (Cobalamin) auf den Markt gebracht. Vitamin B₁₂ spielt eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung. Vor allem wegen seines Fehlens in pflanzlichen Lebensmitteln ist Vitamin B₁₂ insbesondere bei einer streng veganen Ernährungsweise ein kritischer Nährstoff. Daher haben algenbasierte Nahrungsergänzungsmittel in der Lebensmittelwissenschaft eine enorme Bedeutung erlangt, da Algen als pflanzliche Quelle für das Vitamin gelten. Die Mikroalgen *Chlorella* sowie die sogenannte „Blaualge“ *Spirulina* (*Arthrospira* spp.; *Spirulina* als Einzeller gehört eigentlich zu den Cyanobakterien, wird aber zu den Mikroalgen gezählt) werden vorrangig für Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Beide Mikroalgen sind reich an Vitamin B₁₂, aber es könnte einen Unterschied geben zwischen Nahrungsergänzungsmitteln auf Basis von *Chlorella* oder *Spirulina* bezüglich der Bioverfügbarkeit des Vitamins. Bestimmte Algenarten (darunter unter anderem *Spirulina*) produzieren eine Form von Vitamin B₁₂, die für den menschlichen Körper biologisch nicht verfügbar ist (BITO et al., 2016; WELLS et al., 2017). Dies kann daher zu Produkten führen, die keinen Nutzen für den menschlichen Körper haben, aber teuer und mit Qualitätsversprechen vermarktet werden. Daher sollten auch in der Routineanalytik Methoden zur Differenzierung verschiedener Formen von Vitamin B₁₂ etabliert werden.

Material und Methoden

Spermidin: Um Spermidin und andere Polyamine mittels optischer Detektoren nachweisen zu können, bedarf es einer Derivatisierung der Aminogruppe. Diese chemische Reaktion kann mit verschiedenen

Reagenzien erfolgen, hier wurde „AQC“ verwendet. Vor allem Spermidin ist als AQC-Derivat jedoch instabil, was die Analyse erschwert. Die chromatographische Trennung von AQC-Derivaten wurde mit einer Waters Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC™) durchgeführt unter Verwendung eines Acquity™ TUV-Detektors sowie eines Acquity™ Fluoreszenz-Detektors (VAN DEN OEVER und MAYER, 2022a). Ein sich in der Produktentwicklungsphase befindendes OPC haltiges Nahrungsergänzungsmittel mit hohem Spermidin-Gehalt wurde untersucht, jedoch konnte kein Spermidin nachgewiesen werden. Daraufhin wurden Spiking-Experimente mit anderen Spermidin haltigen Rohstoffen (Weizenkeime, Gerste und Algenpulver) sowie einem OPC-Präparat durchgeführt.

Vitamin B₁₂: Cobalamin gilt als analytisch herausfordernde Verbindung wegen seiner komplexen chemischen Struktur sowie der vielen möglichen nativen Formen („Vitamere“) und verschiedenen Analoga. Falsch-positive Ergebnisse können durch das sogenannte „Pseudo-Cobalamin“ (analoge Form; unterer Ligand substituiert) verursacht werden. Daher wurde eine schnelle, einfache und zuverlässige UHPLC-Methode basierend auf UV-Detektion zur chromatografischen Trennung von physiologisch aktivem Vitamin B₁₂ und seiner nicht-aktiven Pseudo-Form entwickelt. Die chromatographische Analyse wurde auf einer Waters Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC™) H-Class ausgestattet mit einem Acquity™ Photodiodenarray (PDA) e λ -Detektor zur Quantifizierung durchgeführt. Zur korrekten Identifizierung von Cyanocobalamin und Pseudocyanocobalamin wurde im Rahmen der Methodenentwicklung ein Massenspektrometer (Acquity™ QDa single Quadrupol-Massendetektor) verwendet (VAN DEN OEVER und MAYER, 2022b). Die entwickelte Methode wurde nach dem EURACHEM-Guide validiert. Anschließend wurden insgesamt 57 algenbasierte Nahrungsergänzungsmittel ($n = 41$ gekennzeichnet als *Chlorella sp.*; $n = 14$ als *Spirulina sp.*; $n = 1$ gekennzeichnet als *Chlorella* und *Spirulina sp.*; und $n = 1$ als weiteres Cyanobakterium markiert) untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Da **Spermidin** in dem OPC haltigen Nahrungsergänzungsmittel mit dieser bereits gut etablierten und optimierten UHPLC-Methode nicht nachgewiesen werden konnte, wurden verschiedene Spiking- und Misch-Experimente durchgeführt, um herauszufinden, ob es zu Wechselwirkungen mit OPC kommt. Diese Wechselwirkungen zwischen Polyaminen und OPC könnten zu dramatisch niedrigeren Werten oder sogar zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Ein reiner Spermidin-Standard wurde sowohl von dem OPC haltigen Spermidin-Produkt als auch von einem OPC-Extrakt sofort gebunden, und es kam zu einer deutlichen Reduktion der gefundenen Spermidin-Restkonzentration. Extrakte aus Weizenkeimen, Gerste und Algenpulver führten zu keiner Reduktion der dazugegebenen Konzentration des Spermidin-Standards. Wurden jedoch diese Rohstoffe sowohl mit dem OPC haltigen Nahrungsergänzungsmittel als auch einem OPC-Extrakt gemischt, kam es ebenfalls zu einer Reduktion der gefundenen Spermidin-Restkonzentration, diese war jedoch unterschiedlich stark zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Probenmatrix der Rohstoffe einen Einfluss auf die Bindung von Spermidin durch OPC hat. Reines Spermidin hat eine hohe Affinität, von OPC gebunden zu werden (was zu falsch-negativen Resultaten führen kann).

Die Ergebnisse der 57 im Handel erhältlichen Nahrungsergänzungsmitteln auf Algenbasis zeigten eine große Spannbreite im Gesamtgehalt an **Vitamin B₁₂**, diese war im Bereich von nicht nachweisbar bis 445 $\mu\text{g}/100\text{g}$ für *Chlorella*-Proben, und zwischen 92 und 164 $\mu\text{g}/100\text{g}$ für *Spirulina*-Produkte. Aber neben der großen Bandbreite bezüglich des Gesamtgehalts gab es auch große Abweichungen in der Konzentration von Pseudo-Vitamin B₁₂ in allen analysierten Proben. *Chlorella*-Produkte enthielten hauptsächlich und in höheren Mengen physiologisch aktives Vitamin B₁₂. Im Gegensatz dazu enthielten als *Spirulina* gekennzeichnete Nahrungsergänzungsmittel große Mengen an Pseudo-Vitamin B₁₂ bezogen auf den Gesamtgehalt. Der relative Prozentsatz von Pseudocobalamin lag bei *Spirulina*-Präparaten zwischen 72 und 98%. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, geeignete analytische Methoden zur Bestimmung und Unterscheidung von Vitamin B₁₂ und seiner Pseudo-Form in Nahrungsergänzungsmitteln aus Algen zu etablieren. Die exakte Quantifizierung des Gesamtgehalts an (physiologisch aktivem) Vitamin B₁₂ ist nicht nur für Lebensmittelanalytiker relevant, sondern auch für den Verbraucherschutz, da sich Konsumenten auf eine korrekte Kennzeichnung der Produkte verlassen können müssen. Nahrungsergänzungsmittel mit einem hohen Gehalt an Pseudo-Vitamin B₁₂ dürfen nicht (mehr) als gute Quelle

für das Vitamin beworben werden (um eine Irreführung bzw. Täuschung von Konsumenten solcher Vitamin B₁₂-Präparate aus Algen in Zukunft zu vermeiden).

Zusammenfassung

Bei der Entwicklung und Produktion von bestimmten Nahrungsergänzungsmitteln können komplexe Lebensmittelmatrices entstehen, welche Anpassungen bestehender UHPLC-Methoden erfordern. Die Mischung aus Spermidin und oligomeren Proanthocyanidinen (OPC) hat einige Herausforderungen mit sich gebracht, da der Gehalt von Spermidin mit einer etablierten Methode aufgrund von Interferenzen mit OPC nicht (vollständig) nachweisbar war. Ein weiteres wichtiges Thema in der Lebensmittelkontrolle ist die chromatographische Trennung und Bestimmung von Vitameren und Analoga eines Vitamins. Bei Vitamin B₁₂ sind geeignete analytische Methoden erforderlich, die eine Unterscheidung des Vitamins und seiner biologisch nicht-aktiven Pseudo-Form ermöglichen, was vor allem in Nahrungsergänzungsmitteln aus Algen entscheidend ist, da diese große Mengen an Pseudo-Vitamin B₁₂ enthalten können.

Abstract

The development and production of certain nutritional supplements can result in complex food matrices requiring further adaption of existing UHPLC methods. The mixture of spermidine and oligomeric proanthocyanidins (OPC) has brought up some challenges since the content of spermidine was not (fully) detectable using a well-established method due to interference with OPC. Another important issue in food control is the chromatographic separation and determination of vitamers and analogues of one specific vitamin. Regarding vitamin B₁₂, appropriate analytical methods are required for the reliable differentiation of the vitamin and its biologically non-active pseudo-form, which is relevant especially in algae-based nutritional supplements.

Literatur

BITO T, BITO M, ASAI Y, TAKENAKA S, YABUTA Y, TAGO K, OHNISHI M, MIZOGUCHI T, WATANABE F (2016): Characterization and quantitation of vitamin B₁₂ compounds in various Chlorella supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8516-8524.
MADEO F, EISENBERG T, BÜTTNER S, RUCKENSTUHL C, KROEMER G (2010): Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy*, 6, 160-162.
SWARTZ ME, MURPHY B (2005): *New Frontiers in Chromatography*. American Laboratory, 22-27.
VAN DEN OEVER SP, MAYER HK (2022a): Can oligomeric proanthocyanidins interfere with UHPLC analysis of spermidine in nutritional supplements? *Journal of Food Composition and Analysis*, 109, 104466.
VAN DEN OEVER SP, MAYER HK (2022b): Biologically active or just “pseudo”-vitamin B₁₂ as predominant form in algae-based nutritional supplements? *Journal of Food Composition and Analysis*, 109, 104464.
WELLS ML, POTIN P, CRAIGIE JS, RAVEN JA, MERCHANT SS, HELLIWELL KE, SMITH AG, CAMIRE ME, BRAWLEY SH (2017): Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29, 949-982.

Adressen der Autoren

Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Institut für Lebensmittelwissenschaften, Muthgasse 11, A-1190 Wien

* Ansprechpartner: DI Dr. Sabrina VAN DEN OEVER, sabrina.van-den-oever@boku.ac.at